

Phäno- und Genotypisierung zur Abwehr von unerwünschten
Arzneimittelwirkungen am Beispiel zweier Antidepressiva

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Michael Kirsch
geboren am 01. Mai 1978 in Greiz / Thüringen.

Gutachter:

1. PD Dr. A. Balogh (Jena)
2. Prof. Dr. D. Müller (Jena)
3. Prof. Dr. C. Hiemke (Mainz)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 31.05.2005

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung und Zielstellung der Arbeit</u>	1
1.1. Arzneimitteltherapie und unerwünschte Arzneimittelwirkungen	1
1.2. Biotransformation	2
1.3. Das Cytochrom-P450-System	2
1.3.1. Funktionen und Vielfalt des CytochromP450 (CYP)	2
1.3.2. Cytochrom P450 2D6 und seine Rolle im Stoffwechsel	3
1.4. Bedeutung von Genotypisierung und Phänotypisierung in der heutigen Arzneimitteltherapie am Beispiel von CYP2D6	4
1.4.1. Genetische Vielfalt und phänotypische Prägung des CYP2D6	5
1.4.2. Dextromethorphan – als Modellsubstanz zur Phänotypisierung des Cytochrom P450 2D6	7
1.5. Paroxetin – pharmakologische Eigenschaften des Antidepressivums ...	9
1.6. Reboxetin – pharmakologische Eigenschaften des Antidepressivums	10
1.7. Zielstellung der Arbeit	11
<u>2. Material und Methoden</u>	13
2.1. Studiendesign	13
2.1.1. Patientencharakterisierung	13
2.1.2. Einnahme der Antidepressiva	15
2.1.3. Genotypisierung von CYP2D6	16
2.1.4. Phänotypisierung von CYP2D6 mit Dextromethorphan	17
2.1.5. Bestimmungen zur Pharmakokinetik beider Antidepressiva	19
2.2. Nachweismethoden	21
2.2.1. Nachweis von Dextromethorphan (DEX) und seiner Metaboliten Dextrorphan (DTX), 3-Hydroxymorphan (3-HM) und 3-Methoxymorphan (3-MM) im Serum	21
2.2.1.1. Validierung	23
2.2.2. Nachweis der Antidepressiva Reboxetin und Paroxetin im Serum	24

2.3.	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter beider Antidepressiva	25
2.4.	Statistische Berechnung	25
3.	<u>Ergebnisse</u>	26
3.1.	CYP2D6 Genotypen des Probandengutes	26
3.2.	Zusammenhang zwischen CYP2D6 Genotyp und Serumkonzentrationen bzw. Metabolitenquotienten des Dextromethorphan- tests in der Kontrollphase	29
3.2.1.	Serumkonzentrationen für DEX und seine Metaboliten	29
3.2.2.	Metabolitenquotienten des Dextromethorphanabbaus	30
3.3.	Einfluss der Paroxetin-, Reboxetin- oder Placeboeinnahme auf den Phänotyp (Vergleich der beiden Dextromethorphan- tests aus Kontroll- und Behandlungsphase)	33
3.3.1.	Auswirkungen auf die Langsammetabolisierer des CYP2D6	33
3.3.2.	Auswirkungen auf die Schnell- und Intermediärmetabolisierer des CYP2D6	35
3.3.2.1.	Kontroll- und Behandlungsphase der Paroxetingruppe	35
3.3.2.2.	Kontroll- und Behandlungsphase der Reboxetingruppe	36
3.3.2.3.	Kontroll- und Behandlungsphase der Placebogruppe	39
3.3.3.	Gemeinsamer Vergleich von Paroxetin-, Reboxetin- und Placebogruppe während Kontroll- und Behandlungsphase	41
3.3.3.1.	Serumkonzentrationen	41
3.3.3.2.	Metabolitenquotienten	43
3.4.	Pharmakokinetik der Antidepressiva Reboxetin und Paroxetin mit Bezugnahme auf die verschiedenen CYP2D6 Genotypen	45
3.4.1.	Prä-Dosis-Spiegel (C _{min}) von Paroxetin	46
3.4.2.	Prä-Dosis-Spiegel (C _{min}) von Reboxetin	48
3.4.3.	AUD (9-24h) von Paroxetin	50
3.4.4.	AUD (9-24h) von Reboxetin	51

