

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

## DISSERTATION

# **Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im Enzym Cytochrom P450 2C9 für Pharmakokinetik und Wirkungen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika Diclofenac und Ibuprofen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité  
Universitätsmedizin Berlin

von Georg Freytag

aus Uslar

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Roots

2. Prof. Dr. med. J. Brockmüller

3. PD Dr. med. K. L. Rost

Datum der Promotion: 7.4.2005

## Die Bedeutung genetischer Polymorphismen im Enzym Cytochrom P450 2C9 für Pharmakokinetik und Wirkungen von Diclofenac und Ibuprofen

Es wird angenommen, dass Cytochrom-P450 2C9 die 4'-Hydroxylierung des Nichtsteroidalen Antiphlogistikums Diclofenac und die Hydroxylierung von S-Ibuprofen beim Menschen katalysiert. Es existieren zwei Varianten von Cyp2C9. Deren Auswirkungen auf die Diclofenac- bzw. Ibuprofen-Pharmakokinetik und die Hemmung von Cox-1 und -2 wurde an 21 gesunden Probanden, die sämtliche Kombination der genetischen Varianten \*2 und \*3 aufwiesen, untersucht. Es zeigten sich keinerlei Hinweise auf eine Einschränkung des Metabolismus von Diclofenac bei heterozygoten und homozygoten Trägern der *Cyp2C9*-Allele \*2 und \*3. Darüber hinaus lagen auch die Serumkonzentrationen des Metaboliten 4'-OH-Diclofenac bei Trägern der Allele *Cyp2C9* \*2 und \*3 nicht niedriger. Obwohl verschiedene *in vitro*-Untersuchungen *Cyp2C9* als metabolisierendes Enzym identifizierten, ist die Pharmakokinetik von Diclofenac beim Menschen entweder überhaupt nicht oder nur in geringem Ausmaß von *Cyp2C9*-Aminosäurepolymorphismen abhängig. Möglicherweise sind die Auswirkungen der *Cyp2C9*-Aminosäurevarianten substratabhängig, oder es ist *in vivo* ein anderes Enzym als *Cyp2C9* verantwortlich für die Bildung von 4'-OH-Diclofenac. Im Unterschied dazu hing die Pharmakokinetik von racemischem und von S-Ibuprofen vom *Cyp2C9* \*3-Polymorphismus ab. Die Bildung von Tx B<sub>2</sub> (Cox-1) hing signifikant von *Cyp2C9* \*3-Polymorphismus ab, derselbe Trend ließ sich auch für Pg E<sub>2</sub> (Cox-2) beobachten. Die eingeschränkte Clearance von S-Ibuprofen, die mit einer erhöhten pharmakodynamischen Aktivität einhergeht, legt nahe, dass Träger des Allels *Cyp2C9*\*3 ein höheres Risiko tragen, nach Einnahme einer oralen Standarddosis unerwünschte Nebenwirkungen zu erleiden.

Cytochrom P450, Cyp 2C9, Diclofenac, Ibuprofen, Cox-1, Cox-2

## **Consequences of genetic polymorphisms in Cytochrome P450 2C9 for pharmacokinetics and effects of Diclofenac and Ibuprofen.**

Cytochrome-P450 2C9 is considered to catalyse the 4'-hydroxylation of the nonsteroidal analgesic drug diclofenac and the hydroxylation of S-ibuprofen in humans. There are two variants of *Cyp2C9*. Their impact on diclofenac/ ibuprofen pharmacokinetics and on the inhibition of cyclooxygenases 1 and 2 was studied in 21 healthy volunteers with all combinations of the *Cyp2C9* variants \*2 and \*3. Blood concentrations of diclofenac/ racemic ibuprofen (and of S-ibuprofen and R-ibuprofen) were measured by HPLC. Thromboxane B<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub> were measured with use of an enzyme immunoassay. There was no evidence of impaired metabolism of diclofenac in heterozygous and homozygous carriers of the *Cyp2C9* alleles \*2 and \*3 compared to the wildtype. Furthermore, plasma concentrations of the metabolite 4'-OH-diclofenac were not lower in carriers of *Cyp2C9*\*2 and \*3. Marked diclofenac mediated inhibition of Cox-1- and Cox-2 activity was detected in all individuals without any *Cyp2C9* genotype dependent differences. Even though several *in vitro* studies identified *Cyp2C9* as the metabolising enzyme, Diclofenac pharmacokinetics in humans is either not or only to a minor extent dependent on the *Cyp2C9* amino acid polymorphisms. It may be that the *Cyp2C9* amino acid variants have differential effects depending on the substrates. Alternatively, an enzyme other than *Cyp2C9* may be responsible for 4'-OH-Diclofenac formation *in vivo*. In contrast, the pharmacokinetics of racemic and of S-ibuprofen depended on the *Cyp2C9* \*3-polymorphism. The *Cyp2C9* variant \*2 exhibited no significant effect. Formation of Tx B<sub>2</sub> (cox-1) depended significantly on the *Cyp2C9* polymorphism, the same trend was observed for Pg E<sub>2</sub> (cox-2). The reduced S-ibuprofen total clearance accompanied by increased pharmacodynamic activity indicates an increased risk for carriers of *Cyp2C9*\*3 to suffer from adverse effects after intake of a standard oral dose.

Cytochrom P450, Cyp 2C9, Diclofenac, Ibuprofen, Cox-1, Cox-2

**Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungen .....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Biotransformation .....	3
1.1.1 Biotransformation und arzneimetabolisierende Enzyme .....	3
1.1.2 Erbliche Polymorphismen arzneimetabolisierender Enzyme .....	4
1.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem.....	6
1.3 Das Enzym Cytochrom P450 2C9.....	8
1.3.1 Das Cytochrom P450 2C9 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel..	8
1.3.2 Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450 2C9 .....	10
1.4 Nichtsteroidale Antiphlogistika .....	12
1.4.1 Entwicklung und Bedeutung der Nichtsteroidalen Antiphlogistika .....	12
1.4.2 Indikationen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika.....	13
1.4.2.1 Indikationen für Diclofenac.....	14
1.4.2.2 Indikationen für Ibuprofen .....	14
1.4.3 Pharmakokinetik der Nichtsteroidalen Antiphlogistika.....	14
1.4.3.1 Pharmakokinetik von Diclofenac.....	15
1.4.3.2 Pharmakokinetik von Ibuprofen.....	15
1.4.4 Wirkung der Nichtsteroidalen Antiphlogistika .....	16
1.4.5 Nebenwirkungen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika .....	18
1.5 Phänotypisierung und Genotypisierung.....	21
1.6 Herleitung der Aufgabenstellung .....	22
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Probandenrekrutierung und Studiendurchführung .....	24
2.1.1 Studiendesign .....	24
2.1.2 Probandenauswahl und Einschlusskriterien.....	24
2.1.3 Ausschlusskriterien .....	25
2.1.4 Art und Dosis der verwendeten Arzneimittel .....	26
2.1.5 Diätetische Maßnahmen .....	26
2.1.6 Überprüfung der Probandencompliance und Vorsichtsmaßnahmen...	26
2.1.7 Studienablauf .....	27
2.1.8 Dokumentation der Studie.....	27
2.1.9 Datenschutz und Vertraulichkeit der Daten.....	27
2.1.10 Erfassung von Nebenwirkungen .....	28

---

2.1.11	Fehlerminimierung .....	28
2.1.12	Versicherungsschutz.....	28
2.1.13	Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamenten- und Prostanoidkonzentrationen .....	28
2.2	Genotypisierung .....	29
2.2.1	Erythrozyten-Lyse .....	29
2.2.2	DNA-Extraktion .....	29
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.2.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP).....	32
2.2.5	Bestimmung des <i>Cyp2C9</i> -Allels durch PCR-RFLP-Tests .....	33
2.3	Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse ...	36
2.3.1	Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse.....	36
2.3.1.1	Vorbereitung der HPLC.....	36
2.3.1.2	Durchführung der HPLC.....	36
2.3.1.3	Statistische Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse.....	37
2.3.2	HPLC von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac.....	38
2.3.2.1	Vorbereitung der HPLC von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac. ...	39
2.3.2.2	Durchführung der HPLC von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac... ..	39
2.3.2.3	Statistische Qualitätskontrolle für Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac.....	40
2.3.3	HPLC von Ibuprofen und OH-Ibuprofen .....	40
2.3.3.1	Vorbereitung der HPLC von Ibuprofen und OH-Ibuprofen. ....	41
2.3.3.2	Durchführung der HPLC von racemischem Ibuprofen und OH-Ibuprofen.....	42
2.3.3.3	Statistische Qualitätskontrolle von racemischem Ibuprofen und OH-Ibuprofen.....	42
2.3.4	HPLC von R- und S-Ibuprofen .....	42
2.3.4.1	Vorbereitung der HPLC von R- und S-Ibuprofen.....	42
2.3.4.2	Durchführung der HPLC von R- und S-Ibuprofen. ....	43
2.3.4.3	Statistische Qualitätskontrolle von R- und S-Ibuprofen.....	43
2.4	Konzentrationsbestimmung von Tx B <sub>2</sub> und Pg E <sub>2</sub> mittels ELISA .....	43
2.4.1	Funktionsprinzip des ELISA .....	43
2.4.2	Bestimmung der Tx B <sub>2</sub> - und Pg E <sub>2</sub> -Plasmakonzentrationen.....	44

---

2.4.3	Statistische Qualitätskontrolle .....	44
2.5	Analyse der Messdaten und Statistik .....	45
3	<i>Ergebnisse</i> .....	46
3.1	Ergebnisse für Diclofenac .....	46
3.1.1	Pharmakokinetische Parameter von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac	46
3.1.1.1	Pharmakokinetik von Diclofenac in Abhängigkeit vom <i>Cyp2C9</i> -Genotyp .....	47
3.1.1.2	Pharmakokinetik von 4'-OH-Diclofenac in Abhängigkeit vom <i>Cyp2C9</i> -Genotyp .....	49
3.1.2	Pharmakodynamische Parameter von Diclofenac.....	49
3.2	Ergebnisse für Ibuprofen .....	52
3.2.1	Pharmakokinetische Parameter von Ibuprofen und OH-Ibuprofen.....	52
3.2.1.1	Pharmakokinetik von racemischem Ibuprofen in Abhängigkeit vom <i>Cyp2C9</i> -Genotyp .....	53
3.2.1.2	Pharmakokinetik von R-Ibuprofen in Abhängigkeit vom <i>Cyp2C9</i> -Genotyp .....	53
3.2.1.3	Pharmakokinetik von S-Ibuprofen in Abhängigkeit vom <i>Cyp2C9</i> -Genotyp .....	54
3.2.1.4	Pharmakokinetik von OH-Ibuprofen in Abhängigkeit vom <i>Cyp2C9</i> -Genotyp	54
3.2.2	Pharmakodynamische Parameter von Ibuprofen .....	56
4	Diskussion .....	59
4.1	Diskussion der Diclofenac-Ergebnisse .....	59
4.1.1	Auswirkungen von <i>Cyp2C9</i> -Genpolymorphismen auf den Diclofenac-Metabolismus .....	59
4.1.1.1	Vergleich der gefundenen Daten mit anderen <i>in vivo</i> -Untersuchungen .....	59
4.1.1.2	Denkbare Ursachen für die Diskrepanz zwischen <i>In vitro</i> - und <i>In vivo</i> -Daten .....	60
4.1.2	Auswirkungen von <i>Cyp2C9</i> -Genpolymorphismen auf die Diclofenac-Pharmakodynamik.....	63
4.1.2.1	Besonderheiten der $T_x$ $B_2$ -Konzentrationsverläufe und deren mögliche Ursachen .....	63
4.1.2.2	Hemmung der Cyclooxygenase-Isoenzyme durch Diclofenac.....	64

---

4.2	Diskussion der Ibuprofen-Ergebnisse.....	64
4.2.1	Auswirkungen von <i>Cyp2C9</i> -Genpolymorphismen auf den Ibuprofen-Metabolismus .....	64
4.2.1.1	Besonderheiten der Pharmakokinetik (Konversion von R-Ibuprofen zu S-Ibuprofen).....	66
4.2.2	Auswirkungen von <i>Cyp2C9</i> -Genpolymorphismen auf die Ibuprofen-Pharmakodynamik.....	66
4.2.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	67
	Literaturverzeichnis .....	68
	Erklärung an Eides Statt.....	77

**Abkürzungen**

Å	Angström
Abb.	Abbildung
ALAT	Alanin-Amino-Transferase
Anti-HCV	Anti-Hepatitis C-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve)
AUC <sub>last</sub>	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt der Medikamentenverabreichung bis zur letzten messbaren Konzentration
AUC <sub>pred</sub>	AUC <sub>predicted</sub> (vorhergesagte Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve)
bp	Basenpaare
BZ	Blutzucker
bzw	beziehungsweise
C	Konzentration
CI	Confidence interval (Vertrauensintervall)
C <sub>max</sub>	Maximale Konzentration
C <sub>min</sub>	Minimale Konzentration
Cl	Clearance
Cl/F	Clearance/bioverfügbare Fraktion (Orale Clearance)
cm	Zentimeter
Cox	Cyclooxygenase
CRF	Case report form (Fallbericht-Formular)
Cyp2C9	Cytochrom-P450 2C9 (das Gen)
Cyp2C9	Cytochrom-P450 2C9 (das Enzym)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Extensive metaboliser (schneller Metabolisierer)
Et al. (u.a.)	Et alii (und andere)
Fa.	Firma
γ-GT	γ-Glutamyltransferase
h	Stunde
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
Hbs-Ag	Hepatitis B-surface antigen (Oberflächenantigen des Hepatitis B-Virus)
HIV	Human immunodeficiency virus (Humanes Immundefizienz Virus)
HPLC	High pressure liquid chromatography
IM	Intermediate metaboliser (mittelschneller Metabolisierer)

---

IS	Interner Standard
KD	Kilo Dalton
$K_m$	Michaeliskonstante: Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit
kg	Kilogramm
LPS	Lipopolysaccharid
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MR	Metabolic ratio (Metabolisierungsquotient)
Mw	Mittelwert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat.
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
NSAID	Nonsteroidal antiphlogistic drug (Nichtsteroidales Anti-phlogistikum)
p	Signifikanzniveau (festgelegt auf 0,05)
Pg	Prostaglandin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pka-Wert	Stärke einer Brønsted-Säure
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PM	Poor metaboliser (langsamer Metabolisierer)
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RFLP	Restriction length fragment polymorphism (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)
RPLC	Reversed phase liquid chromatography
SD	Standardabweichung
SNP	Single nucleotide polymorphism
SRS	Substrate recognition site (Substrat-Erkennungsstelle)
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{max}$	Zeitpunkt, zu dem C maximal ist
Tab.	Tabelle
Tbc	Tuberkulose
TE-Puffer	Tris EDTA Puffer
TEN-Puffer	Tris EDTA Natriumchlorid Puffer
TPZ	Thromboplastinzeit
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
$T_x$	Thromboxan
U	Unit (Einheit)
UV	ultraviolett
$V_{max}$	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

# 1 Einleitung

## 1.1 Biotransformation

### 1.1.1 Biotransformation und arzneimetabolisierende Enzyme

Der Begriff Biotransformation beschreibt die Fähigkeit eines Organismus, Fremdstoffe (Xenobiotika) nach deren Resorption und Verteilung chemisch so zu verändern, dass sie schließlich eliminiert werden können. Solche Fremdstoffe begegnen dem menschlichen Organismus beispielsweise als Arzneimittel, als synthetische oder natürliche unerwünschte Stoffe in der Nahrung und als Kontamination von Luft, Wasser und Haushalt. In Abhängigkeit von ihrer Konzentration sind diese Fremdstoffe giftig für den Organismus und müssen daher, ebenso wie Abbauprodukte von Nährstoffen, ausgeschieden werden. Die Ausscheidung lipophiler Fremdstoffe ist allerdings erschwert. Diese unterliegen im Falle renaler Ausscheidung verstärkt der tubulären Reabsorption und im Falle biliärer Exkretion verstärkt dem enterohepatischen Kreislauf. Die Voraussetzungen für eine verbesserte Ausscheidung lipophiler Substanzen schafft im menschlichen Körper die Biotransformation. Sie ist Aufgabe eines hochdifferenzierten, hauptsächlich in der Leber lokalisierten Enzymsystems. Dieses Enzymsystem gewährleistet die Herabsetzung der Lipidlöslichkeit der abzubauenen Substanzen durch Metabolisierung. Außer in der Leber lässt sich auch in anderen Organen, etwa in der Niere, der Lunge, der Haut und im Gastrointestinaltrakt metabolische Aktivität nachweisen.

Allgemein kann Biotransformation an allen Enzymen des Organismus stattfinden, sofern die Substrate ihren Spezifitätskriterien genügen. Die im Rahmen der Biotransformation sich abspielenden Vorgänge können in zwei Phasen unterteilt werden (Tab.1). Die Reaktionen der ersten Phase werden auch Funktionalisierungsreaktionen genannt. Phase-I-Reaktionen besitzen ihre größte metabolische Aktivität im endoplasmatischen Retikulum der Zelle. Sie katalysieren die Freilegung oder aber die Einführung funktioneller Gruppen. Man unterscheidet innerhalb der Phase-I Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen, deren Aufgabe in der Umwandlung des Ausgangsstoffes in einen polaren Metaboliten besteht. Die Umwandlung führt in den meisten Fällen zur Inaktivierung des Metaboliten, kann aber auch in seltenen Fällen dessen Aktivierung nach sich ziehen. Bei den Phase-II-

Reaktionen handelt es sich um Konjugationsreaktionen, die größtenteils zytosolisch lokalisiert sind und im Einzelfall schon primär ablaufen können. Folglich wird daher entweder die Ausgangssubstanz oder aber der in der Phase-I-Reaktion entstandene polare Metabolit an saure Reste aus dem Intermediärstoffwechsel, z.B. Glukuronsäure oder Glutathion, gekoppelt. Größere Hydrophilie erlaubt dem Organismus die effektive renale und/ oder biliäre Ausscheidung. Biotransformierende Enzyme unterscheiden nicht zwischen für den Organismus nützlichen und schädlichen Substraten. Folglich darf Biotransformation nicht mit Entgiftung gleichgesetzt werden. Zwar kann Biotransformation ein weniger wirksames Endprodukt zur Folge haben, sie kann aber auch aus einer biologisch weitgehend inaktiven Vorstufe („Prodrug“) den eigentlichen Wirkstoff überhaupt erst herstellen. Als „Giftung“ bezeichnet man die Herstellung eines für den Körper schädlicheren Stoffes durch die Biotransformation. Die Regulation des Fremdstoffwechsels unterliegt vielfältigen Einflüssen. Es gibt individuelle Unterschiede in der Reaktion auf Fremdstoffe, die auf genetische, konstitutionelle und Umweltfaktoren zurückgeführt werden können. Darunter fallen z.B. genetisch bedingte Aktivitätsunterschiede der für die Phasen-I und -II der Biotransformation verantwortlichen Enzyme, Arzneimittelinteraktionen, Enzyminduktion und Enzyminhibition, verschiedene Erkrankungen, Körpergewicht, Ernährungsverhalten, Rauchen, Alkoholkonsum und schließlich auch altersabhängige Faktoren.

### **1.1.2 Erbliche Polymorphismen arzneimetabolisierender Enzyme**

Individuelle Unterschiede in der Reaktion auf Fremd- und Arzneistoffe sind seit langem bekannt. Die Vermutung, solche individuellen Unterschiede stünden im Zusammenhang mit den Arzneistoffmetabolismus betreffenden Faktoren, reicht bis an den Anfang des letzten Jahrhunderts zurück (Garrod, 1909). Fünf Jahrzehnte später begründete die Beobachtung, dass vererbliche Defekte im Metabolismus zu individuellen Unterschieden in der Medikamentenwirkung und –nebenwirkung führen können (Motulsky, 1957), die Disziplin der „Pharmakogenetik“. Seither konnten für viele individuelle, scheinbar nicht zusammenhängende „Überempfindlichkeitsreaktionen“ auf Arzneistoffe genetische Grundlagen gefunden werden. Pharmakogenetik ist also diejenige Disziplin, welche die genetische Basis für Individualität in der Arzneimittelwirkung untersucht. Sie konnte zeigen, dass insbesondere Mutationen von Genen, die für arzneimittelmetabolisierende Enzyme kodieren, dieser Individualität zugrunde liegen. Solche Varianten werden dann als

genetische Polymorphismen bezeichnet, wenn es sich bei ihnen um monogen vererbte Merkmale handelt, die sich in einer Bevölkerung in mindestens zwei Phänotypen manifestieren, von denen keiner mit einer Häufigkeit unter einem Prozent vorkommt (Meyer, 1994). Mutationen der Gene, die für arzneimittelmetabolisierende Enzyme kodieren, können zu Enzymvarianten mit höherer, niedrigerer oder vollkommen fehlender Aktivität führen. Sie können auch ohne funktionelle Auswirkungen bleiben. Die auf DNA-Ebene zugrunde liegenden Mechanismen können das gesamte Gen oder nur einen Teilabschnitt betreffen. Dabei kann das gesamte Gen vollständiger Deletion unterliegen oder in multiplen Kopien vorkommen. Innerhalb eines Gens liegen den Veränderungen der DNA oft Punktmutationen, so genannte „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs), zugrunde. Diese betreffen nur eine einzige Base, welche ersetzt (Substitution), eliminiert (Deletion) oder hinzugefügt (Addition) wird. Die Veränderung der Basensequenz der DNA und damit des kodierenden Tripletts (die Folge von drei Basen kodiert für eine Aminosäure) führt bei der Proteinbiosynthese meist zum Einbau einer anderen Aminosäure und damit zur Herstellung einer Enzymvariante.

Der Ursprung genetischer Polymorphismen ist noch nicht abschließend geklärt. Es gilt aber als gesichert, dass die evolutionäre Differenzierung von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen und den für sie kodierenden Genen im Rahmen einer Auseinandersetzung von Pflanzen fressenden Tieren mit Pflanzentoxinen vorangetrieben wurde. (Nebert, 1997) Dabei übten Pflanzentoxine als diätetische Faktoren Selektionsdruck auf das fremdstoffmetabolisierende Enzymsystem von Tieren aus. Das System der arzneimittelmetabolisierenden Enzyme adaptierte vor rund 400 Millionen Jahren durch umfassende Diversifizierung an die Vielfalt umgebender Fremdstoffe, als sich die Umweltbedingungen für die Tierwelt durch Verlassen des Wassers und die Eroberung des Landes bedeutend veränderten. Bis heute haben sich Synthese und Abbau von pflanzlichen Metaboliten durch tierische arzneiverstoffwechselnde Enzyme zur hochdifferenzierten metabolischen Aktivierung und Detoxifizierung von unzähligen Umweltgiftstoffen, Karzinogenen und Medikamenten weiterentwickelt (Nebert, 1997). Ernährungsfaktoren werden auch als Erklärung für das Vorliegen interethnischer Unterschiede in der Häufigkeit beobachtbarer Genpolymorphismen der arzneimittelmetabolisierenden Enzyme herangezogen. Da Polymorphismen arzneiverstoffwechselnder Enzyme zumeist mit einer veränderten

Metabolisierungskapazität einhergehen, ergeben sich für den Polymorphismusträger veränderte Medikamentenwirkungen und –nebenwirkungen. Ist durch einen Enzym polymorphismus die metabolische Kapazität eines ein bestimmtes Medikament verstoffwechselnden Enzyms *vermindert*, ergibt sich für den Polymorphismusträger bei gleicher Medikamentendosis eine *verstärkte* Medikamentenwirkung und –nebenwirkung. Dies ist insbesondere bei der Einnahme von Medikamenten mit nur geringer therapeutischer Breite von großer Bedeutung, da Genpolymorphismusträger auch bei Standarddosierungen ein höheres Risiko tragen, Nebenwirkungen oder Intoxikationen zu erleiden. Eine auf das Individuum und seine Stoffwechselkapazität zugeschnittene Dosierung („Dosisindividualisierung“) minimiert solche Risiken und trägt so zur Verbesserung der Arzneitherapie bei. Die bestcharakterisierten genetischen Polymorphismen sind die der Cytochrom P450-Enzyme, die für die Phase-I des Arzneistoffwechsels verantwortlich sind. Mittlerweile ist bekannt, dass rund 40% des Cytochrom P450-abhängigen Arzneistoffwechsels von polymorphen Enzymen durchgeführt werden. (Ingelman-Sundberg et al., 1999) Neben therapeutisch eingesetzten Medikamenten sind auch toxische, mutagene und kanzerogene Stoffe Substrate polymorpher Enzyme. Folglich wird diskutiert, ob Allelunterschiede in polymorphen Enzymen zu individueller Disposition für eine weite Spanne von Erkrankungen, darunter auch Tumorleiden, führen.

## **1.2 Das Cytochrom P450-Enzymsystem**

Die Cytochrom P450-Enzyme spielen für den Fremdstoffwechsel im menschlichen Organismus eine herausragende Rolle. Sie stellen das primäre menschliche Verteidigungssystem gegen aufgenommene Chemikalien dar und gewährleisten Schätzungen zufolge für mehr als 50% aller Medikamente hauptverantwortlich deren Metabolisierung (Bertz und Grannemann, 1997). Ihr Name verdankt sich ihrer Eigenschaft, mit Kohlenmonoxid einen Komplex zu bilden, der in der spektrophotometrischen Untersuchung eine Absorptionsbande mit Maximum bei 450 nm aufweist. 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 NADPH- und sauerstoffabhängig oxidative Reaktionen im Rahmen der Phase-I der Biotransformation (Funktionalisierungsreaktionen). Sie verstoffwechseln dabei chemisch sehr unterschiedliche Substrate, deren einzige strukturelle

Gemeinsamkeit in ihrer hohen Fettlöslichkeit besteht. Über den Fremdstoffwechsel hinaus obliegt den Cytochrom P450-Enzymen auch eine Vielzahl anderer Aufgaben, z.B. die Biosynthese von Steroidhormonen, die Oxidation ungesättigter Fettsäuren zu intrazellulären Botenstoffen oder der Metabolismus von fettlöslichen Vitaminen. Die Vielfalt der verschiedenen von Cytochrom P450-Enzymen erbrachten Leistungen erklärt ihr gewebsspezifisch unterschiedliches, nahezu ubiquitäres Vorliegen im menschlichen Körper. Cytochrom P450-Enzyme sind intrazellulär im glatten endoplasmatischen Retikulum und in geringerer Zahl auch in Mitochondrien lokalisiert. Sie werden zu den mikrosomalen Enzymen gezählt, weil sie bei der fraktionierten Zentrifugation von Zellen gemeinsam mit Bruchstücken von Membranen, so genannten Mikrosomen, sedimentieren. Ihre Bezeichnung als Monooxygenasen oder mischfunktionelle Oxygenasen beschreibt ihre Verwendung molekularen Sauerstoffs. Bei der klassischen Hydroxylierung wird ein Atom des Sauerstoffmoleküls in das Substrat eingebaut, während das andere zur Bildung eines Wassermoleküls beiträgt. Dieser komplexe Vorgang erfordert die Übertragung zweier Elektronen, die, aus NADPH stammend, im endoplasmatischen Retikulum üblicherweise durch das Enzym Cytochrom P450-Reduktase auf Cytochrom P450 übertragen werden. Cytochrom P450-Enzyme können als terminale Monooxygenasen dieses Elektronentransportsystems nun molekularen Sauerstoff aktivieren. Die Reaktion verläuft nach dem Muster



Neben der Hydroxylierung gibt es noch einige andere wichtige, von Cytochrom P450 katalysierte Reaktionstypen, die in Tab.1 dargestellt sind.

Tabelle 1: Übersicht über die Phase-I- und -II-Reaktionen der Biotransformation von Fremdstoffen und die daran beteiligten Enzymgruppen

<b>Phase-I-Reaktionen</b>		
Oxidation	Hydroxylierung, <i>N</i> -Oxidation, <i>S</i> -Oxidation <i>N</i> -Dealkylierung, <i>O</i> -Dealkylierung Desaminierung, Desulfurierung Oxidative Dehalogenierung Dehydrierung der Hydroxylgruppe Dehydrierung von Aminen <i>N</i> -Oxidation, <i>S</i> -Oxidation	Cytochrom P450-Monooxygenasen  Alkohol Dehydrogenase Monoaminoxidasen Flavin-Monooxygenasen
Reduktion	Dehalogenierung von Nitrogruppen	Cytochrom P450-Monooxygenasen
Hydrolyse	Hydrolyse von Epoxiden	Epoxid-Hydrolasen
sonstige	Oxidation von Radikalen Peroxidation	Superoxid-Dismutasen Glutathion-Peroxidasen
<b>Phase-II-Reaktionen</b>		
Konjugation	Glucuronidierung Sulfatierung Acetylierung Methylierung Glutathion-Konjugation	UDP-Glucuronyltransferasen Sulfotransferasen <i>O</i> -, <i>N</i> -Acetyltransferasen <i>O</i> -, <i>N</i> -, <i>S</i> -Methyltransferasen Glutathion- <i>S</i> -Transferasen

Die Cytochrom P450-Familien werden nach dem Ausmaß ihrer Sequenzhomologie benannt. Beträgt die Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen über 40%, gehören die Hämproteine zur selben Familie. Sequenzen, die zu über 55% identisch sind, werden derselben Subfamilie zugeordnet. (Nebert, 1987) So steht beispielsweise bei Cyp2C9 die Ziffer 2 für die Familie, das C für die Subfamilie und die 9 für das spezifische Enzym. Beim Menschen sind 17 Familien und 42 Subfamilien (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>) der Cytochromgene bekannt. Dabei ist zu beachten, dass die Familien 1-3 die Metabolisierung von Medikamenten und anderen synthetischen oder natürlichen *exogenen* Substanzen gewährleisten, wohingegen mit höheren Nummern versehene Familien größtenteils für Biosynthese und Metabolisierung von *endogenen* Substanzen, z.B. Hormonen, verantwortlich sind.

