Stammesspezifische Unterschiede in der analgetischen Wirkung von Buprenorphin bei der Maus

---

vorgelegt von
Master of Science
Juliane Rudeck
geb. in Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Roland Lauster
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Jens Kurreck
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Gilbert Schönfelder
Dritter Gutachter:	Prof. Dr. Lars Lewejohann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 08.10.2018

Berlin 2018

Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation in allen Teilen von mir selbstständig angefertigt wurde und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben worden sind.“

Berlin, den _____

(Juliane Rudeck)

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Die Arbeit wurde am Bundesinstitut für Risikobewertung in der Abteilung Experimentelle Toxikologie und ZEBET angefertigt und gefördert vom BMBF (Grant No. 031A262D).

Die Inhalte der hier vorliegenden Dissertation wurden teilweise bereits in wissenschaftlichen Journalen veröffentlicht bzw. Eingereicht zur Veröffentlichung. Diese sind im Folgenden aufgelistet.

J. Rudeck, B. Bert, P. Marx-Stoelting, G. Schönfelder, S. Vogl, Liver lobe and strain differences in the activity of murine cytochrome P450 enzymes. Toxicology, (2018). Jul 1; 404-405:76-85. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.06.001>.

J. Rudeck, S. Vogl, C. Heint, M. Steinfath, B. Bert, G. Schönfelder, Analgesic efficacy of buprenorphine depends on the mouse strain. Submitted for publication, (2018).

J. Rudeck, B. Bert, S. Vogl, G. Schönfelder, L. Lewejohann, The effectiveness of habituation on experimental design: A retrospective analysis. In progress, (2018).

Zusammenfassung

Die Verwendung einer optimalen Analgesie sollte oberste Priorität in der Versuchstierkunde haben und ist nicht nur aus ethischen, sondern auch aus rechtlichen Gründen verpflichtend. Laut nationalen und internationalen Versuchstierstatistiken ist die Maus mit ca. 70 % die am häufigsten verwendete Spezies. Opioide werden gewöhnlich zur perioperativen Behandlung von moderaten bis schweren Schmerzen eingesetzt. Aufgrund der langanhaltenden Wirkung und geringen unerwünschten Nebenwirkungen wird für die Spezies Maus bevorzugt das Opioid Buprenorphin verwendet. Unterschiedliche Empfehlungen bzgl. Dosierung, Applikationsart und -intervall führen jedoch zu Unstimmigkeiten in dessen Anwendung. Obwohl mausstammspezifische Unterschiede in der Wirkung von Opioiden bekannt sind, sind diese bisher für die analgetische Wirkung von Buprenorphin noch nicht eindeutig geklärt und finden daher keine Berücksichtigung in den Empfehlungen. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher, den analgetischen Effekt von Buprenorphin in drei häufig verwendeten Maus-Inzuchtstämmen (C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ) zu untersuchen und zu prüfen, ob eventuelle Unterschiede in der Wirkung auf eine veränderte Metabolisierung zurückzuführen sind. Hierfür wurden die basale Schmerzempfindlichkeit sowie der analgetische Effekt von Buprenorphin (0,42 mg/kg, 4,0 mg/kg) unter Verwendung der *Incremental Hot Plate in vivo* getestet. Serum- und Gehirnkonzentrationen von Buprenorphin und seiner Metaboliten wurden bestimmt, um ggf. pharmakokinetisch-bedingte Veränderungen aufzudecken. Darüber hinaus wurden *in vitro* die für die Metabolisierung von Buprenorphin relevanten CYP3A Isozyme hinsichtlich der mRNA Expression, des Proteingehalts und der Aktivität, untersucht.

Die verwendeten Mausstämme unterschieden sich deutlich in ihrer basalen Schmerzempfindlichkeit, wobei Balb/cJ Mäuse am sensitivsten und 129S1/SvImJ Mäuse am wenigsten sensitiv waren. Die Applikation von Buprenorphin führte zu einem dosis- und stammesabhängigen analgetischen Effekt. Die Dosiserhöhung von Buprenorphin steigerte die Antinozizeption beim C57BL/6J und Balb/cJ Stamm, wohingegen der analgetische Effekt beim 129S1/SvImJ Stamm stagnierte. Serum- und Gehirnkonzentrationen von Buprenorphin und seiner Metaboliten waren dosisabhängig und unterschieden sich bei einer Dosis von 4,0 mg/kg Buprenorphin zwischen den Stämmen. Das Verhältnis von Buprenorphin und seinen Metaboliten im Blut sowie die Verteilung zwischen Gehirn und Blut zeigten keine Dosis- und nur geringe Stammesunterschiede, die aber nicht mit der analgetischen Wirkung korrelierten. Darüber hinaus wurden keine Stammesunterschiede in der Aktivität und im Proteingehalt der CYP3A Isozyme detektiert. Auf mRNA Ebene wurden Stammesunterschiede bei einigen CYP3A Isozymen detektiert. Jedoch konnte kein Zusammenhang zwischen mRNA und Aktivitätsdaten nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die Applikation von Buprenorphin mausstammspezifisch gestaltet werden sollte. Nur so kann Schmerzen optimal vorgebeugt

und unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden. Die beobachteten Unterschiede auf pharmakokinetischer Ebene können den unterschiedlichen analgetischen Effekt von Buprenorphin in den drei Mausstämmen nicht ausreichend erklären. Möglicherweise spielen pharmakodynamische Mechanismen eine übergeordnete Rolle, welche in weiterführenden Studien untersucht werden sollen. Die Ergebnisse sollen die wissenschaftliche Gemeinschaft für die Verwendung einer optimierten Analgesie sensibilisieren und somit aktiv zum Tierschutz in der Versuchstierkunde beitragen.

Abstract

The optimal dosage of analgesics should be state-of-the-art in laboratory animal sciences and is not only a question of animal welfare but also a legal provision. According to current national and international statistics on laboratory animals, the mouse is the most commonly used species with approximately 70 %. Opioid analgesics are commonly used for perioperative care of moderate to severe pain in mice. Among the numerous opioid drugs available, buprenorphine is the preferred analgesic due to its long-lasting effect and little adverse side effects. Vast differences in recommendations for dosage, application route and application intervals lead to uncertainties for appropriate administration and counteract optimal pain management. Although strain differences in the analgesic efficacy for opioids in mice are known, they have not been sufficiently investigated for buprenorphine, and consequently have not been taken into account in current recommendations. Therefore, the present study aimed to elucidate the influence of strain differences on the analgesic effect of buprenorphine. Hence, basal pain sensitivity and the analgesic effect of buprenorphine (0.42 mg/kg, 4.0 mg/kg) were tested *in vivo* using three popular mouse strains (male C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ) on the *Incremental Hot Plate*. As pharmacokinetic mechanisms might play a crucial role influencing the analgesic outcome, phase-I and -II metabolism were assessed. Thus, the metabolically relevant CYP3A isozymes were investigated *in vitro* in regard to mRNA expression, protein content and activity. Moreover, serum and brain concentrations of buprenorphine and its metabolites were analyzed in order to investigate alterations in the metabolism.

Basal pain sensitivity differed considerably between the mouse strains with Balb/cJ mice being the most and 129S1/SvImJ mice the least sensitive strain. The application of buprenorphine led to dose and strain dependent analgesic differences. While the analgesic effect of buprenorphine increased in C57BL/6J and Balb/cJ mice with the higher administered dose, the analgesic effect remained stable in 129S1/SvImJ mice. Serum and blood concentrations of buprenorphine and its metabolites were dose and partly strain dependent (4.0 mg/kg dose group). The metabolic ratio in blood and distribution between brain and blood showed no dose and only slight strain dependent variations, which did not correspond with the analgesic effect of buprenorphine. Additionally, no strain dependent differences for CYP3A activity and protein content could be detected *in vitro*, whereas at mRNA expression level slight strain differences were present. However, the mRNA expression differences of some CYP3A isozymes were not in accordance with activity data.

Thus, administration of buprenorphine for optimal pain management should be adapted to the respective mouse strain to avoid pain or adverse side effects. However, strain differences in the analgesic effect of buprenorphine could not be explained by differences in pharmacokinetics. Hence, differences in pharmacodynamic parameters are more likely and should be investigated in further studies. In summary, the results of this study should sensitize the scientific community to optimize pain management in order to contribute to laboratory animal welfare in life sciences.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen.....	II
Zusammenfassung	III
Abstract	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Nozizeption und Schmerz	3
1.2 Das Opioidrezeptor System	6
1.3 Schmerztestung in der Versuchstierkunde.....	9
1.3.1 Thermischer Stimulus	10
1.3.2 Mechanischer Stimulus.....	11
1.3.3 Chemische und elektrische Stimuli	11
1.4 Schmerzmanagement bei der Maus	12
1.5 Buprenorphin	14
1.5.1 Pharmakokinetik und -dynamik von Buprenorphin und seiner Metaboliten	15
1.6 Stammesunterschiede bei der Spezies Maus	19
1.6.1 Nozizeption und Analgesie	20
1.6.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	21
1.7 Zielstellung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Tiere	29
2.1.1.1 Ethische Stellungnahme	29
2.1.1.2 Haltung.....	30
2.1.2 Substanzen	30
2.2 Methoden	30
2.2.1 Stammesvergleich analgetische Wirkung von Buprenorphin.....	31
2.2.1.1 <i>Incremental Hot Plate</i>	31
2.2.1.2 <i>Open Field</i>	31
2.2.1.3 Habituation	32

2.2.1.4	Vorversuch: Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve.....	32
2.2.1.5	Hauptversuch: Stammesvergleich zur analgetischen Wirkung von Buprenorphin.....	33
2.2.1.6	Statistische Planung des Vor- und Hauptversuches	33
2.2.2	Stammesvergleich zur Veränderung im Phase-I Metabolismus	34
2.2.2.1	Probenentnahme	34
2.2.2.2	Analyse von Buprenorphin und seiner Metaboliten	35
2.2.2.3	SNP Identifizierung	35
2.2.2.3.1	Primerdesign	36
2.2.2.3.2	DNA-Isolation und Fragmentherstellung mittels PCR	37
2.2.2.3.3	RFLP und Sanger Sequenzierung	38
2.2.2.4	Aktivitätsanalysen	39
2.2.2.4.1	MeSH Term Analyse Lebermikrosomenisolation	39
2.2.2.4.2	Lebermikrosomenisolation.....	40
2.2.2.4.3	CYP Aktivitäts-Assay.....	41
2.2.2.4.4	CPR Aktivitäts-Assay.....	42
2.2.2.5	Expressionsmessungen metabolisch relevanter Enzyme	42
2.2.2.5.1	RNA Isolation und cDNA Synthese.....	42
2.2.2.5.2	Quantitative real-time PCR und Auswertestrategie	42
2.2.2.5.3	CYP Proteinbestimmung	43
2.2.3	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Stammesvergleich zur analgetischen Wirkung von Buprenorphin.....	45
3.1.1	Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve.....	45
3.1.2	Stammesabhängige Wirksamkeit von Buprenorphin.....	47
3.1.2.1	Wirksamkeit von Buprenorphin in verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen	47
3.1.2.2	Stammesabhängiges Schmerzverhalten.....	49
3.1.2.3	Lokomotorische Aktivitätsanalyse	49
3.2	Stammesvergleich zur Veränderung im Phase-I Metabolismus	52
3.2.1	Metabolisierung von Buprenorphin	52

3.2.1.1	Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve.....	52
3.2.1.2	Stammesvergleich Buprenorphin	53
3.2.2	SNP Verifizierung in stoffwechselrelevanten Enzymen	58
3.2.3	Methodenetablierung zur Aktivitäts- und Expressionsanalyse.....	60
3.2.3.1	MeSH-Term Analyse zur Lebermikrosomenisolation	60
3.2.3.2	Lobuläre CYP Aktivitäts- und Expressionsanalyse.....	61
3.2.4	Stammesabhängige CYP Aktivitäts- und Expressionsanalyse	65
4	Diskussion	68
4.1	Stammesabhängiges Schmerzverhalten.....	68
4.1.1	Basale Schmerzsensitivität	68
4.1.2	Stammesabhängige Abbruchkriterien	70
4.1.3	Analgetische Wirkung von Buprenorphin	71
4.2	Stammesabhängige Metabolisierung von Buprenorphin	74
4.2.1	Stammesspezifische CYP3A Aktivitätsuntersuchungen an Mikrosomen	74
4.2.2	Metabolismus von Buprenorphin <i>in vivo</i>	76
4.3	Pharmakodynamik von Buprenorphin	78
4.3.1	Spinale und supraspinale Wirkung von Buprenorphin	79
4.3.2	Phosphorylierungsmuster und Splicing Varianten des MOR	80
4.3.3	Einfluss endogener Neurotransmitter	80
4.4	Abgeleitete Empfehlungen	81
4.4.1	Bewertung von Schmerzen	81
4.4.2	Verwendung von Buprenorphin	82
5	Schlussfolgerung und Ausblick	85
	Literaturverzeichnis.....	87
	Anhang	98
	Abbildungsverzeichnis	136
	Tabellenverzeichnis	137
	Abkürzungsverzeichnis	138
	Danksagung	140

1 Einleitung

In der Versuchstierkunde sollte die Verwendung von Analgetika zur Behandlung von schmerzhaften Eingriffen während eines Experimentes, beispielsweise bei einem chirurgischen Eingriff, Induktion einer Inflammation oder Tumorwachstum, der Goldstandard sein. Diese Forderung spiegelt sich in der im Jahre 2010 in Kraft getretenen Europäischen Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere wider. Die Richtlinie greift das sogenannte 3R-Prinzip auf, welches somit in das nationale Recht aller EU-Mitgliedsstaaten implementiert werden muss (1). Das 3R-Prinzip wurde erstmals im Jahre 1959 von den britischen Wissenschaftlern William Russel und Rex Burch in ihrem Buch „*The Principles of Humane Experimental Technique*“, beschrieben (2). Die 3R beziehen sich im Kontext der Versuchstierkunde auf die Begriffe *Replacement* (Vermeidung), *Reduction* (Verringerung) und *Refinement* (Verbesserung), das bedeutet Tierversuche sollen wenn möglich durch Alternativen ersetzt (*Replacement*) und die Anzahl der Tiere auf das notwendige Mindestmaß reduziert werden (*Reduction*). Des Weiteren sollen die Bedingungen der Versuchstiere während Zucht, Haltung oder im Versuch verbessert werden, so dass Schmerzen, Leiden oder Schäden auf das unerlässliche Maß reduziert werden (*Refinement*). Auch wenn das übergeordnete Ziel der Richtlinie 2010/63/EU der vollständige Ersatz von Tierversuchen durch Alternativmethoden ist, so erkennt sie auch an, dass derzeit noch nicht gänzlich auf Tierversuche verzichtet werden kann, um die Gesundheit von Mensch und Tier sowie die Umwelt zu schützen. Bis zur Erreichung des Ziels, sollen Maßnahmen ergriffen werden, um den Versuchstieren einen besseren Schutz zu gewährleisten. So schreibt Artikel 14 der Richtlinie explizit die Verwendung von Analgetika zur Schmerzreduktion vor.

Der Einsatz von Analgetika ist nicht nur aus ethischen und rechtlichen Gründen zwingend erforderlich, sondern trägt auch zu einer verbesserten Qualität von wissenschaftlichen Daten z.B. deren Reproduzierbarkeit bei. Schmerz ist eine subjektive Wahrnehmung (3) und kann unterschiedliche physiologische Parameter des Versuchstieres ungewollt und individuell beeinflussen (4). Beispielsweise wurde gezeigt, dass postoperative Schmerzen nach einer Laparotomie zu Veränderungen in der Herzfrequenz und zu Herzfrequenzvariabilität in Mäusen führen (5). Des Weiteren kann sich Schmerz negativ auf die Heilung von Geweben, beispielsweise von Knochen auswirken (6). Zusätzlich kann unbehandelter Schmerz das Immunsystem beeinflussen. Page und Kollegen zeigten, dass unbehandelte Schmerzen nach einem operativen Eingriff zu einer Reduktion der Aktivität der natürlichen Killerzellen und zu einer erhöhten Metastasenbildung in einem Ratten-Lungenkarzinom-Modell führte (7-9). Durch die Behandlung von Schmerzen durch Gabe von Buprenorphin konnte das Wohlbefinden von Mäusen in einem Tumor-Modell verbessert und ein nachhaltiges

erwünschtes Tumorwachstum induziert werden (10). Die genaue Beschreibung des durchgeführten Schmerzmanagements bei einer Veröffentlichung der Versuchsergebnisse ermöglicht Dritten einzuschätzen, ob unbehandelte Schmerzen oder das eingesetzte Analgetikum einen möglichen Störfaktor im Experiment darstellen. Dies würde zu einer besseren Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Daten von tierexperimentellen Studien führen. Obwohl ein Anstieg in der Berichterstattung bzgl. der Verwendung von Analgetika bei Nagetieren von 10 % (2000/2001) auf 20 % (2005/2006) beobachtet wurde, ist diese bis heute bzgl. der perioperativen Versorgung von Versuchstieren nicht zufriedenstellend (11). Carbone und Austin veröffentlichten im Jahr 2016 einen Review, indem sie die publizierten Angaben zur Analgesie und Anästhesie bei Versuchstieren analysierten. Hierfür untersuchten sie 400 Publikationen (250 Publikationen vor 2011 und 150 zwischen 2014 bis 2015), auf die Vollständigkeit der Angaben. In den Publikationen wurden Thorakotomien, Kraniotomien, Gonadenektomien, Organtransplantationen, periphere Nervenschädigungen, spinale Laminektomien und orthopädische Eingriffe an verschiedenen Spezies durchgeführt, die gemäß versuchstierkundlicher Empfehlungen einer postoperativen Schmerzbehandlung bedürfen. 70 % der Publikationen beschrieben lediglich die Anästhesie und ggf. die intraoperative Analgesie, aber erwähnten keine postoperative Analgesie (12). Diese Tatsache verdeutlicht, dass die Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler vermehrt dafür sensibilisiert werden sollten, Analgetika zur Schmerzreduktion bei Versuchstieren zu verwenden und deren Einsatz bei der Publikation der Ergebnisse zu beschreiben.

Da die Spezies Maus laut aktuellen nationalen und internationalen Tierversuchsstatistiken mit 1.959.169 (in Deutschland) und 6.999.312 (in Europa) verwendeten Individuen die am häufigsten verwendete Tierart ist, würde eine hohe Anzahl an Versuchstieren von einer effektiven Schmerzbehandlung profitieren (13, 14).

1.1 Nozizeption und Schmerz

Nozizeption und Schmerz sind zwei verschiedene Mechanismen, die klar voneinander abgegrenzt werden sollten (**Abbildung 1.1**). Schmerz ist ein Produkt komplexerer Verarbeitungsprozesse in höheren Hirnregionen, wohingegen Nozizeption auch ohne die Wahrnehmung von Schmerz auftreten kann (15). Die „*International Association for the study of pain*“ (IASP) definiert Schmerz wie folgt: „Schmerz ist eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung verbunden mit tatsächlicher oder potentieller Schädigung eines Gewebes und ist immer subjektiv“ (3).

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der anatomischen Bereiche, die an der Nozizeption- und Schmerzwahrnehmung beteiligt sind

Die Modulierung und Entstehung der Schmerzwahrnehmung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass unterschiedliche Gehirnregionen an der Verarbeitung von Schmerz beteiligt sind (15). Dahingegen bezieht sich die Nozizeption auf das periphere und zentrale Nervensystem (ZNS), welches über die Aktivierung von Nozizeptoren interne oder externe Umwelteinflüsse registriert und weiterleitet. Insgesamt sind drei verschiedene Gruppen von Nozizeptoren bekannt: A β -, A δ - und C-Faser Nozizeptoren. Die Nozizeptoren sind prinzipiell in allen Strukturen des Körpers lokalisiert, die an der Nozizeption beteiligt sind, einschließlich der Haut, Muskeln und Viszera (innere Organe) (16). Die myelinisierten und schnell leitenden A β -Fasern sind primär an der Weiterleitung von nicht schmerzhaften Reizen der Haut, Muskeln oder Gelenke beteiligt. Dahingegen kann die Weiterleitung von äußeren Reizen über A δ - und C-Faser zu einer Schmerzempfindung führen. Die dünn myelinisierten polymodalen (thermisch, mechanisch, chemisch) A δ -Fasern sind schnell leitende mechanosensitive Rezeptoren (primärer Schmerz). Die nicht myelinisierten C-Fasern hingegen sind langsam leitende polymodale Nozizeptoren (sekundärer Schmerz). Eine weitere schwer zu identifizierende Gruppe an Nozizeptoren sind die sogenannten „stillen oder schlafenden“ Nozizeptoren, die nur durch eine Gewebsschädigung aktiviert werden (17-19). Je nach Qualität des noxischen Reizes werden die jeweiligen Nozizeptoren

angesprochen, die zu verschiedenen Qualitäten von Schmerz, wie beispielsweise stechendem, dumpfem oder brennendem Schmerz, führen (16, 18).

Schmerzen können nicht nur durch äußere Reize wie Hitze, Kälte, Druck oder chemische Stimuli wie Capsaicin oder Senföl induziert werden, sondern auch durch endogene Entzündungsmediatoren wie Serotonin, Acetylcholin, Histamin oder H^+ - und K^+ -Ionen, die infolge einer Gewebsschädigung ausgeschüttet werden (**Abbildung 1.2**).

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Nozizeption

Noxische Reize werden durch spezifische Nozizeptoren wahrgenommen und über das aufsteigende Nervensystem (blau) und das dorsale Horn im Rückenmark zum Gehirn weitergeleitet (Darstellung murines Gehirn). Gewebsschädigungen führen zur Ausschüttung von endogenen Entzündungsmediatoren, die ebenfalls eine Reizweiterleitung zum Gehirn induzieren. Die Reize werden über den Thalamus zum zerebralen Cortex weitergeleitet, wo die eigentliche Schmerzwahrnehmung stattfindet. Über das absteigende Nervensystem (rot) können inhibitorische oder Flexor-Motoneuronen stimuliert werden. Abkürzungen: Nozizeptor (N), Hippocampus (HC), Substantia nigra (SN), Ventrales Striatum (VS), Histamin (His), Serotonin (5-HT), Acetylcholin (ACh), Calcitonin gene-related peptide (CGRP). Abbildung wurden unter Verwendung von Science Slide, Microsoft erstellt.

Gleichzeitig kommt es bei einer traumatischen oder entzündlichen Gewebsschädigung zur Bildung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Kininen, die zu einer Sensibilisierung und erhöhten Ansprechbarkeit der Nozizeptoren auf endogene Schmerzmediatoren führen. Die an der Reizweiterleitung beteiligten Transmitter der Nozizeptoren sind unter anderem Substanz P, Calcitonin *gene-related peptide* (CGRP), Somatostatin, vasoaktives intestinales

Peptid und Glutamat (16). Molekulare Detektoren der Nozizeptoren sind vor allem signalgesteuerte Ionenkanäle. Die prominentesten Vertreter sind die *transient receptor potential*-Kanäle (TRP) (20). Beispielsweise wird der TRPV1 Kanal durch thermische Reize aktiviert und ist für Calcium- und Natriumionen, die zu einer Depolarisation und Öffnung weiterer spannungsabhängiger Natriumkanäle führen, durchlässig. Typischerweise werden schmerzhafte Reize in Form von Aktionspotenzialen über die peripheren primären afferenten Neuronen an das dorsale Horn des Rückenmarks und oder dem Nucleus spinalis nervi trigemini übermittelt. Das neuronale Netzwerk des dorsalen Horns ist nicht nur für die Reizweiterleitung zum Gehirn zuständig, sondern ist zusätzlich an der Modulierung der Reizinformationen zu anderen Neuronen des Rückenmarks beteiligt. Je nach Stimulationsmuster werden Flexor-Motoneuronen oder inhibitorische Neuronen stimuliert. Dieses System, welches die absteigenden inhibitorischen Prozesse steuert, wird auch als „*diffuse noxious inhibitory controls* (DNIC)“ bezeichnet (18, 21, 22). Zusätzlich wird vom dorsalen Horn oder Nucleus spinalis trigemini der Reiz an den Hirnstamm und über den Thalamus zum zerebralen Cortex weitergeleitet, wo die eigentliche Schmerzwahrnehmung prozessiert wird. Die am besten erforschten Bahnen der Schmerzweiterleitung sind die spinothalamische Bahn (projiziert in den Thalamus), die spinomencephalicus Bahn (projiziert in das Mittelhirn) und die spinolimbische Bahn (projiziert zum medialen Thalamus) (16). Vom Thalamus aus bestehen Verbindungen zum limbischen System, welches die Ausschüttung von unter anderem Serotonin und Dopamin steuert, welche die Hauptakteure des Belohnungssystems darstellen. Zusätzlich bestehen über die Hypophyse Verbindungen zum endokrinen System. Bei der Wahrnehmung von Schmerzen wird unter anderem das endogene Amin β -Endorphin ausgeschüttet, welches Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung nimmt (23). In der Modulierung der Schmerzwahrnehmung im Thalamus und zerebralen Cortex, beispielsweise durch endogene Substanzen, ist vor allem das Opioidrezeptor System involviert, welches im Folgenden näher erläutert wird.

1.2 Das Opioidrezeptor System

Das endogene Opioid System besteht zum einem aus den vier verschiedene Opioidrezeptoren: MOR, DOR, KOR und ORL1 und zum anderen aus den endogene Opioidpeptiden β -Endorphin, Enkephaline und Dynorphine und ist maßgeblich an der Ausprägung von Schmerzverhalten und Antinozizeption (gegen die Schmerzwahrnehmung wirkend) beteiligt (24, 25). Die Opioidpeptide und die entsprechenden Rezeptoren sind im zentralen Nervensystem, in kritischen emotional-verknüpften Gehirnstrukturen sowie in peripheren Organen, wie Herz, Lunge, Leber, Gastrointestinaltrakt und Reproduktionstrakt, lokalisiert (26-28). Opioidrezeptoren können prä- und postsynaptisch vorkommen. Präsynaptisch führen sie zu einer Inhibierung der Neurotransmitterfreisetzung und postsynaptisch zu einer Abnahme der neuronalen Erregbarkeit (29).

Bislang wurden vier verschiedene Opioidrezeptoren charakterisiert: μ - (MOR), δ - (DOR) und κ -Opioidrezeptor (KOR) sowie der *Opioid receptor like-1* (ORL1) Rezeptor (24). Zusätzlich gibt es Hinweise in der Literatur, dass weitere Opioidrezeptoren existieren, wie beispielsweise der ε -, ζ - und der λ -Opioidrezeptor. Jedoch befasst sich die aktuelle Forschung hauptsächlich mit MOR, DOR, KOR und ORL1 (**Tabelle 1.1**). Zusätzlich existiert die Meinung, dass vor allem der ε -Opioidrezeptor möglicherweise ein Subtyp vom MOR oder KOR ist (24). Jeder Opioidrezeptor ist hinsichtlich seiner Funktion subklassifiziert (z.B. MOR1 und MOR2), obwohl bisher nur ein Gen je Opioidrezeptor identifiziert und isoliert wurde (23, 30).

Tabelle 1.1: Übersicht zur Verteilung und wichtigsten Eigenschaften der μ - (MOR), δ - (DOR), κ - (KOR) und *Opioid receptor like-1* (ORL1) Opioidrezeptoren

	MOR	DOR	KOR	ORL1
Primäres Vorkommen	caudate Putamen	Bulbus olfactorius, caudate Putamen	Hypothalamus, Nucleus accumbens	Thalamus
Liganden	Alle klinisch relevanten Opioide, Endorphine	Enkephaline	Dynorphine	Nozizeptin/ OrphaninFQ
Primäre Eigenschaft	Analgesie	Anxiolyse	z.T. spinale Analgesie	Hemmung der MOR, DOR und KOR vermittelte Analgesie
Vermittelte Nebenwirkung	Atemdepression, hohes Suchtpotenzial	Atemdepression	Suchtpotenzial	

Der MOR wird in drei funktionelle Subtypen gegliedert, die auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten und -selektivitäten von Agonisten und Antagonisten begründet sind (31). MOR1 weist eine hohe Sensitivität gegenüber dem Antagonisten Naloxonazin auf, wohingegen MOR2 Naloxonazin insensitiv ist, welches eine Unterscheidung von MOR1 und MOR2 Agonisten *in vitro* und *in vivo* ermöglicht (30, 32). Der MOR3 Subtyp wurde erst später identifiziert und zeichnet sich durch eine Opioid-Alkaloid-Selektivität bei gleichzeitiger Opioidpeptid-Insensitivität aus (33). Die MOR Subtypen sind über das gesamte ZNS inklusive des Rückenmarks verteilt, wobei die höchste Dichte im caudate Putamen (Teil des Großhirns) gemessen wurde (24, 34). MOR wird zudem stark im Magen-Darm-Trakt und der Blase exprimiert (35). Der MOR wird vor allem auf Grund seiner analgetischen Wirkung aktiv beforscht (23, 30). In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass alle klinisch relevanten Opiode Agonisten am MOR sind (36). Jedoch wurden zahlreiche weitere Funktionen dem MOR zugeordnet wie beispielsweise Anxiolyse, Sedierung, Euphorie, Atemdepression, Miosis, Antidiurese, Obstipation sowie ein großes Suchtpotenzial (23, 29, 37). Vor allem der MOR1 wurde mit der Vermittlung der analgetischen Wirkung (30, 31), aber auch mit der Ausbildung einer Abhängigkeits- und Toleranzentwicklung in Verbindung gebracht (37). Dahingegen scheint die Atemdepression vorrangig durch MOR2 vermittelt zu sein (31).

Der DOR ist vor allem im bulbus olfactorius, Neocortex, caudate Putamen und Nucleus accumbens (Kernstruktur im unteren Vorderhirn) lokalisiert. Im Thalamus, Hypothalamus und Hirnstamm kommt er nur vereinzelt vor (24, 38). Die spinal vermittelte Analgesie des DOR spielt nur eine untergeordnete Rolle (39). Jedoch können DOR Agonisten die Potenz und Wirksamkeit von MOR Agonisten positiv unterstützen und DOR Antagonisten die Toleranzausbildung, die gleichzeitig MOR Agonisten sind, reduzieren (23). In Ratten führte die Stimulation des DOR zu einem antidepressiven Effekt, weshalb dem DOR vor allem eine anxiolytische Wirkung zugesprochen wird (40). Zusätzlich besitzt der DOR eine atemdepressive Wirkung (41).

Die Verteilung des KOR ist speziesspezifisch (24). Beispielsweise wurde im Schwein die höchste Dichte an KOR in der inneren Schicht des zerebralen Cortex, der Substantia nigra (Kernkomplex im Mittelhirn) und dem Nucleus interpeduncular (Kernkomplex im Mittelhirn) gefunden. Dahingegen ist der KOR in Maus und Ratte hauptsächlich im Nucleus accumbens, Claustrum (Teil des Endhirns), dorsaler endopiriformer Nucleus (Teil des olfaktorischen Cortex), Nucleus interpeduncular und Hypothalamus lokalisiert und nur im geringen Maße im zerebralen Cortex (24, 38, 42). Ähnlich wie DOR spielt KOR nur eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung eines analgetischen Effektes (23). Jedoch konnte für KOR *knock-out* Mäuse eine erhöhte Schmerzantwort bzgl. peritonealer Injektion von Essigsäure beobachtet werden (43). Zusätzlich wird der KOR mit der Ausbildung einer Abhängigkeits- und Toleranzentwicklung in Verbindung gebracht (23).

Der ORL1 ist vor allem in schmerzassoziierten Gehirnstrukturen und dem ZNS lokalisiert, wie das periaquäduktale Grau (Kernkomplex im Mittelhirn), der Thalamus, der somatosensorischer Cortex, das Rückenmark und das Spinalganglion (Nervenknoten im Wirbelkanal) (44). Die Stimulation des ORL1 führt zu einer Blockierung des MOR, DOR und KOR vermittelten antinozizeptiven Effektes (44, 45). Des Weiteren führt die Stimulierung des ORL1 weder zu einer Belohnung noch zu einem aversiven Effekt (44).

Die Liganden-gesteuerte Aktivierung der Opioidrezeptoren inhibiert post- und vor allem präsynaptisch direkt Neuronen, die wiederum die Transmission des Schmerzreizes entlang des Rückenmarks inhibieren, welches für die Analgesie von größter Bedeutung ist (46). Zu den endogenen Opioidpeptiden zählen die Enkephaline (DOR-selektiv), Endorphine (MOR-selektiv) und Dynorphine (KOR-selektiv), die strukturell dem Opiumalkaloid Morphin ähneln (23). Sie sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen als Transmitter involviert und werden im Gegensatz zu den exogenen Opioiden nach ihrer Synthese sofort von Aminopeptidasen abgebaut. Hierdurch werden Toleranz und Abhängigkeitsentwicklung verhindert (47). Die Opioidrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sieben transmembran-Domänen besitzen (**Abbildung 1.3**).

Abbildung 1.3: Schematische Übersicht möglicher Signalwege von Opioidrezeptoren

1. Bindung eines Agonisten am Opioidrezeptor und Dissoziation der Gαi und Gβγ-Untereinheiten; 2. Gαi interagiert mit Kaliumkanälen und Adenylatcyclase (AC); 3. Gβγ inhibiert Calciumeinstrom (Ca^{2+}); 4. G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase (GRK) vermittelte Phosphorylierung (P) und Arrestin Rekrutierung; 5. Opioidrezeptor Internalisierung und Wiederherstellung in den aktiven Zustand; 6. Weitere mögliche Signalwege: MAPK (mitogen-activated protein Kinase); ERK: (extracellular-signal regulated Kinase); JNK (c-Jun N-terminale Kinasen). Die Abbildung wurde in Anlehnung an Al-Hasani und Burchas 2011 (37) unter Verwendung von Science Slide, Microsoft erstellt.

Nach der Bindung eines spezifischen agonistisch-wirkenden Liganden dissoziieren die Gαi und Gβγ Untereinheiten und interagieren mit verschiedenen Signalwegen (37, 48). Die wichtigste intrazelluläre Antwort besteht in der Modulation von Calcium- und Kaliumkanälen in post- und präsynaptischen Neuronen, welche zu einer Hyperpolarisation sowie Blockade

der Transmitterfreisetzung führt und die neuronale Aktivität inhibiert (48-50). Hierbei interagiert die G α i oder G $\beta\gamma$ Untereinheit mit Kaliumkanälen und fördert den Efflux von Kaliumionen (48, 50). Die G $\beta\gamma$ Untereinheit bindet direkt an Calciumkanälen und inhibiert den Influx (49). Des Weiteren wird durch die Aktivierung der Opioidrezeptoren die Adenylatcyclase Aktivität inhibiert und der cAMP-abhängige Calcium Influx prä- und postsynaptisch reduziert (37). Die Aktivierung von Opioidrezeptoren führt gleichzeitig zu einer G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase (GRK) - vermittelten Phosphorylierung am Carboxyl-Terminus und intrazellulären Loops, welches eine Arrestin2/3-vermittelte Desensibilisierung und Internalisierung initiiert (37, 51). Die Rezeptorinternalisierung sowie deren Wiederherstellung in den aktiven Zustand scheinen Liganden-abhängig zu sein (52-54). Unterschiedliche Liganden führen zu unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern an Serinen, Threoninen oder Tyrosinen der intrazellulären Loops und des C-Terminus (55). Schulz und Kollegen zeigten, dass Morphin und DAMGO (synthetisches Opioidpeptid) einen unterschiedlichen Grad der Phosphorylierung am MOR induzieren. DAMGO desensibilisierte MOR werden sofort dephosphoryliert, wohingegen Morphin desensibilisierte MOR an der Plasmamembran verweilen und die Phosphorylierung einen persistenten Zustand aufweist (52). Des Weiteren wurden Unterschiede in der Schnelligkeit der Internalisierung festgestellt. Für den ORL1 wurde beispielsweise beschrieben, dass dessen Internalisierung deutlich schneller im Vergleich zu anderen Opioidrezeptoren, verläuft (56).

Die Bildung von Homo- und Heterodimeren zwischen verschiedenen Opioid- und Nicht-Opioidrezeptoren moduliert die Rezeptorantwort, die durch einen Liganden induziert wird. Das bedeutet, dass die Wirkung eines endogenen oder exogenen Opioids, das Resultat eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Opioidrezeptoren sein kann (23, 37). Pan und Kollegen konnten beispielsweise zeigen, dass MOR mit ORL1 Heterodimere ausbilden kann, welches zu einer gesteigerten Affinität von Liganden des ORL1 führte. Diese gesteigerte Affinität beschränkte sich jedoch auf Liganden, die schon eine hohe Affinität gegenüber MOR aufwiesen (57). Gomes und Kollegen wiesen die Existenz von MOR-DOR Heterodimeren nach und zeigten, dass ein DOR Antagonist die Potenz und Effektivität des MOR Signals steigert (58).

Trotz fortwährend neuer Erkenntnisse ist der durch das Opioidrezeptor System gesteuerte exakte Prozess (Signalweiterleitung), d.h. die analgetische Wirkung verschiedener Opiode, weiterhin nicht ausreichend verstanden und bedarf weiterer Forschung (37).

1.3 Schmerztestung in der Versuchstierkunde

In der Schmerzforschung ist die Unterscheidung zwischen Nozizeption und Schmerz für die Interpretation von Verhaltenstests an Tieren bedeutend, da sie vorwiegend auf Reflexen, hervorgerufen durch noxische Stimuli, beruhen. Prinzipiell werden die Schmerztestungen

nach Art des eingesetzten noxischen Stimulus in thermische, mechanische, chemische und elektrische Schmerztestungen unterschieden (59, 60). Abhängig vom Einsatz eines konstanten oder ansteigenden (inkrementellen) Stimulus wird die Latenzzeit bzw. die Intensität des Stimulus bis zur ersten Schmerzreaktion detektiert. Zusätzlich zu den Schmerztestungen die einen akuten definierten Stimulus verwenden sind Schmerzmodelle etabliert, die durch einen chirurgischen Eingriff oder Applikation von chemischen Substanzen chronische Schmerzen induzieren. Beispiele hierfür sind neuropathische Schmerzen durch eine Kompression bestimmter Nerven oder aber Entzündungsschmerz durch Applikation von Freund-Adjuvans in die Pfote (60). Der Testung chronischer Schmerzen wird in der Regel eine höhere klinische Relevanz als der Testung akuter Schmerzen zugeschrieben. Allerdings ist der induzierte Stimulus nicht skalierbar und langanhaltend und geht damit mit einer deutlich erhöhten Belastung für das Versuchstier einher (59). Auf die Testung von chronischen Schmerzen wird in der folgenden Übersicht nicht eingegangen.

1.3.1 Thermischer Stimulus

Bei thermischen Schmerzmodellen werden konstante oder inkrementelle Hitze- oder Kältestimuli angewendet. Die Verwendung von Kältestimuli ist schwierig und wird vergleichsweise selten angewendet, beispielsweise um neuropathische Schmerzen zu evaluieren (60).

Wesentlich verbreiteter ist der Einsatz von Hitzestimuli. Der *Tail-Flick* Assay ist einer der ältesten nozizeptiven Tests, bei dem der Schwanz der Maus oder Ratte einem thermischen Reiz z.B. Infrarot-Strahlungsquelle oder temperiertes Wasserbad ausgesetzt wird. Gemessen wird die Latenzzeit bis zum Reflex des Rückzucks des Schwanzes. Diese Reaktion wird als spinale Reflexreaktion bewertet und somit der Nozizeption zugeordnet (60, 61). Der *Tail-Flick* Assay wird vor allem zur Testung von Analgetika eingesetzt und soll hoch sensitiv gegenüber der Aktivitätstestung von Opioiden sein, jedoch nicht bei partiellen Opioid-Agonisten (59).

Der *Hot Plate* Test ist ein weiterer klassischer Test, bei dem die Ratte oder Maus auf eine Heizplatte mit definierter Temperatur gesetzt wird und die Latenzzeit bis zum Heben und Schütteln oder Lecken einer der beiden Hinterpfoten gemessen wird. Dieses komplexe Verhalten, soll supraspinale Strukturen mit einbeziehen und somit nicht nur Nozizeption, sondern auch Schmerz testen (15, 60, 61). Der *Hot Plate* Test wird ebenfalls zur Testung von Analgetika eingesetzt und eignet sich für volle und partielle Opioid-Agonisten (59).

Der *Incremental Hot Plate* (IHP) Test stellt eine Variation des klassischen *Hot Plate* Tests dar. Er bezieht ebenfalls supraspinale Strukturen ein und wird zur Testung von Analgetika verwendet (**Abbildung 1.4**). Beim IHP Test wird die Heizplatte von einer definierten nicht schmerzhaften bis zu einer schmerzhaften Temperatur aufgeheizt. Die Vorteile des IHP Test

gegenüber des klassischen *Hot Plate* Tests sind eine höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit (62, 63). Hunskaar und Kollegen detektierten mit Hilfe des IHP Test nach Verabreichung von Paracetamol und Acetylsalicylsäure einen dosisabhängigen Anstieg der Abbruchtemperatur, welcher mit dem klassischen *Hot Plate* Test nicht dargestellt werden konnte (62). Des Weiteren wurden im Gegensatz zum klassischen *Hot Plate* Test (64-66) bei Mäusen und Ratten keine Habituationseffekte beobachtet, die sich in einer verkürzten Reaktionszeit und somit einer niedrigeren Abbruch-Temperatur widerspiegeln (62, 63). Aufgrund der Vorteile wird der IHP Test zusätzlich zur Differenzierung thermaler Allodynie (verstärkte Schmerzempfindlichkeit auf eigentlich nicht schmerzhaften Reize) und Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzantwort auf schmerzhaften Reiz) verwendet (60).

Abbildung 1.4: A) Incremental Hot Plate Apparatur und B) Abbruchkriterium

Die Testung wurde durch einen Experimentator beobachtet und zusätzlich durch zwei Kameras frontal und lateral dokumentiert. Ein definiertes Abbruchkriterium war unter anderem Lecken einer der beiden Hinterpfoten.

1.3.2 Mechanischer Stimulus

Bei der mechanischen Stimulation wird fast ausschließlich der *von Frey* Test verwendet. Hierbei werden sogenannte *von Frey* Filamente (5 cm lange Plastikfilamente, die Durchmesser variieren) mit einer kalibrierten Kraft gegen die Unterseite der Hinterpfote gedrückt. Es wird die Schwelle in Gramm bis zum Rückzug der Pfote detektiert, welches lediglich einen spinalen Reflex darstellt und somit der Nozizeption zugeordnet wird (59). Jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch supraspinale Komponenten beteiligt sind. Dieser Test wird vorrangig zur Untersuchung von Allodynie (verstärkte Schmerzempfindlichkeit auf eigentlich nicht schmerzhaften Reize), vor allem bei Patienten und Tieren mit chronischen Schmerzen, eingesetzt (60).

1.3.3 Chemische und elektrische Stimuli

Die Stimulation mit exogen aufgetragenen chemischen Stimuli spielt eher eine untergeordnete Rolle in der Versuchstierkunde. Beispiele für chemische Stimuli sind die Substanzen Capsaicin oder Senföl, die zu einer Stimulation am TRPV1 bzw. TRPA1 Rezeptor führen (67, 68).

Die elektrische Stimulation ist ein unnatürlicher und unspezifischer Reiz, der nur selten in der Schmerzforschung eingesetzt wird. In der Regel wird die elektrische Stimulation als Kontrollparameter für andere Verhaltensexperimente (z.B. Lernmodelle) bestimmt, in denen Elektrostimuli appliziert werden (60). Der elektrische Reiz induziert hierarchisch angeordnete Reaktionen, die den Reflex des Vermeidens, die Vokalisation während der Stimulation und ggf. eine andauernde Vokalisation einbeziehen und somit spinale sowie supraspinale Strukturen bedient (59).

1.4 Schmerzmanagement bei der Maus

Die Ziele eines optimalen Schmerzmanagements variieren zwischen der totalen Ausschaltung von Schmerz (beispielsweise während einer Operation) und der Reduktion auf einen minimalen Schmerz, der vom Tier toleriert wird, ohne dessen Wohlbefinden zu beeinflussen. Analgesie wird definiert als das Fehlen von Schmerz. Jedoch ist die totale Schmerzausschaltung in wachen Tieren zum einen nicht realisierbar und zum anderen nicht erstrebenswert, da der Schmerz eine Schutzfunktion hat, die vor weiteren Verletzungen schützen soll. Zu den grundsätzlichen Voraussetzungen einer adäquaten Analgesie zählen folgende Punkte: Eine Sedierung ist nicht gleichbedeutend mit einem analgetischen Effekt und maskiert unter Umständen die Schmerzäußerungen. Analgetika sollten in der entsprechenden Dosierung verwendet werden, die effektive Plasma- und Gewebekonzentrationen hervorrufen. Hierbei sollte der Einsatz einer multimodalen Analgesie (Verwendung von mehreren Analgetika mit verschiedenen Wirkmechanismen) in Betracht gezogen werden. Die Überprüfung der Wirksamkeit des Analgetikums ist zwingend notwendig, um einen (wiederkehrenden) Abfall des analgetischen Effektes zu vermeiden (15).

Zu den gängigen Analgetika zählen die Klassen der Lokalanästhetika, nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) und Opioide (**Tabelle 1.2**). Lokalanästhetika blockieren spannungsabhängige Natriumkanäle und sind in ihrer Wirkung lokal und zeitlich stark begrenzt. Der Einsatz von Lokalanästhetika bei der Spezies Maus ist meist nur auf den Gebrauch während einer Operation begrenzt. Die NSAID wirken durch Hemmung der Cyclooxygenase-1 und/ oder -2, wodurch die Synthese von Prostaglandinen und der hierdurch vermittelte Schmerz gehemmt wird. Opioide wirken wie bereits erläutert an Opioidrezeptoren (MOR, DOR, KOR, ORL1) im zentralen Nervensystem sowie peripheren Organen und hemmen dort die Entstehung und Weiterleitung noxischer Stimuli.