3.4.5. Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Parametern und ermitteltem Phänotyp im Vergleich zum bestehenden CYP2D6- Genotyp	51
3.4.6. Korrelation der pharmakokinetischen Parameter der Antidepressiva zu den Metabolitenquotienten des DEX- Abbaus vor und nach der Behandlung	54
3.4.6.1. Paroxetin	54
3.4.6.2. Reboxetin	55
<u>4. Diskussion</u>	56
4.1. Genotypisierung des CYP2D6	56
4.2. Zusammenhang zwischen CYP2D6 Genotyp und Serumkonzentrationen bzw. Metabolitenquotienten des Dextromethorphan tests in der Kontrollphase	57
4.3. Wechselseitige Auswirkungen einer Einnahme von Paroxetin oder Reboxetin auf die Aktivität der am Abbau von Dextromethorphan beteiligten Enzyme und deren Einfluss auf die Pharmakokinetik beider Antidepressiva	60
4.4. Einfluss des CYP2D6- Genotyps auf die Pharmakokinetik der Antidepressiva Paroxetin und Reboxetin	62
<u>5. Schlussfolgerung</u>	65
<u>Zusammenfassung</u>	66
<u>Literaturverzeichnis</u>	68

Abkürzungsverzeichnis

3-HM	3-Hydroxymorphinan
3-MM	3-Methoxymorphinan
AUD	<u>a</u> rea <u>u</u> nder the <u>d</u> atapoints (9-24 h)
Cmin	Prä-Dosis-Spiegel
CYP	Cytochrom P450
DEX	Dextromethorphan
DTX	Dextrorphan
EM	Schnellmetabolisierer (<u>e</u> xtensive <u>m</u> etabolizer)
IM	Intermediärmetabolisierer (<u>i</u> ntermediate <u>m</u> etabolizer)
MQ	<u>M</u> etaboliten <u>q</u> uotient (metabolic ratio)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PM	Langsammetabolisierer (<u>p</u> oor <u>m</u> etabolizer)
UAW	<u>u</u> nerwünschte <u>A</u> rzneimittel <u>w</u> irkungen
UM	Ultraschnellmetabolisierer (<u>u</u> ltra rapid <u>m</u> etabolizer)

1. Einleitung und Zielstellung der Arbeit

1.1. Arzneimitteltherapie und unerwünschte Arzneimittelwirkungen

Die Arzneimitteltherapie erfährt eine stetig zunehmende Bedeutung in der Medizin. Die Entwicklung neuer Medikamente verbessert kontinuierlich deren Effizienz und eröffnet die Möglichkeit neuer Therapieoptionen in der Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen. Den Fortschritten der medikamentösen Therapie stehen aber Probleme wie mangelnde Wirksamkeit eines Pharmakons und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) entgegen. Neben Faktoren wie Komedikation, Erkrankungen, Alter, Geschlecht, Rauchen und Alkoholkonsum sowie Nahrungsbestandteilen konnten in den vergangenen Jahren genetische Faktoren identifiziert werden, die entweder die Wirkung (Pharmakodynamik) oder den Metabolismus (Pharmakokinetik) von Arzneimitteln beeinflussen. Wichtige Aspekte sind dabei inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Expression und katalytischen Aktivität eines Enzyms, variierende Kapazitäten der Transportproteine oder Affinitätsunterschiede von Medikamentenrezeptoren. Zu Änderungen der katalytischen Enzymaktivität kann es aufgrund von Enzymhemmung, Enzyminduktion oder genetisch bedingten Allelvariationen, so genannten Enzym polymorphismen, kommen.

Eine Vielzahl dieser Polymorphismen ist das Ergebnis molekularer Mutationen verschiedener Allele. Sie bedingen eine starke, schwache oder unter Umständen auch fehlende Metabolisierung eines Fremdstoffes. Die Bedeutung der Enzym polymorphismen ist bereits seit einiger Zeit bekannt. Beispiele sind unter anderen die Familie der Cytochrom-P450-Monooxygenasen, die N-Acetyltransferase 2 oder die Glutathion-S-Transferasen.