### **1.3 Das Enzym Cytochrom P450 2C9**

#### **1.3.1 Das Cytochrom P450 2C9 und seine Funktion im Arzneistoffwechsel**

Die zur Gruppe der Cytochrom P450-Enzyme gehörende Subfamilie 2C macht beim Menschen etwa 20% des Gesamtgehalts der Leber an Cytochrom P450 aus und

trägt zu etwa 18% zum von Cytochrom P450-Enzymen durchgeführten Phase-I-Medikamentenstoffwechsel bei (Wolf und Smith, 1999).

Tabelle 2: Nach Substanzklassen geordnete Substrate von Cyp2C9 (nach Miners und Birkett, 1998; Brockmüller et al., 2000; <http://medicine.iupui.edu/flockhart>)

<b>Substanzklasse</b>	<b>Vertreter</b>
Antiepileptika	Phenytoin
Nichtsteroidale Antiphlogistika	Diclofenac; Ibuprofen; Celecoxib; Flurbiprofen; Indometacin; Lornoxicam; Mefenaminsäure; Meloxicam; Naproxen; Piroxicam
Cumarine	S-Warfarin
Orale Antidiabetika	Tolbutamid; Glipizid; Nateglinid
Schleifendiuretika	Torasemid
Sulfonamide	Sulfamethoxazol
HMG-CoA-Reduktasehemmer	Fluvastatin
Antiöstrogene	Tamoxifen
Angiotensin II-Rezeptorantagonisten	Losartan; Irbesartan

Die Cyp2C-Subfamilie besteht aus vier Isoenzymen (Nelson et al., 1996 und Goldstein u. de Morais, 1994), bei denen es sich im Einzelnen um Cyp2C8, Cyp2C9, Cyp2C18 und Cyp2C19 handelt. Sie gruppieren sich um die Region 10q24.2 auf Chromosom 10 (Meehan et al., 1988) und liegen in der Reihenfolge Zentromer-RBP4 (Serum-Retinol-bindendes-Protein-Gen)-2C18-2C19-2C9-2C8-Telomer vor (Gray et al., 1995). Die vier Isoenzyme weisen zwar eine über 82%ige Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf (Goldstein u. de Morais, 1994), dennoch gibt es nur wenige Überschneidungen in ihrer Substratspezifität (Wrighton und Stevens, 1992). Unter den Mitgliedern der Cyp2C-Subfamilie stellt Cyp2C9 das bedeutendste Isoenzym in der menschlichen Leber dar (Goldstein und de Morais, 1994). Es findet sich zudem in wesentlich geringerer Konzentration noch im Intestinum (de Waziers et al., 1990). Das sich aus insgesamt neun Exons zusammensetzende Gen kodiert für ein Hämoprotein von 490 Aminosäuren und einer Masse von ~55,6KD (de Morais et al., 1993). Zur Erkennung der unterschiedlichen zu verstoffwechselnden Substrate, zumeist schwache Säuren mit einem pka-Wert zwischen 3,8-8,1, dienen der Isoform Cyp2C9 insgesamt sechs Substrat-Erkennungsstellen (Substrate recognition sites, SRS) (Gotoh 1992). Einen Überblick über einige der zahlreichen Substrate von Cyp2C9 bietet die Tabelle 2. Unter diesen finden sich auch mehrere Substanzen aus der Gruppe der Nichtsteroidalen Antiphlogistika. Sie wurden zumeist durch *In-vitro*-Untersuchungen mit menschlichen Lebermikrosomen oder mit transgen exprimierten Cyp P450-Enzymen als Substrate von Cyp2C9 identifiziert. Im Einzelnen handelt es sich um Ibuprofen (Hamman et al., 1997), Indometacin (Nakajima et al., 1998),

Flurbiprofen (Tracy et al., 1996; Tracy et al., 1995), Naproxen (Tracy et al., 1997; Rodrigues et al., 1996) Diclofenac (Leemann et al., 1993), Piroxicam (Hutzler et al., 2001), Lornoxicam (Bonnabry et al., 1996), Celecoxib (Tang et al., 2001; Tang et al., 2000a ; Tang et al., 2000b), Mefenaminsäure und Meloxicam (Chesne et al., 1998). Die strukturelle Gemeinsamkeit der Cyp2C9-Substrate besteht darin, dass sie in Entfernung von 7 Å von demjenigen Kohlenstoffatom, das in der Phase-I-Reaktion oxidiert wird, einen anionischen Bereich aufweisen. Die Elektronegativitätsunterschiede zwischen der elektronegativeren Gruppe des Substrats und einer weniger elektronegativen des Isoenzym beeinflussen die Affinität des Substrats, von Cyp2C9 verstoffwechselt zu werden (Mancy et al., 1995 und Jones BC et al., 1996 und Jones HP et al., 1996). Einige Cyp2C9-Substrate weisen nur eine geringe therapeutische Breite auf, z.B. der Vitamin K-Antagonist Warfarin und das Antiepileptikum Phenytoin.

### **1.3.2 Genetische Polymorphismen von Cytochrom P450 2C9**

1964 beschrieben Kutt et al. den Fall eines damals 24jährigen Patienten, der nach dreiwöchiger Einnahme einer Standarddosis des Antiepileptikums Phenytoin Intoxikationserscheinungen, darunter Nystagmus und Ataxie, zeigte (Kutt et al., 1964). Familienmitglieder des Patienten erhielten in der Folge ebenfalls Standarddosen von Phenytoin, woraufhin sich bei zwei von ihnen ähnliche Nebenwirkungen objektivieren ließen. Diesen Nebenwirkungerscheinungen lag in allen drei Fällen eine Akkumulation unmetabolisierten Phenytoins zugrunde. Als Ursache wurde eine insuffiziente Hydroxylierung des Phenytoins angenommen. Nach Einzelfallberichten (Kreeger, 1962 und Bird und Schwalbe, 1965) über ungewöhnlich lange Tolbutamid-Halbwertszeiten bei Patienten, die Standarddosen dieses Sulfonylharnstoffs eingenommen hatten, konnten in einer pharmakogenetischen Studie (Scott und Poffenbarger, 1979) bei insgesamt 50 Patienten und Probanden ein bis zu neunfacher Unterschied in der Tolbutamid-Clearance und eine trimodale Verteilung der Tolbutamid-Eliminierungsraten gefunden werden. Die Autoren stellten für die Probanden mit verringerter Clearance eine defiziente Hydroxylierung von Tolbutamid fest und vermuteten, dass ein genetischer Polymorphismus des verstoffwechselnden Enzyms ihren Beobachtungen zugrunde liegen könnte. In der Folge konnte nachgewiesen werden, dass das gesuchte Enzym im menschlichen Körper sowohl für die Verstoffwechslung von Phenytoin als auch von Tolbutamid verantwortlich ist und es sich dabei um das

Cytochrom P450 2C9 handelt (Relling, 1990). DNA-Sequenzierungen von CYP2C-Enzymen erbrachten den Hinweis auf eine Reihe von verschiedenen Mutanten von Cyp2C9 (Goldstein und de Morais, 1994). In der deutschen Bevölkerung wurden allerdings nur insgesamt drei allelische Varianten gefunden (Sullivan-Klose et al., 1996), die sich für den Arzneistoffwechsel *in vitro* als relevant erwiesen haben (Veronese et al., 1993). Diese funktionell unterschiedlich wirksamen Allelvarianten werden heute als *Cyp2C9\*1*, *Cyp2C9\*2* und *Cyp2C9\*3* bezeichnet (Stubbins et al., 1996). Sie sind Folge von Polymorphismen in der kodierenden Region des *Cyp2C9*-Gens. Diese Polymorphismen produzieren Genproduktvarianten in der Aminosäurenkette, und zwar an Position 144 und an Position 359. Der Wildtyp *Cyp2C9\*1* besitzt an Position 144 seiner Aminosäurenkette die Aminosäure Arginin und an Position 359 die Aminosäure Isoleucin (Arg144/ Ile359). Die Mutation *Cyp2C9\*2* entsteht auf DNA-Ebene durch eine Transversion, bei der in Codon 416 Thymin anstelle von Cytosin eingebaut wird. In der entstehenden Aminosäurenkette liegt folglich anstelle von Arginin die Aminosäure Cystein vor. Das resultierende Allel lautet *Cyp2C9\*2Cys144/ Ile359*. Im Falle des Allels *Cyp2C9\*3* wird aufgrund einer Adenin-Thymin-Transversion in Codon 1016 an Position 359 der Aminosäurenkette Leucin anstelle von Isoleucin eingebaut, entsprechend handelt es sich um *Cyp2C9\*3Arg144/ Leu359*. Ein vierter denkbarer Haplotyp aus beiden beschriebenen Nukleotidpolymorphismen, d.h. die Kombination von Cys144 und Leu359 auf einem Chromosom, ist beim Menschen bisher nicht gefunden worden.

Tabelle 3: Cyp2C9-Allel-Nomenklatur (nach <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2c9.htm>)

Allel	Protein	Nucleotid-Änderung	Effekt	Enzymaktivität <i>in vitro</i>
<b><i>CYP2C9*1</i></b>	CYP2C9.1			Normal
<b><i>CYP2C9*2</i></b>	CYP2C9.2	430C>T	Arg144Cys	vermindert
<b><i>CYP2C9*3</i></b>	CYP2C9.3	1075A>C	Ile359Leu	vermindert

Bei Kaukasiern findet sich das Wildtypallel *Cyp2C9\*1* mit einer Häufigkeit zwischen 79% und 86%, Allel *Cyp2C9\*2* im Bereich von 8-13% und Allel *Cyp2C9\*3* im Bereich von 3-9% (Sullivan-Klose et al., 1996 und Bhasker et al., 1997 und Stubbins et al., 1996 und Inoue et al., 1997). Es bestehen erhebliche interethnische Unterschiede hinsichtlich der *Cyp2C9*-Polymorphismenhäufigkeit. Der beschriebene Austausch von jeweils nur einer einzelnen Aminosäure bewirkt in funktioneller Hinsicht, dass die verschiedenen *Cyp2C9*-Allele eine unterschiedliche metabolische Kapazität für ihre Substrate aufweisen (Veronese et al., 1993). Das Ausmaß der Aktivitätsveränderung

im Fall der Allelvariante *Cyp2C9\*2* ist dabei bisher unklar (Miners und Birkett, 1998). Als Ursache wird eine eingeschränkte funktionelle Interaktion von *Cyp2C9\*2* mit seinem Coenzym P450-Reduktase (Crespi und Miller, 1997) und für heterozygote \*2-Allelträger eine relativ größere Expression des \*2-Alleles über das Wildtyp-Allel diskutiert (Bhasker et al., 1997). Der verringerten Aktivität der *Cyp2C9\*3*-Allelvariante liegt eine verringerte Affinität des mutierten Enzyms für seine Substrate zugrunde (Haining et al., 1996), die sich daraus erklärt, dass die mutierte Aminosäure an Position 359 nahe einer der bekannten Substrat-Erkennungsstellen liegt. Laut Daten von *In-vitro*-Untersuchungen und pharmakokinetischen Probandenstudien liegt die Aktivität des *Cyp2C9\*2*-Enzyms nur knapp unterhalb derjenigen des Wildtypenzym, wohingegen *Cyp2C9\*3*, abhängig vom untersuchten Substrat, lediglich 10-30% der *Cyp2C9\*1*-Aktivität aufweisen soll (Kidd et al., 1999; Sullivan-Klose et al., 1996; Steward et al., 1997). Die phänotypische Fähigkeit, *Cyp2C9*-Substrate verstoffwechseln zu können, wird durch die Kombination zweier genotypisch bestimmbarer Allele festgelegt. Bei drei verschiedenen Allelen ergeben sich für die Kombination von zwei Allelen insgesamt sechs verschiedene Genotypen.

## **1.4 Nichtsteroidale Antiphlogistika**

### **1.4.1 Entwicklung und Bedeutung der Nichtsteroidalen Antiphlogistika**

Die medizinische Wirkung der Weidenrinde und verwandter Pflanzen war verschiedenen Kulturen seit Jahrhunderten geläufig. Bei ihrem Wirkstoff handelt es sich um ein bitteres Glykosid, das Salicin, welches Leroux 1829 erstmals isolieren konnte und dessen antipyretischen Effekt er nachwies. Die Hydrolyse von Salicin ergibt Glukose und Salizylalkohol, der in Salizylsäure umgewandelt werden kann. Natriumsalicylat wurde seit 1875 als Antipyretikum und zur Behandlung des Rheumatischen Fiebers verwandt. Basierend auf zwischenzeitlich vergessenen Arbeiten von Gerhardt aus dem Jahre 1853 gelang es dem Chemiker Hoffmann, Acetylsalicylsäure herzustellen. Schließlich führte Dresser das Medikament 1899 als Aspirin ein. Immer neue, in der Wirkung verwandte Wirkstoffe wurden entdeckt, bis vor über dreißig Jahren Indometacin als Prototyp einer neuen Gruppe starker antientzündlich wirksamer Medikamente in die Medizin eingeführt wurde. Die als Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) bezeichneten Pharmaka wurden in der Absicht entwickelt, die unerwünschten Wirkungen, die bei der langfristigen Behandlung rheumatischer Entzündungen mit Acetylsalicylsäure auftraten, zu

verringern. Dennoch weisen alle Nichtsteroidalen Antiphlogistika mehr oder weniger ausgeprägt die Nebenwirkungen der Salicylate, d.h. ulzerogene, nierenschädigende, bronchokonstriktorische und tokolytische Effekte, auf. Eine Verringerung der Nebenwirkungsrate erhofft man sich von den inzwischen zugelassenen spezifischen Inhibitoren der Isoform Cyclooxygenase-2 (Cox-2). Die Nichtsteroidalen Antiphlogistika können den zugrunde liegenden chemischen Verbindungen entsprechend in verschiedene Untergruppen unterteilt werden. Dazu gehören die Anthranilsäurederivate (z.B. Mefenaminsäure), die Arylpropionsäurederivate (Ibuprofen, Ketoprofen etc.), die Arylessigsäurederivate (Diclofenac, Indometacin u.a.) und die Oxicamderivate (z.B. Piroxicam). Neben einigen substanzspezifischen unerwünschten Wirkungen besteht der entscheidende Unterschied der einzelnen NSAIDs in ihren unterschiedlich langen Halbwertszeiten. Bei langwirksamen NSAIDs besteht Kumulationsgefahr, weswegen ihre dauerhafte Einnahme das Risiko erhöht, lebensbedrohliche Magen-Darm-Schäden und andere Nebenwirkungen zu erleiden.

#### **1.4.2 Indikationen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika**

Zu den Hauptindikationen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika zählen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises einschließlich degenerativer Erkrankungen, darunter die Rheumatoide Arthritis, Osteoarthritis und Ankylosierende Spondylitis. Sie werden verwendet, um entzündliche Prozesse zurückzudrängen, die Beweglichkeit des Patienten zu verbessern und entzündlichen Schmerz zu vermindern. Allerdings bewirken die NSAIDs nur die symptomatische Besserung von Schmerz und Entzündung, wohingegen das Fortschreiten der Gewebeerstörung nicht unterbrochen wird. Nichtsteroidale Antiphlogistika sind außerdem indiziert bei Kopf- und Zahnschmerzen, Migräne und unspezifischem Fieber. Darüber hinaus werden NSAIDs zum Verschluss eines persistierenden Ductus Arteriosus bei Neugeborenen eingesetzt. Schließlich finden sie Verwendung in der Behandlung von Symptomen der primären Dysmenorrhoe.

Das Indikationsspektrum der NSAIDs erklärt ihre herausragende medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung. Schätzungen zufolge entwickeln ca. 8% aller Menschen zumindest zu einem Zeitpunkt in ihrem Leben rheumatische Symptome. Unter den NSAIDs dominiert Diclofenac mit 65% aller Verordnungen (Schmidt, 2001). Ibuprofenpräparate stehen an zweiter Stelle in der Verordnungshäufigkeit Nichtsteroidaler Antiphlogistika. Im Jahr 1999 wurden in Deutschland allein 414 Millionen Tagesdosen Diclofenac bei Gesamtkosten von 244 Millionen DM verordnet.

Im Falle von Ibuprofen waren es immerhin noch 113 Millionen Tagesdosen, die Gesamtkosten von 131 Millionen DM verursachten. Beide Medikamente verbuchten Verordnungszuwächse im Bereich zwischen acht und zehn Prozent (Schmidt, 2001). Unter den meistverordneten Medikamenten belegen Diclofenac-Präparate die Plätze vier, fünf und zwölf.

#### **1.4.2.1 Indikationen für Diclofenac**

Indikationen für Diclofenac sind akute Arthritiden einschließlich Gichtanfällen, chronische Arthritiden, dabei insbesondere die Rheumatoide Arthritis, Spondylitis Ankylosans (Morbus Bechterew) und andere entzündlich-rheumatische Wirbelsäulenleiden, Reizzustände bei Arthrosen und Spondylarthrosen, Weichteilrheumatismus und schließlich schmerzhafte Schwellungen oder Entzündungen nach Verletzungen oder Operationen. In Abhängigkeit von der Schwere der Erkrankung liegt der empfohlene Dosisbereich für Diclofenac zwischen 50-150 mg pro Tag.

#### **1.4.2.2 Indikationen für Ibuprofen**

Indikationen für das nicht verschreibungspflichtige Ibuprofen sind leichte bis mäßig starke Schmerzen, die analgetische Behandlung von Dysmenorrhoe, Migräne und Kopfschmerzen, sowie Fieberzustände. Die empfohlene Höchstdosis liegt bei 1200 mg pro Tag.

#### **1.4.3 Pharmakokinetik der Nichtsteroidalen Antiphlogistika**

Bei der großen Mehrzahl der NSAIDs handelt es sich um organische Säuren, die im Gegensatz zu Acetylsalicylsäure die Cyclooxygenase reversibel und kompetitiv hemmen. Generell werden die NSAIDs nach oraler Applikation gut resorbiert, in hohem Maße an Plasmaproteine gebunden und schließlich per glomerulärer Filtration oder tubulärer Sekretion ausgeschieden. Die Wirkdauer hängt, anders als bei Acetylsalicylsäure, bei der sie durch die Neusynthese von Cyclooxygenase-Enzymen bestimmt wird, von der Clearance ab. NSAIDs werden in Gruppen kürzerer (< 6h) und längerer (> 10h) Halbwertszeit unterteilt. Als organische Säuren reichern sie sich im sauren Milieu von Entzündungsprozessen an.

#### 1.4.3.1 Pharmakokinetik von Diclofenac

Nach oraler Applikation wird Diclofenac distal vom Magen vollständig resorbiert. Maximale Plasmaspiegel werden im Mittel nach 2-3h Stunden erreicht. Die Plasmaproteinbindung beträgt 99%. Der First-Pass-Effekt in der Leber bewirkt, dass nur etwa 60% des Ausgangsstoffes unverändert die posthepatische Zirkulation erreichen (Todd und Sorkin, 1988). In der Leber wird Diclofenac *in vitro* aufgrund einer Interaktion seiner Carboxylgruppe mit Cyp2C9 (Mancy et al., 1999) bevorzugt zum Hauptmetaboliten 4'-OH-Diclofenac verstoffwechselt (Leeman et al., 1993). In geringem Ausmaß bilden andere Isoformen verschiedene weitere Metabolite, darunter insbesondere 5'-OH-Diclofenac (Bort et al., 1999). Als ursächlich verantwortlich für hepatotoxische Nebenwirkungen gelten toxische und/ oder reaktive Diclofenac-Metabolite, die kovalent an Hepatozytenproteine binden und so allergische Reaktionen auslösen sollen (Boelsterli et al., 1995). Es handelt sich bei ihnen wahrscheinlich um mit Glutathion konjugierte Benzoquinon-Imine (Tang et al., 1999<sub>a</sub>). Widersprüchlich wird dabei beurteilt, ob diese reaktiven Metabolite im menschlichen Organismus ausschließlich aus dem Nebenprodukt 5'-OH-Diclofenac stammen (Shen et al., 1999), oder ob sie im Rahmen des Cyp2C9-katalysierten Hauptmetabolisierungswegs auch aus 4'-OH-Diclofenac entstehen (Tang et al., 1999<sub>b</sub>). Der Hauptmetabolit 4'-OH-Diclofenac wird in der Phase-II-Reaktion konjugiert und sulfatiert. 30% des metabolisierten Wirkstoffs werden mit den Fäzes, 70% als pharmakologisch nahezu unwirksame Metaboliten renal eliminiert. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt ca. 2h.

#### 1.4.3.2 Pharmakokinetik von Ibuprofen

Ibuprofen enthält ein chirales Zentrum und wird therapeutisch zumeist als Razemat verabreicht. Allerdings ist seit kurzer Zeit auch reines S-Ibuprofen als Medikament erhältlich. Dieses S-Enantiomer des Wirkstoffs ist primär verantwortlich für die Inhibition der Cyclooxygenase und damit der Prostaglandinsynthese (Adams et al., 1976). Etwa 60% des R-Enantiomers wird im menschlichen Organismus zu S-Ibuprofen umgewandelt, es findet allerdings keine nennenswerte Inversion in die umgekehrte Richtung statt (Rudy et al., 1991; Kaiser et al., 1976; Lee et al., 1985; Day et al., 1988; Avgerinos und Hutt, 1990). Ibuprofen wird im Magen und schließlich vollständig im Dünndarm resorbiert. Maximale Plasmaspiegel werden nach 1-2 h erreicht. Die Plasmaproteinbindung beträgt etwa 99%. *In vitro* wird Ibuprofen in der

Leber hauptanteilig durch Cytochrom P450 2C9 (Leeman et al., 1993), in geringerem Ausmaß auch von anderen Isoenzymen, insbesondere Cyp2C8 (Hamman et al., 1997), metabolisiert. Cyp2C8 scheint für den Abbau des R-Enantiomers hauptverantwortlich zu sein. Im Wesentlichen wird Ibuprofen oxidativ verstoffwechselt. Durch Hydroxylierung und Carboxylierung entstehen pharmakologisch nahezu unwirksame Metabolite (Mills et al., 1973; Rudy et al., 1991 und 1995). Zu ca. 10% wird Ibuprofen glukuronidiert. Die entstehenden Metabolite werden zu 90% renal, der Rest biliär eliminiert. Weniger als 1% der Muttersubstanz wird unverändert im Urin ausgeschieden (Davies, 1998). Die Eliminationshalbwertszeit beträgt 1,8-3,5 h.

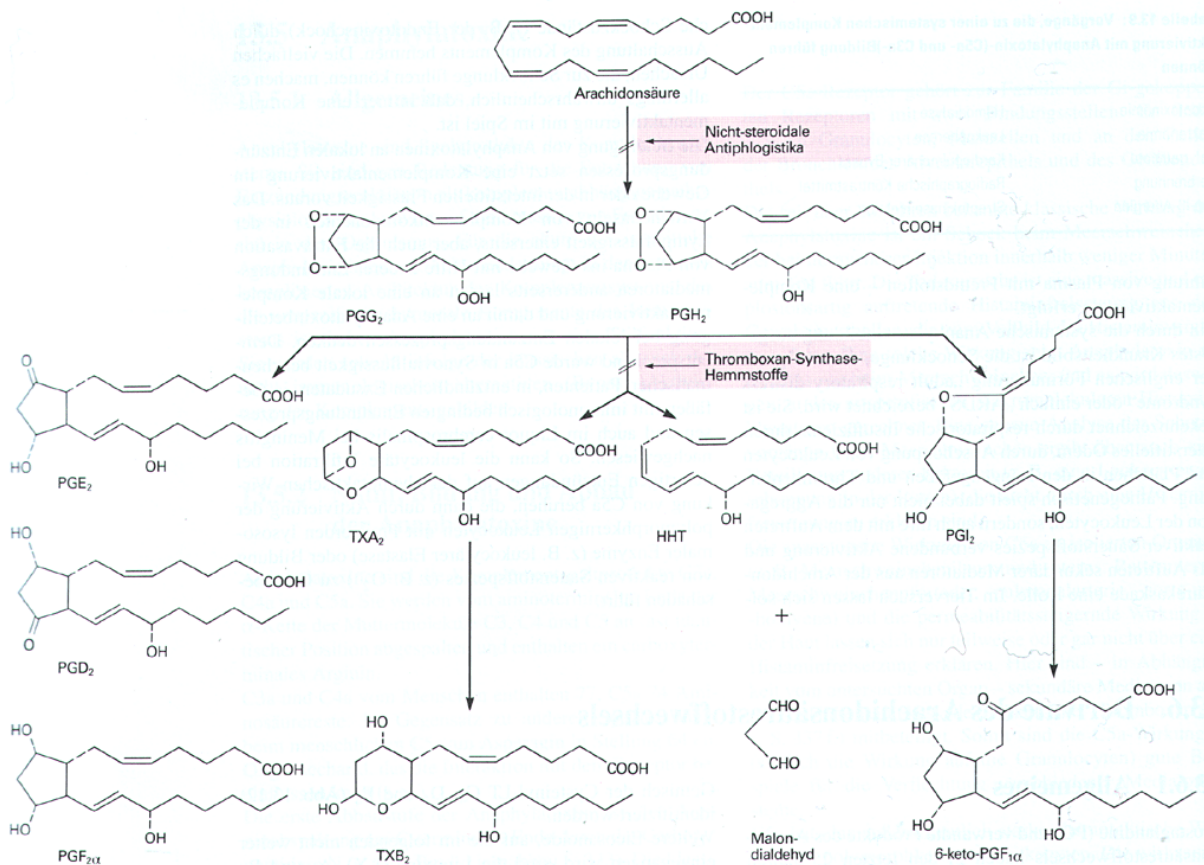
#### 1.4.4 Wirkung der Nichtsteroidalen Antiphlogistika

NSAIDs zeichnen sich durch die Kombination aus *analgetischer, antipyretischer und antiphlogistischer* Wirkung aus. 1971 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass niedrige Konzentrationen von Acetylsalicylsäure und Indometacin die enzymatische Produktion von Prostaglandinen hemmen (Vane et al., 1971). Die verschiedenen durch NSAID-Gabe erzielbaren Effekte erklären sich aus der Vielzahl unterschiedlicher Wirkungen von Prostaglandinen im menschlichen Körper. Letztere sind der Tabelle 4 zu entnehmen

Tabelle 4: Angriffsorte und Wirkungen von Prostaglandinen und Tx A2 (aus Forth et al., 1996)

	Gefäßtonus	Gefäßpermeabilität	Plättchenaggregation	Leukozyten	Bronchien	Magen	Uterus	Schmerz
<b>Pg E2</b>	Dilatation	Zunahme	Hemmung		Dilatation	Schutz		Auslösung
<b>Pg F2 alpha</b>	Kontraktion				Konstriktion		Kontraktion	
<b>Pg D2</b>	Kontraktion		Hemmung	Chemotaxis	Konstriktion			Auslösung
<b>Pg I2</b>	Dilatation	Zunahme	Hemmung					Auslösung
<b>Tx A2</b>	Kontraktion		Förderung		Konstriktion			

NSAIDs greifen in die Prostaglandinsynthese über die Hemmung der Prostaglandinendoperoxidsynthetase, auch als Cyclooxygenase bezeichnet, ein. Dieses Enzym wandelt Arachidonsäure zu den instabilen Zwischenprodukten Pg G<sub>2</sub> und Pg H<sub>2</sub> um, die zu Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostacyclin (Pg I<sub>2</sub>) und weiteren Prostaglandinen weitermetabolisiert werden. Cyclooxygenaseprodukte und der Angriffsort der NSAIDs sind in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1: Biosynthese von Cyclooxygenaseprodukten des Arachidonsäurestoffwechsels und der Angriffspunkt von Nichtsteroidalen Antiphlogistika bzw. Thromboxan-Synthase-Hemmstoffen (aus Forth et al., 1996)**

Weiterhin ist zwischen der gewebskonstitutiven Isoform Cox-1, die sich beispielsweise in Magen, Niere und Blutgefäßen findet, und der durch Zytokine und andere inflammatorisch wirksame Mediatoren in Entzündungsgebieten induzierbaren Cox-2 zu unterscheiden. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass überall dort, wo Zellen geschädigt werden, besonders aber in entzündlichen Exsudaten, Prostaglandine freigesetzt werden. Die *antiphlogistische* Wirkung von NSAIDs liegt in der Hemmung von Biosynthese und Freisetzung der als Entzündungsmediatoren wirksamen Prostaglandine begründet. Bis heute werden verschiedene weitere, nicht Prostaglandin-abhängige Wirkmechanismen diskutiert, die den therapeutischen Effekt Nichtsteroidaler Antiphlogistika aufklären sollen (Abramson und Weissman, 1989; Vane, 1994), darunter z.B. die Hemmung der Expression von im Entzündungsprozess bedeutsamen Zelladhäsionsmolekülen und die Hemmung der Aktivierung und Funktion von neutrophilen Granulozyten. Die *analgetische* Wirkung erschließt sich über die Rolle des Arachidonsäuremetaboliten Pg E<sub>2</sub>. Gewebeschädigungen führen zur Entstehung und Freisetzung algetisch

wirksamer, die Nozizeptoren erregender Substanzen. Das Gewebshormon Prostaglandin E<sub>2</sub> steht im Mittelpunkt dieser als Hyperalgesie bezeichneten, verstärkten Sensibilisierung von Nozizeptoren. Durch Hemmung des Pg E<sub>2</sub>-bildenden Enzyms Cyclooxygenase vermindern NSAIDs folglich die Sensibilisierung von Nozizeptoren und wirken sowohl peripher als auch zentral schmerzlindernd. Der *antipyretische* Effekt erklärt sich ebenfalls aus der Pg E<sub>2</sub>-Synthesehemmung. Fieberauslösende exogene Pyrogene induzieren in Leukozyten die Bildung des endogenen Pyrogens Interleukin-1, das seinerseits die Bildung von Pg E<sub>2</sub> im Hypothalamus auslöst. Auf diese Weise wird der Sollwert des im Hypothalamus ansässigen Temperaturfühlers erhöht, und es resultiert eine Erhöhung der Temperatur im Körperinneren (Fieber). Die NSAIDs hemmen die Synthese von Pg E<sub>2</sub> und normalisieren auf diese Weise die Einstellung des Temperaturfühlers. Die Hemmung der Prostanoid-Synthese, und zwar von Tx B<sub>2</sub> (für Cox-1) und Pg E<sub>2</sub> (für Cox-2), stellt einen etablierten Surrogatparameter für die Aktivität von NSAIDs beim Menschen dar (Evans et al., 1991; Patrono et al., 2001; Fitzgerald und Patrono, 2001). Tx A<sub>2</sub> ist das Hauptprodukt von in Thrombozyten enthaltener Cox-1 (Funk et al., 1991; Hamberg et al., 1975). Die verminderte Entstehung seines inaktiven Hydrolyseprodukts Tx B<sub>2</sub> ist somit ein Maß für die Hemmung der Aktivität der Isoform Cox-1 und kann anhand einer Plasmaspiegelbestimmung von Tx B<sub>2</sub> ermittelt werden. Die verminderte Entstehung von Pg E<sub>2</sub> ist ein Maß für die Hemmung der Aktivität der Isoform Cox-2 (Patrignani et al., 1994) und kann ebenfalls anhand einer Plasmaspiegelbestimmung ermittelt werden. Die Induktion der Cox-2 wird unter anderem durch bakterielle Lipopolysaccharide hervorgerufen (O'Sullivan et al., 1992; Hempel et al., 1994).