Tabelle 1.2: Pharmakologische Vorgehensweise in der Schmerztherapie in Abhängigkeit der prognostizierten Schmerzintensität bei der Maus (modifiziert nach (15, 69))

Schmerzintensität	Analgesie
gering	Monotherapie akzeptabel: NSAID (z.B. Carprofen, Meloxicam, Metamizol)
moderat	Multimodale Therapie sollte berücksichtigt werden: NSAID und/oder Opioiden (z.B. Butorphanol, Buprenorphin, Tramadol)
schwer	Multimodale Therapie empfohlen: starke Opioide (z.B. Buprenorphin, Fentanyl, Tramadol) in Kombination mit NSAID, Lokalanästhetika

Nicht nur die Auswahl des adäquaten Analgetikums ist herausfordernd, zusätzlich existieren unterschiedliche Empfehlungen zur Applikationsroute (oral, transdermal, intraperitoneal (i.p.), subkutan (s.c.), intravenös, intramuskulär), zum Applikationsintervall und zur Dosierung. Die Empfehlungen zur Dosierung beschränken sich hierbei auf die Spezies Maus und weisen eine breite Dosierungsspanne auf. Im Fall des häufig verwendeten Opioidanalgetikum Buprenorphin werden Empfehlungen von 0,006 bis 10 mg/kg Körpergewicht angegeben (Tabelle 1.3) (69-75).

Tabelle 1.3: Verschiedene Dosierungsempfehlungen für Buprenorphin zur Anwendung bei der Maus

Dosis	Applikationsart	Applikationsintervall	Literatur
0,01 – 0,05 mg/kg	s.c.	mind. 2h	(73)
0,05 – 0,1 mg/kg	s.c. oder i.p.	8 h	(69)
0,1 mg/kg	s.c.	6-12 h	(70)
2 mg/kg	s.c.	12 h	(71)
2 mg/kg	s.c.	3-5 h	(72)
2,5 mg/kg	i.p.	6-8 h	(71)

Gades und Kollegen empfehlen beispielsweise bei der Maus die Verwendung von 2,0 mg/kg Buprenorphin zur Behandlung milder Schmerzen über einen Zeitraum von 3 bis 5 Stunden (72). Dahingegen kamen Matsumiya und Kollegen zu dem Schluss, dass Dosen von 0,01 bis 0,05 mg/kg Buprenorphin ausreichend sind, um postoperative Schmerzen nach einer Laparotomie bei der Maus zu behandeln (73). Diese stark variierenden Angaben führen zu Unsicherheiten in deren Umsetzung, da unnötiges Leiden der Tiere durch Unterdosierung, aber auch unerwünschte Nebenwirkungen durch Überdosierung vermieden werden sollten.

1.5 Buprenorphin

Das Opioid Buprenorphin ist das mit am häufigsten verwendete Analgetikum zur Behandlung von moderaten bis starken postoperativen Schmerzen (11, 69, 70, 73, 76). Es weist ein breites analgetisches Spektrum auf und bietet die Möglichkeit verschiedene Qualitäten von Schmerz zu behandeln (76). Die deutsche Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) berichtet, dass erfahrungsgemäß in 95 % der Fälle Versuchstiere mit Buprenorphin bei richtiger Dosierung ausreichend analgetisch behandelt werden können (69).

Buprenorphin besitzt eine schnell einsetzende (15 bis 30 Min nach Applikation(45, 76, 77)) und langanhaltende analgetische Wirkung von vier bis zwölf Stunden in Abhängigkeit von der Dosis (72-75). Die analgetische Wirkung von Buprenorphin ist bedingt durch ein komplexes pharmakologisches Profil. Buprenorphin ist ein partieller MOR Agonist, ein voller DOR und KOR Antagonist und ein ORL1 Agonist, mit einer geringen intrinsischen Aktivität und einer hohen Rezeptor Affinität, einhergehend mit einer langsamen Dissoziation vom Rezeptor (siehe als Review (78)). Aufgrund seines geringen sucht- und abhängigkeiterzeugenden Potenzials (MOR Agonist, DOR Antagonist), wird Buprenorphin vorzugsweise zur Behandlung von z.B. Morphin-abhängigen Suchtpatienten (Suchttherapie) eingesetzt (siehe als Review (79)). Bei Partialagonisten können sogenannte *Ceiling*- oder auch Sättigungseffekte auftreten, die in der Pharmakologie als eine fehlende Zunahme der Wirkung eines Pharmakons trotz Dosissteigerung beschrieben sind. Buprenorphin weist einen *Ceiling*-Effekt bzgl. der respiratorischen Depression auf, welches das Sicherheitsprofil von Buprenorphin positiv unterstützt (80-82). Jedoch tritt bei höheren Dosierungen von Buprenorphin ebenfalls ein Ceiling-Effekt bezogen auf den analgetischen Effekt, auf (80, 81, 83, 84). Darüber hinaus wurden in Nager-Modellen sogar glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehungen detektiert, die bei hohen Dosierungen von Buprenorphin eine Abnahme des analgetischen Effektes beschreiben (45, 76). Lutfy und Kollegen konnten zeigen, dass der analgetische Effekt von Buprenorphin MOR vermittelt ist. Zeitgleich wirkt Buprenorphin agonistisch am ORL1, wodurch der analgetische Effekt von Buprenorphin reduziert wird (glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung). Durch Blockierung mit J-113397 (ORL1 Antagonist) oder *knock-out* des ORL1 wird die glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung aufgehoben (45). Die genauen Mechanismen, die das komplexe pharmakologische Profil bedingen, sind jedoch weitestgehend noch nicht aufgeklärt.

Zusätzliche bekannte Nebenwirkungen des Opioid Analgetikum Buprenorphin sind Sedierung, reduzierte Futteraufnahme und damit verbundene Gewichtsreduktion, erhöhte Aktivität (Verschiebungen im Tag/ Nacht Rhythmus), Obstipation, Übelkeit und ein daraus bei Nagetieren resultierendes Pica-Verhalten (unkontrolliertes Fressverhalten) (85-90).

Nicht nur Buprenorphin sondern auch seine Metaboliten sind pharmakologisch aktiv, so dass zusätzlich die Pharmakokinetik eine entscheidende Rolle auf die analgetische Wirkung von Buprenorphin hat.

1.5.1 Pharmakokinetik und -dynamik von Buprenorphin und seiner Metaboliten

Die Pharmakokinetik befasst sich mit den Wirkungen des Organismus auf das Pharmakon. Hierbei beschreibt das ADME-Modell den Verlauf eines Wirkstoffs im Organismus. Das Akronym ADME steht für Resorption, Verteilung, Metabolismus und Exkretion. Je nach Applikationsroute erfolgt zunächst die Resorption des Pharmakons in das Blutplasma und verteilt sich hierüber im gesamten Körper bis es den spezifischen Wirkungsort (z.B. Opioidrezeptoren) erreicht. Schon während der Verteilung kann die Metabolisierung und oder Elimination des Pharmakons einsetzen. Die Metabolisierung findet hauptsächlich in der Leber statt und im geringen Maße im Darmepithel sowie im Kapillarendothel. An der Exkretion sind im Wesentlichen Leber, Darm, Niere und z.T. Lunge beteiligt. In der Leber werden die vorwiegend lipophilen Pharmaka durch Konjugationsreaktionen in eine wasserlösliche Form gebracht und über den Fäzes und oder Urin ausgeschieden (29).

Die Metabolisierung von Pharmaka erfolgt analog zu endogenen Substraten und wird in zwei enzymatisch katalysierte Phasen, Phase-I und Phase-II, eingeteilt. Die Phase-I-Reaktion ist eine Funktionalisierungsreaktion und wird vor allem durch membranständige Cytochrom-P450 (CYP) Enzyme vermittelt, die im glatten endoplasmatischen Retikulum von hepatischen Zellen lokalisiert sind. Durch Übertragung eines Sauerstoffmoleküls katalysieren CYP Enzyme die Oxidation, Hydroxylierung, Desalkylierung, Desaminierung oder Dehalogenierung von Pharmaka (29). Der Katalysemechanismus ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt (**Abbildung 1.5**)

Abbildung 1.5: Schematische Übersicht des Katalysemechanismus von CYP Enzymen

Abkürzungen: Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP), reduzierte Form des NADP (NADPH), Eisen-(II/III)-Ionen (Fe^{2+/3+}), Rest (R), NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR), Cytochrom-P450 (CYP). Abbildung wurden unter Verwendung von Science Slide, Microsoft erstellt.

Zu Beginn bindet das Substrat an den oxidierten Eisen-Kofaktor des Eisen-Protoporphyrin ix (Häm). Anschließend erfolgt eine NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR) vermittelte Reduktion des Eisen-Kofaktors, wodurch die Anlagerung eines Sauerstoffmoleküls an das CYP Enzym ermöglicht wird. Durch erneuten Elektronentransfer durch die CPR erfolgt die Übertragung des atomaren Sauerstoffs auf das Substrat (91). Die entstehenden Metaboliten sind z.T. wasserlöslicher und z.T. wirksam. Derzeit sind 102 funktionale murine CYP Enzyme identifiziert, die in 18 Familien eingeteilt werden und eine sehr breite Substratspezifität aufweisen (92). Pharmaka werden vor allem von den Subfamilien CYP1A, CYP2C, CYP2D und CYP3A metabolisiert (93). Die Regulation der Genexpression der CYP Enzyme ist komplex und kann durch Aktivierung vielerlei Rezeptoren moduliert werden. Prominente Vertreter sind beispielsweise der Aryl-Hydrocarbon Rezeptor (AHR), Constitutiv androstan Rezeptor (CAR) und der Pregnan-X-Rezeptor (PXR). AHR ist ein Liganden-aktivierbarer Transkriptionsfaktor, der die Expression von CYP1A Isozymen reguliert. CAR und PXR sind Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die Expression von CYP3A Isozymen regulieren (94). Des Weiteren unterliegen die Expression sowie die Aktivität der CYP Enzyme dem zirkadianen Rhythmus. Zhang und Kollegen zeigten für verschiedene CYP Enzyme, die CPR sowie diverser Transkriptionsfaktoren zirkadiane Expressionsprofile (95).

Buprenorphin zeichnet sich durch eine hohe Bioverfügbarkeit nach s.c. und intramuskulärer Applikation aus (77, 96, 97). Die Bioverfügbarkeit nach intravenöser Applikation ist laut Definition bei 100 %. Nur nach oraler Gabe ist die Bioverfügbarkeit deutlich reduziert, auf Grund des signifikanten *First-Pass* Metabolismus in Magen und Leber (98). Zusätzlich verfügt Buprenorphin über ein großes Verteilungsvolumen, bei gleichzeitiger hoher Plasmaproteinbindung von 96 % (96, 97, 99-101). Buprenorphin ist nach s.c. Gabe vor allem im Gehirn, Fettgewebe, Niere und Muskelgewebe zu finden (102, 103).

Im Menschen wird Buprenorphin primär durch eine CYP3A4/5-vermittelte N-Desalkylierung zu Norbuprenorphin umgesetzt (**Abbildung 1.6**). Diese Reaktion kann z.T. von CYP2C8/9 unterstützt werden (104, 105).

Abbildung 1.6: Metabolisierung von Buprenorphin

Abkürzungen: Cytochrom-P450 (CYP), UDP-Glukuronosyltransferasen (UGT)

Norbuprenorphin ist ein voller MOR und DOR sowie ein partieller KOR Agonist und ist damit ein aktiver Metabolit von Buprenorphin (106). Über die Affinität von Norbuprenorphin zum ORL1 sind kontroverse Ansichten in der Literatur zu finden (ORL1 Agonist (106), keine Affinität zum ORL1 (86)). Im Gegensatz zu Buprenorphin verursacht Norbuprenorphin eine beträchtliche Atemdepression und induziert nur eine geringe analgetische Wirkung (86). Brown und Kollegen zeigten, dass Norbuprenorphin im Gegensatz zu Buprenorphin ein Substrat des P-Glykoproteins (ein ABC-Transporter an der luminalen Membran von Gehirn Kapillarendothelzellen in der Blut-Hirn-Schranke) ist (103, 107, 108), das bedeutet, dass Norbuprenorphin zu einem großen Teil wieder aus dem Gehirn ausgeschleust wird. Der Efflux von Norbuprenorphin aus dem Gehirn geht mit einem geringen analgetischen Effekt einher (107). Zusätzlich fanden Alhaddad und Kollegen heraus, dass die pharmakologische

Inhibition des P-Glykoproteins zu einer Blockade des Effluxes von Norbuprenorphin führt, die mit einer verstärkten Buprenorphin-bedingten Atemdepression einher geht (85).

Im Zuge der Phase-II-Reaktion, der Konjugationsreaktion, finden durch Transferasen katalysierte Glukuronidierungen, Sulfatierungen, Methylierungen, Acetylierungen und Konjugationen mit Aminosäuren oder Glutathion statt. Die durch UDP-Glukuronosyltransferase (UGT) vermittelte Glukuronidierung stellt hierbei eine häufige Phase-II-Reaktion bei lipophilen Pharmaka dar (109). Ähnlich wie die CYP Enzyme unterliegt auch die Expression der UGT Enzyme dem zirkadianem Rhythmus (95). Buprenorphin sowie Norbuprenorphin werden beide in einer Phase-II-Reaktion durch UGT glukuronidiert (**Abbildung 1.6**) (110). Die Bildung von Buprenorphin-3-Glukuronid wird vor allem durch UGT1A1 mit Unterstützung von UGT1A3 und UGT2B17 katalysiert. Dahingegen wird die Bildung von Norbuprenorphin-3-Glukuronid primär durch UGT1A3 unter Unterstützung von UGT1A1 katalysiert (111). Hierbei wurden häufig gleiche oder höhere Plasmakonzentrationen der Glukuronide im Vergleich zu Buprenorphin detektiert (112, 113). In der Regel wird die Phase-II-Reaktion als Inaktivierungsreaktion zur Eliminierung von Metaboliten angesehen. Jedoch zeigten Brown und Kollegen, dass die Glukuronide von Buprenorphin und Norbuprenorphin ebenfalls eine biologische Aktivität aufweisen (86). Buprenorphin-3-Glukuronid weist eine hohe Affinität zum MOR, DOR und ORL1, nicht jedoch zum KOR auf. Dahingegen ist Norbuprenorphin hoch affin dem KOR und ORL1, nicht jedoch dem MOR und DOR gegenüber. Buprenorphin-3-Glukuronid zeigt einen geringen analgetischen Effekt, wohingegen Norbuprenorphin-3-Glukuronid das Tidalvolumen reduziert und eine Sedierung verursacht (86).

Das Opioid Buprenorphin wird vorrangig über die Galle und nach intensiver enterohepatischer Zirkulation über den Fäzes ausgeschieden und nur zu 10 – 30 % über den Urin (97, 102). Die Glukuronide Buprenorphin- und Norbuprenorphin-3-Glukuronid sind vor allem im Urin und Buprenorphin und Norbuprenorphin im Fäzes zu finden (114, 115).

1.6 Stammesunterschiede bei der Spezies Maus

Die unterschiedlichen Dosierungsempfehlungen für Buprenorphin können nicht nur durch variierende noxische Stimuli, sondern auch in der Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen begründet sein. Generell wird bei der Spezies Maus zwischen Auszucht- und Inzuchtstämmen unterschieden. Ein Auszuchtstamm ist definiert, als eine geschlossene Population mit definierter genetischer Heterogenität unter Einhaltung bestimmter Variationsgrenzen im Verlauf der Generationen (116). Ein Inzuchtstamm ist ein über mindestens 20 Generationen, durch Bruder-Schwester Verpaarung, gezüchteter Stamm, mit einem klar definierten genetischen Hintergrund. Nach 20 Generationen wird ein Inzuchtkoeffizient (d.h. die Wahrscheinlichkeit eines einzelnen Genlokus, in homozygoter Form vorzuliegen) von 98,63 % und nach 40 Generationen von 99,98 % erreicht (117). Auf Grund des gut definierten genetischen Hintergrundes, werden Inzuchtstämmen vermehrt für wissenschaftliche Fragestellungen genutzt. Im Jahre 2009 wurde vom Sanger Institut das „Mouse-Genome“ Projekt initiiert (118). In der Datenbank werden vollständig sequenzierte Genome einzelner Inzucht-Mausstämmen gesammelt und veröffentlicht. Zusätzliche Funktionen ermöglichen einen einfachen Sequenzvergleich spezifischer Zielgene in unterschiedlichen Mausstämmen, sodass beispielsweise die Identifizierung von *single nucleotide polymorphism* (SNP), Insertionen, Deletionen und Strukturvarianten möglich ist. Hierdurch wird ermöglicht, genetische Varianten mit einer biologischen oder klinischen Relevanz in Zusammenhang zu bringen.

Häufig verwendete Inzuchtstämmen sind C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ (119) (**Abbildung 1.7**). C57BL/6J ist der am weitesten verbreitete Inzuchtstamm, dessen Genom als erstes sequenziert wurde. Er wird in der Regel als Hintergrundstamm zur Generierung von kongenen Stämmen verwendet (120). Balb/cJ wird häufig zur Generierung von Plasmazytomen verwendet, die die Basis der Produktion von monoklonalen Antikörpern darstellen (121). Historisch gesehen, wurden 129S1/SvImJ Mäuse verwendet, auf Grund ihrer hohen Inzidenz zur Ausbildung von testikulärer Teratomen. Mittlerweile werden sie weitaus häufiger zur Produktion gezielter Mutationen verwendet, auf Grund der großen Verfügbarkeit von verschiedenen embryonalen Stammzelllinien, die von ihnen abgeleitet wurden (122).

Abbildung 1.7: Häufig verwendete Maus Inzuchtstämmen

Von links nach rechts: C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ (6 Wochen alte männliche Mäuse).

1.6.1 Nozizeption und Analgesie

Stammesbedingte Unterschiede sind bei der Maus für die basalen Nozizeption bezogen auf unterschiedliche Schmerzreize bereits gut charakterisiert (123-129). Beispielsweise untersuchten Mogil und Kollegen elf Inzuchtstämme hinsichtlich ihrer basalen Nozizeption mit zwölf verschiedenen Schmerztestungen, die thermische, mechanische und chemische Stimuli sowie neuropathischen Schmerz beinhaltete (124). Die verschiedenen Inzuchtstämme wiesen Unterschiede in ihrer basalen Schmerzempfindlichkeit auf, die zusätzlich von der Qualität des Schmerzreizes abhing (124). Zusätzlich charakterisierte die Forschungsgruppe die genetische Variabilität der Nozizeption und identifizierte durch Clusteranalysen fünf verschiedene Typen der Nozizeption und Hypersensitivität: basale thermale Nozizeption, spontane Antwort auf noxische chemische Stimuli, thermische Hypersensitivität, mechanische Hypersensitivität und afferente Eingangs-abhängige Hypersensitivität (124, 130, 131). Jedoch wurden bisher keine konkreten Zielgene identifiziert. Des Weiteren wurden sogar innerhalb verschiedener Substämme von C57BL/6 Unterschiede in der basalen Nozizeption detektiert (132). Die genauen Mechanismen sind derzeit noch nicht aufgeklärt.

Stammesbedingte Unterschiede bezogen auf den analgetischen Effekt von Opioiden wurden für die Spezies Maus bisher nur für Fentanyl, Morphin und Tramadol eindeutig nachgewiesen (133-136). Der volle MOR Agonist Fentanyl zeigte eine 7-fach höhere Potenz bei männlichen C57BL/6J Mäusen, verglichen mit dem Inzuchtstamm 129/SvJ, bei gleicher basaler Schmerzsensitivität ohne Medikation (134). Mogil und Kollegen detektierten ebenfalls Stammesunterschiede hinsichtlich des analgetischen Effektes des vollen MOR Agonisten Morphin (135). Im Fall des partiellen MOR Agonisten Buprenorphin, wurden für die Spezies Ratte stammesbedingte Unterschiede festgestellt (137-139). Für die Spezies Maus sind nach dem bisherigen Wissensstand kontroverse Daten bzgl. eines Stammesvergleichs für den analgetischen Effekt von Buprenorphin vorhanden. Carbone und Kollegen verglichen zwei Maus-Inzuchtstämme Balb/cJ und SWR/J hinsichtlich der Wirkdauer von Buprenorphin miteinander und konnten zwei Stunden nach Applikation keine Stammesunterschiede feststellen (74). Dahingegen untersuchten Wright-Williams und Kollegen die Effektivität von zwei Dosen an Buprenorphin nach einer Vasektomie in männlichen C57BL/6CrI und C3H/HeNCrI Mäusen. Durch Beurteilung von schmerzbezogenen Verhaltensweisen schlussfolgerten sie, dass Buprenorphin in männlichen C57BL/6CrI Mäusen effektiver war (140).

1.6.2 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Unterschiede im analgetischen Effekt von Buprenorphin können in der genetischen Disposition durch eine unterschiedliche Pharmakokinetik und/ oder Pharmakodynamik begründet werden. Wie bereits beschrieben, wird Buprenorphin in einer Phase-I-Reaktion zu Norbuprenorphin umgesetzt, welches eine weitaus geringere analgetische Wirkung als Buprenorphin aufweist (86). Der analgetische Effekt hängt daher unter anderem von der Stoffwechsel-Aktivität der CYP3A Isozyme ab. Stammesunterschiede in der Aktivität von CYP Enzyme sind bekannt. Lofgren und Kollegen untersuchten die Aktivität von CYP Enzymen in fünf unterschiedlichen Mausstämmen. Hierfür verwendeten sie dreizehn verschiedene humanspezifische CYP Substrate, die sie in Lebermikrosomen von männlichen und weiblichen Tieren testeten. Stammesbedingte Unterschiede konnten für die CYP3A-vermittelte Testosteron 6 β -Hydroxylierung detektiert werden (141). Stammesvergleichende Studien bzgl. der Stoffwechselaktivität der Phase-II-vermittelnden UGT Enzyme sind nur vereinzelt vorhanden. Guo und Kollegen untersuchten in zehn Mausstämmen die Glukuronidierungsrate der UGT1A Isozyme (unter anderem relevant für die Bildung von Buprenorphin- und Norbuprenorphin-3-Glukuronid) in Lebermikrosomen und konnten hierbei stammesbedingte Unterschiede feststellen (142). Inwieweit Stammesunterschiede für die Metabolisierung von Buprenorphin eine Rolle spielt, ist nur wenig bekannt. Für zwei Mausstämme (Auszuchtstamm Swiss und Inzuchtstamm FvB) wurde bereits gezeigt, dass sich ihre metabolische Kapazität in der Umsetzung von Buprenorphin zu Norbuprenorphin statistisch signifikant unterscheidet (143). Die Studie untersuchte zwar den stammes- und geschlechtsspezifischen Einfluss des P-Glykoproteins auf die Buprenorphin-vermittelte respiratorische Depression, jedoch nicht die analgetische Wirkung von Buprenorphin oder Unterschiede innerhalb der CYP3A Isozyme.

Die analgetische Wirkung von Buprenorphin wird vor allem über den MOR vermittelt (45). Xu und Kollegen untersuchten die Expression unterschiedlicher Splicing-Varianten des MOR in vier verschiedenen Mausstämmen (144). Sie detektierten stammesabhängige Unterschiede auf Expressionsebene des MOR Gens in verschiedenen Regionen des Gehirns und zeigten eine wahrscheinliche Korrelation mit der stammesbedingten Effektivität gegenüber Morphin auf. Die Gesamtexpression des MOR im Gehirn wies dabei keine stammesspezifischen Unterschiede auf.

Die bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur bzgl. einer stammesabhängigen Nozizeption und Analgesie bei der Maus verdeutlichen, dass auch im Fall von Buprenorphin eine stammesabhängige Wirkung wahrscheinlich ist. Aus diesem Grund wurde folgende Zielstellung entwickelt.

1.7 Zielstellung

Die Etablierung einer geeigneten Analgesie ist eine wichtige Refinement-Maßnahme in der Versuchstierkunde, um Schmerzen, Leiden und Schäden auf das unerlässliche Maß zu reduzieren. Jedoch wird aus der Literatur deutlich, dass die perioperative Schmerzbehandlung bisher nicht zufriedenstellend ist (12). Für die Spezies Maus, die mit 70 % das am häufigsten verwendete Versuchstier ist (13, 14), wird das Opioidanalgetikum Buprenorphin zur Behandlung von moderaten bis schweren postoperativen Schmerzen empfohlen (11, 69, 70, 73, 76). Extreme Spannbreiten von Dosierungsempfehlungen (0,006 – 10 mg/kg) führen jedoch zu großen Unstimmigkeiten in der Anwendung (69-75). Zusätzlich werden wichtige Parameter, wie beispielsweise die Verwendung von unterschiedlichen Mausstämmen, bisher nicht in den Empfehlungen berücksichtigt.

Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht werden (**Abbildung 1.8**):

1. Unterscheidet sich die analgetische Wirkung von Buprenorphin in verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen?
2. Ist dieser mutmaßliche stammesabhängige analgetische Effekt von Buprenorphin, auf Veränderungen im Phase-I Stoffwechsel zurück zu führen?

Abbildung 1.8: Illustrierung der wissenschaftlichen Fragestellung

Zur Bearbeitung der beiden Fragestellungen wurden männliche C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäuse verwendet und folgende Parameter untersucht (**Abbildung 1.9**):

Fragestellung 1: Stammesvergleich zur analgetischen Wirkung von Buprenorphin

- Identifizierung einer geeigneten Buprenorphin-Dosis zum Vergleich dreier Maus-Inzuchtstämme durch Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve für den Referenzstamm C57BL/6J, unter Verwendung des IHP Tests.
- Identifizierung der basalen Schmerzempfindlichkeit sowie der analgetischen Wirkung von Buprenorphin in zwei Dosen (0,42 mg/kg; 4,0 mg/kg) in C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen mittels IHP Test.

Fragestellung 2: Stammesvergleich zu Veränderungen im Phase-I Metabolismus

- Konzentrationsbestimmung von Buprenorphin und seiner Metaboliten in Blutserum und Gehirn mittels HPLC-MS/MS Analyse.
- Identifizierung und Verifizierung von potentiell relevanten SNP in stoffwechselrelevanten Enzymen mittels Datenbank-Analyse sowie Restriktions-Fragmentlängen Polymorphismus–Analyse (RFLP) und Sanger Sequenzierung.
- Aktivitätsanalyse von relevanten Enzymen des Phase-I Metabolismus in Lebermikrosomen durch Verwendung eines Luciferin-basierten Aktivitäts-Assay.
- Expressionsmessung von relevanten Enzymen des Phase-I Metabolismus auf mRNA und Protein Ebene mittels qPCR im SYBR Green Format und ELISA.

Die Ergebnisse sollen zu einer Verbesserung der aktuellen Dosierungsempfehlungen von Buprenorphin beitragen, indem auf Stammesunterschiede aufmerksam gemacht wird und diese vorzugsweise in bestehende Empfehlungen berücksichtigt werden.

Beitrag zum Refinement:

Verbesserung der aktuellen Empfehlungen zur Dosierung von Buprenorphin durch Angabe stammesspezifischer Dosierungen

<i>in vivo</i>	<i>in silico</i>	<i>in vitro</i>
Phänotyp: Bestimmung der Nozizeption und Antinozizeption mittels IHP	Genotyp: Genetische Analyse von metabolisch relevanten CYP Isozymen	Aktivität: Bestimmung der metabolischen Kapazität von relevanten CYP Isozymen
Analytik: Serum- und Gehirnkonzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten		Expression: mRNA und Protein Level von metabolisch relevanten CYP Isozymen
Korrelation der Parameter und Verbesserung der Dosierungsempfehlungen		

Abbildung 1.9: Übersicht der Arbeitspakete sowie angestrebtes Ziel

Abkürzungen: Cytochrom-P450 (CYP), *Incremental Hot Plate* (IHP)

2 Material und Methoden

2.1 Material

Standardmäßig verwendetes Verbrauchsmaterial und sowie gängige Laborausstattung werden nicht gesondert aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
1 ml Einwegspritze	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen (D)
384-well Fast PCR	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
50 Venofix® Venenpunktionsbesteck 23G, 24G, 25G	Braun, Melsungen (D)
50 ml Einwegspritzen	Braun, Melsungen (D)
Black/White Isoplate-96 Black frame White Well	Perkin Elmer, Rodgau (D)
Einweg Skalpell	Braun, Melsungen (D)
Neoject® Einmal-Kanüle 26Gx1/2"	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen (D)
OptiSeal Ultracentrifugationsröhrchen 10 ml	Beckmann Coulter, Krefeld (D)

Tabelle 2.2: Chemikalien/ Biochemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
6x DNA Loading Dye & SDS Solution (6x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Agarose, TopVision	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Di-Kaliumphosphat-Trihydrat	Roth, Karlsruhe (D)
D-Luciferin Firefly, Potassium salt	Biosynth®, Staad (CHE)
EDTA	Roth, Karlsruhe (D)
Eisessig	Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (D)
GelGreen™ 10000-fach konzentriert in Wasser	Biotium, Fremont (USA)
Helipur selbstreinigendes Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen (D)
Kaliumphosphat	Roth, Karlsruhe (D)
ortho-Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt (D)
Saccharose	Merck, Darmstadt (D)
TRIS base	Roth, Karlsruhe (D)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen (D)

Tabelle 2.3: Puffer und Lösungen

Name	Hersteller
DPBS	PAN ^{TM} Biotech GmbH, Aidenbach (D)
NaCl 0,9 %, steril	G-Bioscience, St. Louis (USA)
TE Puffer	Ambion ^{TM} , Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)

Puffer	Zusammensetzung
10x TAE Buffer (1 l)	48,4 g Tris base; 11,44 ml Eisessig; 20 ml 0,5M EDTA

Tabelle 2.4: Kommerzielle biologische Kits

Name	Hersteller
AccuPrime Taq DNA Polymerase System	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Cytochrome P450 Reductase (CPR) Activity kit	BioVision Inc., Milpitas (USA)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Mouse Cytochrome P450 3A4 (CAP3A4) ELISA kit (SED299Mu)	Cloud-Clone Corp., Huston (USA)
NADPH Regeneration System	Promega GmbH, Mannheim (D)
P450-Glo ^{TM} CYP3A4 Assay (Luciferin-IPA)	Promega GmbH, Mannheim (D)
Pierce ^{TM} BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN®, Hilden (D)
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN®, Hilden (D)
QuantiFast® SYBR Green PCR Kit	QIAGEN®, Hilden (D)
RNase-free® DNase Set	QIAGEN®, Hilden (D)
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN®, Hilden (D)

Tabelle 2.5: Enzyme

Enzyme	Hersteller
AvrII	New England BioLabs Inc., Frankfurt (D)
BsaHI	New England BioLabs Inc., Frankfurt (D)
BstNI	New England BioLabs Inc., Frankfurt (D)
CviKI-1	New England BioLabs Inc., Frankfurt (D)
DraI	New England BioLabs Inc., Frankfurt (D)
NlaIII	New England BioLabs Inc., Frankfurt (D)

Tabelle 2.6: DNA/ RNA Ladder

Ladder	Hersteller
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
GeneRuler 50bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
RiboRuler HR RNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)

Tabelle 2.7: Kommerzielle Primer

Kommerzielle Primer	Hersteller
Mm_Actb_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a11_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a13_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a16_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a25_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a41a_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a44_va.1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a57_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp3a59_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Gapdh_3_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Nr1i2_1_SG (PXR) QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Nr1i3_1_SG (CAR) QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Por_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Rn18s_3_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)

Tabelle 2.8: Designte Primer zur SNP Validierung mittels RFLP oder Sanger Sequenzierung

Gen	SNP-ID	Methode	Orientierung	Sequenz (5' zu 3')
<i>Cyp3a16</i>	rs33543287	RFLP	FORWARD	CTTGGGTACATGCCCCGTGAT
			REVERSE	ACATGTAGGCTGTGTGCCAA
<i>Cyp3a16</i>	rs33166435	Sanger	FORWARD	GCAATCAGGAAAACACACAATGCC
			REVERSE	GCCATAAAGCAGATCAAGCCAG
			FORWARD	GAGGACCACTGGACATTGA
			REVERSE	GGAAGGAGCCCCAGTTGTT
<i>Cyp3a44</i>	rs239851337	Sanger	FORWARD	TGCCATTGAGCCTACTGACC
			REVERSE	TACTGCCTGTACATTTGTAGACTCC
			FORWARD	ACCATTGCAAGTGACCAAAT
			REVERSE	TCTGGATGTGTCATTTGCTG
<i>Cyp3a44</i>	rs583385430	RFLP	FORWARD	CCTTTACTGCTCACTGAATGACAA
			REVERSE	GAGGGAGCCCAGTTGTTGAT
<i>Cyp3a57</i>	rs29684215	RFLP	FORWARD	AAAGATGTGAAGCTGTGCCAGA
			REVERSE	AAGCTAAATGTGGAATTTCTGGGTC
<i>Cyp3a59</i>	rs29510048	Sanger	FORWARD	AAGACCCAGACAATTAACAGTGAT
			REVERSE	CCAGTCATGAGACAATGAGTTGC
<i>Cyp3a59</i>	rs49207862	RFLP	FORWARD	AGAAAGGGGAGCCCATCAAC
			REVERSE	GTTAGAGGAGGATAGAAGGGATGGA
<i>Cyp3a59</i>	rs36827986	Sanger	FORWARD	TTTTGAGTCCAACACTGTAGGGAA
			REVERSE	GCATCTACCATGAAGCCCTTGG
			FORWARD	TGGGTTTAGGGCTTGAATTG
			REVERSE	TGTTTTGAAGCAAGGCGT
<i>Cyp3a59</i>	rs38952718	RFLP	FORWARD	CCGGGAAATCCACTGTCACTC
			REVERSE	ATCATGACCAGCCAGACTGTG
<i>Cyp3a59</i>	rs51611659	RFLP	FORWARD	TCCATCAATTGAGTTAGACCT
			REVERSE	ATCTCTTTACAGCATGGAAC
<i>Cyp3a59</i>	rs33429092	Sanger	FORWARD	GCCAGACAAGTATTTCCCTACA
			REVERSE	CACTCCCCATTAACCTCCGGT
			FORWARD	AAGGATTCAGCTACAAGTCC
			REVERSE	ACAGCAATAGAAAAGAGCCA
<i>Cyp3a59</i>	rs33260411	RFLP	FORWARD	TTTCCCTACATGAGAAGTCTCCAG
			REVERSE	TGTGCACAATCACTCCCCATT

Tabelle 2.9: Geräte

Gerät	Hersteller
Geldokumentation, Fusion Solo S	Vilber Lourmat, Eberhardzell (D)
GloMax Veritas ^{TM} Microplate Luminometer	Promega GmbH, Mannheim (D)
Incremental Hot Cold Plate Analgesia Meter	IITC Inc. Life Science, Woodland Hills (USA)
Kamera Axis M1125; Objektiv 3-10.5 mm	Axis Communications, Ismaning (D)
Kamera: DFK 33GR0134, Objektiv: AU-VT02812N (F1.4, 2.8-12mm)	The Imaging Source, Bremen (D) , VIDO.AT, Wien (AUT)
Mastercycler® nexus gradient	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikroplattenlesegerät	Tecan Reader GENios, Männedorf (CHE)
Mithras LB940	Berthold Technologies, Wien (AUT)
Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Mikrovolumen-Spektralphotometer, Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (D)
Oberflächenfühler (88105K-IEC)	Omega Engineering GmbH, Deckenpfronn (D)
Optima LE-80K Ultracentrifuge (NVT 65 Rotor)	Beckmann Coulter, Krefeld (D)
pH Meter 765	Knick, Berlin (DE)
Präzisionswaage L420P	Sartorius AG, Göttingen (DE)
Quant Studio7 Cycler	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Thermometer (HH802U)	Omega Engineering GmbH, Deckenpfronn (DE)

Tabelle 2.10: Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism6.0	GraphPad Software, San Diego (USA)
ImageJ	Wayne Rasband (public domain)
Mediarecorder	Biobserve GmbH,Bonn (D)
MEGA7	Kumar, Stecher und Tamura (public domain)
NEBCutter2.0	New England BioLabs Inc (public domain)
R software Version3.4.0	Prozess und Statistik (public domain)
ScienceSlides Add-Ins	Microsoft, Redmond (USA)
Spectator	Biobserve GmbH,Bonn (D)
Viewer IV	Biobserve GmbH,Bonn (D)

2.1.1 Tiere

Anhand der Literatur wurden die drei Maus-Inzuchtstämme C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ, auf Grund ihrer Häufigkeit der Verwendung (119) und der nicht engen Verwandtschaft hinsichtlich ihrer Genealogie (145), für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

2.1.1.1 Ethische Stellungnahme

Die Haltungsbedingungen der Versuchstiere, die angewendete Tötungsmethode sowie das Studiendesign wurden von der zuständigen Genehmigungsbehörde in Berlin, Landesamt für Gesundheit und Soziales, begutachtet und genehmigt (T 0205/2014, T 0252/2015, G 0309/15, G 0194/16) und sind konform mit dem Deutschen Tierschutzgesetz und der Tierschutzversuchstierverordnung. Die einzelnen verwendeten Mausgruppen sind zur besseren Verständlichkeit in **Tabelle 2.11** aufgeführt.

Tabelle 2.11: Übersicht der verwendeten Mausgruppen zugeordnet zum jeweiligen Versuch

Versuch	Stamm	Anzahl	Substanz	Test	Proben
Buprenorphin Dosisfindung (G 0309/15)	C57BL/6J	23	Buprenorphin (0,05, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 mg/kg), Fentanyl (0,3 mg/kg)	Habituation , OF, IHP	Blut, Gesamtleber, Gehirn
Stammesvergleich Buprenorphin (G 0194/16)	C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ	15 je Stamm	Buprenorphin (0,42, 4,0 mg/kg)	Habituation , OF, IHP	Blut, Gesamtleber, Gehirn, Schwanzspitze
Methodenetablierung Lebermikrosomenisolation T 0205/2014	C57BL/6J	10	/	/	Leberlappen
Stammvergleich naiver Tiere bzgl. CYP3A Aktivität und Expression T 0252/2015	C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ	8 je Stamm	/	/	Gesamtleber, Gehirn

Abkürzungen: *Open Field* (OF), *Incremental Hot Plate* (IHP)

2.1.1.2 Haltung

Männliche C57BL/6J Mäuse wurden von Charles River (Sulzfeld, D, züchtet den Original Jackson Stamm aus den USA) und männliche Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäuse von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA, Import durch Charles River) nach dem Absetzen bezogen. Die Mäuse waren, bezogen auf die gelisteten viralen, bakteriellen und parasitären Pathogene, der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ (FELASA) ohne Befund. Die Mäuse wurden in Gruppen von 5 bis 8 Tieren in Eurostandard Typ III Polycarbonat Käfigen (Tecniplast, Hohenpeissenberg, D) mit Filtertop gehalten. Diese waren mit autoklaviertem Einstreu (LASbedding™PG2, LASvendi, Soest, D) und Nistmaterial, einem Maushaus aus Pappe und einem Nageholz ausgestattet. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu autoklaviertem Futterpellets (LASQCdiet™ Rod16, LASvendi, Soest, D) und Wasser. Dieses war mit Salzsäure angesäuert (pH-Wert = 3), um das Wachstum von pathogenen Keimen zu verhindern. Die Raumtemperatur betrug 21 ± 1 °C, mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 ± 10 %. Der Tag/Nacht Rhythmus wurde durch artifizielles Licht im 12/12 h Rhythmus simuliert, mit Licht von 5:00 bis 17:00 während der Winterzeit und 6:00 bis 18:00 während der Sommerzeit.

2.1.2 Substanzen

Die verwendeten Analgetika wurden mit steriler 0,9 % Natriumchlorid Lösung entsprechend verdünnt. Folgende Konzentrationen wurden verwendet: 0,05, 0,25, 0,42, 0,5, 1,0, 2,0 und 4,0 mg/kg Buprenorphin (Charge: H012, H007) und 0,3mg/kg Fentanyl (Charge 5010). Das Injektionsvolumen betrug 13,5 ml/kg Körpergewicht und wurde s.c. in die Nackenfalte injiziert. Als Kontrolle diente 0,9 % Natriumchlorid Lösung. Applikationsvolumen und –art waren analog zu den applizierten Testsubstanzen.

Tabelle 2.12: Verwendete Analgetika

Analgetikum	Hersteller
Buprenovet® 0,3 mg/ml	Bayer Animal Health Care, Leverkusen (D)
Fentanyl 0,05 mg/ml	Janssen-Cilag GmbH, Neuss (D)

2.2 Methoden

Die Expression und die Aktivität der CYP3A Isozyme, die maßgeblich für die Metabolisierung von Buprenorphin verantwortlich sind, werden durch den zirkadianen Rhythmus beeinflusst. Aus diesem Grund fanden sowohl die Verhaltensuntersuchungen als auch die Probenentnahme von 9:00 bis 11:00 während der Winterzeit und 10:00 bis 12:00 während der Sommerzeit statt. Zusätzliche Einflussfaktoren sind das Alter und das Geschlecht, weshalb sich entschieden wurden ausschließlich männliche Mäuse im Alter von sieben bis acht Wochen zu verwenden (146-149).

2.2.1 Stammesvergleich analgetische Wirkung von Buprenorphin

2.2.1.1 *Incremental Hot Plate*

Zur Testung der Schmerzreaktion wurde die *Incremental Hot Plate* (IHP) verwendet (IITC Inc. Life Science, Los Angeles, USA, Plattengröße 10 cm x 20 cm umgeben von durchsichtigen Plexiglas-Wänden, **Abbildung 1.4**). Da alle in der Literatur beschriebenen Schmerztestungen artifiziell sind und nicht die reale Situation eines chirurgischen Eingriffs widerspiegeln, wurde in der vorliegenden Arbeit bewusst nur ein Schmerztest ausgewählt, dessen definierter Schmerzreiz so wenig belastend wie möglich ist. Hierbei wurde die Heizplatte linear erwärmt. Gemessen wurde die Temperatur, die eine schmerzhafte Reaktion bei dem Tier auslöste. In Anlehnung an Carbone und Kollegen (74) wurde als schmerzhafte Reaktion Heben und Schütteln oder Lecken einer der beiden Hinterpfoten sowie Springen gewertet. Folgendes Protokoll wurde entsprechend Alshahrani und Kollegen (63) mit leichten Modifikationen verwendet: 35 °C Starttemperatur, eine Heizrate von 6 °C/ min und 55 °C Abbruchtemperatur (T2). Zu Beginn wurde die Maus auf die 35 °C warme Heizplatte gesetzt und eine Minute gewartet, damit sich die Maus auf der Platte orientieren konnte. Der Test wurde durch Betätigen des entsprechenden Knopfes gestartet. Bei Auftreten einer Schmerzreaktion wurde der Test manuell über Betätigung der Taste beendet und die Heizplatte innerhalb von 25 bis 30 Sekunden automatisch auf die Starttemperatur herunter gekühlt. Wenn keine Schmerzreaktion auftrat, wurde der Test automatisch bei Erreichen der definierten Abbruchtemperatur (55 °C) beendet. Die Testung wurde frontal und lateral per Videoaufzeichnung dokumentiert und verblindet ausgewertet, um die Abbruchtemperatur zu ermitteln. Die analysierten Daten der IHP Testung wurden verwendet, um zum einen die Temperaturdifferenz $\Delta T = T1(x) - T0$ zu berechnen ($T1(x)$: Abbruchtemperatur nach Analgetikum Applikation der Dosis x, $T0$: basale Abbruchtemperatur). Zum anderen wurde der maximal mögliche Effekt $MPE(x) = 100 \% \times [(T1(x) - T0) / (T2 - T0)]$ berechnet ($T2$: 55°C maximale Abbruchtemperatur). Zwischen den Testungen der einzelnen Mäuse wurden die Platte sowie die Plexiglasbegrenzung mit alkoholfreien Desinfektionstüchern gereinigt.

2.2.1.2 *Open Field*

Da laut Literatur Buprenorphin eine Steigerung der Lokomotion verursacht (75, 90, 150) und nicht auszuschließen ist, dass eine gesteigerte Lokomotion einen Einfluss auf den IHP Test hat, sollte die Lokomotion vor der IHP Testung untersucht werden. Hierfür wurden die Tiere unmittelbar nach s.c. Injektion von Buprenorphin in eine kreisrunde mit Einstreu gefüllte *Open Field* (OF) Arena (grünes Plastik, ø 30 cm, 40 cm Höhe, 109 Lux) gesetzt und bis zur IHP Testung von oben per Videoaufnahme dokumentiert. Hierbei wurde die zurückgelegte Strecke (cm) sowie die durchschnittliche Geschwindigkeit (cm/s) mit Hilfe der Software Viewer, Version IV von Biobserve GmbH, analysiert. Um die Lokomotion während der IHP Testung abschätzen zu können, wurden die zurückgelegte Strecke sowie die

durchschnittliche Geschwindigkeit der letzten drei Minuten vor der IHP Testung beurteilt und diese mit der individuellen basalen Lokomotion ohne Injektion verglichen. Zwischen den Testungen der einzelnen Mäuse wurde das Einstreu gewechselt sowie die Arena mit alkoholfreien Desinfektionstüchern gereinigt.

