

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Genetisch bedingte Unterschiede der
CYP2C9-Aktivität:
Einfluss von Enzyminduktion**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
Universitätsmedizin Berlin

von
Jonas Benjamin Kuon
aus Schramberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Kirchheiner
 2. Prof. Dr. med. R. Kreuz
 3. Prof. Dr. med. J. Brockmöller

Datum der Promotion: 22.02.2008

Abstract

Tolbutamid ist als Probesubstrat zur Bestimmung der CYP2C9-Aktivität in vivo validiert. Die Wirkung von Rifampicin als CYP2C9 Enzym-Induktor ist in zahlreichen Studien belegt. Vorliegende Studie untersucht die Aktivität von CYP2C9-Polymorphismen mit Tolbutamid als Probesubstrat vor und nach Induktion mit Rifampicin. Nachdem die Probanden in folgende CYP2C9*1/*1 (n = 86), CYP*1/*2 (n = 21), CYP*1/*3 (n = 16), CYP*2/*3 (n = 4) und CYP*3/*3 (n = 3) Gruppen genotypisiert wurden, erhielten 130 gesunde Probanden im ersten Teil eine orale Dosis von 500 mg Tolbutamid. Das Substrat Tolbutamid und seine Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid wurden mittels HPLC im Plasma und Urin gemessen. Die Daten wurden mit nonparametrischen pharmakokinetischen Methoden analysiert und statistisch ausgewertet. Anschließend wurde die Pharmakokinetik von Tolbutamid nach viertägiger Einnahme von 450 mg Rifampicin bestimmt. Die mittlere orale Clearance von Tolbutamid (Standardabweichung) betrug 13,0 (3,2), 12,3 (3,5), 8,7 (1,7), 6,5 (0,7), 2,2 (0,6) mL / min bei (*1/*1), (*1/*2), (*1/*3), (*2/*3), (*3/*3) CYP2C9 Allelträgern (p < 0,001 Jonckheere-Terpstra-Test). Nach Induktion stieg die orale Clearance von Tolbutamid auf 25,6 (9,0), 22,6 (7,1), 16,6 (7,3), 11,2 (2,3), 5,6 (2,2) mL / min bei (*1/*1), (*1/*2), (*1/*3), (*2/*3), (*3/*3) CYP2C9 Allelträgern (p < 0,001). Der Induktionsfaktor wies eine große Variabilität auf (1-5), und obwohl eine Tendenz zu erhöhten Induktionsfaktoren bei Trägern des *3 Allels zu erkennen ist, ergab die Testung keine Signifikanz. Allerdings wirkte sich die Induktion, gemessen an der Clearance-Differenz, bei Wildtyp-Trägern deutlich auf die Clearance aus (p < 0,001 Wilcoxon-Test) während die Induktion bei *3/*3 Genotypen keinen deutlichen Unterschied bewirkte. Bei Trägern der CYP2C9-Polymorphismen besteht relativ gesehen die gleiche Induzierbarkeit. Absolut gesehen ist die CYP2C9-Aktivität bei Trägern der Polymorphismen auch nach Induktion niedrig.

CYP2C9

Tolbutamid

Rifampicin

Genetischer Polymorphismus

Induktion

Abstract

The impact of tolbutamide metabolizing enzyme CYP2C9 and its alleles *2, and *3 is well known. Rifampicin is a potent inducer of CYP2C9. If induction is different between CYP2C9 polymorphisms, was the question of this study. By using tolbutamide as a probe of CYP2C9 activity, we evaluated CYP2C9 phenotype in 130 healthy individuals expressing the CYP2C9*1/*1 (n = 86), *1/*2 (n = 21), *1/*3 (n = 16), *2/*3 (n = 4) and *3/*3 (n = 3) genotype via PCR. Initially, volunteers received a single oral dose of 500 mg tolbutamide. After that the subjects were treated with 450 mg rifampicin for four days. Data were analyzed by non-parametric pharmacokinetics and statistics. The mean oral clearances of tolbutamide (Standard deviation) were 13,0 (3,2), 12,3 (3,5), 8,7 (1,7), 6,5 (0,7), 2,2 (0,6) mL / min in carriers of CYP2C9 genotypes (*1/*1), (*1/*2), (*1/*3), (*2/*3) and (*3/*3), respectively (p < 0,001 Jonckheere-Terpstra-Test). After induction with rifampicin the mean total oral clearance of tolbutamide (SD) increased on 25,6 (9,0), 22,6 (7,1), 16,6 (7,3), 11,2 (2,3), 5,6 (2,2) mL / min in carriers of CYP2C9 genotypes (*1/*1), (*1/*2), (*1/*3), (*2/*3) and (*3/*3), respectively (p < 0,001 Jonckheere-Terpstra-Test). The observed intersubject variability of induction was great (factor of induction was between 1 and 5). Although there might be a tendency to stronger factors of induction of CYP*3/*3 genotypes, statistics failed (p = 0,788 Jonckheere-Terpstra-Test). However, the effect of induction (Clearance difference) was significant in *1/*1 genotypes (p < 0,001 Wilcoxon-Test) and not in *3/*3 genotypes. In conclusion inducibility of CYP2C9-polymorphism was similar, but induced CYP2C9-aktivität in polymorphisms remains low.

CYP2C9

tolbutamide

rifampicin

genetic polymorphism

induction

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pharmakogenetik	1
1.1.1	Arzneistoffmetabolismus	3
1.1.2	Das Cytochrom-P450-Enzymsystem	5
1.1.3	Polymorphismen arzneimetabolisierender Enzyme	8
1.1.4	Erworbene Faktoren der interindividuellen Variabilität des Arzneimetabolismus	12
1.2	Zielsetzung der Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Klinische Studie	15
2.1.1	Studiendesign	15
2.1.2	Fallzahlabeschätzung	15
2.1.3	Probandenauswahl	15
2.1.4	Prüfmedikation	16
2.1.5	Diätetische Maßnahmen	17
2.1.6	Versuchsdurchführung und Studienablauf	17
2.1.7	Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamentenplasmakonzentration	18
2.2	Genotypisierung	19
2.2.1	Erythrozytenlyse	19
2.2.2	DNA-Extraktion	19
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.2.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	21
2.2.5	Bestimmung des CYP2C9-Allels durch PCR-RFLP-Tests	21
2.3	Bestimmung der Medikamentenkonzentration mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	23
2.3.1	Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse	23
2.3.2	Quantifizierung von Tolbutamid und seinen Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid mittels HPLC-Anlage	24
2.4	Analyse der Messdaten und Statistik	28
2.4.1	Pharmakokinetische Begriffe und Parameter	28
2.4.2	Bestimmung pharmakokinetischer Parameter	30
2.4.3	Statistische Analysen	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Charakteristika der Probandenkohorte	31
3.1.1	Einfluss von Körpergewicht und Geschlecht auf den CYP2C9-Metabolismus	32
3.2	Ergebnisse für Tolbutamid	33
3.2.1	Pharmakokinetik von Tolbutamid vor Induktion	33
3.2.2	Pharmakokinetik von Tolbutamid nach Induktion mit Rifampicin	35
3.2.3	Konzentration der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid	36
3.3	Induktion bei Trägern unterschiedlicher CYP2C9-Genotypen	40
3.4	Tolbutamidwirkung auf den Blutzucker	42
4	Diskussion	43
4.1	Häufigkeitsverteilung der CYP2C9-Polymorphismen	43
4.2	Auswirkung des CYP2C9-Genotypen auf den Metabolismus von Tolbutamid	44
4.2.1	CYP2C9-Polymorphismen und der Metabolismus von Tolbutamid	44
4.2.2	CYP2C9-Polymorphismen und die Tolbutamidmetabolite im Plasma und Urin	46
4.3	Induktion durch Rifampicin	47
4.3.1	Auswirkung auf den Metabolismus von Tolbutamid zu Hydroxytolbutamid	47
4.3.2	Auswirkung der Induktion bei verschiedenen CYP2C9-Genotypen	48
4.4	Auswirkung von Rifampicin auf die Blutzucker senkende Wirkung von Tolbutamid	52
4.5	Ausblick	53
4.6	Zusammenfassung	54

Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AUC	Area under the curve
bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
C	Konzentration
CAR	Constitutive androstane receptor
Cl	Clearance
Cl / F	Clearance / bioverfügbare Fraktion (Orale Clearance)
C _{max}	Maximale Konzentration
CYP	Cytochrom-P-450-Enzym
CYP2C9	Cytochrom-P-450-2C9 (Gen oder Enzym)
HPLC	High pressure liquid chromatography
MDR1	Multidrug resistance 1
OATP-C	Organic anion transporting polypeptide-C
PCR	Polymerase chain reaction
PPAR	Peroxisome proliferators activated receptor
PXR	Pregnane X receptor
RFLP	Restriction length fragment polymorphism
RXR	Retinoid X rezeptor
SNP	Single nucleotide polymorphism

1 Einleitung

1.1 Pharmakogenetik

Bei der Therapie mit Medikamenten ist es oft nicht möglich, eine Vorhersage zu treffen, wie der Patient auf das verabreichte Präparat anspricht, ob die eingesetzte Dosierung des Medikamentes ausreicht einen Therapieerfolg zu erzielen oder ein Therapieversagen bis hin zu schweren Nebenwirkungen eintritt. Nach Erhebungen aus dem Jahre 1998 von Lazarou et al. beträgt bei Klinikpatienten die Inzidenz schwerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen 6,7 %, die der tödlichen 0,37 %. Arzneimittelnebenwirkungen sind damit nach koronarer Herzkrankheit, Krebs, Schlaganfall und Lungenkrankheiten noch vor Unfällen, Diabetes mellitus und Pneumonie die fünfthäufigste Todesursache in den USA. Die direkten Folgekosten von Arzneimittelnebenwirkungen werden in den Vereinigten Staaten auf 1,4 bis 4 Milliarden US-Dollar im Jahr geschätzt (Lazarou et al., 1998). Erhebungen in Europa zeigen ähnliche Daten (Schneeweiss et al., 2002).

Diese interindividuelle Variabilität in der Arzneimittelantwort unterliegt vielen Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Vorerkrankungen, einer Komedikation, und genetischer Unterschiede.

Genetische Variabilität beeinflusst die Wirkung von Arzneimitteln von der Absorption bis zur vollständigen Elimination (Evans et al., 2003). Diese findet man auf Seiten der Pharmakokinetik (Absorption, Distribution, Metabolismus und Elimination) eines Medikamentes sowie der Pharmakodynamik (Medikamenteneffekte). Nahezu alle Enzyme des Fremdstoffmetabolismus weisen genetische Varianten, so genannte Polymorphismen, auf. Diese können zur Aktivitätseinschränkung bis hin zum völligen Ausfall führen (Evans et al., 1999). In Tabelle 1 ist eine Auswahl beteiligter Strukturen des Arzneistoffmetabolismus, die genetischer Variabilität unterliegen, aufgeführt.

Tab. 1: Genetische Variabilität bei der Wirkung der Medikamente auf der Ebene der Pharmakokinetik sowie der Pharmakodynamik.

Ebene	Beteiligte Strukturen	Polymorphe Proteine
Pharmakokinetik	Arzneistofftransporter	MDR1
		OATP-C
	Cytochrom-P450-Enzyme	CYP2C9
		CYP2C19
		CYP2D6
	Glutathiontransferasen	GSTM1
	Glukuronyltransferasen	UGT1A1
Pharmakodynamik	Rezeptoren	Beta-1-Adrenorezeptor (ADRB1)
		Beta-2-Adrenorezeptor (ADRB2)
	Zielenzyme	Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)
		Vitamin-K-Epoxid-Reduktase (VKOR)

MDR1=Multidrug resistance 1; OATP-C=Organic anion transporting polypeptid-C; CYP=Cytochrom-P-450-Enzym; GSTM1=Glutathion-S-Transferase M1; UGT1A1=Uridin-Diphosphat-Glukuronosyltransferase 1A1

Pharmakogenetik als Teilgebiet der Klinischen Pharmakologie befasst sich mit dem Einfluss genetischer Faktoren auf die Arzneimittelwirkung.

Eines ihrer wesentlichen Ziele ist es, die Arzneitherapie durch die Berücksichtigung der individuellen, erblichen Eigenschaften des jeweiligen Patienten zu optimieren. Eine verbesserte Wirkung der Arzneitherapie wird, durch eine für den einzelnen Patienten stimmige Dosierung der Medikamente erhofft, weil nur solche Medikamente ausgewählt und passend dosiert werden, die eine gewünschte Wirkung erwarten lassen. Dadurch sollte die Therapie an Sicherheit gewinnen, da Nebenwirkungen vermieden werden können. Mittels einer besseren Vorhersage des therapeutischen Erfolges und einer zutreffenderen Einschätzung des individuellen Risikos einer unerwünschten Arzneimittelwirkung könnte das Auftreten schwerer Komplikationen sowie die zusätzlich entstehenden Kosten arzneimittelverursachter Zwischenfälle reduziert werden.

1.1.1 Arzneistoffmetabolismus

Die Fähigkeit des Organismus, Fremdstoffe wie Arzneimittel durch Verstoffwechslung zu eliminieren wird durch den Arzneimetabolismus und die Exkretion gewährleistet. Die Umwandlung der Fremdstoffe durch biochemische Prozesse, die eine verbesserte Wasserlöslichkeit und damit eine gesteigerte Ausscheidung über Harn oder Galle bewirken, nennt man Biotransformation.

Bei der Biotransformation von Medikamenten unterscheidet man zwei aufeinanderfolgende Reaktionsschritte, die in Phase 1 und Phase 2 unterteilt werden. R.T. Williams beschrieb die Entgiftung von Phenacetin anhand dieser zwei Reaktionsschritte: Phase I enthielt die oxidative Dealkylierung von Phenacetin zu 4-Acetamidophenol, gefolgt von Phase II, in der eine organische Säure gebildet wurde, 4-Acetamidophenylglucuronid (Smith und Williams, 1949).

In Phase I entsteht aus dem Ausgangsstoff durch kleine Molekülmodifikation wie Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse ein polarer Metabolit. In Phase II wird durch die sogenannte Konjugationsreaktion die Ausgangssubstanz oder der polare Metabolit an bestimmte Moleküle des Intermediärstoffwechsels wie Glukuronsäure, Schwefelsäure, Acetat, Aminosäuren oder Glutathion gekoppelt (Williams 1959; Gillette, 1963; Gerok und Sickinger, 1973). Diese Reaktionen werden durch membrangebundene Enzyme im endoplasmatischen Retikulum vor allem in der Leber, aber auch in Niere, Lunge, im Intestinum und anderen Organen katalysiert. So werden vor allem lipophile Substanzen, welche die Lipidmembranen passieren können, in entsprechend hohem Maß durch diese intrazellulären Enzymsysteme metabolisiert. Abbildung 1 zeigt die Biotransformation von Phenacetin.

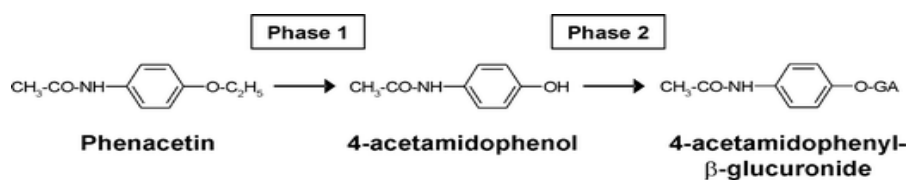


Abb. 1: Meileinstein des Arzneimetabolismus: Biotransformation von Phenacetin (Smith und Williams, 1949).

Die Enzymsysteme unterscheiden jedoch nicht zwischen nützlichen und schädlichen Reaktionen. Der eigentliche Wirkstoff kann aus einer inaktiven Vorstufe („Prodrug“) entstehen, dann spricht man von Bioaktivierung. Sofern durch die Biotransformation giftige Metabolite gebildet werden, nennt man dies Toxifizierung. Häufig aber bewirkt die Biotransformation eine Deaktivierung, d.h. eine Bildung inaktiver Metaboliten. Tabelle 2 stellt die zwei Phasen der Biotransformation mit den jeweiligen Reaktionen und den daran beteiligten Enzymen dar.

Tab. 2: Bedeutende Reaktionen und Enzyme der Biotransformation

	Reaktionen	Enzyme
Phase I	Oxidation	Cytochrom-P450-Enzyme
	Esterspaltung	Esterasen
	Reduktion	Reduktasen
Phase II	Glutathionkopplung	Glutathiontransferasen
	Glukuronidierung	Glukuronyltransferasen
	Schwefelsäurekopplung	Sulfotransferasen
	Acetylierung	Acetyltransferasen

1.1.2 Das Cytochrom-P450-Enzymsystem

Die Cytochrom-P450-Enzyme spielen für den Arzneimetabolismus im menschlichen Organismus eine herausragende Rolle, da in der Regel der erste Schritt in der metabolischen Umwandlung eines Medikamentes die Oxidation ist. Schätzungen zufolge werden mehr als 50 % aller aufgenommenen Medikamente durch das Cytochrom-P450-Enzymsystem metabolisiert (Bertz und Grannemann, 1997).

Über den Fremdstoffwechsel hinaus übernimmt das Cytochrom-P450-System noch eine Vielzahl anderer Aufgaben. Hierzu zählen die Biosynthese von Steroidhormonen, die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zu intrazellulären Botenstoffen oder der Metabolismus von fettlöslichen Vitaminen.

Es handelt sich bei Cytochrom P450 um eine durch eine Supergenfamilie kodierte Gruppe von intrazellulären, membrangebundenen Hämproteinen. Die aus ca. 500 Aminosäuren bestehenden Cytochrom-P450-Enzyme katalysieren oxidative Reaktionen der Phase I der Bio-transformation (Tabelle 2). Diese Enzyme sind hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum der Leber und im Darm lokalisiert. Damit sind sie im Wesentlichen von membrangängigen Substanzen zu erreichen.

Die Cytochrom-P450-Enzyme werden nach ihrer Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit in Familien und Unterfamilien eingeteilt. Gene, die CYPs kodieren und die Enzyme selbst, werden mit „CYP“, gefolgt von einer arabischen Ziffer für die Familie, abgekürzt. Die Subfamilie wird durch einen Grossbuchstaben bestimmt. Zuletzt folgt wieder eine arabische Zahl für das Isoenzym. Mitglieder der Familien müssen eine gemeinsame Aminosäuresequenz von > 40 % vorweisen, die Subfamilie muss eine gemeinsame Aminosäuresequenz von > 55 % vorweisen (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>).

Beim Menschen sind bisher 17 Familien und 42 Subfamilien der Cytochromgene bekannt (<http://drnelson.utmen.edu/CytochromeP450.html>). Dabei ist zu beachten, dass die Familien 1-3 die Metabolisierung von Medikamenten und anderen synthetischen oder natürlichen, exogenen Substanzen gewährleistet, wohingegen mit höheren Nummern versehene Familien größtenteils für die Biosynthese und Metabolisierung endogener Substanzen, z.B. Hormone, verantwortlich sind. Die für die Arzneitherapie besonders wichtigen Cytochrom-P450-Enzyme mit den jeweiligen bedeutenden Substraten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Für den Arzneimetabolismus wichtige Cytochrom-P450-Enzyme mit typischen Substraten (www.medicine.iupui.edu/flockhart)

CYP Familie	Enzyme	Typische Substrate, d.h. davon metabolisierte Medikamente
I	CYP1A1	Warfarin, Amiodaron, Propranolol
	CYP1A2	Clozapin, Imipramin, Koffein, Lidocain, Paracetamol, Theophyllin
II	CYP2A6	Halothan, Nikotin
	CYP2C8	Carbamazepin, Cerivastatin, Paclitaxel, Pioglitazon, Tolbutamid, Verapamil, Warfarin
	CYP2C9	Celecoxib, Clopidogrel, Diclofenac, Fluvastatin, Glibenclamid, Ibuprofen, Tolbutamid, Warfarin
	CYP2C19	Diazepam, Lansoprazol, Omeprazol, Pantoprazol
	CYP2D6	Ajmalin, Amitryptilin, Carvedilol, Codein
III	CYP3A4	Chinidin, Cyclosporin A, Cortisol, Dapson, Diltiazem, Midazolam, Nifedipin, Paclitaxel, Sildenafil, Simvastatin
	CYP3A5	
	CYP3A7	

1.1.2.1 Die CYP2C-Subfamilie CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19

Die zur Gruppe der Cytochrom-P450-Enzyme gehörende Subfamilie CYP2C macht beim Menschen etwa 20 % des Gesamtgehalts der Leber an Cytochrom-P450-Enzymen aus (Shimada et al., 1994). Diese Subfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme trägt zu etwa 18 % zu den von Cytochrom-P450-Enzymen katalysierten Phase-I-Reaktionen des Arzneimetabolismus bei (Wolf und Smith, 1999).