#### 1.4.5 Nebenwirkungen der Nichtsteroidalen Antiphlogistika

Nichtsteroidale Antiphlogistika bewirken durch die Hemmung der Cyclooxygenase Nebenwirkungen an verschiedenen Organsystemen.

Im **Magen** wirken die Prostaglandine Pg I<sub>2</sub> und Pg E<sub>2</sub> zytoprotektiv. Die Hemmung der die Prostaglandine synthetisierenden Cyclooxygenase durch Nichtsteroidale Antiphlogistika führt zur Steigerung der Magensaftsekretion bei gleichzeitig verminderter Sekretion von Bikarbonat und Schleim. Darüber hinaus sinkt die lokale Durchblutung und es kann zu Magenmotilitätsstörungen kommen. Die resultierenden Nebenwirkungen reichen von unspezifischen Magenbeschwerden und Diarrhoe über Erosionen der Magenschleimhaut bis hin zu Ulzera und Blutungen. Gastrointestinale

Nebenwirkungen sind die häufigsten unerwünschten Effekte von Cyclooxygenasehemmern. Das Perforations- und Blutungsrisiko ist in Abhängigkeit von der Wahl des verabreichten Präparats und insbesondere von Dosis und Anwendungsdauer unterschiedlich hoch. Das niedrigste Ulkusblutungsrisiko im Vergleich zu Kontrollgruppen zeigen Ibuprofen (2fach) und Diclofenac (4fach), wohingegen es bei Indometacin (11fach) und Piroxicam (14fach) deutlich erhöht ist (Schmidt, 2001). Die lange Halbwertszeit von Präparaten wie Piroxicam (40 h) birgt die Gefahr, dass sich der Wirkstoff im Körper anreichert und kumulative Überdosierungserscheinungen entstehen.

In der **Niere** führt die Cyclooxygenase-Hemmung zur verminderten Synthese vasodilatatorisch wirksamer Prostaglandine vom Typ  $Pg E_2$ . Hieraus resultiert ein relatives Übergewicht der durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System vermittelten Vasokonstriktion. Somit kann die Prostaglandinsynthesehemmung vor allem dann, wenn die renale Prostaglandinsynthese zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Nierenperfusion bereits gesteigert ist, zu einer Verschlechterung der renalen Hämodynamik bis hin zum akuten Nierenversagen führen. Besonders gefährdet sind in diesem Zusammenhang Patienten, die unter Herzinsuffizienz, intravasalem Volumenmangel oder vorbestehender eingeschränkter Nierenfunktion leiden. Verminderte Natrium-Ausscheidung und renale Durchblutungsminderung können zu Ödemen und Hyperkaliämie führen. Infolgedessen kann die Effizienz einer antihypertensiven Therapie verringert sein. Die so genannte „Analgetikaniere“ mit Papillennekrosen und interstitiellen Nephritiden ist eine Folgeerscheinung von jahrelanger Einnahme hoher Dosen von NSAIDs. Als Spätkomplikation können Urothelkarzinome der ableitenden Harnwege entstehen. Als besonders problematisch gilt die Gabe von NSAIDs vor allem bei vorbestehender Niereninsuffizienz und in Kombination mit anderen nephrotoxischen Präparaten.

**Zentrale Nebenwirkungen**, die offenbar ebenfalls durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese ausgelöst werden, bestehen in Kopfschmerzen, Schwindel und Hör- und Sehstörungen, Erregung, Reizbarkeit und Müdigkeit. Der genaue zugrunde liegende Mechanismus ist bisher unbekannt.

Therapeutisch teils erwünscht, teils unerwünscht sind **Thrombozytenaggregationshemmung** und **Gefäßdilatation**. Sie basieren auf der Hemmung von Thromboxan  $A_2$  in Thrombozyten, wodurch sich das Thromboxan-Prostacylin-Gleichgewicht in Richtung des vasodilatatorisch und

aggregationshemmend wirkenden Prostacyclins verschiebt. Umgekehrt ist für die neueren, Cox-2-selektiven Nichtsteroidalen Antiphlogistika eine signifikante Erhöhung von schweren thrombotischen kardiovaskulären Komplikationen (Herzinfarkt, instabile Angina Pectoris, Herzstillstand, ischämischer Insult) beschrieben (Mukherjee et al., 2001), als deren Ursache eine verminderte Prostacyclin-Produktion in den Gefäßen (Schmedtje et al., 1997) und eine Verschiebung des Thromboxan-Prostacyclin-Gleichgewicht in Richtung des prothrombotisch wirkenden Thromboxan A<sub>2</sub> diskutiert wird (Belton et al., 2000).

Im **Respirationstrakt** weist Pg E<sub>2</sub> eine bronchodilatatorische Wirkung auf. Die Synthesehemmung bronchodilatatorisch wirksamer Prostaglandine führt zu einem relativen Übergewicht von Leukotrienen und folglich zur Bronchokonstriktion. Für diese auch als „Analgetika-Asthma“ bezeichnete Nebenwirkung sind Atopiker prädisponiert. Prostaglandinsynthese-Hemmer bewirken eine verminderte Kontraktilität des **Uterus**. Diese Wirkung ist bei mit Krämpfen einhergehender Dysmenorrhoe ein therapeutisch erwünschter Effekt. Unter Geburt und Schwangerschaft besteht allerdings die Gefahr einer Wehenhemmung bei zudem verlängerter Blutungszeit.

Auf Seiten des Kindes bewirken vasodilatierende Prostaglandine (Pg E<sub>2</sub> und Pg I<sub>2</sub>) die Tonusregulation des Ductus Arteriosus Botalli. Die Synthesehemmung dieser Prostaglandine durch NSAID-Gabe wird bei Neugeborenen mit Ductus-Persistenz therapeutisch genutzt, ist aber in der Spätschwangerschaft aufgrund der Gefahr eines vorzeitigen Verschlusses des Ductus Arteriosus Botalli kontraindiziert.

Eine Reihe von Nebenwirkungen, die als **Überempfindlichkeitsreaktionen** zusammengefasst werden können, ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht durch die Cyclooxygenase-Hemmung vermittelt. In diesen Bereich fallen toxische Knochenmarksschädigungen, allergische und anaphylaktische Reaktionen, dermatologische und schließlich **hepatotoxische** Nebenwirkungen. Im Zusammenhang mit der Einnahme von Diclofenac entwickeln ca. 15% der Patienten eine grenzwertige Erhöhung ihrer Leberenzyme. Bei einer kleineren Zahl von Fällen ist das Auftreten von milder bis schwerer Hepatotoxizität beschrieben, hinsichtlich deren Genese bisher unklar ist, ob sie immunologisch oder nichtimmunologisch vermittelt wird. Die kovalente Modifizierung von Leberproteinen spielt für das Auftreten von Lebererkrankungen im Zusammenhang mit der Einnahme von Diclofenac vermutlich eine entscheidende Rolle (Boelsterli et al., 1995).

Es bleibt festzuhalten, dass in erster Linie für die Organe Magen und Niere ein Zusammenhang zwischen hohen NSAID-Plasmaspiegeln und dem Ausmaß der Nebenwirkungen beschrieben ist, vor allem bei langfristiger Einnahme hoher Dosen. Darüber hinaus hängen Nebenwirkungen offenbar von der Präferenz des Nichtsteroidalen Antiphlogistikums für die bereits beschriebenen Isoformen der Cyclooxygenase ab. Unter den nichtselektiven Cyclooxygenasehemmern ist Diclofenac ein präferentieller Inhibitor der Cyclooxygenase-2 und hemmt als solcher bevorzugt die Zytokin-induzierte Cox-2 in Entzündungszellen, dagegen in geringerem Maße die Synthese zytoprotektiver Prostaglandine durch die konstitutive Cox-1 in vielen anderen Körperzellen (Mitchell et al., 1993). Dadurch sinkt das Risiko für Cox-1-vermittelte Gastropathien, Magengeschwüren, gastrointestinale Blutungen und Nierenfunktionsstörungen. Die Cox-1-Aktivität von Diclofenac ist aber immer noch ausreichend, um bei therapeutischen Plasmakonzentrationen die Prostaglandinbildung im Magen deutlich zu hemmen (Cryer und Feldmann, 1998). Eine effektive Entzündungsunterdrückung ist nach heutigem Wissen von der Inhibition beider Cyclooxygenaseformen abhängig (Wallace et al., 1998).

### **1.5 Phänotypisierung und Genotypisierung**

Die Bestimmung der für die Arzneimitteltherapie relevanten Enzym polymorphismen kann einerseits durch Phänotypisierung und zum anderen durch Genotypisierung geschehen. **Phänotypisierung.** Zu unterscheiden sind bei der Phänotypisierung die *In-vivo*- und die *Ex-vivo*-Verfahren. Untersucht wird eine biochemische Eigenschaft eines exprimierten Proteins, beispielsweise eines Enzyms, eines Rezeptors oder eines Transportproteins. Bei *In-vivo*-Verfahren wird zunächst eine geeignete Testsubstanz verabreicht und dann quantitativ entweder die Elimination der Ausgangssubstanz oder die Bildung eines Metaboliten in Blut, Urin, Speichel oder Atemluft bestimmt. Zur Charakterisierung von Cyp2C9 kann zum Beispiel eine Testdosis von 300 mg Phenytoin verabreicht und nach zwölf Stunden eine Blutentnahme durchgeführt werden. Im Serum wird dann die Konzentration des durch Cyp2C9 gebildeten 5-(parahydroxyphenyl)-5-Phenylhydantoin-Metaboliten (kurz: p-HPPH) und die Konzentration der Muttersubstanz gemessen. Der Metabolisierungsquotient (Metabolic ratio) aus p-HPPH und Phenytoin und ist ein Parameter für die *In-vivo*-Aktivität von Cyp2C9. Erworbene Defekte in der Enzymaktivität werden durch die Phänotypisierung ebenso gemessen wie die

genetische Defizienz. Die Phänotypisierung verliert dann an Aussagekraft, wenn vor der Gabe der Testsubstanz bereits die Arzneitherapie mit einem vom selben Isoenzym verstoffwechselten Medikament eingesetzt hat. In diesem Fall ist eine Konkurrenz von Medikament und Testsubstanz um das verstoffwechselnde Enzym zu erwarten. Die Phänotypisierung spiegelt dann nicht die eigentliche genetische Disposition des Patienten wider. Eine Möglichkeit der *Ex-vivo*-Typisierung stellt die Aktivitätsbestimmung derjenigen Enzyme, die im Plasma in weißen oder roten Blutkörperchen exprimiert werden, dar.

**Genotypisierung.** Bei der Genotypisierung wird die genomische DNA auf solche genetischen Polymorphismen hin untersucht, die für individuelle Unterschiede im Arzneistoffmetabolismus verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wird zunächst aus weißen Blutkörperchen deren DNA extrahiert. Der zu untersuchende Genabschnitt wird dann mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und schließlich elektrophoretisch analysiert. Im Gegensatz zur Phänotypisierung wird bei der Genotypisierung die generelle Disposition aussagekräftiger analysiert, weil gleichzeitig verabreichte Medikamente das Untersuchungsergebnis nicht beeinflussen.

## **1.6 Herleitung der Aufgabenstellung**

Nichtsteroidale Antiphlogistika gehören zu den meistverordneten Medikamenten überhaupt. Nicht zuletzt aufgrund der epidemiologischen Häufigkeit unerwünschter Nebenwirkungen ist es von großem Interesse, die Ursachen individueller Disposition für das Auftreten solcher Nebenwirkungen genauer zu untersuchen.

1. Es soll die Bedeutung genetischer Polymorphismen des Enzyms Cyp2C9 auf die Pharmakokinetik und Wirkung zweier Nichtsteroidaler Antiphlogistika, Diclofenac und Ibuprofen, anhand einer Einmalgabe an ausgewählte, gesunde Träger der insgesamt sechs verschiedenen Cyp2C9-Genotypen in einer kontrollierten klinischen Studie untersucht werden.

2. Hauptzielgröße ist die Messung genetisch bedingter Unterschiede in der Pharmakokinetik von Diclofenac und Ibuprofen. Als Hauptparameter wird die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) verwendet. Die zu erwartenden Unterschiede der AUC sollen dazu dienen, Dosisempfehlungen für die jeweiligen Cyp2C9-Genotypen aussprechen zu können. Pharmakokinetische Nebenzielgrößen sind die Eliminationshalbwertszeit, die maximale Blutkonzentration, die totale

Clearance, die Resorptionsverzögerungszeit sowie die Plasmakonzentrationen der Hauptmetaboliten. Als pharmakodynamische Nebenzielgrößen dient die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) der Surrogatparameter Thromboxan B<sub>2</sub> (für Cyclooxygenase-1) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (für Cyclooxygenase-2).

3. Es soll diskutiert werden, welche Vorteile sich aus einer routinemäßigen Genotypisierung von Cyp2C9 für eine medikamentöse Therapie ergeben könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Probandenrekrutierung und Studiendurchführung

#### 2.1.1 Studiendesign

Dieser Arbeit liegt eine prospektive Kohortenstudie zugrunde, in deren Rahmen 21 Probanden, nach ihrem *Cyp2C9*-Genotyp ausgewählt aus einem großen Kollektiv genotypisierter Probanden, die Nichtsteroidalen Antiphlogistika Diclofenac und Ibuprofen mit einem zeitlichen Mindestabstand von einer Woche einnehmen sollten. Die Studie wurde nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission gemäß den Richtlinien der Good Clinical Practice am Institut für klinische Pharmakologie der Charité durchgeführt. Die teilnehmenden Probanden wurden durch die studienbetreuenden Ärzte und Doktoranden schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie.

#### 2.1.2 Probandenauswahl und Einschlusskriterien

Die Probanden wurden aufgrund ihres jeweiligen Cytochrom P450 2C9-Genotyps aus einem größeren Kollektiv von 516 Probanden, die sich zur Genotypisierung und Teilnahme an klinischen Studien gemeldet hatten, ausgewählt. (siehe Tabelle 5) Dabei wurden jeweils 4 Probanden mit den Cytochrom P-450-Genotypen (\*1/\*1), (\*1/\*2), (\*1/\*3) sowie jeweils 3 mit den seltenen Genotypen (\*2/\*2), (\*2/\*3) und (\*3/\*3) eingeschlossen.

Tabelle 5: Anzahl der Träger der unterschiedlichen *Cyp2C9*-Genotypen in einem Pool von 516 Probanden sowie in der vorliegenden Studie (21 Teilnehmer)

<b>Cyp2C9 Genotyp</b>	<b>Gruppengröße in der vorliegenden Studie</b>	<b>Absolute Anzahl der Träger der jeweiligen Allelkombination</b>	<b>Prozentualer Anteil der Träger der Allelkombination am 516 Leute umfassenden Probandenpool</b>
<b>*1/*1</b>	4	350	67,83
<b>*1/*2</b>	4	91	17,64
<b>*2/*2</b>	3	6	1,16
<b>*1/*3</b>	4	58	11,24
<b>*2/*3</b>	3	7	1,36
<b>*3/*3</b>	3	4	0,78

Es handelte sich um freiwillig teilnehmende, gesunde Nichtraucher im Alter zwischen 18 und 65 Jahren mit einem Körpergewicht  $\pm$  18% gemäß Broca-Index. Alle 21

Probanden, die Nichtsteroidale Antiphlogistika einnahmen, waren kaukasischer Abstammung. Die Auswahl von Probanden aus einer einheitlichen genetischen Population wurde in der Absicht, das Risiko systematischer Fehler zu verringern, vorgenommen. Es wurde eine Anamnese, eine allgemeinärztliche körperliche Untersuchung sowie ein Routinelaborscreening durchgeführt. Im Rahmen dieser Laboruntersuchung wurden als Parameter die Elektrolyte, Harnstoff, Kreatinin, ASAT, ALAT,  $\gamma$ -GT, AP, Gesamt-Bilirubin, TPZ, PTT, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten-/ Leukozyten-/ Thrombozytenzahl sowie HbsAg und Anti-HCV zum Ausschluss einer Hepatitis B bzw. Hepatitis C bestimmt. Darüber hinaus wurde ein HIV-Test durchgeführt. Die Probanden erhielten schriftliche und mündliche Erläuterungen zu Studieneinschränkungen und Ernährungshinweisen.

### 2.1.3 Ausschlusskriterien

Als Ausschlusskriterien galten alle körperlichen oder seelischen Erkrankungen und jegliche Medikamenteneinnahme. Es wurden keine Probanden mit bekanntem Drogen- und Alkoholabusus zur Teilnahme an der Studie zugelassen. Mehrere Autoren fanden in der Vergangenheit eine erhöhte Clearance für Cyp2C9-Substrate bei Alkoholikern. Nicht abschließend geklärt ist, ob Ethanol selbst enzyminduzierend wirkt oder andere Mechanismen (Lebensstilfaktoren, diätetische Gründe etc.) für die erhöhte Clearance verantwortlich sind (Kater et al., 1969; Iber, 1977; Sandor et al., 1981). Neben erhöhten Blutdruckwerten führten auch pathologische Werte im Rahmen der weiter oben dargestellten laborchemischen Routineuntersuchung zum Ausschluss aus der Studie. Die Ausschlusskriterien sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Körperliche Erkrankungen als Ausschlusskriterien

<b>Spezielle Ausschlusskriterien</b>	<b>Diagnostik</b>
Diabetes Mellitus	Nüchtern-BZ, Anamnese
Leber-, Nierenerkrankungen	Routinelaborparameter, Anamnese, körperliche Untersuchung
Magen-Darm-Ulcera	Anamnese
Alkoholabusus, Drogenabusus	Blutentnahmen, Urinkontrollen, Drogenscreening, Blutalkohol
Raucherstatus	Nikotin- und Cotininplasmaspiegel
HBV, HCV, HIV	Virologische Untersuchung

Darüber hinaus konnten keine Probanden in die Studie eingeschlossen werden, die innerhalb der zurückliegenden zwei Monate vor Studienantritt an einer anderen

Arzneimittelstudie teilgenommen oder aber Blut gespendet hatten, bei denen anamnestisch eine Arzneimittelallergie bekannt war oder die ganz allgemein klinische Befunde aufwiesen, die eine Teilnahme an der Studie hätten beeinträchtigen können. Auch Raucher wurden wegen der bekannten enzyminduzierenden Wirkung von Nikotin auf Cytochrom P450-Enzyme zur Teilnahme an der Studie nicht zugelassen. Obwohl keine generellen geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Aktivität von Cyp2C9 bekannt sind, wurden dennoch keine Frauen in die Studie eingeschlossen, da aufgrund zyklusabhängiger Schwankungen von Östrogen eine Beeinflussung des Leberstoffwechsels nicht auszuschließen ist.

#### **2.1.4 Art und Dosis der verwendeten Arzneimittel**

Die zu untersuchenden Substanzen wurden als orale Einmaldosen verabreicht. Die Probanden erhielten zu den jeweiligen Terminen entweder 50mg Diclofenac (Voltaren® 50 (Fa. Novartis)) oder 600mg Ibuprofen (Ibuprofen 600 (Fa. Stada)).

#### **2.1.5 Diätetische Maßnahmen**

Jeweils drei Tage vor Einnahme eines Medikaments bis nach der letzten Blutentnahme mussten die Teilnehmer auf den Genuss von Alkohol und Grapefrüchten verzichten. Während der Dauer der Studie sollte darüber hinaus der Verzehr Xanthin-haltiger Speisen (Bananen, Schokolade) und Getränke (Kaffee, Tee, Cola) aufgrund der bekannten enzyminduzierenden Wirkung von Xanthinen auf Cytochrom P450 einschränkt werden und zwölf Stunden vor Beginn der Studie bis nach der letzten Blutentnahme vollständig unterbleiben. Der Gebrauch von Nikotin und Drogen war über die gesamte Dauer der Studie untersagt. Die Probanden sollten über einen Zeitraum von zehn Stunden vor bis vier Stunden nach Einnahme der Nichtsteroidalen Antiphlogistika nüchtern bleiben. Sie erhielten in dieser Zeit nach Belieben Mineralwasser.

#### **2.1.6 Überprüfung der Probandencompliance und Vorsichtsmaßnahmen**

Unmittelbar vor Einnahme der Testsubstanzen wurden die Probanden im Rahmen einer Kurzanamnese über Medikamentennebenwirkungen, ihren Gesundheitszustand, begleitende Medikamenteneinnahmen sowie Drogen-, Alkohol- und Nikotinkonsum vor bzw. zwischen den Kinetiktagen befragt. Die Studienteilnehmer wurden darauf hingewiesen, dass im Verdachtsfall Blut- und

Urinkontrollen zur Überprüfung ihrer Angaben durchgeführt und sie im Falle eines positiven Testergebnisses mit sofortiger Wirkung aus der Studie ausgeschlossen werden würden.

### **2.1.7 Studienablauf**

Die Kinetikmessung erstreckte sich jeweils über insgesamt 48 Stunden. In diesem Zeitraum erfolgten insgesamt 16 Blutentnahmen. Sofern sich aus der Kurzanamnese keine Einwände gegen die Teilnahme an der Studie ergaben, erhielten die Probanden eine intravenöse Verweilkanüle, die nach Beendigung des ersten Kinetiktages entfernt wurde. Nach einer Nüchternblutentnahme nahmen die Probanden dann im Beisein des verantwortlichen Studienarztes die jeweilige Testsubstanz ein. Über den intravenösen Zugang wurde den Studienteilnehmern daraufhin 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 8 und 10 Stunden nach Einnahme der zu untersuchenden Substanz je 9ml EDTA-Blut zur Medikamentenspiegelbestimmung, eine Heparin-Monovette à 3 ml zur Bestimmung von Pg E<sub>2</sub> und eine Serum-Monovette à 3 ml zur Bestimmung von Tx B<sub>2</sub> abgenommen. Vier Stunden nach der Medikamenteneinnahme erhielten die Probanden eine Standardmahlzeit. Nach der letzten Blutentnahme zehn Stunden nach Einnahme der Testsubstanz wurde der venöse Zugang entfernt, woraufhin die Probanden das Institut verlassen konnten. 24 Stunden nach Einnahme wurden erneut eine EDTA-, eine Heparin-, und eine Serum-Monovette, nach 28 h, 34 h und 48 h jeweils noch eine EDTA-Monovette durch Punktion einer Armvene entnommen. Das Gesamtvolumen des entnommenen Bluts betrug folglich rund 180 ml pro Medikament.

### **2.1.8 Dokumentation der Studie**

Die erhobenen Daten (Anamnese, Laborergebnisse, unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen, Blutentnahme- und Laborprotokolle) wurden in case-report-forms (CRFs) eingetragen, die zusammenhängend für 15 Jahre im Institut für Klinische Pharmakologie der Charité aufbewahrt werden.

### **2.1.9 Datenschutz und Vertraulichkeit der Daten**

Die Probandendaten wurden in anonymisierter Form erhoben. Jeder Proband erhielt eine individuelle Code-Nummer. Die Zuordnung von Proband und Code ist nur den an der Studie mitarbeitenden Doktoranden und Ärzten bekannt und wird nicht an Dritte weitergegeben. Die Daten sind computergesteuert verwaltet und gespeichert.

Ein Datenzugriff anderer auf die personenbezogenen Daten ist nur nach Genehmigung durch die Probanden selbst möglich.

### **2.1.10 Erfassung von Nebenwirkungen**

Während der Kinetikmessungen aufgetretene Nebenwirkungen wurden erfasst und gesondert sechs und 34 Stunden nach Einnahme der Testsubstanz per Kurzanamnese erfragt. Alle Nebenwirkungen wurden in offenen Fragebögen, die keine Rückschlüsse auf das verabreichte Medikament zuließen, schriftlich dokumentiert.

### **2.1.11 Fehlerminimierung**

Die im Rahmen der Studie verwendeten Medikamente wurden in unterschiedlicher Reihenfolge, d.h. randomisiert zugeteilt, wodurch systematische Fehler durch Gewöhnung oder Ermüdung der Probanden vermieden werden sollten. Allerdings sind die Hauptzielparameter der Studie, d.h. Arzneimittelkonzentration und Enzymaktivitäten, von der subjektiven Wahrnehmung der Probanden oder Studienärzte unabhängig.

### **2.1.12 Versicherungsschutz**

Gemäß den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes waren die Probanden über 1000000 DM gegen die bei Blutabnahmen potentiell auftretenden Schäden sowie gegen die nicht therapeutisch indizierte Einnahme der Nichtsteroidalen Antiphlogistika versichert. Die Versicherung wurde bei der Gerling Industrie Service GmbH West, Prinzenallee 21, 40549 abgeschlossen.

### **2.1.13 Weiterverarbeitung und Aufarbeitung der Proben zur Messung der Medikamenten- und Prostanoidkonzentrationen**

Die für die Medikamentenspiegelbestimmung (EDTA-Monovette) vorgesehenen Blutproben wurden unmittelbar nach der Abnahme zehn Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert. Das so gewonnene Blutplasma wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert. Für die Tx B<sub>2</sub>-Konzentrationsbestimmung (Serum-Monovette) wurden 3 ml Vollblut für eine Stunde bei 37° C inkubiert und daraufhin bei 5000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Cup überführt und bei -80° C eingefroren. Für die Pg E<sub>2</sub>-Konzentrationsbestimmung (Heparin-Monovette) wurde das entnommene Blut mit 10µg/ml Vollblut Lipopolysaccharid (LPS, Typ E.Coli

Serotyp 026: B<sub>6</sub> (Fa.Sigma)) (Methode nach Patrignani et al., 1994) versetzt, für insgesamt 24 h in einem Brutschrank bei 37° C inkubiert, dann bei 5000 U/min für 10 min zentrifugiert und schließlich der Überstand in ein Eppendorf-Cup überführt und bei -80° C eingefroren.

