

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

2.1.1 Stichprobenumfang

Die vorliegende Studie war als Pilotstudie angelegt. Nach klinischen und laborchemischen Voruntersuchungen wurden 50 gesunde nicht verwandte männliche Probanden aus Berlin und Umgebung in die Studie eingeschlossen. Als gesund galten Männer, die in allen unter 2.1.3 und 2.1.4 angegebenen Untersuchungen und Laborparametern normale bzw. unauffällige Befunde aufwiesen. Das Alter der Probanden lag zwischen 18 und 40 Jahren, der Altersdurchschnitt bei 26 Jahren. Das Körpergewicht war verteilt zwischen 45,1 kg und 74,6 kg und lag somit im Broca-Index-Normalbereich. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin genehmigt.

2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden gesunde Männer im Alter zwischen 18 und 40 Jahren, die ein Normalgewicht hatten (Broca-Index \pm 15%) und nach eigener Auskunft Nichtraucher waren. Nach schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden erfolgte die klinische Voruntersuchung. Zur Vermeidung systemischer Fehler durch populationsgenetisch bedingte Varianzen in der *MDR1*-Genexpression nahmen ausschließlich Probanden kaukasischer Herkunft an der Studie teil.

Ausgeschlossen wurden Probanden mit:

- Leber- und Nierenfunktionsstörungen
 - pathologischen Befunden im EKG (z.B. Herzrhythmusstörungen, Karotissinussyndrom, Kammertachykardie, AV-Block 2. oder 3. Grades, WPW-Syndrom)
 - Elektrolytstörungen (z.B. Hyperkalzämie oder Hypokaliämie)
 - Zustand nach Operation des Gastrointestinaltraktes, außer Appendektomie
-

-
- Teilnahme an einer anderen Studie in den letzten 3 Monaten oder Blutspende innerhalb der letzten 30 Tage
 - regelmäßige Medikamenteneinnahme sowie Medikamenteneinnahme innerhalb von 4 Wochen vor Beginn der Studie
 - Drogenkonsum oder Verdacht auf selbigen (negatives Drogenscreening im Urin)
 - bekannte maligne Erkrankung
 - Erkrankung des Zentralnervensystems
 - anamnestisch bekannte Arzneimittelallergien
 - Infektion mit Hepatitis B, Hepatitis C und HIV

2.1.3 Klinische Voruntersuchung

Innerhalb von 14 Tagen vor Beginn der Studie und nach schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden folgten

- medizinische Anamnese
 - Feststellung von Alter, Körpergröße und Gewicht
 - Messung der Körpertemperatur (sublingual)
 - Pulsfrequenz- und Blutdruckbestimmung (beidseitig) in liegender Position nach 5 min Ruhe
 - körperliche Untersuchung (Kopf, Thorax, Abdomen, Muskel- und Skeletapparat, neurologischer Status)
 - 12 Kanal EKG-Messung
 - klinisch-chemische und hämatologische Untersuchung (siehe 2.1.4 Labordiagnostik)
-

2.1.4 Labordiagnostik

Neben der klinischen Untersuchung erfolgten am Tag der Voruntersuchung eine Blutabnahme und die Abnahme zweier Urinproben zur labordiagnostischen Bestimmung folgender Parameter:

Im Serum:

- HIV, HCV-Ak und HBsAg-Serologie
- Quick und PTT
- Kalium, Natrium, Chlorid und Calcium
- ASAT, ALAT, γ -GT, CK und AP
- Glucose, Cholesterin, Triglyzeride, Gesamt-Bilirubin
- Kreatinin, Harnstoff
- Albumin
- Hb, Hk, Erythrozyten, Leukozyten, Differential-Blutbild.

Im Urin:

- Erythrozyten
 - Bakterien
 - PH
 - Glucose
 - Proteine
 - Bilirubin
 - Ketonkörper
 - Leukozyten
-

Im Urin-Drogenscreening:

- Kannabinoide
- Morphine und Derivate
- Amphetamine
- Barbiturate
- Benzodiazepine
- Kokain
- Alkohol und dessen Abbauprodukte

2.1.5 Klinische Nachuntersuchung

Etwa eine Woche nach Abschluss der Digoxin-Kinetik erfolgte die klinische Nachkontrolle. Die Probanden wurden erneut körperlich untersucht. Im Vordergrund stand die kardiale Untersuchung durch EKG, Blutdruck- und Pulsmessung sowie die labordiagnostische Blutanalyse, in der folgende Parameter bestimmt wurden:

- Quick und PTT
- Kalium, Natrium, Chlorid und Calcium
- ASAT, ALAT, γ -GT, CK und AP
- Glucose, Cholesterin, Triglyzeride, Gesamt-Bilirubin
- Kreatinin, Harnstoff
- Albumin
- Hb, Hk, Erythrozyten, Leukozyten, Differential-Blutbild.