Die CYP2C Subfamilie besteht aus vier Isoenzymen (Nelson et al., 1996; Goldstein und de Morais, 1994), bei denen es sich im Einzelnen um CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 handelt. Die Gene der vier Isoenzyme gruppieren sich auf dem Chromosom 10 in der Region 10q24.2 (Meehan et al., 1988) und liegen in der Reihenfolge Zentromer-RBP4 (Serum-Retinol-bindendes-Protein-Gen)-2C18-2C19-2C9-2C8-Telomer, wie in Abbildung 2 verdeutlicht, vor (Gray et al., 1995). Obwohl die einzelnen Isoenzyme mit mehr als 82 % eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Goldstein und de Morais, 1994), gibt es nur wenige Überschneidungen in ihrer Substratspezifität (Wrighton und Stevens, 1992). Alle diese Enzyme weisen genetische Polymorphismen auf (Goldstein, 2001).

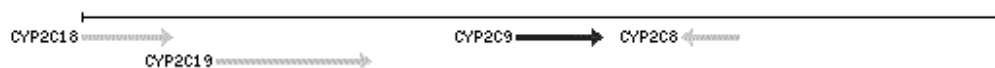


Abb. 2: Anordnung der CYP2C Enzyme auf Chromosom 10q24 (www.ncbi.nlm.nih.gov)

1.1.2.2 Das Enzym CYP2C9 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel

Unter den Mitgliedern der CYP2C-Subfamilie stellt das CYP2C9 mit 60 % den Hauptteil der CYP2C-Isoenzyme in der menschlichen Leber (Goldstein und de Morais, 1994) bereit. Außerhalb der Leber konnte dieses Enzym bisher in etwa 200-fach geringerer Menge nur noch im Intestinum gefunden werden (de Waziers et al., 1990). Das aus insgesamt neun Exons sich zusammensetzende Gen kodiert für ein Hämprotein von 490 Aminosäuren und einer Masse von ~ 52 kDa (Goldstein et al., 1994). Einen Überblick über einige der zahlreichen Substrate bietet die Tabelle 4.

Tab. 4: Nach Substanzklassen geordnete Substrate von CYP2C9 (nach Miners und Birkett, 1998; Brockmöller et al., 2000; <http://medicine.iupui.edu/flockhart>)

Substanzklasse	Vertreter	Substanzklasse	Vertreter
Antiepileptika	Phenytoin	Schleifendiuretika	Torasemid
Nichtsteroidale Antiphlogistika	Diclofenac; Ibuprofen; Celecoxib; Indometacin; Lornoxicam; Naproxen; Meloxicam;	Antidepressiva	Amitriptylin, Fluoxetin
Cumarine	S-Warfarin	HMG-CoA-Reduktasehemmer	Fluvastatin
Sulfonylharnstoffe	Tolbutamid; Glipizid	AT-1-Antagonisten	Losartan, Irbesartan
Orale Antidiabetika/ Insulinsensitizer	Rosiglitazon	Antiöstrogene	Tamoxifen

1.1.2.3 Tolbutamid als CYP2C9 Probesubstrat

Tolbutamid hat eine Bioverfügbarkeit von > 85 % und wird extensiv über CYP2C9 zu 4-Hydroxytolbutamid verstoffwechselt, welches durch Dehydrogenasen zu Carboxytolbutamid oxidiert wird (Thomas et al., 1966; Miners et al., 1996; Veronese et al., 1990). Beide Metabolite werden mit dem Urin ausgeschieden. Dabei stellt der Metabolismus durch CYP2C9 für die Verstoffwechslungsrate den limitierenden Faktor dar (Miners et al., 1996). Dieser Sulfonylharnstoff wird fast ausschließlich über CYP2C9 verstoffwechselt, so dass CYP2C9 auch als *Tolbutamid-Hydroxylase* beschrieben wurde und Tolbutamid nicht nur *in vivo*, sondern auch *in vitro* als CYP2C9 charakterisierendes Testmedikament den Standard darstellt (Miners et al., 1998). Besonders geeignet ist Tolbutamid als CYP2C9-Phänotypisierende Testsubstanz, da die Variabilität in der Tolbutamid-Hydroxylierung auf die genetischen Polymorphismen des CYP2C9-Enzyms zurückzuführen sind (Sullivan-Klose et al., 1996). Somit stellt Tolbutamid, weil es auch leicht und sicher handzuhaben ist, ein ideales Probesubstrat.

1.1.3 Polymorphismen arzneimetabolisierender Enzyme

Pharmakogenetische Varianten in Enzymen des Arzneistoffmetabolismus können zu deutlichen Unterschieden in der Pharmakokinetik, also zu Unterschieden in den Konzentrationen von Arzneistoffen und deren Metaboliten im Blut und in den Zielgeweben, führen.

Die Pharmakokinetik von Arzneimitteln und der Einfluss genetischer Variabilität wird durch pharmakokinetische Kenngrößen wie Plasmakonzentrationen, Clearance, Verteilungsvolumen, Eliminations-Halbwertszeit und Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the concentration time curve*, AUC) beschrieben.

Die im Kapitel 1.1.1 beschriebenen Phase-I-Reaktionen der Arzneistoff-Biotransformation werden meist durch die Enzymfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) vermittelt. Fünf Vertreter dieser Enzymfamilie, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 und CYP1A2, metabolisieren den weitaus größten Teil aller lebergängigen Medikamente (Shimada et al., 1994). Für CYP2D6 und CYP2C19 sind genetische Polymorphismen detektiert worden, die zu einem völligen Fehlen des jeweiligen Enzyms führen (De Morais et al., 1994; Sachse et al., 1997). Bei CYP2C9 gibt es Polymorphismen, welche die Enzymaktivität stark herabsetzen (Miners, 1998). Die interindividuelle Variabilität der Aktivität von CYP3A4 ist hingegen nach heutigem Kenntnisstand nur zu einem geringen Teil durch definierte Genpolymorphismen erklärbar (Sata et al., 2000).

In Tabelle 5 sind wichtige Enzyme des Arzneimetabolismus (Phase I und Phase II), die einen funktionell bedeutsamen erblichen Polymorphismus aufweisen, dargestellt. Die angegebene Häufigkeit homozygoter Genotypen bezieht sich auf Kaukasier. Die in der Tabelle angegebenen Substrate unterstreichen die Bedeutsamkeit dieser Enzyme und ihre Polymorphismen für die Therapie mit Medikamenten.

Tab. 5: Wichtige Enzyme des Arznei- bzw. Fremdstoff-Metabolismus mit einem erblichen Polymorphismus (Kirchheiner et al., 2003)

Phase I	Funktionelle Bedeutung des Polymorphismus	Häufigkeit homozygoter genetischer Varianten*	Bedeutung für folgende Arzneistoffe
Cytochrom P450 (CYP) 1A2	Hohe Induzierbarkeit	46 %	Clozapin, Imipramin, Koffein, Paracetamol
CYP2A6	Reduzierte Aktivität	1 %	Fadrazol, Halothan
CYP2B6	Reduzierte Aktivität	2 %	Bupropion, Propofol
CYP2C8	Reduzierte Aktivität	1,7 %	Carbamazepin, Cervistatin, Paclitaxel
CYP2C9	Reduzierte Aktivität	1-3 %	Celecoxib, Clopidogrel, Diclofenac, Fluvastatin, Tolbutamid
CYP2C19	Fehlende Aktivität	3 %	Diazepam, Lansoprazol, Omeprazol, Pantoprazol
CYP2D6	Fehlende Aktivität	7 %	Ajmalin, Flecainid, Haloperidol
CYP3A4 CYP3A5 CYP3A7	Aktivitätsabschwächung, Expression von CYP3A7 beim Erwachsenen	Mehrere, teils seltene Mutationen	Chinidin, Cyclosporin A, Cortisol, Dapson, Diltiazem, Erythromycin
Phase II			
Arylamin-N-Acetyltransferase 2 (NAT2)	Langsame Acetylierer	55 %	Isoniazid, Hydralazin, Sulfonamide, Procainamid
Uridin-Diphosphat-Glukuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)	Reduzierte Aktivität	10,9 %	Irinotecan
Glutathion-S-Transferase M1 (GSTM1)	Fehlende Aktivität	55 %	Disposition zu Harnblasenkarzinom
Catechol-O-Methyltransferase (COMT)	Verminderte Aktivität	25 %	Estrogene, L-Dopa, Amphetamin
Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)	Fehlende Aktivität	0,3 %	Azathioprin, 6-Mercaptopurin

*Häufigkeit auf homozygoten Genotyp unter Kaukasiern bezogen.

1.1.3.1 Genetische Polymorphismen des Enzyms CYP2C9 und ihre pharmakokinetische Auswirkung

Im Zusammenhang mit familiär auftretenden starken Nebenwirkungen bei der Einnahme von Phenytoin wurde bereits 1964 eine erblich bedingte insuffiziente Hydroxylierung dieses Antiepileptikums diskutiert (Kutt et al., 1964). In einer pharmakogenetischen Studie zur Metabolisierung des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid wurden bei 50 Patienten und Probanden ein bis zu 9-facher Unterschied in der Tolbutamidclearance und ein Hinweis auf eine trimodale Verteilung der Tolbutamideliminierungsraten festgestellt. Die Autoren vermuteten, dass ein genetischer Polymorphismus der defizienten Tolbutamidhydroxylierung zugrunde liegen könne (Scott und Poffenbarger, 1979). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass die Hydroxylierung von Phenytoin und Tolbutamid durch das gleiche Enzym katalysiert wird und es sich hierbei um das Enzym CYP2C9 handelt (Relling et al., 1990). Neben dem Wildtyp wurden noch mindestens 5 funktionell unterschiedlich wirksame Allelvarianten dieses Enzyms entdeckt (Lee et al., 2002; <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2C9.htm>). Während zahlreiche *in-vitro*- und *in-vivo*-Arbeiten über den Einfluss der Allele *2 und *3 auf die Pharmakokinetik von Medikamenten veröffentlicht wurden, existieren über die Allele *4, *5 und *6 nur spärliche *in-vitro*- bzw. Einzelfall-Studien (Lee et al., 2002; leiri et al., 2000; Dickmann et al., 2001; Kidd et al., 1999). Die Prävalenz der einzelnen CYP2C9-Allele unterliegt erheblicher interethnischer Varianz. Während die Allele *2 und *3 bei Afrikanern und Ostasiaten praktisch nicht vorkommen, wurden die Allele *4, *5 und *6 bisher bei Kaukasiern nicht gefunden und somit bei der vorliegenden Arbeit vernachlässigt. Einen Überblick über die prozentuale Verteilung der auf den Allelen *1, *2 und *3 basierenden CYP2C9-Genotypen in verschiedenen ethnischen Bevölkerungen gibt Tabelle 6.

Tab. 6: Prozentuale Anteile des CYP2C9-Genotyps in einzelnen ethnischen Populationen (Lee et al., 2002)

Allele von CYP2C9	Anteil bei Kaukasiern	Anteil bei Afrikanern	Anteil bei Asiaten
CYP2C9*1/*1	65 % (49-70 %)	87-97 %	92-98 %
CYP2C9*1/*2	20 % (16-34 %)	2-9 %	0 %
CYP2C9*1/*3	12 % (10-16 %)	1-4 %	2-8 %
CYP2C9*2/*2	0,9 % (0-6 %)	0 %	0 %
CYP2C9*2/*3	1,4 % (1-2 %)	0 %	0 %
CYP2C9*3/*3	0,4 % (0-1 %)	0 %	0 %

Die Allele *2 und *3 entstehen durch einzelne Punktmutationen der chromosomalen DNA (single nucleotide polymorphisms, SNPs), welche den Austausch von jeweils einer Aminosäure an Position 144 bzw. 359 der Aminosäurenkette zur Folge haben. Der Wildtyp CYP2C9*1 besitzt in der Position 144 seiner Aminosäurenkette die Aminosäure Arginin, an der Position 359 die Aminosäure Isoleucin (CYP2C9*1Arg¹⁴⁴/Ile³⁵⁹). Bei CYP2C9*2 ist das Arginin durch Cytosin ersetzt (CYP2C9*2Cys¹⁴⁴/Ile³⁵⁹), bei CYP2C9*3 das Isoleucin durch Leucin (CYP2C9*3Arg¹⁴⁴/Leu³⁵⁹). Die einzelnen Allelvarianten weisen unterschiedliche Enzymaktivitäten auf, wie Tabelle 7 darstellt. Zahlreiche Arbeiten belegen, dass sowohl *2 als auch *3 die Clearances zahlreicher klinisch relevanter Medikamente *in vitro* signifikant senken und Nebenwirkungen bei Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite vermehrt eine Senkung der Dosis *in vivo* erforderlich machen (Lee et al., 2002; Goldstein 2001; Takahashi et al., 2000). Klinische Studien konnten darlegen, dass die zwei CYP2C9-Allele die Enzymaktivität unterschiedlich herabsetzen: CYP2C9*3 bewirkt bei den meisten CYP2C9-Substraten einen deutlich verlangsamten Metabolismus, während CYP2C9*2 in den meisten klinischen Studien nur geringe Auswirkung auf die Enzymaktivität zeigte (Kirchheiner et al., 2002, [1-3]; Yasar et al., 2001). Eine Ausnahme macht das CYP2C9-Substrat S-Warfarin: Träger des Genotyps CYP2C9*2/*2 zeigen eine deutlich niedrigere orale S-Warfarin-Clearance (Scordo et al., 2002) sowie ein höheres Blutungsrisiko (Aithal et al., 1999). Teilweise existieren also für das CYP2C9*2 Allel Unterschiede in der Aktivität je nach Medikament. So ist die Aktivität von CYP2C9*2 Trägern für das Medikament Torasemid gar nicht eingeschränkt, aber für das Medikament Naproxen ist in der Literatur eine deutliche Einschränkung belegt (Kirchheiner et al., 2004).

Tab. 7: Mögliche Kombinationen der CYP2C9-Allele und ihre zu erwartende Aktivität (Brockmüller et al., 2000)

Genotyp	Anzahl aktiver Allele	Zu erwartende Aktivität
CYP2C9*1/*1	2	Hoch
CYP2C9*1/*2	2	Hoch (allenfalls leicht eingeschränkt)
CYP2C9*2/*2	2	Niedrig
CYP2C9*1/*3	2	Niedrig
CYP2C9*2/*3	2	Niedrig
CYP2C9*3/*3	2	Sehr niedrig

1.1.4 Erworbene Faktoren der interindividuellen Variabilität des Arzneimetabolismus

Der Arzneimetabolismus unterliegt einerseits, wie oben beschrieben, den am Arzneimetabolismus beteiligten Enzymen und deren genetisch bedingten Polymorphismen. Neben diesen angeborenen Faktoren spielen erworbene Faktoren, die für die individuellen Unterschiede im Arzneimetabolismus verantwortlich sind, eine bedeutende Rolle. Um eine patientenorientierte Behandlung gewährleisten zu können, müssen individuelle Faktoren wie Alter, Gewicht, Geschlecht, Begleiterkrankungen sowie eine Komedikation des Patienten berücksichtigt werden. Neben dem Lebensstil und der Ernährung können der Konsum von Genussmittel wie Alkohol und Zigaretten zu Veränderungen im Arzneimetabolismus führen. Nahrungsbestandteile wie z.B. im Grapefruitsaft haben eine hemmende Wirkung auf das metabolisierende P450-Enzymsystem (Ho et al., 2001). Die Pharmakokinetik wird vor allem auf der Ebene der Enzyminduktion und –inhibition stark beeinflusst. Induktion und Inhibition von Enzymen scheinen einen großen Einfluss auf das Auftreten von unerwünschten Begleiterscheinungen und / oder eine fehlende therapeutische Effizienz zu haben (Ingelman-Sundberg, 2001).

1.1.4.1 Enzyminduktion

Ein besonderes Phänomen in der Arzneitherapie ist die so genannte Enzyminduktion. Sie ist Ursache vieler Arzneimittelwechselwirkungen, die die Effizienz einer Arzneimitteltherapie stark beeinflussen kann. Das Phänomen der Enzyminduktion wurde bereits vor ca. 50 Jahren von H. Remmer und Kollegen entdeckt, die gesehen hatten, dass Ratten bei der ersten Behandlung mit dem Medikament Phenobarbital sehr lange schliefen, nach folgenden Behandlung aber viel weniger. Die weitere Erforschung ergab, dass es unter Behandlung mit Phenobarbital zu einer vermehrten Bildung arzneimetabolisierender Enzyme kam. Auch konnte als Zeichen der vermehrten Bildung von Eliminationsenzymen und Transportproteinen ein Anstieg der Lebergröße festgestellt werden (Remmer et al., 1963). Enzyminduktion führt durch Aktivitätserhöhung des metabolisierenden Enzymsystems zu einem beschleunigten Abbau der induzierenden Substanz wie auch anderer Pharmaka. Die Metabolisierungskapazität steigt innerhalb weniger Tage rasch und fällt nach Absetzen des Induktors innerhalb von Tagen bis Wochen auf das ursprüngliche Niveau wieder ab.

Der molekulare Mechanismus der Enzyminduktion ist heute weitgehend aufgeklärt. In der Regel binden bestimmte Substanzen (einige sind in Tabelle 8 genannt) an zytoplasmatisch lokalisierte Proteine, so genannte nukleäre Transkriptionsfaktoren, die dann in den Zellkern transloziert werden. Dort binden sie an spezifische DNA-Abschnitte und führen zu einer gesteigerten mRNA-Bildung und konsekutiv zu einer gesteigerten Enzymbildung.

Tab. 8: Induktionstypen mit unterschiedlichen molekularen Mechanismen

Induktionstyp	Auslösend	Zielstruktur	Mechanismus
Methylcholanthren	Tabakrauch, Omeprazol	CYP1A	Ah-Rezeptor
Phenobarbital	Phenobarbital, Rifampicin	CYP2B	CAR
Pregnenolon-16-alpha carbonitril (PCN)	Rifampicin, Dexamethason, Carbamazepin, Hyperforin	CYP3A, CYP2C	PXR, RXR
Clofibrat	Clofibrat	CYP4A	PPAR

Ah-Rezeptor = Aryl hydrocarbon Rezeptor; CAR = Constitutive androstane receptor; PXR = Pregnane X receptor; RXR = Retinoid X receptor; PPAR = Peroxisome proliferators activated receptor.

1.1.4.1.1 Induktion von CYP2C9 durch Rifampicin

Die Induktion von CYP2C9 durch Rifampicin wird über den Pregnane X Rezeptor (PXR) vermittelt (Chen et al., 2004). Rifampicin bindet an PXR, ein nukleärer Transkriptionsfaktor, und aktiviert diesen. Der Rifampicin-PXR-Komplex bildet daraufhin eine heterodimere Struktur mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR), welche dann an bestimmte Zielstrukturen der DNA bindet und die Transkription von CYP2C9-DNA aktiviert. Das Resultat ist eine gesteigerte CYP2C9 Proteinbiosynthese.

Neben Rifampicin werden weitere Induktoren des Enzyms CYP2C9 in Tabelle 9 aufgeführt.