## 2.2 Genotypisierung

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

### 2.2.1 Erythrozyten-Lyse

Zunächst wurden mindestens 3ml des aufgetauten EDTA-Vollbluts mit 35 ml 1 x Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt, so dass die kern- und DNA-losen Erythrozyten zerstört wurden. Auf der anderen Seite blieben kernhaltige Blutkörperchen aufgrund ihrer höheren Membranstabilität intakt. Daraufhin wurden die Proben 30 min bei 2000 U/min und 4°C (Beckmann-Zentrifuge GS-6R) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment nach Zugabe von 1,5 ml TEN-Puffer bei -20° C bis zur DNA-Extraktion eingefroren. Chemikalien und Lösungen siehe Tab.7.

Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen zur Lyse der Erythrozyten

Puffer	Ansatz/ Hersteller
10 x Erythrozytenlysepuffer	0,372 g EDTA (MG=372,2 g/mol) (Fa.Calbiochem) + 10 g KHCO <sub>3</sub> (MG=100,12 g/mol) (Fa.Merck) + 61,5 g NH <sub>4</sub> Cl (MG=53,49 g/mol) (Fa.Merck) + 600 ml H <sub>2</sub> O (Deionat), lösen, auf 1L mit H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren
1 x Erythrozytenlysepuffer	100 ml 10 x Ery-Lyse-Puffer + 900 ml H <sub>2</sub> O
10 x TEN Puffer	24,2 g TRIS/HCl (MG=121,14 g/mol) (Fa. Merck) + 7,4 g EDTA (MG=372,2 g/mol) + 17,5 g NaCl (MG=58,44 g/ mol) + 600 ml H <sub>2</sub> O, lösen, auf 1L, mit H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren
1 x TEN Puffer	100 ml 10 x TEN-Puffer +900 ml H <sub>2</sub> O

### 2.2.2 DNA-Extraktion

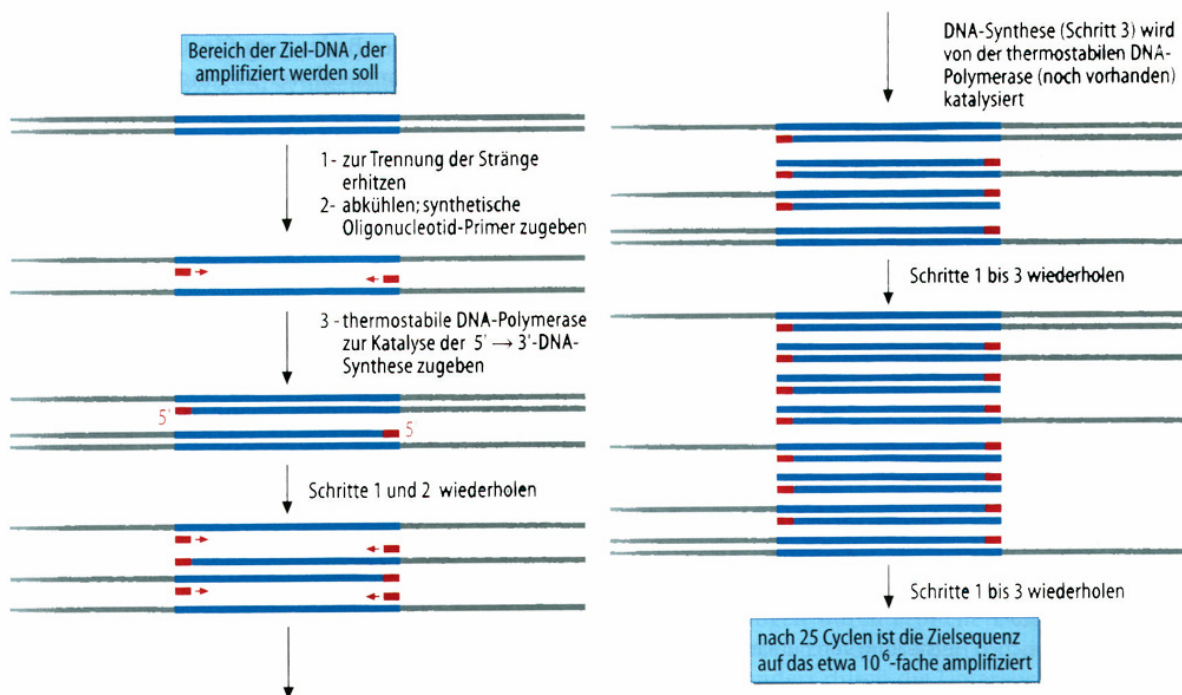
In einem zweiten Schritt konnte die in den Leukozyten enthaltene DNA mithilfe des Phenol-Chloroform-Verfahrens extrahiert werden. Zunächst wurden die Zellsedimente aus der Erythrozytenlyse in sterilen Plastikgefäßen (PP-Röhrchen, Fa. Greiner) in 1,5 ml Lysis-Puffer und 100 µl Proteinase K-Lösung verdaut, danach

verblieben sie bei 37° C für mindestens 12h im Überkopfschüttler. Daraufhin wurden sie mit 1,5 ml Phenol/ Chloroform-Lösung versetzt und für zwei Stunden im Überkopfschüttler gemischt. Dabei diente Phenol der Ausfällung von Proteinen, die in Komplexen mit Nukleinsäuren vorliegen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2500 U/min (Beckmann-Zentrifuge GS-8R) wurde die obere, wässrige Phase abpipettiert und im Rahmen der Chloroform-Nachextraktion mit 1,5 ml Chloroform zwecks Eliminierung verbliebener Lipidbestandteile versetzt. Die Proben wurden für 30 min im Überkopfschüttler gemischt und erneut für 10 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Im folgenden Arbeitsschritt wurde die DNA präzipitiert. 2 ml des Überstands wurden auf Gefäße mit 6 ml 96%igem Ethanol und 100 µl 3M Natriumacetat (pH 5,5) überpipettiert und schließlich für 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, woraufhin die ausgefällte DNA am Boden der Gefäße haftete. Der Überstand wurde abgegossen, die DNA durch Zugabe von 3 ml 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum 10 min bei 3000 U/min 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. Im vorletzten Arbeitsschritt wurde die DNA über mindestens 12h bei 55° C in 200 µl TE-Puffer aufgelöst. Daraufhin konnte die DNA photometrisch quantifiziert werden. Auch die Qualität der Extrakte ließ sich durch den Quotienten der Extraktion bei 280/ 260 nm einschätzen, der zwischen 1,6 und 2,0 liegen sollte. Werte unter 1,5 deuteten auf eine Proteinverunreinigung hin. Schließlich wurde die DNA bei 4°C bis zur PCR-Analyse in sterilen Reaktionsgefäßen aufbewahrt. Chemikalien und Lösungen siehe Tab. 8. Die Analyse der genomischen DNA erfolgte mithilfe einer Kombination aus Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und, nachdem die vervielfältigte DNA durch Restriktionsenzyme verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt wurde, Darstellung der so genannten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP).

Tabelle 8: Chemikalien und Lösungen zur DNA-Extraktion

Lösungen/ Puffer	Ansatz/ Hersteller
20 mM TRIS/HCl	20 ml 100mM TRIS/HCl (Fa.Merck) + 80 ml H <sub>2</sub> O und autoklavieren
Proteinase-K-Lösung	je Probe 2 mg Proteinase K (Fa. Roche) in 100 ml 20 mM TRIS-HCl-Puffer
Lysis-Puffer	Fertigpuffer Fa.Applied Biosystems, Nr.9
Phenollösung	Fertigpuffer Fa.Applied Biosystems, Nr.8
Chloroform-Lösung	Fa. Merck
96%iger und 70%iger Ethanol	Fa. Merck
3 M Natriumacetat	40,8 g Natriumacetat (MG=136,1 g/mol) (Fa.Merck) + 50 ml H <sub>2</sub> O, pH mit Eisessig auf 5,5 einstellen, auf 100 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen und autoklavieren
TE-Puffer	10 mM TRIS/HCl und 0,1 mM EDTA (Fa.Calbiochem) (aus 10 ml 100 mM TRIS/HCl + 10 µl 100 mM EDTA + 90 ml H <sub>2</sub> O, pH mit 0,1 NaOH auf 7,6 einstellen und autoklavieren)

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)



**Abbildung 2: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch die Polymerase-Kettenreaktion (aus Löffler, 2001)**

Bei der PCR handelt es sich um eine *In-vitro*-Technik, die die gezielte Amplifizierung von DNA-Abschnitten unter Zuhilfenahme von DNA-Polymerasen erlaubt. Zur Durchführung einer PCR wird zum einen ein Thermocycler, der die vollautomatische

Steuerung von Temperaturzyklen gewährleistet, und zum anderen eine hitzestabile DNA-Polymerase, die bei Temperaturen von 90-95° C nicht denaturiert, benötigt. Als Starthilfe der PCR dienen einzelsträngige Oligonukleotidprimer, die an komplementäre Enden der Sequenzen einer DNA-Matrize (Template) binden können. Die hitzestabile DNA-Polymerase, eine geringe Menge doppelsträngige DNA, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und zwei DNA-Startmoleküle werden im Rahmen der PCR in einer geeigneten Reaktionspufferlösung inkubiert. Die Aufgabe der DNA-Polymerase besteht darin, Primer in 5'-3'-Richtung entlang *einsträngiger*, denaturierter DNA-Matrizen in Vorwärts- oder Rückwärtsrichtung zu verlängern. Die Sequenzen der dabei entstehenden DNA-Abschnitte sind komplementär zu denen ihrer Matrizen. Die DNA-Abschnitte werden temperaturgesteuert in Reaktionszyklen amplifiziert. Dabei besteht jeder Zyklus aus drei Schritten. Im ersten Schritt werden beide Stränge der DNA-Doppelhelix durch Temperaturerhöhung getrennt (Denaturierung, 94° C), woraufhin sich nach Abkühlen auf 57-60° C im zweiten Schritt die Primer komplementär an die entsprechenden Stellen der einsträngigen DNA-Matrize anlagern können (sog. Annealing). Im dritten Schritt erfolgt bei einer für die Funktion der DNA-Polymerase optimalen Reaktionstemperatur die Verlängerung der Primer (Extension, 72° C). Am Ende dieses Zyklus' liegen neu synthetisierte Doppelstränge vor, die zunächst noch keine definierte Länge haben. Da sie aber im nächsten Zyklus selbst als Matrizen verwendet werden und an ihren Enden die Oligonukleotidsequenz der Primer tragen, entstehen ab dem dritten Durchlauf nur noch Produkte gewünschter Länge. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz. Nach über 30 Durchläufen liegt die DNA theoretisch  $2^{30}$  mal vor, allerdings begrenzt bei molarem Überschuss meist die Enzymmenge die Reaktion und damit die Zahl der Zyklen. Darüber hinaus denaturiert die DNA-Polymerase im Laufe der Reaktion, und mit zunehmender Konzentration hybridisieren die gewünschten Stränge auch untereinander. Der letzte Elongationsschritt wird auf mehrere Minuten verlängert, so dass die vollständige Synthese aller Schritte gewährleistet ist.

#### **2.2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)**

Die so entstandenen amplifizierten DNA-Stücke werden zum Zweck der RFLP-Analyse mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Letztere, auch als Restriktionsenzyme bezeichnet, stammen ursprünglich aus Bakterien und können

doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen mit palindromischer Struktur spalten. Punktmutationen in der DNA können dazu führen, dass ursprüngliche Schnittstellen nicht mehr erkannt werden oder zusätzliche Schnittstellen entstehen. Das Vorliegen unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach Verdau durch Restriktionsenzyme wird als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus 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 Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

### **2.2.5 Bestimmung des *Cyp2C9*-Allels durch PCR-RFLP-Tests**

Zur Bestimmung des Cytochrom P450 2C9-Genotyps wird 1 µl genomischer DNA 25 µl des in Tab.12 beschriebenen PCR-Mastermix' zugesetzt. Im Thermocycler wird die DNA danach in 35 Zyklen amplifiziert. Die erfolgreiche Durchführung der PCR wird im nächsten Schritt kontrolliert, indem ein Gemisch aus 5 µl PCR-Produkt und 10 µl Bromphenolblaupuffer auf 1% Agarosegel aufgetragen werden, woraufhin nach Elektrophorese in einer Protrans-Kammer für 30 min bei 120 Volt im Fall von *Cyp2C9*\*2 eine 372 bp-Bande, im Fall von *Cyp 2C9*\*3 eine 137 bp-Bande entstehen sollte. Das Ergebnis wird, wie in Abbildung 3 dargestellt, photographisch festgehalten. Im Erfolgsfall werden 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl 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. Die entstehenden Restriktionsmuster für die unterschiedlichen Genotypen können dann abgelesen und zu Dokumentationszwecken fotografiert werden. Sie sind in Tabelle 12 im Detail dargestellt.

Tabelle 9: Chemikalien für die PCR-RFLP-Tests

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
dNTPs	Fa. Rapidozym
PCR-Primer	Fa.TIB MOLBIOL
DNA Polymerase AmpliTaqä,	Fa. Perkin Elmer
10 x PCR-Puffer	Fa. Perkin Elmer
25mM MgCl <sub>2</sub>	Fa. Perkin Elmer
Restriktionsendonuklease Sau 96I	Fa. New England Biolabs
Restriktionsendonuklease Styl	Fa. New England Biolabs
Agarose ultrapure	Fa. Gibco BRL
DNA-Standard: 4,5 ml 100 bp-DNA-Leiter	Fa. MBI Fermentas
Bromphenolblaupuffer	Fa. Merck
Ethidiumbromid	Fa. Merck

Tabelle 10: Geräte für die PCR-RFLP-Tests

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Thermocycler GeneAmp PCRSystem 9600/9700	Fa.Perkin Elmer/ Fa.Applied Biosystems
Videosystem Eagle Eye II	Fa.Stratagene
Zentrifugen	Fa.Eppendorf, Fa.Beckmann
Inkubationsschränke	Fa.Biometra
Halbautomatische Schüttler	Fa.Hoefer, Fa.Heidolph
Elektrophorese-Kammern und -schlitten	Fa.Protrans

Tabelle 11: Für die PCR-RFLP-Tests verwendete Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Untersuchte Allelvariante</b>
2CL1	5'-CAC Tgg CTg AAA gAg CTA ACA gAg	Cyp2C9*2
2CR1	5'-gTg ATA Tgg AgT Agg gTC ACC CAC	Cyp2C9*2
C5	5'-Agg AAg AgA TTg AAC gTg TgA	Cyp2C9*3
2C9-6A	5'-TgC ATg ggg CAg gCT ggT ggg gAg AAg GCC AA	Cyp2C9*3

Tabelle 12: Durchführung und Ergebnisse von PCR-RFLP und Gelelektrophorese

	<b>Cyp2C9*2 (Arg<sub>144</sub>Cys)</b>			<b>Cyp2C9*3 (Ile<sub>359</sub>Leu)</b>		
<b>PCR-Mastermix</b>	10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 ml MgCl <sub>2</sub> (25 mM) 1,5ml dNTPs (2 mM) 2,5ml H <sub>2</sub> O (steril, bidest) 17,35ml Primer 2CL1 (10 mM) 0,5ml Primer 2CR1 (10 mM) 0,5ml AmpliTaq Polymerase 0,15 ml			10 x Perkin Elmer Puffer 2,5 ml MgCl <sub>2</sub> (25 mM) 1,5ml dNTPs (2 mM) 2,5ml H <sub>2</sub> O (steril, bidest) 17,35ml Primer C5 (10 mM) 0,5ml Primer 2C9-6A (10 mM) 0,5ml AmpliTaq Polymerase 0,15 ml		
<b>Cycler</b>	2min 94°C– 35 x(30s 94°C– 10s 60°C–1min 72°C)–7min 72°C–4°C			2min 94°C– 35 x (30s 94°C– 10s 57°C– 40s 72°C)– 7min 72°C– 4°C		
<b>Restriktionsenzym</b>	Sau 96I			Styl		
<b>Enzymmastermix</b>	7 ml bidest. Wasser 2 ml Puffer (Neb4, Fa.New England Biolabs) 1 ml Sau 96I			6,5 ml bidest. Wasser 2 ml Puffer (Neb3, Fa.New England Biolabs) 1,5 ml Styl		
<b>Genotyp</b>	<b>*1/*1</b>	<b>*1/*2</b>	<b>*2/*2</b>	<b>*1/*1</b>	<b>*1/*3</b>	<b>*3/*3</b>
<b>Codierung</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Muster (bp)</b>	-	253	253	-	137	104
	179	179	-	137	137	-
	119	119	119	-	104	104
	74	74	-	-	33	33

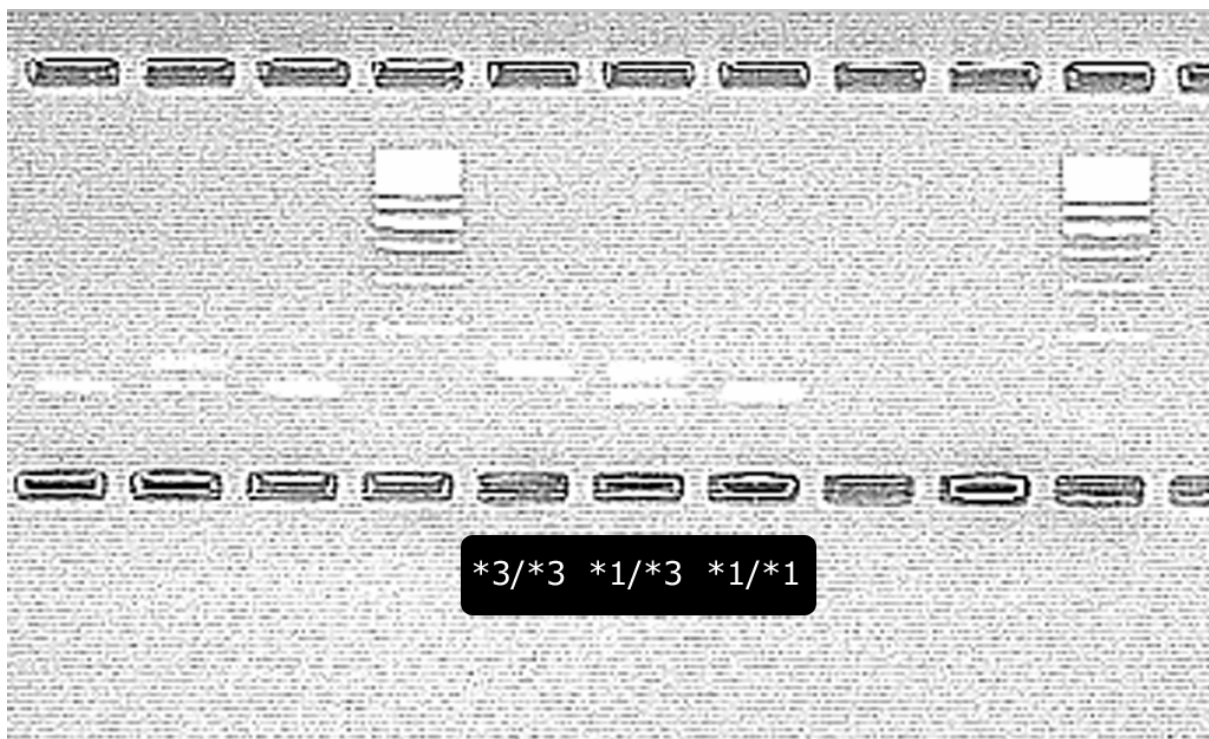


Abbildung 3: Elektrophoretische Auftrennung der durch PCR-RFLP amplifizierten und geschnittenen DNA bei Trägern der Genotypen Cyp2C9 \*3/\*3, \*1/\*3 und \*1/\*1

## **2.3 Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse**

### **2.3.1 Prinzip der Bestimmung von Medikamentenkonzentrationen mittels HPLC-Analyse**

#### **2.3.1.1 Vorbereitung der HPLC**

**Herstellung von Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben.** Im ersten Schritt werden Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben hergestellt. Zur Herstellung der einzelnen Lösungen werden die entsprechenden Volumina methanolischer Stammlösungen mit Rinderserum verdünnt. Die Kalibrierstandards dienen der Erstellung einer Kalibrationskurve und der Ermittlung der Bestimmungsgrenze. Ihre Konzentrationen sollten den aufgrund der gängigen Literaturdaten zu erwartenden Konzentrationsbereich umfassen. Die herzustellenden Qualitätskontrollproben, deren Konzentrationen sowohl den oberen als auch den unteren Bereich der Kalibrationskurve abdecken sollten, werden für die statistische Qualitätskontrolle benötigt.

**Erstellung einer Kalibrationskurve.** Aus den hergestellten Kalibrierstandards kann im zweiten Schritt die Kalibrationskurve errechnet werden. Diese Berechnung erfolgt mittels linearer Regression der in der HPLC (High performance liquid chromatography) gemessenen Peakflächenquotienten (Analyt/ Interner Standard) der Kalibrierstandards gegen die Konzentration.

**Extraktion der Substanzen.** Die zu detektierenden Substanzen müssen, bevor sie in der HPLC analysiert werden können, aus den Plasmaproben extrahiert und in Laufmittel rekonstituiert werden.

#### **2.3.1.2 Durchführung der HPLC**

Nach der Extraktion können mithilfe der HPLC die Medikamentenkonzentrationen bestimmt werden. Die HPLC beruht auf der Verteilungschromatographie, zeichnet sich durch hohe Auflösung und Empfindlichkeit, hohe Kapazität und vergleichsweise schnelle Durchführbarkeit aus. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Verteilung von Stoffen zwischen zwei miteinander nicht mischbaren flüssigen Phasen. Die eine (stationäre) Phase ist an einem festen Träger verankert, an dem die andere (mobile) Phase entlang fließt. 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 puffer-

haltigen wässrigen Lösung, die mit einem *wasserlöslichen*, organischen Lösungsmittel gemischt ist. Die Trennung eines Stoffgemischs durch die HPLC kommt dadurch zustande, dass verschiedene Stoffe sich entsprechend ihrer thermodynamischen Verteilungskoeffizienten unterschiedlich zwischen beiden Phasen verteilen und folglich mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Säule wandern. Neben der Trennsäule besteht eine HPLC-Anlage im Wesentlichen noch aus einer Pumpe (zur Modifikation der Zusammensetzung der mobilen Phase während der Chromatographie sind zwei Pumpen notwendig), einem Probeninjektor und einem Ultraviolett-durchflussdetektionssystem.

**Auswertung.** Zur Ermittlung der unbekanntenen Konzentrationen der untersuchten Proben wird auf die Kalibrationskurve zurückgegriffen. Diese ergibt sich, wie oben beschrieben, daraus, dass normierte Messwerte (Peakflächenquotienten Analyt/Interner Standard) als Funktion der Konzentrationen von Eichproben einer linearen Regressionsanalyse unterzogen werden. Aus den normierten Messwerten der zu bestimmenden Proben lassen sich nun anhand der erhaltenen Regressionsparameter die unbekanntenen Konzentrationen ermitteln.

### 2.3.1.3 Statistische Qualitätskontrolle der Analyseergebnisse

Mithilfe der statistischen Qualitätskontrolle kann bei quantitativen Bestimmungen die Präzision (Erfassung zufälliger Fehler) systematisch kontrolliert und überwacht werden. Künstliche Qualitätskontrollproben werden in eine Analysenserie eingefügt und unter den gleichen Bedingungen wie Patientenproben analysiert. Das Prinzip der statistischen Qualitätskontrolle besteht darin, dass vom Analyseergebnis der Kontrollproben auf die Zuverlässigkeit der Probandenwerte geschlossen wird.

**Präzision.** Sie ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse bei wiederholter Durchführung einer analytischen Methode unter identischen Bedingungen. Man unterscheidet zwischen der **Intra-assay-Varianz** (serielle Varianz), die durch mehrfache ( $n \geq 5$ ) Bestimmung der Qualitätskontrollproben *in einer Mess-Serie* berechnet wird, und der **Inter-assay-Varianz**. Für letztere, auch zeitabhängige Varianz genannt, werden die gemessenen Qualitätskontrollproben über einen Zeitraum von *mehreren Messtagen* ausgewertet.

**Bestimmungsgrenze.** Die Bestimmungsgrenze lässt sich beschreiben als die kleinste messbare Konzentration eines Analyten, die noch mit einer definierten Richtigkeit und Präzision bestimmt werden kann ( $\pm 20\%$ ). Sie wird mithilfe von Kalibrierstandards festgelegt.

### 2.3.2 HPLC von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien zur Bestimmung der Diclofenac-Plasmakonzentrationen

Chemikalie	Hersteller/ Ansatz
Diclofenac	Fa.Sigma
4'-OH-Diclofenac	Fa.Gentest Inc
Flurbiprofen (Interner Standard)	Fa.Sigma
1M Phosphorsäure	6,74ml Phosphorsäure (Fa.Merck) auf 100ml Wasser
n-Hexan	Fa.Merck
Diethylether	Fa.Merck
20mM Phosphatpuffer, pH3	Kaliumdihydrogenphosphat (5,44 g/ 2l) (Fa.Merck) mit Phosphorsäure (1ml 85% Phosphorsäure auf 2l)
Acetonitril	Fa.Merck
Glukuronidase/ Sulfatase	Fa.Sigma (Typ H-5)
0,5M Natriumacetatpuffer, pH5	400ml Wasser werden mit 5,71ml Eisessig versetzt und mit 30% Natronlauge auf pH5 eingestellt. Die Lösung wird in einem Messkolben auf 500ml aufgefüllt

Tabelle 14: Für die HPLC-Analyse von Diclofenac benötigte Geräte und deren Einstellungen

HPLC	Diclofenac
Säule	LiChrospher 100 RP 18 (5mm, 125 * 4mm)
Detektor (Merck)	UV, 280nm, 0.0025aufs, slow
Mobile Phase	A(B): Phosphatpuffer 95 (45) Acetonitril 5 (55)
Membranfilter	0,2mm regenerierte Zellulose, Bestellnummer 11607-50-N
Fluss	1,5ml/ min
Integratoreneinstellung	File Nr.5
Probenaufgeber	Run time 24min, Vol 75µl
Testgemisch	100ml Diclofenac (10mg/ ml) und 4'-OH-Diclofenac (10mg/ ml) + 50ml IS (50mg/ ml), 30ml injizieren
Kontrollproben	Probe 1: 200ng/ ml Probe 2: 800ng/ ml
Eichproben	1. Nullwert 2. 50ng/ ml 3. 100ng/ ml 4. 400ng/ ml 5. 800ng/ ml 6. 1000ng/ ml
Umrechnung von ng/ ml auf nmol/ l	Diclofenac Faktor 3.38 4-OH-Diclofenac Faktor 3.2
Retentionszeiten	4-OH-Diclofenac 7.8 min Flurbiprofen 14.1 min Diclofenac 14.9 min
Pumpensteuerung	Programm Nr.4
	A B
	t=0 75 25
	t=15 0 100
	t=22 0 100
	t=25 75 25

### 2.3.2.1 Vorbereitung der HPLC von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac.

**Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben.** Zur Herstellung einer Eichkurve wurden im Fall von Diclofenac sechs (inkl. Nullserum) Kalibrierstandards und für die statistische Qualitätskontrolle zwei Qualitätskontrollproben im unteren und oberen Bereich der Kalibrierkurve verwendet (siehe Tab.14). Zur Herstellung der einzelnen Lösungen wurden die entsprechenden Volumina der methanolischen Stammlösungen mit Rinderserum verdünnt. Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

**Extraktion von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac.** Für die chromatographische Analyse mussten Diclofenac und sein Metabolit 4'-OH-Diclofenac aus den Plasmaproben extrahiert werden. Die bei -20° C aufbewahrten Plasmaproben wurden aufgetaut und kurz zentrifugiert, so dass feste Bestandteile (Fibrinfasern, Proteinkonglomerate etc.) entfernt werden konnten. Daraufhin wurden 500 µl des homogenen Überstand mit 20 µl eines so genannten Internen Standards (Flurbiprofen, 50 µg/ml) versetzt. Bei dem Internen Standard handelt es sich um eine dem zu untersuchenden Stoff chemisch verwandte Substanz, mit deren Hilfe die Vollständigkeit der Extraktion beurteilt werden kann. Die nun folgende Extraktion dient dazu, störende Substanzen zu entfernen und die mithilfe der Chromatographie zu detektierenden Stoffe anzureichern. Der Probe wurden 200 µl 1-molarer Phosphorsäure (6,74 ml Phosphorsäure auf 100 ml Wasser) zugesetzt, daraufhin wurde sie zweimal mit einem Gemisch von 4ml n-Hexan/ Ether (50:50) für 10 min in einem Überkopfschüttler extrahiert. Nach Zentrifugation wurden 7 ml der vereinigten organischen Phase für ca. 30 min unter Stickstoff bei Raumtemperatur zum Trocknen gebracht und der dabei entstehende Rückstand in 150 µl Acetonitril/ Wasser (50:50) rekonstituiert. Nach erneuter Zentrifugation konnten 75 µl der Probe chromatographiert werden.