Die Identifikation solcher Polymorphismen und die Kenntnis anderer Faktoren mit Einfluss auf die Enzymaktivität, wie z.B. Enzymhemmung oder Enzyminduktion, ist ein zentrales Anliegen der modernen Arzneimitteltherapie. Phänotypisierung und Genotypisierung übernehmen hier eine wichtige Aufgabe, um zukünftig eine sicherere und individuelle Arzneimitteltherapie zu ermöglichen.

1.2. Biotransformation

Die Biotransformation, d.h. die enzymatische Entgiftung bzw. Inaktivierung von Stoffwechselendprodukten, Arzneimitteln oder anderen Fremdstoffen, erfolgt hauptsächlich in der Leber. In einer so genannten Phase-I-Reaktion wird die Grundstruktur lipophiler Substanzen durch Oxidation, Reduktion und Hydrolyse verändert. Beispielsweise erfolgt über Enzyme des Cytochrom P450 und andere Kofaktoren der Einbau einer Hydroxylgruppe, wodurch die Substanz zunächst funktionalisiert wird. In geringerem Umfang sind auch Alkohol- oder Aldehydhydrogenasen, Epoxidhydroxylasen oder andere Enzyme an der Phase-I-Reaktion beteiligt.

In der nachfolgenden Phase-II-Reaktion wird durch Konjugation mit Glucuron-, Schwefel-, Essig- oder Aminosäuren eine chemische Gruppe übertragen, um die Substanz anschließend besser über die Nieren bzw. die Gallenflüssigkeit ausscheiden zu können.

1.3. Das Cytochrom-P450-System

1.3.1. Funktionen und Vielfalt des Cytochrom-P450

Das Cytochrom-P450-System (CYP) ist eine große Familie bedeutender Monooxygenasen mit breiter Substratspezifität. Es existieren mehrere Genfamilien im Tier- und Pflanzenreich und auch für den Menschen wurden bereits zahlreiche Gene zur Kodierung verschiedener CYP-Enzyme entdeckt. Das P450-System ist für den Organismus als Entgiftungssystem notwendig, um den Körper vor toxischen Substanzen zu schützen. Es übernimmt in der Phase-I-Reaktion der Biotransformation eine Schlüsselrolle und sorgt so, neben dem Abbau und der Ausscheidung körperfremder Stoffe, darüber hinaus auch für die Verwertung körpereigener Substrate wie Steroide, Prostaglandine oder Fettsäuren.

Die einzelnen Isoenzyme des P450-Systems werden CYP-Familien und -Unterfamilien zugeordnet, deren Systematik sich nach der Aminosäuresequenz richtet. Der Großteil der einzelnen P450-Enzyme kommt in der Leber vor, aber auch in Lunge, Darmmukosa und Niere. Den Hauptanteil am Abbau von Fremdstoffen im menschlichen Organismus, insbesondere von Arzneimitteln, haben die Familien CYP1, CYP2 und CYP3. Am Abbau von Antidepressiva sind im Wesentlichen die Isoenzyme CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 beteiligt. CYP3A4 ist mit einem Anteil von 30% und mehr das am stärksten exprimierte Isoenzym in der Leber (SHIMADA et al., 1994) und ist in viele klinisch wichtige Medikamenteninteraktionen involviert. Die Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 zeichnen sich durch eine große Vielfalt an Polymorphismen aus, wobei in der vorliegenden Arbeit vor allem das CYP2D6 im Mittelpunkt steht.

1.3.2. Cytochrom P4502D6 und seine Rolle im Stoffwechsel

Aufgrund seiner vielfältigen Polymorphismen ist CYP2D6 das am besten untersuchte Isoenzym. Obwohl es quantitativ in der Leber nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist es durch die Beteiligung am Abbau von bisher mehr als 50 bekannten Substraten, besonders kardiovaskulär und zentralnervös wirksamen Stoffen (FROMM et al., 1997), qualitativ sehr wichtig. Betroffene Arzneimittel sind z.B. Antiarrhythmika der Klasse 1 (Ajmalin, Propafenon), Betablocker (Metoprolol, Timolol), Neuroleptika (Haloperidol, Perphenazin), Antidepressiva (Amitryptilin, Desipramin, Fluoxetin), Opiode (Codein, Tramadol) und Amphetamine (SCHWAB et al., 2002). Es wird angenommen, dass CYP2D6 am Abbau von 50 % aller psychoaktiven Medikamente beteiligt ist, weshalb der CYP2D6-Polymorphismus gerade in der Psychiatrie und Neurologie eine bedeutende Rolle spielt. Ein Einfluss auf die Expression von CYP2D6 durch Xenobiotika ist bislang nicht bekannt.