2.1.6 Allgemeine Einschränkungen

Alkoholkonsum sowie der Genuss von Kaffee, koffeinhaltigen Getränken wie Cola und Schwarztee waren eine Woche vor, während und bis 3 Tage nach Beginn der Digoxin-Applikation nicht erlaubt. Um die Blutabnahmen zu standardisieren, sollten die Probanden morgens nüchtern (auch kein Tee oder Mineralwasser) am Tag der

Digoxin-Kinetik erscheinen. Erlaubt war lediglich die Einnahme von stillem Wasser 10 h vor und 4 h nach oraler Digoxin-Gabe. Durch Gespräche mit den Probanden wurde darauf hingewirkt, diese Vorgaben strikt einzuhalten.

2.2 Studiendesign

Die Studie war als Pilotstudie angelegt. Eine Blendung war nicht nötig, da jeder Proband die gleiche Menge Digoxin als orale Gabe erhielt und die zu messenden Parameter nicht von der subjektiven Wahrnehmung der Teilnehmer und der Studienärzte abhängig war.

2.2.1 Studienverlauf

Die Tabelle 2.1 veranschaulicht den zeitlichen Ablauf und die jeweiligen Untersuchungen der Digoxin-Kinetik.

Tabelle 2.1: Zeitraum und Ablauf der Digoxin-Kinetik

Tag	Zeitlicher Ablauf	Blutentnahme/Untersuchungen
14-7 d vor der Digoxin-Kinetik	Vormittags	<u>Klinische Voruntersuchung:</u> Siehe 2.1.3.
1	8.00 Uhr	Legen des peripher-venösen Verweilkatheters und eine Leerwertblutentnahme (Nr.1)
	Zeitpunkt nach Digoxin-Gabe in min: 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 90, 120, 180, 240	Anschließend einmalige Gabe von 1mg Digoxin zusammen mit 200 ml Leitungswasser Blutentnahme je 5 ml aus dem Katheter in ein EDTA-Röhrchen (Nr.2-Nr.14) Anschließend Kontroll-EKG
Etwa+8	Vormittags	<u>Klinische Nachuntersuchung:</u> Siehe 2.1.5

Nach Entnahme der Blutproben wurden die EDTA Röhrchen zentrifugiert und das dekantierte Plasma in Polypropylenröhrchen bei -22°C gelagert.

2.2.2 Probandenüberwachung

Über den gesamten Verlauf der Studie erfolgten Messungen von Blutdruck, Puls und EKG (Tabelle 2.1), um das mögliche Auftreten kardialer Nebenwirkungen frühzeitig

zu erkennen. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen wurden nach Zeitpunkt, Art und Dauer dokumentiert. Es lag im Ermessen des Prüfarztes und der Entscheidungsfreiheit des Probanden, die Studie fortzuführen oder abzubrechen. Bei keinem der in dieser Studie untersuchten Probanden war ein Ausschluss erforderlich.

2.3 Digoxin

Für die Studie wurde das Herzglykosid Digoxin als folgendes handelsübliches Präparat für die orale Applikation eingesetzt:

- DilanacinTM, Arzneimittelwerk Dresden GmbH, Radebeul; 1 Tablette enthält 0.25 mg Digoxin

Alle Präparate stammten aus einer Charge. Jeder Proband erhielt eine einmalige orale Dosis von 1 mg.

2.4 Kinetik von Digoxin

2.4.1 Materialien

Für die Bestimmung der Digoxin-Kinetik wurden folgende Materialien verwendet:

- Imx Digoxin Assay (Abbott Laboratories)
- Imx Digoxin MODE 1 Kalibrator (zur Nullwertbestimmung)
- Imx Digoxin-Kontrollen L, M und H (zum Kontrollieren der Messwerte)

2.4.2 Ablauf der quantitativen Digoxin-Messung

Mit Hilfe des oben genannten Mess-Kit wurde ein Mikropartikel-Enzymimmunoassay durchgeführt (IMx[®] Digoxin Assay, Abbott Laboratories; USA). Dazu wurde der digoxinhaltige Reaktionsansatz mit anti-Digoxin-beschichteten Mikropartikeln versetzt. Der dabei gebildete Antikörper-Antigen-Komplex führte auf einer Glasfibrermatrix zu irreversibler Bindung der Mikropartikel. Ein Digoxin-alkalisches Phosphatase-Konjugat wurde dazugegeben um an die freien Stellen der mit anti-Digoxin beschichteten Mikropartikel zu binden. Durch die Beschichtung der

gewaschenen Matrix mit 4-Methylumbelliferyl-Phosphat konnte das fluoreszierende Reaktionsprodukt in einem optischen Messapparat quantifiziert werden. Sämtliche Werte wurden doppelt bestimmt und deren Mittelwerte für spätere Berechnungen und Tabellen genutzt. Bei einem Messbereich von über 4,00 µl/ml erfolgte eine Verdünnung mittels Imx Digoxin MODE 1 Kalibrator im Verhältnis 1:1. Die anschließende Messung und Verdopplung der Werte führten zum Messergebnis.