### 2.3.2.2 Durchführung der HPLC von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac.

Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 1,5 ml/min auf einer reversed phase Trennsäule mit einem Fließmittelgradienten aus Phosphatpuffer und Acetonitril. Die Zusammensetzung des Fließmittels wurde dabei, wie in Tabelle 14 dargestellt, durch eine programmgesteuerte Pumpe zeitabhängig verändert. Die Konzentration von Diclofenac wurde schließlich mithilfe eines nach dem Prinzip der Absorptionsphotometrie messenden UV-Durchflussdetektors bei einer Wellenlänge

von 280 nm ermittelt. Sämtliche Plasmaproben von insgesamt drei Probanden wurden analysiert auf Glukuronid- und Sulfat-Metaboliten von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac. Zu diesem Zweck wurden Proben von 0,5 ml für eine Stunde mit 5000 Einheiten Glukuronidase/ Arylsulfatase bei 37°C in Natriumacetatpuffer (pH 5) inkubiert. Die Durchführung der Hydrolyse führte zu keiner Veränderung der in gleicher Weise quantifizierten Plasmakonzentrationen. Die in ng/ml freie Säure erhaltenen Ergebnisse von Diclofenac und 4-Hydroxydiclofenac konnten dann auf nmol/L umgerechnet werden.

### 2.3.2.3 Statistische Qualitätskontrolle für Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac.

**Festlegung der Bestimmungsgrenze.** Als Bestimmungsgrenze wurde die Hälfte der Konzentration des niedrigsten Kalibrators (50 ng/ml) festgelegt. Folglich betrug sie für Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac 25 ng/ml.

**Präzision.** Die *Intra*-assay-Varianz (n=25) betrug bei 50 ng/ml für Diclofenac 5,6% und für 4'-OH-Diclofenac 5,2%. Die *Inter*-assay-Varianz für Diclofenac betrug bei 200 ng/ml 14,8% und bei 800 ng/ml 8,0%. Sie belief sich für 4'-OH-Diclofenac bei 200 ng/ml auf 12,8% und bei 800 ng/ml auf 15,6%.

### 2.3.3 HPLC von Ibuprofen und OH-Ibuprofen

Tabelle 15: Für die Ibuprofen-Konzentrationsbestimmung verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/ Ansatz
Ibuprofen	Fa.Sigma
OH-Ibuprofen	Fa.Sigma
Flurbiprofen (Interner Standard)	Fa.Sigma
1N Salzsäure	Fa.Merck
n-Hexan	Fa.Merck
t-Butyl-Methylether	t-Butyl-Methylether
20mM Phosphatpuffer, pH3	Kaliumdihydrogenphosphat (5,44g/2l) (Fa.Merck) mit Phosphorsäure (ca.1ml 85% Phosphorsäure auf 2l)
Acetonitril	Fa.Merck
Diethylether	Fa.Merck

Tabelle 16: Für die HPLC-Analyse von Ibuprofen benötigte Geräte und deren Einstellungen

HPLC	Ibuprofen
Säule	LiChrospher 100 RP 18 (5mm, 125 * 4mm)
Detektor (Merck)	UV, 220nm, 0.0025aufs, slow
Mobile Phase	A(B): Phosphatpuffer 95 (45) Acetonitril 5 (55)
Membranfilter	0,2 mm regenerierte Zellulose, Bestellnummer 11607-50-N
Fluss	1,5 ml/ min
Integratoreneinstellung	File Nr.8
Probenaufgeber	Run time 16min, Vol 50 µl
Testgemisch	200 ml Ibuprofen + OH-Ibuprofen-Gemisch (jeweils 500 mg/ ml) + 200ml IS (500mg/ ml) + 1600ml Methanol, 10ml injizieren
Kontrollproben	Probe 1: 1 mg/ ml Probe 2: 20 mg/ ml
Eichproben	1. Nullwert 2. 0,5 mg/ ml 3. 1 mg/ ml 4. 5 mg/ ml 5. 10 mg/ ml 6. 20 mg/ ml 7. 40 mg/ ml
Umrechnung von ng/ ml auf nmol/ l	Ibuprofen 4.85 OH-Ibuprofen 4.5
Retentionszeiten	OH-Ibuprofen 1,98 min Flurbiprofen 8,90 min Ibuprofen 9,70 min
Pumpensteuerung	Programm Nr.4 A B t=0 50 50 t=5 0 100 t=9 0 100 t=13 50 50

### 2.3.3.1 Vorbereitung der HPLC von Ibuprofen und OH-Ibuprofen.

**Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben.** Zur Herstellung einer Eichkurve wurden für Ibuprofen sieben (inkl. Nullserum) Kalibrierstandards und für die statistische Qualitätskontrolle zwei Qualitätskontrollproben im unteren und oberen Bereich der Kalibrierkurve verwendet (siehe Tab.16). Zur Herstellung der einzelnen Lösungen wurden die entsprechenden Volumina der methanolischen Stammlösungen mit Rinderserum verdünnt. Die Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

**Extraktion von Ibuprofen und OH-Ibuprofen.** Ibuprofen und sein Metabolit OH-Ibuprofen mussten vor der chromatographischen Analyse aus den Plasmaproben extrahiert werden. Nach dem Auftauen wurden die Plasmaproben kurz zentrifugiert, so dass feste Bestandteile (Fibrinfasern, Proteinkonglomerate etc.) entfernt werden

konnten. 250 µl des homogenen Überstands wurden mit 20 µl des Internen Standards (Flurbiprofen, 25 µg/ml) sowie 100 µl 1N Salzsäure versetzt. Daraufhin wurde die Probe mit 1,5 ml n-Hexan/ t-Butyl-Methylether (80:20) für 15 min im Überkopfschüttler extrahiert. Nach Zentrifugation wurden 1,3 ml der organischen Phase abpipettiert und bei 40°C für 20 min zur Trockne gebracht. Der dabei entstehende Rückstand wurde in 100 µl Fließmittel (95% Phosphatpuffer, 5% Acetonitril) rekonstituiert.

### **2.3.3.2 Durchführung der HPLC von racemischem Ibuprofen und OH-Ibuprofen.**

Die Chromatographie von 50 µl der in der Extraktion hergestellten Proben erfolgte bei einer Flussrate von 1,5 ml/min auf einer reversed phase Trennsäule (LiChrospher 100 RP 18-Säule) mit einem Fließmittelgradienten aus Phosphatpuffer und Acetonitril. Die programmgesteuerte Pumpe veränderte, wie in Tabelle 16 dargestellt, zeitabhängig das Mischverhältnis des Fließmittelgemischs. Die Konzentration von Ibuprofen konnte dann im UV-Durchflussdetektor bei 220 nm gemessen und die in µg/ml freie Säure erhaltenen Ergebnisse von Ibuprofen und OH-Ibuprofen auf µmol/L umgerechnet werden.

### **2.3.3.3 Statistische Qualitätskontrolle von racemischem Ibuprofen und OH-Ibuprofen.**

**Festlegung der Bestimmungsgrenze.** Die Bestimmungsgrenze wurde auf 0,5 µg/ml festgelegt.

**Präzision.** Die *Inter-assay-Varianz* für *racemisches Ibuprofen* betrug bei 1 µg/ml 15% und bei 20 µg/ml 9 %. Sie belief sich für *OH-Ibuprofen* bei 1 µg/ml auf 22 % und bei 20 µg/ml auf 11 %.

## **2.3.4 HPLC von R- und S-Ibuprofen**

### **2.3.4.1 Vorbereitung der HPLC von R- und S-Ibuprofen.**

**Kalibrierstandards und Qualitätskontrollproben.** Zur Herstellung einer Eichkurve wurden sieben (inkl. Nullserum) Kalibrierstandards zwischen 1 µg/ml und 50 µg/ml und für die statistische Qualitätskontrolle zwei Qualitätskontrollproben im unteren (5 µg/ml) und oberen (30 µg/ml) Bereich der Kalibrierkurve verwendet.

**Extraktion von R- und S-Ibuprofen.** Die der chromatographischen Analyse vorausgehende Extraktion von R- und S-Ibuprofen aus den Plasmaproben entsprach weitgehend der für racemisches Ibuprofen beschriebenen Methode, allerdings wurde ein Gemisch aus N-Hexan und Diethylether (95:5) verwendet.

#### **2.3.4.2 Durchführung der HPLC von R- und S-Ibuprofen.**

Die Enantiomere wurden auf einer LiChroCart250-4 WhelkO1 (S,S)-Säule (Fa.Merck) getrennt. Das Fließmittel bestand aus N-Hexan/ 2-Propanolol/ Essigsäure (98:2:0,05), die Flussrate betrug 0,5 ml/min bei einer Temperatur von 25° C. Die Enantiomere wurden im UV-Durchflussdetektor bei 230 nm quantifiziert. Die Retentionszeiten betragen für R-Ibuprofen 10,1 min, für S-Ibuprofen 11,0 min, für R-Flurbiprofen 14,5 min und für S-Flurbiprofen 16,7 min.

#### **2.3.4.3 Statistische Qualitätskontrolle von R- und S-Ibuprofen.**

**Festlegung der Bestimmungsgrenze.** Die Bestimmungsgrenze für die Enantiomere R- und S-Ibuprofen wurde auf 0,5 µg/ml festgelegt.

**Präzision.** Die *Inter-assay*-Varianz für *R-Ibuprofen* betrug bei 2,5 µg/ml 6,8 % und bei 15 µg/ml 7,8 %. Die *Inter-assay*-Varianz für *S-Ibuprofen* betrug bei 2,5 µg/ml 14 % und bei 15 µg/ml 10 %.

## **2.4 Konzentrationsbestimmung von Tx B<sub>2</sub> und Pg E<sub>2</sub> mittels ELISA**

### **2.4.1 Funktionsprinzip des ELISA**

Bei dem ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) wird ein für das zu detektierende Antigen (in diesem Falle Tx B<sub>2</sub> oder Pg E<sub>2</sub>) spezifischer Antikörper fest an eine polymere Matrix gebunden. Nach Zugabe des Antigens (zum Beispiel einer Serumprobe) bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Anschließend werden nicht gebundene Antigene durch Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper, der eine andere Stelle des Antigens erkennt, hinzugefügt und erneut gewaschen. Die an die Platte gebundene Menge dieses Antikörpers ist der des Antigens proportional. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym verknüpft, das die Umwandlung eines farblosen Substrats zu einem farbigen Produkt oder eines nicht fluoreszierenden Substrats zu einem fluoreszierenden Produkt katalysiert. Folglich ist die Menge des zugegebenen Antigens proportional zur entstehenden Farbstoffintensität.

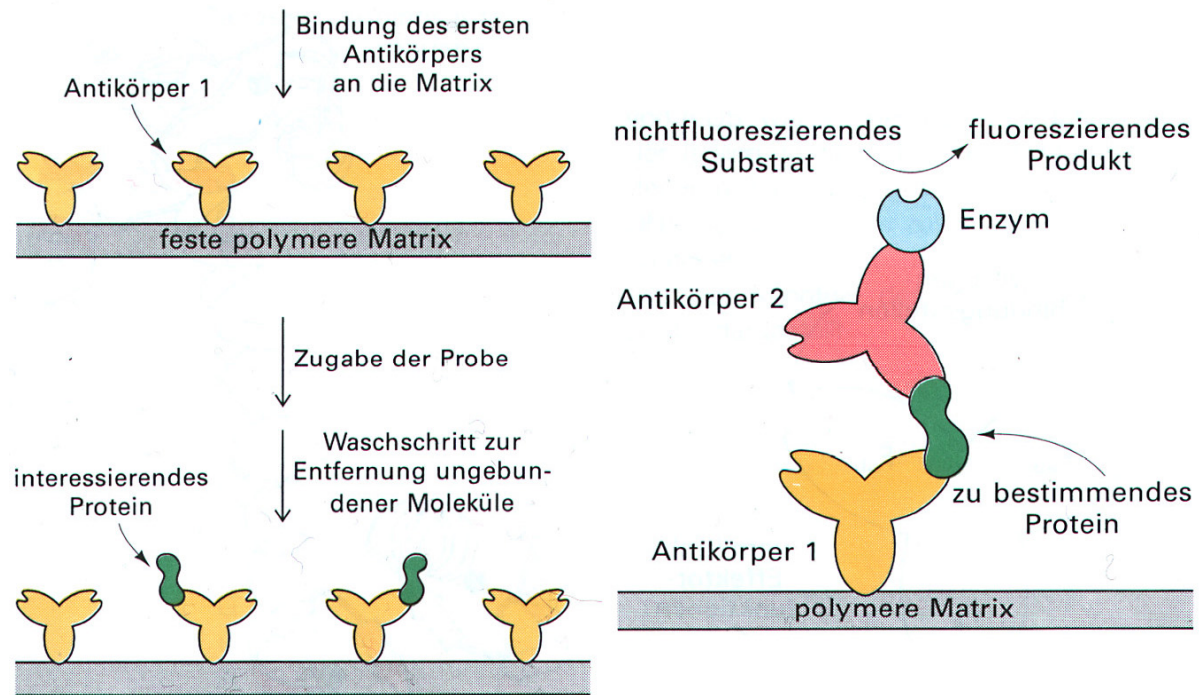


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei der ELISA (aus Stryer, 1996)

#### 2.4.2 Bestimmung der $Tx B_2$ - und $Pg E_2$ -Plasmakonzentrationen

Die Quantifizierung von  $Tx B_2$  und  $Pg E_2$  (Patrignani et al., 1994; Patrono et al., 1980<sub>a</sub>; Patrono et al., 1980<sub>b</sub>) wurde mithilfe eines kommerziellen Enzym-Immunoassays (Fa. Biotrend) durchgeführt. Für die Detektion der Farbänderung wurden der Mikrotitrierplattenreader SLT Spectra II (SLT Labinstrument) und die Software Magellan<sup>®</sup> (Spectra II, SLT, Tecan Grailsheim) verwendet. Die Serumproben wurden gemäß der Assay-Arbeitsanleitung aufbereitet und gegebenenfalls mit Assay-Puffer verdünnt, so dass Konzentrationen in den definierten Kalibrationsspannen erhalten wurden.

#### 2.4.3 Statistische Qualitätskontrolle

Für  $Tx B_2$  lag die Bestimmungsgrenze bei 7,98 ng/L. Die *Intra*-assay-Varianz betrug 1,6% bis 4,0% für den Konzentrationsbereich von 760 ng/L bis 2600 ng/L. Die *Inter*-assay-Varianz lag für Konzentrationen von 44 ng/L bis 3000 ng/L zwischen 3,6 % und 7,6 %. Für  $Pg E_2$  betrug die Bestimmungsgrenze 36 ng/L. Die *Intra*-assay-Varianz lag für Konzentrationen von 116 ng/L bis 2416 ng/L zwischen 5,8 % und 17,5%, die *Inter*-assay-Varianz zwischen 3,0 % und 5,1 % für einen Konzentrationsbereich von 111 ng/L bis 1902 ng/L.

## 2.5 Analyse der Messdaten und Statistik

**Analyse der Messdaten.** Zur Untersuchung der *Pharmakokinetik* wurden jedem Probanden 16 Plasmaproben für die Konzentrationsanalyse entnommen. Die Oral Clearance und die AUCs wurden mithilfe einer Nicht-Kompartiment-Analyse mit dem Programm WINNONLIN Version 1.5, 1997 (Scientific Consulting Inc., NC, USA) beschrieben. Die Oral Clearance wurden berechnet als Dosis/ AUC mit Extrapolierung gegen unendlich. Die letzten drei Datenpunkte der Eliminationsphase wurden zur Bestimmung der Eliminationskonstante verwendet. Für die Analyse der *pharmakodynamischen* Messdaten erfolgte keine Extrapolierung über die letzte gemessene Konzentration von Tx B<sub>2</sub> bzw. Pg E<sub>2</sub> hinaus. Die Dauer von  $\geq 50$  % Hemmung der Prostanoid-Synthese ließ sich aus den Konzentrations-Zeit-Kurven mithilfe von linearer Interpolation zwischen den ermittelten Konzentrationen bestimmen.

**Statistik.** Zur Feststellung statistischer Signifikanz in den Unterschieden zwischen den *Cyp2C9*-Genotypgruppen wurde der nicht parametrisierte Jonckheere-Terpstra Trend Test zur Testung Gen-Dosis-abhängiger Trends gemäß der SPSS Software (SPSS for Windows, Version 10; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) verwendet. Für die statistische Testung der Clearance wurde entsprechend der Auswirkungen der beiden Allele auf die *CYP2C9*-Aktivität ein Trend in folgender Richtung angenommen: *Cyp2C9* \*1/\*1 > \*1/\*2 > \*2/\*2 > \*1/\*3 > \*2/\*3 > \*3/\*3. Zur Testung der AUC wurde entsprechend die umgekehrte Reihenfolge zugrunde gelegt. Die Abschätzung der notwendigen Teilnehmerzahl und die *post hoc* Power-Analyse wurden mithilfe des Programms Nquery 4 (Statistical Solutions Inc., Cork, Irland) basierend auf einem Vergleich von zwei Gruppen unter Benutzung des t-Tests durchgeführt. Der wichtigste Vergleich war der zwischen Individuen ohne \*3-Allel (\*1/\*1, \*1/\*2, \*2/\*2) und solchen mit einem oder mehr *Cyp2C9*\*3-Allelen (\*1/\*3, \*2/\*3, \*3/\*3), da *Cyp2C9*\*3 in bisherigen Studien die größten funktionellen Auswirkungen zu haben schien, wohingegen die Expression von *Cyp2C9*\*2 die Enzymaktivität nur leicht zu verändern schien.

### 3 Ergebnisse

Die Studienmedikation wurde von allen 21 Teilnehmern gut vertragen. In der Tabelle 17 sind für jeden Probanden Alter, Körpergröße und Körpergewicht angegeben. Das durchschnittliche Alter betrug 31 Jahre, die durchschnittliche Körpergröße 182 cm, das durchschnittliche Körpergewicht 75 kg. Die Probanden sind in der Reihenfolge ihres *Cyp2C9*-Genotyps sowie der ihnen im Rahmen der Studie zugeordneten Codenummer aufgelistet. Der Proband mit der zugeordneten Codenummer 10 nahm lediglich Ibuprofen, nicht aber Diclofenac ein.

Tabelle 17: Demographische Daten und *Cyp2C9*-Genotypen der Studienteilnehmer

Studiencode	Alter [Jahre]	Körpergröße [cm]	Körpergewicht [kg]	<i>CYP2C9</i> Genotyp
1	26	198	82	*1/*1
10	40	184	74	*1/*1
16	25	192	85	*1/*1
25	25	174	82	*1/*1
2	27	195	85	*1/*2
22	31	178	83	*1/*2
23	30	178	73	*1/*2
24	39	175	65	*1/*2
7	24	192	82	*1/*3
11	31	185	85	*1/*3
12	24	185	67	*1/*3
20	57	173	64	*1/*3
3	36	178	63	*2/*2
18	29	171	72	*2/*2
33	30	174	81	*2/*2
4	24	180	67	*2/*3
9	23	185	75	*2/*3
19	30	192	72	*2/*3
5	45	178	79	*3/*3
13	29	176	71	*3/*3
14	26	179	74	*3/*3
<b>Mw</b>	31	182	75	
<b>SD</b>	8	8	8	

#### 3.1 Ergebnisse für Diclofenac

##### 3.1.1 Pharmakokinetische Parameter von Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac

Tabelle 18 zeigt die individuellen Daten für die pharmakokinetischen Parameter Cl/F (Orale Clearance: Clearance/bioverfügbare Fraktion eines Medikaments),  $C_{\max}$  (maximale Konzentration) und  $t_{1/2}$  (Halbwertszeit) für Diclofenac bzw.  $AUC_{\text{last}}$  (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve vom Zeitpunkt der Medikamentenverabreichung

bis zur letzten messbaren Konzentration),  $t_{\max}$  (Zeitpunkt, zu dem C maximal ist) und  $C_{\max}$  für den Metaboliten 4'-OH-Diclofenac. Die Darstellung der Probandendaten folgt der Einteilung der Probanden in sechs verschiedene Gruppen, die den sechs möglichen allelischen Kombinationen von *Cyp2C9* entsprechen.

Tabelle 18: Pharmakokinetische Daten für Diclofenac bei 20 männlichen Studienteilnehmern. (\*\* 4'-OH-Diclofenac konnte bei diesem Probanden nicht bestimmt werden)

Cyp2C9 Genotyp	Studiencode	Diclofenac			4'-OH Diclofenac		
		Clearance/F [L·h <sup>-1</sup> ]	C <sub>max</sub> [µg·L <sup>-1</sup> ]	t <sub>1/2</sub> [h]	AUC <sub>last</sub> [µg·h·L <sup>-1</sup> ]	t <sub>max</sub> [h]	C <sub>max</sub> [µg·L <sup>-1</sup> ]
*1/*1	1	17,1	3124	0,89	321	2,33	96
	16	19,2	1797	1,85	**	**	**
	25	24,2	1473	0,77	423	3,1	122
<b>Mw</b>		<b>20,2</b>	<b>2131</b>	<b>1,17</b>	<b>372</b>	<b>2,7</b>	<b>109</b>
*1/*2	2	23,6	2331	0,42	126	2,50	94
	22	32,5	910	1,29	402	2,03	100
	23	24,2	1719	1,25	34	2,53	29
	24	34,8	1034	1,18	266	3,17	89
<b>Mw</b>		<b>28,8</b>	<b>1498</b>	<b>1,04</b>	<b>207</b>	<b>2,56</b>	<b>78</b>
*1/*3	7	31,3	1151	0,65	102	5,17	80
	11	16,7	2462	1,37	502	2,08	102
	12	22,7	1498	0,98	86	2,57	39
	20	18,8	2604	1,21	210	1,53	142
<b>Mw</b>		<b>22,4</b>	<b>1929</b>	<b>1,05</b>	<b>225</b>	<b>2,84</b>	<b>91</b>
*2/*2	3	26,7	1554	1,11	380	2,10	101
	18	21,3	2963	1,06	342	2,52	116
	33	41,5	1405	0,27	221	2,08	205
<b>Mw</b>		<b>29,8</b>	<b>1974</b>	<b>0,81</b>	<b>314</b>	<b>2,23</b>	<b>141</b>
*2/*3	4	71,5	278	1,52	281	6,05	98
	9	32,6	734	0,85	813	5,03	540
	19	18,5	2229	0,91	267	2,02	125
<b>Mw</b>		<b>40,9</b>	<b>1081</b>	<b>1,09</b>	<b>453</b>	<b>4,37</b>	<b>254</b>
*3/*3	5	25,7	1418	0,97	306	2,57	119
	13	17,1	1650	1,08	841	2,10	99
	14	26,5	1764	1,28	181	2,58	58
<b>Mw</b>		<b>23,1</b>	<b>1610</b>	<b>1,11</b>	<b>442</b>	<b>2,42</b>	<b>92</b>
<b>Gesamt</b>	<b>Mw</b>	<b>27,3</b>	<b>1704</b>	<b>1,05</b>	<b>321</b>	<b>2,8</b>	<b>124</b>
	(95%CI)	(21,5-33,1)	(1360-2050)	(0,88-1,21)	(217-425)	(2,3-3,4)	(72-176)

### 3.1.1.1 Pharmakokinetik von Diclofenac in Abhängigkeit vom *Cyp2C9*-Genotyp

Die Oralen Diclofenac-Clearances unterschieden sich rund vierfach bei einem Durchschnittswert aller Teilnehmer von 27,3 L/h (95% CI (Vertrauensintervall) 21,5-33,1 L/h). Die durchschnittliche Lag-time (zeitliche Dauer bis zur ersten gemessenen, von Null abweichenden Plasmakonzentration) betrug für Diclofenac 1,22 h (95% CI 0,78-1,66 h).  $C_{\max}$  lag für Diclofenac bei durchschnittlich 1,7 mg/L (95% CI: 1,4-2,1 mg/L), die individuellen Daten unterschieden sich dabei um mehr als den Faktor 10.

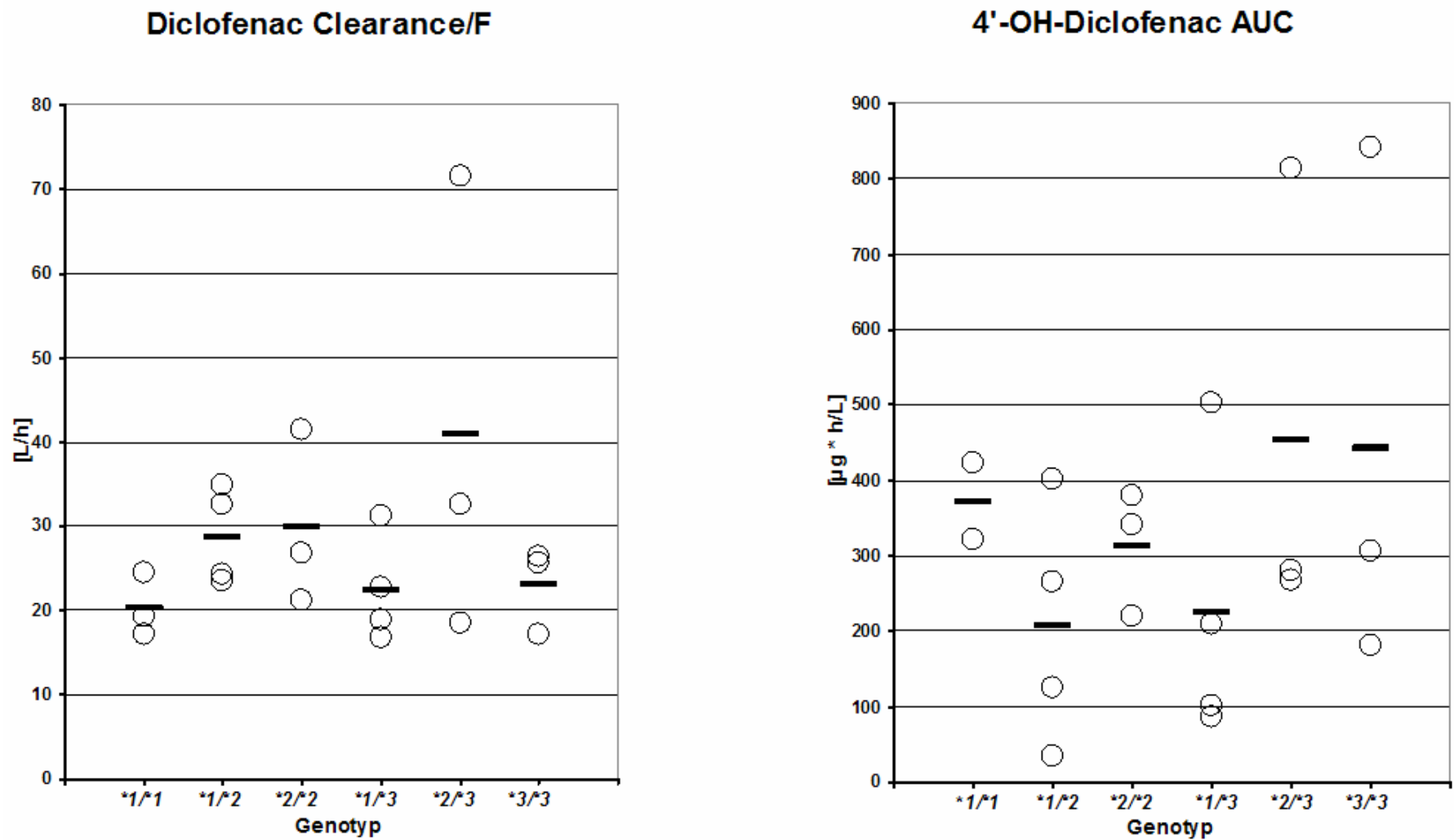


Abbildung 5: Orale Diclofenac-Clearance bzw. AUC von 4'-OH-Diclofenac in Abhängigkeit vom Cyp2C9- Genotyp (Cl/F: Clearance/Orale Bioverfügbarkeit)

Die zeitliche Dauer bis zum Erreichen des Plasmaspitzenpiegels ( $t_{\max}$ ) belief sich im Mittel auf 1,98 h (95% CI 1,5-2,4 h). Der Abfall der Plasmakonzentrationen folgte einer mono-exponentiellen Funktion mit einer Halbwertszeit von 1,05 h (95% CI: 0,88-1,21 h). In der Abbildung 3 sind die individuellen Oral Clearance für die in sechs verschiedene Gruppen aufgeteilten Probanden dargestellt. Weder *Cyp2C9*\*2 noch *Cyp2C9*\*3 übten einen Einfluss auf die pharmakokinetischen Parameter von Diclofenac aus. Die Kreise zeigen die individuellen Oral Clearance, die Querstriche die Clearance-Mittelwerte innerhalb der Gruppen. Dabei fällt auf, dass die im Mittel niedrigsten Diclofenac-Clearances sich sogar bei homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels (*Cyp2C9* \*1/\*1) finden.