Tab. 9: Induktoren des Enzyms CYP2C9 geordnet nach Substanzklassen (<http://medicine.iupui.edu/flockhart>)

Substanzklasse / Stoff	Induktor des Enzyms CYP2C9
Antituberkulotika	Rifampicin
Barbiturate	Secobarbital
Antikonvulsiva	Carbamazepin

Rifampicin wird häufig als Induktor von CYP2C9 verwendet, da es unter den für die Induktion zur Verfügung stehenden Substanzen (Alternativen siehe Tabelle 9) eine hohe enzyminduzierende Potenz hat (Miners und Birkett, 1998) und als die bei weitem verträglichste Substanz gilt. Bekannte Nebenwirkungen von Rifampicin sind eine ungefährliche Verfärbung von Schweiß und Urin, ein grippeähnliches Gefühl, und eine mögliche Erhöhung der Transaminasen.

Immer wieder wird die Frage gestellt, ob die bekannten Polymorphismen nicht nur die Funktion, sondern auch die Induzierbarkeit des Enzyms beeinflussen. Zudem belegen *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen, dass Polymorphismen, so genannte SNPs, in der Promotorregion von CYP2C9 gefunden worden sind, die mit dem bekannten *3 Allel verknüpft und die Transkriptionsaktivität zu beeinflussen scheinen (Shintani et al., 2001; Xie et al., 2002). Es ist denkbar, dass die Enzyminduktion entweder in gleicher Weise die Aktivität bei Trägern niedrig- und hochaktiver Genvarianten erhöht, also wie ein konstanter Faktor wirkt. Es sind aber auch Wechselwirkungen in der Art denkbar, dass die genetischen Unterschiede durch die Enzyminduktion nivelliert oder potenziert werden. Beide Hypothesen könnte man molekular begründen, in der vorliegenden Studie soll klinisch geprüft werden, was zutrifft.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Studie ist es, die interindividuelle Variabilität des Ausmaßes der Induktion von CYP2C9 durch Rifampicin in Abhängigkeit der CYP2C9-Allelvarianten *2 und *3 zu untersuchen. Speziell ging es um die Frage, ob sich bei Trägern der unterschiedlichen Genvarianten die Enzyminduktion in gleicher oder unterschiedlicher Weise auswirkt.

Als phänotypisierende Testsubstanz soll Tolbutamid eingesetzt werden. Als Prototyp eines Enzyminduktors soll Rifampicin verwendet werden.

Unter den Genvarianten interessierten zwei Varianten, die jeweils zu einem Aminosäureaustausch im Enzym CYP2C9 führen, nämlich die Variante *2 (Arginin-144-zu-Cystein-Austausch) und die Variante *3 (Leucin-359-zu-Isoleucin-Austausch).

Daraus resultieren folgende Untersuchungen:

1. Auswirkung der CYP2C9 Allele *2 und *3 auf den Metabolismus von Tolbutamid
2. Auswirkung der Induktion mit Rifampicin auf den Metabolismus von Tolbutamid
3. Auswirkung der Allelvarianten *2 und *3 auf die Induktion mit Rifampicin

2 Material und Methoden

2.1 Klinische Studie

2.1.1 Studiendesign

Dieser Arbeit liegt eine prospektive, offene, nicht randomisierte humanpharmakologische Studie zugrunde. Insgesamt sollten an der Studie 150 Probanden (75 männliche und 75 weibliche) teilnehmen. Alle wurden am ersten Tag hinsichtlich der Pharmakokinetik von Tolbutamid untersucht, erhielten für 4 Tage eine Dosis von 450 mg Rifampicin täglich und wurden daraufhin 12 Stunden nach letzter Rifampicin-Dosis nochmals pharmakokinetisch charakterisiert.

Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäß den Richtlinien der „Good Clinical Practice“ am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité durchgeführt. Alle teilnehmenden Probandinnen und Probanden wurden über die Studie eingehend mündlich und schriftlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

2.1.2 Fallzahlabeschätzung

Ziel der Fallzahlabeschätzung ist es, mindestens einen Langsammetabolisierer der Genotypen $*2/*2$, $*2/*3$ oder $*3/*3$ in der untersuchten Probandengruppe vorweisen zu können. Die erwartete Häufigkeit dieser Langsammetabolisierer liegt bei etwa 3 %. Um einen genetischen Polymorphismus, der mit der Häufigkeit 3 % auftritt mit 95 % Wahrscheinlichkeit mindestens einmal in einer Gruppe Probanden zu finden, ist folgende Fallzahl erforderlich: $p^n = 0,05$. n: gesuchte Fallzahl; p: Wahrscheinlichkeit, keine Variante zu finden, bei 3 % Häufigkeit ist $p = 0,97$. $n = \ln 0,05 / \ln 0,97$; ergibt $n = 98$ Probanden.

2.1.3 Probandenauswahl

Probanden, die in die klinische Studie eingeschlossen wurden, mussten Nichtraucher sein und durften keine körperlichen oder seelischen Erkrankungen haben. Probandinnen durften keine oralen Kontrazeptiva einnehmen und nicht schwanger sein. Der BMI sollte zwischen 18 und 25 kg / m² sein, das Alter zwischen 18 und 50 Jahre. Laborchemisch und im EKG durften keine Auffälligkeiten sein. Es wurden für diese Studie nur Personen deutscher Abstammung, um das Risiko systematischer Fehler durch andere, nicht mit CYP2C9 zusammenhängende Genpolymorphismen zu reduzieren, eingeschlossen.

2.1.4 Prüfmedikation

An den zwei ersten Studientagen der Phase 1 und 2 wurde jeweils einmal 500 mg Tolbutamid (Rastinon®, Aventis, Frankfurt, Deutschland, Strukturformel siehe Abbildung 3) oral verabreicht. Die übliche Dosierung bei Diabetes mellitus beträgt 1 g nach dem Frühstück, die bei Bedarf auf 2 g erhöht werden kann. Somit liegt die verwendete Dosis unterhalb der üblichen therapeutischen Dosis.

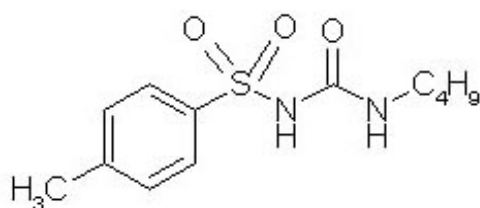


Abb. 3: Tolbutamid

Zur Enzyminduktion wurde Rifampicin (Rifa®, Grünenthal, Aachen, Deutschland, Strukturformel siehe Abbildung 4) über 4 Tage zu jeweils 450 mg oral verabreicht.

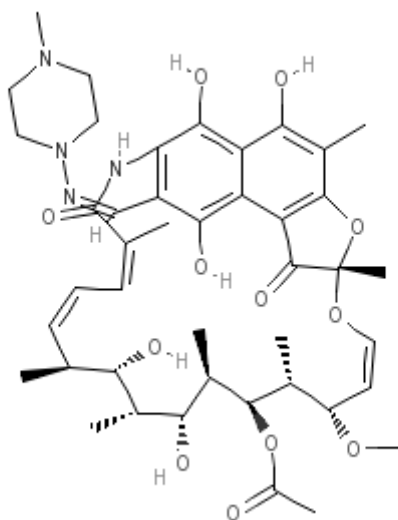


Abb. 4: Rifampicin

2.1.5 Diätetische Maßnahmen

Die Probanden müssen vor und während der Studie eine „interaktionsarme Diät“ halten. Manche Arzneimittel, aber auch Nahrungsbestandteile beeinflussen – in diesem Fall vor allem induzieren – die Aktivität oxidativer Enzyme und würden daher das Studienergebnis stören. Interaktionsarme Diät bedeutet daher ab einer Woche vor der Studie bei der Ernährung auf Gegrilltes, Broccoli, Kohlsorten, Grapefruitsaft und chininhaltige Getränke zu verzichten. Xanthinhaltige Nahrungsmittel wie Schokolade, Bananen, Kakao, schwarzer oder grüner Tee, Kaffee oder Cola sollten auf pro Tag maximal 2 Tassen Kaffee oder 2 Bananen oder 50 g Schokolade reduziert werden. Alkoholhaltige Speisen oder Getränke sollten auf maximal 0,5 l Bier oder 200 ml Wein beschränkt werden. Medikamente wie Heiltees oder Heilkräuter (z.B. Johanniskrauttee) waren gänzlich untersagt. Ab 24 Stunden vor und bis 48 Stunden nach Tolbutamideinnahme wurde der Proband angehalten, vollständig auf xanthinhaltige Nahrungsmittel sowie auf alkoholhaltige Speisen und Getränke zu verzichten. Die Probanden sollten an den Tagen der Testsubstanzeinnahme von 22 Uhr des Vortages an nüchtern sein.

2.1.6 Versuchsdurchführung und Studienablauf

Die Studie gliedert sich in 2 Phasen. In Phase 1 wird die individuelle Tolbutamidkinetik ohne Induktor, in Phase 2 unter Induktion mit Rifampicin untersucht. Die Belastung der Probandinnen und Probanden bestand in einer zweimaligen Verabreichung einer Testdosis von 500 mg Tolbutamid oral, einmal in Phase 1 und einmal in Phase 2 und anschließend jeweils 7 Blutabnahmen. Die Kinetikmessung erfolgte an den beiden Studientagen über 48 Stunden. Nach einer Nüchternblutabnahme wurde die Testsubstanz Tolbutamid verabreicht und es folgten Blutabnahmen à 9 ml in einem EDTA-Röhrchen nach folgendem Zeitschema: 0; 0,5; 2; 4; 8; 24; und 48 Stunden. Um hypoglykämischen Reaktionen entgegenzuwirken wurden den Probanden nach 0,5 sowie 2 Stunden 200 ml Apfelsaft (Glukose 10 %) gereicht. Um hypoglykämische Entgleisungen zu erkennen wurde nach den ersten 4 Blutabnahmen die Blutzuckerkonzentration mit einem BZ-Messgerät (Accutrend Sensor, Hestia Pharma GmbH Mannheim, Deutschland) gemessen. Nach der 4. Blutabnahme wurde ein standardisiertes Mittagessen nach diätetischen Vorschriften den Probanden gereicht. Von da an durfte unter Berücksichtigung der „interaktionsarmen Diät“ Nahrung zu sich genommen werden. Der Urin wurde bis zur Blutabnahme nach 8 und dann noch bis zur 24-h-Abnahme gesammelt. Der Studientag in Phase 2 verlief wie in Phase 1 mit der Ausnahme, dass der Proband 4 Tage vor dem 2. Studientag jeweils abends 450 mg Rifampicin oral einnehmen musste. Tabelle 10 gibt den Studienablauf der beiden Studientage wieder.

Tab. 10: Ablauf der Studientage

	Prä	0 h	0,5 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Durchgehende Präsenz auf Station		■						
Keine Nahrung / Getränke außer Wasser	- 8 h	■						
200 ml Apfelsaft (Glc 10 %)			▲	▲				
Standardisiertes Mittagessen auf Station					▲			
Nahrung / Getränke ohne Einschränkung					■			
Blutabnahme für Kinetik (9 ml)	▲		▲	▲	▲	▲	▲	▲
Blutzuckertest			▲	▲	▲			
Urinsammelperioden		■ 0-8 h				■ 8-24 h		

Blutzuckertest jeweils nach der Blutentnahme. Standardisiertes Mittagessen auf Station sowie Nahrung / Getränke ohne Einschränkung im Rahmen der interaktionsarmen Diät. Glc: Glukosekonzentration. h: Zeit in Stunden.

2.1.7 Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamentenplasmakonzentration

Die für die Medikamentenspiegelbestimmung (EDTA-Röhrchen) vorgesehenen Blutproben wurden unmittelbar nach der Abnahme 10 min bei 5000 U / min zentrifugiert. Das so gewonnene Blutplasma wurde in Falconröhrchen überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei – 20°C gelagert. Für die Messung der Tolbutamidmetaboliten aus dem gesammelten Urin wurden jeweils 20 ml Urin in Falconröhrchen überführt und bei – 20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2 Genotypisierung

Zur DNA-Extraktion wurden pro Proband etwa 5 ml venöses Blut einer aufgetauten EDTA-Monovette benötigt. Die DNA wurde dann aus den kernhaltigen Leukozyten gewonnen.

2.2.1 Erythrozytenlyse

Mindestens 3 ml aufgetautes Vollblut wurde mit 35 ml Ery-Lyse-Puffer versetzt und kurz gemischt. Durch diesen Vorgang werden die kern- und DNA-losen Erythrozyten zerstört, während kernhaltige Blutbestandteile aufgrund ihrer höheren Membranstabilität intakt bleiben. Um das DNA-haltige Zellsediment zu isolieren und für die DNA-Extraktion vorzubereiten, wurden die Proben anschließend für 30 min bei 2000 U / min zentrifugiert, der Überstand verworfen und nach Zugabe von 1,5 ml TEN-Puffer (bestehend aus Tris / HCl, EDTA und NaCl) bei – 20°C eingefroren.

2.2.2 DNA-Extraktion

In einem zweiten Schritt konnte die in den Leukozyten enthaltene DNA mithilfe des Phenol-Chloroform-Verfahrens extrahiert werden. Hierzu mussten zu Anfang die Zellsedimente mit 1,5 ml Lyse-Puffer und 100 µl Proteinase-K-Lösung bei 37°C für 12 h verdaut werden. Zur Ausfällung der Proteine versetzte man das Reagens mit 1,5 ml einer Phenol- / Chloroform-Lösung und zentrifugierte es. Zur Eliminierung verbliebener Lipidbestandteile wurde im Rahmen der Chloroform-Nachextraktion die obere wässrige Phase abpipettiert und nochmals mit 1,5 ml Chloroform versetzt und zentrifugiert. Danach folgte die DNA-Präzipitation. 2 ml des Überstandes wurden mit 6 ml 96 %-igem Ethanol und 100 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,5) überpipettiert und zentrifugiert, woraufhin die ausgefällte DNA schließlich am Boden des Gefäßes haftete. Der Überstand wurde abgegossen. Die DNA wurde durch Zugabe von 3 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert. Nachdem der dabei entstehende Überstand abgegossen worden war, wurden die Proben für 30 min auf dem Kopf stehend auf Zellstoffpapier gestellt, so dass der verbliebene Alkohol abtropfen und verdunsten konnte. Abschließend wurde die DNA in TEN-Puffer (10 mM Tris-Puffer / 1 mM EDTA, pH 8) aufgelöst bei 4°C bis zur PCR in sterilen Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine *In-vitro*-Technik, die eine Vervielfältigung von spezifischen DNA-Sequenzen in zellfreien Milieu ermöglicht und diese somit für weitere Analyseverfahren zugänglich macht. Zur Durchführung einer PCR wird in einem „Thermocycler“, der die vollautomatische Steuerung von Temperaturzyklen gewährleistet, eine Reaktionspufferlösung mit folgenden Stoffen gegeben: eine geringe Menge doppelsträngige DNA, eine hitzestabile DNA-Polymerase (sog. *Taq*-Polymerase), die bei Temperaturen von 90-95°C nicht denaturiert, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sowie zwei synthetische Oligonukleotid-Primer, die zu Sequenzen beiderseits des DNA-Abschnittes, den man vervielfältigen möchte, komplementär sind. Das Prinzip lässt sich vereinfacht in 3 Schritte einteilen. Im ersten Schritt werden beide Stränge der DNA durch Temperaturerhöhung auf 94°C getrennt (Denaturierung). Nach Abkühlung auf 57-60°C binden die Primer im zweiten Schritt an die komplementären Stellen der nun einsträngigen DNA-Matrize (Hybridisierung). Im dritten Schritt erfolgt bei einer für die Funktion der DNA-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur die Verlängerung der Primer und die Synthese komplementärer DNA-Sequenzen (DNA-Synthese). Am Ende dieses Zyklus, der etwa 5 Minuten dauert, liegen 2 neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrize dienen und an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur noch Amplifikate gewünschter Länge. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz. Nach über 30 Durchläufen liegt die DNA theoretisch 2^{30} – mal vor. Der Vorteil an dieser Synthesemethode ist, dass die *Taq*-Polymerase hitzestabil ist und somit die aufeinander folgenden Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte einander abwechseln können, ohne dass zwischendurch neues Enzym beigefügt werden muss.

2.2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Die so entstandenen amplifizierten DNA-Stücke werden zum Zweck der RFLP-Analyse mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Dies sind Enzyme, die die DNA sequenzspezifisch schneiden und somit in der Regel DNA-Fragmente ähnlicher Länge produzieren. Es können jedoch individuelle Unterschiede in der Nucleotid-Sequenz Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen betreffen, so dass alle Genombereiche in unterschiedliche Fragmente zerlegt werden. Das Vorliegen unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach einem Verdau durch Restriktionsenzyme wird als Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus bezeichnet. Die vervielfältigte und geschnittene DNA kann im nächsten Schritt durch eine Agarosegelelektrophorese untersucht werden. Die Fragmente wandern abhängig von ihrer Größe unterschiedlich schnell durch die netzähnlichen Polysaccharidstrukturen des Agarosegels und werden schließlich durch intercalierende Farbstoffe wie Ethidumbromid sichtbar gemacht. Dieses Verfahren dient der gezielten Suche bekannter Mutationen mithilfe sequenzspezifischer Enzyme, wie beispielsweise der dieser Arbeit zugrunde liegenden CYP2C9-Polymorphismen.

2.2.5 Bestimmung des CYP2C9-Allels durch PCR-RFLP-Tests

Die Bestimmung der Allele 2 und 3 sowie des Wildtypallels erfolgte nach der von Sullivan-Klose et al., 1996 beschriebenen Methode. Hierzu wird 1 µl genomischer DNA jeweils 25 µl des in Tabelle 11 beschriebenen Mastermix zugesetzt, um eine gezielte Amplifizierung der 2 DNA-Segmente, die die beiden Punktmutationen enthalten, zu erhalten. Mittels gelelektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel (1 %, 30 min., 120 V) erfolgte die Kontrolle der PCR-Produkte. Zur Verwendung kam eine Protrans-Kammer. Im Fall von CYP2C9*2 wurde eine 372 bp, im Fall von CYP2C9*3 eine 137 bp lange Bande erwartet. Im Erfolgsfall wurden die entstandenen 2 Typen von DNA-Fragmenten mit einem Enzymmastermix versetzt und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Zur Auswertung in der Elektrophorese wird die Probe nach Zugabe von 10 µl Bromphenolblaupuffer auf 3,5 % Agarosegel aufgetragen und für 60 min bei 100 Volt aufgetrennt (Sullivan-Klose et al., 1996). Die entstehenden Restriktionsmuster für die unterschiedlichen Genotypen können dann abgelesen und zu Dokumentationszwecken fotografiert werden. Sie sind im Detail in Tabelle 11 auf der folgenden Seite dargestellt.