1.4. Bedeutung von Genotypisierung und Phänotypisierung in der heutigen Arzneimitteltherapie

Eine erfolgreiche Arzneimitteltherapie basiert auf der klinischen Beurteilung des Patienten als wichtigstem Kriterium. Zur Unterstützung können die Kontrolle des Medikamentenplasmaspiegels sowie eine Genotypisierung und Phänotypisierung beitragen. Die Genotypisierung, beispielsweise eines Enzyms, ist die molekularbiologische Untersuchung des Erbgutes nach Anzahl und Funktionalität der für dieses Enzym kodierenden Allele.

Phänotypisierung ist die Methode zur Bestimmung des Phänotyps eines Menschen mittels geeigneter Arzneistoffe als Modellsubstrate. Der Phänotyp ist geprägt durch das Zusammenwirken von determiniertem Genotyp und Umwelteinflüssen verschiedenster Art. Häufig beeinflussen oder verändern besonders Xenobiotika durch Induktion oder Hemmung eines Enzyms den Phänotyp. So können aus der gleichzeitigen Gabe zweier Medikamente Konkurrenzsituationen an diesem Enzym entstehen und die pharmakokinetischen Parameter gegenüber der Verabreichung als Einzelsubstanz stark variieren. Daraus entstehen mögliche unerwünschte Effekte wie Wirkstoffkumulation oder mangelnde Arzneimittelkonzentration, in deren Folge sich, in Abhängigkeit vom jeweiligen Arzneimittel, klinisch relevante Probleme wie unzureichende Medikamentenwirkung, Therapieresistenz, Nebenwirkungen bis hin zur Toxizität mit schwerwiegenden Komplikationen, entwickeln können.

Die Kenntnis des CYP2D6-Phänotyps eines Patienten kann hier durch gezielte Maßnahmen, wie Dosisanpassung oder den Einsatz medikamentöser Therapiealternativen, entscheidend dazu beitragen, solche Probleme zu vermindern (EICHELBAUM and GROSS, 1990; ALVAN, 1992).

In der Vergangenheit hat dabei vor allem die Phänotypisierung als kosteneffizientes aber aufwändiges Verfahren eine Rolle gespielt und sich auch außerhalb der Pharmakologie, z.B. bei Bluttransfusionen, als Methode etabliert. Seit einigen Jahren gewinnt zunehmend die Genotypisierung als wesentlich schnellere aber kostspieligere Alternative zur Phänotypisierung an Bedeutung. Eine Reihe von Untersuchungen zur Phänotyp-Genotyp-Korrelation dokumen-

tierte, dass mittels alleiniger Genotypisierung für CYP2D6 zu 99% der Fälle eine korrekte Vorhersage des PM-Phänotyps getroffen werden kann und damit auf die aufwändige Phänotypisierung mit Verabreichung einer Testsubstanz verzichtet werden kann (SCHWAB et al., 2002). Bislang besitzen wissenschaftliche Erkenntnisse auf dem Gebiet der präventiven Beurteilung eines individuellen Erkrankungsrisikos, mit Ausnahme definierter Erbkrankheiten, nur bei einigen Polymorphismen, wie z.B. die der Enzyme CYP2D6 und Catechol-O-Methyl-Transferase oder des Serotonintransporters, eine klinische Relevanz und fanden in der Praxis nur bei speziellen Indikationen, häufig beim Auftreten schwerwiegender UAW nach Medikamenteneinnahme, ihre Anwendung. Dementsprechend begrenzt ist die bisherige Reihe an Substanzen deren therapeutische Dosierung, z.B. durch eine vorherige Genotypisierung des Patienten, zielgerechter ausgewählt werden kann. Zukünftig werden die Kenntnisse über Enzym polymorphismen in der Prävention fremdstoffbedingter Erkrankungen erheblich an Bedeutung gewinnen. Denn ein besseres Verständnis der Funktion und Charakteristik der Enzyme ermöglicht dem behandelnden Arzt Interaktionen zwischen Medikamenten vorherzusehen, individuelle Risiken einzuschätzen und entsprechende therapeutische Maßnahmen zu ergreifen. In naher Zukunft sollen zunehmend einfache und kostengünstige molekularbiologische Techniken die Genotypisierung allgemein verfügbar machen und somit eine individuelle Arzneimitteltherapie mit verminderten Risiken ermöglichen.