2.5 Pharmakokinetische Parameter

Um Aussagen über die Aktivität und den Expressionsgrad von P-gp zu machen, war es nötig, die dafür relevantesten Parameter auszuwählen. Im Anschluss an die Digoxin-Kinetik wurden daher aus dem abzentrifugierten Plasma der Probanden die folgenden Hauptzielparameter ermittelt:

- die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve (AUC 0-4h)
- die Höhe des maximalen Plasmaspiegels (C_{max})
- der Zeitpunkt des maximalen Plasmaspiegels (T_{max})

Die größten P-gp assoziierten Veränderungen der AUC traten während der ersten Stunden nach oraler Einnahme auf. Digoxin hat ein großes Verteilungsvolumen und bindet sich rasch an Körpergewebe wie z.B. Herz- und Skelettmuskulatur, so dass die AUC nach 4 Stunden vernachlässigbar gering ist (44). Daher wurde für die Auswertung der Studie die AUC (0-4) für die Zeit der ersten 4 Stunden berechnet. Die AUC berechnete sich durch die Trapezregel $AUC = (C_{i+1} + C_i) \cdot (T_{i+1} - T_i) : 2$. Sowohl T_{max} als auch C_{max} von Digoxin wurden direkt aus den gemessenen Werten abgeleitet.

2.6 DNA-Extraktion

2.6.1 Grundlagen

Zur Bestimmung der 8 Polymorphismen im *MDR1*-Gen musste zunächst DNA aus einer Vollblutprobe der Probanden isoliert werden. Dazu wurde das Blut mit einem

Ery-Lyse-Puffer versetzt, gemischt, gekühlt und nachfolgend 30 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes verblieb ein Zellpellet, zu dem nun 1,5 ml TEN-Puffer gegeben wurden. In ein weiteres Röhrchen wurden 1,5 ml Lysis-Puffer und 2 mg Proteinase gelöst in 100 µl 20 mmol/l Tris/HCL-Puffer gegeben. Die dabei überführten Zellsedimente inkubierten über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden 1,5 ml Phenol/Chloroform hinzugegeben und die Röhrchen im Überkopfschüttler 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Die dabei entstandene obere wässrige Phase wurde in ein dafür vorgesehenes Röhrchen überpipettiert und anschließend abermals zentrifugiert. Dem dekantierten Überstand wurde in einem neuen Röhrchen 6 ml 96%iges Ethanol+100 µl 3 mol/l Natriumacetat-Lösung pH 5,5 zugegeben, geschüttelt und abgestellt. Nach einer Zeit von 15 min bis 3 h wurde erneut zentrifugiert (10 min bei 3000 rpm). Der Überstand wurde mit 3 ml 70%igem Ethanol versetzt, geschüttelt und zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und Verdunsten des Restethanols verblieb im Röhrchen die zur PCA benötigte Desoxyribonucleinsäure. Diese wurde über Nacht in 250-350 µl TE-Puffer bei 55°C gelöst. Danach konnte die DNA photometrisch quantifiziert und deren Reinheit nach einem Quotienten aus der optischen Dichte bei 280 und 260 nm bestimmt werden.

2.6.2 Materialien

Mit Hilfe der folgenden Materialien wurde die DNA aus dem Probandenvollblut extrahiert:

- Ery-Lyse-Puffer:

1,15 mol/l Ammoniumchloridlösung (61,46 g/l)

0,1 mol/l Kaliumhydrogencarbonat-Lösung (10,01 g/l)

1 mmol/l Na-EDTA-Lösung (372 mg/l)

- TEN-Puffer:

0,2 mol/l Tris/HCL pH 7,5 (24,22 g/l)

0,02 mol/l Na-EDTA-Lösung (7,44 g/l)

0,3 mol/l NaCl-Lösung (17,53 g/l)

- Proteinase-Lösung:

2 mg Proteinase gelöst in 100 µl 20 mmol/l Tris/HCL-Puffer (2,42 g/l)

- TE-Puffer:

10 mmol/l Tris/HCL

0.1 mol/l Na-EDTA-Lösung (37,2 g/l)

- Phenol/Chloroform-Gemisch: (Fertiglösung von Fa. Applied Biosystems, Nr.8)
- Chloroform
- 70%iges und 96%iges Ethanol