Tab. 11: Durchführung und Ergebnisse von PCR-RFLP und Gelelektrophorese

	CYP2C9*2 (Arg144Cys)			CYP2C9*3 (Ile359Leu)		
PCR-Mastermix	10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 ml			10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 ml		
	MgCl ₂ (25 mM) 1,5 ml			MgCl ₂ (25 mM) 1,5 ml		
	DNTPs (2 mM) 2,5 ml			DNTPs (2 mM) 2,5 ml		
	H ₂ O (steril, bidest) 17,35 ml			H ₂ O (steril, bidest) 17,35 ml		
	Primer 2CL1 (10 mM) 0,5 ml (5'- CACTGGCTGAAAGAGCTAACA GAG -3')			Primer C5 (10 mM) 0,5 ml (5'- AGGAAGAGATTGAACGTGTGA -3')		
	Primer 2CR1 (10 mM) 0,5 ml (5'- GTGATATGGAGTAGGGTCACC CAC -3')			Primer 2C9-6A (10 mM) 0,5 ml (5'- TGCATGGGGCAGGCTGGTGGGGAG AAGGTCAA -3')		
	AmpliTaq Polymerase 0,15 ml			AmpliTaq Polymerase 0,15 ml		
Cycler	2 min 94°C - 35 x (30 s 94°C-10 s 60°C-1 min 72°C) -7 min 72°C-4°C			2 min 94°C -35 x (30 s 94°C-10 s 57°C-40 s 72°C) – 7 min 72°C-4°C		
Restriktionsenzym	Sau 96I			Styl		
Enzymmastermix	7 ml bidest. Wasser			6,5 ml bidest. Wasser		
	2 ml Puffer (Neb4, Fa. New England Biolabs)			2 ml Puffer (Neb4, Fa. New England Biolabs)		
	1 ml Sau 96I			1,5 ml Styl		
Genotyp	*1/*1	*1/*2	*2/*2	*1/*1	*1/*3	*3/*3
Codierung	0	1	2	0	1	2
Muster (bp)		253	253			
	179	179		137	137	
	119	119	119		104	104
	74	74			33	33

2.3 Bestimmung der Medikamentenkonzentration mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

2.3.1 Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse

2.3.1.1 Extraktion

Der eigentlichen Konzentrationsbestimmung wird die Extraktion der Substanz aus den Plasmaproben vorangestellt. Diese dient der Vorreinigung und Anreicherung und führt somit zu einer vereinfachten Detektion in der folgenden Chromatographie. Der Probe wird in der Regel ein Interner Standard (IS) zugesetzt. Hierbei handelt es sich um eine bekannte Menge einer Substanz, die dem zu untersuchenden Stoff chemisch verwandt ist und mit deren Hilfe mögliche Verluste während der Extraktion relativiert werden.

2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand einer Kalibrierkurve, die durch Analyse von definierten Kalibrierstandards erstellt wird. Hierzu werden bei jeder Messung die Konzentrationen einer ausreichenden Anzahl von Eichproben bestimmt, sie umfassen den zu erwartenden Konzentrationsbereich der Probe. Nach Analyse werden die Quotienten der Peakhöhen des Analyten und des Internen Standards gebildet (Analyt / IS) um eventuelle Verluste während der Extraktion auszugleichen. Die Berechnung der Kalibrierkurve erfolgt dann mittels linearer Regression der Peakflächenquotienten der Kalibrierstandards gegen die Konzentration.

2.3.1.3 Durchführung der HPLC

Zur Bestimmung der Plasmamedikamentenkonzentrationen wurde die Methode der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography) durchgeführt, welche sich durch hohe Trennleistung und Empfindlichkeit, hohe Kapazität und schnelle Durchführbarkeit auszeichnet. Das ihr zugrunde liegende Prinzip sind die Verteilungs- und Adsorptionschromatographie, bei der sich Stoffe aufgrund unterschiedlicher Affinität zu zwei nicht miteinander mischbaren flüssigen Phasen zwischen diesen verteilen. Eine der Phasen, die stationäre Phase, ist an einen festen Träger gebunden. Hier fließt die andere, mobile Phase entlang. Im Fall der so genannten RPLC (Reversed Phase Liquid Chromatography) besteht die stationäre Phase aus Kieselgelteilchen, an die *hydrophobe* Substanzen kovalent gebunden sind, und die mobile Phase aus einer pufferhaltigen wässrigen Lösung, die mit einem *hydrophilen* organischen Lösungsmittel gemischt ist.

Die Trennung eines Stoffgemischs durch die HPLC kommt dadurch zustande, dass die verschiedenen in der mobilen Phase gelösten Komponenten, je nach ihrer Affinität zur stationären Phase, langsamer als das Lösungsmittel durch die Säule wandern und sich somit abhängig von ihren hydrophoben Eigenschaften auftrennen. Die einzelnen Stoffe werden abschließend mittels eines nach dem Prinzip der Absorptionsfotometrie messenden UV-Durchflussdetektors bestimmt. Hierbei wird die Intensitätsabschwächung (Extinktion) eines die Probe durchlaufenden Lichtstrahls gemessen, woraus ihre molare Konzentration bestimmt werden kann. Bei diesem Schritt wird auf die oben beschriebene Kalibrierkurve zurückgegriffen. Aus den normierten Messwerten der zu bestimmenden Proben lassen sich nun anhand der erhaltenen Regressionsparameter die unbekannt Konzentrationen ermitteln.

2.3.2 Quantifizierung von Tolbutamid und seinen Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid mittels HPLC-Anlage

2.3.2.1 Herstellung verschiedener benötigter Lösungen, Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben

Stammlösung Tolbutamid: 100 mg Tolbutamid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden in einem Glasgefäß mit 100 ml Methanol (E. Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

Stammlösung Hydroxytolbutamid: 5 mg Hydroxytolbutamid (Ultrafine, Manchester, England) wurden in einem Glasgefäß mit 1 ml Methanol versetzt.

Stammlösung Carboxytolbutamid: 5 mg Carboxytolbutamid (Ultrafine, Manchester, England) wurden in einem Glasgefäß mit 1 ml Methanol versetzt.

Arbeitslösung Hydroxytolbutamid: 10 µl der Hydroxytolbutamid-Stammlösung wurden in einem Glasgefäß mit 990 µl Methanol versetzt (entspricht 10 µl / ml).

Arbeitslösung Carboxytolbutamid: 10 µl der Carboxytolbutamid-Stammlösung wurden in einem Glasgefäß mit 990 µl Methanol versetzt (entspricht 10 µl / ml).

Interne Standardlösung: 10 mg Phenytoin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurden in einem Glasgefäß mit 50 ml Methanol versetzt.

Laufmittel (Mobile Phase): 250 ml Methanol wurden in einem Glasgefäß mit 750 ml Essigsäure (0,05 % E. Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

Es wurden 6 Kalibrierstandards (inklusive Nullplasma) und 5 Qualitätskontrollproben im niedrigen, mittleren und höheren Bereich verwendet. Dazu wurden die jeweiligen Volumina der Tolbutamid-Stammlösung und der Hydroxytolbutamid- bzw. Carboxytolbutamid-Arbeitslösung in 5 ml Glasgefäße gegeben und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Die Proben wurden anschließend mit Leerplasma versetzt und 10 min gemischt. Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.3.2.2 Erstellung der Kalibrationskurve

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurden 6 Kalibrierstandards verwendet. Die Berechnung der Kalibrationskurve erfolgte nach linearer Regression der Peakhöhenquotienten (Analyt / Interner Standard) gegen die Konzentration. Die Konzentrationen der Kalibrierstandards für Hydroxy- und Carboxytolbutamid betragen 0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 und 5,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$; für Tolbutamid 0; 5,0; 10,0; 30,0; 50,0 und 70,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

2.3.2.3 Extraktion der Substanzen

Es wurden jeweils 50 μl Plasma, 5 μl der Arbeitslösung des internen Standards und 10 μl 0,1 N HCl-Lösung in ein 10 ml Glasgefäß gegeben, gemischt und anschließend 1 ml Dichlormethan hinzu pipettiert. Die Proben wurden 20 sec auf dem Überkopfschüttler extrahiert und anschließend 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgesaugt, die organische Phase isoliert und unter Stickstoffstrom bei 40°C zur Trockne eingengt. Die Extrakte wurden daraufhin in jeweils 150 μl Laufmittel gelöst, in HPLC-Injektionsgefäße überführt und ein Aliquot von 10 μl injiziert.

2.3.2.4 Durchführung und Qualitätskontrolle der HPLC-Analyse

Die Proben wurden in einer „reversed-phase-Chromatographie“ analysiert, d.h., die Chromatographie erfolgte auf einer hydrophob beschichteten Kieselgelsäule.

Tab. 12: HPLC-Anlage (Shimadzu, Duisburg)

Pumpe	Flussrate von 0,7 ml / min
Injektor	Injektionsvolumen von 10 μl
Temperatur	60°C
Detektor	UV 280 nm
Laufzeit	20 min

Die Konzentrationsermittlung erfolgte durch Berechnung der Kalibrationskurve nach linearer Regression der Peakhöhenquotienten (Analyt / Interner Standard) gegen die Konzentration. Mit dem Reziprokwert der erhaltenen Steigung der Kalibrationsgeraden wurden die Konzentrationen der Probandenproben ermittelt. Zur Akzeptanz der gewonnenen Ergebnisse wurde die Analyse durch validierte Qualitätskontrollproben kontrolliert, die randomisiert in die Studie eingestreut wurden. Es wurden mindestens drei validierte Qualitätskontrollproben eingesetzt, deren Konzentration jeweils 5-mal gemessen wurde. Ein Analysenverlauf galt als validiert, wenn die Qualitätskontrollproben innerhalb der festgelegten Akzeptanzgrenzen lagen ($\pm 15\%$).

Unter Bestimmungsgrenze versteht man die niedrigste Konzentration eines Analyten in einer Probe, die noch mit einer bestimmten Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann ($\pm 20\%$). Die Bestimmungsgrenzen wurden anhand der Rekalkulierung von Kalibrierstandards und Kontrollen ermittelt. Sie lag für Tolbutamid bei der Analyse von 50 μl Plasma bei 2,0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ für Hydroxy- und Carboxytolbutamid jeweils bei 0,1 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

Tab. 13: Rekalkulation der Kalibrierstandards zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Tolbutamid				
C ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	MW	SD	VK (%)	AR (%)
5.0	4.76	0.36	7.5	95.1
10.0	9.45	0.65	6.8	94.6
30.0	29.76	1.50	5.1	99.2
50.0	49.32	2.21	4.	98.6
70.0	70.64	1.86	2.6	100.9
Hydroxytolbutamid				
C ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	MW	SD	VK (%)	AR (%)
0.25	0.24	0.01	6.1	97.9
0.50	0.45	0.03	6.5	89.2
1.00	1.01	0.06	5.9	100.8
2.50	2.47	0.08	3.4	98.7
5.00	5.02	0.05	0.9	100.4

Carboxytolbutamid

C (µg / ml)	MW	SD	VK (%)	AR (%)
0.25	0.27	0.03	12.5	106.5
0.50	0.52	0.02	4.8	104.4
1.00	1.04	0.09	8.3	103.6
2.50	2.60	0.24	9.4	103.9
5.00	4.95	0.11	2.3	98.9

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient; AR = analytische Richtigkeit

Das HPLC-System arbeitet spezifisch, wenn es in der Lage ist, die zu bestimmenden Substanzen ohne Verfälschung durch andere in der Probe enthaltenen Komponenten zu erfassen. Die Qualität des HPLC-Systems wurde täglich durch die verantwortlichen Analytiker geprüft. Verschiedene humane Leerplasmaproben wurden hinsichtlich der Abwesenheit von Störsubstanzen vor den eigentlichen Analysen getestet.

Bei Analyse von 50 µl Plasma wurde für Tolbutamid im Bereich von 0-70 µg / ml und für die Metabolite im Bereich von 0-5,0 µg / ml eine Linearität der Kalibrierfunktion festgestellt. Alle Korrelationskoeffizienten waren $\geq 0,99$.

Die Präzision ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit von Analyseergebnissen bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter genau gleichen Bedingungen. Man unterscheidet die Intra-assay-Varianz von der Inter-assay-Varianz. Die Intra-assay-Varianz wird durch mehrfache Messung der Qualitätskontrollproben (QC) im Laufe eines Tages bestimmt, während die Inter-assay-Varianz durch Auswertung der Qualitätskontrollproben (QC) über einen Zeitraum von mehreren Tagen berechnet wird.

Tab. 14: Tolbutamid / Inter-assay-Varianz

	QC 3.0 µg / ml	QC 6.0 µg / ml	QC 20.0 µg / ml	QC 60.0 µg / ml
MW	2.86	5.76	19.99	58.87
SD	0.20	0.29	0.96	5.17
VK (%)	7.0	5.1	4.8	8.8
AR (%)	95.4	95.9	99.9	98.1

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient; AR = analytische Richtigkeit

Tab. 15: Hydroxytolbutamid / Inter-assay-Varianz

	QC 0.1 µg / ml	QC 0.4 µg / ml	QC 1.5 µg / ml	QC 4.0 µg / ml
MW	0.10	0.39	1.51	3.92
SD	0.01	0.02	0.05	0.31
VK (%)	11.3	4.2	3.1	7.9
AR (%)	97.2	97.7	100.7	97.9

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient; AR = analytische Richtigkeit

Tab. 16: Caboxytolbutamid / Inter-assay-Varianz

	QC 0.1 µg / ml	QC 0.4 µg / ml	QC 1.5 µg / ml	QC 4.0 µg / ml
MW	0.12	0.41	1.44	4.00
SD	0.02	0.05	0.10	0.46
VK (%)	17.7	14.4	7.2	11.4
AR (%)	115.8	101.4	95.8	100.1

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; VK = Variationskoeffizient; AR = analytische Richtigkeit

2.4 Analyse der Messdaten und Statistik

2.4.1 Pharmakokinetische Begriffe und Parameter

Die einzelnen Messwerte der Blutkonzentrationen von Tolbutamid und seiner Metaboliten wurden in so genannten pharmakokinetischen Parametern zusammengefasst. Einer dieser Parameter, der besonders zur Charakterisierung der Pharmakokinetik nach oraler Dosierung hilfreich ist, ist die AUC (area under the curve = Fläche unter der Kurve). Die AUC dient als Messgröße für das Ausmaß der Bioverfügbarkeit und für das Ausmaß der Exposition des Menschen mit dem Medikament. Trägt man nach Medikamentenapplikation gemessene Plasmakonzentration gegen die Zeit auf, so bezeichnet man die Fläche unter der resultierenden Kurve als AUC. Anders ausgedrückt stellt die AUC das Integral der Konzentrationen über die Zeit dar. Näherungsweise wird die AUC nach der Trapezregel bestimmt, wobei vom letzten Messzeitpunkt die Restfläche im Regelfall entsprechend dem Konzentrationsabfall der gegen Ende gemessenen Konzentrationen gegen unendlich extrapoliert wird. Dies setzt jedoch voraus, dass die Plasmakonzentrationen ausreichend lang verfolgt wurden, um mit hinreichender Präzision extrapoliert zu können.

Aus der AUC kann die totale Clearance eines Medikamentes berechnet werden. Die totale Clearance ist ein geeigneter Parameter zur Charakterisierung und Quantifizierung der Eliminationsprozesse. Sie beschreibt die Möglichkeit des Körpers und seiner Eliminationsorgane, ein bestimmtes Volumen Blut pro Zeiteinheit von einem Arzneistoff zu befreien, d.h. durch Metabolismus und / oder Exkretion eine verabreichte Substanz aus dem Körper zu eliminieren. Sie berechnet sich wie folgt: $Cl = \text{Dosis} / \text{AUC}$.

Diese Beziehung gilt für die intravenöse Dosierung. Bei oraler Medikamentengabe kann nur die orale Clearance Cl / F (Clearance dividiert durch Bioverfügbarkeit) berechnet werden, welche neben der systemischen Clearance auch mögliche präsystemische Clearanceanteile einschließt und von der häufig unbekanntem Resorptionsquote abhängt.

Die Clearance ist additiv, d.h. sie setzt sich aus den Clearanceanteilen der jeweils an der Elimination beteiligten Organe oder Enzyme zusammen.

Während sich in der AUC ausschließlich der *Umfang* der Bioverfügbarkeit niederschlägt, wird zur Quantifizierung ihrer Geschwindigkeit der Absorption und Elimination weitere Zielgrößen gemessen. Hierzu dienen die Spitzenkonzentration C_{\max} nach Einmalapplikation sowie der Zeitpunkt t_{\max} des Erreichens dieser Spitzenkonzentration. Die Höhe von C_{\max} ist für die erreichbare therapeutische Wirkung und die Häufigkeit bzw. Intensität unerwünschter Nebenwirkungen von Bedeutung.

Weitere zur Charakterisierung von Medikamenten verwendete Parameter sind das Verteilungsvolumen (V) und die Halbwertszeit ($t_{1/2}$).

Das Verteilungsvolumen bezeichnet anschaulich das Volumen, in dem sich ein Medikament verteilt. Da sich die meisten Medikamente aber im Körper nicht gleichmäßig verteilen, ist eine andere, rein rechnerische Definition des Verteilungsvolumens in der Regel deutlicher. So wird das Verteilungsvolumen als Quotient aus Dosis und Blutkonzentration berechnet, wobei wiederum wie schon bei der Clearance dies bei oraler Dosierung nur in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit, also als V / F angegeben werden kann und eine genaue Bestimmung des Verteilungsvolumens eine intravenöse Dosierung erfordert.

Die Halbwertszeit bezeichnet die Zeit, in der die Konzentration eines Medikamentes auf die Hälfte gesunken ist. Die Halbwertszeit ist nur eindeutig definiert für diejenigen Medikamente, bei denen ein so genanntes Ein-Kompartiment-Modell vorliegt. Sofern 2- oder 3-Kompartiment-Modelle vorliegen, gibt es mehrere Halbwertszeiten.

2.4.2 Bestimmung pharmakokinetischer Parameter

Die Ergebnisse der Plasmakonzentrationsmessungen wurden durch nonparametrische pharmakokinetische Methoden mittels des Programms WinNonlin™ (Version 1,5, 1997 Scientific Consulting Inc., NC, USA) analysiert. Die AUCs wurden nach der Trapezregel mit Extrapolierung gegen unendlich bestimmt und die Clearance nach oben beschriebener Formel aus der oralen Dosis und den AUCs berechnet. Die orale Clearance ist der Quotient aus der metabolischen Clearance und der Bioverfügbarkeit. Als die jeweilige C_{\max} wurde die höchste gemessene Plasmakonzentration einer einzelnen Kinetik gewertet.

2.4.3 Statistische Analysen

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede hinsichtlich pharmakokinetischer Eigenschaften in Bezug auf die einzelnen Genotypen wurde der Trendtest nach Jonckheere-Terpstra verwendet. Die Reihenfolge zur statistischen Testung von AUC, C_{\max} , und der Clearance wurde entsprechend der Anzahl aktiver Allele wie folgt festgelegt:

CYP2C9*3/*3>*3/*2>*3/*1>*2/*2>*2/*1>*1/*1. Dabei ist es für den P-Wert gleichgültig, ob die Werte in der genannten Reihenfolge steigen oder Fallen; bei der Clearance würde man erwarten, dass diese in der oben genannten Reihenfolge steigt.

Für den Vergleich der pharmakokinetischen Parameter vor und nach Enzyminduktion wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet.

Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der detektierten CYP2C9-Allele erfolgte mittels Chi²-Test.

Statistische Berechnungen und Grafiken wurden mit der Software SPSS (Version 12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Probandenkohorte

Die ausgewählte und ausgewertete Population bestand aus 130 Kaukasiern deutscher Abstammung, davon waren 36 weiblichen und 94 männlichen Geschlechts (74 % männliche zu 26 % weibliche).

Das mittlere Alter betrug 29 ± 9 Jahre bei einem mittleren BMI (Body Mass Index kg / m^2) von $22,8 \pm 2,1$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Zwischen den BMIs der einzelnen Genotypengruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

Die Testmedikation wurde von allen Probanden gut vertragen. Nach Eingangsuntersuchung der Probanden konnten alle Probanden, welche die Kriterien erfüllten, an der Studie teilnehmen. Kein Proband wurde aufgrund Nichteinhaltens der Studienordnung von der Studie ausgeschlossen, allerdings haben einige Probanden ($n = 11$) aus eigener Entscheidung (Zeitgründe) die Studie nach dem ersten Studientag abgebrochen. In Tabelle 17 sind die Probanden nach ihrem CYP2C9-Genotyp angegeben.