### 3.1.1.2 Pharmakokinetik von 4'-OH-Diclofenac in Abhängigkeit vom *Cyp2C9*-Genotyp

Die  $AUC_{\text{last}}$  des Diclofenac-Metaboliten 4'-OH-Diclofenac betrug im Durchschnitt 321  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI: 217-425  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ). Plasmaspitzenpiegel wurden nach durchschnittlich  $t_{\max}$  2,8 h (95% CI 2,3-3,4 h) erreicht und beliefen sich im Mittel auf  $C_{\max}$  124  $\mu\text{g/L}$  (95% CI 72-176  $\mu\text{g/L}$ ). Ein Einfluss des *Cyp2C9*-Genotyps auf die Plasmakonzentrationen des Metaboliten 4'-OH-Diclofenac konnte nicht nachgewiesen werden. In der Abb.5 sind die individuellen  $AUC_{0-\text{last}}$  sowie die *Cyp2C9*-gruppenspezifischen  $AUC_{0-\text{last}}$ -Mittelwerte dargestellt.

### 3.1.2 Pharmakodynamische Parameter von Diclofenac

Die Auswertung der  $\text{Tx B}_2$ - bzw.  $\text{Pg E}_2$ -Konzentrationsverläufe zeigte bei allen Probanden einen Abfall auf Werte nahe der Nachweisgrenze und anschließend einen Wiederanstieg auf oder sogar über das Ausgangsniveau. Entsprechend der Cox-2-Präferenz von Diclofenac war  $\text{Pg E}_2$  länger und stärker unterdrückt. Die zeitliche Dauer, für die nach der Einnahme von Diclofenac die  $\text{Tx B}_2$ -Konzentration  $\leq 50\%$  der Ausgangskonzentrationen bzw. die  $\text{Pg E}_2$ -Konzentration  $\leq 10\mu\text{g/L}$  betrug, die  $\text{Tx B}_2$ - bzw.  $\text{Pg E}_2$ - $AUC_{0-10\text{h}}$  und die  $\text{Tx B}_2$ - und  $\text{Pg E}_2$ -Minimalkonzentrationen  $C_{\min}$  sind in der Tabelle 19 dargestellt. Die durchschnittliche  $\text{Tx B}_2$ -Ausgangskonzentration belief sich auf 90  $\mu\text{g/L}$  (95% CI 73-107  $\mu\text{g/L}$ ), die  $\text{Tx B}_2$ - $AUC_{0-10\text{h}}$  im Mittel auf 998  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 736-1260  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ), für durchschnittlich 2,3 h (95% CI 1,9–2,7 h) lag die  $\text{Tx B}_2$ -Konzentration unter 50% des Ausgangswerts, die geringste Plasma- $\text{Tx B}_2$ -Konzentration betrug durchschnittlich 2,2  $\mu\text{g/L}$  (95% CI 1,3-3,1  $\mu\text{g/L}$ ). Bei allen Probanden ließ sich nach etwa 1-2 h ein deutlicher Abfall der  $\text{Tx B}_2$ -Kon-

zentrationen auf Werte  $\leq 10\%$  des Ausgangswerts feststellen. Die Pg E<sub>2</sub>-Ausgangskonzentration unterschied sich individuell mehr als 15fach und betrug durchschnittlich 85  $\mu\text{g/L}$  (95% CI 51-119  $\mu\text{g/L}$ ), die Pg E<sub>2</sub>-AUC<sub>0-10h</sub> belief sich im Mittel auf 284  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 193-376  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ), für durchschnittlich 4,3 h (95% CI 3,3-5,3 h) lag die Pg E<sub>2</sub>-Konzentration unter 10  $\mu\text{g/L}$  und C<sub>min</sub> im Durchschnitt bei 2,8  $\mu\text{g/L}$  (95% CI 2,4-3,2  $\mu\text{g/L}$ ). Etwa 1 h nach der Einnahme von Diclofenac zeigte sich ein steiler Abfall der Plasma-Pg E<sub>2</sub>-Konzentration, die auch nach 10 h noch nicht wieder vollständig ihren Ausgangswert erreicht hatte. Somit dauerte die Hemmung von Pg E<sub>2</sub> über den Abfall der Diclofenac-Konzentration hinaus an. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich kein Hinweis auf Cyp2C9-Genotyp-bedingte Unterschiede in der Pharmakodynamik von Diclofenac. Dies wird auch ersichtlich anhand der Tx B<sub>2</sub>- und Pg E<sub>2</sub>-Konzentrations-Zeit-Verläufe, die in der Abb.6 für Probanden mit den homozygoten Cyp2C9-Genotypen \*1/\*1, \*2/\*2 und \*3/\*3 anhand der individuellen Probandendaten und der gruppenspezifischen Mittelwerte dargestellt sind.

Tabelle 19: Parameter von Tx B<sub>2</sub> und Pg E<sub>2</sub> als Indikatoren der Cox-1-/Cox-2-Aktivität

CYP2C9 Genotyp	Code	TxB <sub>2</sub>			PgE <sub>2</sub>		
		Dauer [h] von $\geq 50\%$ Hemmung	AUC <sub>0-10h</sub> [ $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ ]	C <sub>min</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )	Konzentration $\leq 10 \mu\text{g/L}$ [h]	AUC <sub>0-10h</sub> [ $\mu\text{g/L}\cdot\text{h}$ ]	C <sub>min</sub> ( $\mu\text{g/L}$ )
*1/*1	1	3,5	1164	2,9	1,7	378	5,6
	16	1,5	1386	8,4	3,7	269	2,5
	25	3,8	385	0,9	6,2	81	2,0
	<b>Mw</b>	<b>2,9</b>	<b>978</b>	<b>4,1</b>	<b>3,9</b>	<b>242</b>	<b>3,4</b>
*1/*2	2	1,8	1111	0,7	3,4	338	3,4
	22	2,5	544	1,2	9,2	35	2,5
	23	1,7	1325	3,9	3,5	303	1,1
	24	1,3	1672	4,6	2,4	490	2,5
	<b>Mw</b>	<b>1,8</b>	<b>1163</b>	<b>2,6</b>	<b>4,6</b>	<b>292</b>	<b>2,4</b>
*1/*3	7	1,9	578	0,9	5,2	443	2,0
	11	2,9	516	1,1	3,3	215	3,3
	12	3,2	639	2,1	3,9	220	2,9
	20	1,8	740	0,3	4,7	78	3,6
	<b>Mw</b>	<b>2,5</b>	<b>618</b>	<b>1,1</b>	<b>4,3</b>	<b>239</b>	<b>3,0</b>
*2/*2	3	1,4	240	0,9	2,4	238	2,6
	18	2,3	1257	1,9	3,0	460	2,8
	33	1,5	2488	3,4	4,7	258	2,0
	<b>Mw</b>	<b>1,7</b>	<b>1329</b>	<b>2,1</b>	<b>3,4</b>	<b>318</b>	<b>2,5</b>
*2/*3	4	2,3	1479	2,6	5,5	90	2,7
	9	3,0	479	2,4	1,4	876	3,8
	19	3,7	1172	0,9	10,2	51	2,9
	<b>Mw</b>	<b>3,0</b>	<b>1043</b>	<b>2,0</b>	<b>5,7</b>	<b>339</b>	<b>3,1</b>
*3/*3	5	1,6	430	0,8	3,7	346	2,4
	13	2,5	826	1,9	3,4	201	2,4
	14	2,0	1535	1,2	4,3	319	2,1
	<b>Mw</b>	<b>2,0</b>	<b>930</b>	<b>1,3</b>	<b>3,8</b>	<b>288</b>	<b>2,3</b>
<b>Mw</b>	<b>2,3</b>	<b>998</b>	<b>2,2</b>	<b>4,3</b>	<b>284</b>	<b>2,8</b>	
(95%CI)		(1,9-2,7)	(736-1260)	(1,3-3,1)	(3,3-5,3)	(193-376)	(2,4-3,2)

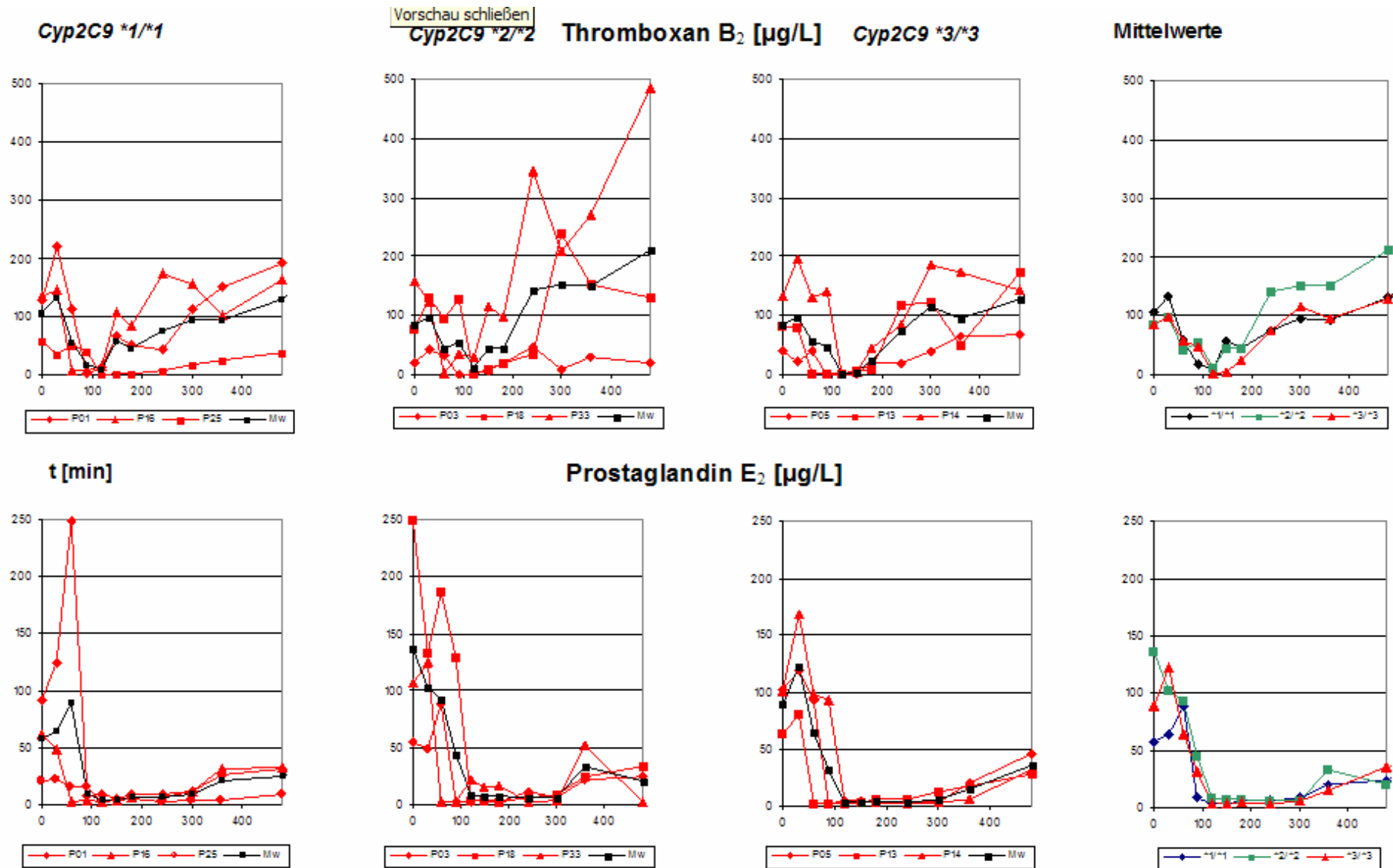


Abbildung 6: TxB<sub>2</sub>- und PgE<sub>2</sub>-Konzentrationen nach Diclofenac-Gabe bei Probanden mit homozygotem Cyp2C9-Genotyp

### 3.2 Ergebnisse für Ibuprofen

#### 3.2.1 Pharmakokinetische Parameter von Ibuprofen und OH-Ibuprofen

In Tabelle 20 sind die individuellen Probandendaten zur Ibuprofen-Pharmakokinetik für racemisches Ibuprofen, die Enantiomere S-(+)-Ibuprofen und R-(-)-Ibuprofen und den Metaboliten OH-Ibuprofen, dargestellt.

Tabelle 20: Pharmakokinetische Daten für Ibuprofen bei 21 männlichen Studienteilnehmern

Cyp2C9 Genotyp	Code	Ibuprofen Razemat			R-Ibuprofen		S-Ibuprofen		OH-Ibuprofen
		Cl/F [L/h]	C <sub>max</sub> [mg/L]	t <sub>1/2</sub> [h]	AUC <sub>pred</sub> [mg · h/L]	C <sub>max</sub> [mg/L]	AUC <sub>pred</sub> [mg · h/L]	C <sub>max</sub> [mg/L]	AUC <sub>last</sub> [mg · h/L]
<b>*1/*1</b>	1	2,60	34,0	3,24	95,5	18,1	126,8	17,8	5,0
	10	3,43	36,3	2,83	61,0	18,3	134,0	15,9	24,8
	16	4,83	33,5	3,39	38,8	12,7	50,6	14,7	7,2
	25	4,32	28,9	3,58	73,3	16,0	102,8	21,9	4,9
	<b>Mw</b>	<b>3,80</b>	<b>33,2</b>	<b>3,26</b>	<b>67,2</b>	<b>16,3</b>	<b>103,6</b>	<b>17,6</b>	<b>10,5</b>
<b>*1/*2</b>	2	2,75	41,8	3,23	152,1	16,7	123,0	17,5	6,6
	22	3,27	36,3	3,24	69,8	16,4	121,7	21,6	15,6
	23	2,44	47,3	5,34	90,4	18,4	153,4	21,5	14,4
	24	4,02	37,9	1,83	58,5	16,3	69,2	18,4	14,5
	<b>Mw</b>	<b>3,12</b>	<b>40,8</b>	<b>3,41</b>	<b>92,7</b>	<b>17,0</b>	<b>116,8</b>	<b>19,8</b>	<b>12,8</b>
<b>*1/*3</b>	7	2,72	41,9	5,20	100,9	23,0	182,1	25,8	16,9
	11	2,28	46,3	4,18	70,0	19,1	112,6	21,4	18,6
	12	2,20	37,4	5,31	100,0	18,9	147,2	22,1	11,4
	20	2,26	49,4	4,23	116,0	25,3	184,9	23,7	4,4
	<b>Mw</b>	<b>2,37</b>	<b>43,8</b>	<b>4,73</b>	<b>96,7</b>	<b>21,6</b>	<b>156,7</b>	<b>23,3</b>	<b>12,8</b>
<b>*2/*2</b>	3	2,58	50,3	1,92	102,4	23,4	128,1	23,8	6,9
	18	2,65	47,9	5,15	105,9	33,5	123,4	29,6	9,3
	33	2,83	44,2	3,80	185,9	17,1	89,1	19,8	16,9
	<b>Mw</b>	<b>2,69</b>	<b>47,5</b>	<b>3,62</b>	<b>131,4</b>	<b>24,7</b>	<b>113,5</b>	<b>24,4</b>	<b>11,0</b>
<b>*2/*3</b>	4	2,74	36,5	3,96	53,4	14,5	115,5	21,3	12,6
	9	3,18	37,2	6,03	70,2	16,0	97,8	20,4	24,0
	19	2,42	42,2	3,00	70,5	17,0	174,5	21,7	13,4
	<b>Mw</b>	<b>2,78</b>	<b>38,6</b>	<b>4,33</b>	<b>64,7</b>	<b>15,8</b>	<b>129,3</b>	<b>21,1</b>	<b>16,7</b>
<b>*3/*3</b>	5	2,03	45,8	3,87	98,0	20,4	169,5	23,1	8,1
	13	1,84	46,2	4,08	72,3	19,1	373,1	39,1	7,7
	14	2,45	38,7	4,89	48,5	14,1	165,0	25,0	6,5
	<b>Mw</b>	<b>2,11</b>	<b>43,6</b>	<b>4,28</b>	<b>72,9</b>	<b>17,9</b>	<b>235,9</b>	<b>29,1</b>	<b>7,4</b>
<b>Mw</b>	<b>2,85</b>	<b>41,0</b>	<b>3,92</b>	<b>87,3</b>	<b>18,8</b>	<b>140,2</b>	<b>22,2</b>	<b>11,9</b>	
(95%CI)	(2,50-3,20)	(38,3-43,7)	(3,46-4,38)	(71,5-103,1)	(16,7-20,9)	(110,9-169,5)	(19,9-24,5)	(9,1-14,7)	

Der Metabolismus von racemischem Ibuprofen und von S-Ibuprofen hängt von Cyp2C9-Genpolymorphismen ab. Die vorliegenden Daten zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Cyp2C9-Genotyp auf der einen und Orale Clearance und C<sub>max</sub> (racemisches Ibuprofen) bzw. AUC und C<sub>max</sub> (S-Ibuprofen) auf der anderen Seite. Die Verstoffwechslung des R-Ibuprofen-Enantiomers ist dagegen nicht vom Cyp2C9-Genotyp abhängig. Der Zusammenhang zwischen Cyp2C9-

Genpolymorphismen und Ibuprofen-Metabolismus basiert somit auf den Auswirkungen auf den Metabolismus des S-Enantiomers

### 3.2.1.1 Pharmakokinetik von racemischem Ibuprofen in Abhängigkeit vom *Cyp2C9*-Genotyp

Die in Tabelle 20 dargestellten individuellen Oralen Clearances von racemischem Ibuprofen unterschieden sich rund 2,5fach bei einem Durchschnittswert aller Teilnehmer von 2,85 L/h (95% CI 2,50-3,20 L/h). Der maximale Plasmaspiegel  $C_{max}$  von racemischem Ibuprofen betrug durchschnittlich 41,0 mg/L (95% CI 38,3-43,7 mg/L), die durchschnittliche Dauer  $t_{max}$  bis zum Erreichen des maximalen Plasmaspiegels 1,93 h (95% CI 1,65-2,21 h). Die Halbwertszeit von racemischem Ibuprofen belief sich im Mittel auf 3,92 h (95% CI 3,46-4,38 h). Aus den Daten wird ersichtlich, dass die Orale Clearance für racemisches Ibuprofen bei Probanden mit dem Genotyp *Cyp2C9* \*3/\*3 nahezu 50% niedriger als bei Trägern des Genotyps *Cyp2C9* \*1/\*1 liegt (im Mittel 2,11 L/h gegenüber 3,80 L/h). Der in Abb. 7 veranschaulichte Zusammenhang zwischen *Cyp2C9*-Genotyp und Ibuprofen-Clearance ist gemäß Jonckheere-Terpstra-Tests statistisch signifikant ( $p=0,008$ ), ebenso der Zusammenhang zwischen  $C_{max}$  und *Cyp2C9*-Genotyp ( $p=0,025$ ). Die Eliminationshalbwertszeiten von racemischem Ibuprofen betragen für den Genotyp *Cyp2C9* \*1/\*1 im Mittel 3,26 h, für *Cyp2C9* \*3/\*3 4,28 h.

### 3.2.1.2 Pharmakokinetik von R-Ibuprofen in Abhängigkeit vom *Cyp2C9*-Genotyp

Im Falle des Enantiomers R-Ibuprofen betrug die durchschnittliche AUC aller Teilnehmer 87,3  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 71,5-103,1  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ). Niedrigste und höchste gemessene AUC unterschieden sich individuell nahezu fünffach.  $C_{max}$  betrug durchschnittlich 18,8 mg/L (95% CI 16,7-20,9 mg/L),  $t_{max}$  im Mittel 1,95 h (95% CI 1,68-2,22 h). Für das R-Enantiomer zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der AUCs bei Trägern der Genotypen *Cyp2C9* \*1/\*1 und \*3/\*3 (67,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  und 72,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ). Die Orale R-Ibuprofen-Clearance der sechs verschiedenen *Cyp2C9*-Genotypgruppen ist in der Abbildung 7 dargestellt. Auch die maximale R-Ibuprofen-Plasmakonzentration  $C_{max}$  unterschied sich zwischen Trägern von *Cyp2C9* \*1/\*1 und \*3/\*3 nur unwesentlich (16,3 mg/L bzw. 17,9 mg/L)

### 3.2.1.3 Pharmakokinetik von S-Ibuprofen in Abhängigkeit vom Cyp2C9-Genotyp

Die durchschnittliche AUC aller Probanden belief sich für das S-Enantiomer auf 140,2  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 110,9-169,5  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ),  $C_{\text{max}}$  betrug durchschnittlich 22,2 mg/L (95% CI 19,9-24,5 mg/L),  $t_{\text{max}}$  im Mittel 2,36 h (95% CI 1,99-2,73 h). Wie weiter oben angedeutet, ist die für das racemische Gemisch gefundene Abhängigkeit der pharmakokinetischen Parameter vom Cyp2C9\*3-Allel auf einen enantioselektiven Einfluss auf S-Ibuprofen zurückzuführen. Die in Tabelle 20 dargestellten Daten zeigen bei Probanden mit Cyp2C9-Genotyp \*3/\*3 eine mehr als doppelt so hohe S-Ibuprofen-AUC als bei Trägern von Cyp2C9 \*1/\*1 (im Mittel 235,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  bzw. 103,6  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ). Der Zusammenhang zwischen AUC und Cyp2C9-Genotyp ist gemäß Jonckheere-Terpstra-Tests statistisch signifikant ( $p=0,046$ ). Die Plasmaspitzenpiegel ( $C_{\text{max}}$ ) unterschieden sich zwischen Trägern der Cyp2C9-Genotypen \*3/\*3 und \*1/\*1 rund 1,7fach (29,1 mg/L vs. 17,6 mg/L), der Zusammenhang zwischen  $C_{\text{max}}$  und Cyp2C9-Genotyp ist gemäß Jonckheere-Terpstra-Tests ebenfalls statistisch signifikant ( $p=0,005$ ).

### 3.2.1.4 Pharmakokinetik von OH-Ibuprofen in Abhängigkeit vom Cyp2C9-Genotyp

Die AUC des Metaboliten OH-Ibuprofen lag im Durchschnitt bei 11,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 9,1-14,7  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ). Verglichen mit der mittleren AUC der Muttersubstanz von 222,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 199,9-245,9  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ) betrug die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve des Metaboliten folglich nur etwa ein Zwanzigstel. Für die AUC von OH-Ibuprofen zeigen die Daten der Tabelle 20 keinen signifikanten Unterschied zwischen den Cyp2C9-Genotypen \*1/\*1 und \*3/\*3. Der maximale OH-Ibuprofen-Plasmaspiegel ( $C_{\text{max}}$ ) betrug für Träger des Genotyps Cyp2C9 \*3/\*3 durchschnittlich nur 0,84 mg/L verglichen mit 1,43 mg/L bei Trägern von Cyp2C9 \*1/\*1. Zwar ist dieser erwartete Trend zwischen Cyp2C9-Genotyp und OH-Ibuprofen statistisch nicht signifikant, dennoch lagen die Plasmakonzentrationen des Metaboliten bei Trägern von Cyp2C9 \*3/\*3 durchschnittlich niedriger als bei den Probanden aller anderen Gruppen. Diese Daten passen zu der Annahme, dass OH-Ibuprofen durch Cyp2C9 gebildet wird.

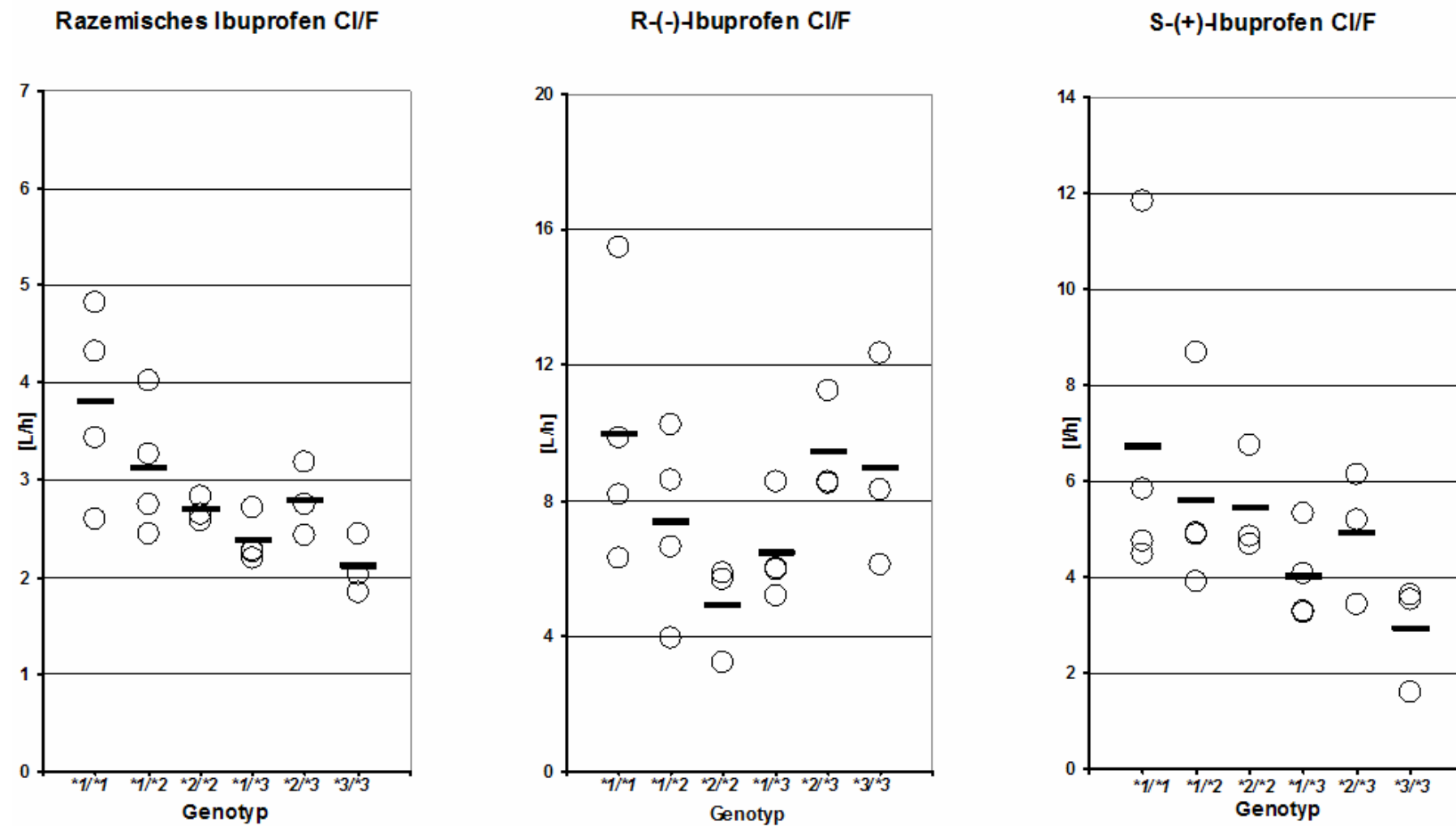


Abbildung 7: Orale Clearances von racemischem Ibuprofen, R-Ibuprofen und S-Ibuprofen in Abhängigkeit vom *Cyp2C9*-Genotyp (CL/F: Clearance/Orale Bioverfügbarkeit)

### 3.2.2 Pharmakodynamische Parameter von Ibuprofen

Die pharmakodynamischen Parameter in Tabelle 21 sind weitgehend wie in Tabelle 19 dargestellt, allerdings wird hier die Dauer, zu der  $Pg E_2$  nach Einnahme von Ibuprofen  $\leq 50\%$  der Ausgangskonzentration betrug, angegeben. Die durchschnittliche  $Tx B_2$ -Ausgangskonzentration betrug  $101 \mu\text{g/L}$  (95% CI 67-135  $\mu\text{g/L}$ ), sie unterschied sich bei den Probanden mehr als dreißigfach. Für im Mittel 8,8 h (95% CI 6,8-10,8 h) lag die  $Tx B_2$ -Konzentration bei  $\leq 50\%$  des Ausgangswert, die  $AUC_{0-10h}$  aller Probanden belief sich im Mittel auf  $188 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 120-256  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ), die durchschnittliche minimale  $Tx B_2$ -Konzentration auf  $1,15 \mu\text{g/L}$  (0,54-1,76  $\mu\text{g/L}$ ). Bei allen Probanden zeigte sich ein deutlicher Abfall der  $Tx B_2$ -Konzentrationen auf Werte unter  $7 \mu\text{g/L}$  nach etwa 1-2 h und eine Hemmung von mehr als 90% im Vergleich zum Ausgangswert. Auch im Falle von  $Pg E_2$  unterschied sich die individuelle Ausgangskonzentration mehr als 20fach, sie lag durchschnittlich bei  $82 \mu\text{g/L}$  (95% CI 50-114  $\mu\text{g/L}$ ). Für durchschnittlich 9,4 h (95% CI 6,7-12,1 h) betrug die  $Pg E_2$ -Konzentration  $\leq 50\%$  der Ausgangskonzentration. Die  $AUC_{0-10h}$  aller Probanden belief sich für  $Pg E_2$  im Mittel auf  $238 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$  (95% CI 172-304  $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ), die durchschnittliche minimale  $Pg E_2$ -Konzentration betrug  $6,72 \mu\text{g/L}$  (95% CI 4,30-9,14). Die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven ( $AUC_{0-10h}$ ) wiesen für den Surrogatparameter  $Tx B_2$  genotypabhängige Unterschiede auf. Sie lagen bei den Gruppen *Cyp2C9*  $*2/*3$  ( $104 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ) und  $*3/*3$  ( $105 \mu\text{g}\cdot\text{h/L}$ ) am niedrigsten. Die Testung mit dem Jonckheere-Terpstra-Test (mit dem Trend *Cyp2C9*  $*1/*1 > *1/*2 > *2/*2 > *1/*3 > *2/*3 > *3/*3$ ) erbrachte einen statistisch signifikanten Trend für den Zusammenhang zwischen niedriger metabolischer Kapazität für Ibuprofen und niedrigen AUCs für  $Tx B_2$  ( $p=0,040$ ).