2.7 Genotypisierung

2.7.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Grundlagen

Die PCR diente zur Amplifikation von *MDR1*-cDNA-Fragmenten. Prinzipiell wird für die PCR eine DNA-Matrize, welche sowohl aus doppelsträngiger als auch aus einzelsträngiger DNA bestehen kann, und ein Polymerisationsprimer-Paar benötigt. Während die Polymerisationsprimer im 3`-Bereich immer vollständig komplementär zur Matrize sein müssen, können die 5`-Bereiche eines Primers teilweise degeneriert sein oder eine 5`-überhängende nicht komplementäre Sequenz enthalten. Die Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) gestattet die exponentielle Amplifikation definierter DNA-Sequenzen durch Erkennen selbiger und deren Verlängerung mit Hilfe von zugegebenen Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs). Der Nukleotideinbau wird begünstigt durch eine optimale Konzentration von Magnesiumchlorid, das mit den dNTPs lösliche Komplexe zu bilden vermag und somit die Polymeraseaktivität

wesentlich verbessert. Zunächst erfolgte die Denaturierung der DNA über einen Zeitraum von 2 min bei 94°C. In 35 repetitiv aufeinanderfolgenden Temperaturschritten wurde nun die Matrizen-DNA jeweils 30 Sekunden bei 94°C denaturiert und anschließend 30-60 s auf eine Temperatur < 60°C abgekühlt. Dabei fand die Hybridisierung der Polymerisationsprimer an die DNA-Matrize statt. Dann wurde der Reaktionsansatz auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase (72°C) erwärmt, wodurch es zur Anordnung der hybridisierten Primer komplementär zur Matrize kommt (Polymerisation). Die finale Extension der synthetisierten Doppelstränge erfolgte bei 72°C über 10 min. Die Methode zur Amplifikation beruhte auf den Arbeitsschritten von Cascorbi *et al.* (38).

Materialien

Für die Amplifizierung der DNA wurden die folgenden Materialien verwendet:

- Thermocycler Trio (Biometra, Göttingen)
- PCR-Puffer II (Roche, Mannheim, Germany)
- 2mmol/l $MgCl_2 \Rightarrow$ je 5 pmol des 3`- bzw. 5`-Primers (TIB Molbiol, Berlin, Germany)
- 0,5 Einheiten AmpliTaq-Polymerase (Roche, Mannheim, Germany)

2.7.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Anhand von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) ließen sich die einzelnen Genotypen eruieren und gegenüberstellen. Durch einzelne Nukleotid-Polymorphismen, Insertionen sowie Deletionen können neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme geschaffen oder alte entfernt werden. Die Länge der Restriktionsfragmente variiert mit der jeweiligen DNA-Modifikation.

Die im Rahmen der Studie untersuchten Polymorphismen sind in Tabelle 2.2 zusammen mit den jeweiligen Primern, den dazugehörigen Primersequenzen, den eingesetzten Restriktionsenzymen und den Fragmentlängen für das Referenztypallel und für homozygote Polymorphismen aufgeführt.

Tabelle 2.2: Die untersuchten 8 Polymorphismen des *MDR1*-Gens

Polymorphismus im <i>MDR1</i> -Gen	Primernamen	Restriktionsenzym	Fragmentlänge (Referenztypallel/Variante)
Ex2-1G>A	MDR-26 MDR-27	FokI	119 119/ 238
Ex2 61>G	MDR-1b MDR-6	Taq II	279 / 146 33
Ex6+ 139C>T	MDR-13 MDR-14	Ssp I	299 / 275 24
Ex11 1199G>A	MDR-24 MDR-25	Eco57 I	206 52/ 258
Ex17-76T>A	MDR-20 MDR-21	Apo I	231 84/ 120 111 84
Ex21 2677G>A	MDR-9 MDR-10	Bsr I	220 / 206 14
Ex21 2677G>T	MDR-9 MDR-10a	Ban I	198 26/ 224
Ex26 3435C>T	MDR-11 MDR-12	Sau3A I	197 / 158 39

2.7.3 Methodenstatistik

Die Medianwerte wurden für die AUC, C_{max} und T_{max} bezogen auf die verschiedenen Genotypen berechnet. Ziel der Studie war die Überprüfung des Einflusses von *MDR1*-Polymorphismen auf Parameter der Digoxin-Kinetik. Der Kruskal-Wallis Test berechnete statistische Signifikanzen von mehr als 2 parallelen Gruppen. Für die Gegenüberstellung zweier Gruppen wurde die Mann-Whitney-U Kalkulation angewandt. Ein Prüfwert von $p < 0,05$ galt dabei als signifikant. Für die dargestellten Box plots sowie für die nichtparametrischen Tests nach Kruskal-Wallis wurde das Statistikprogramm SPSS benutzt.