2.2.1.3 Habituation

Um vertrauenswürdige Daten zu erzeugen sowie die Belastung des Versuchstieres während des eigentlichen Experiments so gering wie möglich zu halten, ist eine Habituation an die Versuchsaapparaturen notwendig. Zwei Wochen nach Akklimatisierung an die Haltungsbedingungen wurden die männlichen Mäuse in Einzelhaltung überführt. Die folgenden sechs Tage wurde täglich jede Maus in einer randomisierten Reihenfolge an die experimentellen Gegebenheiten habituieret. Zunächst erfolgte eine Fixation, um die s.c. Injektion in die Nackenfalte zu simulieren. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Habituation an die kreisrunde OF Arena, die von oben per Videoaufnahme dokumentiert wurde. Im Folgenden wurde die Maus auf die warme (35 °C Starttemperatur) Heizplatte der IHP Apparatur für 4 min gesetzt und ebenfalls frontal und lateral per Videoaufnahme dokumentiert.

2.2.1.4 Vorversuch: Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve

Zur Erstellung der Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve wurden männliche C57BL/6J Mäuse in einer randomisierten Reihenfolge getestet. Im Folgenden wird der Versuchsablauf exemplarisch für ein Tier beschrieben (**Abbildung 2.1**).

Abbildung 2.1: Zeitlicher Ablauf des Tierversuches

Abkürzung: *Incremental Hot Plate* (IHP)

Nach der Habituation erfolgte die einmalige Bestimmung der basalen Schmerzempfindung (T0) mittels IHP. Zunächst wurde die Maus fixiert, um eine s.c. Injektion zu simulieren. Anschließend wurde sie für drei Minuten in die kreisrunde Arena gesetzt und die Lokomotion von oben per Videoaufnahme dokumentiert (Basalwert). Anschließend wurde die Schmerzreaktion mittels IHP getestet. Ein Tag nach Testung der basalen Schmerzempfindung wurde die analgetische Wirkung einer definierten Dosis von

Buprenorphin (T1(x)) getestet. Folgende Dosen von Buprenorphin wurden eingesetzt: 0,00; 0,05; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 mg/kg mit n = 3 Mäusen pro Dosisgruppe. Nach s.c. Injektion einer der aufgelisteten Dosen von Buprenorphin wurde die Maus in die kreisrunde Arena zur Erfassung der Lokomotion gesetzt. 30 Minuten nach s.c. Injektion wurde die Schmerzempfindung auf der IHP getestet. Zusätzlich zu den Buprenorphin Dosisgruppen wurden zwei Tiere mit einer Dosis von 0,3 mg/kg Fentanyl behandelt und analog im OF und IHP getestet. Im Anschluss an die IHP Testung wurde die Maus sofort zur Probenentnahme getötet, die im Abschnitt **2.2.2.1** beschrieben wird.

2.2.1.5 Hauptversuch: Stammesvergleich zur analgetischen Wirkung von Buprenorphin

Zur Testung der analgetischen Wirkung von Buprenorphin in verschiedenen Mausstämmen wurden männliche Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ verwendet. Die Durchführung des Versuches erfolgte analog zum Vorversuch (**2.2.1.4**). Jedoch wurden hier lediglich zwei verschiedene Buprenorphin Dosen s.c. in die Nackenfalte appliziert: 0,42 mg/kg (n = 10 je Stamm) und 4,00 mg/kg (n = 5 je Stamm), die nach Auswertung des Vorversuches festgelegt wurden.

2.2.1.6 Statistische Planung des Vor- und Hauptversuches

Zur Berechnung der Versuchstierzahlen, die im Vor- und Hauptversuch verwendet wurden, wurde ein Simulationsmodell mit Hilfe der Software R (Version 3.3.1) erstellt und berechnet. Im Vorversuch sollte eine Dosis-Wirkungskurve erstellt werden, um die Effektive Dosis 50 % (ED50) zu ermitteln. Die Genauigkeit der Abschätzung des ED50 ist abhängig von der Präzision der gemessenen Dosis-Wirkungskurve, die wiederum von den verwendeten Dosen und der Tierzahl pro Dosisgruppe abhängt. Der ermittelte ED50 Wert sollte so genau bestimmt werden, um im Hauptversuch, mit einer Power von 80 % drei verschiedene Maus-Inzuchtstämme an einer Stelle ihrer Dosis-Wirkungskurve unterscheiden zu können, wenn sie sich mindestens um den Faktor 1,5 in ihrer Buprenorphin-Effektivität variieren.

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurde die applizierte Dosis gegen den $MPE(x) = 100\% \times [(T1(x) - T0) / (T2 - T0)]$ aufgetragen. Die Werte für das Simulationsmodell wurden zum einen definiert mit T2 = 55 °C Abbruchtemperatur und zum anderen aus der Literatur geschätzt (T0 = 47,5 °C ± 2,5 °C (MW ± SD) (63)). T1 ist abhängig von der applizierten Dosis x und wurde durch eine loglogistische Funktion modelliert:

$$T1 = T0 + \frac{7.5}{1 - \exp(b(\ln(x) - \ln(e)))} + \varepsilon.$$

Der Anstieg der loglogistischen Funktion wurde als gleich für alle drei verwendeten Maus-Inzuchtstämme angenommen und mit b = -2 aus der Literatur geschätzt (151). Der ED50 Wert wurde als e = 0,61 mg/kg Buprenorphin für den Inzuchtstamm C57BL/6J angenommen

(151) und für Balb/cJ und 129S1/SvImJ wie folgt definiert: $e(\text{Balb/cJ}) = 2/3 \cdot e(\text{C57BL/6J})$; $e(129S1/SvImJ) = 3/2 \cdot e(\text{C57BL/6J})$, um einen Unterschied, der mindestens um den Faktor 1,5 variiert, detektieren zu können. Die Varianz des normalverteilten Störfaktors ε wurde so gewählt, dass die Varianz zwischen $T1(x)$ und $T0$ pro Dosis r^2 beträgt, mit 0,25, 0,49 und 0,81 als mögliche Werte. Folgende Dosispunkte wurden verwendet: 0,00, 0,05, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00 und 4,00 mg/kg. Für jeden Parametersatz wurden 5000 Dosis-Wirkungskurven simuliert und eine Kurvenanpassung mit der R-Funktion `drm` durchgeführt, sodass e und b geschätzt werden konnten. Die Simulation ergab, dass eine Gruppengröße mit $n = 3$ Tieren je Dosis verwendet werden sollte ($\alpha = 0,05$, $\beta = 0,2$, $r^2 = 0,81$).

Die realen Daten des Vorversuches wurden verwendet ($T0 = 48 \pm 0,87$ °C, $ED50 = 0,42$ mg/kg, $b = -1,4$, $r^2 = 0,89$), um das Simulationsmodell zu optimieren und die Gruppengröße für den Hauptversuch zu berechnen. Die Gruppengröße je Stamm wurde durch Bootstrap-Analyse und Kruskal-Wallis Testungen mit einer Stichprobengröße von $n = 1000$ durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass die optimal zu prüfende Dosis 0,42 mg/kg ist, mit einer Gruppengröße von $n = 10$ Tiere ($\alpha = 0,05$, $\beta = 0,2$). Zusätzlich wurde eine zweite Dosis (4,0 mg/kg) implementiert, um mögliche Unterschiede in der Effektivität von Buprenorphin zu ermitteln. Hierfür wurde dasselbe Simulationsmodell verwendet, unter der Annahme, dass die obere Asymptote um den Faktor 3/2 oder 1/2 verschoben wird. Die Analyse ergab eine Gruppengröße von $n = 5$ Tiere pro Stamm ($\alpha = 0,05$, $\beta = 0,2$).

2.2.2 Stammesvergleich zur Veränderung im Phase-I Metabolismus

2.2.2.1 Probenentnahme

Im Alter von 7 bis 8 Wochen wurden die Mäuse durch graduelle Kohlenstoffdioxid (CO_2) Begasung getötet und sofort Blut durch Herzpunktion gewonnen. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Leber mit eiskalter steriler Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) über die Portalvene perfundiert. Die perfundierte Leber sowie das Gehirn wurden entnommen, gewogen und sofort mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das koagulierte Blut wurde für 15 min bei 5.500 relativer Zentrifugalkraft (rcf) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde bei -20 °C gelagert.

Für die Methodenetablierung der Lebermikrosomenisolation wurden die einzelnen Leberlappen sowie der Processus papillaris (Proc. p.) präpariert und separat eingefroren (**Abbildung 2.2**). Für alle weiteren Versuche wurde die gesamte Leber eingefroren.

Zusätzlich zur Entnahme von Blut, Leber und Gehirn, wurde von den Mäusen, die für den Buprenorphin Stammesvergleich eingesetzt wurden, eine Schwanzspitzenbiopsie für die SNP Analyse entnommen, mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Nassgewicht[g]	Lobus s. l.	Lobus m.	Lobus d. l.	Lobus c.	Proc. p.
MW $\pm$ SD	0,51 $\pm$ 0,13	0,5 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,03	0,12 $\pm$ 0,02

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Leberlappen der Maus und entsprechende Nassgewichte

Dargestellt sind Lobus sinister lateralis (Lobus s. l.), Lobus medialis (Lobus m.), Lobus dexter lateralis (Lobus d. l.), Lobus caudatus (Lobus c.) und Processus papillaris (Proc. p.) und die in Rot gekennzeichneten Schnittlinien. Die Tabelle stellt eine Übersicht der Nassgewichte nach Leberperfusion als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (MW $\pm$ SD) dar (n = 10, C57BL/6J, männlich).

2.2.2.2 Analyse von Buprenorphin und seiner Metaboliten

Zur Methodenetablierung bzw. -optimierung, wurden vorab Serum und Gehirn von unbehandelten Tieren an die Firma MVZ Labor Dessau GmbH versendet. Anhand der Proben des Vorversuches wurde die Funktionalität der Analyse überprüft.

Nach Proteinpräzipitation wurde der Gesamtgehalt an Buprenorphin und seiner Metaboliten im Serum und Gehirn mittels Flüssigchromatographie gekoppelt an Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durch die Firma MVZ Labor Dessau GmbH analysiert (Nachweisgrenze: 0,1 ng/ml für jeden Analyten). Die Quantifizierung erfolgte über Buprenorphin und Norbuprenorphin Isotopenstandards mit einer Quantifizierungsgrenze von 0,13 ng/ml für Buprenorphin, 0,16 ng/ml für Norbuprenorphin, 0,15 ng/ml für Buprenorphin-3-Glucuronid und 0,2 ng/ml für Norbuprenorphin-3-Glucuronid. Die Analyse wurde mit Hilfe der Proben des Vorversuches etabliert und analog für die Proben des Hauptversuches durchgeführt.

2.2.2.3 SNP Identifizierung

Das „Welcome Trust Sanger Institute“ hat im Zuge seines „Mouse Genome“ Projektes eine Datenbank entwickelt, in der mittlerweile die Genome von 36 verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen vollständig sequenziert vorliegen

(http://www.sanger.ac.uk/sanger/Mouse_SnpViewer/rel-1505, Datum: 15.12.2015) (118). Mit Hilfe dieser Datenbank kann gezielt nach SNP, Insertionen, Deletionen oder Strukturvarianten in ausgewählten Genen und Mausstämmen gesucht werden, die laut Datenbankbetreibern jedoch bei den eigens verwendeten Tieren verifiziert werden sollten.

Die Datenbank nutzt den Inzuchtstamm C57BL/6J als Referenzstamm. In der vorliegenden Arbeit wurde die Datenbank verwendet, um „missense Varianten“ im kodierenden Bereich aller *Cyp3a* Gene bei den Maus-Inzuchtstämmen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ zu identifizieren. Unter Verwendung der Veröffentlichung RL1505-GRCm38, wurden insgesamt 12 SNP in 5 *Cyp3a* Genen identifiziert, in denen die drei Maus-Inzuchtstämme einen Unterschied aufweisen: rs33543287, rs33166435, rs239851337, rs583385430, rs29684215, rs29510048, rs49207862, rs36827986, rs38952718, rs51611659, rs33429092, rs33260411. Diese identifizierten SNP sollten in den verwendeten Mäusen, mit Hilfe von RFLP (Restriktions-Fragmentlängen Polymorphismus) oder Sanger Sequenzierung verifiziert werden, um sicherzustellen, dass unsere drei Mausstämmen keinen genetischen Drift aufweisen. Hierfür wurden zunächst Primer designt.

2.2.2.3.1 Primerdesign

Die identifizierten SNP wurden anhand ihrer SNP ID in der Datenbank „dbSNP“ von *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) aufgerufen. Ein Sequenzbereich von etwa 3,3 bis 3,8 Kilobasen um den SNP herum wurde extrahiert im FASTA Format. Mit Hilfe der Anwendung „PrimerBlast“ von NCBI wurden SNP umspannende Primerpaare designt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine unspezifischen Nebenprodukte entstehen, dass das Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Produkt genügend groß ist (ca. 1000 Basenpaare (bp)) und der SNP möglichst mittig im PCR-Produkt lokalisiert ist. Anschließend wurde die Anwendung NEBCutter2.0 genutzt, um ein geeignetes Restriktionsenzym zu identifizieren. Dieses sollte beim Vorhanden- oder Nichtvorhandensein des SNPs spezifisch schneiden. Zusätzlich Schnittstellen im Gesamt-PCR-Produkt wurden akzeptiert, solange die resultierenden Fragmentlängen mittels Gelelektrophorese noch aufzutrennen und der entsprechenden SNP nachzuweisen war. Insgesamt konnten für 7 SNP spezifische Restriktionsenzyme identifiziert werden, sodass eine Analyse mittels RFLP möglich war (**Tabelle 2.8**). Für die verbleibenden fünf SNP wurden zusätzliche unspezifische Primer auf das vorhandene PCR-Produkt designt, so dass ein kleineres PCR-Produkt (max. 500 bp) für eine Sanger Sequenzierung generiert werden konnte.

2.2.2.3.2 DNA-Isolation und Fragmentherstellung mittels PCR

Die DNA aus den Schwanzspitzenbiopsien, wurde mit dem kommerziell erhältliche Kit QIAamp DNA Mini Kit von der Firma QIAGEN entsprechend des Herstellerprotokolls isoliert. Die DNA Konzentration wurde am Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt. Die Proben der 15 Mäuse je Inzuchtstamm wurden jeweils in drei 5-er Gruppen eingeteilt und entsprechend zu gleichen Teilen gepoolt.

Die DNA Fragmente wurden mittels konventioneller PCR unter Verwendung des AccuPrime Taq DNA Polymerase System, hergestellt. Das dafür verwendete PCR-Programm ist in **Tabelle 2.13** dargestellt.

Tabelle 2.13: PCR-Programm zur DNA-Fragmentherstellung

	Temperatur	Dauer	Zyklenanzahl
Hot Start	94 °C	2 min	
Denaturieren	94 °C	30 sec	35
Annealing	Siehe Tabelle 2.14	30 sec	
Verlängern	68 °C	2 min	
Auffüllen	68 °C	10 min	
Hold	4 °C	unendlich	

Hierfür wurden zunächst die Annealing Temperaturen der designten Primerpaare optimiert sowie verschiedene Reaktionsbedingungen ausgetestet (verschiedene Volumina an AccuPrime™ PCR Buffer). Die optimierten Bedingungen sind in **Tabelle 2.14** dargestellt. Zusätzlich ist die final verwendete Zusammensetzung des Reaktionsmix in **Tabelle 2.15** aufgelistet. Die PCR-Produkte wurden im Anschluss an die PCR mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN aufgereinigt. Zur Herstellung der DNA Fragmente in zwei aufeinander folgenden PCR mit unterschiedlichen Primerpaaren (**Tabelle 2.13**), wurde als DNA Template für die zweite PCR 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes aus der ersten PCR verwendet. Die DNA Konzentration des PCR-Produktes wurde am Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt.

Tabelle 2.14: Optimierte Reaktionsbedingungen der designten Primerpaare

Gen	SNP ID	Primerpaar	Annealing T [°C]	Produktgröße [bp]	Reaktionsmix [µl]
<i>Cyp3a16</i>	rs33543287	1	54,6	1216	2,5
<i>Cyp3a16</i>	rs33166435	2	53,4	1445	2,5
		3	50,4	340	2,5
<i>Cyp3a44</i>	rs239851337	4	53,4	1285	2,5
		5	50,4	393	2,5
<i>Cyp3a44</i>	rs583385430	6	50,8	1108	2,5
<i>Cyp3a57</i>	rs29684215	7	54,6	546	5,0
<i>Cyp3a59</i>	rs29510048	8	52,1	500	2,5
<i>Cyp3a59</i>	rs49207862	9	53,4	1238	2,5
<i>Cyp3a59</i>	rs36827986	10	52,1	1992	3,5
		11	50,4	216	2,5
<i>Cyp3a59</i>	rs38952718	12	46,8	309	2,5
<i>Cyp3a59</i>	rs51611659	13	54,7	400	2,5
<i>Cyp3a59</i>	rs33429092	14	53,4	1835	2,5
		15	50,4	399	2,5
<i>Cyp3a59</i>	rs33260411	16	54,6	1833	5,0

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des PCR Reaktionsmix

Komponenten	50 µl Reaktion
10x AccuPrime™ PCR Buffer II	Siehe Tabelle 2.14
Primer Mix (jeweils 10 µM)	2,5 µl
DNA Template	100 ng
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase	1 µl
PCR Wasser	Auffüllen auf 50 µl

2.2.2.3.3 RFLP und Sanger Sequenzierung

Die identifizierten SNPs wurden mittels RFLP oder Sanger Sequenzierung verifiziert (**Tabelle 2.8**). **Tabelle 2.16** zeigt eine Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme (RE) und das resultierende spezifische Fragmentmuster der eingesetzten DNA Fragmente. DNA

Fragmente, die eine spezifische Unterscheidung zwischen der Wildtyp-Sequenz (C57BL/6J) und dem Vorhandensein des SNP zulassen, sind rot markiert. Die Restriktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA Banden durch GelGreen visualisiert und dokumentiert (2 % Agarosegel, TAE Puffer, 130 V, 120 min, anschließendes Färben mit 3xGelGreen in ddH₂O für 30 min, Entfärben in ddH₂O für 10 min).

Tabelle 2.16: Übersicht verwendeter Restriktionsenzyme (RE) und resultierender DNA-Fragmente

SNP ID	RE	Ref-Sequenz ¹ [bp]	SNP-Sequenz ² [bp]	Stamm ³
rs33543287	BstNI	100, 197, 78, 721 , 119	100, 197, 800 , 119	129S1/SvImJ
rs583385430	NlaIII	180, 185, 168, 40, 408 , 126	180, 185, 168, 40, 335 , 74 , 126	129S1/SvImJ,
				Balb/cJ
rs29684215	DraI	546	236, 310	Balb/cJ
rs49207862	CviKI-1	11, 113, 25, 40, 16,14, 56, 741 , 222	11, 113, 25, 40, 16,14, 56, 87, 654 , 222	Balb/cJ
rs38952718	BsaHI	309	158, 151	Balb/cJ
rs51611659	BstNI	120, 181, 98	120, 280	Balb/cJ
rs33260411	AvrII	1833	1002, 831	Balb/cJ

¹DNA-Fragmente bei Referenzsequenz, ²DNA-Fragmente bei SNP-Sequenz, ³SNP enthaltender Stamm

Abkürzungen: single nucleotide polymorphism (SNP), Identifikationsnummer (ID), Restriktionsenzym (RE), Referenz (Ref), Basenpaar (bp)

Rot markiert: Fragmentlängen, die Unterscheidung zwischen Ref- und WT-Sequenz ermöglichen

Die SNP rs33166435, rs239851337, rs29510048, rs36827986, rs33429092 wurden mittels Sanger Sequenzierung verifiziert. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der RFLP Analyse der SNP rs33543287, rs583385430 nochmals mittels Sanger Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde durch die Firma eurofins Genomics (Ebersberg, D) durchgeführt. Hierfür wurden voreingestellte Proben (15 µl PCR Produkt (5 ng/µl: 300 – 1000 bp; 10 ng/µl: 1000 – 3000 bp) und 2 µl Primer (10µM)) versendet. Anschließend wurden die Sequenzdaten mit der Software MEGA7 ausgewertet.

2.2.2.4 Aktivitätsanalysen

2.2.2.4.1 MeSH Term Analyse Lebermikrosomenisolation

Für die Etablierung der Methoden der Lebermikrosomenisolation wurde eine systematische Recherche in der Literaturdatenbank PubMed des NCBI, unter Verwendung der MeSH-Terme „liver microsomes“ (38.429 Publikationen), „mouse“ (eingegrenzt auf 5.217 Publikationen) und „cytochrome p450“ (eingegrenzt auf 1.804 Publikationen), durchgeführt. MeSH-Terme sind Schlagwörter, die den Inhalt von Fachartikeln beschreiben und im Fall von

PubMed manuell zugeordnet werden. Die Suche wurde auf einen Zeitraum von 2011 bis 2015 beschränkt (Suchbegriff: (((liver microsomes[MeSH Terms]) AND mouse[MeSH Terms]) AND cytochrome p450[MeSH Terms]) AND ("2011/01/01"[Date - Publication] : "2015/12/31"[Date - Publication])). Auf Grund der Unsicherheit, bis zu welchem Zeitpunkt PubMed die MeSH-Terme für eine Publikation vergibt, wurden die Publikationen von 2016 nicht mit berücksichtigt. Die zeitliche Einschränkung reduzierte die Anzahl der Publikationen auf 168. Diese 168 Publikationen wurden nach Angaben zum verwendeten Lebergewebe für eine Mikrosomenisolation (Teilstück oder Gesamte Leber) durchsucht (**Anhang:** Tabelle S1 und ergänzende Literatur PubMed Analyse). 127 der 168 untersuchten Publikationen verwendeten tatsächlich Maus-Lebermikrosomen. Diese 127 Publikationen wurden unter folgende Kategorien sortiert: „Leber“ (Autoren erwähnten lediglich das verwendete Gewebe Leber), „gepoolte Leber“ (Autoren beschreiben ein Zusammenfassen mehrerer Lebern von unterschiedlichen Tieren) und „Teilstück der Leber“ (Autoren nennen ein Teilstück der Leber verwendet zu haben). Zusätzlich wurde analysiert, welches Geschlecht und welcher Hintergrundstamm am häufigsten für eine Mikrosomenisolation verwendet wurden. Auf Grundlage der Recherche wurde zunächst ein Versuch durchgeführt, bei dem die einzelnen Leberlappen im Vergleich zur Gesamtleber hinsichtlich der Aktivität und Expression der CYP3A Isozyme untersucht wurden.

2.2.2.4.2 Lebermikrosomenisolation

Die im folgendem beschriebenen Schritte der Lebermikrosomenisolation wurden bei 4 °C durchgeführt. Die einzelnen Leberlappen (Methodenetablierung) bzw. die gesamte Leber (Stammesvergleich) wurden auf Eis aufgetaut, mit einem Skalpell zerkleinert und in einen 8 ml Potter, gefüllt mit 5 ml Homogenisationsmedium (250 mM Saccharose, 1mM EDTA), überführt. Die zerkleinerte Leber wurde mechanisch durch sieben auf und ab Bewegungen des Potters homogenisiert. Für die RNA-Isolation wurden 100 µl des Homogenats in 600 µl RNeasy Lysis Buffer (RLT), versetzt mit β-Mercaptoethanol (β-ME), überführt und bei -80 °C gelagert. Das verbleibende Homogenat wurde in ein 15 ml Zentrifugations-Röhrchen überführt und auf 10 ml mit Homogenisationsmedium aufgefüllt. Das Homogenat bzw. der Überstand wurde zweimal zentrifugiert: 15 min, 12.000 g, 4 °C (Multifuge, Hereaus). Der Überstand wurde in ein 10 ml Ultrazentrifugations-Röhrchen transferiert und ultrazentrifugiert: 1 h 10 min, 100.000 g, 4 °C (Beckmann Ultrazentrifuge, NVT65 Rotor). Das mikrosomale Pellet wurde in 200 bis 250 µl Suspensionsmedium (250 mM Saccharose) resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Der Gesamtproteingehalt der isolierten Mikrosomen wurde mit Hilfe des Pierce^{TM} BCA Protein Assay Kit bestimmt. Hierfür wurde eine BSA Standardreihe mit folgenden Konzentrationen verwendet: 25, 125, 250, 500, 700 und 1000 µg/ml.

2.2.2.4.3 CYP Aktivitäts-Assay

Da mausspezifische CYP3A-Substrate bisher nicht existieren, wurde die CYP3A Aktivität mit dem kommerziell erhältlichen Luciferin-basierten Assay von Promega analysiert. Dieser Assay wurde ursprünglich für die Analyse humaner Proben entwickelt. Es wurde jedoch zusätzlich gezeigt, dass auch die murine CYP Aktivität analysierbar ist (152, 153). Der Assay wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Laut Herstellerangaben besteht eine Produktbildung erster Ordnung in Bezug auf die angegebene Proteinkonzentration und Inkubationszeit. Dieses wurde exemplarisch mit einer Probe überprüft und bestätigt. Für jede Reaktion wurden 3 µg Mikrosomen in einem Volumen von 5 µl verwendet. Die vorherige Verdünnung erfolgte in Suspensionsmedium. Zur Quantifizierung wurde eine D-Luciferin Standardkurve, verdünnt in sterilem ddH₂O, mit folgenden Konzentrationen verwendet: 0,008, 0,016, 0,08, 0,20, 0,40, 1,00 und 2,00 µM D-Luciferin. Der Assay wurde in einer 96-Well Platte mit weißen Wells und Schwarzen Rand durchgeführt, um eine gegenseitige Beeinflussung benachbarter Wells zu minimieren. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe des NADPH Regenerationssystems (Promega GmbH, Mannheim, D) gestartet. Die Reaktionszeit des CYP3A Assay betrug 10 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe des Luciferin Detektion Reagenz gestoppt und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um das Lumineszenzsignal zu stabilisieren. Die relative Lumineszenz wurde fünfmal hintereinander in einem Luminometer (GloMax, Promega GmbH, Mannheim, D) gemessen. Die resultierenden relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) der fünf Messungen wurden gemittelt und in D-Luciferin Konzentrationen durch Interpolation mit der Standardkurve umgerechnet. Anschließend wurden die D-Luciferin Konzentrationen in CYP Reaktionsraten umgerechnet und auf den Gesamtgehalt an Protein normalisiert. Da nicht genau bekannt ist, welche murinen CYP3A Isozyme maßgeblich an der Verstoffwechslung des produktspezifischen Substrats beteiligt sind, wird im folgendem der Begriff CYP3A Reaktionsrate verwendet. Um die Spezifität des CYP3A Assay zu testen, wurden zwei von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) als CYP3A-spezifisch empfohlene Inhibitoren (Ketoconazol und Troleandomycin) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (1, 1,0, 10, 100 und 150 µM Ketoconazol und 1,0 und 10 µM Troleandomycin). Die Inhibitoren wurden in der entsprechenden Konzentration zum Reaktionsansatz hinzugefügt und für 10 Minuten bei 37 °C vor inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Hinzugabe von NADPH gestartet. Die weitere Durchführung erfolgte analog. Die Daten sind im Anhang dargestellt (**Anhang:** Abbildung S1).

Für die Methodenentwicklung zur Mikrosomenisolation, wurde die CYP Aktivität in den einzelnen Leberlappen und dem Proc. p. der Maus analysiert. Um die theoretische CYP Reaktionsrate der gesamten Leber zu illustrieren, wurde ein gewichteter Mittelwert (WA) aller

Leberlappen und des Proc. p. berechnet. Dieser basiert auf der individuellen CYP Aktivität und dem entsprechenden Gewicht des spezifischen Leberlappens.

2.2.2.4.4 CPR Aktivitäts-Assay

Die CPR Aktivität in isolierten Maus-Lebermikrosomen wurde mit einem kommerziell erhältlichen Kit nach Herstellerangaben analysiert. Hierbei ist die Reduktion eines farblosen Substrats in ein farbiges Produkt (Absorptionsmaximum 460 nm) an die CPR vermittelte Oxidation von NADPH gekoppelt. Die Reduktion ist direkt proportional zur CPR Aktivität. Die Quantifizierung erfolgte in Duplikaten und für jede Reaktion wurden 25 µg Mikrosomen eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden im Kit enthaltende humane CPR Enzyme verwendet. Die Absorption wurde direkt nach Starten der Reaktion im kinetischen Modus in einem Messintervall von 1 min für eine Dauer von 30 min bei 25 °C gemessen, um eine Reaktion Erster Ordnung zu gewährleisten. Zunächst wurde ΔOD_{460} berechnet mit: $\Delta OD_{460} = A_2 - A_1$ (A_1 Probenwert zum Zeitpunkt T_1 , A_2 Probenwert zum Zeitpunkt T_2). Die Berechnung der in einer bestimmten Reaktionszeit ($T_1 - T_2$) gebildeten Substratmenge in nmol (B), wurde durch Interpolation des ΔOD_{460} Wertes mit der korrespondierenden Glucose-6-Phosphat Standardkurve erreicht. Die CPR Aktivität wird als $\frac{B}{\Delta T \times P} = \frac{nmol}{min \times mg} = mU/mg$ dargestellt, mit P als Gesamtproteingehalt der Probe.

2.2.2.5 Expressionsmessungen metabolisch relevanter Enzyme

2.2.2.5.1 RNA Isolation und cDNA Synthese

Die gelagerten Aliquots, bestehend aus 100 µl Leberhomogenat und 600 µl RLT versetzt mit β -ME, wurden aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht. Zur RNA Isolation wurde das kommerziell erhältliche RNeasy® Mini Kit von QIAGEN, mit direktem DNase I Verdau auf der Säule, nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA Konzentration wurde am Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt. Die Integrität der RNA wurde durch Visualisierung der ribosomalen Banden 18S und 28S auf einem nativen 1 % Agarose Gel (TAE Puffer, 130 V, 1 h) kontrolliert. 1 µg der Gesamt-RNA wurde in cDNA mittels High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit, unter Verwendung des Herstellerprotokolls, transkribiert.

2.2.2.5.2 Quantitative real-time PCR und Auswertestrategie

Quantitative real-time PCR (qPCR) Expressionsprofile wurden im SYBR Green Format, unter Verwendung des QuantiFast SYBR Green PCR Kit und QuantiTect Primer von QIAGEN, durchgeführt. Dabei wurden folgende Gene analysiert: *Cyp3a11*, *Cyp3a13*, *Cyp3a16*, *Cyp3a25*, *Cyp3a41*, *Cyp3a44*, *Cyp3a57*, *Cyp3a59*, *NADPH-Cytocrome-P450-Oxidoreductase (CPR)*, *Pregnan-X-Rezeptor (PXR)*, Constitutiv androstan Rezeptor (*CAR*). Für jede Reaktion wurden 6 ng cDNA in einem Reaktionsvolumen von 10 µl im 384-Well Plattenformat eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte in Triplikaten und in Echtzeit mit dem

Applied Biosystems Quant Studio7 unter folgenden Bedingungen: 95°C für 5 min, (95°C für 10 s, 60°C für 30 sec) x 40 Zyklen. Im Anschluss wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. *β-Actin*, *Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH)* und *18S ribosomal RNA (Rn18s)* wurden als Referenzgene verwendet. Zur Berechnung des ΔC_t -Wertes wurde das arithmetische Mittel der drei Referenzgene gebildet und vom gemittelten C_t -Wert der jeweiligen Probe subtrahiert. Die errechneten ΔC_t -Werte wurden in relative Genexpressionen transformiert: $2^{-\Delta C_t} \cdot 10^7$.

2.2.2.5.3 CYP Proteinbestimmung

Murine CYP3A Isozyme wurden auf Proteinebene mittels kommerziell erhältlichen mausspezifischen Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit, entsprechend der Herstellerangaben, quantifiziert. Hierbei wurden Mikrosomen in PBS verdünnt und 1 µg in einem Volumen von 100 µl pro Well hinzugegeben. Der spezifische CYP Proteingehalt wurde indirekt spektrophotometrisch (450 nm) detektiert und durch Interpolation mit der Standardkurve quantifiziert. Da zum jetzigen Zeitpunkt nicht für alle murinen CYP3A Isozyme Antikörper kommerziell erhältlich sind wurde ein Assay ausgewählt, der gegen die humane CYP3A4 Sequenz gerichtet ist, um konsistent zum ausgewählten CYP3A4 Aktivitäts-Assay zu sein. Die Reaktivität gegen die Zielspezies Maus wurde durch den Hersteller getestet.

2.2.3 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der erhobenen Ergebnisse wurde die Software GraphPad Prism, Version 6 verwendet. Alle Daten wurden als nicht normalverteilt angenommen. Die jeweiligen exakt verwendeten statistischen Testungen werden im Zusammenhang mit der Ergebnisdarstellung genannt. Daten die hinsichtlich des Faktors Stamm miteinander verglichen wurden, wurden mittels *Kruskal-Wallis* Test (einfaktorielle Varianzanalyse) und anschließend *Dunn's multiple comparison* Test analysiert. Zum Vergleich einer Dosisgruppe mit dem entsprechenden Basal-Wert innerhalb eines Stammes wurde ein einseitiger *Wilcoxon matched-pairs signed rank* Test verwendet, da es sich hier um abhängige Daten handelt. Der Test wurde auf Einseitigkeit beschränkt, da die Applikation eines Schmerzmittels nur eine Veränderung in eine Seite zulässt. Zum Vergleich beider Dosisgruppen innerhalb eines Stammes wurde ein zweiseitiger *Mann-Whitney* Test durchgeführt, da es sich um unabhängige Daten handelt. Dieser Test wurde zweiseitig durchgeführt, da sich die beiden Dosisgruppen theoretisch in beide Richtungen unterscheiden können. Ab einem P-Wert < 0,05 wurden Unterschiede als statistisch signifikant bewertet. Um eine Übersichtlichkeit der Abbildungen zu gewährleisten, wurde nur ein Stern zur Visualisierung der statistischen Signifikanz eingefügt. Die exakten P-Werte sowie Mittelwerte ± Standardabweichung, bzw. Median mit [5./ 95. Perzentile] sind in Tabelle S2 bis S36 im **Anhang** aufgeführt. Da es sich bei GraphPad Prism um eine amerikanische Software handelt, sind die Dezimalstellen in den Abbildungen durch einen Punkt getrennt.

Fehlende Messwerte sind im Zusammenhang mit den Ergebnissen kommentiert und werden hier der Vollständigkeit halber gelistet:

- Die Analyse der Videodaten ergab, dass der IHP Test für eine 129S1/SvImJ Maus aus der 4,00 mg/kg Buprenorphin Dosisgruppe zu früh gestoppt wurde (Hauptversuch). Aus diesem Grund fehlt für dieses Tier die exakte T1(x).
- Fehlende Messwerte in der Analytik von Buprenorphin und seiner Metaboliten sind durch das nicht Erreichen der Quantifizierungsgrenze bedingt.

Zusätzlich wurde mit der Software R (Version 3.3.1) eine Faktorenanalyse bzgl. der detektierten Varianz durchgeführt. Unter Verwendung eines linearen Korrelationsmodells (lmres) wurden nacheinander die Faktoren Stamm, durchschnittliche Geschwindigkeit, Buprenorphinkonzentration in Serum und Gehirn, metabolische Kapazität von Buprenorphin zu Norbuprenorphin sowie die Verteilung von Buprenorphin zwischen Gehirn und Blut als mögliche Erklärung für die vorhandene Varianz der Abbruchtemperaturen bzgl. beider Dosisgruppen im IHP Test getestet und der Korrelationskoeffizient R^2 ermittelt. Zusätzlich wurde R^2 nach Subtraktion des Stammeffektes für alle aufgezählten Faktoren berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Kruskal-Wallis* Test berechnet.

3 Ergebnisse¹

3.1 Stammesvergleich zur analgetischen Wirkung von Buprenorphin

3.1.1 Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve

Um eine geeignete Buprenorphin-Dosis für den Vergleich von drei Maus-Inzuchtstämmen zu identifizieren, wurde zunächst eine Dosisfindungsstudie durchgeführt. Zur Durchführung wurden männliche C57BL/6J Mäuse verwendet.

Die Funktionalität des IHP Testes wurde zusätzlich durch die Modellsubstanz Fentanyl evaluiert. Fentanyl ist ein voller MOR Agonist, der bei einer ausreichend hohen Dosis zu einem maximalen Effekt im IHP Test führen sollte. Hierfür wurden zwei männliche C57BL/6J Mäuse 30 Min nach s.c. Injektion mit 0,3 mg/kg Fentanyl auf der IHP getestet, wobei eine MPE von 100 % erreicht wurde (Daten nicht gesondert dargestellt). Die Gabe von Buprenorphin führte zu einem dosisabhängigen analgetischen Effekt mit einer halbmaximal effektiven Dosis (ED₅₀) von 0,42 mg/kg (*Kruskal-Wallis* Test: $p = 0,01$) (**Abbildung 3.1**).

Abbildung 3.1: Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve

Effekt von Buprenorphin in männlichen C57BL/6J Mäusen auf dem IHP Test 30 min nach s.c. Applikation (MW $\pm$ SD, $n = 3$ je Dosisgruppe, P -Wert $< 0,05$: *vs. Vehikel Kontrolle, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison* Test). Die Dosiswirkungskurve wurde mit einem 4-parametrischen loglogistischen Modell erstellt (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S2, S3).

Die maximale Wirksamkeit wurde im IHP Test mit einem durchschnittlichen maximal möglichen Effekt (MPE) von 38,71 % erreicht. Dabei wies die Dosis-Wirkungskurve eine Steigung von 1,4 auf. Als durchschnittliche basale Schmerzempfindlichkeit wurden

¹ Ergebnisse, die in diesem Abschnitt gezeigt werden, sind zum Teil adaptiert worden aus Rudeck et al. (2018). Die Verwendung von ähnlichen Abbildungen und wörtlichen Passagen wird nicht zusätzlich als Selbstzitation kenntlich gemacht (siehe Abschnitt: Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen).

$48 \pm 0,87$ °C (MW $\pm$ SD) ermittelt. Hierbei zeigte sich eine hohe Korrelation von 0,89 zwischen der basalen Schmerztemperatur T0 und der Schmerztemperatur T1 nach Gabe einer definierten Dosis x. Die ermittelten Daten wurden verwendet, um das im Methodenteil beschriebene Simulationsmodell (2.2.1.6) zu optimieren und die Dosis zu evaluieren, bei der die Durchführung eines Stammesvergleichs am sinnvollsten ist. Hierbei wurde eine Dosis von 0,42 mg/kg berechnet.

Zur Evaluation des Einflusses einer potentiellen Lokomotionssteigerung durch Applikation von Buprenorphin wurde die durchschnittliche Geschwindigkeit drei Minuten vor IHP Testung ermittelt. Die durchschnittliche Geschwindigkeit scheint durch die Gabe von Buprenorphin dosisabhängig gesteigert worden zu sein (**Abbildung 3.2**). Jedoch wurden keine eindeutigen statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,576$; basale Lokomotion ohne Injektion ausgeschlossen).

Abbildung 3.2: Dosisabhängige Geschwindigkeit 30 min nach Gabe von Buprenorphin

Dargestellt ist die durchschnittliche ($\bar{x}$) zurückgelegte Strecke [cm], der letzten drei Minuten vor der IHP Testung, 27 bis 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin (MW $\pm$ SD, Basal: $n = 15$; Vehikel (VH)-Gruppe und Dosisgruppen: $n = 3$; männliche C57BL/6J, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison Test vs. VH; basal Gruppe ausgeschlossen) (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S2, S3).

Ergebniszusammenfassung: Dosisfindung Buprenorphin

- Buprenorphin war analgetisch wirksam im IHP Test.
- Eine Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve konnte für den Stamm C57BL/6J ermittelt werden.
- Als optimale Dosis für den Stammesvergleich wurden 0,42 mg/kg Buprenorphin berechnet.
- Buprenorphin scheint zu einer Steigerung der Lokomotion zu führen.

3.1.2 Stammesabhängige Wirksamkeit von Buprenorphin

Die Wirksamkeit von Buprenorphin wurde in den drei häufig verwendeten Maus-Inzuchtstämmen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ untersucht. Auf Grundlage der Ergebnisse des Vorversuches wurde die als optimal berechnete Dosis von 0,42 mg/kg Buprenorphin verwendet. Der Stamm C57BL/6J wies bei der Dosisfindungsstudie nur eine maximale Wirksamkeit von 38,71 % auf. Um zu evaluieren, ob bei Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen eine abweichende maximale Wirksamkeit auftritt, wurde zusätzlich die Dosis von 4,0 mg/kg Buprenorphin untersucht.

3.1.2.1 Wirksamkeit von Buprenorphin in verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen

Die drei verwendeten Maus Inzuchtstämme zeigten deutliche Unterschiede in ihrer basalen Schmerzsensitivität im IHP Test (*Kruskal-Wallis* Test: $p < 0,0001$; **Abbildung 3.3**). Hierbei war der Inzuchtstamm Balb/cJ, mit einer Abbruchtemperatur von 44,42 °C [40,5/ 46,4 °C] (Median [5./ 95. Perzentile]) am sensitivsten und der Inzuchtstamm 129S1/SvImJ mit einer Abbruchtemperatur von 50,65 °C [48,0/ 52,68 °C] (Median [5./ 95. Perzentile]) am wenigsten sensitiv. Für den Inzuchtstamm C57BL/6J wurde eine Abbruchtemperatur von 48,39 °C [47,0/ 49,34 °C] (Median [5./ 95. Perzentile]) ermittelt.

Abbildung 3.3: Basale Schmerzsensitivität

Basale Abbruchtemperatur männlicher C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäuse, unter Verwendung des IHP Test ($n = 15$ pro Stamm; *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison* Test; P-Wert $< 0,05$: * vs. C57BL/6J; # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ). Die Daten sind als Box Plots mit Median [5./ 95. Perzentile] dargestellt (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S4 – S5).

Die Gabe von Buprenorphin führte zu einer Steigerung der Abbruchtemperatur im Vergleich zur basalen Abbruchtemperatur bei allen Inzuchtstämmen, ausgenommen bei 129S1/SvImJ Mäuse nach s.c. Injektion von 4,0 mg/kg Buprenorphin (*Wilcoxon matched-pairs signed rank* Test (Basal vs. 0,42 mg/kg, Basal vs. 4,0 mg/kg): C57BL/6J: $p = 0,001$, $p = 0,0313$; Balb/cJ: $p = 0,001$, $p = 0,313$; 129S1/SvImJ: $p = 0,001$, $p = 0,0625$) (**Abbildung 3.4 A**). Eine dosisabhängige Verringerung der Schmerzsensitivität wurde bei den Inzuchtstämmen C57BL/6J und Balb/cJ ermittelt, welches sich in einer Erhöhung der Abbruchtemperatur

widerspiegelte (*Mann-Whitney* Test (0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg): C57BL/6J: $p = 0,0193$, Balb/cJ: $p = 0,0007$). Jedoch führte eine Erhöhung der verabreichten Dosis von Buprenorphin zu keiner Steigerung in der analgetischen Wirkung bei 129S1/SvImJ Mäusen (*Mann-Whitney* Test (0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg): $p = 0,1059$). Zusätzlich zur Dosisabhängigkeit wies Buprenorphin eine stammesabhängige Wirksamkeit auf (*Kruskal-Wallis* Test: 0,42 mg/kg: $p < 0,0001$; 4,0 mg/kg: $p = 0,0003$) (**Abbildung 3.4 B**). Die Verabreichung von 0,42 mg/kg Buprenorphin führte zu einer Erhöhung der Abbruchtemperatur um 1,35 °C [1,1/ 1,81 °C] (Median [5./ 95. Perzentile]) in C57BL/6J, 4,05 °C [2,9/ 5,5 °C] in Balb/cJ und 2,87 °C [1,8/ 5,12 °C] in 129S1/SvImJ. Die Applikation von 4,0 mg/kg Buprenorphin führte zu einer zweifach höheren Abbruchtemperatur mit 2,69 °C [2,21/ 3,3 °C] (Median [5./ 95. Perzentile]) in C57BL/6J und zu einer 2,4-fachen höheren Abbruchtemperatur mit 9,68 °C [6,27/ 10,62 °C] in Balb/cJ Mäusen (*Mann-Whitney* Test (0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg): beide Stämme $p = 0,0007$). Der Stamm 129S1/SvImJ wies nur eine Erhöhung der Abbruchtemperatur von 1,85 °C [1,42/ 3,12 °C] (Median [5./ 95. Perzentile]) auf (*Mann-Whitney* Test (0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg): $p = 0,1059$).

Abbildung 3.4: Dosis- und stammesabhängige Wirksamkeit von Buprenorphin

A) Abbruchtemperatur der basalen Schmerzsensitivität sowie 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin unter Verwendung des IHP Test (einseitiger *Wilcoxon matched-pairs signed rank* Test; P-Wert $< 0,05$: * vs. individuelle basale Sensitivität). **B)** Temperaturdifferenz der Schmerzsensitivität 30 min nach Gabe von Buprenorphin und der basalen Schmerzsensitivität (*Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*; P-Wert $< 0,05$: * vs. C57BL/6J; # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ). Die Daten sind als Box Plots mit Median und [5./ 95. Perzentile] dargestellt (basal: $n = 15$, 0,42 mg/kg: $n = 10$; 4,0 mg/kg: $n = 5$ ausgenommen 129S1/SvImJ mit $n = 4$) (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S4 - S6).

Durch eine Korrelationsanalyse konnte untermauert werden, dass die beobachteten Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung auf den Stamm zurück zu führen sind bzgl. beider Dosisgruppen (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,67$, $p = 3,2 \times 10^{-7}$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,85$, $p = 2,76 \times 10^{-5}$).