Tab. 17: Häufigkeit der CYP2C9-Genotypen und mittlerer BMI (kg / m^2) mit Standardabweichung (SA) unter n Probanden

	CYP2C9 *1/*1	CYP2C9 *1/*2	CYP2C9 *1/*3	Cyp2C9 *2/*2	CYP2C9 *2/*3	CYP2C9 *3/*3	Gesamt
Anzahl	86	21	16	0	4	3	130
Prozent (%)	67	16	12	0	3	2	100
BMI (kg / m^2)	22,9 (0,2)	23,8 (0,3)	21,9 (0,5)	0	22,9 (1,0)	22,6 (1,1)	22,8 (2,1)

Bei Auswertung der Allelfrequenz (Tabelle 18) kam das Allel *1 mit 80,3 % am häufigsten vor. Das *2 Allel folgte mit 10,7 % und das *3 Allel mit 8,8 %. Bis auf das *3 Allel zeigten die Allelhäufigkeiten keinen signifikanten Unterschied verglichen mit der kaukasischen Normalbevölkerung anhand der Werte nach Lee et al., 2002 im Chi-Quadrat-Test.

Tab. 18: CYP2C9-Allelfrequenz der Probanden

Allel	n = 260	Frequenz (%)	Chi-Quadrat ¹
*1	209	80,4	0,2
*2	28	10,8	0,4
*3	23	8,8	0,003

n berechnet sich aus der Gesamtzahl der detektierten Allele; ¹ zur Berechnung des Chi-Quadrat-Tests wurde die in dieser Arbeit beobachtete Allelhäufigkeit mit der der kaukasischen Normalbevölkerung verglichen anhand der Werte von Lee et al., 2002.

3.1.1 Einfluss von Körpergewicht und Geschlecht auf den CYP2C9-Metabolismus

Neben den jeweiligen CYP2C9-Genotypen spielt das Körpergewicht der Probanden eine große Rolle als Prädiktor der Clearance. Mit steigendem Körpergewicht der Probanden nahm die totale orale Clearance zu ($p < 0,01$). Unter der Induktion mit Rifampicin konnte dieser Zusammenhang erneut signifikant ($p < 0,01$) nachgewiesen werden.

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen totaler oraler Clearance und dem jeweiligen Geschlecht der Probanden vor Induktion ($p = 0,005$) wie auch nach Induktion ($p = 0,008$). Probandinnen (BMI $22,0 \pm 0,4$ kg / m²; Mittelwert \pm Standardabweichung) zeigten insgesamt und im Vergleich zu Probanden nach Genotypen aufgeschlüsselt, niedrigere Clearances als männliche Probanden (BMI $23,2 \pm 0,1$ kg / m²; Mittelwert \pm Standardabweichung). Dieser Zusammenhang war nicht signifikant, nachdem die totale orale Clearance auf das Körpergewicht von 75 kg adjustiert wurde.

3.2 Ergebnisse für Tolbutamid

In Tabelle 19 sind die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen der Parameter C_{\max} , $AUC_{(0-\infty)}$ und orale Clearance vor und nach Induktion mit Rifampicin der verschiedenen CYP2C9-Genotypen dargestellt. In Abbildung 5 ist die orale Clearance von Tolbutamid in Abhängigkeit der CYP2C9-Genotypen dargestellt.

3.2.1 Pharmakokinetik von Tolbutamid vor Induktion

Träger des Genotypen CYP2C9*3/*3 wiesen die niedrigste orale Clearance mit $2,2 \pm 0,6$ mL / min (Mittelwert \pm Standardabweichung) im Vergleich zu Trägern des Wildtyp-Genotypen CYP2C9*1/*1 mit $13,0 \pm 3,2$ mL / min auf. Somit lag eine im Mittel 6-fach niedrigere orale Clearance bei Trägern homozygoter CYP2C9*3 Allele vor als bei Wildtyp-Träger bei der Einzeldosis von 500 mg Tolbutamid. Die heterozygoten Träger des *3 Allels, CYP2C9*1/*3 und *2/*3, lagen dazwischen (Mittelwert der CYP2C9 *1/*3 und *2/*3 oralen Clearance 2-fach niedriger). Das Allel CYP2C9*2 zeigte keinen so deutlichen Einfluss auf die Tolbutamid-Clearance. So hatte die CYP2C9*1/*2 Genotypengruppe im Mittel eine nur leicht verringerte Clearance um 5 %. Die Ergebnisse waren hoch signifikant ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test).

Die $AUC_{(0-\infty)}$ zeigte im Mittel eine fast 6-fache Vergrößerung bei CYP2C9*3/*3 Genotypen im Vergleich zu Trägern der Wildtyp-Allele. Die AUCs der heterozygoten Träger des CYP2C9*2- und CYP2C9*3-Allels lagen dazwischen (1,1-fach erhöht bei *1/*2 und 1,4-fach erhöht bei *1/*3 und 1,8-fach erhöht bei *2/*3). Die statistische Analyse ergab eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test).

Tab. 19: Pharmakokinetische Parameter vor und nach Induktion von Tolbutamid aufgeschlüsselt nach den unterschiedlichen CYP2C9-Genotypen, dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung (SA).

	CYP2C9 *1/*1 (n = 86)	CYP2C9 *1/*2 (n = 21)	CYP2C9 *1/*3 (n = 16)	Cyp2C9 *2/*3 (n = 4)	CYP2C9 *3/*3 (n = 3)	P-I	P-II
C_{max} (µg / ml)	43,8 (9,7)	42,2 (8,0)	46,4 (9,6)	48,7 (7,5)	53,7 (13,5)	p = 0,2	
C_{maxR} (µg / ml)	36,4 (9,2)	37,8 (7,9)	39,4 (9,3)	43,4 (5,8)	54,0 (9,3)	p = 0,006	**
AUC_(0-∞) (µg*h / mL)	686,7 (205,5)	736,7 (270,3)	993,8 (195,6)	1274,1 (128,4)	3929,4 (1093,1)	p < 0,001	
AUC_{(0-∞)R} (µg*h / mL)	358,0 (103,6)	414,1 (173,6)	515,4 (83,8)	761,5 (142,3)	1656,1 (705,7)	p < 0,001	**
Cl_o (mL / min)	13,0 (3,2)	12,3 (3,5)	8,7 (1,7)	6,5 (0,7)	2,2 (0,6)	p < 0,001	
Cl_{oR} (mL / min)	25,6 (9,0)	22,6 (7,1)	16,6 (7,3)	11,2 (2,3)	5,6 (2,2)	p < 0,001	**

C_{max}, maximale gemessene Konzentration; C_{maxR}, maximale Konzentration nach Induktion mit Rifampicin; AUC_(0-∞), Fläche unter der Plasmakonzentrationszeitkurve von Zeitpunkt 0 gegen unendlich; AUC_{(0-∞)R}, Fläche unter der Plasmakonzentrationszeitkurve von Zeitpunkt 0 gegen unendlich nach Induktion mit Rifampicin; Cl_o, orale Clearance von Tolbutamid; Cl_{oR} orale Clearance von Tolbutamid nach Induktion mit Rifampicin; P-Wert I: Jonckheere-Terpstra-Test; P-Wert II: Wilcoxon-Test ** für p < 0,001.

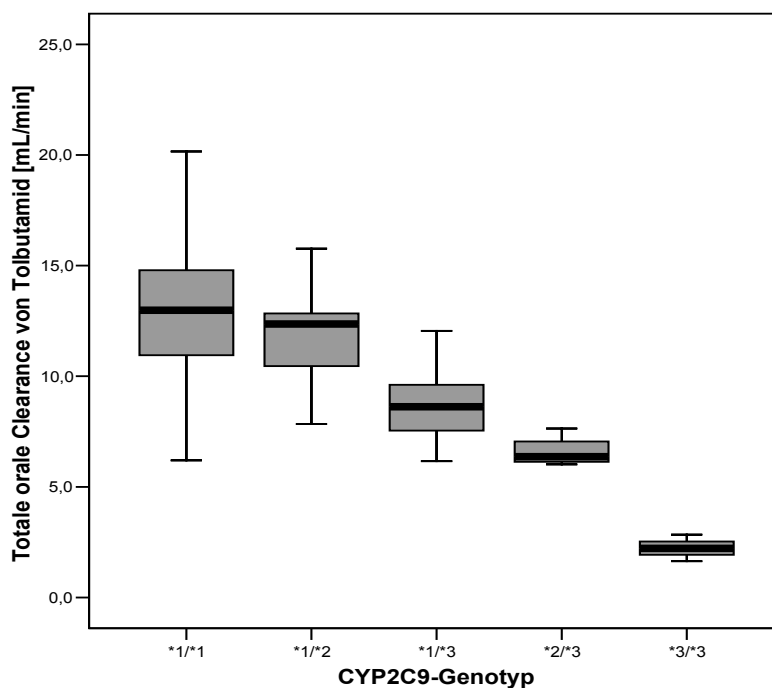


Abb. 5: Totale orale Clearance von Tolbutamid der CYP2C9-Genotypen

Die CYP2C9-Polymorphismen führten zu leichten Erhöhungen der maximalen Konzentration. Die maximale Konzentration (C_{max}) war bei homozygoten CYP2C9*3/*3 Trägern im Mittel um 20 % höher als bei homozygoten CYP2C9*1/*1 Genotypen. Heterozygote CYP2C9*3-Allelträger zeigten eine Erhöhung um 10 % (CYP2C9*2/*3) bzw. eine Erhöhung um 6 % (CYP2C9*1/*3). Träger des CYP2C9*1/*2 Genotyps zeigten im Mittel eine um 4 % geringere C_{max} als Wildtypträger. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zu den maximalen Konzentrationen von Tolbutamid bei Trägern von CYP2C9-Allelen mit reduzierter Aktivität ($p = 0,2$ Jonckheere-Terpstra-Test).

3.2.2 Pharmakokinetik von Tolbutamid nach Induktion mit Rifampicin

Nach Induktion mit Rifampicin stieg die totale orale Clearance signifikant im Mittel um den Faktor 2 ($p < 0,001$ Wilcoxon-Test). Träger des CYP2C9*3/*3 hatten im Mittel die niedrigste totale orale Clearance nach Induktion durch Rifampicin mit $5,6 \pm 2,2$ mL / min und lagen somit 4,5-fach niedriger als die Träger des CYP2C9*1/*1 Wildtyps. Auch hier zeigte sich, dass das CYP2C9*2-Allel im Vergleich zum CYP2C9*3-Allel einen geringeren Einfluss auf die Clearance ausübt. CYP2C9*1/*2 Genotypen hatten eine 1,1-fach niedrigere Clearance, CYP2C9*1/*3 Genotypen hatten eine 1,5-fach niedrigere Clearance im Vergleich zum CYP2C9*1/*1 Wildtyp. Ein signifikanter Unterschied konnte auch nach Induktion mit Rifampicin nachgewiesen werden ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Tests).

Die Induktion führte zu signifikanten Verringerungen der AUC von Tolbutamid ($p < 0,001$ Wilcoxon-Test) im Mittel um etwa 50 %. Die Ergebnisse waren im Jonckheere-Terpstra-Test signifikant ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test).

C_{max} zeigte sich signifikant verringert ($p < 0,001$ Wilcoxon-Test). Nur bei Trägern des CYP2C9*3/*3 Genotyps stieg die maximale Konzentration leicht an, von $53,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ auf $54,0 \mu\text{g} / \text{ml}$. Im Jonckheere-Terpstra-Test zeigte sich ein signifikanter Einfluss der CYP2C9-Genotypen auf die maximale Konzentration nach Induktion ($p = 0,006$ Jonckheere-Terpstra-Test).

Abbildung 6 zeigt die totale orale Clearance von Tolbutamid vor und nach Induktion mit Rifampicin der einzelnen CYP2C9-Genotypen.

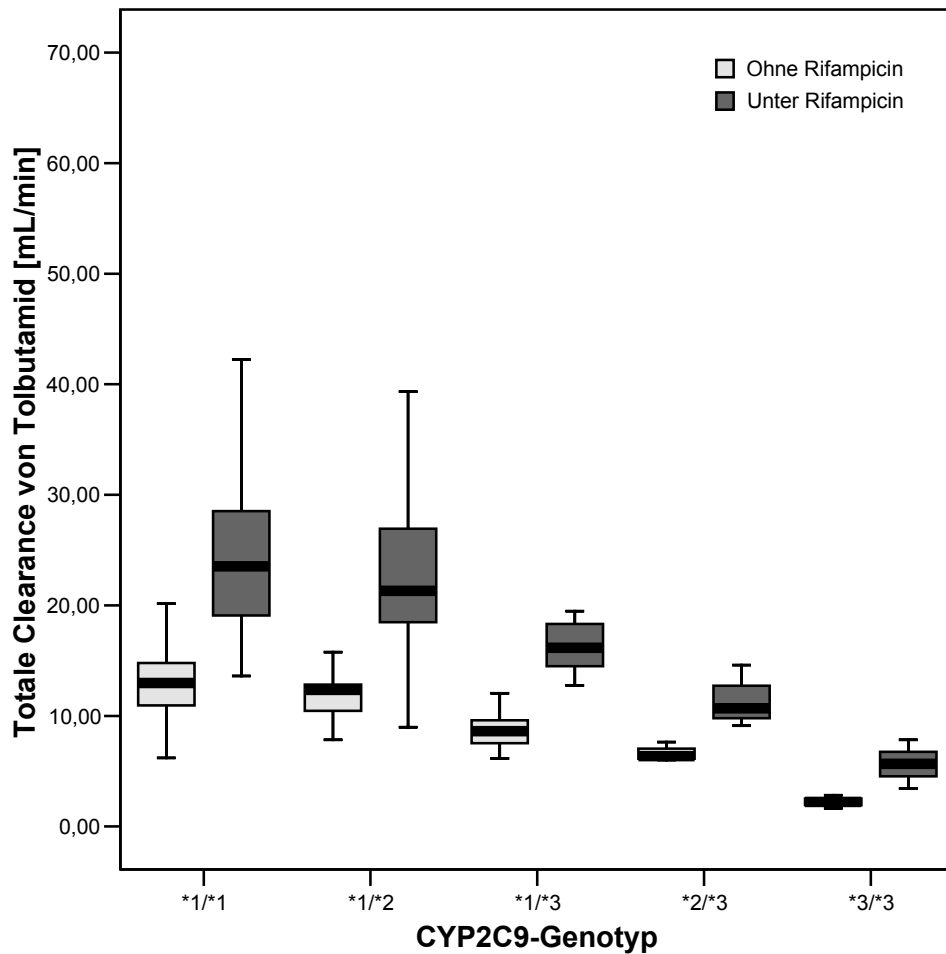


Abb. 6: Totale orale Clearance von Tolbutamid vor und nach Induktion mit Rifampicin der CYP2C9-Genotypen

3.2.3 Konzentration der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid

In Tabelle 20 sind die $AUC_{(0-\infty)}$ für Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid sowie die Summe der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid nach 8 h und 24 h, vor und nach Induktion mit Rifampicin als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Abbildung 6 zeigt die Summe der Metaboliten im Urin des 8 h Intervalls (A_e COOH-To + A_e OH-To) vor und nach Induktion mit Rifampicin nach CYP2C9-Genotypen aufgeschlüsselt.

3.2.3.1 Metabolite im Plasma vor und nach Induktion mit Rifampicin

3.2.3.1.1 Metabolite im Plasma vor Induktion

Die AUC des Metaboliten Hydroxytolbutamid verdeutlicht die unterschiedliche Aktivität der einzelnen CYP2C9-Genotypen. So hatten Träger des CYP2C9*3/*3 Genotypen eine 4-fach kleinere AUC ($1,6 \pm 0,3 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{l}$) als Träger des Wildtypen ($6,6 \pm 1,8 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{l}$). Es ergab sich insgesamt ein signifikanter Unterschied zu verminderten AUCs von Hydroxytolbutamid bei Trägern von CYP2C9-Allelen mit reduzierter Aktivität ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test).

Die AUC des Metaboliten Carboxytolbutamid zeigte auch die unterschiedliche Aktivität der einzelnen CYP2C9-Genotypen. Träger des CYP2C9*3/*3 Genotypen hatten eine 3-fach kleinere AUC ($9,3 \pm 4,9 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{l}$) als Träger des Wildtypen ($26,3 \pm 9,1 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{l}$). Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zu verminderten AUCs von Carboxytolbutamid bei Trägern von CYP2C9-Allelen mit reduzierter Aktivität ($p = 0,002$ Jonckheere-Terpstra-Test).

3.2.3.1.2 Metabolite im Plasma nach Induktion

Nach Induktion mit Rifampicin stiegen die AUC der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid signifikant an ($p < 0,001$ Wilcoxon-Test). Die statistische Analyse nach Induktion zeigte signifikante Trends für die verminderte Aktivität von Trägern von CYP2C9-Allelen für Hydroxytolbutamid ($p = 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test) und für Carboxytolbutamid ($p = 0,019$ Jonckheere-Terpstra-Test).

3.2.3.2 Metabolite im Urin vor und nach Induktion mit Rifampicin

3.2.3.2.1 Metabolite im Urin vor Induktion

Die CYP2C9-Allelvarianten *2 und *3 führten auch zu deutlich unterschiedlichen Metabolitmengen im Urin verglichen mit dem Wildtypen. Homozygote Allel*3-Träger hatten nur etwa 13 % ($18,0 \pm 4,3 \text{ mg}$) der Summe der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid nach 8 h verglichen mit dem Wildtypen ($131,8 \pm 72,6 \text{ mg}$). CYP2C9*1/*3-Träger hatten etwa 64 % der Metabolitensumme verglichen mit dem Wildtypen nach 8 h im Urin. CYP2C9*1/*2-Träger erreichten 94 % der Metabolite verglichen mit dem Wildtyp. Nach 24 h hatten *3/*3 24 %, *1/*3 72 % und *1/*2 90 % der Metabolite im Urin verglichen mit dem Wildtypen. Beide Intervalle zeigten einen signifikanten Trend ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test).

3.2.3.2.2 Metabolite im Urin nach Induktion

Die mit dem Urin ausgeschiedene Summe der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxy-
tolbutamid stieg nach Induktion signifikant unter allen CYP2C9-Genotypen nach 0-8 h Urin-
sammlung ($p < 0,001$ Wilcoxon-Test), und nach 0-24 h Urinsammlung ($p < 0,001$ Wilcoxon-
Test) im Vergleich zu der Metabolitenausscheidung vor Induktion.

Das 8 h Intervall zeigte nach Induktion einen signifikanten Trend ($p < 0,013$ Jonckheere-
Terpstra-Test). Das 24 h Intervall zeigte keinen signifikanten Trend im Jonckheere-
Terpstra-Test ($p = 0,119$ Jonckheere-
Terpstra-Test).

Tab. 20: Pharmakokinetische Parameter der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxy-
tolbutamid der einzelnen CYP2C9-Genotypen dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung (SA)

	CYP2C9 *1/*1 (n = 86)	CYP2C9 *1/*2 (n = 21)	CYP2C9 *1/*3 (n = 16)	Cyp2C9 *2/*3 (n = 4)	CYP2C9 *3/*3 (n = 3)	P-I	P-II
AUC_(0-∞)OH (mg*h / l)	6,6 (1,8)	5,9 (1,4)	5,8 (1,2)	3,4 (0,8)	1,6 (0,3)	$p < 0,001$	
AUC_(0-∞)OH-R (mg*h / l)	8,4 (2,1)	7,5 (1,7)	7,9 (2,1)	5,0 (0,8)	3,6 (1,6)	$p = 0,001$	**
AUC_(0-∞)COOH (mg*h / l)	26,3 (9,1)	23,6 (8,6)	21,9 (5,8)	16,3 (6,7)	9,3 (4,9)	$p = 0,002$	
AUC_(0-∞)COOHR (mg*h / l)	28,6 (8,7)	24,9 (8,6)	26,5 (9,9)	22,2 (4,9)	18,3 (9,9)	$p = 0,019$	**
Ae24 HC (mg)	329,7 (84,5)	297,0 (65,5)	240,3 (59,6)	187,7 (21,5)	81,3 (37,4)	$p < 0,001$	
Ae24 HCR (mg)	347,3 (81,0)	355,9 (115,1)	349,0 (42,5)	269,5 (44,7)	238,3 (76,1)	$p = 0,119$	**
Ae8 HC (mg)	131,8 (72,6)	124,1 (46,9)	84,8 (39,4)	52,7 (28,5)	18,0 (4,3)	$p < 0,001$	
Ae8 HCR (mg)	180,0 (79,8)	189,7 (74,8)	137,8 (55,1)	124,2 (19,4)	53,3 (6,8)	$p < 0,013$	**

AUC_(0-∞)OH, AUC_(0-∞) für Hydroxytolbutamid; AUC_(0-∞)OHR, nach Induktion mit Rifampicin; AUC_(0-∞)CO, AUC_(0-∞) für Carboxy-
tolbutamid; AUC_(0-∞)COR, nach Induktion mit Rifampicin; Ae24 HC, 0-24 h Summe der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten Carbo-
xytolbutamid und Hydroxytolbutamid; Ae24 HCR, nach Induktion; Ae8 HC; 0-8 h Summe der im Urin ausgeschiedenen Metabo-
liten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid. Ae8 HCR, nach Induktion. P-I: Jonckheere-
Terpstra-Test. P-II: Wilcoxon-Test
****** für $p < 0,001$.