Darüber hinaus wurden die minimalen  $Tx B_2$ -Konzentrationen ( $C_{min}$ ) als Indikatoren der maximalen Cox-1-Inhibition ausgewertet. Bei Trägern des Genotyps *Cyp2C9*  $*1/*1$  betrug die minimale  $Tx B_2$ -Konzentration im Mittel  $1,35 \mu\text{g/L}$  im Vergleich zu  $0,72 \mu\text{g/L}$  bei *Cyp2C9*  $*2/*3$  und  $0,45 \mu\text{g/L}$  bei *Cyp2C9*  $*3/*3$ . Im Jonckheere-Terpstra-Test erwies sich dieser Zusammenhang als grenzwertig statistisch signifikant ( $p=0,05$ ). Der Zeitraum, zu dem die Cyclooxygenase-1  $\geq 50\%$  gehemmt wurde, war länger bei Trägern langsam metabolisierender Genotypen (Tabelle 21). Im Unterschied zu den Ergebnissen für  $Tx B_2$  zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluss der *Cyp2C9*-Genotypen auf die minimalen Konzentrationen ( $C_{min}$ ) und die  $AUC_{0-10h}$ -Daten von  $Pg E_2$ .

Tabelle 21: Parameter von Tx B<sub>2</sub> und Pg E<sub>2</sub> als Indikatoren der Cox-1-/Cox-2-Aktivität

CYP2C9 Genotyp	Code	TxB <sub>2</sub>			PgE <sub>2</sub>		
		Dauer von ≥50% Hemmung [h]	AUC <sub>0-10h</sub> [µg/L·h]	C <sub>min</sub> (µg/L)	Dauer von ≥50% Hemmung [h]	AUC <sub>0-10h</sub> [µg/L·h]	C <sub>min</sub> (µg/L)
<i>*1/*1</i>	1	8,7	298	2,96	4,6	392	11,01
	10	9,4	152	0,96	8,5	101	5,23
	16	5,3	258	0,43	4,8	243	8,48
	25	9,5	134	1,04	7,4	559	3,60
<b>Mw</b>		<b>8,2</b>	<b>211</b>	<b>1,35</b>	<b>6,3</b>	<b>324</b>	<b>7,08</b>
<i>*1/*2</i>	2	3,4	684	6,34	5,4	345	10,96
	22	5,9	63	0,72	8,6	63	4,13
	23	9,5	175	0,89	8,4	270	4,67
	24	6,6	444	1,08	5,3	419	2,64
<b>Mw</b>		<b>6,4</b>	<b>342</b>	<b>2,26</b>	<b>6,9</b>	<b>274</b>	<b>5,60</b>
<i>*1/*3</i>	7	6,5	190	1,21	5,1	370	5,09
	11	7,4	136	0,77	5,0	180	5,79
	12	5,2	198	1,09	14,5	125	5,79
	20	7,3	129	0,38	4,2	73	4,56
<b>Mw</b>		<b>6,6</b>	<b>163</b>	<b>0,86</b>	<b>7,2</b>	<b>187</b>	<b>5,31</b>
<i>*2/*2</i>	3	9,2	86	0,66	3,1	257	5,49
	18	6,8	74	0,50	6,7	100	3,53
	33	8,0	294	1,54	6,0	382	9,69
<b>Mw</b>		<b>8,0</b>	<b>151</b>	<b>0,90</b>	<b>5,3</b>	<b>246</b>	<b>6,24</b>
<i>*2/*3</i>	4	13,2	194	1,55	15,5	229	5,86
	9	5,1	58	0,28	8,2	63	2,95
	19	24,0	60	0,33	14,0	60	3,07
<b>Mw</b>		<b>14,1</b>	<b>104</b>	<b>0,72</b>	<b>12,6</b>	<b>117</b>	<b>3,96</b>
<i>*3/*3</i>	5	13,2	139	0,75	20,0	234	5,86
	13	10,0	90	0,28	24,0	138	5,40
	14	11,5	85	0,31	19,0	405	27,28
<b>Mw</b>		<b>11,6</b>	<b>105</b>	<b>0,45</b>	<b>21,0</b>	<b>259</b>	<b>12,85</b>
<b>p-Wert (Trend)</b>		<b>n.s.</b>	<b>0,040</b>	<b>0,05</b>	<b>0,02</b>	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>
<b>Mw (95%CI)</b>		<b>8,8 (6,8-10,8)</b>	<b>188 (120-256)</b>	<b>1,15 (0,54-1,76)</b>	<b>9,4 (6,7-12,1)</b>	<b>238 (172-304)</b>	<b>6,72 (4,30-9,14)</b>

Allerdings erwies sich die zeitliche Dauer der ≥50%-Pg E<sub>2</sub>-Synthesehemmung bei Trägern der Cyp2C9-Genotypen *\*2/\*3* und *\*3/\*3* mit durchschnittlich 12,6 h bzw. 21 h als signifikant länger (p=0,02) als bei Trägern des Wildtypallels Cyp2C9 *\*1/\*1*.

In Abbildung 8 sind für alle Cyp2C9-Genotypgruppen die mittleren Prostanoid-Konzentrations-Zeit-Verläufe innerhalb der ersten zehn Stunden nach Ibuprofen-Gabe dargestellt. Gesondert gegenübergestellt sind die Daten von Probanden mit Genotyp Cyp2C9 *\*1/\*1* und *\*3/\*3* anhand der individuellen Probandendaten und als direkter Vergleich der aus den individuellen Daten resultierenden Mittelwerte. Im Falle von Tx B<sub>2</sub> zeigte sich eine verlängerte Synthesehemmung bei Trägern der Genotypen Cyp2C9 *\*2/\*3* und *\*3/\*3*, im Falle von Pg E<sub>2</sub> bei den Genotypen Cyp2C9 *\*1/\*3*, *\*2/\*3* und *\*3/\*3*.

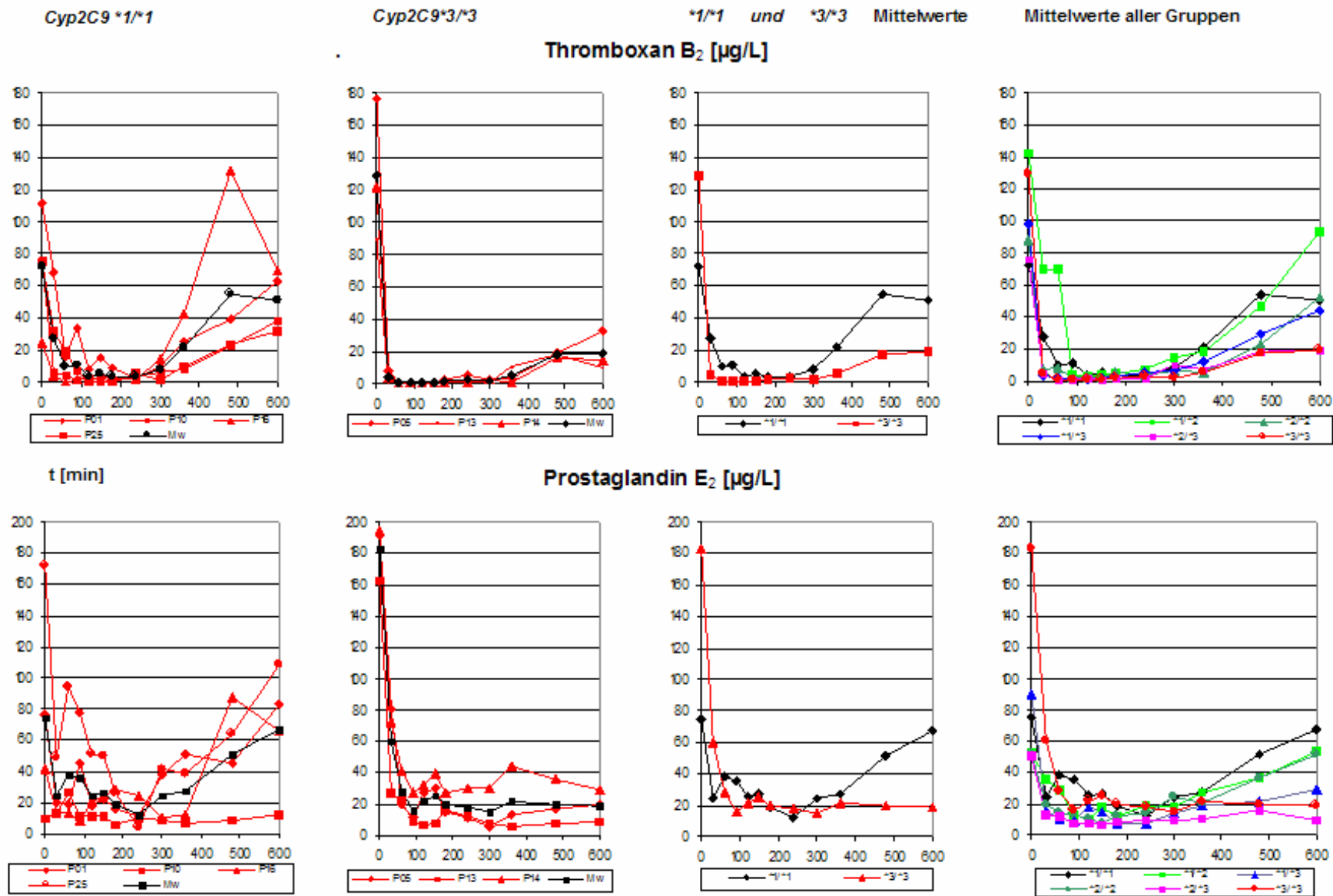


Abbildung 8: TxB<sub>2</sub> und PgE<sub>2</sub>-Konzentrations-Zeit-Verläufe nach Ibuprofen-Gabe in Abhängigkeit vom Cyp2C9-Genotyp

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Diclofenac-Ergebnisse

#### 4.1.1 Auswirkungen von *Cyp2C9*-Genpolymorphismen auf den Diclofenac-Metabolismus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen keinerlei Auswirkungen der *Cyp2C9*-Allele \*2 und \*3 auf den Diclofenac-Metabolismus. Eine formale *post hoc* Power Analyse ergab, dass die Variabilität bei den Probanden in dieser Studie höher lag als anhand der AUC-Daten aus der Literatur (Macia et al., 1995) hätte erwartet werden können. Die durchschnittliche AUC aller Probanden betrug 2066 µg·h/L (SD 604 µg·h/L). Die Fallzahlschätzung für die Genotyp-Gruppen basierte auf der Annahme, dass erst Unterschiede in der Clearance oder AUC von ca. 1:2 zwischen den langsamsten und schnellsten Genotyp-Gruppen (*Cyp2C9* \*3/\*3 versus \*1/\*1) in eine klinisch relevante Anpassung der Dosierung münden können. Zur Feststellung solch eines Unterschieds in den mittleren AUCs wurde die durchschnittliche AUC in der nicht genotypisierten Bevölkerung aus einer Kinetik-Studie mit der dazugehörigen Standardabweichung zugrunde gelegt (Macia et al., 1995). Hieraus ergab sich, dass mit einer Power (Teststärke) von 90% und einem Fehler 1.Art (Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$ ) von 5% drei Probanden pro Gruppe bereits ausreichend gewesen wären.

Ein genetischer Effekt auf die Orale Clearance sollte sich als Trend zeigen, bei dem homozygote Träger des Wildtypallels die höchste, heterozygote Träger eine mittlere und homozygote Träger der Allelvarianten die niedrigste Clearance aufweisen. Ein solcher Trend ließ sich jedoch nicht erkennen. Unter allen Gruppen zeigten homozygote Träger des Wildtypallels sogar die im Durchschnitt niedrigste Orale Clearance.

##### 4.1.1.1 Vergleich der gefundenen Daten mit anderen *in vivo*-Untersuchungen

Die erhobenen Daten stimmen gut mit den Ergebnissen aus anderen, kürzlich abgeschlossenen, klinischen Studien überein. So konnten Shimamoto et al. ebenfalls keine Unterschiede in der Diclofenac-Clearance bei sechs heterozygoten Trägern der *Cyp2C9*-Allelkombination \*1/\*3 im Vergleich zu sechs homozygoten Trägern der Allelkombination \*1/\*1 (Shimamoto et al., 2001) nach Verabreichung einer Dosis von

50 mg Diclofenac (Voltaren, Novartis Pharma, Osaka, Japan) feststellen. Die vorliegende Arbeit ergänzt dieses Ergebnis noch um die Daten von Probanden mit den seltener zu findenden Genotypen *Cyp 2C9* \*2/\*2, \*2/\*3 und vor allem \*3/\*3. Gleichermäßen fand eine weitere Studie von Morin et al. keine signifikanten Unterschiede zwischen Trägern der *Cyp2C9* \*1/\*1-Allelkombination im Vergleich zu heterozygoten Trägern von Allel \*2 und \*3 (Morin et al., 2001), obwohl die Autoren beobachteten, dass die durchschnittliche Clearance von Individuen mit dem Genotyp \*1/\*3 (n=4) nur 60% und die der Träger der Allelkombination \*1/\*2 (n=3) etwa 80% der für den Wildtyp \*1/\*1 bestimmten Clearance betrug. Eine weitere Studie von Dorado et al. beschrieb ein leichtes, statistisch aber nicht signifikantes Absinken des Metabolisierungsquotienten 4'-OH-Diclofenac/ Diclofenac bei heterozygoten Trägern der Allele \*2 und \*3 im Vergleich zu Trägern der Allelkombination \*1/\*1 (Dorado et al., 2001). Alle an dieser Stelle aufgeführten Daten basieren allerdings auf dem Vergleich von heterozygoten Trägern der *Cyp2C9-Allele* \*2 oder \*3 mit homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels. Obwohl ein kodominanter Erbmodus für Cytochrom P450-Enzyme wie *Cyp2C9* nachgewiesen werden konnte, ist die Teststärke von Studien, die auf der Untersuchung allein von heterozygoten Probanden basieren, im Vergleich zur vorliegenden, die auch homozygote Träger (*Cyp2C9* \*2/\*2 und \*3/\*3) berücksichtigt, niedriger. Die vorliegenden Daten werden durch eine Untersuchung von Yasar et al. bestätigt, die ebenfalls keinen Einfluss der *Cyp2C9-Allele* \*2 und \*3 unter anderem bei einem homozygoten Träger der Allelkombination *Cyp2C9* \*3/\*3 und vier heterozygoten *Cyp2C9* \*2/\*3-Trägern auf den Metabolismus einer Einzeldosis Diclofenac nachweisen konnten (Yasar et al., 2001). Die Daten einer Pharmakokinetik-Studie von Morin et al., die die Probanden 15 Minuten nach Medikamenteneinnahme ein standardisiertes Frühstück zu sich nehmen ließen, zeigten eine große interindividuelle Schwankungsbreite (mehr als 24fach) in der Lag-time von Diclofenac (Morin et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit (die Probanden durften erst vier Stunden nach der Einnahme von Diclofenac essen) fanden sich demgegenüber deutlich geringere (maximal 8fache) individuelle Schwankungen der Lag-time.

#### **4.1.1.2 Denkbare Ursachen für die Diskrepanz zwischen *In vitro*- und *In vivo*-Daten**

Eine Vielzahl von *In-vitro*-Studien konnte nachweisen, dass *Cyp2C9* nahezu exklusiv die Bildung von 4'-OH-Diclofenac katalysiert (Tang et al., 1999; Mancy et al., 1999;

Leemann et al., 1993; Bort et al., 1999). Für die Cyp2C9-katalysierte 4'-Hydroxylierung lag die Michaeliskonstante  $K_m$  (Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit) besonders niedrig, nämlich in derselben Größenordnung wie die Diclofenac-Plasmaspiegel nach Gabe einer therapeutischen Dosis Diclofenac. Hierin zeigt sich eine offensichtliche Diskrepanz zu den Daten aus den weiter oben angeführten klinischen Studien, die keinen Anhalt für einen Einfluss von Cyp2C9-Polymorphismen auf den Diclofenac-Metabolismus liefern. Drei mögliche Erklärungen für diese Diskrepanz sollen daher an dieser Stelle diskutiert werden.

Entweder handelt es sich bei Cyp2C9 nicht um die klinisch relevante Diclofenac-4'-Hydroxylase beim Menschen. Diese Vermutung lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht ausschließen. Möglicherweise sind die Konzentrationen von Diclofenac in der Leber signifikant höher als die in dieser Arbeit gemessenen Plasmakonzentrationen. In diesem Fall könnten auch andere Enzyme oder Isoenzyme von CYP2C, obwohl sie eigentlich eine geringere Affinität zu Diclofenac haben, maßgeblich beteiligt sein.

Oder zweitens, Träger langsamer Cyp2C9-Allele weisen eine defiziente 4'-Hydroxylierung von Diclofenac auf, diese führt jedoch nicht zu einer verringerten Diclofenac-Clearance. Es ist denkbar, dass die 4'-Hydroxylierung zwar über CYP2C9 mediiert wird, der Metabolit aber schnell glukuronidiert wird und damit hauptsächlich im Urin (und nicht im Plasma) vorliegt. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht beurteilt werden, da Diclofenac und 4'-OH-Diclofenac nicht im Sammelurin quantifiziert wurden. Unter dieser Annahme müssten Träger des Genotyps Cyp2C9 \*1/\*1 im Urin einen höheren Metabolisierungsquotienten (4'-OH-Diclofenac/ Diclofenac) aufweisen als Träger des Genotyps Cyp2C9 \*3/\*3. In den Plasmakonzentrationen der Muttersubstanz und vor allem des 4'-Hydroxy-Metaboliten zeigten sich dagegen nur geringe Unterschiede

Quantitativ muss sich eine Einschränkung der 4'-Hydroxylierung nicht zwingend auf die Clearance von Diclofenac auswirken. Aus einer Untersuchung von Stierlin und Faigle mit radioaktiv markiertem Diclofenac und seinen Metaboliten in Urin und Galle ging hervor, dass 4'-OH-Diclofenac zwar den bedeutendsten ausgeschiedenen Metaboliten darstellt, dieser aber dennoch nur 40% der Radioaktivität der Muttersubstanz ausmacht (Stierlin und Faigle, 1979).

Eine dritte mögliche Erklärung dafür, dass sich keine Auswirkungen von *Cyp2C9*-Genpolymorphismen auf die Pharmakokinetik und die Wirkung von Diclofenac feststellen ließen, liefert die Annahme, dass substratspezifisch unterschiedliche Auswirkungen dieser Polymorphismen, insbesondere der Leucin359-Variante, bestehen. Zu dieser Hypothese passt die Feststellung, dass *Cyp2C9* offenbar zwei unterschiedliche Substratbindungsregionen (He et al., 1999) besitzt. Der Ort, an dem beim *Cyp2C9-Allel* \*3 eine Aminosäure substituiert ist, liegt nahe einer bekannten Substraterkennungsregion (Gotoh, 1992). Insofern ließe sich spekulieren, dass die Leucin359 Variante in erster Linie nur eine der beiden Substratbindungsregionen betrifft und der Diclofenac-Metabolismus aus diesem Grund unbeeinträchtigt bleibt. Diese Annahme ist bislang noch nicht experimentell bestätigt worden. Tatsächlich zeigten *In-vitro*-Studien, die die Effekte der *Cyp2C9* Leucin359-Variante untersuchten, für unterschiedliche Substrate auch unterschiedliche Auswirkungen. Für das Substrat Diclofenac ergab sich im Vergleich des *Cyp2C9*\*1-Wildtypallels mit der Leucin359-Variante nur ein 3facher Unterschied von  $K_m$  und der intrinsischen Clearance ( $V_{max}/K_m$ ). Demgegenüber fanden sich für die Substrate S-Warfarin, Mefenaminsäure, Flurbiprofen und Tolbutamid zum Teil erheblich größere Abweichungen von  $K_m$  und intrinsischer Clearance zwischen Wildtypallel und *Cyp2C9*\*3 (Takanashi et al., 2000; Yamazaki et al., 1998; Takanashi et al., 1998, Aithal et al., 2000). Auf der anderen Seite zeigten sich für die Substrate Phenytoin, Piroxicam und Tenoxicam (Takanashi et al., 1998) sogar geringere Unterschiede von  $K_m$  zwischen den *Cyp2C9*-Enzymvarianten und den Wildtypenzymen als für Diclofenac, obwohl zumindest im Falle von Phenytoin in mehreren Studien (Kidd et al., 1999; Odani et al., 1997) gezeigt werden konnte, dass die *in vivo*-Pharmakokinetik von *Cyp2C9*-Polymorphismen abhängt. Hinsichtlich der *Cyp2C9*\*2-Allelvariante wurden ähnliche  $K_m$ -Werte für die polymorphen Enzyme und das Wildtypallel in Bezug auf die Diclofenac-, Warfarin- und Laureat-Hydroxylierung berichtet (Crespi und Miller, 1997). Folglich existiert eine substratabhängig unterschiedliche Auswirkung der Aminosäurepolymorphismen. Die klinischen Auswirkungen der *Cyp2C9*\*2- und *Cyp2C9*\*3-Aminosäurevarianten können gegenwärtig nicht akkurat aus den *In-vitro*-Daten vorhergesagt werden.

#### **4.1.2 Auswirkungen von Cyp2C9-Genpolymorphismen auf die Diclofenac-Pharmakodynamik**

Die pharmakokinetischen Ergebnisse werden ergänzt durch Daten aus der Messung von etablierten Surrogatparametern, welche die pharmakodynamische Aktivität von NSAIDs im menschlichen Gewebe widerspiegeln. Sie zeigen keinerlei Auswirkungen von Cyp2C9-Polymorphismen und bestätigen somit die Ergebnisse der pharmakokinetischen Analyse. Mithilfe der Untersuchung der Surrogatparameter kann geschlossen werden, dass abhängig vom Cyp2C9-Genotyp unterschiedlich wirksame aktive Diclofenac-Metaboliten gebildet werden, da jegliche aktiven Metaboliten im Plasma sich auf die Konzentration der Prostaglandine auswirken müssten. Ohnehin konnte im Tierversuch bei Ratten und Mäusen sowie *in vitro* durch Quantifizierung der Prostaglandinsynthesehemmung gezeigt werden, dass der Hauptmetabolit 4'-OH-Diclofenac lediglich 1/30 bis 1/40 der Aktivität seiner Muttersubstanz aufweist (Maier et al., 1979; Menasse et al., 1978), und dass alle übrigen Diclofenac-Metaboliten, die zudem nur eine sehr geringe Konzentration im Plasma aufweisen, eine äußerst geringe pharmakologische Aktivität besitzen. Bei allen Probanden unserer Studie konnte ein deutlicher Abfall der Plasmaspiegel von Tx B<sub>2</sub> und Pg E<sub>2</sub> festgestellt werden, der die Hemmung von Cox-1 bzw. Cox-2 anzeigt.

##### **4.1.2.1 Besonderheiten der Tx B<sub>2</sub>-Konzentrationsverläufe und deren mögliche Ursachen**

Auffällig war, dass sich bei einigen Probanden die Tx B<sub>2</sub>-Konzentrationen nach dem Abklingen der Diclofenac-induzierten Synthesehemmung sogar über die Ausgangskonzentrationen hinaus erholten (Abb.6). Allerdings kann mithilfe des Studiendesigns der vorliegenden Arbeit nicht unterschieden werden, ob dies auf einen zirkadianen Rhythmus der Thromboxan-Synthese (Vacas et al., 1991) oder ein hypothetisches Rebound-Phänomen (Vial et al., 1991; Seppälä et al., 1983) nach Gabe von NSAIDs zurückzuführen ist. Vacas et al. diskutierten zirkadianen Rhythmen geschuldete Veränderungen der Thromboxan-Synthese für den Zeitraum zwischen 1.30 h und 3.30 h nachts. Diese Beobachtung kann anhand der vorliegenden Daten insofern nicht nachvollzogen werden, als zwischen 18 h des ersten und 8 h des zweiten Studientages keine Blutentnahmen stattfanden. Außerdem zeigte sich die von uns beschriebene überschießende Erholung der Tx B<sub>2</sub>-Konzentrationen über die Ausgangskonzentrationen hinaus ab etwa fünf bis sieben Stunden nach

Studienbeginn, also am frühen Nachmittag. Sie lag somit außerhalb des von Vacas et al. untersuchten zeitlichen Fensters. Die von Vial et al. beschriebene Rebound-Erhöhung von Tx B<sub>2</sub> wurde, anders als in der vorliegenden Arbeit, nicht fünf bis sieben Stunden nach einer einmaligen Einnahme von Diclofenac, sondern 14 Tage nach Absetzen eines irreversiblen Cyclooxygenasehemmers (Acetylsalicylsäure), den die Probanden zuvor über eine Woche hinweg eingenommenen hatten, gefunden. Zudem wurde der Tx B<sub>2</sub>-Rebound im Urin nachgewiesen, wohingegen die Daten der vorliegenden Studie auf Plasmaspiegeln von Tx B<sub>2</sub> beruhen (Vial et al., 1991). Auch Seppälä et al. wiesen eine überschießende Erholung der Tx B<sub>2</sub>-Werte erst sieben Tage nach Absetzen eines zuvor über sieben Tage eingenommenen Nichtsteroidalen Antiphlogistikums (Indometacin) im Urin nach (Seppälä et al., 1983).

#### **4.1.2.2 Hemmung der Cyclooxygenase-Isoenzyme durch Diclofenac**

Der Vergleich der Erholung der Tx B<sub>2</sub>- und Pg E<sub>2</sub>-Synthese anhand der in Abb. 6 dargestellten Konzentrations-Zeit-Verläufe zeigt, dass Diclofenac in stärkerem Ausmaß die Pg E<sub>2</sub>-Synthese unterdrückt. Diese Beobachtung lässt sich als bevorzugte Hemmung der Cyclooxygenase-2 durch Diclofenac interpretieren, die bereits an anderer Stelle (Warner et al., 1999) beschrieben wurde. Auch eine Anreicherung von Diclofenac in den Lymphozyten könnte zur prolongierten Unterdrückung der Pg E<sub>2</sub>-Synthese beitragen.

## **4.2 Diskussion der Ibuprofen-Ergebnisse**

### **4.2.1 Auswirkungen von Cyp2C9-Genpolymorphismen auf den Ibuprofen-Metabolismus**

Aufgrund der Ergebnisse einer *In-vitro*-Studie von Hamman et al. über den Ibuprofen-Metabolismus durch Cyp2C-Enzyme, in der die Autoren eine verringerte Ibuprofen-Clearance für Träger des Cyp2C9\*2-Allels diskutierten (das Allel Cyp2C9\*3 wurde nicht untersucht), konnte ein Effekt von genetischen Cyp2C9-Polymorphismen auf die Clearance von Ibuprofen angenommen werden (Hamman et al., 1997). Eine klinische Bestätigung dieser *In-vitro*-Daten war bisher noch nicht erfolgt. Die pharmakokinetischen und -dynamischen Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass genetische Cyp2C9-Polymorphismen *in vivo* eine signifikante Auswirkung auf die Ibuprofen-Clearance haben. Diese lag bei Trägern der schnell metabolisierenden Allelkombination Cyp2C9 \*1/\*1 gegenüber Trägern des langsamen Cyp2C9 \*3/\*3-

Genotyps im Falle razemischen Ibuprofens 1,8fach und für das rechtsdrehende S-Enantiomer sogar 2,3fach höher. Die Auswirkungen der *Cyp2C9*-Polymorphismen auf die Pharmakokinetik erwiesen sich als enantiospezifisch für S-Ibuprofen. Bezüglich der Pharmakodynamik zeigten sich die Auswirkungen der *Cyp2C9*-Polymorphismen besonders deutlich im Hinblick auf die Hemmung der Cox-1 (Abb.8). Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass Träger der langsamen *Cyp2C9*-Genotypen nach Einnahme einer Standarddosis Ibuprofen in besonderer Weise von unerwünschten Nebenwirkungen gefährdet sind. Für das kürzlich auf dem Markt erschienene reine S-Enantiomer von Ibuprofen sind durch den (verglichen mit dem herkömmlichen Razemat) größeren Einfluss von *Cyp2C9* auf die Metabolisierung noch gravierendere Auswirkungen der *Cyp2C9*-Enzym polymorphismen anzunehmen.