3.1.2.2 Stammesabhängiges Schmerzverhalten

Als Abbruchkriterien wurden das Schütteln und/ oder Lecken einer der beiden Hinterpfoten sowie Springen definiert. Hierbei war auffällig, dass der Inzuchtstamm 129S1/SvImJ bei der Erfassung der basalen Schmerztemperatur fast ausschließlich das Schütteln einer der beiden Hinterpfoten zeigte (**Abbildung 3.5 A**). Dahingegen wiesen die Hälfte der verwendeten Mäuse des Stammes C57BL/6J das Lecken einer der beiden Hinterpfoten als Abbruchkriterium auf (**Abbildung 3.5 A**). Mäuse des Inzuchtstammes Balb/cJ zeigten vor allem ein Schütteln der Hinterpfote, welches oft mit einem nachfolgenden Lecken der entsprechenden Hinterpfote einherging. Nach Gabe von Buprenorphin zeigten fast alle Mäuse der verwendeten Stämme, als erstes Abbruchkriterium das Schütteln einer der beiden Hinterpfoten an. Vor allem männliche C57BL/6J Mäuse, die mit 4,0 mg/kg Buprenorphin behandelt wurden zeigten jedoch weiterhin ein Lecken der Hinterpfote als Abbruchkriterium an (**Abbildung 3.5 B, C**). Weder bei der Evaluation der basalen Schmerzsensitivität noch nach Gabe von Buprenorphin wurde der IHP Test durch Springen der Maus abgebrochen.

Abbildung 3.5: Häufigkeit der definierten Abbruchkriterien im IHP Test

Dargestellt ist die Häufigkeit der ersten sich darstellenden definierten Abbruchkriterien bei den verwendeten Maus-Inzuchtstämmen im IHP Test, basal oder nach 30-minütiger s.c. Applikation von Buprenorphin.

3.1.2.3 Lokomotorische Aktivitätsanalyse

Basal und ohne vorherige Injektion zeigten die drei Inzuchtstämme keine statistisch signifikanten Unterschiede in ihrer Lokomotion (*Kruskal-Wallis* Test: $p = 0,05$). Die Applikation von Buprenorphin führte zu einer Steigerung der durchschnittlichen Geschwindigkeit in allen drei Inzuchtstämmen, wobei der Grad der Steigerung vom

jeweiligen Stamm abhing (*Wilcoxon matched-pairs signed rank Test* (Basal vs. 0,42 mg/kg, Basal vs. 4,0 mg/kg): C57BL/6J: $p = 0,001$, $p = 0,0313$; Balb/cJ: $p = 0,001$, $p = 0,0313$; 129S1/SvImJ: $p = 0,001$, $p = 0,0625$) (**Abbildung 3.6, Anhang:** Tabelle S4 – S6). Hierbei konnte beim Inzuchtstamm 129S1/SvImJ eine signifikant verminderte Lokomotion, verglichen mit den Stämmen C57BL/6J und Balb/cJ, in beiden Dosisgruppen detektiert werden (*Kruskal-Wallis Test*: 0,42 mg/kg: $p = 0,0043$; 4,0 mg/kg: $p = 0,0113$).

Abbildung 3.6: Aktivitätssteigerung durch Applikation von Buprenorphin

Dargestellt ist die durchschnittliche ($\bar{x}$) Geschwindigkeit [cm/s] in den letzten drei Minuten vor der IHP Testung, 27 bis 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin (Box Plot mit Median und [5./ 95. Perzentile]; Basal: $n = 15$; 0,42: $n = 10$; 4,0: $n = 5$; einseitiger *Wilcoxon matched-pairs signed rank Test*: * $p < 0,05$ vs. basal) (exakte Werte im **Anhang:** Tabelle S4 – S6).

Die Ergebnisse der lokomotorischen Aktivitätsanalyse erklären jedoch nicht die vorhandenen Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,01$, $p = 0,61$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,3$, $p = 0,04$). Auch die Subtraktion des ermittelten Stammeffektes führte zu keiner Korrelation der Parameter Temperaturdifferenz und durchschnittliche Geschwindigkeit (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,008$, $p = 0,62$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,01$, $p = 0,73$).

Ergebniszusammenfassung:

Stammesabhängige Wirksamkeit von Buprenorphin

- C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ wiesen unterschiedliche basale Schmerzempfindlichkeiten auf.
- Buprenorphin zeigte in allen verwendeten Inzuchtstämmen eine analgetische Wirksamkeit im IHP Test.
- Der analgetische Effekt von Buprenorphin konnte in den Stämmen C57BL/6J und Balb/cJ dosisabhängig gesteigert werden.
- Eine Erhöhung der Buprenorphindosis führte beim Stamm 129S1/SvImJ zu keinem gesteigerten analgetischen Effekt.
- Buprenorphin steigerte die Lokomotion stammesabhängig, jedoch unabhängig von der analgetischen Wirkung.

3.2 Stammesvergleich zur Veränderung im Phase-I Metabolismus

3.2.1 Metabolisierung von Buprenorphin

3.2.1.1 Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve

Die Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten wurde in Serum und Gehirn der im Vorversuch verwendeten Mäuse untersucht (**Abbildung 3.7**). Hierbei stiegen die Konzentrationen im Serum sowie im Gehirn dosisabhängig an. Im Serum waren vor allem Buprenorphin und dessen glukuronidierte Form Buprenorphin-3-Glukuronid vorhanden, deren Konzentrationen vergleichbar waren, außer nach Applikation von 0,5 mg/kg Buprenorphin (**Abbildung 3.7 A**). Im Gehirn konnten nur Buprenorphin sowie Norbuprenorphin quantifiziert werden (**Abbildung 3.7 B**). Hierbei waren die Buprenorphinkonzentrationen im Gehirn um das 25- bis 85-fache höher als die von Norbuprenorphin.

Abbildung 3.7: Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten in Serum und Gehirn

Analytik von Buprenorphin und seiner Metaboliten 30 min nach s.c. Applikation in **A)** Serum und **B)** Gehirn (MW $\pm$ SD, $n = 3$, männliche C57BL/6J Mäuse; Datenpunkte unterhalb der Quantifizierungsgrenze sind nicht dargestellt).

Auf Grund der geringen Tierzahl und z.T. fehlender Messwerte wurde keine Statistik durchgeführt (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S2, S7).

3.2.1.2 Stammesvergleich Buprenorphin

Die Serumkonzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten stieg dosisabhängig in allen drei Stämmen an (**Abbildung 3.8**, *Mann-Whitney Test pro Stamm pro Stamm* 0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg siehe **Anhang**: Tabelle S6). Stammesabhängige Unterschiede zeigten sich nur nach Gabe von 4,0 mg/kg Buprenorphin hinsichtlich der Buprenorphin und Norbuprenorphin-3-Glukuronid Serumkonzentration (*Kruskal-Wallis Test*: $p = 0,0142$ Buprenorphin; $p = 0,0204$ Norbuprenorphin-3-Glukuronid). Dabei wies der Stamm Balb/cJ für beide Substanzen eine höhere Serumkonzentration auf als die Stämme C57BL/6J und 129S1/SvImJ (**Abbildung 3.8 A, D**). Jedoch konnte durch die detektierten Unterschiede in der Buprenorphinkonzentration nicht die vorhandene stammesbedingte Schmerzwahrnehmung erklärt werden (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,0027$, $p = 0,78$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,38$, $p = 0,02$). Auch die Subtraktion des Stammeffektes führt zu keiner Korrelation der beiden Parameter (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,07$, $p = 0,15$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,03$, $p = 0,58$).

Abbildung 3.8: Dosis- und stammesabhängige Serumkonzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten

Serumkonzentrationen wurden in männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin mittels LC-MS/MS analysiert und sind als Box Plots mit Median und [5./ 95. Perzentile] dargestellt (0,42 mg/kg: $n = 10$, 4,0 mg/kg: $n = 5$, *Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison*; $P\text{-Wert} < 0,05$: * vs. C57BL/6J, # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ). Messwerte unterhalb der Quantifizierungsgrenze sind nicht dargestellt. **Cave:** Unterschiedliche Skalierung zur besseren Visualisierung (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S4 – S6).

Das metabolische Verhältnis (MR) von Norbuprenorphin zu Buprenorphin und Buprenorphin-3-Glukuronid zu Buprenorphin zeigte weder dosis- noch stammesabhängige Unterschiede (**Abbildung 3.9 A, B**, *Mann-Whitney Test pro Stamm pro Stamm 0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg* siehe **Anhang**: Tabelle S5, S6). Dahingegen war das metabolische Verhältnis von Norbuprenorphin-3-Glukuronid zu Norbuprenorphin stammes- (*Kruskal-Wallis Test*: 0,42 mg/kg: $p = 0,0004$; 4,0 mg/kg: $p = 0,001$), jedoch nicht dosisabhängig. Der Stamm 129S1/SvImJ zeigte ein statistisch signifikant geringeres MR als der Stamm Balb/cJ (**Abbildung 3.9 C**). Jedoch wurde keine Korrelation zwischen der MR und der stammesbedingten Schmerzwahrnehmung weder vor (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,06$, $p = 0,18$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,12$, $p = 0,21$) noch nach der Berücksichtigung des Stammeffektes festgestellt (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,04$, $p = 0,27$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,04$, $p = 0,48$).

Abbildung 3.9: Metabolisches Verhältnis (MR) im Serum

Dargestellt ist das logarithmierte MR von **A)** Norbuprenorphin (NBup) zu Buprenorphin (Bup), **B)** Buprenorphin-3-Glukuronid (B3G) zu Bup und **C)** Norbuprenorphin-3-Glukuronid (N3G) zu NBup als Box Plots mit Median [5./ 95. Perzentile] (0,42 mg/kg: $n = 10$; 4,0 mg/kg: $n = 5$; *Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison*; P -Wert $< 0,05$: # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ). Die Konzentrationen wurden in männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin ermittelt. Messwerte unterhalb der Quantifizierungsgrenze sind nicht dargestellt (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S4 – S6).

Vergleichbar zu den Ergebnissen aus der Serumanalytik, wies die Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten eine dosisabhängige Erhöhung im Gehirn auf (**Abbildung 3.10**, *Mann-Whitney Test* pro Stamm pro Stamm 0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg siehe **Anhang**: Tabelle S6). Stammesabhängige Konzentrationsunterschiede bzgl. Buprenorphin und Norbuprenorphin wurden in beiden Dosisgruppen gemessen. Im Vergleich zu C57BL/6JMäusen wurde bei 129S1/SvImJ Mäusen eine niedrigere Konzentration von Buprenorphin und Norbuprenorphin im Gehirn nachgewiesen (*Kruskal-Wallis Test*: Buprenorphin: $p = 0,0018$ (0,42 mg/kg), $p = 0,0081$ (4,0 mg/kg); Norbuprenorphin: $p = 0,0096$ (0,42 mg/kg), $p = 0,0014$ (4,0 mg/kg)) (**Abbildung 3.10 A, B**).

Abbildung 3.10: Dosis- und stammesabhängige Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten im Gehirn

Gehirnkonzentrationen wurden in männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin mittels LC-MS/MS analysiert und sind als Box Plots mit Median und [5./ 95. Perzentile] dargestellt (0,42 mg/kg: $n = 10$, 4,0 mg/kg: $n = 5$, *Kruskal-Wallis Test* mit *Dunn's multiple comparison*; P-Wert < 0,05: * vs. C57BL/6J, # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ). Messwerte unterhalb der Quantifizierungsgrenze sind nicht dargestellt. **Cave:** Unterschiedliche Skalierung zur besseren Visualisierung (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S4 – S6).

Dahingegen waren Stammesunterschiede hinsichtlich der entsprechenden Glukuronide nur in der hohen Dosisgruppe feststellbar. Hierbei wurden im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen bei 129S1/SvImJ Mäusen geringere Glukuronidkonzentrationen im Gehirn gemessen (*Kruskal-Wallis Test*: Buprenorphin-3-Glukuronid: $p = 0,0002$; Norbuprenorphin-3-Glukuronid: $p = 0,0001$) (**Abbildung 3.10 C, D**). Weder vor (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,08$, $p = 0,12$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,02$, $p = 0,65$) noch nach der Berücksichtigung des stammesbedingten Effektes

(0,42 mg/kg: $R^2 = 0,01$, $p = 0,54$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,09$, $p = 0,28$) konnte ein Zusammenhang zwischen der Schmerzwahrnehmung und der Buprenorphinkonzentration im Gehirn nachgewiesen werden, auch nach Subtraktion des detektierten Stammeffektes.

Bezüglich der Verteilung von Buprenorphin und seiner Metaboliten konnte festgestellt werden, dass Buprenorphin in höheren Konzentrationen im Gehirn vorkommt, während die Glukuronide vermehrt im Blut nachzuweisen sind (**Abbildung 3.11 A, C, D**). Norbuprenorphin zeigte eine gleichmäßige Verteilung zwischen Gehirn und Blut (**Abbildung 3.11 B**).

Abbildung 3.11: Dosis- und stammesabhängige Verteilung von Buprenorphin und seiner Metaboliten zwischen Gehirn und Blut

Dargestellt ist das logarithmierte Verteilungsverhältnis zwischen Gehirn und Blut als Box Plot mit Median und [5./ 95. Perzentile] (0,42 mg/kg: $n = 10$, 4,0 mg/kg: $n = 5$, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*; P -Wert $< 0,05$: * vs. C57BL/6J). Die Konzentrationen wurden in männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen 30 min nach s.c. Applikation von Buprenorphin ermittelt. Messwerte unterhalb der Quantifizierungsgrenze sind nicht dargestellt (exakte Werte im **Anhang: Tabelle S4 – S6**).

Die Verteilung von Buprenorphin und seiner Metaboliten war nicht dosisabhängig (**Abbildung 3.11**, *Mann-Whitney* Test pro Stamm pro Stamm 0,42 mg/kg vs. 4,0 mg/kg siehe **Anhang**: Tabelle S6). Geringe stammesabhängige Unterschiede waren nur bzgl. Buprenorphin in beiden Dosisgruppen festzustellen (**Abbildung 3.11 A**). Bezogen auf die 0,42 mg/kg Dosisgruppe wurde beim Inzuchtstamm C57BL/6J ein höherer Verteilungskoeffizient von Buprenorphin im Gehirn im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen, detektiert (*Kruskal-Wallis* Test: $p = 0,0042$). In der 4,0 mg/kg Dosisgruppe war die Verteilung von Buprenorphin zwischen Gehirn und Blut bei C57BL/6J Mäusen nur gegenüber 129S1/SvImJ Mäusen signifikant erhöht (*Kruskal-Wallis* Test: $p = 0,0012$). Die vorhandene Varianz der Schmerzwahrnehmung aller getesteter Mäuse (**Abbildung 3.4 B**) kann nicht durch die Verteilung von Buprenorphin zwischen Gehirn und Blut erklärt werden (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,13$, $p = 0,05$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,17$, $p = 0,14$). Auch die Subtraktion des Stammeffektes führt zu keiner verbesserten Korrelation (0,42 mg/kg: $R^2 = 0,05$, $p = 0,25$; 4,0 mg/kg: $R^2 = 0,12$, $p = 0,22$).

Ergebniszusammenfassung: Metabolisierung von Buprenorphin

- Buprenorphin und seine Metaboliten konnten dosisabhängig im Blut und Gehirn nachgewiesen werden.
- Die Metabolisierung von Buprenorphin und die Verteilung von Buprenorphin und seiner Metaboliten zwischen Gehirn und Blut zeigten bei den drei verwendeten Mausstämmen keine dosisabhängigen und nur teilweise stammesabhängige Unterschiede.
- Ein Zusammenhang zwischen analgetischer Wirksamkeit und der Metabolisierung von Buprenorphin war nicht festzustellen.

3.2.2 SNP Verifizierung in stoffwechselrelevanten Enzymen

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben, erfolgt im Menschen der Phase-I Metabolismus von Buprenorphin über Isozyme der Subfamilie CYP3A. Aus diesem Grund lag der Fokus der folgenden Untersuchungen auf dieser Enzym-Subfamilie.

Unterschiede im Metabolismus von Substanzen können beispielsweise auf das Vorhandensein stammspezifischer SNP zurückgeführt werden. Mit Hilfe der „Mouse Genome“ Datenbank wurden zwölf stammspezifische SNP in der kodierenden Sequenz der *Cyp3a* Isozyme identifiziert. Um den genetischen Status der von uns verwendeten Mäusestämme zu überprüfen, wurden die zwölf identifizierten SNP verifiziert. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 3.1** dargestellt. Als Referenzsequenz verwendet die Datenbank den Inzuchtstamm C57BL/6J. Dementsprechend ist der jeweilige Stamm bei einem Nichtvorhandensein eines SNP unter der Spalte „Referenzsequenz“ einsortiert. Konnte der untersuchte SNP nachgewiesen werden, ist der entsprechende Stamm in der Spalte „SNP vorhanden“ einsortiert. Die hochgestellte Zahl „1“ weist darauf hin, dass das Ergebnis mit den Angaben der Datenbank übereinstimmt, wohingegen die hochgestellte Zahl „2“ eine Abweichung anzeigt.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der SNP Verifizierung bei verwendeten C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (n = 15 pro Stamm).

SNP ID	Gen	Methode	Referenzsequenz	SNP vorhanden
rs33543287	<i>Cyp3a16</i>	Sanger	C57BL/6J ¹ , Balb/cJ ¹	129S1/SvImJ ¹
rs33166435	<i>Cyp3a16</i>	Sanger	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs239851337	<i>Cyp3a44</i>	Sanger	C57BL/6J ¹ , Balb/cJ ¹	129S1/SvImJ ¹
rs583385430	<i>Cyp3a44</i>	Sanger	C57BL/6J ¹ , Balb/cJ² , 129S1/SvImJ²	
rs29684215	<i>Cyp3a57</i>	RFLP	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs29510048	<i>Cyp3a59</i>	Sanger	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs49207862	<i>Cyp3a59</i>	RFLP	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs36827986	<i>Cyp3a59</i>	Sanger	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs38952718	<i>Cyp3a59</i>	RFLP	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs51611659	<i>Cyp3a59</i>	RFLP	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹
rs33429092	<i>Cyp3a59</i>	Sanger [#]	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	
rs33260411	<i>Cyp3a59</i>	RFLP	C57BL/6J ¹ , 129S1/SvImJ ¹	Balb/cJ ¹

¹ Stamm weist die in der „Mouse Genome“ Datenbank angegebene Sequenz auf

² Stamm weist eine zur „Mouse Genome“ Datenbank abweichende angegebene Sequenz auf

[#] Die Sequenzen des Stammes Balb/cJ waren nicht auswertbar

Mittels RFLP bzw. Sanger Sequenzierung konnten alle identifizierten SNP für den betreffenden Mausstamm verifiziert werden, mit Ausnahme von rs583385430 und rs33429092. Der SNP rs583385430 war in keinem der von uns verwendeten Stämme nachweisbar. Jedoch ist dieser SNP mit einer geringen Vertrauenswürdigkeit in der „*Mouse Genome*“ Datenbank angegeben und befindet sich noch im Validierungsprozess. Aus diesem Grund ist es möglich, dass dieser SNP im Laufe des Validierungsprozesses wieder aus der Datenbank entfernt wird. Bezogen auf den SNP rs33429092 waren die Sequenzen des Stammes Balb/cJ nicht auswertbar, sodass eine Verifizierung in diesem Stamm nicht möglich war. Für die Stämme C57BL/6J und 129S1/SvImJ hingegen wurde das Nichtvorhandensein des SNP rs33429092 in Übereinstimmung mit den Angaben der Datenbank nachgewiesen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die verwendeten Mausstämme einen stabilen genetischen Status, bezogen auf die untersuchten *Cyp3a* Isozyme, aufweisen.

Ergebniszusammenfassung: SNP Verifizierung

- Identifizierte SNP in der *Cyp3a* Subfamilie konnten analog zur „*Mouse Genome*“ Datenbank in den Stämmen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ nachgewiesen werden.
- Das genetische Profil war bei den von uns verwendeten Stämmen mit der „*Mouse Genome*“ Datenbank vergleichbar.

3.2.3 Methodenetablierung zur Aktivitäts- und Expressionsanalyse

3.2.3.1 MeSH-Term Analyse zur Lebermikrosomenisolation

Zur weiteren Untersuchung der CYP Subfamilien sollten Mikrosomen aus Lebergewebe isoliert werden. Jedoch stellte sich bei der Methodenetablierung heraus, dass sich die Protokolle zur Lebermikrosomenisolation stark in der Angabe des zu verwendenden Ausgangsmaterials (Gesamtleber vs. Teilstück der Leber) unterscheiden. Aus diesem Grund wurde eine systematische PubMed Literaturrecherche durchgeführt, um zu evaluieren, welches das geeignetste Ausgangsmaterial für die Lebermikrosomenisolation bei der Maus ist.

Die systematisch durchgeführte PubMed Literaturrecherche (n = 127 Publikationen, **Anhang:** Tabelle S1) ergab, dass 30 % der untersuchten Publikationen nur den Term „Leber“, ohne weitere Spezifikationen im Material und Methodenteil, als verwendetes Material zur Lebermikrosomenisolation nannten. 35 % beschrieben die Verwendung von gepoolten Lebern mehrerer Maus-Individuen. Die verbleibenden 35 % gaben an, Teilstücke der Leber zu verwenden. 95 % der Publikationen, die ein Teilstück der Leber verwendeten, gaben keine genaueren Angaben, welcher Leberlappen verarbeitet wurde. Des Weiteren nutzten 48 % aller analysierten Publikationen männliche Mäuse, 11,8 % weibliche und 4,7 % beide Geschlechter. Die verbleibenden 35,5 % benannten das Geschlecht nicht. Am häufigsten wurde der Inzuchtstamm C57BL/6 (33,9 % der Publikationen) von verschiedenen Züchtern verwendet. Die Inzuchtstämme Balb/cJ und 129/Sv wurden nur zu jeweils 4,7 % genutzt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Frage nach dem geeignetsten Ausgangsmaterial für eine Lebermikrosomenisolation und welche Bedeutung dieses für darauffolgende CYP Analysen hat, nicht eindeutig geklärt ist. Aus diesem Grund wurden zunächst für den Inzuchtstamm C57BL/6J Aktivitäts- und Expressionsanalysen zu relevanten CYP Enzym-Subfamilien durchgeführt in den verschiedenen Leberlappen und dem Proc. p. der Maus im Vergleich zur Gesamtleber durchgeführt.

Ergebniszusammenfassung: MeSH Term Analyse Lebermikrosomenisolation

- In der Literatur konnte keine einheitliche Empfehlung aufgefunden werden, welches Ausgangsmaterial für eine Lebermikrosomenisolation verwendet werden soll.
- Von den analysierten Publikationen verwendeten jeweils ein Drittel entweder die gesamte Leber, gepoolte Lebern oder Teilstücke der Leber.
- Die Mehrzahl der Publikationen definierte nicht, welche Teile der Leber verwendet

3.2.3.2 Lobuläre CYP Aktivitäts- und Expressionsanalyse

In männlichen C57BL/6J Mäusen wurde die CYP3A Subfamilie in den einzelnen Leberlappen und dem Proc. p. hinsichtlich ihrer Aktivität und Expression untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass die gemessene lobuläre Aktivität von CYP3A im Lobus s. l. und Lobus m. am größten ist. Im Vergleich zum Lobus s. l. war die CYP Reaktionsrate im Lobus d. l., Lobus c. und dem Proc. p. durchschnittlich um das 1,2-, 1,7- und 2,6-fache niedriger (*Friedman* Test: $p = 0,0006$) (**Abbildung 3.12 A**). Der theoretisch berechnete gewichtete Mittelwert (WA) war mit der gemessenen CYP Aktivität im Lobus d. l. vergleichbar. Um den errechneten WA beurteilen zu können, wurde ebenfalls die CYP Aktivität in der Gesamtleber von männlichen C57BL/6J Mäusen analysiert. Diese zeigte eine gute Übereinstimmung zum theoretischen berechneten WA (**Abbildung 3.12 A und Abbildung 3.14 A**).

Abbildung 3.12: CYP Aktivität und Proteingehalt in den Leberlappen männlicher C57BL/6J Mäuse

A) Lobuläre Aktivität und **B)** lobulärer Proteingehalt der CYP3A Isozyme in den vier Leberlappen und dem Proc. p. (MW $\pm$ SD, $n = 10$; P-Wert $< 0,05$; * vs. Lobus s. l., # vs Lobus m., *Friedman* Test mit *Dunn's multiple comparison*). Die schwarz gestrichelte Linie repräsentiert den theoretisch errechneten gewichteten Mittelwert (WA) (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S8– S11). Abkürzungen: Lobus sinister lateralis (Lobus s. l.), Lobus medialis (Lobus m.), Lobus dexter lateralis (Lobus d. l.), Lobus caudatus (Lobus c.) und Processus papillaris (Proc. p.).

Der Gesamtproteingehalt an CYP3A wurde mittels ELISA analysiert, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Leberlappen und dem Proc. p. festgestellt werden konnten (*Friedman* Test: $p = 0,6771$) (**Abbildung 3.12 B**).

Tabelle 3.2 stellt die lobuläre mRNA Expression der *Cyp3a* Isozymen mit den entsprechenden P-Werten dar. Alle *Cyp* Transkripte konnten in den entsprechenden Proben analysiert werden. Insgesamt wiesen die Gene *Cyp3a11* und *3a25* ein hohes und die Gene *3a41* und *3a44* ein sehr geringes mRNA Expressionslevel auf. Interlobuläre Unterschiede wurden bezüglich der *Cyp3a13*, *3a16* und *3a25* mRNA Expression festgestellt (**Tabelle 3.2**)

Zusätzlich wurden die Aktivität, Protein- und Genexpression der Enzym-Subfamilien CYP1A, CYP2C und CYP2D analysiert. Diese Subfamilien sind neben CYP3A von besonderer Bedeutung für den Phase-I Stoffwechsel verschiedener Pharmaka (93). Da sie jedoch keinen bekannten Beitrag zur Verstoffwechslung von Buprenorphin leisten, sind diese Ergebnisse nur im Anhang aufgeführt (**Anhang:** Abbildung S2, Tabelle S8, S10, S12 – S20).

Tabelle 3.2: Relative Genexpression der Cyp3a Isozyme in den vier Leberlappen und dem Processus papillaris männlicher C57BL/ 6J Mäuse (n = 10; E = Exponent).

Gen	Lobus sinister lateralis		Lobus medialis		Lobus dexter lateralis		Lobus caudatus		Processus papillaris		P-Wert ³
	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	
Cyp3a11	2,06E+06	7,44E+05	2,07E+06	7,20E+05	2,12E+06	7,02E+05	2,23E+06	6,47E+05	2,04E+06	7,19E+05	0,100
Cyp3a13	1,63E+05	3,73E+04	1,57E+05	3,64E+04	1,65E+05	3,67E+04	1,42E+05	3,55E+04	1,52E+05	2,67E+04	0,035
Cyp3a16	1,78E+04	6,60E+03	1,42E+04	4,32E+03	1,27E+04	3,65E+03	1,30E+04	4,79E+03	1,65E+04	6,91E+03	0,0004
Cyp3a25	8,57E+05	1,92E+05	8,08E+05	1,42E+05	8,77E+05	1,50E+05	7,51E+05	9,93E+04	7,90E+05	1,54E+05	0,018
Cyp3a41	3,73E+02	1,64E+02	3,73E+02	1,68E+02	3,74E+02	1,66E+02	3,56E+02	1,50E+02	3,99E+02	1,93E+02	0,648
Cyp3a44	1,48E+02	1,06E+02	1,31E+02	8,25E+01	1,15E+02	9,92E+01	1,28E+02	8,13E+01	1,19E+02	1,00E+02	0,238
Cyp3a57	2,85E+05	5,76E+04	2,78E+05	4,82E+04	2,30E+05	8,19E+04	2,74E+05	3,32E+04	2,79E+05	4,46E+04	0,765
Cyp3a59	3,77E+05	6,31E+04	3,65E+05	5,58E+04	3,79E+05	5,28E+04	3,74E+05	4,06E+04	3,58E+05	5,21E+04	0,440

¹ Mittelwert (MW)   ² Standardabweichung (SD)   ³ Friedman Test

¹ Mittelwert (MW)   ² Standardabweichung (SD)   ³ Friedman Test

Die Aktivität von CYP Enzymen ist unter anderem abhängig von der Elektronenzufuhr. Der bekannteste Elektronendonator für CYP Enzyme ist die CPR. Die Aktivität der CPR kann somit indirekt Einfluss auf die Aktivität von CYP Enzymen haben (154).

Untersuchungen der CPR Aktivität zeigten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Leberlappen und dem Proc. p. (*Friedman Test*: $p = 0,0001$) (**Abbildung 3.13 A**). Hierbei wurde die höchste CPR Aktivität im Lobus s. l. und Lobus m. und die geringste im Proc. p. gemessen. Der theoretisch berechnete WA (schwarz gestrichelte Linie) ist vergleichbar mit der CPR Aktivität in der gesamten Leber von männlichen C57BL/6J Mäusen (**Abbildung 3.15**). Bei der Analyse der relativen Genexpression der CPR wurde lediglich eine geringe Erhöhung im Lobus c. im Vergleich zum Lobus m. detektiert (*Friedman Test*: $p = 0,0228$) (**Abbildung 3.13 B**).

Abbildung 3.13: Lobuläre CPR Aktivität und Genexpression

A) Lobuläre CPR Aktivität und **B)** lobuläre CPR Genexpression in den vier Leberlappen und dem Proc. p. männlicher C57BL/6J Mäuse ($n = 10$, $MW \pm SD$; P -Wert $< 0,05$: * vs. Lobus. s. l., # vs. Lobus m., *Friedman Test* mit *Dunn's multiple comparison*) (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S8, S19, S21, S22). Abkürzungen: Lobus sinister lateralis (Lobus s. l.), Lobus medialis (Lobus m.), Lobus dexter lateralis (Lobus d. l.), Lobus caudatus (Lobus c.) und Processus papillaris (Proc. p.).

Ergebniszusammenfassung: Interlobuläre CYP Analyse

- Die CYP3A Enzyme wiesen eine unterschiedliche Aktivität und zum Teil mRNA Expressionsunterschiede in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris auf (männliche C57BL/6J Mäuse).
- Lobuläre Unterschiede in der CPR Aktivität weisen Ähnlichkeiten zu lobulären Unterschieden in der CYP Aktivität auf.

3.2.4 Stammesabhängige CYP Aktivitäts- und Expressionsanalyse

Da die vorher genannten Ergebnisse gezeigt haben, dass die Auswahl eines bestimmten Teilstücks der Leber zu signifikanten Unterschieden in der Aktivität und Expression von CYP Enzymen führen kann, wurden für den Vergleich der drei Maus-Inzuchtstämme die Mikrosomen aus der Gesamt-Leber isoliert. Die Untersuchungen ergaben, dass keine signifikanten stammesbedingte Unterschiede in der CYP3A Aktivität vorliegen (*Kruskal-Wallis* Test: $p = 0,2248$) (**Abbildung 3.14**).

Abbildung 3.14: Stammesabhängige CYP3A Aktivität und Proteingehalt

A) Stammesabhängige Aktivität und **B)** stammesabhängiger Proteingehalt der CYP3A Isozyme in der gesamten Leber männlicher Mäuse (MW $\pm$ SD, $n = 8$, P -Wert $< 0,05$: * vs. C57BL/6J, # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*) (exakte Werte im **Anhang**: Tabelle S23 – S26).

Für den Gesamtproteingehalt an CYP3A Isozymen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Inzuchtstämmen festgestellt werden (*Kruskal-Wallis* Test: $p = 0,208$) (**Abbildung 3.14 B**).

Stammesbedingte mRNA Expressionsunterschiede wurden bei allen Genen der *Cyp3a* Isozymen, mit Ausnahme von *Cyp3a44*, detektiert. Hierbei waren die Gene *Cyp3a11*, *3a16*, *3a25*, *3a57* und *3a59* am stärksten im Inzuchtstamm Balb/cJ exprimiert. Im Vergleich dazu wiesen die Inzuchtstämme C57BL/6J und 129S1/SvImJ eine geringere Expression dieser Gene auf. Die Genexpression von *Cyp3a13* und *3a41* war in den Inzuchtstämmen C57BL/6J und Balb/cJ deutlich erniedrigt (**Tabelle 3.3**). Zusätzlich wurde die Genexpression zweier CYP Regulatoren ermittelt. Der Transkriptionsfaktor *Constitutiv androstan Rezeptor* (CAR) induziert vor allem die Expression von *Cyp3a11* und *3a44*, wies jedoch keinen Unterschied in seiner Genexpression in den drei Stämmen auf. Der Transkriptionsfaktor *Pregnan-X-Rezeptor* (PXR) induziert ebenfalls die Expression von *Cyp3a11* und *3a44* und wies eine geringere Expression im Stamm Balb/cJ auf, verglichen mit C57BL/6J (**Tabelle 3.3**).

Tabelle 3.3: Relative Genexpression der Cyp3a Isozyme und CYP Regulatoren in der gesamten Leber von männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (n = 8, E = Exponent)

Stamm	C57BL/6J		Balb/cJ		129S1/SvImJ		P-Wert ³
Gen	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	
Cyp3a11	2,31E+06	6,56E+05	5,55E+06	1,59E+06	1,73E+06	3,03E+05	0,0002
Cyp3a13	1,48E+05	2,35E+04	1,54E+04	3,81E+03	1,76E+05	1,91E+04	0,0002
Cyp3a16	2,08E+04	5,75E+03	3,63E+04	7,01E+03	1,29E+04	2,95E+03	0,0001
Cyp3a25	9,28E+05	2,28E+05	1,80E+06	4,88E+05	1,03E+06	3,03E+05	0,0016
Cyp3a41	5,06E+02	1,22E+02	1,18E+03	3,05E+02	1,13E+03	6,47E+02	0,0018
Cyp3a44	1,98E+02	7,90E+01	3,11E+02	1,63E+02	5,03E+02	4,15E+02	0,1013
Cyp3a57	3,97E+05	7,45E+04	1,11E+06	3,27E+05	3,77E+05	9,74E+04	0,0004
Cyp3a59	5,04E+05	1,02E+05	1,38E+06	3,49E+05	5,04E+05	1,39E+05	0,0005
CAR	4,50E+04	7,87E+03	4,35E+04	1,00E+04	5,75E+04	1,70E+04	0,1433
PXR	3,02E+04	2,63E+03	2,25E+04	2,71E+03	2,90E+04	7,38E+03	0,0032

¹ Mittelwert (MW) ² Standardabweichung (SD) ³ Kruskal-Wallis Test

Des Weiteren wurde die stammesabhängige CPR Aktivität in den drei Inzuchtstämmen bestimmt (**Abbildung 3.15**). Die CPR Aktivität in Balb/cJ Mäusen war deutlich erniedrigt verglichen mit C57BL/6J und 129S1/SvImJ Mäusen (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,013$). Bei der Analyse der relativen Genexpression der CPR, konnten keine stammesabhängigen Unterschiede festgestellt werden (Kruskal-Wallis Test: $p = 0,3491$).

Abbildung 3.15: Stammesbedingte CPR Aktivität und Genexpression

A) Stammesabhängige CPR Aktivität und **B)** Genexpression in der gesamten Leber männlicher C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäuse (n = 8, MW ± SD; P-Wert < 0,05: * vs. C57BL/6J, # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ, Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison) (exakte Werte im Anhang: Tabelle S23, S27 – S29).

Es ist nicht bekannt inwieweit die Applikation von Buprenorphin einen Einfluss auf die *in vitro* gemessene CYP Aktivität und Expression hat. Daher wurden sowohl bei den verwendeten Tieren für die Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve als auch bei den Tieren für den Stammesvergleich zur analgetischen Wirksamkeit von Buprenorphin die Aktivität und

Expression der CYP3A Enzyme *ex vivo* analysiert (**Anhang:** Abbildung S3 – S6). Hierbei konnten keine wesentlichen Unterschiede zu den bereits untersuchten unbehandelten Tieren (**Abbildung 3.14, Tabelle 3.3**) festgestellt werden. Des Weiteren wurden keine dosisabhängigen Unterschiede detektiert (**Anhang:** Abbildung S3, S4). Lediglich in der mRNA Expression von *Cyp3a16* wurde eine Erniedrigung (*Mann-Whitney* Test: $p < 0,0001$ (C57BL/6J), $p = 0,0008$ (Balb/cJ), $p = 0,0003$ (129S1/SvImJ)) und von *CPR* eine Erhöhung (*Mann-Whitney* Test: $p < 0,0001$ (C57BL/6J, Balb/cJ), $p = 0,0025$ (129S1/SvImJ)) in allen drei Inzuchtstämmen beobachtet (**Anhang:** Abbildung S6).

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, werden Buprenorphin und Norbuprenorphin durch eine UGT-vermittelte Phase-II Reaktion glukuronidiert. Aus diesem Grund wurde die relative Genexpression der *Ugt1a* und *2b* Isozyme in den drei Inzuchtstämmen untersucht. Da sich die vorliegende Promotionsarbeit vorwiegend auf den Phase-I Stoffwechsel fokussiert, sind diese Ergebnisse nur im Anhang aufgeführt (**Anhang:** Abbildung S7, S8).

Zusätzlich wurden die Aktivität, der Proteingehalt und die Genexpression der CYP1A, CYP2C und CYP2D Isozyme in den drei Inzuchtstämmen analysiert (**Anhang:** Abbildung S9, Tabelle S23, S25, S28, S30 – S36).

Ergebniszusammenfassung: Stammesabhängige CYP Analyse

- Die CYP3A Aktivität sowie der Proteingehalt wiesen in den drei untersuchten Maus-Inzuchtstämmen keinen signifikanten Unterschied auf.
- Stammesbedingte Unterschiede in der *Cyp3a* Genexpression stehen in keinem Zusammenhang mit dem CYP3A Proteingehalt und der Aktivität.
- Die CYP3A Aktivität scheint unabhängig von stammesbedingten Unterschieden in der CPR Aktivität zu sein.
- Die Applikation von Buprenorphin führt nicht zu wesentlichen Veränderungen in der CYP3A Aktivität, Proteingehalt und Genexpression.

4 Diskussion

4.1 Stammesabhängiges Schmerzverhalten

Opioide werden häufig perioperativ zur Behandlung von moderaten bis schweren Schmerzen bei der Maus eingesetzt (11, 69, 70, 73, 76). Unter den zahlreich verfügbaren Opioiden wird Buprenorphin auf Grund seines langanhaltenden analgetischen Effektes und der geringen unerwünschten Nebeneffekte bevorzugt verwendet (78, 79, 86). Um das Schmerzmanagement möglichst optimal zu gestalten, sind Kenntnisse über eine angemessene Dosierung zwingend erforderlich. Bisher waren Stammesunterschiede bei Mäusen bezüglich des analgetischen Effekts von Buprenorphin nicht eindeutig geklärt und wurde daher auch nicht in Empfehlungen berücksichtigt.

4.1.1 Basale Schmerzsensitivität

Stammesunterschiede in der basalen Nozizeption sind gut in der Literatur dokumentiert (74, 124, 127, 135). Variationen in der Schmerzsensitivität von verschiedenen Mausstämmen sind abhängig von verschiedenen Faktoren. Zum einen sind Stammesunterschiede in der basalen Nozizeption abhängig von der Qualität und Intensität des angewendeten Schmerzreizes, z.B. thermischer, mechanischer oder chemischer Schmerzreiz (124). Zum anderen sind die Stammesunterschiede abhängig vom Ort des angewandten Schmerzreizes. So führt beispielsweise die Induktion eines Schmerzreizes durch einen thermischen Stimulus an den Pfoten im Vergleich zum Schwanz zu einem unterschiedlichen Ergebnis (124). Zusätzlich sind die Stammesunterschiede in der basalen Nozizeption abhängig vom Züchter von dem ein Mausstamm bezogen wurde und selbst die Verwendung von Substämmen kann zu unterschiedlichen Ergebnissen führen (124, 132).

In der vorliegenden Arbeit wurden stammesspezifische Unterschiede in der basalen Nozizeption unter Verwendung des IHP Test ermittelt. Hierbei war der Inzuchtstamm Balb/cJ am sensitivsten und der Inzuchtstamm 129S1/SvImJ am wenigsten empfindlich. Der IHP Test stellt eine Variation des klassischen *Hot Plate* Tests dar, sodass diese beiden Schmerztestungen am ehesten vergleichbar sind. Mogil und Kollegen untersuchten die basale Nozizeption der Inzuchtstämme C57BL/6J und Balb/cJ auf dem klassischen *Hot Plate* Test. Diese Mausstämme wurden vom selben Züchter (Jackson Laboratory, USA) wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausstämme bezogen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen beobachteten Mogil und Kollegen eine geringere Schmerzsensitivität beim Inzuchtstamm C57BL/6J im Vergleich zum Inzuchtstamm Balb/cJ unter Verwendung des klassischen *Hot Plate* Test (124). Jedoch konnten die in der hier vorliegenden Arbeit, während der Dosisfindungsstudie erhobenen basalen Schmerzsensitivitäten bzgl. des Inzuchtstammes C57BL/6J ($48 \pm 0,87$ °C) während der Stammesvergleichsstudie wiederholt

werden ($48,2 \pm 0,58$ °C). Dieses trägt zu einer gesteigerten Vertrauenswürdigkeit der in dieser Arbeit erhobenen Daten bei. Daher sind die kontroversen Ergebnisse der Stammesunterschiede in der basalen Nozizeption zwischen IHP Test bezogen auf die Ergebnisse der hier vorliegende Arbeit und klassischem *Hot Plate* Test bezogen auf Daten aus der Literatur eher der Methodik geschuldet.

Eine Erklärung für die kontroversen Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Endpunkte beim klassischen *Hot Plate* Test und dem IHP sein. Der klassischen *Hot Plate* Test basiert auf der Messung der Zeit, wann die Tiere bei einer fixen Temperatur zum ersten Mal ein Schmerzverhalten in Form von Lecken der Hinterpfoten zeigen. Dabei hängt die Abbruchzeit erheblich von der definierten Temperatur ab, die in der Regel zwischen 53 und 58 °C liegt (74, 124). Der IHP Test basiert dahingegen auf einer linearen Temperatursteigerung, bei dem die Temperatur bestimmt wird, bei der die Tiere erstmals eine Schmerzreaktion zeigen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden für alle getesteten C57BL/6J und Balb/cJ Mäuse Abbruchtemperaturen kleiner als 50 °C detektiert. Yeasomans und Kollegen fanden heraus, dass unterschiedliche nozizeptive Fasern durch niedrige und hohe Hitzestimuli aktiviert werden (155, 156). Hierbei wurden durch eine niedrige Hitzerate C-Fasern (0,9 °C/s) aktiviert, wohingegen hohe Hitzeraten (6,5 °C/s) vorzugsweise A δ -Fasern aktiviert haben. Daher ist zu vermuten, dass beim klassischen *Hot Plate* Test mit hohen fixen Temperaturen, primär A δ -Fasern angesprochen werden, wohingegen der hier eingesetzte IHP Test eher C-Fasern aktiviert. Die Aktivierung unterschiedlicher Schmerzfasern könnte zu unterschiedlich starken Schmerzempfindlichkeiten bei demselben Mausstamm führen und daher einen Vergleich zwischen IHP und klassischem *Hot Plate* Test erschweren.

Trotz fehlender Vergleichbarkeit zum klassischen *Hot Plate* Test wurde die Entscheidung zur Verwendung des IHP Test in der hier vorliegenden Arbeit bewusst getroffen. Der IHP Test wird in der Literatur im Vergleich zum klassischen *Hot Plate* Test bei Maus und Ratte als sensibler beschrieben (62, 63). Hunskaar und Kollegen detektierten mit Hilfe des IHP Test einen dosisabhängigen Anstieg der Abbruchtemperatur, nach Verabreichung von Paracetamol und Acetylsalicylsäure. Dieser Effekt konnte mit dem klassischen *Hot Plate* Test nicht dargestellt werden (62). Dieser Aspekt macht deutlich, dass der IHP Test die Möglichkeit besitzt, auch geringe Unterschiede im analgetischen Effekt (z.B. schwach wirksamer Substanzen) zu detektieren. Zusätzlich erlaubt der IHP Test im Gegensatz zum klassischen *Hot Plate* Test (64-66) auch die wiederholte Verwendung der Tiere für einen Versuch (62, 63). Auch wenn die Testdauer beim IHP Test im Vergleich zum *Hot Plate* Test deutlich länger ist (ca. 3 Minuten vs. 30 Sekunden (63, 74, 75)), überwiegen klar die Vorteile einer gesteigerten Sensitivität und Reproduzierbarkeit unter Einsatz eines geringeren thermischen Stimulus. Es bleibt jedoch ganz klar festzuhalten, dass sowohl der IHP Test als auch der klassische *Hot Plate* Test nur eine Qualität von Schmerz, nämlich akuten

thermisch-ausgelösten Schmerz, betrachten. Der klassische *Hot Plate* und IHP Test sollen supraspinale Schmerzweiterleitung widerspiegeln, bei der auch komplexere Strukturen der Schmerzwahrnehmung eine Rolle spielen. Im Gegensatz dazu testet beispielsweise der *Tail-Flick* Test nur den reinen Reflex, der auf spinale Strukturen zurück zu führen ist (61). Durch Auswahl des IHP Testes sollte in der hier vorliegenden Arbeit sichergestellt werden, dass nicht nur spinal, sondern auch supraspinal vermittelte Analgesie detektiert werden kann (39, 157).

4.1.2 Stammesabhängige Abbruchkriterien

Um das Schmerzmanagement überprüfen zu können, ist die richtige Einschätzung des Schmerzverhaltens von großer Bedeutung. Jedoch besteht weiterhin das größte Problem darin Schmerzen richtig zu erkennen (15, 73). Da bisher kein optimales System existiert Schmerzen richtig einzuschätzen, gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Evaluierung von Schmerzen.