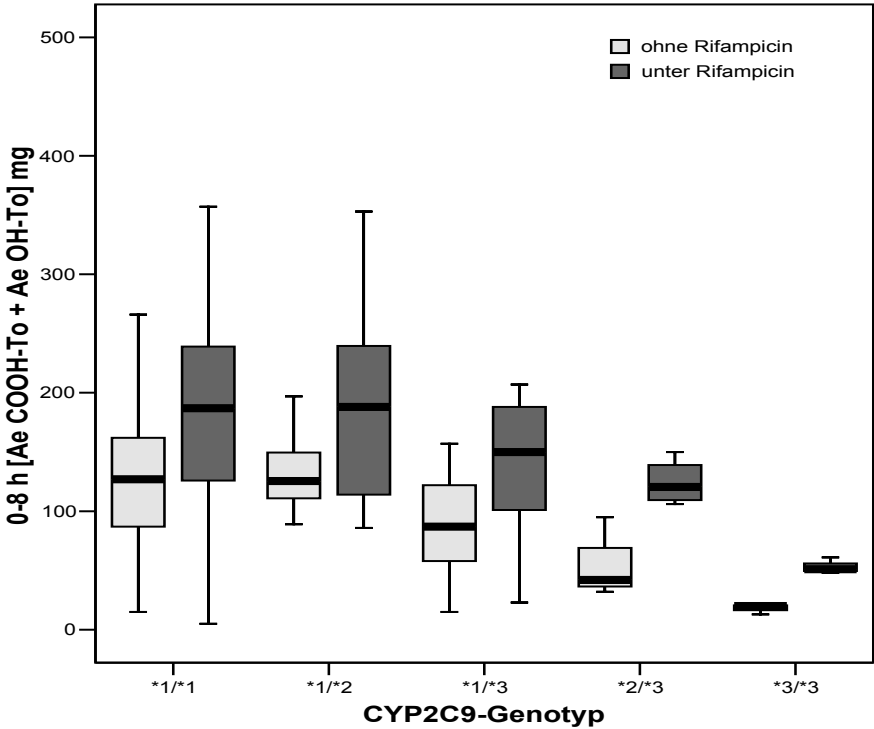


Abb. 7: Summe der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxyltolbutamid ([Ae COOH-To + Ae OH-To]) nach 0-8 h ohne und unter Rifampicin.

3.3 Induktion bei Trägern unterschiedlicher CYP2C9-Genotypen

Tabelle 21 zeigt Mittelwerte und Standardabweichung des aus der totalen oralen Clearance berechneten Induktionsfaktors, der Differenz der totalen oralen Clearance vor und nach Induktion sowie die p-Werte des Wilcoxon-Tests berechnet aus der oralen Clearance vor und nach Induktion mit Rifampicin der einzelnen CYP2C9-Genotypen, sowie p-Werte des Jonckheere-Terpstra-Tests. Abbildung 8 zeigt die Verteilungshäufigkeit der Induktionsfaktoren insgesamt und Abbildung 9 zeigt die Induktionsfaktoren nach den einzelnen CYP2C9-Genotypen aufgeschlüsselt.

Die stärkste Induktion zeigte die Gruppe der CYP2C9*3/*3 Allelträger mit $2,5 \pm 0,8$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die niedrigste Induktion wurde in der Gruppe der CYP2C9*2/*3 Allelträger mit $1,6 \pm 0,1$ festgestellt. Der durch Rifampicin ausgelöste Induktionsfaktor bewegte sich insgesamt bei allen Teilnehmer und Teilnehmerinnen der Studie in einem Bereich von maximal 4,7 und minimal 1,1. Der mittlere Induktionsfaktor aller Probanden berechnet aus der totalen oralen Clearance betrug $2,14 \pm 0,54$ (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die statistische Analyse ergab keinen Zusammenhang zwischen Induktionsfaktor und CYP2C9-Genotyp nach dem Jonckheere-Terpstra-Trendtest.

Die Differenz der oralen Clearance vor und nach Induktion mit Rifampicin zeigt einen deutlichen Unterschied der einzelnen Genotypen bezüglich der Induktion auf die orale Clearance ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test). Wie Tabelle 26 verdeutlicht, wiesen Träger des CYP2C9-Wildtypen eine Differenz von 12,5 mL / min auf. Dagegen zeigten Träger der CYP2C9*3 Allelvariante deutlich geringere Differenzen, 3,4 mL / min bei CYP2C9*3/*3 und 4,6 mL / min bei CYP2C9*2/*3. Der p-Wert des Wilcoxon-Tests der oralen Clearance vor und nach Induktion zeigt, dass deutlichere Unterschiede bei Wildtyp-Träger als bei CYP2C9*3 Allelträger durch die Induktion auftritt (CYP2C9*1/*1 mit $p < 0,001$ entgegen CYP2C9*3/*3 mit $p = 0,109$).

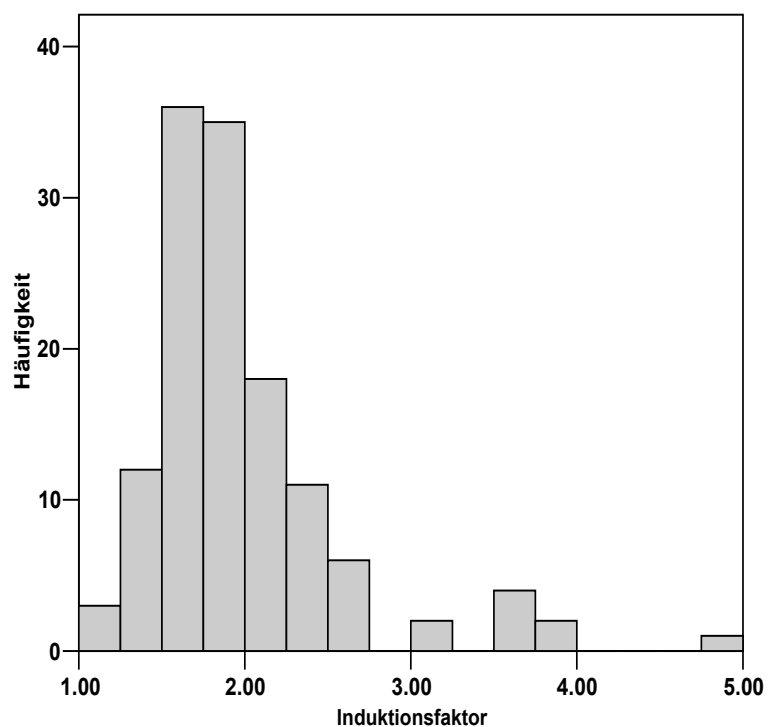


Abb. 8: Häufigkeitsverteilung der Induktionsfaktoren von n = 130 Probanden

Tab. 21: Induktionsfaktor berechnet aus der totalen oralen Clearance, Differenz der oralen Clearance vor und nach Induktion und p-Wert des Wilcoxon-Tests (P-II) sowie p-Wert des Jonckheere-Terpstra-Tests (P-I) der verschiedenen CYP2C9-Genotypen, dargestellt als Mittelwert und Standardabweichung (SA)

	CYP2C9 *1/*1 (n = 86)	CYP2C9 *1/*2 (n = 21)	CYP2C9 *1/*3 (n = 16)	Cyp2C9 *2/*3 (n = 4)	CYP2C9 *3/*3 (n = 3)	P-I
Cl_oF	2,0 (0,6)	1,8 (0,3)	1,9 (0,2)	1,6 (0,1)	2,5 (0,8)	p = 0,375
Cl_oDiff (mL / min)	12,5 (0,8)	10,2 (1,1)	7,9 (5,3)	4,6 (8,6)	3,4 (1,1)	p < 0,001
P-II	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,068	p = 0,109	

Cl_oF, Induktionsfaktor berechnet aus der oralen Clearance; Cl_oDiff, Differenz berechnet aus oraler Clearance nach Induktion minus oraler Clearance nach Induktion; P-I: Jonckheere-Terpstra-Test. P-II: p-Wert des Wilcoxon-Tests für orale Clearance vor und nach Induktion.

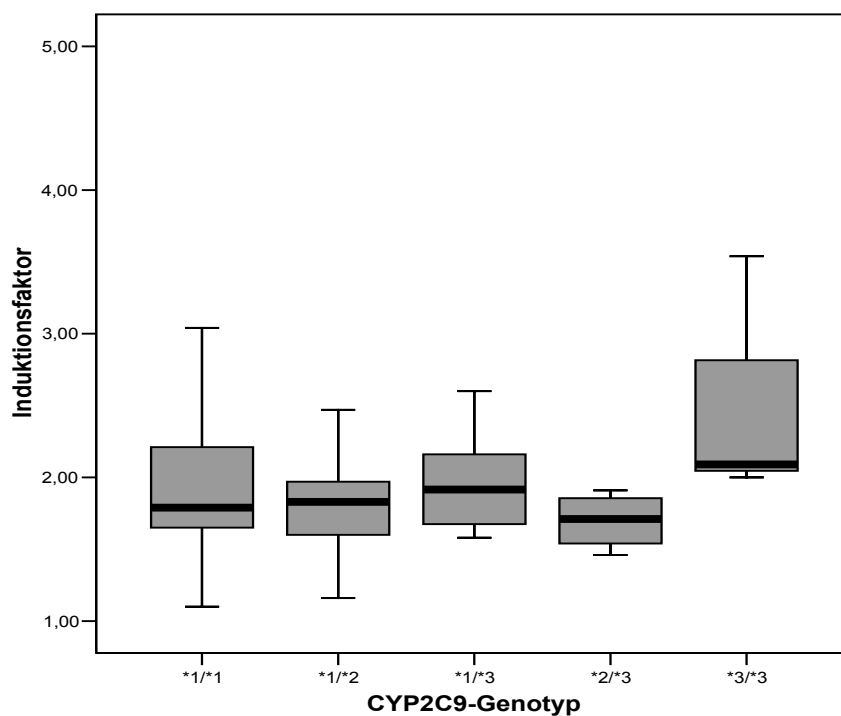


Abb. 9: Induktionsfaktoren der einzelnen CYP2C9-Genotypen; *1/*1 bei n = 86; *1/*2 bei n = 21; *1/*3 bei n = 16; *2/*3 bei n = 4; *3/*3 bei n = 3.

3.4 Tolbutamidwirkung auf den Blutzucker

Zu Beginn der Untersuchung lagen die mittleren Blutzuckerspiegel der Probanden bei 5,12 (0,59) mg / dl (Mittelwert und Standardabweichung) und zeigten sich nicht signifikant unterschiedlich zwischen den einzelnen CYP2C9-Genotypen. Nach Verabreichung von 500 mg Tolbutamid zeigte kein Proband Anzeichen oder Symptome einer Hypoglykämie. Die Senkung des Blutzuckerspiegels 4 Stunden nach Tolbutamideinnahme betrug 2,62 (2,18) mg / dl. Zwischen den einzelnen CYP2C9-Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Senkung des Blutzuckerspiegels durch Tolbutamid.

Nach Induktion betrug die Senkung des Blutzuckerspiegels durch Tolbutamid 2,03 (1,98) mg / dl ($p = 0,028$ Wilcoxon-Test). Somit war die Blutglukose senkende Potenz von 500 mg Tolbutamid unter Enzyminduktion um 23 % vermindert. Zwischen den einzelnen CYP2C9-Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Senkung des Blutzuckerspiegels durch Tolbutamid.

4 Diskussion

Die Allelvarianten *2 und *3 des CYP2C9 sind deutlich an der Variabilität des Arzneimittel-metabolismus über diese Enzym beteiligt. Rifampicin als CYP2C9-Enzyminduktor führt zu relevanten Auswirkungen im Metabolismus von CYP2C9-Substraten. Diese Studie sollte klinisch untersuchen, ob die Allelvarianten *2 und *3 Einfluss auf die Enzyminduktion ausüben. Dabei sollte die Auswirkung der CYP2C9 Allelvarianten *2 und *3 auf den Metabolismus von Tolbutamid vor und nach Induktion mit Rifampicin untersucht werden und dann die Auswirkung der Allelvarianten *2 und *3 auf die Induktion mit Rifampicin.

4.1 Häufigkeitsverteilung der CYP2C9-Polymorphismen

Die Häufigkeitsverteilung der in dieser Studie untersuchten CYP2C9 Allele CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3 entspricht in ihrer Verteilung Ergebnissen aus anderen Populationsstudien zur CYP2C9 Allelverteilung in Populationen kaukasischer Abstammung (Lee et al., 2002). Dies belegen die hier untersuchten Allelfrequenzen von *1 Allel und *2 Allel, welche keine signifikanten Unterschiede im Chi-Quadrat-Test verglichen mit der kaukasischen Normalbevölkerung nach Lee et al., 2002 zeigten. Die in vorliegender Studie gefundene Allelfrequenz des *3 Allels zeigte eine höhere Frequenz ($p = 0,003$ Chi²-Test) als in einer kaukasischen Population nach Lee et al., 2002 erwartet werden kann. Es wurden homozygote *3 Allelträger gezielt aus der Genotypendatenbank der Charité, Berlin ausgewählt. Dies dürfte die in dieser Studie höhere *3 Allelfrequenz erklären. Homozygote Träger des *3 Allels kommen auch unter einer sehr grossen Genotypendatenbank, wie die der Charité in Berlin mit fast 1000 genotypisierten Probanden, sehr selten vor ($n = 3$). Diese Zahl entspricht etwa 0,3 % homozygoter CYP2C9*3/*3 Träger, die für eine kaukasische Population erwartet werden kann (Lee et al., 2002). In ähnlichen CYP2C9 Studien wurde keine Zahl von drei oder mehr homozygote Trägern weder von CYP2C9*2 noch CYP2C9*3 erreicht (Kidd, 1999, Niemi, 2002, Scordo, 2002, Thijssen, 2001, Yasar, 2001).

Die Allelfrequenz von CYP2C9 zeigt zwischen ethnischen Gruppen, wie Tabelle 6 im Einleitungsteil auf Seite 10 darstellt, deutliche Unterschiede. Die Allelvarianten *2 und *3 kommen in der afrikanischen und ostasiatischen Bevölkerung praktisch nicht vor. Auch innerhalb der kaukasischen Bevölkerung konnten Untersuchungen deutliche Unterschiede in der Allelverteilung darlegen. Die spanische Bevölkerung, die eine Subpopulation der kaukasischen Bevölkerung darstellt, weist eine höhere Allelfrequenzen der CYP2C9 *2 und vor allem *3 Allele auf im Vergleich zur Allelhäufigkeit unter britischen oder schwedischen Kaukasier (Llerena et al., 2004, Garcia-Martin et al., 2001).

4.2 Auswirkung des CYP2C9-Genotypen auf den Metabolismus von Tolbutamid

Tolbutamid wird zu mehr als 80 % durch die hepatische Biotransformation zu Hydroxytolbutamid eliminiert. Diese Reaktion wird fast ausschließlich über CYP2C9 katalysiert, der entscheidende, Metabolisierungsrate-limitierende Schritt. Die hier untersuchten CYP2C9-Genpolymorphismen CYP2C9*2 und CYP2C9*3 zeigen einen deutlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik des Sulfonylharnstoffs Tolbutamid.

4.2.1 CYP2C9-Polymorphismen und der Metabolismus von Tolbutamid

Homozygote Träger des CYP2C9*3 Allels (n = 3) zeigten eine 6-fach verringerte totale orale Clearance (2,2 mL / min) im Vergleich zu Wildtyp-Trägern (13,0 mL / min). Die Clearance des CYP2C9*1/*3 Genotyps (8,7 mL / min) lag zwischen den Homozygoten CYP2C9*3 Trägern und des Wildtyps. Das CYP2C9*2 Allel zeigte weniger deutliche Unterschiede. CYP2C9*1/*2 Genotypen hatten eine nur leicht niedrigere Clearance (12,3 mL / min) als Wildtypträger (13,0 mL / min).

Diese Daten ähneln den Ergebnissen von Kirchheiner et al., 2002, die eine 6-fach verringerte mittlere Clearance des Genotypen CYP2C9*3/*3 von 0,15 l / h im Vergleich zur Clearance des CYP2C9*1/*1 Wildtypen von 0,97 l / h zeigen konnte und in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Sullivan-Klose et al., 1996) ist. CYP2C9*2 hingegen zeigte nur geringe Veränderungen in der Aktivität. Homozygote CYP2C9*2 Träger wiesen nur eine orale Clearance von 75 % verglichen zum Wildtypen vor, Heterozygote CYP2C9*2 zeigten keine signifikante Veränderung der Kinetik (Kirchheiner 2002).

In zwei anderen Studien konnte eine deutlich reduzierte Tolbutamidclearance von CYP2C9*1/*3 und CYP2C9*1/*2 Genotypen gezeigt werden (Shon et al., 2002; Lee et al., 2002). Dies legt nahe, dass beide CYP2C9-Polymorphismen zu einer reduzierten Aktivität führen können. Pharmakokinetische Unterschiede der einzelnen *2 und *3 Polymorphismen konnten für eine Vielzahl weiterer CYP2C9-Substrate gefunden werden. So konnten für die CYP2C9-Substrate wie Glibenclamid, Nateglinid, Ibuprofen, Celecoxib, Phenytoin, Glipizid und S-Warfarin eine deutliche Abnahme der metabolischen Aktivität gezeigt werden. Sie führt, verglichen mit dem Wildtyp, zu einer 5- bis 10-fach reduzierten oralen Clearance. Diese Clearanceminderung ist direkt abhängig zum untersuchten Substrat (Kirchheiner et al., 2004). Auch hier zeigte das CYP2C9*2 Allel nur geringe Auswirkungen auf die Aktivität.

Allerdings kann es bei Trägern des CYP2C9*2 Allels bei der Medikation mit S-Warfarin vermehrt zu Blutungskomplikationen kommen (Aithal et al., 2000; Scordo et al., 2002). Sehr deutlich ist die Aktivitätsminderung bei homozygoten CYP2C9*3 Trägern. So zeigte eine Studie eine verminderte Aktivität bei homozygoten Trägern des CYP2C9*3 Allels, die zu einer verminderten Clearance der Substanzen Phenytoin und Glipizid von 21 % bzw. 18 % im Vergleich zum Studiendurchschnitt führte (Kidd et al., 1999). McCrea et al. konnte 1999 eine Person, die eine minimale Bildungsrate von < 1 % des aktiven Metaboliten E-3174 von Losartan aufwies, als homozygot für das CYP2C9*3 Allel identifizieren.

Die Ile359Leu Variante (CYP2C9*3) konnte in der Substratbindungsstelle in der Nähe des Aktivitätszentrums des CYP2C9-Enzyms lokalisiert werden. Deshalb wird vermutet, dass diese Variante einen deutlichen Effekt auf die Substratbindung und die Enzymaktivität ausüben könnte (Williams et al., 2003). Die Arg144Cys Variante (CYP2C9*2) liegt ausserhalb des Substratbindungsstelle, könnte aber eine Rolle in der Interaktion zwischen CYP2C9 und CYP-Reduktasen spielen (Crespi et al., 1997).