1.4.1. Genetische Vielfalt und phänotypische Prägung des CYP2D6

Die Enzymaktivität von CYP2D6 steht in Abhängigkeit von der Funktionalität und der Anzahl seiner intakten Allele. Da im Gen des CYP2D6 zahlreiche Polymorphismen der Allelvarianten auftreten, resultieren daraus große interindividuelle Unterschiede in der Metabolisierungskapazität dieses Enzyms. Der CYP2D6-Phänotyp, d.h. die Aktivität des Enzyms im Menschen, tritt entweder als Langsammetabolisierer (PM), Intermediärmetabolisierer (IM),

Schnellmetabolisierer (EM) oder Ultraschnellmetabolisierer (UM) in Erscheinung. Die verwendeten Abkürzungen sind aus dem Englischen abgeleitet und entsprechen der international gebräuchlichen Nomenklatur mit der Einteilung in „extensive metabolizers (EM), intermediate metabolizers (IM), poor metabolizers (PM) und ultra rapid metabolizers (UM)“.

Genetisch betrachtet besitzen die Genotypen folgende Allelkombinationen:

- **PM:** zwei funktionslose Allele
- **IM:** ein funktionelles Allel vom Wildtyp und ein funktionsloses Allel
- **EM:** zwei funktionelle Allele vom Wildtyp und
- **UM:** die Genduplizierung eines funktionellen Allels.

Die Aktivität des Enzyms CYP2D6 wird durch Messen des Metabolismus von Modellsubstraten wie Dextromethorphan (DEX), Debrisoquin oder Spartein beurteilt (STREETMAN et al., 2000). In solchen Studien zur Phänotypisierung von CYP2D6 wurde gezeigt, dass in der Bevölkerung mehrheitlich EM und IM auftreten, welche eine effiziente Metabolisierung der verabreichten Modellsubstanzen gewähren. Mit einem Anteil von 7-10% in der kaukasischen Bevölkerung (STEINER, 1988) und ca. 1- 4% in der asiatischen und schwarzen Bevölkerung (RELLING et al., 1991; BERTILSSON et al., 1992) treten die PM, mit nur geringem Substratumsatz, meist durch alternative Abbauwege, in der jeweiligen Population auf. Im menschlichen Erbgut sind bereits mehr als 50 Mutationen und über 70 verschiedene Allele für das Enzym CYP2D6 bekannt, die häufig zur phäno-typischen Ausprägung eines PM führen.

Beobachtet werden aber auch Personen mit stark erhöhter Metabolisierungsrate des CYP2D6. Ursache ist die Genduplikation oder -multiplikation eines funktionellen Allels im Erbgut dieser Personen. Sie werden als UM bezeichnet und treten in Deutschland mit einer Häufigkeit von ca. 2 - 4 % auf (BERTILSSON et al., 2002, SCHWAB et al., 2002).

Neben den zahlreichen Polymorphismen, die einen PM-Phänotyp des CYP2D6 hervorrufen, sind einige Medikamente, z.B. Antidepressiva wie

Fluoxetin und Paroxetin, potente Hemmsubstrate dieses Enzyms. In verschiedenen Dokumentationen ist beschrieben, dass unter den Personen mit phänotypischer Ausprägung eines PM bekannte Nebenwirkungen wie z.B. Neuroleptika-assoziierte irreversible Spätdyskinesien, Auftreten eines Delirs oder kardiale Nebenwirkungen unter der Therapie mit trizyklischen Antidepressiva gehäuft vorkommen (SPINA et al., 1992).