Die Evaluierung von postoperativen und Krankheitsmodell bedingten Schmerzen muss im Voraus durchdacht sein, um das Schmerzmanagement zu überprüfen. Hierbei sollten modellspezifische Parameter definiert werden, die für jede Studie individuell anzupassen sind. Beispielsweise wird bei neuropathischen Schmerzen eine spontane schmerzassoziierte Beinbewegung als Indikator verwendet (158). Abdominale Schmerzen nach chirurgischen Eingriffen werden durch Strecken und/ oder Aufwölben des Rückens angezeigt (159). Eine relativ neue Methode zur Evaluation postoperativer Schmerzen ist die sogenannte „*Grimace Scale*“, die anhand der Position bzw. Status der Ohren, Augen, Nase, Schnurrhaare und Wangen, den Schmerz einschätzt (73, 160). Dieses setzt jedoch eine gute Dokumentation des Gesichtsausdruckes und eine schnelle Auswertung voraus. Zusätzlich können weitere Parameter herangezogen werden, um das Wohlbefinden zu beurteilen, wie beispielsweise der Nestbau oder das Putzverhalten. Mäuse bauen sich in der Regel sofort ein Nest, um einen Unterschlupf vor Prädatoren zu haben und sich ein Mikroklima zu schaffen. Anhand der Schnelligkeit und Komplexität, können Rückschlüsse auf das Wohlbefinden gezogen werden (161). Fehlendes Putzverhalten, welches sich in verklebten oder struppigen Fell widerspiegelt können Anzeichen von länger anhaltenden Schmerzen sein (159).

Bei artifiziellen Schmerztests ist die Definition der Abbruchkriterien ebenfalls äußerst wichtig und kann zu signifikant unterschiedlichen Ergebnissen führen. Belknap und Kollegen untersuchten unterschiedliche Abbruchkriterien bzgl. der Morphinsensitivität im *Hot Plate* Test und konnten nur beim Lecken der Vorderpfote Stammesunterschiede detektieren (162). Jedoch ist das Lecken der Vorderpfoten Teil des normalen Putzverhaltens von Mäusen und somit eher als ungeeignetes Abbruchkriterium einzuordnen. Bannon und Kollegen empfehlen

daher als einziges Abbruchkriterium das Lecken einer der beiden Hinterpfoten zu definieren, da es ein eindeutiges schmerzhaftes Verhalten darstellt (163). Carbone und Kollegen mussten jedoch feststellen, dass der Inzuchtstamm Balb/cJ nur bedingt als schmerzhaftes Verhalten das Lecken einer der beiden Hinterpfoten zeigte. Daher wurde zusätzlich das Heben und Schütteln einer der beiden Hinterpfoten definiert (74). Auf Grundlage der publizierten Erkenntnisse wurde in der hier vorliegenden Arbeit das Lecken sowie das Heben und Schütteln einer der beiden Hinterpfoten als Abbruchkriterium gewertet. Stammesabhängiges schmerzhaftes Verhalten wurde auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Vor allem die Stämme Balb/cJ und 129S1/SvImJ wiesen fast ausschließlich das Schütteln als Abbruchkriterium auf. Der Stamm C57BL/6J zeigte Schmerzen vor allem durch das Lecken einer der beiden Hinterpfoten an. Zusätzlich zeigte die Nachauswertung des Videomaterials bei C57BL/6J Mäusen, dass unmittelbar vor dem Lecken, die entsprechende Hinterpfote geschüttelt wurde. Der Stamm 129S1/SvImJ speichelte und urinierte sich zudem den Bauch ein, bevor er eine der beiden Hinterpfoten hob und schüttelte. Diese Erkenntnisse machen deutlich, wie wichtig die Auswertung der Videoaufnahmen für die hier vorgestellten Ergebnisse war. Zusätzlich zeigen diese Umstände, dass die Definition der Abbruchkriterien einen erheblichen Einfluss auf den Ausgang der Ergebnisse haben kann und sorgfältig hinterfragt werden sollte.

4.1.3 Analgetische Wirkung von Buprenorphin

Die analgetische Wirkung von Buprenorphin wurde in zahlreichen human- und tierbasierten Studien untersucht und ist gut in der Literatur dokumentiert (76, 78, 84). Für die Spezies Maus gibt es ebenfalls viele Untersuchungen bzgl. der analgetischen Wirkung von Buprenorphin, die jedoch einen anderen Fokus als Stammesunterschiede haben.

Ein Großteil dieser Studien untersuchten schwerpunktmäßig die pharmakokinetischen sowie -dynamischen Eigenschaften von Buprenorphin in einem einzigen Mausstamm. Dabei variieren diese Studien stark in der Verwendung der Applikationsrouten, des Zeitpunktes der Testung nach Applikation, des Schmerztests oder chirurgischen Eingriffs sowie des Bewertungssystems der Schmerzen, sodass ein Vergleich nur bedingt möglich ist (5, 73-76, 151, 159, 161, 164). Ein weiterer Teil der Studien, die die analgetische Wirkung von Buprenorphin untersuchten, verwendeten zwar mehrere Mausstämme, jedoch zu einem anderen Zweck. Carbone und Kollegen verglichen beispielsweise die analgetische Wirkung von Buprenorphin mit einem Buprenorphin-Präparat mit nachhaltiger Freisetzung in zwei unterschiedlichen Mausinzuchtstämmen (Balb/cJ, SWR/J) unter Verwendung des klassischen *Hot Plate Tests* (74). Lediglich Wright-Williams und Kollegen untersuchten die analgetische Wirkung von Buprenorphin nach einer Vasektomie in C57BL/6Crl und C3H/HeNCrl Mäusen und beobachteten Stammesunterschiede im Schmerzverhaltens (z.B.

kratzen oder Lecken der Wunde, abnormaler Gang) (140). Diese Publikation ist eine der wenigen die anmerkt, dass Buprenorphin stammesspezifisch analgetisch wirksam ist.

Auf Grundlage der existierenden Datenlage ist ein systematischer Stammesvergleich nicht möglich und fehlt bisher für die Spezies Maus. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein systematischer Vergleich der analgetischen Wirkung von Buprenorphin in den drei häufig verwendeten Inzuchtstämme C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ unter Verwendung des IHP Testes durchgeführt. Hierbei wurde gezeigt, dass sowohl in der basalen Schmerzsensitivität, als auch in der analgetischen Wirkung von Buprenorphin Stammesunterschiede existieren.

Neben der analgetischen Wirkung kann Buprenorphin die Lokomotion beeinflussen. Niedrige Buprenorphin-Dosen führen zu einer erhöhten lokomotorischen Aktivität (87), wohingegen hohe Dosen sedativ wirken (143). Daher können lokomotorische Effekte von Buprenorphin die Ergebnisse des IHP beeinflussen, da komplexe Abbruchkriterien wie Heben und Schütteln bzw. Lecken einer der beiden Hinterpfoten, abgeprüft werden. Aus diesem Grund wurde die Lokomotion unmittelbar vor der IHP Testung ermittelt, um diese als möglichen Störfaktor ausschließen zu können. Der Stamm 129S1/SvImJ zeigte bei beiden Buprenorphindosen vergleichbar hohe Abbruchtemperaturen ermittelt als verzögertes Heben und Schütteln/Lecken einer der beiden Hinterpfoten, die auf einen sedativen Effekt zurückgeführt werden könnten. Jedoch zeigten die Ergebnisse des Lokomotionstests im *Open Field* für beide applizierten Buprenorphindosen eine im Vergleich zum Basalwert ähnlich erhöhte lokomotorische Aktivität, was einem sedativen Effekt widerspricht. Für den Inzuchtstamm Balb/cJ zeigte Buprenorphin die höchste analgetische Wirkung, welches sich in einer hohen Abbruchtemperatur widerspiegelte. Daher könnte argumentiert werden, dass die gute analgetische Wirkung von Buprenorphin auf eine Erhöhung der Lokomotion zurück zu führen ist, die zu einem reduzierten Kontakt der Pfoten mit der Heizplatte und damit einer verzögerten Reaktion führen könnte. Allerdings war die Steigerung der Lokomotion auch bei diesem Mausstamm nicht abhängig von der applizierten Buprenorphindosis und vergleichbar mit dem Stamm C57BL/6J, der geringere Abbruchtemperaturen im IHP Test aufwies. Aus diesen Gründen ist der Einfluss von Buprenorphin auf die Lokomotion als möglicher Störfaktor für die IHP Testung unwahrscheinlich.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Stammesunterschiede in der Schmerzsensitivität sind auf eine unterschiedliche analgetische Wirkung von Buprenorphin zurück zu führen. Hierbei führte die Applikation von 0,42 mg/kg Buprenorphin im Inzuchtstamm Balb/cJ zur höchsten und im Inzuchtstamm C57BL/6J zur niedrigsten analgetischen Wirkung. Die Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass eine hohe basale Schmerzsensitivität nicht zwingendermaßen einer erhöhten Buprenorphindosis bedarf, um

eine vergleichbare analgetische Wirkung herbeizuführen. So wies der Stamm Balb/cJ die höchste basale Sensitivität gegenüber dem thermischen Schmerzreiz auf. Gleichzeitig hatte Buprenorphin im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen die höchste Effektivität. Dahingegen zeigte der Stamm C57BL/6J im Vergleich zum Balb/cJ Stamm eine moderate basale Schmerzsensitivität und eine vergleichbar geringere analgetische Wirkung von Buprenorphin. Um beide Stämme auf ein vergleichbares analgetisches Niveau zu bringen, wäre für den Balb/cJ Stamm eine weitaus geringere Dosis an Buprenorphin ausreichend als für den C57BL/6J Stamm. Im Gegensatz dazu hatte Buprenorphin beim Stamm 129S1/SvImJ eine moderate analgetische Wirkung.

Die Untersuchung eines mutmaßlichen Zusammenhanges zwischen basaler Schmerzsensitivität und analgetischer Wirkung von Buprenorphin ist daher interessant, da eine Abschätzung der Dosis erheblich erleichtert wäre. In der Literatur finden sich Beispiele für andere Opioide. Im Fall des Opioids Fentanyl detektierten Varnado-Rhodes und Kollegen eine siebenfach erhöhte Potenz im 129/svJ Stamm im Vergleich zum C57BL/6J Stamm, obwohl sich diese in ihrer basalen Schmerzsensitivität nicht unterschieden haben (134). Symeon und Kollegen zeigten für das Opioid Tramadol eine deutlich höhere Effektivität für den Balb/cJ Stamm im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen, bei einer vergleichbaren basalen Schmerzsensitivität (136). Auch in der hier durchgeführten Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen basaler Schmerzsensitivität und analgetischer Wirkung von Buprenorphin festgestellt werden. Folglich kann der analgetische Effekt von Buprenorphin in verschiedenen Mausstämmen nicht anhand der basalen Schmerzsensitivität abgeleitet werden.

Die Applikation einer höheren Dosis von Buprenorphin (4,0 mg/kg) führte in der hier vorliegenden Arbeit zu einer gesteigerten analgetischen Wirkung bei den Inzuchtstämmen C57BL/6J und Balb/cJ. Dahingegen konnte durch die Applikation von 4,0 mg/kg Buprenorphin keine Steigerung der analgetischen Wirkung von Buprenorphin bei dem Inzuchtstamm 129S1/SvImJ erreicht werden. Das Abflachen der analgetischen Wirkung bei diesem Stamm bei einer höheren Dosis von Buprenorphin deutet auf eine glockenförmige Dosis-Wirkungskurve hin. Glockenförmige Dosis-Wirkungskurven von Buprenorphin sind häufig bei Schmerztests in Maus und Ratte beobachtet worden, die eine sehr hohe Schmerztemperatur verwenden (45, 76). Während der sogenannte Ceiling-Effekt von Buprenorphin durch die partiell agonistische Aktivität am MOR erklärt werden kann, kann diese Eigenschaft als Argument bezogen auf die glockenförmige Dosis-Wirkungsbeziehung nicht dienen (78). Lutfy und Kollegen nehmen an, dass die Aktivierung des ORL1 Rezeptors zu der Ausbildung einer glockenförmigen Dosis-Wirkungsbeziehung beiträgt (45). Dieses Ergebnis einer wahrscheinlich glockenförmig verlaufenden Dosis-Wirkungskurve von Buprenorphin beim Stamm 129S1/SvImJ ist von großer Bedeutung, da eine zu hohe

Dosierung nicht nur mit unerwünschten Nebenwirkungen wie respiratorischer Depression assoziiert sein kann, sondern auch mit einem Abfall der analgetischen Wirkung.

4.2 Stammesabhängige Metabolisierung von Buprenorphin

Von besonderer Bedeutung für den Phase-I Stoffwechsel von Buprenorphin ist im Menschen die Enzym-Subfamilien CYP3A, die vor allem in Leber und Darm lokalisiert ist (93, 148). Da es sehr wahrscheinlich ist, dass auch in der Spezies Maus Buprenorphin über die orthologe Enzym-Subfamilie CYP3A verstoffwechselt wird, wurde diese in der hier vorliegenden Arbeit untersucht. Hierbei wurden bereits bei der Planung und Durchführung mögliche Faktoren, die die Expression und Aktivität der CYP Enzyme beeinflussen, wie beispielsweise der zirkadiane Rhythmus, das Alter und Geschlecht (95, 146-148), mit berücksichtigt und im Material und Methoden Teil begründend dargelegt.

Zur Untersuchung der Metabolisierung von verschiedenen Substanzen existieren zwei sich ergänzende Ansätze, die *ex vivo* und *in vivo* durchgeführt werden. Beide Ansätze wurden in der hier vorliegenden Arbeit angewendet und werden in den beiden folgenden Abschnitten diskutiert.

4.2.1 Stammesspezifische CYP3A Aktivitätsuntersuchungen an Mikrosomen

Die Verwendung von murinen Lebermikrosomen oder Leberschnitten ist der Goldstandard, um grundlegende pharmako- bzw. toxikokinetische Profile der Biotransformation von Substanzen *ex vivo* darzustellen (165-169). Darüber hinaus eignet sich diese Methode auch, um stammesspezifische Aktivitätsunterschiede zu untersuchen. Jedoch stellte sich im Rahmen der Methodenetablierung und einer systematischen PubMed Literaturrecherche heraus, dass sich die Protokolle zur Lebermikrosomenisolation erheblich in der Angabe des zu verwendenden Ausgangsmaterials (Gesamtleber vs. Teilstück der Leber) unterscheiden. Hinsichtlich der Konsequenzen, die durch die Verwendung von einzelnen Leberlappen- oder Gesamtleber-Homogenaten für die Mikrosomenisolation resultieren, sind bisher nur sehr limitierte Informationen vorhanden. Uehara und Kollegen untersuchten die CYP2E und CYP2B Aktivität in den verschiedenen Leberlappen der Ratte und konnten signifikante Unterschiede, im Zusammenhang mit einer gesteigerten Empfindlichkeit der Tetrachlormethan-induzierten Hepatotoxizität feststellen (170). Für die Spezies Maus sind solche Daten bisher nicht erhoben worden.

Daher wurde im Rahmen der Methodenentwicklung zur Mikrosomenisolation untersucht, ob lobuläre Unterschiede in der CYP3A Aktivität existieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die CYP3A Aktivität erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Leberlappen und dem Proc. p. aufweisen. Die höchste CYP3A Aktivität wurde im Lobus s.l. und Lobus m. detektiert, welches auf einen erhöhten Metabolismus in diesen zwei Leberlappen hinweist.

Mögliche Erklärungen für die Variation der enzymatischen Aktivität sind eine erhöhte Gen- und/ oder Proteinexpression (171), verminderte Aktivität von assoziierten Enzymen (154, 172, 173) sowie weitere nicht genetische Faktoren, wie beispielsweise der Blutfluss und damit verbundene Sauerstoffpartialdruck (93, 168, 174-180). In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aktivität und Gen- bzw. Proteinexpression nicht bestätigt werden. In der Literatur existieren mehrere Beispiele, die eine Diskrepanz zwischen mRNA bzw. Proteinexpression und der CYP Aktivität beschreiben und somit im Einklang mit dem vorliegenden Ergebnis dieser Arbeit sind (146, 154). Die Zufuhr von Elektronen durch die CPR ist maßgeblich für die Funktionalität und auch Aktivität von CYP Enzymen (154, 172). Aus diesem Grund wurden zusätzlich in der hier vorliegenden Arbeit die mRNA Expression und die Aktivität der CPR untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur CPR Genexpression die CPR Aktivität lobuläre Unterschiede aufweist. Eine gesteigerte CPR Aktivität in einem bestimmten Leberlappen ging dabei mit einer erhöhten CYP3A Aktivität einher.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Wahl des Leberlappens einen entscheidenden Einfluss auf das Resultat einer pharmakologischen bzw. toxikologischen Metabolismusstudie haben kann und unter Umständen zu falsch negativen oder positiven Ergebnissen führt. Wenn möglich sollte daher die gesamte Leber zur Mikrosomenherstellung verwendet werden, welches für die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung der CYP3A Aktivität in verschiedenen Mausstämmen umgesetzt wurde. Hierbei konnten keine Unterschiede in der CYP3A Aktivität zwischen den drei Inzuchtstämmen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ detektiert werden. Des Weiteren wurden eine vergleichbare CYP3A Proteinexpression zwischen den drei Inzuchtstämmen festgestellt. Auch Lofgren und Kollegen führten eine systematische Untersuchung der CYP3A-vermittelten Testosteron-6 β -Hydroxylierung und CYP3A Proteinexpression in Lebermikrosomen von fünf verschiedenen Mausstämmen durch und stellten ebenfalls keine Unterschiede fest (141).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden im Gegensatz zur CYP3A Aktivität Stammesunterschiede in der Genexpression der CYP3A Enzyme ermittelt. In der Literatur finden sich meist nur Genexpressionsdaten bezogen auf einen Stamm (148), sodass diese systematisch erhobenen Daten eine Ergänzung zur existierenden Literatur darstellen. Jedoch liefern diese Ergebnisse keine weitere Erkenntnis bzgl. einer stammesbedingten CYP3A Aktivität.

Analog zu der in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchung bzgl. lobulärer Unterschiede in der CYP3A Aktivität bei männlichen C57BL/6J Mäusen wurde auch die CPR Aktivität in den drei verwendeten Mausstämmen untersucht. Überraschenderweise wurden im Gegensatz zur CYP3A Aktivität Stammesunterschiede in der CPR Aktivität gemessen.

Die lobuläre und stammesbedingte CYP3A Aktivität scheinen demnach durch unterschiedliche Faktoren bzw. Mechanismen beeinflusst. Genetische Polymorphismen und/oder epigenetische Modifikationen der CPR oder CYP Enzyme könnten eine Erklärung für den fehlenden Zusammenhang zwischen CPR und CYP Aktivität in den drei verwendeten Mausstämmen sein (93). Im Menschen wurden in den letzten 60 Jahren vererbte genetische Variationen in Pharmaka-verstoffwechselnden Enzymen ausgiebig untersucht (93). Häufig führen Polymorphismen zu einem Funktionsverlust, indem sie das Splicing oder die mRNA Expression beeinflussen und weniger die Transkription oder Proteinstruktur (181). Überraschenderweise gibt es nur wenige Polymorphismen, die einen klaren Einfluss auf die Substratspezifität oder Umsetzung des Substrates haben (93). Für die Spezies Maus sind solche Untersuchungen bisher nicht bekannt, da eine personalisierte Therapie lange Zeit nur auf die Humanmedizin beschränkt war. Bisher wurden die verschiedenen genetischen Varianten bzgl. der CYP Enzyme, die zwischen den unterschiedlichen Maus-Inzuchtstämmen auftreten nur in einer Datenbank dokumentiert, jedoch noch nicht mit einer klinischen Relevanz in Zusammenhang gebracht (118). In dieser Arbeit wurden zwölf SNP in der codierenden Sequenz unterschiedlicher CYP3A Isozyme verifiziert. Damit konnte der genetische Status der verwendeten Mäuse charakterisiert werden und ein genetischer Drift bezogen auf die in der Datenbank hinterlegten Sequenzen ausgeschlossen werden. Eine Verknüpfung mit einem relevanten Effekt konnte an dieser Stelle jedoch nicht hergestellt werden.

Da nicht sicher ist, ob das in der hier vorliegenden Arbeit im *ex vivo* Test verwendete Substrat durch vergleichbare Enzyme verstoffwechselt wird wie Buprenorphin in der Maus, ist die *in vivo* Testung eine erforderliche Überprüfung und Ergänzung der bisherigen Ergebnisse.

4.2.2 Metabolismus von Buprenorphin *in vivo*

Buprenorphin ist maßgeblich für den analgetischen Effekt verantwortlich (86), sodass dessen Metabolisierungsrate ein Grund für Stammesunterschiede in der analgetischen Wirkung darstellen kann. Alhaddad und Kollegen konnten für männliche Fvb und Swiss Mäuse eine signifikant unterschiedliche Metabolisierung von Buprenorphin zu Norbuprenorphin nachweisen (143). Jedoch untersuchten sie nicht gleichzeitig den analgetischen Effekt von Buprenorphin, sondern die durch Norbuprenorphin verursachte respiratorische Depression. Im pharmakologischen Kontext betrachtet, führt ein Funktionsverlust von stoffwechselrelevanten Enzymen zu einer verringerten *Clearance* und erhöhten Plasmakonzentration der jeweiligen Substanz, während eine gesteigerte Enzymfunktion mit einer erhöhten *Clearance* und geringen Plasmakonzentration einhergeht (93).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gemessene Serumkonzentration von Buprenorphin 30 Minuten nach Applikation in allen Proben über 0,5 ng/ml betrug, welches als effektive analgetische Serumkonzentration in der Humanmedizin angesehen wird (182). Zusätzlich wurde Buprenorphin extensiv in seine drei bekannten Metaboliten Norbuprenorphin, Buprenorphin-3-Glukuronid und Norbuprenorphin-3-Glukuronid umgesetzt. Die höchste Umsetzungsrate war hierbei von Buprenorphin zu Buprenorphin-3-Glukuronid, welches sich in einer vergleichbar hohen Serumkonzentration widerspiegelte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Daten aus der Literatur, die 100 bis 600 % höhere Buprenorphin-3-Glukuronid Konzentrationen im Vergleich zu Buprenorphin beschreiben und die Metabolisierung zu Norbuprenorphin als weniger bedeutende Umwandlung ansehen (86, 112, 113). Da in der hier vorliegenden Arbeit die Probenentnahme bereits 30 Minuten nach Applikation stattgefunden hat, kann eine spätere Verschiebung des Verhältnisses von Buprenorphin zu seinen Metaboliten nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl geringe Stammesunterschiede in der Serumkonzentration von Buprenorphin in der 4,0 mg/kg Dosisgruppe detektiert wurden, konnten weder Stammesunterschiede in der metabolischen Kapazität von Buprenorphin zu Norbuprenorphin noch von Buprenorphin zu Buprenorphin-3-Glukuronid festgestellt werden. Alle drei bekannten Metaboliten von Buprenorphin sind pharmakologisch aktiv, wobei nur Norbuprenorphin und Buprenorphin-3-Glukuronid analgetisch wirksam sind (86). Jedoch konnten auch hier keine stammesbedingten Unterschiede in der Serumkonzentration festgestellt werden.

Buprenorphin weist eine periphere und zentral Wirkung am Opioidrezeptor sowie eine langsame Dissoziation auf (78). Daher könnte die Verteilung von Buprenorphin und seinen Metaboliten sowie deren Gehirnkonzentrationen eine größere Relevanz als die Plasmakonzentrationen für den analgetischen Effekt von Buprenorphin haben. Die Verarbeitung des noxischen Stimulus und die Schmerzwahrnehmung bzw. Modulierung wird vor allem über das Opioidrezeptor System gesteuert, welches im ZNS lokalisiert ist (37). Dabei sind für die Prozessierung des Schmerzes vor allem höhere Cortex Strukturen notwendig (15). Aus diesem Grund sollte die Konzentration im Gehirn einen größeren Einfluss auf den analgetischen Effekt von Buprenorphin haben. Buprenorphin, welches vor allem für den analgetischen Effekt verantwortlich ist (86), wurde in weitaus höheren Konzentrationen im Gehirn der drei Inzuchtstämme detektiert, als die Metaboliten. Es wurden jedoch nur geringe Stammesunterschiede in der Gehirnkonzentration von Buprenorphin gemessen, die nicht im Zusammenhang mit einem erhöhten analgetischen Effekt im IHP Test stehen. Auch die Verteilung der Metaboliten von Buprenorphin zwischen Blut und Gehirn zeigte keine signifikanten Stammesunterschiede.

Darüber hinaus konnte beim Stamm 129S1/SvImJ kein dosisabhängiger Zusammenhang zwischen analgetischer Wirkung und applizierter Dosis nachgewiesen werden. Beobachtet wurde ein vergleichbarer analgetischer Effekt bei den beiden applizierten Dosen von Buprenorphin, obwohl die Gehirnkonzentration um das 8-fache zwischen der 0,42 und 4,0 Dosisgruppe variierte. Dieses Phänomen könnte auf eine gleichzeitige Aktivierung des MOR und ORL1 zurück zu führen sein und wurde bereits im Abschnitt 4.1.3 ausgeführt (45).

In dieser vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Gesamtkonzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten, nach Proteinpräzipitation, analysiert. Eine Aussage über die Verfügbarkeit der ungebundenen Form von Buprenorphin kann daher nicht getroffen werden. Buprenorphin weist eine hohe Plasmaproteinbindung von 95 – 98 % im Hund auf und bindet vor allem an α - und β -Globulin Fraktionen im Blut (99-101). Dieser Wert wird auch als Richtwert für den Menschen angenommen (183). Eine höhere Proteinplasmabindung kann unter Umständen zu einer geringeren Verteilung ins Gewebe führen und beeinträchtigt somit auch die Effektstärke des Pharmakons (29, 184). Bei lipophilen Pharmaka wie Buprenorphin ermöglicht die Proteinplasmabindung die Transportfähigkeit im Blut (99, 185). Darüber hinaus ist deren Anreicherung in Geweben, wie beispielsweise dem Gehirn im Vergleich zur Verteilung im Blutkreislauf begünstigt (102, 103). Dieses konnte in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da höhere Buprenorphinkonzentrationen im Gehirn als im Serum gemessen wurden. Durch eine erhöhte Plasmaproteinbindung wird gleichzeitig die Elimination des Pharmakons verzögert (29, 184). KuKanich und Kollegen stellten dar, dass die unterschiedliche Plasmaproteinbindung von Fentanyl (84 %) und Buprenorphin (95 - 98 %) ein Grund für die Unterschiede in deren pharmakokinetischen Parametern sein könnte (184). Daher scheint die Plasmaproteinbindung vorrangig interessant für die Untersuchung verschiedener Opiode zu sein und weniger für die Untersuchung von Stammesunterschieden bei einer Substanz.

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass für die hier untersuchten Stämme pharmakokinetische Parameter als mögliche Gründe für Stammesunterschiede im analgetischen Effekt von Buprenorphin, eine untergeordnete Rolle spielen. Daher werden im folgenden Abschnitt mögliche Gründe für Stammesunterschiede in der analgetischen Wirkung von Buprenorphin auf pharmakodynamischer Ebene diskutiert.

4.3 Pharmakodynamik von Buprenorphin

Unterschiede in der analgetischen Wirkung von Opioiden werden vielfältig auf pharmakodynamischer Ebene diskutiert. Mögliche Faktoren, die zum Teil auch schon mit stammesbedingten Unterschieden in der analgetischen Wirkung von Buprenorphin diskutiert wurden, sind die spinale und supraspinale Wirkung von Buprenorphin durch verschiedene Opioidrezeptoren, Phosphorylierungsmuster und Splicing Varianten des MOR und eine

durch das endogene Opioid System bedingte veränderte Ausschüttung von endogenen Neurotransmittern. Diese werden in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt.

4.3.1 Spinale und supraspinale Wirkung von Buprenorphin

Schmerzinhibierende Mechanismen schließen vor allem spinale (zum Rückenmark gehörend) und supraspinale (oberhalb des Rückenmarks) Reizweiterleitung mit ein (39, 157, 186-189). Die Applikation von Buprenorphin führt in MOR „knock-out“ Mäusen zu keinem analgetischen Effekt (45, 190, 191). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass die analgetische Wirkung von Buprenorphin primär über MOR vermittelt ist. Lutfy und Kollegen fanden heraus, dass die MOR vermittelte Analgesie von Buprenorphin maßgeblich durch gleichzeitige Aktivierung des ORL1 beeinflusst wurde. Die Blockierung des ORL1 führte zu einer Steigerung des analgetischen Effektes von Buprenorphin (45). Veränderte Eigenschaften des MOR und oder ORL1 könnten relevant für den stammesabhängigen analgetischen Effekt von Buprenorphin sein.

Ob Buprenorphin vorrangig spinal oder supraspinal analgetisch wirksam ist wird kontrovers diskutiert (188, 189, 192, 193). Jedoch wurden unterschiedliche Kombinationen an Opioidrezeptoren als Hauptakteure für die spinal und supraspinal vermittelte Analgesie identifiziert. Lange Zeit wurde geglaubt, dass MOR1 supraspinale Analgesie, wohingegen MOR2 spinale Analgesie induzieren soll (194-196). Jedoch zeigten Moskowitz und Goodman mit einer autoradiographischen Verteilungsstudie, dass sowohl MOR1 als auch MOR2 spinal und supraspinal exprimiert sind (197). Zusätzlich zeigten verschiedene Studien, dass die intrazerebralventrikuläre und intrathekale Applikation von Fentanyl und Morphin in MOR1-defizienten Mäusen keine analgetische Wirkung hervorruft (198).

Die spinale Analgesie soll laut Porreca und Kollegen vor allem DOR vermittelt sein (39). Dahingegen zeigten Gerhold und Kollegen, dass die spinale Analgesie vorrangig MOR1 vermittelt ist (188). Die supraspinale Analgesie ist laut verschiedene Forschungsgruppen MOR1 vermittelte und durch einen intensiven *cross-talk* mit DOR verknüpft (39, 157, 189, 199). Darüber hinaus zeigten Ballesta und Kollegen bei zwei Rattenstämmen, dass ein verstärkter *cross-talk* zwischen MOR und DOR mit einer erhöhten analgetischen Wirkung, induziert durch MOR Agonisten, assoziiert ist (189). Ding und Kollegen identifizierten eine zusätzliche supraspinale Komponente bei der Buprenorphin vermittelten Analgesie, die keine Sensitivität gegenüber dem Opioidrezeptor Antagonisten Naloxon, Pertussis Toxin und Nociceptin/Orphanin-FQ aufweist (200). Dahingegen führte spinal appliziertes Naloxon zu einem verringerten und JTC-801 (ORL1-Antagonist) zu einem erhöhten analgetischen Effekt von Buprenorphin (200).

4.3.2 Phosphorylierungsmuster und Splicing Varianten des MOR

Phosphorylierungsmuster und alternative Splicing Varianten des MOR werden bezogen auf die Sensitivität unterschiedlicher Opioide diskutiert.

Posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- und oder Tyrosin-Resten an intrazellulären Loops induzieren eine Arrestin 2/3 Rekrutierung, welches zur Internalisierung des Rezeptors führt (37, 55). In der Literatur sind bereits Liganden-abhängige Phosphorylierungsmuster identifiziert worden, die zu unterschiedlichen Effekten führen können. Beispielsweise zeigten Schulz und Kollegen, dass Morphin und DAMGO (synthetisches Opioidpeptid) einen unterschiedlichen Grad der Phosphorylierung am MOR induzieren. DAMGO desensibilisierte MOR werden sofort dephosphoryliert, wohingegen Morphin desensibilisierte MOR an der Plasmamembran verweilen und die Phosphorylierung einen persistenten Zustand aufweist (52). Jedoch wurde bisher nicht untersucht, ob es auch stammesbedingte Phosphorylierungsmuster gibt, die die Internalisierung beeinflussen und so zu relevanten Unterschieden im analgetischen Effekt von Opioiden, wie beispielsweise Buprenorphin führen können.

Alternative Splicing Varianten des MOR werden häufig im Zusammenhang mit dem Opioidrezeptor System diskutiert. Xu und Kollegen untersuchten die bekannten 29 Splicing Varianten des MOR in vier verschiedenen Mausstämmen und fanden im gesamten Gehirn keine Unterschiede. Jedoch identifizierten sie stammesbedingte Unterschiede in einigen Splicing Varianten in bestimmten Hirnregionen, die im Zusammenhang mit der Morphinsensitivität der Mausstämmen stehen sollen (144). Diese Vermutung wird durch verschiedene Studien unter Verwendung von unterschiedlichen MOR Splicing Varianten *knock-out* Mäusen unterstützt (191, 201).

4.3.3 Einfluss endogener Neurotransmitter

Veränderungen im endogenen Opioid System gehen sehr wahrscheinlich mit einer veränderten Ausschüttung endogenen Neurotransmitters wie beispielsweise Serotonin und Dopamin einher, die den analgetischen Effekt von Opioiden beeinflussen können.

Der Zusammenhang zwischen Serotonin und Schmerz ist sehr komplex (202). Zum einen zeigen unterschiedliche Arbeiten, dass die Ausschüttung von Serotonin auf spinaler und peripherer Ebene einen positiven Einfluss auf die induzierte Analgesie hat (203-205). Zum anderen kann Serotonin auch pro-nozizeptiv wirken (206, 207). Im Zusammenhang mit chronischen Schmerzen beschäftigen sich Wijnvoord und Kollegen mit dem inhibitorischen serotonergen System. Hierbei konnten sie zeigen, dass naive Balb/cCrI Mäuse im Vergleich zu C57BL/6J und 129/SvCrI einen höheren Anteil an Serotonin-immunreaktiven Fasern im dorsalen Horn des Rückenmarks sowie eine erhöhte Serotoninkonzentration aufwiesen. Zusätzlich weist der Stamm 129/SvCrI im Vergleich zum Stamm C57BL/6J eine erhöhte

Serotoninkonzentration im dorsalen Horn des Rückenmarks auf (128). Denkbar wäre, dass die vorhandene Konzentration an Serotonin die analgetische Wirksamkeit von Buprenorphin positiv oder auch negativ unterstützt. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Applikation von Opioiden das serotonerge System beeinflusst (208-210). Im Fall von Buprenorphin wird vermutet, dass die Applikation zu einer Erhöhung des intrasynaptischen Serotonin Levels führt (210). Jedoch bleibt ein Zusammenhang mit einer veränderten analgetischen Wirkung offen.

Eine weitere Möglichkeit für die stammesbedingten Unterschiede in der analgetischen Wirkung von Buprenorphin sind genetische Variationen, die den KOR und oder den Dopamin Transporter betreffen. Svingos und Kollegen zeigten in der Spezies Ratte, dass der KOR und der Dopamin Transporter in den neuronalen Endigungen des Nucleus accumbens koexistieren (211). Ergebnisse von Gerra und Kollegen stellten dar, dass Buprenorphin bei Opioid-abhängigen humanen Patienten effektiver war, wenn sie an Depressionen litten (212, 213). Dieses Ergebnis könnte auf der antagonistischen Wirkung von Buprenorphin auf den KOR beruhen. In einer weiterführenden Studie identifizierten sie mögliche Genvarianten im Dopamin Transporter, die mit Nicht-Respondern bzw. Respondern bzgl. Buprenorphin in Zusammenhang gebracht werden konnten (214). Bei Nicht-Respondern wurde eine erhöhte Frequenz des Dopamin Transporters Gen-Polymorphismus im Allel 10 gefunden und bei Respondern im Allel 6,7 und 11 (214). Entsprechende Untersuchungen in der Spezies Maus fehlen bisher.

4.4 Abgeleitete Empfehlungen

Diese Arbeit ist als erster Schritt zur Entwicklung Mausstamm-spezifischer Empfehlungen zu verstehen. Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass stammesbedingte Unterschiede bzgl. des Schmerzverhaltens, der basalen Nozizeption sowie der analgetischen Wirksamkeit von Buprenorphin existieren. Die wissenschaftliche Gemeinschaft sollte dafür sensibilisiert werden, dass verschiedene Mausstämme auch einer unterschiedlichen Behandlung mit Analgetika bedürfen und nicht generell als Spezies Maus anzusehen sind.

Zum einen lassen sich allgemeine Empfehlungen bzgl. der Erfassung von Schmerzen und der Etablierung eines optimierten Schmerzmanagements ableiten. Zum anderen konnten wichtige Erkenntnisse bzgl. der Verwendung von Buprenorphin gewonnen werden, die einen ersten Schritt zu einer stammesspezifischen Analgesie darstellen.

4.4.1 Bewertung von Schmerzen

Die Erfassung und Bewertung von Schmerzen stellt bis heute eines der größten Probleme in der Versuchstierkunde dar. Da Mäuse zu den Beutetieren zählen, vermeiden sie es in der Regel Schmerzen zu zeigen, aus Angst vor dem Prädator und zusätzlich, um den sozialen

Status aufrechtzuerhalten. Durch automatisierte Erfassungssysteme kann dieses Problem umgangen werden und Schmerzen meist noch präziser und eher identifiziert werden, um entsprechend die Medikation zu optimieren oder den Versuch ggf. abubrechen (158). Auch in der hier vorliegenden Arbeit war die manuelle Auswertung der automatisch erfassten Videoaufnahmen von großer Bedeutung. Hierdurch konnte sichergestellt werden, dass zuverlässig das erste Schmerzverhalten während der IHP Testung gewertet wurde. Nichtsdestotrotz bedarf es weiterer Forschung, um das „Normalverhalten“ von Mäusen vom schmerzhaften Verhalten klar abzugrenzen und skalierbar zu machen. Daher ist es notwendig, sich vor Beginn des Versuches adäquate Parameter zu definieren und diese ggf. während des Versuches anzupassen. Grundlegend das angewendete Schmerzmanagement nur so gut ist, wie die Fähigkeit, die Schmerzen auch richtig einzuschätzen und zu bewerten.

Die Notwendigkeit der Behandlung von Schmerzen bei Versuchstieren sollte unumstritten sein. Jedoch bleibt zu diskutieren, ob die Applikation der höchsten nicht toxischen Dosis eine ausreichende Refinement-Maßnahme darstellt. Dieses kann klar verneint werden. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Applikation hoher Dosen von Buprenorphin zu keiner gesteigerten analgetischen Wirkung führen kann und ein weiterer Abfall der analgetischen Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann. Daher sollte zusätzlich zur Etablierung eines neuen Mausstammes in einer Forschungseinrichtung, auch die stammesspezifische Analgesie etabliert werden. Hierbei können institutsinterne etablierte Dosierungen von anderen Mausstämmen als Richtwert herangezogen werden. Jedoch sollte die Wirksamkeit kritisch überprüft und für den entsprechenden Eingriff optimiert werden.

4.4.2 Verwendung von Buprenorphin

Die hier vorliegenden Ergebnisse können nur als Orientierungshilfe zur Dosierung von Buprenorphin herangezogen werden, da Dosierungen verwendet wurden, die um das 4- bis 40-fache über den üblicherweise verwendeten Dosierungen von Buprenorphin liegen. Des Weiteren ist es absolut notwendig, dass die Analgesie auf den entsprechenden Eingriff angepasst wird. Außerdem wurde nur ein Zeitpunkt während der Hellphase, nämlich 30 Minuten nach Applikation von Buprenorphin untersucht. Folgendes lässt sich jedoch trotzdem ableiten. Es ist zu vermuten, dass der Stamm Balb/cJ eine geringere Dosis von Buprenorphin benötigt als der C57BL/6J Stamm. Zusätzlich ist anzunehmen, dass der Stamm Balb/cJ ein breiteres Dosierungsspektrum besitzt. Dahingegen sollte die Dosierung mit Buprenorphin beim Stamm 129S1/SvImJ vorsichtig etabliert werden. Die Daten zeigen, dass eine hohe Dosis zu einem gleichbleibenden analgetischen Effekt führt, sodass das Wirkspektrum als deutlich kleiner anzunehmen ist, als beim Balb/cJ Stamm. Es ist sehr wahrscheinlich, dass weitere Mausstämme existieren, die ebenfalls einen glockenförmigen Verlauf der analgetischen Wirkung von Buprenorphin aufweisen. Zusätzlich lässt die Tatsache, dass selbst durch Verwendung eines vergleichsweise milden artifiziellen

thermischen Stimulus zu signifikanten Unterschieden in der analgetischen Wirkung von Buprenorphin führt vermuten, dass auch bei anderen noxischen Stimuli Stammesunterschiede auftreten, die auch weitere hier nicht untersuchte Stämme betreffen. Aus diesem Grund wird eine stammesspezifische Anwendung von Buprenorphin empfohlen.

Neben den zahlreichen positiven Eigenschaften, die Buprenorphin als anzuwendendes Analgetikum attraktiv machen, sind auch einige unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben. Eine der am häufigsten beschriebenen unerwünschten Nebenwirkungen ist die durch Buprenorphin und Norbuprenorphin ausgelöste Atemdepression (86, 143). Signifikante Erniedrigungen im Tidalvolumen wurden bei männlichen FvB Mäusen ab einer Konzentration von 30 mg/kg Buprenorphin über einen Zeitraum von 120 Minuten detektiert (143). Allerdings liegen diese Konzentrationen nicht im empfohlenen Dosisbereich von Buprenorphin (69-73, 75). Jedoch werden Analgetika in der Regel perioperativ, also vor, während und nach einem chirurgischen Eingriff, eingesetzt. Ein chirurgischer Eingriff bedarf einer Anästhesie, die zusätzlich zur Schwächung des Kreislaufes und Erniedrigung des Tidalvolumens führt. Das bedeutet, dass der vermeintlich unbedenklich Effekt von Buprenorphin auf das Tidalvolumen bei niedriger Dosis, in Kombination mit einer Anästhesie zu einer lebensbedrohlichen Situation führen kann (69). Zusätzlich kann je nach Zeitpunkt der Applikation die Tiefe der Anästhesie falsch eingeschätzt werden. Daher wird bei der Spezies Hund und Katze bei präoperativer Anwendung von Buprenorphin, eine Wartezeit von 30 Minuten empfohlen (215, 216).

Des Weiteren kann bereits die Applikation von geringen Dosen an Buprenorphin (z.B. 0,1 mg/kg) zu einer reduzierten Futteraufnahme und Gewichtsverlust führen (75). Je nach Gewichtsverlust kann und muss hierdurch der Versuch frühzeitig beendet werden. Vermutlich verursacht Buprenorphin, ähnlich wie beim Menschen, Übelkeit, die eine Ursache für die reduzierte Futteraufnahme sein kann (84). Bei der Spezies Ratte wurde häufig das sogenannte Pica Verhalten beobachtet (88, 89). Da Nagetiere nicht die Fähigkeit besitzen sich zu übergeben, wird ein unkontrolliertes Fressverhalten von Nest- und Einstraumaterial ausgelöst, um wahrscheinlich die Übelkeit zu minimieren (217). Dieses unkontrollierte Fressverhalten führt in der Regel zum Darmverschluss der betroffenen Tiere und unumgänglich zum Tod. Die Konsequenz hieraus ist, dass die Tiere eine Zeit lang ohne Nist- oder Einstreumaterial gehalten werden müssen. Im Gegensatz zur Spezies Ratte ist für die Maus dieses Phänomen bisher nicht ausreichend untersucht worden (4, 88, 89).

Um mögliche Nebenwirkungen zu umgehen, könnte die Applikation von sehr niedrigen Dosen eine Lösung sein, die jedoch engere Applikationsintervalle mit sich führen würde, um einen konstanten analgetisch wirksamen Plasmaspiegel zu gewährleisten. Obwohl Buprenorphin eine geschätzte Halbwertszeit von ca. drei Stunden bei der Maus aufweist, gibt

es dennoch eine längere Wirkdauer von bis zu zwölf Stunden in Abhängigkeit von der Dosis auf Grund der hohen Rezeptoraffinität (74, 77, 78). Daher wäre darauf zu achten, die Applikationsintervalle nicht zu kurz zu wählen, um eine ungewollte hohe Akkumulation von Buprenorphin auf den vorhandenen Plasmaspiegel zu vermeiden, der unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen könnte. Generell bedarf jede Applikation eines Analgetikums einer Fixierung des Tieres, die mit erheblichem Stress verbunden ist (218-220). Stress kann sich ähnlich wie Schmerzen negativ auf den Heilungsprozess auswirken und womöglich die Ergebnisse des Experimentes beeinflussen (5, 6). Zusätzlich zeigten Gerhold und Kollegen, dass die Applikation einer subanalgetischen Dosis von Buprenorphin zu einem pro-nozizeptiven Effekt führen kann, der sich in einer thermischen und mechanischen Hyperalgesie widerspiegelte (188). Um tägliche Mehrfachdosierungen zu umgehen, gibt es eine in den USA zugelassene Formulierung von Buprenorphin mit Depot Wirkung. Untersuchungen verschiedener Forschungsgruppen zeigen dabei vielversprechende Ergebnisse auf, mit einer Langzeitwirkung von mindestens 12 bis 24 Stunden (74, 75). Dieses Präparat ist jedoch bisher nicht in der Europäischen Union zugelassen.

Als Fazit lässt sich festhalten, dass die Etablierung stammesspezifischer Dosierungen einer gerechtfertigten Notwendigkeit unterliegt. Nur hierdurch wird ermöglicht, Schmerzen und Leiden der Versuchstiere auf das unerlässliche Maß zu reduzieren.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammengefasst ist nicht nur die basale Nozizeption sondern auch der analgetische Effekt von Buprenorphin unter Verwendung des IHP Test stammesabhängig:

1. Balb/cJ weist die höchste Sensitivität gegenüber Buprenorphin auf, sowie ein breites Dosierungsspektrum.
2. 129S1/SvImJ zeigt die geringste Sensitivität gegenüber Buprenorphin und eine fehlende Steigerung des analgetischen Effektes, bei höherer Dosis.
3. C57BL/6J weist eine moderate Sensitivität gegenüber Buprenorphin, mit moderatem Dosierungsspektrum auf.