Seit der Verdrängung von Tolbutamid durch die so genannten Sulfonylharnstoffe zweiter Generation wie Glibenclamid oder Glimepirid hat die klinische Bedeutung von unterschiedlichen oralen Clearances von Tolbutamid durch die CYP2C9-Polymorphismen abgenommen. Als aktivitätsbeschreibendes Probesubstrat für CYP2C9 ist Tolbutamid als relativ sicheres Medikament aber bestens geeignet (Kirchheiner et al., 2002; Lee et al., 2002; Shon et al., 2002). Sogar in einer weitaus niedrigeren Dosierung von nur 125 mg Tolbutamid konnten signifikant niedrigere ($p < 0,001$) orale Clearances von CYP2C9*1/*3 und CYP2C9*2/*2 verglichen mit CYP2C9*1/*1 und CYP2C9*1/*2 dargestellt werden. So scheinen sogar 125 mg Tolbutamid ausreichend zu sein, den Phänotypen zu bestimmen (Jetter et al., 2004).

4.2.2 CYP2C9-Polymorphismen und die Tolbutamidmetabolite im Plasma und Urin

4.2.2.1 Metabolite im Plasma

Die Tolbutamidmetabolite Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid verdeutlichen die unterschiedliche Aktivität der CYP2C9-Genotypen und unterstreichen die verminderte Aktivität der Allele *2 und vor allem *3. So hatten Homozygote CYP2C9*3-Träger eine 4-fach kleinere AUC des Metaboliten Hydroxytolbutamid verglichen mit dem Wildtypen. Bei der Betrachtung der AUCs der Metabolite zeigte die statistische Analyse durch den Jonckheere-Terpstra-Test eine höhere Signifikanz bei der Auswertung des Metaboliten Hydroxytolbutamid ($p < 0,001$) im Vergleich zu dem Metaboliten Carboxytolbutamid ($p = 0,002$).

Kirchheiner et al. 2002 konnte eine, vom CYP2C9-Genotypen unabhängige, Elimination des Metaboliten Hydroxytolbutamid zeigen. Kirchheiner stellte bei der Betrachtung der Halbwertszeiten von Tolbutamid und Hydroxytolbutamid fest, dass Hydroxytolbutamid eine kürzere Halbwertszeit vorwies. Das bedeutet, dass letzteres schneller eliminiert wird als es gebildet wird. In der vorliegenden Arbeit ist die größere AUC des Metaboliten Carboxytolbutamid im Vergleich zum Metaboliten Hydroxytolbutamid als indirekter Beweis der kürzeren Halbwertszeit von Hydroxytolbutamid zu werten.

4.2.2.2 Metabolite im Urin

Die mit dem Urin ausgeschiedene Summe der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid verdeutlicht ebenfalls die unterschiedliche Aktivität der einzelnen CYP2C9-Genotypen, wobei das 24 h Urinintervall nach Induktion eine deutliche Tendenz zeigte, die nicht ganz das Signifikanzniveau erreichte. So hatten Homozygote CYP2C9*3-Träger nach 8 Stunden nur 13 % der Metabolite im Urin verglichen mit Wildtyp-Träger. Lee et al. hatte in einer Studie 2002 die im Urin ausgeschiedene Summe der Metaboliten Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid gemessen und signifikante Unterschiede zwischen den CYP2C9-Genotypen *1/*1 und heterozygoten *1 Genotypen festgestellt. Zwischen heterozygoten *1 Genotypen schien kein signifikanter Unterschied zu bestehen. In der vorliegenden Arbeit war im Gegensatz zu von Lee et al. berichteten Daten kein signifikanter Unterschied zwischen *1/*1 und *1/*2 messbar. Nach Lee et al., 2002 zeigte sich die Urinsammlung des 0-12 h Intervalls stärker vom Genotyp abhängig als das 6-12 h Intervall. In der vorliegenden Arbeit zeigte das längere Intervall (0-24 h) einen deutlicheren Trend ($p < 0,001$) als das kürzere Intervall (0-8 h) mit $p = 0,001$.

4.3 Induktion durch Rifampicin

4.3.1 Auswirkung auf den Metabolismus von Tolbutamid zu Hydroxytolbutamid

Durch die Induktion mit Rifampicin stieg in den vorgelegten Untersuchungen die totale orale Clearance aller Probanden im Mittel um den Faktor 2 hochsignifikant an. Parallel dazu verringerte sich die $AUC_{(0-\infty)}$ von Tolbutamid um 50 % ebenfalls hochsignifikant.

Die gesteigerte Aktivität des Enzyms CYP2C9 zeigte sich außerdem in einer deutlich vermehrten Bildung der Metabolite Hydroxytolbutamid und Carboxytolbutamid im Blut. Die mittlere AUC für Hydroxytolbutamid stieg um 25 %. Die mittlere AUC für Carboxytolbutamid stieg geringer an (11 %).

Die Induktion zeigte sich auch in einer deutlich erhöhten Metabolitensumme im Urin. Nach 8 Stunden stieg im Mittel die Summe der Metaboliten um 30 %. Nach 24 Stunden stieg die Summe der Metaboliten um 12 %.

Seit 1970 ist die Auswirkung der Induktion mit Rifampicin auf den Metabolismus von Antidiabetika bekannt. So ist schon früh der Wirkverlust von Tolbutamid, ein Sulfonylharnstoff der ersten Generation, durch Rifampicininduktion beschrieben (Syvälahti et al., 1976). Interaktionen zwischen Sulfonylharnstoffen zweiter Generation wie Glibenclamid und Glipizid und dem Induktor Rifampicin wurden vor kurzem untersucht. Nach Induktion mit 600 mg Rifampicin / Tag über 5 Tage lang verringerte sich die $AUC_{(0-\infty)}$ von Glibenclamid um 39 %, und die maximale Konzentration (C_{max}) verringerte sich um 22 %. Insgesamt wurde durch die Induktion mit Rifampicin die Blutglukose senkende Wirkung von Glibenclamid um 36 % abgeschwächt (Niemi et al., 2000). Die $AUC_{(0-\infty)}$ von Glipizid fiel um 22 % nach Induktion mit Rifampicin. Ein Effekt auf die Blutglukose senkende Wirkung wurde nicht beobachtet (Niemi et al., 2001). In vorliegender Studie wurde die $AUC_{(0-\infty)}$ von Tolbutamid aller einzelnen Genotypen zusammen um 50 % gesenkt und dies führte zu einem Wirkverlust von 23 %. So zeigt die Auswirkung der Induktion durch Rifampicin auf den Tolbutamidmetabolismus in vorliegender Studie vergleichbare Ergebnisse mit Studien anderer Antidiabetika vom Sulfonylharnstofftyp.

Vergleichbare Auswirkungen durch Induktion mit Rifampicin konnten auch für andere CYP2C9-Substrate gezeigt werden (Williamson et al., 1998; Kay et al., 1985). Nach Induktion mit Rifampicin über 4 Tage mit 600 mg / Tag verringerte sich beispielsweise die AUC des Antikoagulanz Warfarin um 58 % (O'Reilly et al., 1974). Nach 21 tägiger Induktion mit 600 mg Rifampicin / Tag sank die Plasmakonzentration von Warfarin sogar um 85 % (O'Reilly et al., 1975).

4.3.2 Auswirkung der Induktion bei verschiedenen CYP2C9-Genotypen

4.3.2.1 Relative Auswirkung der CYP2C9-Polymorphismen auf Induktion

Eine ganze Reihe von Polymorphismen sind im Bereich des CYP2C9-Gens gefunden worden, auch in Regionen, die an der Aktivität der Transkription eine Rolle spielen. Manche scheinen mit den bekannten CYP2C9-Allelvarianten wie *3 verknüpft und deshalb stellt sich die Frage, ob die Induzierbarkeit sich zwischen den hier untersuchten CYP2C9-Allelvarianten *2 und *3 im Vergleich zum Wildtyp unterscheidet. Der in vorliegender Studie errechnete Induktionsfaktor der oralen Clearance zeigte eine große Variabilität. Es wurden Induktionsfaktoren zwischen 1 und 5 beobachtet. Es stellte sich aber heraus, dass die Induktionsfaktoren der einzelnen CYP2C9-Genotypen nicht signifikant unterschiedlich waren ($p = 0,788$ Jonckheere-Terpstra-Test), obwohl bei der Betrachtung der Induktionsfaktoren der einzelnen CYP2C9-Genotypen eine Tendenz zu höheren Faktoren bei Trägern des CYP2C9*3-Allels zu vermuten ist. Der Induktionsfaktor bei *3/*3 Haplotypen lag im Mittel bei $2,5 \pm 0,8$ im Gegensatz zu *1/*1 Haplotypen, die nur einen Induktionsfaktor von $2,0 \pm 0,6$ zeigten. Weitere Einflussfaktoren auf die Induktion (siehe Kapitel 4.3.2.3) könnten diese Tendenz maskieren.

4.3.2.2 Absolute Auswirkung der CYP2C9-Polymorphismen auf Induktion

Bei Betrachtung der Clearance vor und nach Induktion mit Rifampicin gibt es erhebliche Unterschiede. So hatten Träger von Wildtyp-Allelen eine deutliche Differenz von $12,5 \text{ mL / min}$ ($p < 0,001$), CYP2C9*3/*3 Genotypen dagegen, bedingt durch die verringerte Clearance vor Induktion, nur eine Differenz von $3,4 \text{ mL / min}$ ($p = 0,109$). Für den Kliniker bedeutet dies, dass obwohl die Genotypen keinen deutlichen Trend auf die Induzierbarkeit aufweisen ($p = 0,788$), es sehr wohl einen Unterschied ausmacht, welcher Genotyp bei dem zu behandelnden Patient vorliegt. Denn der Genotyp des Patienten entscheidet, ob die Induktion, ausgelöst durch eine eventuell begleitenden Therapie mit einem induzierenden Medikament, einen klinisch relevanten Einfluss (*1/*1 mit $p < 0,001$) auf benötigte Medikamentenspiegel ausübt, oder ob die Induktion keinen bedeutenden Unterschied (*3/*3 mit $p = 0,109$) bewirkt. Interessanterweise konnte in dieser Studie kein klinisch relevanter Unterschied der Tolbutamid-Wirkung nach Induktion mit Rifampicin zwischen Wildtypträgern und CYP2C9*3/*3-Trägern festgestellt werden (siehe Kapitel 4.4).

4.3.2.3 Weitere Einflussfaktoren auf die Induktion mit Rifampicin

Rifampicin ist ein bekannter Induktor, der verantwortlich ist für bedeutende Arzneimittelinteraktionen. Dabei zeigt die Induktion eine große Variabilität zwischen einzelnen Individuen. In unserer Studie nahm der Induktionsfaktor berechnet aus der totalen oralen Clearance von Tolbutamid Werte zwischen 1 und 5 an. Neben den eigentlichen an der Metabolisierung beteiligten Enzymen, hier das CYP2C9, können Transporter, die an dem Medikamententransport in die Zelle hinein, sowie an dem Medikamententransport aus der Zelle hinaus beteiligt sind, Transkriptionsfaktoren und die eingesetzte Rifampicinidosis an der großen Variabilität der Induktion beteiligt sein.

4.3.2.3.1 PXR und Induktion mit Rifampicin

PXR ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselfunktion im Arzneistoffmetabolismus einnimmt. PXR regelt die Expression wichtiger Arzneimetabolisierender Enzyme wie z.B. CYP3A4 oder auch CYP2C9 und Transporter wie P-Glykoprotein (MDR1). Das Ausmaß der Induktion durch Rifampicin auf intestinale oder hepatische CYP3A4 Aktivität zeigt eine deutliche Variation, die durch Mutationen im PXR-Gen erklärt werden könnte. Zangh et al. berichtete 2001 über eine ganze Reihe detektierter SNPs des PXR-Gens, die zum Teil zu einem unterschiedlichen Ausmaß der CYP3A4 Induktion durch Rifampicin führen. Eine Mutation im Bereich des Promotors (25385C>T) führte bei Homozygoten dieser Mutation (25385TT) zu einer 2-fach höheren CYP3A4 Aktivität nach Induktion mit Rifampicin als Homozygote 25385CC Genotypen (Zangh et al., 2001). Lamba et al. stellten 2005 diese Allelvarianten und ihre unterschiedliche Auswirkung auf die Metabolisierung dar. Diese Allelfrequenzen wurden in der kaukasischen Bevölkerung als < 1 % angegeben. Da die CYP2C9-Induktion durch Rifampicin ebenfalls durch PXR geregelt wird, könnten Punktmutationen des PXR die Induktion stärken oder abschwächen.

4.3.2.3.2 OATP-C und Induktion mit Rifampicin

OATP1B1 (OATP-C, Organic anion transporting polypeptide-C) ist ein Aufnahmetransporter, der ausschließlich in der Leber exprimiert wird. OATP1B1 sorgt für den aktiven Transport von Rifampicin und anderen Substraten in die menschliche Leberzelle hinein und ist somit der bedeutender Faktor der Aktivierung von PXR in der menschlichen Leberzelle (Tirona et al., 2003).

Es ist bekannt, dass Stoffe, die über diesen Transporter in die Leberzelle aufgenommen werden, durch gleichzeitige Gabe von Rifampicin an ihrem Transport in die Leberzelle und somit an ihrem Metabolismus und Ausscheidung gehindert werden können. Diese Hemmung durch Rifampicin kann zu unerwünscht hohen Spiegel im Blut und folglich zu Nebenwirkungen führen, da diese Stoffe einen verzögerten Metabolismus haben (Vavricka et al., 2002).

Auch im Gen *SLCO1B1*, welches OATP-C kodiert, sind eine ganze Reihe von SNPs detektiert worden. Einige dieser Polymorphismen führen zu einer dramatischen Verminderung der OATP-C-Transportfunktion in die Leberzelle (Niemi et al., 2004). So könnte man die große Variabilität in der Induzierbarkeit von CYP2C9 auch auf Polymorphismen im OATP-C Transporter zurückführen.

Niemi et al. untersuchte 2006, ob die Variabilität in der Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin von Polymorphismen des *OAT1B1* (OATP-C) abhängt. In Niemi's Studie konnte kein eindeutiger Effekt der Polymorphismen von *OAT1B1* auf die Induktion von CYP3A4 nachgewiesen werden, obwohl eine gesteigerte Induktion bei einer Allelvariante des *OAT1B1* festgestellt werden konnte. Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass andere OATP-Transporter, wie z.B. *OATP1B3* einen ausgleichenden Effekt ausüben (Niemi et al., 2006).

4.3.2.3.3 P-Glykoprotein und Induktion mit Rifampicin

P-Glykoprotein ist ein Effluxtransporter der so genannten ATP-binding cassette Familie (ABC), die eine wichtige Rolle für die Exkretion von Arzneistoffen spielt. Das P-Glykoprotein wird von dem so genannten Multidrug Resistance Gen-1 (*MDR1*) kodiert. Die Induktion wird ebenfalls über PXR vermittelt (Schuetz et al., 1996). Diese Effluxtransporter findet man vor allem an der luminalen Seite von Zellen in der Leber, Darm und Nieren. Eine besonders hohe Aktivität des P-Glykoproteins kommt in der Dünndarmmukosa wie auch in der Dickdarmmukosa vor, und dort ist der aktive Transport von P-Glykoprotein Substraten aus der Mukozelle in das Darmlumen gerichtet. Somit werden diese Substrate, die bereits resorbiert wurden zumindest teilweise wieder in das Lumen zurücktransportiert. Dieser Prozess zeigt sich gut für Digoxin und erklärt, warum die systemische Verfügbarkeit von Digoxin unter 100 % liegt.

Die Induktion mit Rifampicin wirkt sich auch auf den Digoxinspiegel aus, obwohl Digoxin keinem relevanten Metabolismus unterliegt und nahezu unverändert im Urin ausgeschieden wird. So zeigte eine Studie, in der die Interaktion von Digoxin und Rifampicin untersucht wurde, die Senkung der AUC von Digoxin um 88 % (Greiner et al., 1999). Diese Interaktion mit Rifampicin wurde mit der PXR-vermittelten Induktion von intestinalen P-Glykoprotein

Transporter erklärt, da Greiner et al. in seiner Studie 1999 im Dünndarm eine 3,5-fache Erhöhung von P-Glykoprotein durch Induktion mit Rifampicin feststellen konnte.

Das P-Glykoprotein weist eine Vielzahl von Polymorphismen auf und einige zeigen funktionelle Bedeutung auch in ihrer Induzierbarkeit durch Rifampicin. Hoffmeyer et al. konnte 2000 zeigen, dass homozygote Träger der Mutation C3435T im Exon 26 des MDR1-Gens eine verminderte Expression von P-Glykoprotein im Dünndarm hatten, eine geringere Enzyminduktion durch Rifampicin aufwiesen und eine abgeschwächte Exkretion von Digoxin in den Darm zeigten. Folglich konnte bei Trägern homozygoter T/T Genotypen ein 4-fach erhöhter Digoxin Spiegel im Blut unter Induktion mit Rifampicin nachgewiesen werden im Vergleich zu homozygoten Träger des 3435C-Wildtyp-Gens (Hoffmeyer et al., 2000).

Das Ausmaß der Induktion durch Rifampicin wird durch die intrazelluläre Konzentration des Induktors in der Leber determiniert. Diese Konzentration wird durch den Effluxtransporter MDR1 in der Leberzelle beeinflusst, da Rifampicin selbst Substrat von MDR1 ist. Je höher die Aktivität des Transporters, desto geringer das Ausmaß der Induktion (Schütz et al., 1996). So können Mutationen im MDR1 Gen, wie C3435T im Exon 26, durch veränderte Aktivität des Effluxtransporters an der Variabilität der Induktion beitragen. Floyd et al., 2003 konnte hierzu in einer Studie, die die Induktion von CYP3A4 unter Rifampicin im Hinblick auf die MDR1-Polymorphismen G2677T in Exon 21 und C3435T in Exon 26 untersuchte, keinen deutlichen Einfluss der MDR1-Polymorphismen auf die Induktion erkennen. Dies könne allerdings an der hohen Induktionsdosis liegen, die dazu führen kann, dass kleine Änderungen der intrazellulären Rifampicinkonzentration keinen deutlichen Unterschied in der Induktion ausmachen (Floyd et al., 2003).

4.3.2.3.4 Eingesetzte Rifampicindosis

Die zur Behandlung der Tuberkulose eingesetzte Rifampicindosis liegt für Erwachsene zwischen 450 – 600 mg / Tag (Douglas et al., 1999). Mit steigender Rifampicindosis, von 450 mg bis auf 600 mg / Tag, steigt sehr wohl der therapeutische Nutzen, nicht aber das Ausmaß der Induktion (Burman et al., 2001). Mit nur 300 mg Rifampicin pro Tag scheint die Induktion fast maximal zu sein, da sich die Pharmakokinetik von Warfarin unter 300 mg Rifampicin im Vergleich zu 600 mg Rifampicin nicht unterscheidet (Syvälahti et al., 1976; Twum-Barima et al., 1981). Eine genau unter diesem Induktionsschema von 450 mg Rifampicin / Tag über 4 Tage durchgeführte Studie zur Induktion von CYP3A4 zeigte bei der Metabolisierung von Alprazolam eine Abnahme der AUC um 88 % (Schmider et al., 1999). Das in dieser Studie verwendete Induktionsschema mit 450 mg Rifampicin / Tag über 4 Tage führt folglich zu einer deutlichen Induktion, und man bewegt sich dennoch im unteren Bereich der zu

therapeutischen Zwecken eingesetzten Rifampicindosis. Allerdings könnte für den Nachweis schwacher Einflussfaktoren auf die Induktion die eingesetzte Rifampicindosis auch zu hoch angesetzt sein, wie schon im Kapitel 4.3.2.3.3 diskutiert.