Aufgrund der Tatsache, dass in der kaukasischen Bevölkerung nahezu ein Zehntel der Personen den CYP2D6-Genotyp PM aufweisen und mit zunehmendem Rückgang der Enzymaktivität das Risiko für das Auftreten von UAW steigt, kann die Kenntnis des individuellen Geno- bzw. Phänotyps eine effizientere und verträglichere Behandlung im Rahmen der Arzneimitteltherapie möglich machen.

1.4.2. Dextromethorphan – als Modellsubstanz zur Phänotypisierung des Cytochrom-P450 2D6 und CYP 3A4

Dextromethorphan (DEX) ist ein therapeutisch genutztes rezeptfreies Antitussivum, das neben Spartein und Debrisoquin als weitläufig genutzte Modellsubstanz zur Phänotypisierung von CYP2D6 Verwendung findet und sich darüber hinaus auch zur Phänotypisierung von CYP3A4 eignet (JONES et al., 1996b).

Nach oraler Applikation wird DEX rasch resorbiert, erreicht innerhalb von zwei Stunden maximale Serumspiegel und wird in der Leber metabolisiert. Die Hauptabbauwege des DEX (Abb.1) sind die O-Demethylierung via CYP2D6 zu Dextrorphan (DTX) und die N-Demethylierung via CYP3A4 zu 3-Methoxymorphinan (3-MM). Sowohl 3-MM als auch DTX werden anschließend erneut O- bzw. N-demethyliert, so dass 3-Hydroxymorphinan (3-HM) entsteht (HUSTENSTILLER-RATIOPHARM®, Fachinformation, 1998).

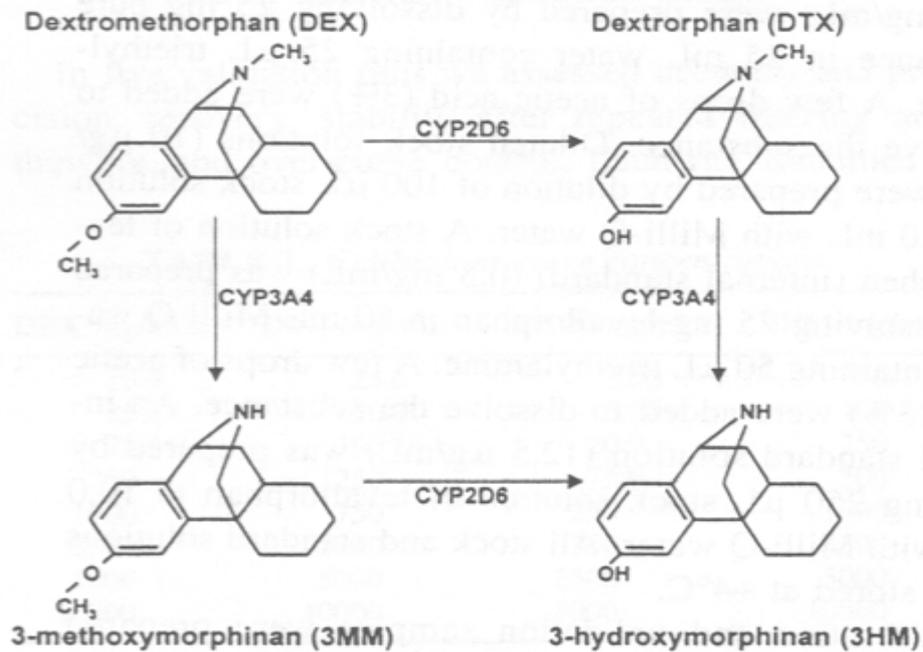


Abb.1: Abbau von Dextromethorphan

Die O-Demethylierung von DEX zu DTX, katalysiert durch CYP2D6, ist der dominierende Abbauweg der Metabolisierung. Als Folge resultieren hohe Konzentrationen von DTX und des anschließend gebildeten Metaboliten 3-HM in Serum und Urin. Zur Bestimmung der Enzymaktivität von CYP2D6 und CYP3A4 dient der Quotient aus den entsprechenden Metabolitenkonzentrationen. Dieser so genannte Metabolitenquotient (MQ) ist also das zahlenmäßig ausgedrückte Konzentrationsverhältnis von Substrat und Produkt eines beliebigen Metabolisierungsschrittes und entspricht im Englischen der so genannten „metabolic ratio“. Als Aktivitätsparameter des CYP2D6 dienen die MQ aus den Serumkonzentrationen von DEX / DTX und 3-MM / 3-HM. Die Parameter der CYP3A4 Aktivität sind die MQ DEX / 3-MM und DTX / 3-HM. Mittels der Metabolisierungsgeschwindigkeit der Testsubstanz DEX ist daher die simultane Aktivitätsbestimmung von CYP2D6 und CYP3A4 möglich (JONES et al., 1996a; DUCHARME et al., 1996).