Der stammesabhängige analgetische Effekt von Buprenorphin konnte weder durch die Aktivität der stoffwechselrelevanten Enzyme *in vitro*, noch durch die Analyse der Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten *in vivo* erklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der stammesabhängige analgetische Effekt von Buprenorphin bei einem festen Zeitpunkt nicht vorrangig auf pharmakokinetischen Unterschieden basiert. Zusätzliche Untersuchungen sind notwendig, um weitere Einflussfaktoren wie pharmakodynamische Parameter zu untersuchen (**Abbildung 5.1**):

1. Ist der stammesbedingte analgetische Effekt von Buprenorphin auf ein verändertes Phosphorylierungsmuster des MOR zurück zu führen?
2. Ist der stammesbedingte analgetische Effekt von Buprenorphin auf eine veränderte Ausschüttung von Serotonin und endogenen Opioidpeptiden zurück zu führen?

Abbildung 5.1: Übersicht der neu formulierten Hypothesen

Veränderungen im Phosphorylierungsmuster der μ -Rezeptoren oder der Serotoninausschüttung könnten Gründe für den nachgewiesenen stammesbedingten Unterschiede der analgetischen Wirkung von Buprenorphin sein.

Ein optimales Schmerzmanagement ist nicht nur aus ethischen und rechtlichen Gründen gefordert, sondern trägt gleichzeitig zu einer verbesserten Qualität von wissenschaftlichen Daten bei. Bisher ist nicht abzuschätzen, wann der komplette Ersatz durch alternative Methoden und somit der vollständige Verzicht auf Tierversuche realisiert werden kann. Bis zu diesem Zeitpunkt sollten unerlässliche Tierversuche so optimiert werden, dass Schmerzen, Leiden und Schäden auf ein Minimum reduziert werden, um aktiv zum Tierschutz in der Versuchstierkunde beizutragen. Die Erkenntnis, dass auch beim häufig verwendeten Opioid Buprenorphin stammesabhängige analgetische Effekte bei der Spezies Maus auftreten sollte genutzt werden, um eine stammesspezifische Analgesie zu entwickeln. Um dies zu realisieren, sollten in Publikationen folgende Parameter konsequent veröffentlicht werden: Stamm, Geschlecht, Alter, Art und Zeitpunkt des Eingriffes, Analgetikum, Dosis, Applikationsart und -intervall sowie Evaluationsmodell zur Überprüfung der Analgesie. Zusätzlich ist die Betrachtung beider Geschlechter anzustreben, da sowohl in der Humanmedizin, als auch bei Maus und Ratte geschlechtsbedingte Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung existieren (221-223).

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einer Sensibilisierung der wissenschaftlichen Gemeinschaft zu einer stammesspezifischen Schmerzmedikation bei. Darüber hinaus stellen sie eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen dar, um stammesspezifische Empfehlungen für definierte Eingriffe zu etablieren.

Literaturverzeichnis

1. *Richtlinie 2010/63/EU Des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere* (2010).
2. W. M. S. Russel, R. L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*. (Methuen, London, 1959).
3. IASP, *Classification of Chronic Pain*. H. Merskey, N. Bogduk, Eds., (Seattle, ed. 2, 1994).
4. P. Jirkof, Side effects of pain and analgesia in animal experimentation. *Lab animal* **46**, 123-128 (2017).
5. M. Arras, A. Rettich, P. Cinelli, H. P. Kasermann, K. Burki, Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC veterinary research* **3**, 16 (2007).
6. C. Schwarz *et al.*, Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue engineering. Part A* **19**, 247-254 (2013).
7. G. G. Page, S. Ben-Eliyahu, R. Yirmiya, J. C. Liebeskind, Morphine attenuates surgery-induced enhancement of metastatic colonization in rats. *Pain* **54**, 21-28 (1993).
8. G. G. Page, W. P. Blakely, S. Ben-Eliyahu, Evidence that postoperative pain is a mediator of the tumor-promoting effects of surgery in rats. *Pain* **90**, 191-199 (2001).
9. G. G. Page, Immunologic effects of opioids in the presence or absence of pain. *Journal of pain and symptom management* **29**, S25-31 (2005).
10. J. Lofgren *et al.*, Analgesics promote welfare and sustain tumour growth in orthotopic 4T1 and B16 mouse cancer models. *Laboratory animals*, 23677217739934 (2017).
11. E. L. Stokes, P. A. Flecknell, C. A. Richardson, Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Laboratory animals* **43**, 149-154 (2009).
12. L. Carbone, J. Austin, Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PloS one* **11**, e0155001 (2016).
13. EU Commission. (2013).
14. BMEL, Versuchstierdaten 2016. (2017).
15. National Research Council (US), Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, *Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*. (National Academies Press (US), Washington (DC), 2009).
16. W. D. Willis, K. N. Westlund, Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society* **14**, 2-31 (1997).
17. M. S. Gold, G. F. Gebhart, Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* **16**, 1248-1257 (2010).
18. A. I. Basbaum, D. M. Bautista, G. Scherrer, D. Julius, Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* **139**, 267-284 (2009).
19. D. Julius, A. I. Basbaum, Molecular mechanisms of nociception. *Nature* **413**, 203-210 (2001).
20. D. Julius, TRP channels and pain. *Annual review of cell and developmental biology* **29**, 355-384 (2013).
21. D. Le Bars, A. Dickenson, J. Besson, Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. *Pain* **6**, 283-304 (1979).
22. D. Le Bars, A. Dickenson, J. Besson, Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). II. Lack of effect on non-convergent neurons, supraspinal involvement and theoretical implications *Pain* **6**, 305-327 (1979).
23. Y. Feng *et al.*, Current Research on Opioid Receptor Function. *Current drug targets* **13**, 230-246 (2012).
24. B. N. Dhawan *et al.*, International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological reviews* **48**, 567-592 (1996).

25. E. E. Benarroch, Endogenous opioid systems: current concepts and clinical correlations. *Neurology* **79**, 807-814 (2012).
26. A. Mansour, C. A. Fox, H. Akil, S. J. Watson, Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in neurosciences* **18**, 22-29 (1995).
27. Y. Xia, G. G. Haddad, Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem. *Brain research* **549**, 181-193 (1991).
28. G. Wittert, P. Hope, D. Pyle, Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 877-881 (1996).
29. K. H. Greafe, W. Lutz, H. Bönisch, *Pharmakologie und Toxikologie*. (Georg Thieme Verlag KG, Würzburg, 2011).
30. G. W. Pasternak, Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life sciences* **68**, 2213-2219 (2001).
31. G. S. Ling, K. Spiegel, S. H. Lockhart, G. W. Pasternak, Separation of opioid analgesia from respiratory depression: evidence for different receptor mechanisms. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **232**, 149-155 (1985).
32. R. M. Eisenberg, TRIMU-5, a mu 2-opioid receptor agonist, stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **47**, 943-946 (1994).
33. P. Cadet, K. J. Mantione, G. B. Stefano, Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 5118-5123 (2003).
34. U. Arvidsson *et al.*, Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 3328-3341 (1995).
35. M. Sobczak, M. Sałaga, M. A. Storr, J. Fichna, Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *Journal of Gastroenterology* **49**, 24-45 (2014).
36. H. Pathan, J. Williams, Basic opioid pharmacology: an update. *British journal of pain* **6**, 11-16 (2012).
37. R. Al-Hasani, M. R. Bruchas, Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* **115**, 1363-1381 (2011).
38. P. E. Lutz, B. L. Kieffer, Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in neurosciences* **36**, 195-206 (2013).
39. F. Porreca, H. I. Mosberg, R. Hurst, V. J. Hruby, T. F. Burks, Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **230**, 341-348 (1984).
40. A. Baamonde *et al.*, Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D1 receptor stimulation. *European journal of pharmacology* **216**, 157-166 (1992).
41. G. G. Haddad, J. I. Schaeffer, K. J. Chang, Opposite effects of the delta- and mu-opioid receptor agonists on ventilation in conscious adult dogs. *Brain research* **323**, 73-82 (1984).
42. J. C. Hunter *et al.*, CI-977, a novel and selective agonist for the kappa-opioid receptor. *British journal of pharmacology* **101**, 183-189 (1990).
43. C. Gaveriaux-Ruff, B. L. Kieffer, Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* **36**, 62-71 (2002).
44. L. Toll, M. R. Bruchas, G. Calo, B. M. Cox, N. T. Zaveri, Nociceptin/Orphanin FQ Receptor Structure, Signaling, Ligands, Functions, and Interactions with Opioid Systems. *Pharmacological reviews* **68**, 419-457 (2016).
45. K. Lutfy *et al.*, Buprenorphine-induced antinociception is mediated by mu-opioid receptors and compromised by concomitant activation of opioid receptor-like receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 10331-10337 (2003).

46. K. Ahlbeck, Opioids: a two-faced Janus. *Current medical research and opinion* **27**, 439-448 (2011).
47. E. Freye, *Opioide in der Medizin*. (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010), vol. 8.
48. K. Wickman, D. E. Clapham, Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* **75**, 865-885 (1995).
49. G. W. Zamponi, T. P. Snutch, Modulating modulation: crosstalk between regulatory pathways of presynaptic calcium channels. *Molecular interventions* **2**, 476-478 (2002).
50. R. Sadja, N. Alagem, E. Reuveny, Gating of GIRK channels: details of an intricate, membrane-delimited signaling complex. *Neuron* **39**, 9-12 (2003).
51. C. P. Bailey, M. Connor, Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Current opinion in pharmacology* **5**, 60-68 (2005).
52. S. Schulz *et al.*, Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *The EMBO journal* **23**, 3282-3289 (2004).
53. E. J. Melief *et al.*, Duration of action of a broad range of selective kappa-opioid receptor antagonists is positively correlated with c-Jun N-terminal kinase-1 activation. *Molecular pharmacology* **80**, 920-929 (2011).
54. A. A. Pradhan *et al.*, Ligand-directed trafficking of the delta-opioid receptor in vivo: two paths toward analgesic tolerance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 16459-16468 (2010).
55. C. Chavkin, J. P. McLaughlin, J. P. Cerver, Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization. *Molecular pharmacology* **60**, 20-25 (2001).
56. S. Spampinato, M. Baiula, M. Calienni, Agonist-regulated internalization and desensitization of the human nociceptin receptor expressed in CHO cells. *Current drug targets* **8**, 137-146 (2007).
57. Y. X. Pan, E. Bolan, G. W. Pasternak, Dimerization of morphine and orphanin FQ/nociceptin receptors: generation of a novel opioid receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun* **297**, 659-663 (2002).
58. I. Gomes *et al.*, Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, Rc110 (2000).
59. D. Le Bars, M. Gozariu, S. W. Cadden, Animal models of nociception. *Pharmacological reviews* **53**, 597-652 (2001).
60. M. Barrot, Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* **211**, 39-50 (2012).
61. N. S. Gregory *et al.*, An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* **14**, 1255-1269 (2013).
62. S. Hunskaar, O. G. Berge, K. Hole, A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behavioural brain research* **21**, 101-108 (1986).
63. S. Alshahrani, F. Fernandez-Conti, A. Araujo, M. DiFulvio, Rapid determination of the thermal nociceptive threshold in diabetic rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e3785 (2012).
64. R. L. Collins, G. Whitney, Genotype and test experience determine responsiveness to morphine. *Psychopharmacology* **56**, 57-60 (1978).
65. G. D. Gamble, R. J. Milne, Repeated exposure to sham testing procedures reduces reflex withdrawal and hot-plate latencies: attenuation of tonic descending inhibition? *Neuroscience letters* **96**, 312-317 (1989).
66. M. A. Plone, D. F. Emerich, M. D. Lindner, Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain* **66**, 265-270 (1996).
67. A. E. Dubin, A. Patapoutian, Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation* **120**, 3760-3772 (2010).
68. K. Y. Kwan *et al.*, TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277-289 (2006).

-
69. Committee on Anaesthesia of GV-SOLAS, Expert Information: Pain management for laboratory animals. *GV-SOLAS*, 1-69 (2015).
70. C. A. Richardson, P. A. Flecknell, Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **33**, 119-127 (2005).
71. C. T. Hawk, S. L. Leary, T. H. Morris, *Formulary for Lab Animals*. (Blackwell Publishing, ed. Third Edition, 2005, pp 19).
72. N. M. Gades, P. J. Danneman, S. K. Wixson, E. A. Tolley, The magnitude and duration of the analgesic effect of morphine, butorphanol, and buprenorphine in rats and mice. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* **39**, 8-13 (2000).
73. L. C. Matsumiya *et al.*, Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **51**, 42-49 (2012).
74. E. T. Carbone, K. E. Lindstrom, S. Diep, L. Carbone, Duration of action of sustained-release buprenorphine in 2 strains of mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **51**, 815-819 (2012).
75. P. Jirkof, A. Tourvieille, P. Cinelli, M. Arras, Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. *Laboratory animals* **49(3)**, 177-187 (2015).
76. T. Christoph *et al.*, Broad analgesic profile of buprenorphine in rodent models of acute and chronic pain. *European journal of pharmacology* **507**, 87-98 (2005).
77. S. Yu *et al.*, Pharmacokinetics of buprenorphine after intravenous administration in the mouse. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **45**, 12-16 (2006).
78. K. Lutfy, A. Cowan, Buprenorphine: a unique drug with complex pharmacology. *Current neuropharmacology* **2**, 395-402 (2004).
79. T. M. Tzschentke, Behavioral pharmacology of buprenorphine, with a focus on preclinical models of reward and addiction. *Psychopharmacology* **161**, 1-16 (2002).
80. A. Cowan, J. W. Lewis, I. R. Macfarlane, Agonist and antagonist properties of buprenorphine, a new antinociceptive agent. *British journal of pharmacology* **60**, 537-545 (1977).
81. S. L. Walsh, K. L. Preston, M. L. Stitzer, E. J. Cone, G. E. Bigelow, Clinical pharmacology of buprenorphine: ceiling effects at high doses. *Clinical pharmacology and therapeutics* **55**, 569-580 (1994).
82. A. Dahan *et al.*, Buprenorphine induces ceiling in respiratory depression but not in analgesia. *British journal of anaesthesia* **96**, 627-632 (2006).
83. A. Cowan, J. C. Doxey, E. J. Harry, The animal pharmacology of buprenorphine, an oripavine analgesic agent. *British journal of pharmacology* **60**, 547-554 (1977).
84. S. L. Walsh, T. Eissenberg, The clinical pharmacology of buprenorphine: extrapolating from the laboratory to the clinic. *Drug and alcohol dependence* **70**, S13-27 (2003).
85. H. Alhaddad *et al.*, Respiratory toxicity of buprenorphine results from the blockage of P-glycoprotein-mediated efflux of norbuprenorphine at the blood-brain barrier in mice. *Critical care medicine* **40**, 3215-3223 (2012).
86. S. M. Brown, M. Holtzman, T. Kim, E. D. Kharasch, Buprenorphine metabolites, buprenorphine-3-glucuronide and norbuprenorphine-3-glucuronide, are biologically active. *Anesthesiology* **115**, 1251-1260 (2011).
87. P. Jirkof, A. Tourvieille, P. Cinelli, M. Arras, Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. *Laboratory animals* **49**, 177-187 (2015).
88. J. A. Clark, Jr., P. H. Myers, M. F. Goelz, J. E. Thigpen, D. B. Forsythe, Pica behavior associated with buprenorphine administration in the rat. *Laboratory animal science* **47**, 300-303 (1997).
89. R. Sarabia-Estrada, A. Cowan, B. M. Tyler, M. Guarnieri, Association of nausea with buprenorphine analgesia for rats. *Lab animal* **46**, 242-244 (2017).

90. H. C. Jackson, I. J. Griffin, D. J. Nutt, Buprenorphine-cocaine interactions in mice: effect on locomotor activity and hole-dipping behaviour. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **45**, 636-640 (1993).
91. F. P. Guengerich, Rate-limiting steps in cytochrome P450 catalysis. *Biol Chem* **383**, 1553-1564 (2002).
92. D. R. Nelson *et al.*, Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14**, 1-18 (2004).
93. U. M. Zanger, M. Schwab, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* **138**, 103-141 (2013).
94. E. G. Hrycay, S. M. Bandiera, Expression, function and regulation of mouse cytochrome P450 enzymes: comparison with human P450 enzymes. *Current drug metabolism* **10**, 1151-1183 (2009).
95. Y. K. Zhang, R. L. Yeager, C. D. Klaassen, Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **37**, 106-115 (2009).
96. D. Brewster, M. J. Humphrey, M. A. McLeavy, The systemic bioavailability of buprenorphine by various routes of administration. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **33**, 500-506 (1981).
97. A. Elkader, B. Sproule, Buprenorphine: clinical pharmacokinetics in the treatment of opioid dependence. *Clinical pharmacokinetics* **44**, 661-680 (2005).
98. S. E. Robinson, Buprenorphine: an analgesic with an expanding role in the treatment of opioid addiction. *CNS drug reviews* **8**, 377-390 (2002).
99. E. R. Garrett, V. R. Chandran, Pharmacokinetics of morphine and its surrogates VI: Bioanalysis, solvolysis kinetics, solubility, pK'a values, and protein binding of buprenorphine. *Journal of pharmaceutical sciences* **74**, 515-524 (1985).
100. E. R. Garrett, V. R. Chandran, Pharmacokinetics of morphine and its surrogates. X: Analyses and pharmacokinetics of buprenorphine in dogs. *Biopharmaceutics & drug disposition* **11**, 311-350 (1990).
101. R. C. Heel, R. N. Brogden, T. M. Speight, G. S. Avery, Buprenorphine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy. *Drugs* **17**, 81-110 (1979).
102. R. B. Pontani, N. L. Vadlamani, A. L. Misra, Disposition in the rat of buprenorphine administered parenterally and as a subcutaneous implant. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **15**, 287-297 (1985).
103. H. E. Hassan, A. L. Myers, A. Coop, N. D. Eddington, Differential involvement of P-glycoprotein (ABCB1) in permeability, tissue distribution, and antinociceptive activity of methadone, buprenorphine, and diprenorphine: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of pharmaceutical sciences* **98**, 4928-4940 (2009).
104. N. Picard, T. Cresteil, N. Djebli, P. Marquet, In vitro metabolism study of buprenorphine: evidence for new metabolic pathways. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **33**, 689-695 (2005).
105. K. Kobayashi *et al.*, Human buprenorphine N-dealkylation is catalyzed by cytochrome P450 3A4. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **26**, 818-821 (1998).
106. P. Huang, G. B. Kehner, A. Cowan, L. Y. Liu-Chen, Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **297**, 688-695 (2001).
107. S. M. Brown *et al.*, P-glycoprotein is a major determinant of norbuprenorphine brain exposure and antinociception. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **343**, 53-61 (2012).
108. N. Tournier *et al.*, Interaction of drugs of abuse and maintenance treatments with human P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). *The international journal of neuropsychopharmacology* **13**, 905-915 (2010).

109. H. L. Liston, J. S. Markowitz, C. L. DeVane, Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology. *Journal of clinical psychopharmacology* **21**, 500-515 (2001).
110. R. D. Bruce, E. McCance-Katz, E. D. Kharasch, D. E. Moody, G. D. Morse, Pharmacokinetic interactions between buprenorphine and antiretroviral medications. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **43 Suppl 4**, S216-223 (2006).
111. K. Rouguieg, N. Picard, F. L. Sauvage, J. M. Gaulier, P. Marquet, Contribution of the different UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms to buprenorphine and norbuprenorphine metabolism and relationship with the main UGT polymorphisms in a bank of human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **38**, 40-45 (2010).
112. D. E. Moody *et al.*, A liquid chromatographic-electrospray ionization-tandem mass spectrometric method for determination of buprenorphine, its metabolite, norbuprenorphine, and a coformulant, naloxone, that is suitable for in vivo and in vitro metabolism studies. *Analytical biochemistry* **306**, 31-39 (2002).
113. E. F. McCance-Katz *et al.*, Interaction between buprenorphine and atazanavir or atazanavir/ritonavir. *Drug and alcohol dependence* **91**, 269-278 (2007).
114. Y. Blom, U. Bondesson, E. Anggard, Analysis of buprenorphine and its N-dealkylated metabolite in plasma and urine by selected-ion monitoring. *Journal of chromatography* **338**, 89-98 (1985).
115. E. J. Cone, C. W. Gorodetzky, D. Yousefnejad, W. F. Buchwald, R. E. Johnson, The metabolism and excretion of buprenorphine in humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **12**, 577-581 (1984).
116. J. Weiss, C. Becker, E. Bernsmann, H. Dietrich, K. Nebendahl, *Tierpflege in Forschung und Klinik*. (Enke Verlag, Stuttgart, 2009), vol. 3. Auflage.
117. GV-SOLAS Ausschuss für Genetik und Labortierzucht, Substämme von Inzuchtstämmen. (2013).
118. D. J. Adams, A. G. Doran, J. Lilue, T. M. Keane, The Mouse Genomes Project: a repository of inbred laboratory mouse strain genomes. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **26**, 403-412 (2015).
119. M. Johnson, Laboratory Mice and Rats. *Materials and Methods* **2**, (2012).
120. The Jackson Laboratory, C57BL/6J Mouse Strain Datasheet - 000664. (2017).
121. The Jackson Laboratory, Balb/cJ Mouse Strain Datasheet - 000651. (2017).
122. The Jackson Laboratory, 129S1/SvImJ Mouse Strain Datasheet - 002448. (2017).
123. K. Bon, C. A. Lichtensteiger, S. G. Wilson, J. Mogil, Characterization of cyclophosphamide cystitis, a model of visceral and referred pain, in the mouse: species and strain differences. *The Journal of urology* **170**, 1008-1012 (2003).
124. J. S. Mogil *et al.*, Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* **80**, 67-82 (1999).
125. S. Leo, R. Straetmans, R. D'Hooge, T. Meert, Differences in nociceptive behavioral performance between C57BL/6J, 129S6/SvEv, B6 129 F1 and NMRI mice. *Behavioural brain research* **190**, 233-242 (2008).
126. J. S. Mogil, S. M. Adhikari, Hot and cold nociception are genetically correlated. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, RC25 (1999).
127. E. Nesher, V. Peskov, A. Rylova, O. Raz, A. Pinhasov, Comparative analysis of the behavioral and biomolecular parameters of four mouse strains. *Journal of molecular neuroscience : MN* **46**, 276-284 (2012).
128. N. Wijnvoord *et al.*, Inter-strain differences of serotonergic inhibitory pain control in inbred mice. *Molecular pain* **6**, 70 (2010).
129. S. L. Wright-Williams, J. P. Courade, C. A. Richardson, J. V. Roughan, P. A. Flecknell, Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* **130**, 108-118 (2007).
130. W. R. Lariviere *et al.*, Heritability of nociception. III. Genetic relationships among commonly used assays of nociception and hypersensitivity. *Pain* **97**, 75-86 (2002).

131. J. S. Mogil *et al.*, Heritability of nociception II. 'Types' of nociception revealed by genetic correlation analysis. *Pain* **80**, 83-93 (1999).
132. C. D. Bryant *et al.*, Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *Journal of neurogenetics* **22**, 315-331 (2008).
133. A. Oliverio, C. Castellano, B. E. Eleftheriou, Morphine sensitivity and tolerance: a genetic investigation in the mouse. *Psychopharmacologia* **42**, 219-224 (1975).
134. Y. Varnado-Rhodes, J. Gunther, G. W. Terman, C. Chavkin, Mu opioid analgesia and analgesic tolerance in two mouse strains: C57BL/6 and 129/SvJ. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* **43**, 15-17 (2000).
135. J. S. Mogil, B. Kest, B. Sadowski, J. K. Belknap, Differential genetic mediation of sensitivity to morphine in genetic models of opiate antinociception: influence of nociceptive assay. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **276**, 532-544 (1996).
136. I. Symeon *et al.*, Evaluation of the effects of tramadol on analgesic response and locomotor activity on two different strains of laboratory mice. *J HELLENIC VET MED SOC* **68(1)**, 089-096 (2017).
137. H. Avsaroglu, A. S. van der Sar, H. A. van Lith, L. F. van Zutphen, L. J. Hellebrekers, Differences in response to anaesthetics and analgesics between inbred rat strains. *Laboratory animals* **41**, 337-344 (2007).
138. D. Morgan, C. D. Cook, M. J. Picker, Sensitivity to the discriminative stimulus and antinociceptive effects of mu opioids: role of strain of rat, stimulus intensity, and intrinsic efficacy at the mu opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **289**, 965-975 (1999).
139. J. M. Turner, L. M. Lomas, E. S. Smith, A. C. Barrett, M. J. Picker, Pharmacogenetic analysis of sex differences in opioid antinociception in rats. *Pain* **106**, 381-391 (2003).
140. S. Wright-Williams, P. A. Flecknell, J. V. Roughan, Comparative effects of vasectomy surgery and buprenorphine treatment on faecal corticosterone concentrations and behaviour assessed by manual and automated analysis methods in C57 and C3H mice. *PloS one* **8**, e75948 (2013).
141. S. Lofgren, A. L. Hagbjork, S. Ekman, R. Fransson-Steen, Y. Terelius, Metabolism of human cytochrome P450 marker substrates in mouse: a strain and gender comparison. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **34**, 811-834 (2004).
142. Y. Guo *et al.*, In silico and in vitro pharmacogenetic analysis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17735-17740 (2007).
143. H. Alhaddad *et al.*, Gender and strain contributions to the variability of buprenorphine-related respiratory toxicity in mice. *Toxicology* **305**, 99-108 (2013).
144. J. Xu *et al.*, Differential expressions of the alternatively spliced variant mRNAs of the micro opioid receptor gene, OPRM1, in brain regions of four inbred mouse strains. *PloS one* **9**, e111267 (2014).
145. J. A. Beck *et al.*, Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics* **24**, 23-25 (2000).
146. H. C. Kwak, H. C. Kim, S. J. Oh, S. K. Kim, Effects of age increase on hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male C57BL/6 mice. *Archives of pharmacal research*, (2014).
147. T. Sakuma *et al.*, Regulation of the expression of two female-predominant CYP3A mRNAs (CYP3A41 and CYP3A44) in mouse liver by sex and growth hormones. *Arch Biochem Biophys* **404**, 234-242 (2002).
148. H. J. Renaud, J. Y. Cui, M. Khan, C. D. Klaassen, Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol Sci* **124**, 261-277 (2011).
149. J. S. Mogil, Perspective: Equality need not be painful. *Nature* **535**, S7 (2016).
150. P. Marquez, R. Baliram, B. L. Kieffer, K. Lufy, The mu opioid receptor is involved in buprenorphine-induced locomotor stimulation and conditioned place preference. *Neuropharmacology* **52**, 1336-1341 (2007).

151. U. K. Ozdogan, J. Lahdesmaki, M. Scheinin, The analgesic efficacy of partial opioid agonists is increased in mice with targeted inactivation of the $\alpha 2A$ -adrenoceptor gene. *European journal of pharmacology* **529**, 105-113 (2006).
152. J. Y. Chung *et al.*, Cellular defense mechanisms against benzo[a]pyrene in testicular Leydig cells: implications of p53, aryl-hydrocarbon receptor, and cytochrome P450 1A1 status. *Endocrinology* **148**, 6134-6144 (2007).
153. U. Emmenegger *et al.*, Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of chronic low-dose metronomic cyclophosphamide therapy in mice. *Molecular cancer therapeutics* **6**, 2280-2289 (2007).
154. C. Lee, X. Ding, D. S. Riddick, Downregulation of mouse hepatic CYP3A protein by 3-methylcholanthrene does not require cytochrome P450-dependent metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 1782-1786 (2013).
155. D. C. Yeomans, V. Pirec, H. K. Proudfit, Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence. *Pain* **68**, 133-140 (1996).
156. D. C. Yeomans, H. K. Proudfit, Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain* **68**, 141-150 (1996).
157. G. S. Ling, G. W. Pasternak, Spinal and supraspinal opioid analgesia in the mouse: the role of subpopulations of opioid binding sites. *Brain research* **271**, 152-156 (1983).
158. S. Kawasaki-Yatsugi *et al.*, Automated measurement of spontaneous pain-associated limb movement and drug efficacy evaluation in a rat model of neuropathic pain. *European journal of pain (London, England)* **16**, 1426-1436 (2012).
159. T. W. Adamson *et al.*, Assessment of carprofen and buprenorphine on recovery of mice after surgical removal of the mammary fat pad. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **49**, 610-616 (2010).
160. D. J. Langford *et al.*, Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* **7**, 447-449 (2010).
161. P. Jirkof *et al.*, Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Laboratory animals* **47**, 153-161 (2013).
162. J. K. Belknap, M. Lame, P. W. Danielson, Inbred strain differences in morphine-induced analgesia with the hot plate assay: a reassessment. *Behavior genetics* **20**, 333-338 (1990).
163. A. W. Bannon, A. B. Malmberg, Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N. Crawley ... [et al.]* **Chapter 8**, Unit 8 9 (2007).
164. K. M. Faller, D. J. McAndrew, J. E. Schneider, C. A. Lygate, Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. *Experimental physiology* **100**, 164-172 (2015).
165. L. Jia, X. Liu, The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments. *Current drug metabolism* **8**, 822-829 (2007).
166. D. Zhang, G. Luo, X. Ding, C. Lu, Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2**, 549-561 (2012).
167. S. Muruganandan, C. J. Sinal, Mice as clinically relevant models for the study of cytochrome P450-dependent metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **83**, 818-828 (2008).
168. P. Godoy *et al.*, Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of toxicology* **87**, 1315-1530 (2013).
169. OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals, Toxicokinetics No. 417. (2010).
170. T. Uehara *et al.*, Heterogeneous Liver Lobe Responses of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Male Rats Pretreated with Hepatic Enzyme-Inducing Agents. *J Toxicol Pathol* **17**, 223-230 (2004).

171. M. Martignoni, G. M. Groothuis, R. de Kanter, Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2**, 875-894 (2006).
172. L. Gong, C. M. Zhang, J. F. Lv, H. H. Zhou, L. Fan, Polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase and its effect on drug metabolism and efficacy. *Pharmacogenetics and genomics* **27**, 337-346 (2017).
173. H. F. Zhang *et al.*, Correlation of Cytochrome P450 Oxidoreductase Expression with the Expression of 10 Isoforms of Cytochrome P450 in Human Liver. *Drug Metab Dispos* **44**, 1193-1200 (2016).
174. T. Kashiwagi, T. Kamada, H. Abe, Dynamic studies on the portal hemodynamics of scintiphotosplenoportography. Streamline flow in the human portal vein. *Gastroenterology* **69**, 1292-1296 (1975).
175. Y. Shirai *et al.*, Colorectal carcinoma metastases to the liver. Does primary tumor location affect its lobar distribution? *Cancer* **77**, 2213-2216 (1996).
176. G. H. Copher, B. M. Dick, "stream line" phenomena in the portal vein and the selective distribution of portal blood in the liver. *Archives of Surgery* **17**, 408-419 (1928).
177. T. Oinonen, K. O. Lindros, Zonation of hepatic cytochrome P-450 expression and regulation. *The Biochemical journal* **329** (Pt 1), 17-35 (1998).
178. D. E. Malarkey, K. Johnson, L. Ryan, G. Boorman, R. R. Maronpot, New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* **33**, 27-34 (2005).
179. J. W. Allen, S. N. Bhatia, Formation of steady-state oxygen gradients in vitro: application to liver zonation. *Biotechnology and bioengineering* **82**, 253-262 (2003).
180. P. Maier, B. Saad, H. P. Schawaldler, Effect of periportal- and centrilobular-equivalent oxygen tension on liver specific functions in long-term rat hepatocyte cultures. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **8**, 423-435 (1994).
181. W. Sadee *et al.*, Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Pharmacol Ther* **89**, 355-365 (2011).
182. H. C. Evans, S. E. Easthope, Transdermal buprenorphine. *Drugs* **63**, 1999-2010; discussion 2011-1992 (2003).
183. H. Hoja *et al.*, Determination of buprenorphine and norbuprenorphine in whole blood by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* **21**, 160-165 (1997).
184. B. KuKanich, P. Allen, Comparative pharmacokinetics of intravenous fentanyl and buprenorphine in healthy greyhound dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **37**, 595-597 (2014).
185. S. D. Roy, E. Roos, K. Sharma, Transdermal delivery of buprenorphine through cadaver skin. *Journal of pharmaceutical sciences* **83**, 126-130 (1994).
186. M. J. Millan, Multiple opioid systems and pain. *Pain* **27**, 303-347 (1986).
187. J. McDonald, D. G. Lambert, Opioid receptors. *BJA Education* **15**, 219-224 (2015).
188. K. J. Gerhold, R. Drdla-Schutting, S. D. Honsek, L. Forsthuber, J. Sandkuhler, Pronociceptive and Antinociceptive Effects of Buprenorphine in the Spinal Cord Dorsal Horn Cover a Dose Range of Four Orders of Magnitude. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**, 9580-9594 (2015).
189. J. J. Ballesta, J. Cremades, M. Rodriguez-Munoz, J. Garzon, C. C. Faura, Sensitivity to mu-opioid receptor-mediated anti-nociception is determined by cross-regulation between mu- and delta-opioid receptors at supraspinal level. *British journal of pharmacology* **166**, 309-326 (2012).
190. S. Ide *et al.*, Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **29**, 1656-1663 (2004).
191. S. G. Grinnell *et al.*, Mediation of buprenorphine analgesia by a combination of traditional and truncated mu opioid receptor splice variants. *Synapse (New York, N.Y.)* **70**, 395-407 (2016).

192. R. M. Bryant, J. E. Olley, M. B. Tyers, Antinociceptive actions of morphine and buprenorphine given intrathecally in the conscious rat. *British journal of pharmacology* **78**, 659-663 (1983).
193. T. Yamamoto, K. Shono, S. Tanabe, Buprenorphine activates mu and opioid receptor like-1 receptors simultaneously, but the analgesic effect is mainly mediated by mu receptor activation in the rat formalin test. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **318**, 206-213 (2006).
194. K. A. Gergen, J. E. Zadina, A. J. Kastin, D. Paul, Intrathecal Tyr-W-MIF-1 produces potent, naloxone-reversible analgesia modulated by alpha 2-adrenoceptors. *European journal of pharmacology* **298**, 235-239 (1996).
195. D. Paul, R. J. Bodnar, M. A. Gistrak, G. W. Pasternak, Different mu receptor subtypes mediate spinal and supraspinal analgesia in mice. *European journal of pharmacology* **168**, 307-314 (1989).
196. C. G. Pick, R. J. Nejat, G. W. Pasternak, Independent expression of two pharmacologically distinct supraspinal mu analgesic systems in genetically different mouse strains. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **265**, 166-171 (1993).
197. A. S. Moskowitz, R. R. Goodman, Autoradiographic analysis of mu1, mu2, and delta opioid binding in the central nervous system of C57BL/6BY and CXBK (opioid receptor-deficient) mice. *Brain research* **360**, 108-116 (1985).
198. M. Narita, S. Imai, Y. Itou, Y. Yajima, T. Suzuki, Possible involvement of mu1-opioid receptors in the fentanyl- or morphine-induced antinociception at supraspinal and spinal sites. *Life sciences* **70**, 2341-2354 (2002).
199. D. Wang *et al.*, Functional Divergence of Delta and Mu Opioid Receptor Organization in CNS Pain Circuits. *Neuron* **98**, 90-108.e105 (2018).
200. Z. Ding, R. B. Raffa, Identification of an additional supraspinal component to the analgesic mechanism of action of buprenorphine. *British journal of pharmacology* **157**, 831-843 (2009).
201. J. Xu *et al.*, Alternatively spliced mu opioid receptor C termini impact the diverse actions of morphine. *The Journal of clinical investigation* **127**, 1561-1573 (2017).
202. F. Viguier, B. Michot, M. Hamon, S. Bourgoin, Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms--implications of 5-HT(7) and other 5-HT receptor types. *European journal of pharmacology* **716**, 8-16 (2013).
203. Y. B. Peng, Q. Lin, W. D. Willis, The role of 5-HT3 receptors in periaqueductal gray-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **276**, 116-124 (1996).
204. R. I. Taber, M. B. Latranyi, Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). *European journal of pharmacology* **75**, 215-222 (1981).
205. D. A. Diniz *et al.*, Serotonin induces peripheral antinociception via the opioidergic system. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **97**, 1434-1437 (2017).
206. C. Heintz, R. Drdla-Schutting, D. N. Xanthos, J. Sandkuhler, Distinct mechanisms underlying pronociceptive effects of opioids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 16748-16756 (2011).
207. L. L. Tan *et al.*, A pathway from midcingulate cortex to posterior insula gates nociceptive hypersensitivity. *Nature neuroscience* **20**, 1591-1601 (2017).
208. P. K. Gillman, Monoamine oxidase inhibitors, opioid analgesics and serotonin toxicity. *British journal of anaesthesia* **95**, 434-441 (2005).
209. G. G. Graham, M. J. Davies, R. O. Day, A. Mohamudally, K. F. Scott, The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* **21**, 201-232 (2013).
210. R. Rastogi, R. A. Swarm, T. A. Patel, Case scenario: opioid association with serotonin syndrome: implications to the practitioners. *Anesthesiology* **115**, 1291-1298 (2011).

-
211. A. L. Svingos, C. Chavkin, E. E. Colago, V. M. Pickel, Major coexpression of kappa-opioid receptors and the dopamine transporter in nucleus accumbens axonal profiles. *Synapse (New York, N.Y.)* **42**, 185-192 (2001).
212. G. Gerra *et al.*, Buprenorphine treatment outcome in dually diagnosed heroin dependent patients: A retrospective study. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **30**, 265-272 (2006).
213. G. Gerra *et al.*, Buprenorphine versus methadone for opioid dependence: predictor variables for treatment outcome. *Drug and alcohol dependence* **75**, 37-45 (2004).
214. G. Gerra *et al.*, Association between gene variants and response to buprenorphine maintenance treatment. *Psychiatry research* **215**, 202-207 (2014).
215. J. Henke, W. Erhardt, S. Tacke, Analgesieprotokoll vor, während und nach der Anästhesie von Hunden und Katzen mit schmerzhaften Zuständen. *Tierärztl Prax* **36**, 27-34 (2008).
216. W. Erhardt, J. Henk, J. Haberstroh, *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen.* (Schattauer GmbH, Stuttgart, 2004).
217. N. Takeda, S. Hasegawa, M. Morita, T. Matsunaga, Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **45**, 817-821 (1993).
218. P. Cinelli, A. Rettich, B. Seifert, K. Burki, M. Arras, Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Laboratory animals* **41**, 174-184 (2007).
219. M. K. Meijer, A. G. Lemmens, B. F. Van Zutphen, V. Baumans, Urinary corticosterone levels in mice in response to intraperitoneal injections with saline. *Journal of applied animal welfare science : JAAWS* **8**, 279-283 (2005).
220. M. K. Meijer, B. M. Spruijt, L. F. van Zutphen, V. Baumans, Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Laboratory animals* **40**, 382-391 (2006).
221. I. Belfer *et al.*, Pain modality- and sex-specific effects of COMT genetic functional variants. *Pain* **154**, 1368-1376 (2013).
222. J. S. Mogil, Sex differences in pain and pain inhibition: multiple explanations of a controversial phenomenon. *Nature reviews. Neuroscience* **13**, 859-866 (2012).
223. J. S. Mogil, E. J. Chesler, S. G. Wilson, J. M. Juraska, W. F. Sternberg, Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **24**, 375-389 (2000).

Anhang

Abbildung S1: Spezifische Inhibierung der CYP3A Aktivität

Spezifische Inhibierung der CYP3A Aktivität mittels Ketoconazol und Troleandomycin in pmol D-Luciferin pro µg Protein und Minute in der gesamten Leber von männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (gepoolte Proben aus n = 8 Individuen pro Stamm). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung (technische Triplikate).

Die in **Abbildung S2** dargestellten Ergebnisse wurden nach den unter **2.2.2.4** und **2.2.2.5** beschriebenen Methoden erstellt. Für die Analyse der Aktivitäten wurden die kommerziell erhältlichen Kits P450-Glo™ CYP1A1 Assay (Luciferin-CEE), P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay (Luciferin-1A2), P450-Glo™ CYP2D6 Assay (Luciferin-ME EGE) der Firma Promega GmbH (Mannheim, D) und für die Analyse des Proteingehaltes die kommerziell erhältlichen Kits Mouse Cytochrome P450 1A1(CYP1A1) ELISA kit (Elab®, Wuhan (CHN)), Mouse Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) ELISA kit (SED294Mu) (Cloud-Clone Corp., Huston (USA)) und Mouse Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) ELISA kit (BlueGene Biotech, Shanghai (CHN)) verwendet.

Abbildung S2: CYP Aktivität und Proteingehalt in den Leberlappen männlicher C57BL/6J Mäuse

Lobuläre Aktivität der **A)** CYP1A1, **B)** CYP1A2 und **C)** CYP2D Enzyme und lobulärer Proteingehalt der **D)** CYP1A1, **E)** CYP1A2 und **F)** CYP2D Isozyme in den vier Leberlappen und dem Proc. p. (MW ± SD, n = 10; P-Wert < 0,05; * vs. Lobus s. l., # vs Lobus m., *Friedman Test mit Dunn's multiple comparison*). Die schwarz gestrichelte Linie repräsentiert den theoretisch errechneten gewichteten Mittelwert (WA) (**Tabelle S12 - S17**). Abkürzungen: Lobus sinister lateralis (Lobus s. l.), Lobus medialis (Lobus m.), Lobus dexter lateralis (Lobus d. l.), Lobus caudatus (Lobus c.) und Processus papillaris (Proc. p.).

Die in **Abbildung S3 – S6** dargestellten Ergebnisse wurden nach den unter **2.2.2.4** und **2.2.2.5** beschriebenen Methoden erstellt. Die entsprechenden verwendeten Materialien sind im Material- und Methodenteil aufgelistet.

Abbildung S3: Effekt von Buprenorphin auf die Aktivität und den Proteingehalt von CYP3A

A) CYP3A Aktivität und **B)** Proteingehalt in Lebermikrosomen männlicher C57BL/6J Mäuse, die 30 min vor der Tötung mit unterschiedlichen Dosen an Buprenorphin behandelt wurden (MW ± SD, n = 3, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*).

Abbildung S4: Effekt von Buprenorphin auf die Genexpression der Cyp3a Enzyme und CPR
 Dargestellt ist der *fold change* der relativen hepatischen Genexpression männlicher C57BL/6J Mäuse, die mit unterschiedlichen Dosen an Buprenorphin behandelt wurden, bezogen auf die 0,00 mg/kg Kontrollgruppe (MW $\pm$ SD, n = 3, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison* auf log transformierten Daten).

Abbildung S5: Dosis- und stammbabhängige Aktivität und Expression von CYP3A

A) Aktivität und **B)** Proteingehalt von CYP3A Enzymen in Lebermikrosomen männlicher Mäuse, die 30 min vor der Tötung mit verschiedenen Dosen an Buprenorphin behandelt wurden (Box Plot mit Median und [5./ 95. Perzentile]; 0,42 mg/kg n = 10; 4,0 mg/kg n = 5; *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*).

Abbildung S6: Effekt von Buprenorphin auf die relative Genexpression von CYP3A Isozymen und CPR in unterschiedlichen Inzuchtstämmen

Dargestellt ist die durchschnittliche relative hepatische Genexpression + SD in männlichen Mäusen, mit (hellgrau) und ohne (dunkelgrau) vorherige Behandlung von Buprenorphin (naive Tiere n = 8, Buprenorphin Tiere n = 15; zweiseitiger *Mann-Whitney* Test, P-Wert < 0,05: * vs. Naive Tiere). Da die mit Buprenorphin behandelten Tiere keinen dosisabhängigen Effekt aufwiesen, wurden diese zusammengefasst dargestellt.

Die in **Abbildung S7 und S8** dargestellten Ergebnisse wurden nach den unter **2.2.2.5** beschriebenen Methoden erstellt. Die zur Analyse verwendeten Primer sind in **Tabelle S32** im Anhang aufgeführt.

Abbildung S7: Stammesabhängige Ugt1a Enzym Genexpression

Dargestellt ist die durchschnittliche hepatische Genexpression in männlichen Mäusen (MW + SD, n = 8, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*; P-Wert < 0,05, # Balb/cJ vs.

Abbildung S8: Stammesabhängige Ugt2b Enzym Genexpression

Dargestellt ist die durchschnittliche hepatische Genexpression in männlichen Mäusen (MW + SD, n = 8, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*; P-Wert < 0,05, # Balb/cJ vs. 129S1/SvImJ).

Die in **Abbildung S9** dargestellten Ergebnisse wurden nach den unter **2.2.2.4** und **2.2.2.5** beschriebenen Methoden erstellt. Für die Analyse der Aktivitäten wurden die kommerziell erhältlichen Kits P450-Glo™ CYP1A1 Assay (Luciferin-CEE), P450-Glo™ CYP1A2 Induction/Inhibition Assay (Luciferin-1A2), P450-Glo™ CYP2D6 Assay (Luciferin-ME EGE) der Firma Promega GmbH (Mannheim, D) und für die Analyse des Proteingehaltes die kommerziell erhältlichen Kits Mouse Cytochrome P450 1A1(CYP1A1) ELISA kit (Elab®, Wuhan (CHN)), Mouse Cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) ELISA kit (SED294Mu) (Cloud-Clone Corp., Huston (USA)) und Mouse Cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) ELISA kit (BlueGene Biotech, Shanghai (CHN)) verwendet.