4.4 Auswirkung von Rifampicin auf die Blutzucker senkende Wirkung von Tolbutamid

Tolbutamid gehört zur Gruppe der Sulfonylharnstoffe, die ihre Blutglukose senkende Wirkung durch eine gesteigerte Ausschüttung von Insulin entfalten. In dieser Studie wurde die Blutglukose zu den Blutabnahmezeitpunkte 0, 0,5, 1, 2, 4 h nach Einnahme von Tolbutamid bestimmt. Daraufhin wurden die Fläche unter der Blutzuckerkurve und die Senkung durch Tolbutamid einmal vor und dann nach Induktion mit Rifampicin berechnet.

Es stellte sich heraus, dass die Blutzucker senkende Potenz von Tolbutamid durch die Verabreichung von 450 mg Rifampicin über 4 Tage im Mittel um 23 % bei allen Genotypen abnahm ($p = 0,028$ Wilcoxon-Test). Die CYP2C9-Polymorphismen *2 und *3 unterschieden sich nicht vom Wildtyp in der Blutzucker senkende Potenz von Tolbutamid, weder vor noch nach Induktion mit Rifampicin. Auch Kirchheiner et al. kam in einer Studie aus dem Jahr 2002 zu dem Schluss, dass der Blutzucker und die Insulinsekretion nach Tolbutamidstimulation sich nicht zwischen den einzelnen CYP2C9-Genotypengruppen unterscheidet. Erstmals konnte vorliegende Arbeit zeigen, dass die CYP2C9-Polymorphismen *2 und *3 im induzierten Zustand die Blutzucker senkende Wirkung von Tolbutamid nicht beeinflussen.

Obwohl die CYP2C9-Varianten deutlich unterschiedliche Tolbutamid-Konzentrationen vorweisen, scheint dies nicht zu unterschiedlichen Blutzuckerspiegeln zwischen den CYP2C9-Genotypen zu führen. Eine Erklärung könnte sein, dass die ausgewählten Probanden keine gestörte Blutzuckerregulierung aufweisen wie etwa Typ II Diabetiker. So wird der Blutzuckerspiegel bei Nichtdiabetiker durch mehrere Faktoren reguliert, die wichtigsten sind die beiden Hormongegenspieler Insulin und Glukagon. So kann bei gesunden Probanden eine gesteigerte Insulinsekretion durch eine forcierte Glukagonsekretion ausgeglichen werden. Für diabetische Patienten mit einem langsammetabolisierenden Genotyp kann allerdings ein erhöhtes Risiko für eine ausgeprägte Hypoglykämie nicht ausgeschlossen werden, zumal diese Patienten weit höheren therapeutischen Dosen Blutzucker senkenden Medikamenten ausgesetzt sind.

Neuere Sulfonylharnstoff wie Glibenclamid zeigten einen Wirkverlust von 44 % nach Induktion mit Rifampicin (Niemi et al., 2001). Die neueren Sulfonylharnstoffe der zweiten Generation besitzen eine 1000-fache Potenz im Vergleich zu Tolbutamid. Dies kann den nicht so deutlichen Effekt von Tolbutamid in dieser Studie auf den Blutzuckerspiegel erklären.

4.5 Ausblick

CYP2C9-Polymorphismen können zu deutlichen Unterschieden in der Pharmakokinetik von vielen in der Arzneimitteltherapie eingesetzten Medikamenten wie orale Antidiabetika, orale Antikoagulantien, NSAIDs und anderen führen. Dies belegen enzymkinetische Untersuchungen, die in dieser Arbeit angesprochen wurden.

Neben des Genstatus, der lebenslang besteht, spielen weitere Einflussfaktore wie eine Komedikation eine bedeutende Rolle in der Variabilität des Arzneimetabolismus.

Eine Komedikation, die zur Induktion führt, kann die Variabilität weiter verstärken. Dies belegen die Daten dieser Studie. Im nicht-induzierten Status ist die Variabilität zwischen CYP2C9*1/*1 und CYP2C9*3/*3 Genotypen 6-fach, die Induktion führt zu einem 12-fachen Unterschied, wenn Träger des CYP2C9*1/*1 von Induktion betroffen sind und *3/*3 nicht.

Bei der Entwicklung genotypenbasierter Arzneimitteldosierung muss die Bedeutung des lebenslangen Genotypen mit der des aktuellen Phänotypen abgewogen werden. Der aktuelle Phänotyp hängt dabei signifikant von dem aktuellen Induktionsstand der Enzyme ab. Besonders im Hinblick auf eine Mehrfachmedikation scheint der Enzyminduktionsstatus bedeutsamer als der Genotyp des Enzyms selbst (Kirchheiner et al., 2004).

In der klinischen Praxis sind viele Einflussgrößen am Gelingen einer Arzneitherapie beteiligt. Neben der Pharmakokinetik sind pharmakodynamische Endpunkte zu berücksichtigen, die in prospektiven Untersuchungen den Effekt einer genotypenbasierten Arzneydosierung beweisen müssen. Zusammen mit den Ergebnissen früherer enzymkinetischer Untersuchungen kann diese Arbeit als Basis für weitere Studien dienen.

4.6 Zusammenfassung

Die Allelvarianten *2 und *3 des CYP2C9 sind deutlich an der Variabilität des Arzneimittel-metabolismus über diese Enzym beteiligt. Rifampicin als CYP2C9-Enzyminduktor führt zu relevanten Auswirkungen im Metabolismus von CYP2C9-Substraten. Diese Studie sollte klinisch untersuchen, ob die Allelvarianten *2 und *3 Einfluss auf die Enzyminduktion ausüben.

Nach der Genotypisierung von 130 gesunden Probanden in ihre CYP2C9-Genotypen wurde die totale orale Clearance von Tolbutamid vor und nach Induktion mit Rifampicin gemessen. Die Allelvarianten *2 und *3 zeigten einen deutlichen Trend zu reduzierten totalen oralen Clearances von Tolbutamid vor ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test) und nach Induktion mit Rifampicin ($p < 0,001$ Jonckheere-Terpstra-Test). Der Induktionsfaktor berechnet aus der totalen oralen Clearance wies eine große Variabilität auf (1-5), und obwohl eine Tendenz zu erhöhten Induktionsfaktoren bei Trägern des *3 Allels zu erkennen ist, erreichte diese Tendenz nicht das Signifikanzniveau. Interessanterweise wirkte sich die Induktion, gemessen an der Clearance-Differenz, bei Wildtyp-Trägern deutlich auf die Clearance aus ($p < 0,001$ Wilcoxon-Test), während die Induktion bei *3/*3 Genotypen keinen deutlichen Unterschied bewirkte ($p = 0,109$ Wilcoxon-Test).

Erstmalig konnte mit vorliegender Studie gezeigt werden, dass relativ gesehen die Induktion zwischen den verschiedenen CYP2C9-Genotypen nicht unterschiedlich ist, aber absolut gesehen auch nach Induktion die Aktivität der CYP2C9-Polymorphismen niedrig bleibt.

Literaturverzeichnis

- Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*. 1999, 353. 717-719
- Baes M, Gulick T, Choi HS, Martinoli MG, Simha D and Moore DD. A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily that interacts with a subset of retinoic acid response elements. *Mol Cell Biol*. 1994, 14. 1544-1552
- Bertz RJ, Granneman GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet*. 1997, 32. 210-258
- Brockmüller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. Pharmacogenetic diagnostics of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics*. 2000, 1(2). 125-151
- Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet*. 2001, 40. 327-341
- Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004, 308. 495-501
- Crespi CL, Miller VP. The R144C change in the CYP2C9*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics*. 1997, 7. 203-210
- de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*. 1994, 269. 15419-15422
- de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990, 253(1). 387-393
- Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, Kim RB, Wood AJ, Stein CM, Wilkinson GR, Schwarz UI. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol*. 2001, 60. 382-387

- Douglas JG, McLeod MJ. Pharmacokinetic factors in the modern drug treatment of tuberculosis. *Clin Pharmacokinet.* 1999, 37. 127-146
- Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics: drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 2003, 348. 538-549
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science.* 1999, 286. 487-491
- Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL Jr, Bhat K, Kim RB, Wilkinson GR. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics.* 2003, 13. 595-606
- Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Gamito FJG, Agúndez JAG. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001, 57. 47-49
- Gerok W, Sickinger K. *Drugs and the liver.* Schattauer Verlag, Stuttgart. 1973. 441
- Gillette JR. Metabolism of drugs and other foreign compounds by enzymatic mechanisms. *Progr Drug Res.* 1963, 6. 11-75
- Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol.* 2001, 52(4). 349-355
- Goldstein JA, de Morais SMF. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics.* 1994, 4. 285-299
- Gray IC, Nobile C, Muruseu R, Ford S, Spurr NK. A 2,4 megabase physical map spanning the Cyp2C gene cluster on chromosome 10q24. *Genomics.* 1995, 28. 328-332
- Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 1999, 104. 147-153
- Ho PC, Saville DJ, Wanwimolruk S. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J Pharm Pharm Sci.* 2001, 4. 217-227

- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphism of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2000, 97. 3473-3478
- Ieiri I, Tainaka H, Morita T, Hadama A, Mamiya K, Hayashibara M, Ninomiya H, Ohmori S, Kitada M, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Ther Drug Monit*. 2000, 22(3). 237-244
- Ingelman-Sundberg M. Implication of polymorphic Cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metabolism and Disposition*. 2001, 29(4). 570-573
- Jetter A, Kinzig-Schippers M, Skott A, Lazar A, Tomalik-Scharte D, Kirchheiner J, Walchner-Bonjean M, Hering U, Jakob V, Rodamer M, Jabrane W, Kasel D, Brockmüller J, Fuhr U, Sorgel F. Cytochrome P(450) 2C9 phenotyping using low-dose tolbutamide. *PEur J Clin Pharmacol*. 2004, 60(3). 165-171
- Kay L, Kampmann JP, Svendsen TL, Vergman B, Hansen JE, Skovsted L, Kristensen M. Influence of rifampicin and isoniazid on the kinetics of phenytoin. *PBr J Clin Pharmacol*. 1985, 20(4). 323-326
- Kidd RS, Straughn AB, Meyer MC, Blaisdell J, Goldstein JA, Dalton JT. Pharmacokinetics of chlorpheniramine, phenytoin, glipizide and nifedipine in an individual homozygous for the CYP2C9*3 allele. *Pharmacogenetics*. 1999, 9(1). 71-80
- Kirchheiner J, Bauer S, Meineke I, Rohde W, Prang V, Meisel C, Roots I, Brockmüller J. Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Pharmacogenetics*. 2002, 12. 101-109
- Kirchheiner J, Brockmüller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W, Meisel C, Roots I. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 2002, 71. 286-296

- Kirchheiner J, Meineke I, Freytag G, Meisel C, Roots I, Brockmöller J. Enantiospecific effects of cytochrome P450 2C9 amino acid variants on ibuprofen pharmacokinetics and on the inhibition of cyclooxygenases 1 and 2. *Clin Pharmacol Ther.* 2002, 72. 62-75
- Kirchheiner J, Meisel C, Goldammer M, Gerloff T, Kaiser R, Roots I. Pharmakogenetik als Basis neuer Therapiekonzepte. *Bundesgesundheitsblatt.* 2003, 46. 835-844
- Kirchheiner J, Tshauridu M, Jabrane W, Roots I, Brockmöller J. The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Med.* 2004, 1(1). 63-84
- Lamba J, Lamba V, Schuetz E. Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics. *Current Drug Metabolism.* 2005, 6. 369-383
- Llerena A, Dorado P, et al.. Lower frequency of CYP2C9*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. *The Pharmacogenomics Journal.* 2004, 4. 403-406
- Kutt H, Wolk M, MC Dowell F. Insufficient parahydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity. *Neurology.* 1964, 14. 542-548
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a metaanalysis of prospective studies. *JAMA.* 1998, 279. 1200-1205
- Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics.* 2002, 12(3). 251-263
- Lee CR, Pieper JA, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Evaluation of cytochrome P450 2C9 metabolic activity with tolbutamide in CYP2C9*1 heterozygotes. *Clin Pharmacol Ther.* 2002, 72(5). 562-571
- McCrea JB, Cribb A, Rushmore T, Osborne B, Gillen L, Lo MW, Waldman S, Bjornsson T, Spielberg S, Goldberg MR. Phenotypic and genotypic investigations of a healthy volunteer deficient in the conversion of losartan to its active metabolite E-3174. *Clin Pharmacol Ther.* 1999, 65(3). 348-352
- Meehan RR, Gosden JR, Rout D, Hastle ND, Friedberg T, Adesnik M, Buckland R, van Heyningen V, Fletcher J, Spurr NK, Sweeney J, Wolf CR. Human cytochrome P-450 PB-1: A multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10. *Am J Genet.* 1988, 42. 26-37

- Miners JO, Birkett DJ. The use of tolbutamide as a substrate probe for human hepatic P4502C9. *Methods Enzymol.* 1996, 272. 139-145
- Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol.* 1998, 45. 525-538
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus JC, Nebert DW. P 450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996, 6. 1-42
- Niemi M, Kivisto KT, Backman JT, Neuvonen PJ. Effect of rifampicin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glimepiride. *Br J Clin Pharmacol.* 2000, 50. 591-595
- Niemi M, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Effects of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide and glipizide. *Clin Pharmacol Ther.* 2001, 69. 400-406
- Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9 genotypes. *Clin Pharmacol Ther.* 2002, 72. 326-332
- Niemi M, Schaeffeler E, Lang T, Fromm MF, Neuvonen M, Kyrklund C, Backman JT, Kerb R, Schwab M, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivisto KT. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide-C (OATP-C, SCLO1B1). *Pharmacogenetics.* 2004, 14. 429-440
- Niemi M, Kivisto KT, Diczfalusy U, Bodin K, Bertilsson L, Fromm MF, Eichelbaum M. Effect of SLCO1B1 polymorphism on induction of CYP3A4 by rifampicin. *Pharmacogenet Genomics.* 2006, 16(8). 565-568
- O'Reilly RA. Interaction of sodium warfarin and rifampin. *Ann Intern Med.* 1974, 81. 337-40
- O'Reilly RA. Interaction of chronic daily warfarin therapy and rifampin. *Ann Intern Med.* 1975, 83. 506-508
- Relling MV, Aoyama T, Gonzales FJ, Meyer UA. Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990, 252. 442-447

- Remmer H, Merker HJ. Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: Association with drug-metabolizing enzymes. *Science*. 1963, 142. 1657-1658
- Rushmore TH, Kong AN. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*. 2002, 3. 481-490
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997, 60. 284-295
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000, 67. 48-56
- Schmider J, Brockmüller J, Arold G, et al.. Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine. *Pharmacogenetics*. 1999, 9. 725-734
- Schneeweiss S, Hasford J, Gottler M, Hoffmann A, Riethling AK, Avorn J. Admissions caused by adverse drug events to internal medicine and emergency departments in hospitals: a longitudinal population-based study. *Eur J Clin Pharmacol*. 2002, 58. 285-291
- Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately upregulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 1996, 49. 311-318
- Scordo MG, Pengo V, Spina E, Dahl ML, Gusella M, Padriani R. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance. *Clin Pharmacol Ther*. 2002, 72. 702-710
- Scott J, Poffenbarger PL. Pharmacogenetics of tolbutamide metabolism in humans. *Diabetes*. 1979, 28(1). 41-51
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994, 270. 414-423

- Shintani M, Ieiri I, Inoue K, Mamiya K, Ninomiya H, Tashiro N, Higuchi S, Otsubo K. Genetic polymorphisms and functional characterization of the 5'-flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. *Clin Pharmacol Ther.* 2001, *70*(2). 175-182
- Shon JH, Yoon YR, Kim KA, Lim YC, Lee KJ, Park JY, Cha IJ, Flockhart DA, Shin JG. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genetic polymorphisms on the disposition of and blood glucose lowering response to tolbutamide in humans. *Pharmacogenetics.* 2002, *12*. 111-119
- Smith JN, Williams RT. The metabolism of phenacetin (p-ethoxyacetanilide) in the rabbit and a further observation on acetanilide metabolism. *Biochem J.* 1949. *44*. 239-242
- Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA . The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics.* 1996, *6*(4). 341-349
- Syvälähti E, Pihlajamäki K, Iisalo E. Effect of tuberculostatic agents on the response of serum growth hormone and immunoreactive insulin to intravenous tolbutamid, and on the half-life of tolbutamide. *Int J Clin Pharmacol Biopharm.* 1976, *13*. 83-89
- Tirona RG, Leake BF, Wolkoff AW, Kim RB. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003, *304*. 223-228
- Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K. CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics.* 2000, *10*(2). 95-104
- Thijssen HH, Driittij MJ, Vervoort LM, de Vries-Hanje JC. Altered pharmacokinetics of R- and S- acenocoumarol in a subject heterozygous for CYP2C9*3. *Clin Pharmacol Ther.* 2001, *70*. 292-298
- Thomas RC, Ikeda GJ. The metabolic fate of tolbutamide in man and in the rat. *J Med Chem.* 1966, *9*. 507-510
- Twum-Barima Y, Carruthers SG. Quinidine-rifampin interaction. *N Engl J Med.* 1981, *304*. 1466-1469
- Vavricka SR, Van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K. ME. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human. *Hepatology.* 2002, *36*(1). 164-172

- Veronese ME, Miners JO, Randles D, Gregov D, Birkett DJ. Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers. *Clin Pharmacol Ther.* 1990, 47. 403-411
- Williams RT. Detoxifikation mechanisms the metabolism and detoxification of drugs, toxic substances and other organic compounds. Chapman & Hall, London. 1959. 796
- Williamson KM, Patterson JH, McQueen RH, Adams KF Jr, Pieper JA. DEffects of erythromycin or rifampin on losartan pharmacokinetics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* 1998. 63(3). 316-323
- Williams PA, Cosme J, Ward A, Angove HC, Matak Vinkovic D, Jhoti H. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature.* 2003, 424. 464-468
- Wolf CR, Smith G. Pharmacogenetics. *Br Med Bull.* 1999, 55(2). 366-386
- Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol.* 1992, 22. 1-21
- Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002, 54(10). 1257-1270
- Yasar U, Tybring G, Hidestrand M, Oscarson M, Ingelman-Sundberg M, Dahl ML, Eliasson E. Role of CYP2C9 polymorphism in losartan oxidation. *Drug Metab Dispos.* 2001, 29. 1051-1056
- Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Wrighton SA, Hancock M, Kim RB, Strom S, Thummel K, Russel CG, Hudson JR Jr, Schuetz EG, Boguski MS. The human pregnane X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics.* 2001, 11. 555-572

Webseiten

<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>. UT Memphis, Department of Biochemistry 1993: Cytochrome P450 homepage

<http://www.imm.ki.se/CYPallels/cyp2c9.htm>; Karolinska Institute, National Institute Of Environmental Medicine 1999: Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee

<http://medicine.iupui.edu/flockhart/>; UT Indiana, Department Of Medicine 2002: Cytochrome P450 drug int

Erklärung

Ich, Jonas Kuon, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genetisch bedingte Unterschiede der CYP2C9-Aktivität: Einfluss von Enzyminduktion“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderen Arbeiten dargestellt habe.

Heidelberg, den 03.05.2007

Jonas Kuon

Danke

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ivar Roots für die Überlassung des Dissertations-Themas und für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité anzufertigen.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Julia Kirchheiner für die Hilfestellung während der praktischen Tätigkeit sowie bei der Fertigstellung der Dissertation.

Danke auch Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller für die Einarbeit in die Statistik.

Gedankt sei auch dem Labor für Klinische Pharmakologie, Dr. Steffen Bauer und Mitarbeitern.

Nicht zuletzt meinen Freunden und Unterstützern.

Publikationsliste:

Vormfelde SV, Kirchheiner J, Bauer S, Herchenhein P, Kuon J, Zirk A, Brockmöller J: Rifampin induction and polymorphisms of CYP2C9: *-in Vorbereitung*