Eine Untersuchung aus dem Jahre 1999 konnte nachweisen, dass in der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland jährlich fast eine Viertelmilliarde DM zur Behandlung gastrointestinaler NSAID-Nebenwirkungen bei geschätzt 1100 bis 2200 NSAID-zuordenbaren Todesfällen (unter ca. 73 Millionen Versicherten) investiert werden (Bolten et al., 1999). Im selben Jahr stand Ibuprofen unter den am häufigsten verordneten Nichtsteroidalen Antiphlogistika mit 113 Millionen verschriebenen Tagesdosen an zweiter Stelle (Schmidt, 2001). Zwar stellt Ibuprofen nach allgemeiner Ansicht ein vergleichsweise nebenwirkungsarmes Nichtsteroidales Antiphlogistikum dar, das in vielen Ländern auch rezeptfrei erhältlich ist. Dennoch weist es neben den von Bolten et al. untersuchten unerwünschten Wirkungen im Gastrointestinaltrakt auch die übrigen klassischen Nebenwirkungen der NSAIDs auf, z.B. Verschlechterung der Nierenfunktion oder erhöhtes Risiko für Herzversagen aufgrund von vermehrter Natriumretention.

Unter Kaukasiern gibt es etwa 1% Träger des homozygoten Genotyps *Cyp2C9* \*3/\*3 und zusammen 16% Träger der heterozygoten Genotypen *Cyp2C9* \*1/\*3 und *Cyp2C9* \*2/\*3 (Scordo et al., 2001), die eine Prädisposition für das Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen aufzuweisen scheinen. Angesichts der großen Verbreitung polymorpher *Cyp2C9*-Enzyme erschließt sich, dass eine Dosisindividualisierung medizinischen und ökonomischen Nutzen durch die Verbesserung der Sicherheit der Arzneitherapie und die Verringerung von Kosten, die durch Nebenwirkungen der Arzneitherapie entstehen, erbringen könnte. Die Ergebnisse der für die Dosisindividualisierung notwendigen einmaligen Genotypisierung, darin der

Bestimmung der Blutgruppe vergleichbar, sind lebenslang gültig. Zu bedenken ist, dass eine Genotypisierung von *Cyp2C9* eine Dosisindividualisierung nicht nur für die Behandlung mit Ibuprofen, sondern auch mit dem Antiepileptikum Phenytoin, dem Vitamin K-Antagonisten Warfarin, mit den Oralen Antidiabetika Tolbutamid, Glibenclamid, Glipizid und Nateglinid sowie dem selektiven Cox-2-Hemmer Celecoxib, dessen Metabolismus in vivo ebenfalls von *Cyp2C9*-Polymorphismen abhängt (Kirchheiner et al., 2003), erlaubt.

#### **4.2.1.1 Besonderheiten der Pharmakokinetik (Konversion von R-Ibuprofen zu S-Ibuprofen)**

Auffällig an der Pharmakokinetik von Ibuprofen ist die Konversion des R-Enantiomers in die S-Form. Wird diese Umwandlung nicht mitbedacht, so wird die totale Clearance von S-Ibuprofen unterschätzt. Aus früheren Studien ist bekannt, dass durchschnittlich 60% von R-Ibuprofen in S-Ibuprofen umgewandelt werden. Lötsch et al. konnten kürzlich nachweisen, wie dieses Wissen in die pharmakokinetische Analyse razemischen Ibuprofens einbezogen werden kann (Lötsch et al., 2001). Der von ihnen präsentierte Ansatz ist unter der Annahme einer linearen Pharmakokinetik gleichbedeutend mit einem Korrekturfaktor von 1,6 für die S-Ibuprofen-Clearance. Die in Tabelle 20 und im Text angegebenen Daten wurden nicht um diesen Faktor korrigiert.

#### **4.2.2 Auswirkungen von *Cyp2C9*-Genpolymorphismen auf die Ibuprofen-Pharmakodynamik**

Die Auswirkungen der *Cyp2C9*-Polymorphismen auf die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Prostanoiden zeigen sich, wie in Abbildung 8 dargestellt, besonders deutlich im Hinblick auf die Hemmung von Tx B<sub>2</sub>. Diese Beobachtung passt zur vorbeschriebenen Klassifikation von Ibuprofen als präferentiell Inhibitor der Cox-1 (Vane und Botting, 1995). Die maximale Hemmung der Prostanoid-Synthese zeigte die Tendenz, invers mit der (durch den *Cyp2C9*-Genotyp festgelegten) enzymatischen Aktivität zu korrelieren. Im Fall von Tx B<sub>2</sub> (Cox-1) zeigte sich dieser Trend bei allen Genotypen und konnte in der Auswertung für C<sub>min</sub>, die zum Beispiel einen möglichen Effekt von Ibuprofen auf die Thrombozytenaggregation widerspiegelt, und die AUC (Tab.22) bestätigt werden. Eine mögliche Begründung dafür, weswegen der Zusammenhang zwischen *Cyp2C9*-Polymorphismen und Prostanoid-Synthesehemmung weniger eindeutig ausfällt als bei den pharmakokinetischen

Daten, könnte darin bestehen, dass es auch auf der pharmakodynamischen Seite eine hohe genetische Variabilität gibt, z.B. Polymorphismen der Cox-Enzyme (Halushka et al., 2003).

#### 4.2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass keine Unterschiede in den Diclofenac- und 4'-OH-Diclofenac-Pharmakokinetiken in Abhängigkeit von Cyp2C9-Aminosäurepolymorphismen entdeckt werden konnten, und dass diese Feststellung durch valide Marker der pharmakodynamischen Aktivität von Diclofenac bestätigt wurde. Die Frage, ob tatsächlich andere Enzyme als Cyp2C9 den relevanten Diclofenac-Metabolismus *in vivo* katalysieren, oder ob die Cyp2C9-Aminosäurevarianten unterschiedliche Wirkungen auf unterschiedliche Substrate haben, wird durch weiterführende molekulare und klinisch-pharmakologische Untersuchungen geklärt werden müssen. Eine Verbesserung der Pharmakotherapie mit Diclofenac durch routinemäßige Cyp2C9-Genotypisierung ist den vorliegenden Ergebnissen zufolge nicht zu erwarten.

Im Unterschied dazu wird die Ibuprofen-Clearance *in vivo* signifikant durch genetische Cyp2C9-Polymorphismen beeinflusst. Träger der schnell metabolisierenden Allelkombination Cyp2C9 \*1/\*1 wiesen eine 1,8fach höhere Clearance von racemischem Ibuprofen auf als Träger des langsamen Cyp2C9 \*3/\*3-Genotyps, die Clearance für das rechtsdrehende S-Enantiomer lag sogar 2,3fach höher. Die Auswirkungen der Cyp2C9-Polymorphismen auf die Pharmakokinetik sind enantio-spezifisch für S-Ibuprofen. Die pharmakodynamischen Auswirkungen der Cyp2C9-Polymorphismen zeigten sich besonders deutlich im Hinblick auf die Hemmung der Cox-1.

Die vorliegenden Daten legen nahe, dass Träger der langsamen Cyp2C9-Genotypen ein höheres Risiko haben, nach der Einnahme einer Standarddosis Ibuprofen unerwünschte Nebenwirkungen zu erleiden. Inwieweit aber die Wirksamkeit und Nebenwirkungsrate von Ibuprofen bei Patienten tatsächlich von CYP2C9-Polymorphismen abhängt, kann nicht allein aus der vorliegenden Studie, die auf der Bestimmung von Surrogatparametern basiert, geschlossen werden. Möglicherweise könnten epidemiologische Studien eine Assoziation zwischen der Inzidenz akuter gastrointestinaler Blutungen oder akuten oder chronischen Nierenversagens und der Einnahme von Nichtsteroidalen Antiphlogistika durch Patienten, die genetische Polymorphismen von Cyp2C9 aufweisen, zeigen.

**Literaturverzeichnis**

- Abramson SR, Weissmann G. The mechanisms of action on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Rheum* 1989; 32, 1-9.
- Adams SS, Bresloff P, Mason CG. Pharmacological differences between the optical isomers of ibuprofen: Evidence for the metabolic inversion of the (-) isomer. *J Pharm Pharmacol* 1976; 28, 256-257.
- Aithal GP, Day CP, Leathart JB, Daly AK. Relationship of polymorphism in CYP2C9 to genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatitis. *Pharmacogenetics* 2000; 10(6), 511-518.
- Avgerinos A, Hutt AJ. Interindividual variability in the enantiomeric disposition of ibuprofen following the oral administration of the racemic drug to healthy volunteers. *Chirality* 1990; 2, 249-256.
- Aynacioglu AS, Brockmüller J, Bauer S, Sachse C, Guzelbey P, Ongen Z, Nacak M, Roots I. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48(3), 409-415.
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102, 840-845.
- Bertz RJ und Grannemann GR. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clin Pharmacokinet* 1997; 32, 210-258
- Bhasker CR, Miners JO, Coulter S, Birkett DJ. Allelic and functional variability of cytochrome P450C9. *Pharmacogenetics* 1997; 7, 51-58.
- Bird ED und Schwalbe jr. FC. Prolonged hypoglycemia secondary to tolbutamide. *Ann Intern Med* 1965; 62, 110-112.
- Boelsterli UA, Zimmermann HJ, Kretz-Rommel. Idiosyncratic liver toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs: molecular mechanisms and pathology. *Crit Rev Toxicol* 1995; 25, 207-235.
- Bolten WW, Lang B, Wagner AV, Krobot KJ. Konsequenzen und Kosten der NSA-Gastropathie in Deutschland. *Akt Reumatol* 1999; 24, 127-134.
- Bonnabry P, Leemann T, Dayer P. Role of human liver microsomal CYP2C9 in the biotransformation of lornoxicam. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 49(4), 305-308.
- Bort R, Mace K, Boobis A, Gomez-Lechon MJ, Pfeifer A, Castell J. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol* 1999; 58(5), 787-796.
- 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.
- Cairns J, Overbaugh J, Miller S. The origin of mutants. *Nature* 1988; 335, 142-145.
- Chesne C, Guyomard C, Guillouzo A, Schmid J, Ludwig E, Sauter T. Metabolism of Meloxicam in

- human liver involves cytochromes P450C9 and 3A4. *Xenobiotica* 1998: 28(1), 1-13.
- 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(3), 203-210.
- Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998: 104(5), 413-421.
- Davies NM. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen: the first 30 years. *Clin Pharmacokinet* 1998: 34, 101-154.
- Day RO, Williams K, Graham GG, Lee EJ, Knihinicki RD, Champion GD. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in synovial fluid. *Clin Pharmacol Ther* 1988: 43, 480-487.
- De Morais SMF, Schweikl H, Blaisdell J, Goldstein JA. Gene structure and upstream regulatory regions of human CYP 2C9 and CYP 2C18. *Biochem Biophys Res Commun* 1993: 194, 194-201.
- De Waziers I, Cugnenc PH, Leroux J-P, Beaune PH. Cytochrome P450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 1990: 253, 387-393.
- Dorado R, Norberto MJ, Berecz R, Martinez M, De la Rubia M, Yasar Ü. Cyp2C9 genotype and diclofenac hydroxylation in a Spanish population. *Pharmacology and toxicology* 2001: 89, 102.
- Evans AM, Nation RL, Sansom LN, Bochner F, Somogyi AA. Effect of racemic ibuprofen dose on the magnitude and duration of platelet cyclo-oxygenase inhibition: relationship between inhibition of thromboxane production and the plasma unbound concentration of S(+)-ibuprofen. *Br J Clin Pharmacol* 1991: 31, 131-138.
- Fitzgerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001: 345, 433-442.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1996.
- Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 1991: 5(9), 2304-2312.
- Garrod AE. *Inborn errors of metabolism*. University Press, New York Oxford: 1909
- Goldstein, JA, de Morais SMF. Biochemistry and molecular biology of the human CYP 2C subfamily. *Pharmacogenetics* 1994: 4, 285-299.
- Gotoh O. Substrate recognition sites in cytochrome P-450 family 2 (CYP 2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1992: 267, 83-90.
- 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.
- Haining RL, Hunter AP, Veronese ME, Trager WF, Rettie AE. Allelic variants of human cytochrome

- P450 2C9: baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch Biochem Biophys* 1996: 333(2), 447-458.
- Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003: 73(1), 122-130.
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975: 72(8), 2994-2998.
- Hamman MA, Thompson GA, Hall SD. Regioselective and stereoselective metabolism of ibuprofen by human cytochrome P450 2C. *Biochem Pharmacol* 1997: 54(1), 33-41.
- He M, Korzekwa KR, Jones JP, Rettie AE, Trager WF. Structural forms of phenprocoumon and warfarin that are metabolized at the active site of CYP2C9. *Arch Biochem Biophys* 1999: 372(1), 16-28.
- Hempel SL, Monick MM, Hunninghake GW. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 1994: 93(1), 391-396.
- Hutzler JM, Hauer MJ, Tracy TS. Dapsone activation of CYP2C9-mediated metabolism: evidence for activation of multiple substrates and a two-site model. *Drug Metab Dispos* 2001: 29(7), 1029-1034.
- Iber FL. Drug metabolism in heavy consumers of ethyl alcohol. *Clin Pharmacol Ther* 1977: 22, 735-742.
- Ingelmann-Sundberg M, Oscarson M, Mc Lellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacological Sciences* 1999: 20, 342-349.
- Inoue K, Yamazaki H, Imiya K, Akasaka S, Guengerich FP, Shimada T. Relationship between CYP 2C9 and 2C19 genotypes and tolbutamide methylhydroxylation and S-mephenytoin 4'-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics* 1997: 7, 103-113.
- Jones BC, Hawksworth G, Horne VA, Newlands A, Morsman J, Tute MS, Smith DA. Putative active site template model for cytochrome P4502C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos* 1996: 24 (2), 260-266.
- Jones JP, He M, Trager WF, Rettie AE. Three dimensional quantitative structure-activity relationship for inhibitors of cytochrome P4502C9. *Drug Metab Dispos* 1996: 24, 1-6.
- Kaiser DG, VanGiessen GJ, Reisecher RJ, Wechter WJ. Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomers in humans. *J Pharm Sci* 1976: 65, 269-273.
- Kater RMH, Roggin G, Tobon F, Zieve P, Iber FL. Increased rate of clearance of drugs from the circulation of alcoholics. *Am J Med Sci* 1969: 258, 35-39.

- 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, Stormer E, Meisel C, Steinbach N, Roots I, Brockmöller J. Influence of CYP2C9 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. *Pharmacogenetics* 2003: 13(8), 473-480.
- Kreeger N. Tolbutamide-induced hypoglycemia. *N Engl J Med* 1962: 266, 818-820.
- Kutt H, Wolk M, MC Dowell F. Insufficient parahydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity. *Neurology* 1964: 14, 542-548
- Lee EJD, Williams K, Day R, Graham G, Champion D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br J Clin Pharmacol* 1985: 19, 669-674.
- Leemann T, Transom C, Dayer P. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci* 1993: 52, 29-34.
- Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. Barcelona. Hongkong. London. Mailand. Paris. Singapur. Tokio. 2001.
- Lötsch J, Muth-Selbach U, Tegeder I, Brune K, Geisslinger G. Simultaneous fitting of R- and S-ibuprofen plasma concentrations after oral administration of the racemate. *Br J Clin Pharmacol* 2001: 52(4), 387-398.
- Macia MA, Frias J, Carcas AJ, Guerra P, Valiente R, Lucero ML. Comparative bioavailability of a dispersible formulation of diclofenac and finding of double plasma peaks. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1995: 33(6), 333-339.
- Maier R, Menasse R, Riesterer L, Pericin C, Ruegg M, Ziel R. The pharmacology of diclofenac sodium (Voltarol). *Rheumatol Rehabil*. 1979: Suppl 2, 11-21.
- Mancy A, Antignac M, Minoletti C, Dijols S, Mouries V, Duong NT, Battioni P, Dansette PM, Mansuy D. Diclofenac and its derivatives as tools for studying human cytochromes P450 active sites: particular efficiency and regioselectivity of P450 2Cs. *Biochemistry* 1999: 38(43), 14264-14270.
- Mancy A, Broto P, Dijols S, Dansette PM, Mansuy D. The substrate binding site of human liver cytochrome P4502C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling. *Biochemistry* 1995: 34, 10365-10375.
- 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.
- Menasse R, Hedwall PR, Kraetz J, Pericin C, Riesterer L, Sallmann A, Ziel R, Jaques R. Pharmacological properties of diclofenac sodium and its metabolites. *Scand J Rheumatol Suppl* 1978: 22, 5-16.

- Meyer UA. The molecular basis of genetic polymorphism of drug metabolism of drug metabolism. *J Pharm* 1994; 46, 409-415.
- Mills RFN, Adams SS, Clife EE, Dickinson W, Nicholson JS. The metabolism of ibuprofen. *Xenobiotica* 1973; 3, 589-598.
- Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45(6), 525-538.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90(24), 11693-11697.
- Morin S, Lorient MA, Poirier JM, Tenneze L, Beaune PH, Funck-Brentano C, Jaillon P, Becquemont L. Is diclofenac a valuable CYP2C9 probe in humans? *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 56(11), 793-797.
- Motulsky AG. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA* 1957; 165, 835-837.
- Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001; 286(8), 954-959.
- Nakajima M, Inoue T, Shimada N, Tokudome S, Yamamoto T, Kuroiwa Y. Cytochrome P450 2C9 catalyzes indomethacin O-demethylation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1998; 26(3), 261-266.
- Nebert DW, Adesnick M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman M. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* 1987; 6, 1-11
- Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 1997; 60, 265-271.
- 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.
- Odani A, Hashimoto Y, Otsuki Y, Uwai Y, Hattori H, Furusho K, Inui K. Genetic polymorphism of the CYP2C subfamily and its effect on the pharmacokinetics of phenytoin in Japanese patients with epilepsy. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62(3), 287-292.
- O'Sullivan MG, Huggins EM Jr, Meade EA, DeWitt DL, McCall CE. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187(2), 1123-7.
- Patrignani P, Panara MR, Greco A, Fusco O, Natoli C, Iacobelli S, Cipollone F, Ganci A, Creminon C, Maclouf J. Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271(3), 1705-12.

- Patrono C, Ciabattoni G, Pugliese F, Pinca E, Castrucci G, De Salvo A, Cattani P. Radioimmunoassay measurement of stable metabolites of platelet arachidonic acid: a convenient method for the in vitro and ex vivo evaluation of cyclo-oxygenase inhibitors. *Agents Actions Suppl* 1980a: 7, 256-259.
- Patrono C, Ciabattoni G, Pugliese F, Pinca E, Castrucci G, De Salvo A, Satta MA, Parachini M. Radioimmunoassay of serum thromboxane B<sub>2</sub>: a simple method of assessing pharmacologic effects on platelet function. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 1980b: 6, 187-191.
- Patrono C, Patrignani P, Garcia Rodriguez LA. Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J Clin Invest* 2001: 108(1), 7-13.
- 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.
- Rodrigues AD, Kukulka MJ, Roberts EM, Ouellet D, Rodgers TR. (O-methyl 14C)naproxen O-demethylase activity in human liver microsomes: evidence for the involvement of cytochrome P4501A2 and P4502C9/10. *Drug Metab Dispos* 1996: 24(1),126-136.
- Rudy AC, Knight PM, Brater DC, Hall SD. Enantioselective disposition of ibuprofen in elderly persons with and without renal impairment. *J Pharmacol Exp Ther* 1995: 273, 88-93.
- Rudy AC, Knight PM, Brater DC, Hall SD. Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans. Administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *J Pharmacol Exp Ther* 1991: 259, 1133-1139.
- Sandor P, Sellers EM, Dumbrell M, Khouw V. Effect of short-and long-term alcohol use on phenytoin kinetics in chronic alcoholics. *Clin Pharmacol Ther* 1981: 30, 390-397.
- Scott J, Poffenbarger PL. Pharmacogenetics of tolbutamide metabolism in humans. *Diabetes* 1979: 28 (1), 41-51
- Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997: 272, 601-608.
- Schmidt G. Antirheumatika und Antiphlogistika. In: Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.): *Arzneiverordnungsreport 2000*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2001.
- Scordo MG, Aklillu E, Yasar U, Dahl ML, Spina E, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population. *Br J Clin Pharmacol* 2001: 52(4), 447-450
- Seppälä E, Laitinen O, Vapaatalo H. Comparative study on the effects of acetylsalicylic acid, indomethacin and paracetamol on metabolites of arachidonic acid in plasma, serum and urine in man. *Int J Clin Pharmacol Res* 1983: 3(4), 265-269.
- Shen S, Marchick MR, Davis MR, Doss GA, Pohl LR. Metabolic activation of diclofenac by human cytochrome P450 3A4: role of 5-hydroxydiclofenac. *Chem Res Toxicol* 1999: 12(2), 214-222.

- 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 (1), 414-423.
- Shimamoto J, Ieiri I, Urae A, Kimura M, Irie S, Kubota T, Chiba K, Ishizaki T, Otsubo K, Higuchi S. Lack of differences in diclofenac (a substrate for CYP2C9) pharmacokinetics in healthy volunteers with respect to the single CYP2C9\*3 allele. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000; 56(1), 65-68.
- Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF, Rettie AE. Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9\*3. *Pharmacogenetics* 1997; 7, 361-367.
- Stierlin H, Faigle JW. Biotransformation of diclofenac sodium (Voltaren) in animals and in man. II. Quantitative determination of the unchanged drug and principal phenolic metabolites, in urine and bile. *Xenobiotica* 1979; 9(10), 611-21.
- Stryer L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1996.
- Stubbbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P4502C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996; 6, 429-439.
- Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. The role of the Cyp2C9-Leu(359) allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 1996; 6, 341-349.
- Takahashi H, Kashima T, Nomoto S, Iwade K, Tainaka H, Shimizu T, Nomizo Y, Muramoto N, Kimura S, Echizen H. Comparisons between in-vitro and in-vivo metabolism of (S)-warfarin: catalytic activities of cDNA-expressed CYP2C9, its Leu359 variant and their mixture versus unbound clearance in patients with the corresponding CYP2C9 genotypes. *Pharmacogenetics* 1998; 8, 365-373.
- 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.
- Tang C, Shou M, Mei Q, Rushmore TH, Rodrigues AD. Major role of human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) in the oxidative metabolism of celecoxib, a novel cyclooxygenase-II inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(2), 453-459.
- Tang C, Shou M, Rodrigues AD. Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) activity. *Drug Metab Dispos* 2000; 28(5), 567-572.
- Tang C, Shou M, Rushmore TH, Mei Q, Sandhu P, Woolf EJ, Rose MJ, Gelmann A, Greenberg HE, De Lepeleire I, Van Hecken A, De Schepper PJ, Ebel DL, Schwartz JI, Rodrigues AD. In-vitro metabolism of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, by allelic variant forms of human liver microsomal cytochrome P450 2C9: correlation with CYP2C9 genotype and in-vivo pharmacokinetics. *Pharmacogenetics* 2001; 11(3), 223-235.

- Tang W, Stearns RA, Bandiera SM, Zhang Y, Raab C, Braun MP, Dean DC, Pang J, Leung KH, Doss GA, Strauss JR, Kwei GY, Rushmore TH, Chiu SH, Baillie TA. Studies on cytochrome P-450-mediated bioactivation of diclofenac in rats and in human hepatocytes: identification of glutathione conjugated metabolites. *Drug Metab Dispos* 1999a: 27(3), 365-372.
- Tang W, Stearns RA, Wang RW, Chiu SH, Baillie TA. Roles of human hepatic cytochrome P450s 2C9 and 3A4 in the metabolic activation of diclofenac. *Chem Res Toxicol* 1999b: 12(2), 192-199.
- Todd PA, Sorkin EM. Diclofenac sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 1988: 35(3), 244-285.
- Tracy TS, Marra C, Wrighton SA, Gonzalez FJ, Korzekwa KR. Studies of flurbiprofen 4'-hydroxylation. Additional evidence suggesting the sole involvement of cytochrome P450 2C9. *Biochem Pharmacol* 1996: 52(8), 1305-1309.
- Tracy TS, Marra C, Wrighton SA, Gonzalez FJ, Korzekwa KR. Involvement of multiple cytochrome P450 isoforms in naproxen O-demethylation. *Eur J Clin Pharmacol* 1997: 52(4), 293-298.
- Tracy TS, Rosenbluth BW, Wrighton SA, Gonzalez FJ, Korzekwa KR. Role of cytochrome P450 2C9 and an allelic variant in the 4'-hydroxylation of (R)- and (S)-flurbiprofen. *Biochem Pharmacol* 1995: 49(9), 1269-1275.
- Vacas MI, Del Zar MM, Martinuzzo M, Falcon C, Carreras LO, Cardinali DP. Inhibition of human platelet aggregation and thromboxane B2 production by melatonin. Correlation with plasma melatonin levels. *J Pineal Res* 1991: 11(3-4), 135-139.
- Vane J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature-New Biol* 1971: 231, 232-235.
- Vane J. Towards a better aspirin. *Nature* 1994: 367, 215-216.
- Vane JR, Botting RM. A better understanding of anti-inflammatory drugs based on isoforms of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2). *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1995: 23, 41-48.
- Veronese ME, Doecke CJ, Mackenzie PI, McManus ME, Miners JO, Rees DL, Gasser R, Meyer UA, Birkett DJ. Site-directed mutation studies of human liver cytochrome P-450 isoenzymes in the CYP2C subfamily. *Biochem J* 1993: 289(2), 533-538.
- Vial JH, McLeod LJ, Roberts MS. Rebound elevation in urinary thromboxane B2 and 6-keto-PGF1 alpha excretion after aspirin withdrawal. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1991: 21A, 157-160.
- Wallace JL, Bak A, McKnight W, Asfaha S, Sharkey KA, MacNaughton WK. Cyclooxygenase 1 contributes to inflammatory responses in rats and mice: implications for gastrointestinal toxicity. *Gastroenterology* 1998:115(1), 101-109.
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999: 96 (13), 7563-7568.

Wolf CR und Smith G. Pharmacogenetics. Br Med Bull 1999; 55(2), 66-386

Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. Crit Rev Toxicol 1992; 22, 1-21.

Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, Ozawa N, Kawai T, Suzuki Y, Goldstein JA, Guengerich FP, Shimada T. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. Biochem Pharmacol 1998; 56(2), 243-251.

Yasar U, Eliasson E, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Gadd M, Sjoqvist F, Dahl ML. The role of CYP2C9 genotype in the metabolism of diclofenac in vivo and in vitro. Eur J Clin Pharmacol. 2001; 57(10), 729-735.

### **Webseiten**

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

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/default.htm>; Karolinska Institutet 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 an Eides Statt**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt und die der Literatur entnommenen Daten als solche gekennzeichnet habe.

Berlin, 30.Januar.2004

Georg Freytag

**Publikationsliste**

Kirchheiner J, Meineke I, Freytag G, Meisel C, Roots I, Brockmoller 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(1), 62-75.

**Zur Person**

Georg Tobias Heinrich Freytag  
geb. am 16.Juli 1974  
in Uslar  
ledig  
evangelisch

**Schulbildung**

1981-1985 Grundschule Ochtersum, Hildesheim  
1985-1987 Orientierungsstufe Ost, Hildesheim  
1987-1994 Scharnhorstgymnasium Hildesheim  
1994 Abitur

**Zivildienst**

1994/1995 Mobiler Sozialer Hilfsdienst beim Deutschen Roten Kreuz,  
Hildesheim

**Hochschulstudium**

1995-1997 Studium der Humanmedizin  
Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau  
1997-2003 Studium der Humanmedizin  
Humboldt-Universität zu Berlin

**Examina**

08/1997 Ärztliche Vorprüfung  
08/1998 I. Staatsexamen  
04/2002 II. Staatsexamen  
10/2003 III. Staatsexamen

**Praktisches Jahr**

08/2002-12/2002 Neurologie  
Park-Klinik Weißensee, Berlin  
12/2002-03/2003 Innere Medizin, Kardiologie und Diabetologie  
St. Hedwig Krankenhaus, Berlin  
04/2003-08/2003 Neuro-und Allgemein Chirurgie  
Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin

**Dissertation**

03/2000 Beginn der Doktorarbeit in der Abteilung für Klinische  
Pharmakologie bei Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots, Charité,  
Berlin