Abbildung S9: Stammesabhängige CYP Aktivität und Proteingehalt

Stammesabhängige Aktivität der **A)** CYP1A1, **B)** CYP1A2 und **C)** CYP2D und stammesabhängiger Proteingehalt der **D)** CYP1A1, **E)** CYP1A2 und **F)** CYP2D Enzyme in der gesamten Leber männlicher Mäuse (MW + SD, n = 8, P-Wert < 0,05: * vs. C57BL/6J, # 129S1/SvImJ vs. Balb/cJ, *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison*) (exakte Werte im Anhang: **Tabelle S29 – S34**).

Tabelle S1: Übersicht der verwendeten Literatur aus PubMed zur systematischen Analyse des durchschnittlich verwendeten Ausnagsmaterials zur Leber Mikrosomenisolation

Nr. ¹	Spezies	Mausstamm ²	Geschlecht	Mikrosomen verwendet	Leber	gepoolte Leber	kommerzielle Mikrosomen	Teilstück der Leber
1	Human		keine Angaben					
2	Maus	other	Männl.	Ja		Ja	Ja	
3	Ratte	other	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
4	Maus	Sv/129	keine Angaben	Ja	Ja			
5	Maus	Sv/129	keine Angaben	Ja	Ja			
6	Maus	C57BL/6	Männl./ Weibl.	Ja				Ja
7	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja	Ja	Ja	Ja	
8	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja	Ja			
9	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
10	Maus	CD-1	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
11	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja		Ja		
12	Maus	DBA	Männl.	Ja	Ja			
13	Ratte, Hund, Human, Affe					Ja	Ja	
14	Maus	C57BL/6	Männl.	Nein				
15	Human, Ratte			Ja		Ja	Ja	
16	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
17	Maus	other	keine Angaben	Ja				Ja
18	Maus, Ratte, Human	Balb/c	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
19	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
20	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja		
21	Maus	ICR	Männl.	Ja	Ja			
22	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
23	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja				
24	Human			Ja		Ja		
25	Maus	other	keine Angaben	Ja				Ja
26	Maus	ICR	Männl.	Ja	Ja			
27	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja	Ja			

¹ Nummerierung Literatur in Übereinstimmung mit dem folgenden Literaturverzeichnis, ² bzw. Hintergrundstamm,

Fortsetzung Tabelle S1

Nr. ¹	Spezies	Mausstamm ²	Geschlecht	Mikrosomen verwendet	Leber	gepoolte Leber	kommerzielle Mikrosomen	Teilstück der Leber
28	Maus	weitere	keine Angaben	Ja				Ja
29	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
30	Human	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
31	Maus	DBA	Weibl.	Ja		Ja		
32	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
33	Maus	FVB	Weibl.	Ja	Ja			
34	Maus	CD-1	keine Angaben	Ja	Ja			
35	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
36	Maus	CD-1	Männl.	Ja		Ja	Ja	
37	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja				
38	Maus	weitere weitere	Männl.	Ja				Ja
39	Ratte	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
40	Maus	Sv/129 weitere	Weibl.	Ja		Ja		
41	Maus	ICR	Männl.	Ja		Ja		
42	Maus	ICR	Männl.	Ja				Ja
43	Maus	Balb/c	Männl.	Nein				
44	Maus	FVB	keine Angaben	Nein				
45	Maus	weitere	Männl.	Ja				Ja
46	Maus	keine Angaben	Männl.	Ja		Ja	Ja	
47	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
48	Maus	weitere	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
49	Maus	ICR	Männl./ Weibl.	Ja		Ja		Ja
50	Human	C57BL/6		Ja		Ja	Ja	
51	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
52	Maus	C57BL/6	Weibl.	Ja	Ja			
53	Maus	ICR	Männl.	Ja				Ja
54	Maus	C57BL/6 keine	Weibl.	Ja	Ja			
55	Maus	Angaben keine	Männl.	Ja				Ja
56	Maus	Angaben	Männl.	Ja	Ja			Ja
57	Maus		keine Angaben	Ja				
58	Maus		keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
59	Ratte, Humane	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
60	Maus	weitere	Männl.	Ja	Ja			

¹ Nummerierung Literatur in Übereinstimmung mit dem folgenden Literaturverzeichnis, ² bzw. Hintergrundstamm,

Fortsetzung TabelleS1

Nr. ¹	Spezies	Mausstamm ²	Geschlecht	Mikrosomen verwendet	Leber	gepoolte Leber	kommerzielle Mikrosomen	Teilstück der Leber
61	Maus	C57BL/6	Männl./ Weibl.	Ja		Ja		Ja
62	Maus	CD-1	keine Angaben	Ja				
63								
64	Maus	C57BL/6	Weibl.	Nein				
65	Maus	CD-1	Männl.	Ja	Ja			
66	Maus	Balb/c	Weibl.	Ja	Ja			
67	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja	Ja			
68	Maus	CD-1	Männl.	Ja		Ja	Ja	
69	Maus	ICR	Männl.	Ja	Ja			
70	Maus, Ratte, Human	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
71	Maus	Sv/129	keine Angaben	Ja				Ja
72	Human		Männl./Weibl.	Ja		Ja	Ja	
73	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
74	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
75	Maus	ICR	Männl.	Ja				Ja
76	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja	Ja		Ja
77	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja	Ja		
78	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja 2
79	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja	Ja			
80	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				
81				Nein				
82	Maus	weitere	Männl.	Nein				
83	Maus	Balb/c	Männl.	Ja	Ja			
84	Human			Ja		Ja	Ja	
85	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja		Ja		Ja
86	Ratte, Humane	keine Angaben	keine Angaben	Ja				
87	Maus	CD-1	Männl.	Ja		Ja	Ja	
88	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
89	Maus	CD-1	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
90	Maus	keine Angaben	Männl.	Ja		Ja	Ja	
91	Maus	C57BL/6	Weibl.	Ja				

¹ Nummerierung Literatur in Übereinstimmung mit dem folgenden Literaturverzeichnis, ² bzw. Hintergrundstamm,

Fortsetzung TabelleS1

Nr. ¹	Spezies	Mausstamm ²	Geschlecht	Mikrosomen verwendet	Leber	gepoolte Leber	kommerzielle Mikrosomen	Teilstück der Leber
92	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja	Ja			
93	Maus	weitere	keine Angaben	Ja	Ja			
94	Maus	ICR	Männl.	Ja	Ja			
95	Maus	weitere	Männl.	Ja	Ja			
96	Maus	ICR	Männl.	Ja				Ja
97	Maus	Sv/129	Männl./ Weibl.	Ja				Ja
98	Maus	C57BL/6	Weibl.	Ja	Ja			
99	Ratte, Human	keine Angaben	keine Angaben	Ja				
100	Maus	ICR	Männl.	Ja				Ja
101	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja				
102	Maus	weitere	keine Angaben	Ja	Ja			Ja
103	Maus	weitere	Weibl.	Nein				
104	Maus	Balb/c	Männl.	Ja	Ja			
105	Maus			Nein				
106	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
107	Maus	weitere	keine Angaben	Ja				
108	Maus	C57BL/6	Weibl.	Ja	Ja			
109	Maus	keine Angaben	Männl.	Ja				Ja
110	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
111	Nicht auswertbar da russisch							
112	Maus	Sv/129	keine Angaben	Ja				Ja
113	Maus	weitere	Weibl.	Ja		Ja	Ja	
114	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
115	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
116	Maus	CD-1	Männl.	Ja		Ja	Ja	
117	Maus	FVB	Weibl.	Ja	Ja			
118	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja		Ja		
119	Nicht auswertbar da russisch							
120	Maus	Keine Angaben	Keine Angaben	Ja	Ja			
121	Maus	weitere	Männl.	Ja				Ja
122	Maus	keine Angaben	keine Angaben	Ja		Ja	Ja	
123	Human			Ja				

¹ Nummerierung Literatur in Übereinstimmung mit dem folgenden Literaturverzeichnis, ² bzw. Hintergrundstamm,

Fortsetzung TabelleS1

Nr. ¹	Spezies	Mausstamm ²	Geschlecht	Mikrosomen verwendet	Leber	gepoolte Leber	kommerzielle Mikrosomen	Teilstück der Leber
124	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
125	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja		Ja		
126	Maus	CD-1	Männl.	Ja	Ja			
127	Human			Ja				
128	Maus	ICR	Männl.	Ja				Ja
129	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja				
130	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja				Ja
131	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja		Ja		Ja
132	Nicht auswertbar da chinesisch							
133	Maus	CD-1	Männl.	Ja				Ja
134	Human			Ja				
135	Maus	weitere	keine Angaben	Ja	Ja			
136	Nicht auswertbar da chinesisch							
137	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
138	Maus		Weibl.	Nein				
139	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
140	Human			Ja				
141	Human			Ja				
142	Maus	weitere	Männl.	Ja		Ja		
143	Maus	weitere	Weibl.	Nein				
144	Ratte, Human			Ja		Ja	Ja	
145	Maus	C57BL/6	Weibl.	Ja	Ja			
146	Maus	weitere	Männl./ Weibl.	Ja	Ja			
147	Maus	CD-1	Männl.	Ja	Ja			
148	Nicht auswertbar da russisch							
149	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
150	Maus	ICR	Männl.	Ja		Ja		
151	Maus	Sv/129	Weibl.	Ja				Ja
152	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				Ja
153	Human			Ja				
154	Human			Ja				
155	Maus	Balb/c	Männl.	Nein				

¹ Nummerierung Literatur in Übereinstimmung mit dem folgenden Literaturverzeichnis, ² bzw. Hintergrundstamm,

Fortsetzung Tabelle S1

Nr. ¹	Spezies	Mausstamm ²	Geschlecht	Mikrosomen verwendet	Leber	gepoolte Leber	kommerzielle Mikrosomen	Teilstück der Leber
156	Maus	DBA	keine Angaben	Ja	Ja			
157	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja			
158	Maus	CD-1	Männl.	Nein				
159	Maus	CD-1	Männl.	Ja		Ja	Ja	
160	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja	Ja			
161	Maus	DBA	Weibl.	Ja	Ja	Ja		
162	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja	Ja	Ja		
163	Maus	other	Weibl.	Ja				Ja
164	Maus	C57BL/6	keine Angaben	Ja				Ja
165	Maus	CD-1	Männl.	Ja				Ja
166	Maus	Balb/c	Männl.	Ja	Ja			
167	Maus	C57BL/6	Männl.	Ja				
168	Maus	CD-1	Männl./Weibl.	Ja	Ja	Ja	Ja	

¹Nummerierung Literatur in Übereinstimmung mit dem folgenden Literaturverzeichnis, ²bzw. Hintergrundstamm,

Ergänzung: Literatur PubMed Analyse von Tabelle S1

1. J. Zhang *et al.*, Cytochrome P450 Isoforms in the Metabolism of Decursin and Decursinol Angelate from Korean Angelica. *The American journal of Chinese medicine* **43**, 1211-1230 (2015).
2. J. D. Xie *et al.*, Fentanyl Enhances Hepatotoxicity of Paclitaxel via Inhibition of CYP3A4 and ABCB1 Transport Activity in Mice. *PloS one* **10**, e0143701 (2015).
3. S. Wei *et al.*, Impact of chrysosplenetin on the pharmacokinetics and anti-malarial efficacy of artemisinin against Plasmodium berghei as well as in vitro CYP450 enzymatic activities in rat liver microsome. *Malaria journal* **14**, 432 (2015).
4. S. Wang, D. Bott, A. Tung, K. S. Sugamori, D. M. Grant, Relative Contributions of CYP1A2 and CYP2E1 to the Bioactivation and Clearance of 4-Aminobiphenyl in Adult Mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 916-921 (2015).
5. S. Wang, K. S. Sugamori, A. Tung, J. P. McPherson, D. M. Grant, N-hydroxylation of 4-aminobiphenyl by CYP2E1 produces oxidative stress in a mouse model of chemically induced liver cancer. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **144**, 393-405 (2015).
6. Y. C. Tien *et al.*, Dose of Phenobarbital and Age of Treatment at Early Life are Two Key Factors for the Persistent Induction of Cytochrome P450 Enzymes in Adult Mouse Liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 1938-1945 (2015).
7. J. Sun *et al.*, Guanfu base A, an antiarrhythmic alkaloid of Aconitum coreanum, Is a CYP2D6 inhibitor of human, monkey, and dog isoforms. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 713-724 (2015).
8. N. Scheer *et al.*, Defining Human Pathways of Drug Metabolism In Vivo through the Development of a Multiple Humanized Mouse Model. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 1679-1690 (2015).
9. C. Z. Qin *et al.*, Mechanism-based inhibition of Alantolactone on human cytochrome P450 3A4 in vitro and activity of hepatic cytochrome P450 in mice. *Journal of ethnopharmacology* **168**, 146-149 (2015).
10. J. Ning *et al.*, Characterization of phase I metabolism of resibufogenin and evaluation of the metabolic effects on its antitumor activity and toxicity. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 299-308 (2015).
11. K. Muta, T. Fukami, M. Nakajima, A proposed mechanism for the adverse effects of acebutolol: CES2 and CYP2C19-mediated metabolism and antinuclear antibody production. *Biochemical pharmacology* **98**, 659-670 (2015).
12. S. N. Muhsain, M. A. Lang, A. Abu-Bakar, Mitochondrial targeting of bilirubin regulatory enzymes: An adaptive response to oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology* **282**, 77-89 (2015).
13. K. W. Mosure *et al.*, Preclinical Pharmacokinetics and In Vitro Metabolism of Asunaprevir (BMS-650032), a Potent Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor. *Journal of pharmaceutical sciences* **104**, 2813-2823 (2015).
14. N. Moskaleva *et al.*, Spaceflight Effects on Cytochrome P450 Content in Mouse Liver. *PloS one* **10**, e0142374 (2015).
15. Y. Ma *et al.*, Design and optimization of a series of 1-sulfonylpyrazolo[4,3-b]pyridines as selective c-Met inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **58**, 2513-2529 (2015).
16. Q. L. Lv *et al.*, In Vitro and in Vivo Inhibitory Effects of Glycyrrhetic Acid in Mice and Human Cytochrome P450 3A4. *International journal of environmental research and public health* **13**, 84 (2015).
17. X. Liu *et al.*, Metabolomics reveals the formation of aldehydes and iminium in gefitinib metabolism. *Biochemical pharmacology* **97**, 111-121 (2015).
18. G. I. Lepesheva *et al.*, VFV as a New Effective CYP51 Structure-Derived Drug Candidate for Chagas Disease and Visceral Leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* **212**, 1439-1448 (2015).
19. S. Y. Lee, J. Y. Lee, Y. M. Kim, S. K. Kim, S. J. Oh, Expression of hepatic cytochrome P450s and UDP-glucuronosyltransferases in PXR and CAR double humanized mice treated with rifampicin. *Toxicology letters* **235**, 107-115 (2015).
20. J. Y. Lee, S. Y. Lee, K. Lee, S. J. Oh, S. K. Kim, Determination of species-difference in microsomal metabolism of amitriptyline using a predictive MRM-IDA-EPI method. *Chemico-biological interactions* **229**, 109-118 (2015).
21. O. K. Kwon *et al.*, Comprehensive Analysis of in Vivo Phosphoproteome of Mouse Liver Microsomes. *Journal of proteome research* **14**, 5215-5224 (2015).

22. H. C. Kwak, H. C. Kim, S. J. Oh, S. K. Kim, Effects of age increase on hepatic expression and activity of cytochrome P450 in male C57BL/6 mice. *Archives of pharmacal research* **38**, 857-864 (2015).
23. T. M. Keck *et al.*, Using click chemistry toward novel 1,2,3-triazole-linked dopamine D3 receptor ligands. *Bioorganic & medicinal chemistry* **23**, 4000-4012 (2015).
24. F. Kazmi, J. E. Barbara, P. Yerino, A. Parkinson, A long-standing mystery solved: the formation of 3-hydroxydesloratadine is catalyzed by CYP2C8 but prior glucuronidation of desloratadine by UDP-glucuronosyltransferase 2B10 is an obligatory requirement. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 523-533 (2015).
25. K. Kato *et al.*, Development of Murine Cyp3a Knockout Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 1208-1217 (2015).
26. J. S. Jeon *et al.*, Metabolic characterization of meso-dihydroguaiaretic acid in liver microsomes and in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **76**, 94-102 (2015).
27. R. Jayaraman, M. K. Pasha, A. Williams, K. C. Goh, K. Ethirajulu, Metabolism and Disposition of Pacritinib (SB1518), an Orally Active Janus Kinase 2 Inhibitor in Preclinical Species and Humans. *Drug metabolism letters* **9**, 28-47 (2015).
28. C. J. Henderson, L. A. McLaughlin, N. Scheer, L. A. Stanley, C. R. Wolf, Cytochrome b5 is a major determinant of human cytochrome P450 CYP2D6 and CYP3A4 activity in vivo. *Molecular pharmacology* **87**, 733-739 (2015).
29. H. Hashimoto *et al.*, Identification of a major radiometabolite of [¹¹C]PBB3. *Nuclear medicine and biology* **42**, 905-910 (2015).
30. W. Hamaguchi *et al.*, Synthesis, SAR study, and biological evaluation of novel quinoline derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors with reduced CYP3A4 inhibition. *Bioorganic & medicinal chemistry* **23**, 297-313 (2015).
31. M. M. Fashe, R. O. Juvonen, A. Petsalo, J. Rasanen, M. Pasanen, Species-Specific Differences in the in Vitro Metabolism of Lasiocarpine. *Chemical research in toxicology* **28**, 2034-2044 (2015).
32. O. H. Elshenawy, A. O. El-Kadi, Modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated enzymes by trimethylarsine oxide in C57BL/6 mice: In vivo and in vitro studies. *Toxicology letters* **238**, 17-31 (2015).
33. E. F. Choo *et al.*, Use of transgenic mouse models to understand the oral disposition and drug-drug interaction potential of cobimetinib, a MEK inhibitor. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 864-869 (2015).
34. J. Cheng *et al.*, Optimization of 2-phenylcyclopropylmethylamines as selective serotonin 2C receptor agonists and their evaluation as potential antipsychotic agents. *Journal of medicinal chemistry* **58**, 1992-2002 (2015).
35. A. L. Blobaum *et al.*, A Screen of Approved Drugs Identifies the Androgen Receptor Antagonist Flutamide and Its Pharmacologically Active Metabolite 2-Hydroxy-Flutamide as Heterotropic Activators of Cytochrome P450 3A In Vitro and In Vivo. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **43**, 1718-1726 (2015).
36. T. Yu, X. Chen, Y. Wang, R. Zhao, S. Mao, Modulatory effects of extracts of vinegar-baked Radix Bupleuri and saikosaponins on the activity of cytochrome P450 enzymes in vitro. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **44**, 861-867 (2014).
37. B. Yang, W. Liu, K. Chen, Z. Wang, C. Wang, Metabolism of diosbulbin B in vitro and in vivo in rats: formation of reactive metabolites and human enzymes involved. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **42**, 1737-1750 (2014).
38. T. Sueyoshi *et al.*, Flame retardant BDE-47 effectively activates nuclear receptor CAR in human primary hepatocytes. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **137**, 292-302 (2014).
39. M. Stiborova *et al.*, The influence of dicoumarol on the bioactivation of the carcinogen aristolochic acid I in rats. *Mutagenesis* **29**, 189-200 (2014).
40. M. Stiborova *et al.*, Cytochrome b5 and epoxide hydrolase contribute to benzo[a]pyrene-DNA adduct formation catalyzed by cytochrome P450 1A1 under low NADPH:P450 oxidoreductase conditions. *Toxicology* **318**, 1-12 (2014).
41. S. Shen, L. Li, X. Ding, J. Zheng, Metabolism of styrene to styrene oxide and vinylphenols in cytochrome P450 2F2- and P450 2E1-knockout mouse liver and lung microsomes. *Chemical research in toxicology* **27**, 27-33 (2014).
42. N. Scheer *et al.*, Deletion of 30 murine cytochrome p450 genes results in viable mice with compromised drug metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **42**, 1022-1030 (2014).

43. J. Ruan, M. Yang, P. Fu, Y. Ye, G. Lin, Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: insights into the structural and enzymatic basis. *Chemical research in toxicology* **27**, 1030-1039 (2014).
44. E. J. Park *et al.*, Discovery of novel pyrimidine and malonamide derivatives as TGR5 agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **24**, 4271-4275 (2014).
45. N. Moriya, H. Kataoka, H. Fujino, J. Nishikawa, F. Kugawa, Different expression patterns of hepatic cytochrome P450 s during anaphylactic or lipopolysaccharide-induced inflammation. *Die Pharmazie* **69**, 142-147 (2014).
46. T. Mitsui *et al.*, A useful model capable of predicting the clearance of cytochrome 3A4 (CYP3A4) substrates in humans: validity of CYP3A4 transgenic mice lacking their own Cyp3a enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **42**, 1540-1547 (2014).
47. K. Liu *et al.*, Role of CYP3A in isoniazid metabolism in vivo. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **29**, 219-222 (2014).
48. Y. Li, L. Wu, Y. Gu, D. Si, C. Liu, Metabolism of aildenafil in vivo in rats and in vitro in mouse, rat, dog, and human liver microsomes. *Drug testing and analysis* **6**, 552-562 (2014).
49. L. Li, V. Megaraj, Y. Wei, X. Ding, Identification of cytochrome P450 enzymes critical for lung tumorigenesis by the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK): insights from a novel Cyp2abfgs-null mouse. *Carcinogenesis* **35**, 2584-2591 (2014).
50. B. Lee *et al.*, Potential of decursin to inhibit the human cytochrome P450 2J2 isoform. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **70**, 94-99 (2014).
51. Y. Kusunoki *et al.*, Hepatic early inflammation induces downregulation of hepatic cytochrome P450 expression and metabolic activity in the dextran sulfate sodium-induced murine colitis. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **54**, 17-27 (2014).
52. S. Kuno *et al.*, Development of mice exhibiting hepatic microsomal activity of human CYP3A4 comparable to that in human liver microsomes by intravenous administration of an adenovirus vector expressing human CYP3A4. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **29**, 296-304 (2014).
53. Y. A. Kazantseva, A. A. Yarushkin, V. O. Pustyl'nyak, CAR-mediated repression of Foxo1 transcriptional activity regulates the cell cycle inhibitor p21 in mouse livers. *Toxicology* **321**, 73-79 (2014).
54. H. Kakutani *et al.*, In vitro and in vivo induction of cytochrome P450 by coplanar polychlorinated/brominated biphenyls (Co-PXBs) providing high TEQ in mother's milk in Japan. *Toxicology* **324**, 68-75 (2014).
55. M. Ishii *et al.*, Total gastrectomy may result in reduced drug effectiveness due to an increase in the expression of the drug-metabolizing enzyme Cytochrome P450, in the liver. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **51**, 180-188 (2014).
56. C. J. Henderson *et al.*, A role for cytochrome b5 in the In vivo disposition of anticancer and cytochrome P450 probe drugs in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **42**, 70-77 (2014).
57. V. S. Gopinath *et al.*, Design, synthesis, ADME characterization and antileishmanial evaluation of novel substituted quinoline analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **24**, 2046-2052 (2014).
58. F. Du, Z. Liu, X. Li, J. Xing, Metabolic pathways leading to detoxification of triptolide, a major active component of the herbal medicine Tripterygium wilfordii. *Journal of applied toxicology : JAT* **34**, 878-884 (2014).
59. I. H. Baek *et al.*, Development of a pharmacokinetic/pharmacodynamic/disease progression model in NC/Nga mice for development of novel anti-atopic dermatitis drugs. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **44**, 975-987 (2014).
60. T. Ashino, K. Hakukawa, Y. Itoh, S. Numazawa, Inhibitory effect of synthetic cannabinoids on CYP1A activity in mouse liver microsomes. *The Journal of toxicological sciences* **39**, 815-820 (2014).
61. P. Zhang *et al.*, Dietary regulation of mouse intestinal P450 expression and drug metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 529-535 (2013).
62. H. K. Zhang *et al.*, Chemistry, pharmacology, and behavioral studies identify chiral cyclopropanes as selective alpha4beta2-nicotinic acetylcholine receptor partial agonists

- exhibiting an antidepressant profile. Part II. *Journal of medicinal chemistry* **56**, 5495-5504 (2013).
63. K. Yokotani *et al.*, [Effect of three herbal extracts on cytochrome P450 and possibility of interaction with drugs]. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan* **54**, 56-64 (2013).
  64. X. Wu, M. Duffel, H. J. Lehmler, Oxidation of polychlorinated biphenyls by liver tissue slices from phenobarbital-pretreated mice is congener-specific and atropselective. *Chemical research in toxicology* **26**, 1642-1651 (2013).
  65. T. L. Swenson, J. E. Casida, Neonicotinoid formaldehyde generators: possible mechanism of mouse-specific hepatotoxicity/hepatocarcinogenicity of thiamethoxam. *Toxicology letters* **216**, 139-145 (2013).
  66. M. Sutherland *et al.*, Antitumor activity of a duocarmycin analogue rationalized to be metabolically activated by cytochrome P450 1A1 in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Molecular cancer therapeutics* **12**, 27-37 (2013).
  67. M. Stiborova, V. Cerna, M. Moserova, V. M. Arlt, E. Frei, The effect of benzo[a]pyrene on metabolic activation of anticancer drug ellipticine in mice. *Neuro endocrinology letters* **34 Suppl 2**, 43-54 (2013).
  68. S. Smith *et al.*, The pre-clinical absorption, distribution, metabolism and excretion properties of IPI-926, an orally bioavailable antagonist of the hedgehog signal transduction pathway. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **43**, 875-885 (2013).
  69. W. Sirisangtragul, B. Sripanidkulchai, Modulatory effect of Thai traditional medicine (Yahom Tultavai) on hepatic cytochrome P450 enzymes and pentobarbital-induced sleeping in mice. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM* **10**, 128-136 (2013).
  70. B. M. Silber *et al.*, Pharmacokinetics and metabolism of 2-aminothiazoles with antiprion activity in mice. *Pharmaceutical research* **30**, 932-950 (2013).
  71. T. Y. Shih, T. H. Young, H. S. Lee, C. B. Hsieh, O. Y. Hu, Protective effects of kaempferol on isoniazid- and rifampicin-induced hepatotoxicity. *The AAPS journal* **15**, 753-762 (2013).
  72. P. Pimkaew *et al.*, Interactions of sesquiterpenes zederone and germacrone with the human cytochrome P450 system. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **27**, 2005-2012 (2013).
  73. K. M. Pianalto, J. H. Hartman, G. Boysen, G. P. Miller, Differences in butadiene adduct formation between rats and mice not due to selective inhibition of CYP2E1 by butadiene metabolites. *Toxicology letters* **223**, 221-227 (2013).
  74. T. Nishimura *et al.*, Using chimeric mice with humanized livers to predict human drug metabolism and a drug-drug interaction. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **344**, 388-396 (2013).
  75. L. Li, W. Li, Y. H. Kim, Y. W. Lee, Chlorella vulgaris extract ameliorates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in mice. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* **65**, 73-80 (2013).
  76. C. Lee, X. Ding, D. S. Riddick, The role of cytochrome P450-dependent metabolism in the regulation of mouse hepatic growth hormone signaling components and target genes by 3-methylcholanthrene. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 457-465 (2013).
  77. C. Lee, X. Ding, D. S. Riddick, Downregulation of mouse hepatic CYP3A protein by 3-methylcholanthrene does not require cytochrome P450-dependent metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 1782-1786 (2013).
  78. M. J. LeBaron *et al.*, An integrated approach for prospectively investigating a mode-of-action for rodent liver effects. *Toxicology and applied pharmacology* **270**, 164-173 (2013).
  79. M. Kot *et al.*, Gender-dependent activity of CYP3A is indirectly modified by GR in the noradrenergic system. *Pharmacological reports : PR* **65**, 1431-1434 (2013).
  80. S. D. Kim, M. Antenos, E. J. Squires, G. M. Kirby, Cytochrome P450 2A5 and bilirubin: mechanisms of gene regulation and cytoprotection. *Toxicology and applied pharmacology* **270**, 129-138 (2013).
  81. K. Kaminski, J. Obniska, I. Chlebek, B. Wiklik, S. Rzepka, Design, synthesis and anticonvulsant properties of new N-Mannich bases derived from 3-phenylpyrrolidine-2,5-diones. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**, 6821-6830 (2013).
  82. Z. Y. Hu *et al.*, Pharmacokinetic evaluation of the anticancer prodrug simmitemcan in different experimental animals. *Acta pharmacologica Sinica* **34**, 1437-1448 (2013).

83. V. Hosagrahara *et al.*, Effect of repeated dosing on rifampin exposure in BALB/c mice. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **49**, 33-38 (2013).
84. R. Higuchi, T. Fukami, M. Nakajima, T. Yokoi, Prilocaine- and lidocaine-induced methemoglobinemia is caused by human carboxylesterase-, CYP2E1-, and CYP3A4-mediated metabolic activation. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 1220-1230 (2013).
85. C. J. Henderson, L. A. McLaughlin, C. R. Wolf, Evidence that cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase can act as sole electron donors to the hepatic cytochrome P450 system. *Molecular pharmacology* **83**, 1209-1217 (2013).
86. K. Fukunaga *et al.*, 2-(2-Phenylmorpholin-4-yl)pyrimidin-4(3H)-ones; a new class of potent, selective and orally active glycogen synthase kinase-3 β inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **23**, 6933-6937 (2013).
87. J. C. Erve *et al.*, Bioactivation of sitaxentan in liver microsomes, hepatocytes, and expressed human P450s with characterization of the glutathione conjugate by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemical research in toxicology* **26**, 926-936 (2013).
88. J. Y. Choi *et al.*, Rational development of 4-aminopyridyl-based inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51 as anti-chagas agents. *Journal of medicinal chemistry* **56**, 7651-7668 (2013).
89. H. Chen, D. Soroka, Y. Zhu, S. Sang, Metabolism of ginger component [6]-shogaol in liver microsomes from mouse, rat, dog, monkey, and human. *Molecular nutrition & food research* **57**, 865-876 (2013).
90. A. L. Blobaum *et al.*, Heterotropic activation of the midazolam hydroxylase activity of CYP3A by a positive allosteric modulator of mGlu5: in vitro to in vivo translation and potential impact on clinically relevant drug-drug interactions. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **41**, 2066-2075 (2013).
91. X. Zhou, J. D'Agostino, F. Xie, X. Ding, Role of CYP2A5 in the bioactivation of the lung carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **341**, 233-241 (2012).
92. M. Zhao *et al.*, Stereoselective metabolism of tetrahydropalmatine enantiomers in rat liver microsomes. *Chirality* **24**, 368-373 (2012).
93. M. F. Yueh, T. Li, R. M. Evans, B. Hammock, R. H. Tukey, Triclocarban mediates induction of xenobiotic metabolism through activation of the constitutive androstane receptor and the estrogen receptor α . *PloS one* **7**, e37705 (2012).
94. K. Yokotani *et al.*, Hepatic cytochrome P450 mediates interaction between warfarin and *Coleus forskohlii* extract in vivo and in vitro. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **64**, 1793-1801 (2012).
95. X. Wang *et al.*, Furocoumarins affect hepatic cytochrome P450 and renal organic ion transporters in mice. *Toxicology letters* **209**, 67-77 (2012).
96. N. Virgona *et al.*, *Coleus forskohlii* extract induces hepatic cytochrome P450 enzymes in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **50**, 750-755 (2012).
97. K. Vanhees *et al.*, Maternal intake of quercetin during gestation alters ex vivo benzo[a]pyrene metabolism and DNA adduct formation in adult offspring. *Mutagenesis* **27**, 445-451 (2012).
98. R. J. Turesky, E. E. Bessette, D. Dunbar, R. G. Liberman, P. L. Skipper, Cytochrome P450-mediated metabolism and DNA binding of 2-amino-1,7-dimethylimidazo[4,5-g]quinoxaline and its carcinogenic isomer 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in mice. *Chemical research in toxicology* **25**, 410-421 (2012).
99. Y. Tamura *et al.*, Design, synthesis and identification of novel benzimidazole derivatives as highly potent NPY Y5 receptor antagonists with attractive in vitro ADME profiles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **22**, 5498-5502 (2012).
100. M. Tajima *et al.*, Consumption of a high-fat diet during pregnancy decreases the activity of cytochrome P450 3a in the livers of offspring. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* **47**, 108-116 (2012).
101. M. Stiborova *et al.*, Bioactivation versus detoxication of the urothelial carcinogen aristolochic acid I by human cytochrome P450 1A1 and 1A2. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **125**, 345-358 (2012).
102. M. Stiborova *et al.*, Activation and detoxification metabolism of urban air pollutants 2-nitrobenzanthrone and carcinogenic 3-nitrobenzanthrone by rat and mouse hepatic microsomes. *Neuro endocrinology letters* **33 Suppl 3**, 8-15 (2012).

103. M. I. Shukoor *et al.*, Tolfenamic acid suppresses cytochrome P450 2E1 expression in mouse liver. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* **4**, 1122-1129 (2012).
104. A. M. Sharma, Y. Li, M. Novalen, M. A. Hayes, J. Uetrecht, Bioactivation of nevirapine to a reactive quinone methide: implications for liver injury. *Chemical research in toxicology* **25**, 1708-1719 (2012).
105. S. Sanoh *et al.*, Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 2267-2272 (2012).
106. M. K. Pasha *et al.*, Preclinical metabolism and pharmacokinetics of SB1317 (TG02), a potent CDK/JAK2/FLT3 inhibitor. *Drug metabolism letters* **6**, 33-42 (2012).
107. X. Y. Pang *et al.*, Expression and regulation of human fetal-specific CYP3A7 in mice. *Endocrinology* **153**, 1453-1463 (2012).
108. M. Murtomaa-Hautala *et al.*, Significant interspecies differences in induction profiles of hepatic CYP enzymes by TCDD in bank and field voles. *Environmental toxicology and chemistry* **31**, 663-671 (2012).
109. C. Mekjaruskul, M. Jay, B. Sripanidkulchai, Modulatory effects of Kaempferia parviflora extract on mouse hepatic cytochrome P450 enzymes. *Journal of ethnopharmacology* **141**, 831-839 (2012).
110. M. E. McDonnell *et al.*, Riluzole prodrugs for melanoma and ALS: design, synthesis, and in vitro metabolic profiling. *Bioorganic & medicinal chemistry* **20**, 5642-5648 (2012).
111. M. M. Marchenko, H. P. Kopyl'chuk, I. O. Shmarakov, I. M. Buchkovs'ka, [Activity of enzymatic detoxification systems in the mice liver under conditions of different retinoid provision]. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal (1999)* **84**, 42-47 (2012).
112. Y. Lu, X. H. Zhang, A. I. Cederbaum, Ethanol induction of CYP2A5: role of CYP2E1-ROS-Nrf2 pathway. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **128**, 427-438 (2012).
113. D. Lowes *et al.*, Lead optimization of antimalarial propafenone analogues. *Journal of medicinal chemistry* **55**, 6087-6093 (2012).
114. W. S. Lo *et al.*, A dual function of the furanocoumarin chalepensis in inhibiting Cyp2a and inducing Cyp2b in mice: the protein stabilization and receptor-mediated activation. *Archives of toxicology* **86**, 1927-1938 (2012).
115. Y. Li *et al.*, In vitro bioactivation of a selective estrogen receptor modulator (2S,3R)-(+)-3-(3-hydroxyphenyl)-2-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)phenyl]-2,3-dihydro -1,4-benzoxathin-6-ol (I) in liver microsomes: formation of adenine adducts. *Chemical research in toxicology* **25**, 2368-2377 (2012).
116. L. Li, X. Chen, J. Zhou, D. Zhong, In vitro studies on the oxidative metabolism of 20(s)-ginsenoside Rh2 in human, monkey, dog, rat, and mouse liver microsomes, and human liver s9. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 2041-2053 (2012).
117. J. S. Lagas *et al.*, P-glycoprotein, multidrug-resistance associated protein 2, Cyp3a, and carboxylesterase affect the oral availability and metabolism of vinorelbine. *Molecular pharmacology* **82**, 636-644 (2012).
118. Y. Kobayashi, T. Fukami, R. Higuchi, M. Nakajima, T. Yokoi, Metabolic activation by human arylacetamide deacetylase, CYP2E1, and CYP1A2 causes phenacetin-induced methemoglobinemia. *Biochemical pharmacology* **84**, 1196-1206 (2012).
119. V. I. Kaledin, N. V. Baginskaia, E. A. Vasiunina, S. I. Il'nitskaia, L. P. Ovchinnikova, [Increase of general toxic effects and decrease of hepatocarcinogenic effects of diethylnitrosamine administered to mice in conjunction with isopropanol]. *Voprosy onkologii* **58**, 658-662 (2012).
120. J. Hou *et al.*, Discovery and extensive in vitro evaluations of NK-HDAC-1: a chiral histone deacetylase inhibitor as a promising lead. *Journal of medicinal chemistry* **55**, 3066-3075 (2012).
121. M. Hasegawa *et al.*, Investigation of drug-drug interactions caused by human pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A4 and CYP2C subfamilies in chimeric mice with a humanized liver. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 474-480 (2012).
122. L. A. Gates, D. Lu, L. A. Peterson, Trapping of cis-2-butene-1,4-dial to measure furan metabolism in human liver microsomes by cytochrome P450 enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 596-601 (2012).
123. S. S. Gao *et al.*, Dual effects of phloretin on aflatoxin B1 metabolism: activation and detoxification of aflatoxin B1. *BioFactors (Oxford, England)* **38**, 34-43 (2012).
124. A. S. Gandhi *et al.*, CYP3A-dependent drug metabolism is reduced in bacterial inflammation in mice. *British journal of pharmacology* **166**, 2176-2187 (2012).

125. Z. Z. Fang *et al.*, Metabolic map and bioactivation of the anti-tumour drug noscapine. *British journal of pharmacology* **167**, 1271-1286 (2012).
126. S. Deb, M. Pandey, H. Adomat, E. S. Guns, Cytochrome P450 3A-mediated microsomal biotransformation of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in mouse and human liver: drug-related induction and inhibition of catabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 907-918 (2012).
127. K. C. Chimalakonda *et al.*, Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **40**, 2174-2184 (2012).
128. W. Chatuphonprasert, K. Jarukamjorn, Impact of six fruits--banana, guava, mangosteen, pineapple, ripe mango and ripe papaya--on murine hepatic cytochrome P450 activities. *Journal of applied toxicology : JAT* **32**, 994-1001 (2012).
129. S. A. Bardowell, F. Duan, D. Manor, J. E. Swanson, R. S. Parker, Disruption of mouse cytochrome p450 4f14 (Cyp4f14 gene) causes severe perturbations in vitamin E metabolism. *The Journal of biological chemistry* **287**, 26077-26086 (2012).
130. V. M. Arlt *et al.*, Exposure to benzo[a]pyrene of Hepatic Cytochrome P450 Reductase Null (HRN) and P450 Reductase Conditional Null (RCN) mice: Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts by immunohistochemistry and 32P-postlabelling. *Toxicology letters* **213**, 160-166 (2012).
131. J. L. Zheng *et al.*, Assessment of subclinical, toxicant-induced hepatic gene expression profiles after low-dose, short-term exposures in mice. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **60**, 54-72 (2011).
132. M. Zhao, L. P. Li, J. Shen, H. D. Jiang, [Inhibitory and inductive effects of (-)- and (+)-tetrahydropalmatine on CYP450 in mice]. *Zhejiang da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Zhejiang University. Medical sciences* **40**, 33-39 (2011).
133. F. Zhang *et al.*, In vitro metabolism, glutathione conjugation, and CYP isoform specificity of epoxidation of 4-vinylphenol. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **41**, 6-23 (2011).
134. D. Yang, J. Yang, D. Shi, R. Deng, B. Yan, Scoparone potentiates transactivation of the bile salt export pump gene and this effect is enhanced by cytochrome P450 metabolism but abolished by a PKC inhibitor. *British journal of pharmacology* **164**, 1547-1557 (2011).
135. H. Yamazaki *et al.*, In vivo formation of a glutathione conjugate derived from thalidomide in humanized uPA-NOG mice. *Chemical research in toxicology* **24**, 287-289 (2011).
136. M. Wang *et al.*, Comparative pharmacokinetics and metabolism studies in lean and diet-induced obese mice: an animal efficacy model for 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) inhibitors. *Drug metabolism letters* **5**, 55-63 (2011).
137. Y. F. Ueng *et al.*, Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 (CYP)2A6 by chalepensin in recombinant systems, in human liver microsomes and in mice in vivo. *British journal of pharmacology* **163**, 1250-1262 (2011).
138. L. Udomsuk *et al.*, Modified expression of aryl hydrocarbon receptor-related genes by deoxymiroestrol, a phytoestrogen, in mouse hepatocytes in primary culture. *Journal of ethnopharmacology* **137**, 902-908 (2011).
139. K. N. Theken *et al.*, Activation of the acute inflammatory response alters cytochrome P450 expression and eicosanoid metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 22-29 (2011).
140. X. Su *et al.*, Discovery of adamantyl heterocyclic ketones as potent 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors. *ChemMedChem* **6**, 1439-1451 (2011).
141. K. Samuelsson, M. A. Bergstrom, C. A. Jonsson, G. Westman, A. T. Karlberg, Diphenylthiourea, a common rubber chemical, is bioactivated to potent skin sensitizers. *Chemical research in toxicology* **24**, 35-44 (2011).
142. S. A. Saghir, B. I. Ghanayem, I. R. Schultz, Kinetics of trihalogenated acetic acid metabolism and isoform specificity in liver microsomes. *International journal of toxicology* **30**, 551-561 (2011).
143. J. J. Raybon *et al.*, Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of rifampicin-mediated Cyp3a11 induction in steroid and xenobiotic X receptor humanized mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **337**, 75-82 (2011).
144. A. Potega *et al.*, The imidazoacridinone antitumor drug, C-1311, is metabolized by flavin monooxygenases but not by cytochrome P450s. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 1423-1432 (2011).
145. M. H. Pham *et al.*, Identification and induction of cytochrome P450s involved in the metabolism of flavone-8-acetic acid in mice. *Drug metabolism letters* **5**, 73-84 (2011).

146. A. Pal *et al.*, Influence of *Moringa oleifera* on pharmacokinetic disposition of rifampicin using HPLC-PDA method: a pre-clinical study. *Biomedical chromatography : BMC* **25**, 641-645 (2011).
147. S. Nesnow *et al.*, Propiconazole increases reactive oxygen species levels in mouse hepatic cells in culture and in mouse liver by a cytochrome P450 enzyme mediated process. *Chemico-biological interactions* **194**, 79-89 (2011).
148. N. E. Moskaleva, V. G. Zgoda, A. I. Archakov, [Mass-spectrometric measurements of P450 isoform specific content and corresponding enzyme activities]. *Bioorganicheskaya khimiya* **37**, 149-164 (2011).
149. M. S. Moon *et al.*, 3,5,5-trimethyl-hexanoyl-ferrocene diet protects mice from moderate transient acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **124**, 348-358 (2011).
150. X. C. Ma *et al.*, Comparative metabolism of cinobufagin in liver microsomes from mouse, rat, dog, minipig, monkey, and human. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 675-682 (2011).
151. Y. Lu, J. Zhuge, D. Wu, A. I. Cederbaum, Ethanol induction of CYP2A5: permissive role for CYP2E1. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 330-336 (2011).
152. Q. Li *et al.*, Kinetics of ethylene and ethylene oxide in subcellular fractions of lungs and livers of male B6C3F1 mice and male fischer 344 rats and of human livers. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **123**, 384-398 (2011).
153. F. Li, J. Lu, X. Ma, Metabolomic screening and identification of the bioactivation pathways of ritonavir. *Chemical research in toxicology* **24**, 2109-2114 (2011).
154. F. Li, J. Lu, L. Wang, X. Ma, CYP3A-mediated generation of aldehyde and hydrazine in atazanavir metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 394-401 (2011).
155. B. Li, P. Yau, B. Kemper, Identification of cytochrome P450 2C2 protein complexes in mouse liver. *Proteomics* **11**, 3359-3368 (2011).
156. J. E. Laine, S. Auriola, M. Pasanen, R. O. Juvonen, D-Isomer of gly-tyr-pro-cys-pro-his-pro peptide: a novel and sensitive in vitro trapping agent to detect reactive metabolites by electrospray mass spectrometry. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **25**, 411-425 (2011).
157. Y. Kato *et al.*, A possible mechanism for 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice. *Toxicology and applied pharmacology* **254**, 48-55 (2011).
158. H. Jin *et al.*, Pulmonary toxicity and metabolic activation of tetrandrine in CD-1 mice. *Chemical research in toxicology* **24**, 2142-2152 (2011).
159. R. Jayaraman *et al.*, Preclinical metabolism and disposition of SB939 (Pracinostat), an orally active histone deacetylase inhibitor, and prediction of human pharmacokinetics. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 2219-2232 (2011).
160. M. C. Hollander *et al.*, A Cyp2a polymorphism predicts susceptibility to NNK-induced lung tumorigenesis in mice. *Carcinogenesis* **32**, 1279-1284 (2011).
161. M. R. Hakkinen *et al.*, 2'-Deoxyguanosine as a surrogate trapping agent for DNA reactive drug metabolites. *Toxicology letters* **207**, 34-41 (2011).
162. Y. Guo *et al.*, CYP2D plays a major role in berberine metabolism in liver of mice and humans. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **41**, 996-1005 (2011).
163. M. A. Crampsie *et al.*, Phenylbutyl isoselenocyanate modulates phase I and II enzymes and inhibits 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)- 1-butanone-induced DNA adducts in mice. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)* **4**, 1884-1894 (2011).
164. N. N. Bumpus, E. F. Johnson, 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside (AICAR)-stimulated hepatic expression of Cyp4a10, Cyp4a14, Cyp4a31, and other peroxisome proliferator-activated receptor alpha-responsive mouse genes is AICAR 5'-monophosphate-dependent and AMP-activated protein kinase-independent. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **339**, 886-895 (2011).
165. S. Botros, N. El-Lakkany, S. H. Seif el-Din, A. N. Sabra, M. Ibrahim, Comparative efficacy and bioavailability of different praziquantel brands. *Experimental parasitology* **127**, 515-521 (2011).
166. T. Ashino *et al.*, Auranofin protects against cocaine-induced hepatic injury through induction of heme oxygenase-1. *The Journal of toxicological sciences* **36**, 635-643 (2011).
167. I. Amunom *et al.*, Cytochromes P450 catalyze the reduction of alpha,beta-unsaturated aldehydes. *Chemical research in toxicology* **24**, 1223-1230 (2011).