1.5. Paroxetin – pharmakologische Eigenschaften des Antidepressivums

Paroxetin ist ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer mit antidepressiver Wirkung (BUUS LASSEN, 1989), der auch bei Panikattacken sowie Angst- und Zwangsstörungen therapeutische Anwendung findet. Paroxetin gilt als einer der stärksten Inhibitoren des CYP2D6 (ALFARO et al., 2000) und seine Serumkonzentrationen stehen in Abhängigkeit zum CYP2D6-Phänotyp (SINDRUP et al., 1992).

Die Pharmakokinetik der Substanz wurde in einer Vielzahl von Studien detailliert untersucht. Nach oraler Einnahme wird Paroxetin gut aus dem Darm resorbiert, unterliegt anschließend einem first-pass Metabolismus, der gesättigt werden kann, und verteilt sich dann, aufgrund des Charakters eines lipophilen Amins, im Körpergewebe. Unter therapeutischer Dosierung beträgt die Plasmaproteinbindung ca. 95 %. Während des Abbaus in der Leber werden durch Oxidation, Methylierung und Konjugation polare, pharmakologisch inaktive Metabolite gebildet, die anschließend sowohl biliär als auch renal ausgeschieden werden. Am Abbau scheinen zwei Enzyme mit unterschiedlicher Affinität und Kapazität entscheidend beteiligt zu sein. Es wird angenommen, dass es sich bei dem Enzym mit hoher Affinität aber geringer Kapazität um CYP2D6 und dem Enzym mit geringer Affinität und großer Kapazität um CYP3A4 handelt (KUSS et al., 1999). Eine steady-state Plasmakonzentration wird nach ca. 7-14 Tagen erreicht. Wiederholte Einzelgaben oder Dosissteigerung von Paroxetin zeigen eine nicht-lineare Kinetik (KAYE et al., 1989), wofür eine unterschiedliche individuelle partielle Sättigung des first-pass Metabolismus die Ursache zu sein scheint. Die Halbwertszeit beträgt im Mittel ca. 1 Tag, unterliegt aber ebenfalls ausgeprägten individuellen sowie alters- und dosisabhängigen Schwankungen (KAYE et al., 1989). Insgesamt bestehen große interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik von Paroxetin.

1.6. Reboxetin – pharmakologische Eigenschaften des Antidepressivums

Reboxetin ist ein hochselektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer mit schwacher Hemmung der Serotoninwiederaufnahme (MELLONI et al., 1984). Er wird eingesetzt zur Therapie schwerer Depressionen. Reboxetin zeigt kaum Affinität zu cholinergen, α -adrenergen und histaminergen Rezeptoren und besitzt zudem eine gute Verträglichkeit (RIVA et al., 1989; WONG et al., 1998.) Pharmakokinetisch erfolgt nach oraler Aufnahme eine schnelle und nahezu vollständige Resorption im Magen-Darm-Trakt, ohne einen nennenswerten first-pass-Metabolismus (FLEISHAKER et al., 1999.) Die Serumkonzentration erreicht ihr Maximum nach ca. 2 Stunden und nimmt unter Sättigungsbedingungen (steady state) sowohl nach oraler als auch intravenöser Verabreichung in nahezu monoexponentieller Weise, ohne verlängerte Verteilungsphase, nach einer Kinetik 1. Ordnung ab. Es besteht eine starke Plasmaproteinbindung von mehr als 98 % (FLEISHAKER, 2000), hauptsächlich an das α_1 -saure Glykoprotein (EDWARDS et al., 1995.) Individuelle Schwankungen und altersabhängige Zunahme der Konzentration des sauren Glykoproteins können zu einer Abnahme der renalen Clearance und Zunahme der Plasmakonzentration des Reboxetins führen (JANUZZO et al., 1994.) Daneben werden weitere einflussnehmende Faktoren auf die Plasmaproteinbindung angenommen (JANUZZO et al., 1995.) Die Metabolisierung des Reboxetins erfolgt hauptsächlich durch das Enzym CYP 3A4 (DOSTERT et al., 1997) über drei Hauptabbauewege in der Leber: Hydroxylierung, O-Dealkylierung und Oxidation bzw. eine Kombination dieser Reaktionen. Anschließend werden die Metaboliten und ca. 10% der Ausgangssubstanz über die Niere ausgeschieden (COCCHIARA et al., 1991.) Die Halbwertszeit beträgt nüchtern ca. 12 h (EDRONAX® 4 mg, Fachinformation 1997), kann sich aber aufgrund renaler und hepatischer Funktionsstörungen deutlich verlängern (FLEISHAKER, 2000). Die Pharmakokinetik verläuft linear und bleibt auch bei Mehrfachgaben unverändert.