168. J. J. Alberti, S. Sentellas, M. Salva, In vitro liver metabolism of acridinium bromide in preclinical animal species and humans: identification of the human enzymes involved in its oxidative metabolism. *Biochemical pharmacology* **81**, 761-776 (2011).

Tabelle S2: Übersicht der durchschnittlichen Geschwindigkeit (Geschw.), des maximal möglichen Effektes (MPE(x)) sowie der Konzentrationen von Buprenorphin und seiner Metaboliten in Serum und Gehirn (männl. C57BL/6J Mäuse, basal: n=21, pro Dosisgruppe: n=3; G 0309/15)

Bup [mg/kg]	Basal	0,00/ VH	0,05	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD	MW $\pm$ SD
Geschw.	2,48 $\pm$ 0,82	6,49 $\pm$ 5,81	5,74 $\pm$ 4,84	10,24 $\pm$ 4,65	5,73 $\pm$ 1,07	8,43 $\pm$ 4,22	9,0 $\pm$ 3,47	10,14 $\pm$ 1,71
[cm/s]								
MPE₅₀[%]	-	-1,65 $\pm$ 2,59	1,91 $\pm$ 1,64	10,76 $\pm$ 6,24	23,91 $\pm$ 9,1	28,83 $\pm$ 2,17	31,46 $\pm$ 10,42	38,71 $\pm$ 16,14
Bup-Serum	-	-	3,8 $\pm$ 0,68	16,27 $\pm$ 5,02	13,41 $\pm$ 14,09	71,32 $\pm$ 27,57	192,9 $\pm$ 24,8	418,7 $\pm$ 59,01
[ng/ml]								
NBup-Serum	-	-	-	0,11	0,13	0,52 $\pm$ 0,5	0,41 $\pm$ 0,12	1,23 $\pm$ 0,63
[ng/ml]								
B3G-Serum	-	-	8,45 $\pm$ 9,85	21,78 $\pm$ 17,3	49,43 $\pm$ 80,59	115,6 $\pm$ 106,7	57,03 $\pm$ 30	318,7 $\pm$ 249
[ng/ml]								
N3G-Serum	-	-	0,24 $\pm$ 0,17	0,58 $\pm$ 0,36	2,04 $\pm$ 2,51	6,54 $\pm$ 4,86	4,59 $\pm$ 1,73	19,24 $\pm$ 12,57
[ng/ml]								
Bup-Gehirn	-	-	2,25 $\pm$ 0,07	11,5 $\pm$ 2,86	10,03 $\pm$ 6,64	14,53 $\pm$ 2,01	74,07 $\pm$ 26,98	193,3 $\pm$ 74,66
[pg/mg]								
NBup-Gehirn	-	-	-	0,35 $\pm$ 0,07	0,4	0,6 $\pm$ 0,14	1,83 $\pm$ 0,84	3,3 $\pm$ 1,02
[pg/mg]								
B3G-Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-
[pg/mg]								
N3G-Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-
[pg/mg]								

Bup: Buprenorphin; NBup: Norbuprenorphin; B3G: Buprenorphin-3-Glukuronid, N3G: Norbuprenorphin-3-Glukuronid

MW $\pm$ SD: Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; VH: Vehikelgruppe

Tabelle S3: Übersicht der berechneten P-Werte unter Durchführung des *Kruskal-Wallis* Test mit *Dunn's multiple comparison* bezogen auf die basalen Werte (männl. C57BL/6J Mäuse, n=3 pro Dosisgruppe, G 0309/15)

Bup [mg/kg]	0,05	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0
Geschw.	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999	> 0,9999
MPE(x)	> 0,9999	> 0,9999	0,2115	0,0617	0,028	0,0119

Geschw.: durchschnittliche Geschwindigkeit; MPE(x): Maximal möglicher Effekt

Tabelle S4: Übersichtstabelle der Daten des Stammesvergleiches (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n=15 pro Stamm, G 0194/ 16)

Dosisgruppe	C57BL/6J [Median [5./95.] Perzentile]			Balb/cJ [Median [5./95.] Perzentile]			129S1/SvImJ [Median [5./95.] Perzentile]		
	Basal	0,42 mg/kg	4,0 mg/kg	Basal	0,42 mg/kg	4,0 mg/kg	Basal	0,42 mg/kg	4,0 mg/kg
Temperatur [°C]	48,39 [47/ 49,39]	49,67 [48,81/ 50,48]	50,7 [49,6/ 51,65]	44,42 [40,5/ 46,4]	47,91 [46/ 49,3]	51,82 [50,7/ 55]	50,65 [48/ 52,68]	53,97 [51,6/ 55]	52,6 [51,12/ 54,1]
ΔT [°C] ^a	-	1,35 [1,1/ 1,81]	2,69 [2,21/ 3,3]	-	4,05 [2,9/ 5,5]	9,68 [6,27/ 10,62]	-	2,87 [1,8/ 5,12]	1,85 [1,42/ 3,12]
Geschw. [cm/s]	2,7 [1,1/ 3,93]	8,7 [7,8/ 11,5]	10,87 [8,33/ 12,73]	2,77 [0,33/ 5,5]	9,28 [6,13/ 17,7]	10,83 [8,9/ 17,7]	1,63 [0,47/ 3,07]	5,04 [2/ 11,07]	7 [1,47/ 8,9]
Bup Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[ng/ml]	-	44 [18,1/ 67,5]	459 [370/ 495]	-	52,25 [31,8/ 72,9]	538 [468/ 560]	-	41,5 [31,1/ 84,3]	468 [415/ 501]
NBup Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[ng/ml]	-	0,6 [0,2/ 9,9]	6,3 [3,6/ 9,3]	-	0,5 [0,2/ 1,8]	5,8 [2,4/ 9,5]	-	0,6 [0,2/ 7,5]	5,6 [3,9/ 38,7]
B3G Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[ng/ml]	-	101,6 [6,7/ 332]	277 [134/ 370]	-	28,85 [10,5/ 271]	250 [185/ 426]	-	90,1 [15/ 288]	205 [185/ 342]
N3G Serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[ng/ml]	-	9,6 [2,5/ 22,8]	100 [40,5/ 188]	-	9,6 [5,1/ 38,9]	162 [45,8/ 289]	-	5,65 [1,6/ 13,9]	33,6 [25,3/ 98,2]
Bup Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[pg/mg]	-	1530 [1157/ 1959]	12268 [9345/ 14803]	-	1329 [879,6/ 12785]	11957 [9635/ 12785]	-	1171 [860,2/ 1407]	8896 [7752/ 10203]
NBup Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[pg/mg]	-	4,35 [2,2/ 6,8]	38 [30,4/ 50,3]	-	2,85 [1,8/ 5,1]	31,5 [20,4/ 37]	-	2,35 [1,3/ 4]	15,5 [13,5/ 26,9]
B3G Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[pg/mg]	-	0,8 [0,6/ 2,8]	9,8 [4,7/ 15,9]	-	1,6 [0,8/ 4,4]	20,4 [10,2/ 31,1]	-	0,85 [0,6/ 1,4]	4,5 [4,1/ 6,7]
N3G Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
[pg/mg]	-	1,93 [1,37/ 2,84]	9,84 [4,68/ 15,89]	-	2,56 [1,52/ 4,41]	20,41 [10,22/ 31,11]	-	1,4 [1,4/ 1,4]	4,48 [4,05/ 6,67]
Log ₁₀ (NBup/Bup) Serum	-	-1,78 [-2,45/ -0,65]	-1,82 [-2,11/ -1,73]	-	-2,07 [-2,3/ -1,46]	-1,97 [-2,29/ -1,74]	-	-1,84 [-2,2/ -0,75]	-1,92 [-2,03/ -1,07]
Log ₁₀ (B3G/Bup) Serum	-	0,53 [-0,93/ 0,88]	-0,13 [-0,54/ -0,07]	-	-0,31 [-0,58/ 0,93]	-0,35 [-0,46/ -0,08]	-	0,29 [-0,41/ 0,83]	-0,31 [-0,4/ -0,12]
Log ₁₀ (N3G/NBup) Serum	-	1,15 [0,35/ 1,6]	1,23 [0,81/ 1,31]	-	1,34 [1,14/ 1,56]	1,45 [1,16/ 1,54]	-	0,79 [0,23/ 1,09]	0,74 [0,41/ 0,81]
Log ₁₀ (Gehirn/Blut) Bup	-	0,79 [0,57/ 1,28]	0,69 [0,632/ 0,76]	-	0,54 [0,48/ 0,87]	0,53 [0,37/ 0,61]	-	0,57 [0,27/ 0,71]	0,5 [0,39/ 0,55]
Log ₁₀ (Gehirn/Blut) NBup	-	0,06 [-1,32/ 0,6]	0,02 [0,15/ 0,4]	-	-0,06 [-0,39/ 0,09]	-0,9 [-0,27/ 0,16]	-	-0,24 [-1,57/ 0,1]	-0,26 [-1,18/ -0,02]
Log ₁₀ (Gehirn/Blut) B3G	-	-1,69 [-2,43/ -0,75]	-0,95 [-1,88/ -0,81]	-	-1,5 [-2,34/ -0,76]	-1,24 [-1,67/ -0,96]	-	-2,16 [-2,85/ -1,33]	-1,59 [-1,89/ -1,51]
Log ₁₀ (Gehirn/Blut) N3G	-	-1,64 [-1,69/ -1,2]	-1,9 [-2,1/ -1,3]	-	-1,44 [-2,2/ -1,2]	-1,71 [-1,93/ -1,36]	-	-1,42 [-1,42/ -1,42]	-1,6 [-2,15/ -1,53]

Bup:Buprenorphin, NBup: Norbuprenorphin, B3G: Buprenorphin-3-Glukuronid, N3G: Norbuprenorphin-3-Glukuronid

Tabelle S5: Übersicht der berechneten P-Werte der Daten des Stammesvergleiches (Kruskal-Wallis Test mit Dunn's multiple comparison, männl., n=15 pro Stamm, G0194/16)

	Basal				0,42 mg/kg Bup				4,0 mg/kg Bup			
	C57BL/6J vs. Balb/cJ		C57BL/6J vs. 129S1/SvImJ		Balb/cJ vs. 129S1/SvImJ		C57BL/6J vs. 129S1/SvImJ		Balb/cJ vs. 129S1/SvImJ		C57BL/6J vs. 129S1/SvImJ	
Temperatur	0,0033		0,0131		< 0,0001		0,0668		0,1231		0,0584	
ΔT	-		-		-		< 0,0001		0,8242		0,7850	
Geschw.	> 0,9999		0,1474		0,0742		> 0,9999		0,0144		0,0926	
BupSerum	-		-		-		0,4425		> 0,9999		> 0,9999	
NBupSerum	-		-		-		> 0,9999		> 0,9999		> 0,9999	
B3GSerum	-		-		-		0,7591		> 0,9999		0,9144	
N3GSerum	-		-		-		> 0,9999		0,5848		0,1687	
Log1qNBup/Bup)												
Serum	-		-		-		0,6977		> 0,9999		> 0,9999	
Log1qB3G/Bup)												
Serum	-		-		-		0,443		> 0,9999		> 0,9999	
Log1qN3G/NBup)												
Serum	-		-		-		0,2022		0,0986		0,1431	
Bup-Gehirn	-		-		-		0,2262		0,0011		0,0216	
NBup-Gehirn	-		-		-		0,0893		0,01		0,0056	
B3G- Gehirn	-		-		-		0,1172		> 0,9999		0,2682	
N3G- Gehirn	-		-		-		Nicht möglich auf Grund fehlender Werte					
Log ₁₀ (Gehirn /Blut)												
Bup	-		-		-		0,0197		0,0082		0,0089	
Log ₁₀ (Gehirn /Blut)												
NBup	-		-		-		0,9289		0,1265		0,0589	
Log ₁₀ (Gehirn /Blut)												
B3G	-		-		-		> 0,9999		0,5597		0,1017	
Log ₁₀ (Gehirn /Blut)												
N3G	-		-		-		Nicht möglich auf Grund fehlender Werte					

Bup: Buprenorphin, NBup: Norbuprenorphin, B3G: Buprenorphin-3-Glukuronid, N3G: Norbuprenorphin-3-Glukuronid

Tabelle S6: Übersicht der berechneten P-Werte nach Vergleich der Dosisgruppen pro Stamm (männl., n=15 pro Stamm, G0194/16)

	C57BL/6J				Balb/cJ				129S1/SvImJ			
	Basal vs, 0,42 mg/kg	basal vs, 4,0 mg/kg	0,42 mg/kg vs, 4,0 mg/kg	Basal vs, 0,42 mg/kg	basal vs, 4,0 mg/kg	0,42 mg/kg vs, 4,0 mg/kg	Basal vs, 0,42 mg/kg	basal vs, 4,0 mg/kg	Basal vs, 0,42 mg/kg	basal vs, 4,0 mg/kg	0,42 mg/kg vs, 4,0 mg/kg	0,42 mg/kg vs, 4,0 mg/kg
Temperatur	^a 0,001	^a 0,0313	^b 0,0193	^a 0,001	^a 0,0313	^b 0,0007	^a 0,001	^a 0,0625	^a 0,001	^a 0,0625	^b 0,1059	^b 0,1059
Geschw.	^a 0,001	^a 0,0313	^b 0,1645	^a 0,001	^a 0,0313	^b 0,2158	^a 0,001	^a 0,0625	^a 0,001	^a 0,0625	^b 0,7003	^b 0,7003
^b BupSerum	-	-	0,0007	-	-	0,0007	-	-	-	-	0,0007	0,0007
^b NBup-Serum	-	-	0,0113	-	-	0,0003	-	-	-	-	0,0077	0,0077
^b B3G-Serum	-	-	0,04	-	-	0,0127	-	-	-	-	0,1645	0,1645
^b N3G-Serum	-	-	0,0007	-	-	0,0007	-	-	-	-	0,0007	0,0007
^b Log10(NBup/Bup)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum	-	-	0,5135	-	-	0,4396	-	-	-	-	0,8591	0,8591
^b Log10(B3G/Bup)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum	-	-	0,0753	-	-	> 0,9999	-	-	-	-	0,0193	0,0193
^b Log10(N3G/NBup)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum	-	-	0,7679	-	-	0,3553	-	-	-	-	0,3097	0,3097
^b Bup-Gehirn	-	-	0,0007	-	-	0,0007	-	-	-	-	0,0007	0,0007
^b NBup- Gehirn	-	-	0,0007	-	-	0,0007	-	-	-	-	0,0007	0,0007
^b B3G- Gehirn	-	-	0,0003	-	-	0,0007	-	-	-	-	0,0007	0,0007
^b N3G- Gehirn	-	-	0,0159	-	-	0,0043	-	-	-	-	0,0007	0,0007
^b Log ₁₀ (Gehirn /	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nicht möglich	Nicht möglich
Bup	-	-	0,2065	-	-	0,6787	-	-	-	-	0,3097	0,3097
^b Log ₁₀ (Gehirn /Blut)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NBup	-	-	0,8591	-	-	0,953	-	-	-	-	0,7679	0,7679
^b Log ₁₀ (Gehirn /Blut)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B3G	-	-	0,0753	-	-	0,4396	-	-	-	-	0,028	0,028
^b Log ₁₀ (Gehirn /Blut)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N3G	-	-	0,4127	-	-	0,6623	-	-	-	-	Nicht möglich	Nicht möglich

^a Wilcoxon matched pairs signed rank Test,einseitig ^bMann-Whitney Test, zweiseitig

Bup: Buprenorphin, NBup: Norbuprenorphin, B3G: Buprenorphin-3-Glukuronid, N3G: Norbuprenorphin-3-Glukuronid

Tabelle S7: Log₁₀ des metabolischen Verhältnisses von Buprenorphin und seiner Metaboliten sowie deren Verteilung zwischen Gehirn und Blut (männl. C57BL/6J Mäuse, n=21, G 0309/15)

	Median [5./ 95. Perzentile]
Log ₁₀ (NBup/Bup)	-2,49 [-2,83/ -1,95]
Log ₁₀ (B3G/Bup)	-0,05 [-0,91/ 0,68]
Log ₁₀ (N3G/NBup)	1,07 [0,79/ 1,47]
Log ₁₀ (Gehirn/Blut) Bup	0,66 [0,19/ 17,88]
Log ₁₀ (Gehirn/Blut) NBup	3,47 [0,51/ 4,74]

Buprenorphin; NBup: Norbuprenorphin; B3G: Buprenorphin-3-Glukuronid, N3G: Norbuprenorphin-3-Glukuronid

Tabelle S8: CYP1A1, 1A2, 2C, 2D und 3A Aktivität (pmol D-Luciferin/ µg Protein/ Min) und CPR Aktivität (mU/ mg) in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris von männlichen C57BL/6J Mäusen (Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD), n=10, P-Wert: *Friedman Test*).

	Lobus sinister lateralis		Lobus medialis		Lobus dexter lateralis		Lobus caudatus		Processus papillaris		
Aktivität	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	P-Wert
CYP1A1	0,040	0,018	0,041	0,015	0,028	0,012	0,022	0,007	0,015	0,009	< 0,0001
CYP1A2	0,550	0,175	0,576	0,145	0,425	0,110	0,335	0,061	0,255	0,081	< 0,0001
CYP2C	0,008	0,002	0,009	0,003	0,005	0,002	0,003	0,001	0,003	0,001	< 0,0001
CYP2D	0,081	0,037	0,094	0,039	0,078	0,061	0,052	0,040	0,035	0,025	< 0,0001
CYP3A	0,085	0,029	0,080	0,036	0,068	0,040	0,051	0,036	0,028	0,031	0,0006
CPR	69,61	7,250	67,26	11,01	58,14	13,79	58,15	14,37	45,88	14,10	0,0001

Tabelle S9: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*), mit *Dunn's multiple comparison* der CYP3A Aktivitätsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	0,897	0,109	0,004
Lobus medialis	> 0,999	1	0,897	0,109	0,004
Lobus dexter lateralis	0,897	0,897	1	> 0,999	0,66
Lobus caudatus	0,109	0,109	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	0,004	0,004	0,66	> 0,999	1

Tabelle S10: CYP1A1, 1A2, 2D und 3A Proteingehalt (ng CYP/ µg Protein) in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris von männlichen C57BL/6J Mäusen (Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD), n=10, P-Wert: *Friedman Test*).

Proteingehalt	Lobus sinister lateralis		Lobus medialis		Lobus dexter lateralis		Lobus caudatus		Processus papillaris		P-Wert
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	
CYP1A1	0,408	0,2	0,43	0,184	0,416	0,191	0,351	0,132	0,34	0,163	0,4395
CYP1A2	0,543	0,142	0,527	0,092	0,534	0,193	0,482	0,17	0,554	0,225	0,4628
CYP2D	0,313	0,025	0,299	0,04	0,33	0,0435	0,324	0,065	0,318	0,047	0,4395
CYP3A	0,987	0,254	0,905	0,123	0,835	0,263	0,793	0,349	0,734	0,415	0,6771

Tabelle S11: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*), mit *Dunn's multiple comparison* der CYP3A Proteindaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus medialis	> 0,999	1	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus dexter lateralis	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999	> 0,999
Lobus caudatus	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tabelle S12: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP1A1 Aktivitätsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	0,477	0,072	0,0002
Lobus medialis	> 0,999	1	0,162	0,019	< 0,0001
Lobus dexter lateralis	0,477	0,162	1	> 0,999	0,237
Lobus caudatus	0,072	0,019	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	0,0002	< 0,0001	0,237	> 0,999	1

Tabelle S13: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP1A2 Aktivitätsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	0,897	0,019	0,0004
Lobus medialis	> 0,999	1	0,339	0,004	< 0,0001
Lobus dexter lateralis	0,897	0,339	1	> 0,999	0,162
Lobus caudatus	0,019	0,004	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	0,0004	< 0,0001	0,162	> 0,999	1

Tabelle S14: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP2C Aktivitätsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0.999	0.4771	0.0069	< 0.0001
Lobus medialis	> 0.999	1	0.3389	0.0041	< 0.0001
Lobus dexter lateralis	0.4771	0.3389	1	> 0.999	0.0721
Lobus caudatus	0.0069	0.0041	> 0.999	1	> 0.999
Processus papillaris	< 0.0001	< 0.0001	0.0721	> 0.999	1

Tabelle S15: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP2D Aktivitätsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	> 0,999	0,047	0,004
Lobus medialis	> 0,999	1	0,477	0,001	< 0,0001
Lobus dexter lateralis	> 0,999	0,477	1	0,660	0,109
Lobus caudatus	0,047	0,001	0,660	1	> 0,999
Processus papillaris	0,004	< 0,0001	0,109	> 0,999	1

Tabelle S16: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP1A1 Proteindaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus medialis	> 0,999	1	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus dexter lateralis	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999	> 0,999
Lobus caudatus	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tabelle S17: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP1A2 Proteindaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	> 0,999	0,897	> 0,999
Lobus medialis	> 0,999	1	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus dexter lateralis	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999	> 0,999
Lobus caudatus	0,897	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tabelle S18: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP2D Proteindaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus medialis	> 0,999	1	0,219	> 0,999	> 0,999
Lobus dexter lateralis	> 0,999	0,219	1	> 0,999	> 0,999
Lobus caudatus	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1	> 0,999
Processus papillaris	> 0,999	> 0,999	> 0,999	> 0,999	1

Tabelle S19: Relative Genexpression der *Cyp1a*, *Cyp2c* und *2d* Enzyme in den vier Leberlappen und dem Processus papillaris männlicher C57BL/6J Mäuse (n = 10, Ausnahme *Cyp2d9* und *Cyp2d34* n = 6; E = Exponent). Die zur Analyse verwendeten Primer sind in Tabelle S19 im Anhang aufgeführt.

Gen	Lobus sinister lateralis		Lobus medialis		Lobus dexter lateralis		Lobus caudatus		Processus papillaris		
	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	P-Wert ³
<i>Cyp1a1</i>	1,14E+03	8,63E+02	8,53E+02	3,78E+02	5,78E+02	2,64E+02	6,23E+02	3,29E+02	5,25E+02	1,63E+02	0,151
<i>Cyp1a2</i>	8,14E+05	3,23E+05	8,41E+05	3,46E+05	7,96E+05	3,17E+05	7,86E+05	3,06E+05	7,29E+05	2,26E+05	0,538
<i>Cyp2c29</i>	2,20E+06	3,31E+05	2,09E+06	2,36E+05	2,08E+06	3,35E+05	2,24E+06	2,80E+05	2,09E+06	2,23E+05	0,122
<i>Cyp2c37</i>	1,73E+06	6,12E+05	1,75E+06	6,65E+05	1,75E+06	5,91E+05	1,74E+06	5,80E+05	1,54E+06	5,25E+05	0,016
<i>Cyp2c44</i>	4,81E+05	7,20E+04	5,01E+05	5,08E+04	5,06E+05	6,35E+04	5,20E+05	4,26E+04	4,73E+05	5,57E+04	0,101
<i>Cyp2c50</i>	3,13E+06	7,46E+05	2,97E+06	6,97E+05	2,94E+06	5,48E+05	3,18E+06	5,69E+05	2,88E+06	4,82E+05	0,247
<i>Cyp2c67</i>	2,91E+05	5,65E+04	2,91E+05	4,74E+04	2,89E+05	5,30E+04	3,20E+05	4,81E+04	3,08E+05	5,86E+04	0,033
<i>Cyp2c70</i>	4,67E+10	1,48E+11	4,09E+10	1,29E+11	4,95E+10	1,57E+11	5,61E+10	1,77E+11	5,53E+10	1,75E+11	0,130
<i>Cyp2d9</i>	1,43E+06	6,56E+05	1,24E+06	6,43E+05	1,30E+06	6,06E+05	1,39E+06	5,84E+05	1,43E+06	5,42E+05	0,424
<i>Cyp2d10</i>	2,10E+06	6,89E+05	2,03E+06	6,22E+05	1,99E+06	6,14E+05	2,01E+06	5,96E+05	2,05E+06	5,90E+05	0,138
<i>Cyp2d11</i>	1,13E+05	3,48E+04	1,13E+05	2,70E+04	1,11E+05	2,30E+04	1,04E+05	2,04E+04	1,63E+05	7,13E+04	0,019
<i>Cyp2d12</i>	2,98E+02	7,83E+01	2,65E+02	1,10E+02	2,65E+02	8,66E+01	2,88E+02	7,30E+01	3,05E+02	8,45E+01	0,252
<i>Cyp2d13</i>	4,81E+05	1,01E+05	4,98E+05	1,00E+05	5,08E+05	8,24E+04	5,11E+05	7,74E+04	4,68E+05	1,11E+05	0,024
<i>Cyp2d22</i>	2,17E+05	2,93E+04	2,11E+05	2,88E+04	2,11E+05	2,76E+04	2,08E+05	3,06E+04	2,14E+05	3,39E+04	0,648
<i>Cyp2d26</i>	1,05E+06	1,04E+05	1,07E+06	1,15E+05	1,08E+06	1,40E+05	1,06E+06	1,58E+05	1,05E+06	1,64E+05	0,308
<i>Cyp2d34</i>	1,69E+01	7,59E+00	1,49E+01	8,72E+00	2,18E+01	1,62E+01	2,80E+01	1,90E+01	2,70E+01	1,81E+01	0,424
<i>Cyp2d40</i>	1,64E+05	3,95E+04	1,64E+05	4,07E+04	1,78E+05	4,25E+04	1,79E+05	3,70E+04	1,91E+05	4,78E+04	0,0003
<i>CPR</i>	2,10E+05	3,19E+04	1,97E+05	3,52E+04	2,05E+05	3,56E+04	2,18E+05	3,81E+04	1,99E+05	4,83E+04	0,0228

¹ Mittelwert (MW)   ² Standardabweichung (SD)   ³ Friedman Test

Tabelle S20: Verwendete Primer zur Genexpression der *Cyp1a*, *Cyp2c*, *Cyp2d*, *Ugt1a*, *Ugt2b* Enzyme und *AHR*

Kommerzielle Primer	Hersteller
Mm_0610033E06Rik_1_SG QuantiTect Primer Assay (Ugt2b37)	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_1300012D20Rik_1_SG QuantiTect Primer Assay (Ugt2b1)	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_9430041C03Rik_1_SG QuantiTect Primer Assay (Ugt2b38)	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_AHR_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_AI788959_1_SG QuantiTect Primer Assay (Ugt2b34)	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_C730031G17_1_SG QuantiTect Primer Assay (Ugt2b35)	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp1a1_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp1a2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2c29_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2c37_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2c44_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2c50_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2c67_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2c70_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d10_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d11_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d12_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d13_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d22_2_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d26_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d34_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d40_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Cyp2d9_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt1a12_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt1a2_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt1a5_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt1a6_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt1a7c_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt2b36_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)
Mm_Ugt2b5_1_SG QuantiTect Primer Assay	QIAGEN®, Hilden (D)

Tabelle S21: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*), mit *Dunn's multiple comparison* der CPR Aktivitätsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	> 0,999	0,0374	0,1333	0,0003
Lobus medialis	> 0,999	1	0,2838	0,7710	0,0053
Lobus dexter lateralis	0,0374	0,2838	1	> 0,999	> 0,999
Lobus caudatus	0,1333	0,7710	> 0,999	1	0,8969
Processus papillaris	0,0003	0,0053	> 0,999	0,8969	1

Tabelle S22: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Friedman Test*), mit *Dunn's multiple comparison* der CPR Genexpressionsdaten in den verschiedenen Leberlappen und dem Processus papillaris (männl. C57BL/6J Mäuse, n = 10).

P-Wert	Lobus sinister lateralis	Lobus medialis	Lobus dexter lateralis	Lobus caudatus	Processus papillaris
Lobus sinister lateralis	1	0,8969	> 0,999	> 0,999	> 0,999
Lobus medialis	0,8969	1	> 0,999	0,0186	> 0,999
Lobus dexter lateralis	> 0,999	> 0,999	1	0,2365	> 0,999
Lobus caudatus	> 0,999	0,0186	0,2365	1	0,1621
Processus papillaris	> 0,999	> 0,999	> 0,999	0,1621	1

Tabelle S23: CYP1A1, 1A2, 2C, 2D und 3A Aktivität (pmol D-Luciferin/ µg Protein/ Min) und CPR Aktivität (mU/ mg) in männl. C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD), n=8, P-Wert: *Kruskal-Wallis*).

Aktivität	C57BL/6J		Balb/cJ		129S1/SvImJ		P-Wert
	MW	± SD	MW	± SD	MW	± SD	
CYP1A1	0,0196	0,0066	0,0103	0,0025	0,0393	0,0073	0,0001
CYP1A2	0,478	0,098	0,335	0,0635	0,6355	0,0436	0,0002
CYP2C	0,0103	0,003	0,003	5,8E-5	0,009	0,001	0,0003
CYP2D	0,0707	0,021	0,002	0,0007	0,0562	0,0513	0,0002
CYP3A	0,0698	0,014	0,06075	0,0079	0,0732	0,0146	0,2248
CPR	55,06	6,961	36,72	2,899	52,63	15,07	0,0130

Tabelle S24: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CYP3A Aktivitätsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,5038	> 0,999
Balb/cJ	0,5038	1	0,3348
129S1/SvImJ	> 0,999	0,3348	1

Tabelle S25: CYP1A1, 1A2, 2D und 3A Proteingehalt (ng CYP/ µg Protein) in männl. C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD), n=8).

	C57BL/6J		Balb/cJ		129S1/SvImJ		
Proteingehalt	MS	± SD	MW	± SD	MW	± SD	P-Wert
CYP1A1	0,305	0,134	0,294	0,148	0,284	0,144	0,9254
CYP1A2	0,578	0,304	0,472	0,164	0,354	0,084	0,0935
CYP2D	0,31	0,02	0,314	0,028	0,328	0,027	0,2299
CYP3A	0,645	0,268	0,505	1,11	0,475	0,178	0,2080

Tabelle S26: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CYP3A Proteindaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,9666	0,2313
Balb/cJ	0,9666	1	> 0,9999
129S1/SvImJ	0,2313	> 0,9999	1

Tabelle S27: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CPR Aktivitätsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,0240	> 0,999
Balb/cJ	0,0240	1	0,0441
129S1/SvImJ	> 0,999	0,0441	1

Tabelle S28: Relative Genexpression der Cyp Enzyme und CYP Regulatoren in der gesamten Leber von männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (n = 8, Ausnahme Cyp2d34: n = 7 (C57BL/6J) und n = 5 (129S1/SvImJ), E = Exponent). Die zur Analyse verwendeten Primer sind in Tabelle S19 im Anhang aufgeführt.

Stamm	C57BL/6J		Balb/cJ		129S1/SvImJ		P-Wert ³
Gen	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	MW ¹	± SD ²	
<i>Cyp1a1</i>	7,99E+02	1,63E+02	1,10E+03	2,84E+02	8,69E+02	2,21E+02	0,0568
<i>Cyp1a2</i>	1,26E+06	2,14E+05	1,26E+06	2,01E+05	1,68E+06	9,25E+04	0,0005
<i>Cyp2c29</i>	3,53E+05	6,97E+04	6,06E+05	2,00E+05	5,52E+05	2,08E+05	0,0087
<i>Cyp2c37</i>	3,14E+06	3,37E+05	2,59E+06	2,95E+05	2,51E+06	4,20E+05	0,0061
<i>Cyp2c44</i>	7,87E+05	9,27E+04	7,75E+04	1,85E+04	6,04E+05	1,26E+05	< 0,0001
<i>Cyp2c50</i>	4,64E+06	7,03E+05	9,75E+06	7,56E+05	6,25E+06	1,16E+06	< 0,0001
<i>Cyp2c67</i>	4,25E+05	6,14E+04	8,64E+05	9,48E+04	6,10E+05	4,03E+04	< 0,0001
<i>Cyp2c70</i>	3,53E+05	6,97E+04	6,06E+05	2,00E+05	5,52E+05	2,08E+05	0,0087
<i>Cyp2d9</i>	1,93E+06	6,73E+05	2,54E+06	3,09E+05	1,98E+06	1,78E+05	0,0075
<i>Cyp2d10</i>	3,27E+06	4,24E+05	3,66E+06	3,94E+05	2,99E+06	2,40E+05	0,0079
<i>Cyp2d11</i>	1,29E+05	3,33E+04	1,52E+05	4,16E+04	1,20E+05	1,78E+04	0,1083
<i>Cyp2d12</i>	5,80E+02	1,66E+02	5,36E+02	1,20E+02	1,10E+03	1,47E+02	0,0006
<i>Cyp2d13</i>	6,56E+05	9,13E+04	5,77E+05	7,97E+04	6,36E+05	1,06E+05	0,2894
<i>Cyp2d22</i>	2,94E+05	5,70E+04	2,60E+05	5,31E+04	2,55E+05	3,41E+04	0,2363
<i>Cyp2d26</i>	1,44E+06	2,52E+05	1,32E+06	3,39E+05	1,26E+06	1,36E+05	0,2815
<i>Cyp2d34</i>	2,77E+02	3,73E+02	1,52E+02	2,75E+02	1,11E+02	1,64E+02	0,5144
<i>Cyp2d40</i>	2,10E+05	2,30E+04	1,77E+05	2,44E+04	2,04E+05	3,20E+04	0,0583
<i>AHR</i>	3,61E+04	7,85E+03	2,93E+03	7,18E+02	3,08E+04	7,43E+03	0,0004
<i>CAR</i>	4,50E+04	7,87E+03	4,35E+04	1,00E+04	5,75E+04	1,70E+04	0,1433
<i>PXR</i>	3,02E+04	2,63E+03	2,25E+04	2,71E+03	2,90E+04	7,38E+03	0,0032
<i>CPR</i>	1,44E+05	3,31E+04	1,20E+05	4,22E+04	1,36E+05	2,20E+04	0,3491

¹ Mittelwert (MW) ² Standardabweichung (SD) ³ Kruskal-Wallis Test

Tabelle S29: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CPR Genexpressionsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,4415	> 0,9999
Balb/cJ	0,4415	1	> 0,9999
129S1/SvImJ	> 0,9999	> 0,9999	1

Tabelle S30: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CYP1A1 Aktivitätsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,2141	0,0441
Balb/cJ	0,2141	1	<0,0001
129S1/SvImJ	0,0441	<0,0001	1

Tabelle S31: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CYP1A2 Aktivitätsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,2691	0,0441
Balb/cJ	0,2691	1	0,0001
129S1/SvImJ	0,0441	0,0001	1

Tabelle S32: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CYP2C Aktivitätsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,0005	> 0,999
Balb/cJ	0,0005	1	0,0080
129S1/SvImJ	> 0,999	0,0080	1

Tabelle S33: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (Kruskal-Wallis Test) mit Dunn's multiple comparison der CYP2D Aktivitätsdaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	0,0002	0,7737
Balb/cJ	0,0002	1	0,0140
129S1/SvImJ	0,7737	0,0140	1

Tabelle S34: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Kruskal-Wallis* Test) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP1A1 Proteindaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	>0,9999	>0,9999
Balb/cJ	>0,9999	1	>0,9999
129S1/SvImJ	>0,9999	>0,9999	1

Tabelle S35: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Kruskal-Wallis* Test) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP1A2 Proteindaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	>0,9999	0,1017
Balb/cJ	>0,9999	1	0,4127
129S1/SvImJ	0,1017	0,4127	1

Tabelle S36: Berechnete P-Werte der nichtparametrischen ANOVA (*Kruskal-Wallis* Test) mit *Dunn's multiple comparison* der CYP2D Proteindaten (männl. C57BL/6J, Balb/cJ, 129S1/SvImJ Mäuse, n = 8).

P-Wert	C57BL/6J	Balb/cJ	129S1/SvImJ
C57BL/6J	1	>0,9999	0,2691
Balb/cJ	>0,9999	1	0,8665
129S1/SvImJ	0,2691	0,8665	1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der anatomischen Bereiche, die an der Nozizeption- und Schmerzwahrnehmung beteiligt sind.....	3
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Nozizeption.....	4
Abbildung 1.3: Schematische Übersicht möglicher Signalwege von Opioidrezeptoren.....	8
Abbildung 1.4: A) <i>Incremental Hot Plate</i> Apparatur und B) Abbruchkriterium.....	11
Abbildung 1.5: Schematische Übersicht des Katalysemechanismus von CYP Enzymen.....	16
Abbildung 1.6: Metabolisierung von Buprenorphin.....	17
Abbildung 1.7: Häufig verwendete Maus Inzuchtstämme.....	19
Abbildung 1.8: Illustrierung der wissenschaftlichen Fragestellung.....	22
Abbildung 1.9: Übersicht der Arbeitspakete sowie angestrebtes Ziel.....	23
Abbildung 2.1: Zeitlicher Ablauf des Tierversuches.....	32
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Leberlappen der Maus und entsprechende Nassgewichte.....	35
Abbildung 3.1: Buprenorphin Dosis-Wirkungskurve.....	45
Abbildung 3.2: Dosisabhängige Geschwindigkeit 30 min nach Gabe von Buprenorphin.....	46
Abbildung 3.3: Basale Schmerzsensitivität.....	47
Abbildung 3.4: Dosis- und stammesabhängige Wirksamkeit von Buprenorphin.....	48
Abbildung 3.5: Häufigkeit der definierten Abbruchkriterien im IHP Test.....	49
Abbildung 3.6: Aktivitätssteigerung durch Applikation von Buprenorphin.....	50
Abbildung 3.7: Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten in Serum und Gehirn.....	52
Abbildung 3.8: Dosis- und stammesabhängige Serumkonzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten.....	53
Abbildung 3.9: Metabolisches Verhältnis (MR) im Serum.....	54
Abbildung 3.10: Dosis- und stammesabhängige Konzentration von Buprenorphin und seiner Metaboliten im Gehirn.....	55
Abbildung 3.11: Dosis- und stammesabhängige Verteilung von Buprenorphin und seiner Metaboliten zwischen Gehirn und Blut.....	56
Abbildung 3.12: CYP Aktivität und Proteingehalt in den Leberlappen männlicher C57BL/6J Mäuse.....	61
Abbildung 3.13: Lobuläre CPR Aktivität und Genexpression.....	64
Abbildung 3.14: Stammesabhängige CYP3A Aktivität und Proteingehalt.....	65
Abbildung 3.15: Stammesbedingte CPR Aktivität und Genexpression.....	66
Abbildung 5.1: Übersicht der neu formulierten Hypothesen.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht zur Verteilung und wichtigsten Eigenschaften der μ - (MOR), δ - (DOR), κ - (KOR) und <i>Opioid receptor like-1</i> (ORL1) Opioidrezeptoren	6
Tabelle 1.2: Pharmakologische Vorgehensweise in der Schmerztherapie in Abhängigkeit der prognostizierten Schmerzintensität bei der Maus (modifiziert nach (15, 69))	13
Tabelle 1.3: Verschiedene Dosierungsempfehlungen für Buprenorphin zur Anwendung bei der Maus	13
Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterial	24
Tabelle 2.2: Chemikalien/ Biochemikalien und Reagenzien.....	24
Tabelle 2.3: Puffer und Lösungen.....	25
Tabelle 2.4: Kommerzielle biologische Kits.....	25
Tabelle 2.5: Enzyme.....	26
Tabelle 2.6: DNA/ RNA Ladder.....	26
Tabelle 2.7: Kommerzielle Primer.....	26
Tabelle 2.8: Designte Primer zur SNP Validierung mittels RFLP oder Sanger Sequenzierung	27
Tabelle 2.9: Geräte.....	28
Tabelle 2.10: Software.....	28
Tabelle 2.11: Übersicht der verwendeten Mausgruppen zugeordnet zum jeweiligen Versuch	29
Tabelle 2.12: Verwendete Analgetika	30
Tabelle 2.13: PCR-Programm zur DNA-Fragmentherstellung.....	37
Tabelle 2.14: Optimierte Reaktionsbedingungen der designten Primerpaare	38
Tabelle 2.15: Zusammensetzung des PCR Reaktionsmix	38
Tabelle 2.16: Übersicht verwendeter Restriktionsenzyme (RE) und resultierender DNA-Fragmente	39
Tabelle 3.1: Ergebnisse der SNP Verifizierung bei verwendeten C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (n = 15 pro Stamm).....	58
Tabelle 3.2: Relative Genexpression der <i>Cyp3a</i> Isozyme in den vier Leberlappen und dem Processus papillaris männlicher C57BL/6J Mäuse (n = 10; E = Exponent).....	63
Tabelle 3.3: Relative Genexpression der <i>Cyp3a</i> Isozyme und CYP Regulatoren in der gesamten Leber von männlichen C57BL/6J, Balb/cJ und 129S1/SvImJ Mäusen (n = 8, E = Exponent)	66

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
AHR	<i>Aryl-Hydrocarbon Rezeptor</i>
Alas1	<i>δ-Aminolaevulinat Synthase 1</i>
bp	Basenpaare
bp	Basenpaare
cAMP	Zyklische Adenosinmonophosphat
CAR	Constitutiv androstan Rezeptor
CGRP	calcitonin gene-related peptide
CHE	Schweiz
CHN	China
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPR	NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase
CYP	Cytochrom-P450
D	Deutschland
DOR	δ-Opioidrezeptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated Kinase
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
i.p.	intraperitoneal
IASP	<i>International Association for the study of pain</i>
IHP	Incremental Hot Plate
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
KOR	κ-Opioidrezeptor
Lobus c.	Lobus caudatus
Lobus d. l.	Lobus dexter lateralis
Lobus m.	Lobus medialis
Lobus s. l.	Lobus sinister lateralis
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MOR	μ-Opioidrezeptor
MPE	Maximal möglicher Effekt
MR	metabolisches Verhältnis
MW	Mittelwert
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika

ORL1	<i>Opioid receptor like-1</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCPA	P-Chlorphenylalanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Proc. p.	Processus papillaris
PXR	<i>Pregnan-X-Rezeptor</i>
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rcf	relativer Zentrifugalkraft
RE	Restriktionsenzym
Ref	Referenz
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen Polymorphismus
RLT	RNeasy Lysis Buffer
RLU	relativen Lumineszenzeinheiten
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i> -Kanäle
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vs.	versus
WA	Gewichteter Mittelwert
ZNS	Zentral Nervensystem
β-ME	β-Mercaptoethanol

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Gilbert Schönfelder, der mir ermöglicht hat auf diesem interessanten und interdisziplinären Gebiet zu promovieren. Vielen Dank für die Unterstützung, aber auch für das entgegengebrachte Vertrauen dieses Projekt so frei durchzuführen. Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Jens Kurreck für die überaus konstruktive universitäre Betreuung meiner Promotion danken. Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Lars Lewejohann, der mich mit seiner Expertise in der Verhaltensbiologie unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank geht an meine beiden wissenschaftlichen Betreuerinnen Dr. Silvia Vogl und PD Dr. Bettina Bert, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich in meiner wissenschaftlichen Karriere gefördert haben. Des Weiteren möchte ich der Fachgruppe 95 am BfR für die freundliche Aufnahme danken und dabei besonders meiner Fachgruppenleiterin Frau Dr. Stefanie Banneke, die sich immer Zeit für meine Anliegen genommen hat. Darüber hinaus möchte ich den Tierpflegern herzlich danken, die mich in den professionellen Umgang mit Versuchstieren eingeführt und unterstützt haben. Hierbei möchte ich besonders Frau Carola Schwarck danken, die selbst manches Wochenende mit mir im Tierraum verbracht hat. Des Weiteren möchte ich meiner Bürokollegin Dr. Annalena Riedasch danken, die mich nicht nur fachlich unterstützt hat sondern mit der Zeit eine sehr gute Freundin geworden ist, mit der ich immer herzlich lachen konnte. Natürlich möchte ich auch allen anderen Kollegen und Doktoranden der Abteilung 9 des BfR für ihre Unterstützung, die freundliche Zusammenarbeit und die konstruktiven Kommentare in den Laborseminaren danken. In diesem Zusammenhang möchte ich Dr. Céline Heintz und Dr. Philip Marx-Stoelting für ihre fachliche Expertise danken und Julia Scheinpflug, die mich während der Verifizierung der SNP tatkräftig beim pipettieren unterstützt hat. Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Matthias Steinfath, der sich in den komplexen biologischen Sachverhalt eingedacht und das Simulationsmodell zur Berechnung der zu verwendenden Tierzahl in den Versuchen erstellt hat.

Zum Schluss möchte ich vor allem meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich in allem unterstützt haben, immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich zu der Person gemacht haben die ich heute bin. Darin inbegriffen ist mein Freund Philip Preikschat der mich in allem unterstützt und immer wieder aufgebaut hat. Außerdem möchte ich besonders Marica Grossegeisse und „unserem“ Pferd Avalon für die gemeinsamen entspannten Ausritte am Wochenende danken.