In vitro Untersuchungen zeigten bei sehr hohen Dosen des Reboxetins einen Hemmeffekt sowohl auf CYP3A4 (WIENKERS et al., 1999) als auch CYP2D6

(RASMUSSEN et al., 2000). Diese Konzentrationen werden in vivo als freie Konzentrationen aber nicht erreicht (FLEISHAKER, 2000). Eine bisher einzige in vivo Untersuchung mit zehn gesunden Probanden weiblichen und männlichen Geschlechts überprüfte die in vitro erlangten Erkenntnisse und bestätigte den fehlenden Hemmeffekt des Reboxetins auf CYP2D6 (AVENOSO et al., 1999). Für andere wichtige Isoenzyme des Cytochrom P450-Systems, wie z.B. CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2E1 wurde ein Einfluss von Reboxetin auf die Enzymaktivität ausgeschlossen.

1.7. Zielstellung der Arbeit

Genetische Polymorphismen von Enzymen des Arzneimittelabbaus spielen für die Wirkung und für unerwünschte Nebenwirkungen einer Vielzahl von Medikamenten eine praxisbedeutsame Rolle. Insbesondere dem Cytochrom-P450 (CYP) und seinen Untergruppen kommt aufgrund seines breiten und vielfältigen Spektrums an Substraten, mit der Beteiligung an Entgiftung von toxischen und körperfremden Stoffen, z.B. zahlreicher Medikamente, sowie seiner Rolle im Abbau und der Verwertung körpereigener Stoffe eine große Bedeutung im Rahmen des gesamten Stoffwechsels zu. Es ist daher von großem Interesse, die bestehenden Kenntnisse zu dem Vorkommen, ihrer Funktionsweise und den Ursachen und Auswirkungen einer veränderten Aktivität der betreffenden Enzyme, zu erweitern.

Für den Subtyp CYP2D6, welcher wesentlich am katalytischen Umbau von Antidepressiva, Neuroleptika, Antiarrhythmika und Analgetika beteiligt ist, sind eine Vielzahl verschiedener Allele beschrieben, die eine unterschiedliche katalytische Enzymaktivität (phänotypische Prägung) bedingen. Neben den genetisch determinierten Unterschieden der Enzymaktivität ist eine Reihe von Medikamenten mit inhibitorischen Einflüssen auf den Stoffwechsel des Enzyms bekannt. Als einer der stärksten Inhibitoren des CYP2D6 gilt z.B. das Antidepressivum Paroxetin, ein selektiver Serotonin- Wiederaufnahmehemmer. Für das neuere Antidepressivum Reboxetin, ein selektiver Noradrenalin-

Wiederaufnahmehemmer, der hauptsächlich durch das Enzym CYP3A4 metabolisiert wird, sind trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Fluoxetin, einem potentiellen Hemmstoff des CYP2D6, keine klinisch relevanten inhibitorischen Effekte bekannt. In-vitro-Untersuchungen zeigten aber, dass unphysiologisch hohe Reboxetinkonzentrationen einen Hemmeffekt sowohl auf CYP2D6 ($K_i = 2,5-2,8 \mu\text{mol/l}$) als auch CYP3A4 ($K_i = 11 \mu\text{mol/l}$) ausüben. In-vivo-Untersuchungen bezüglich eines solchen Hemmeffektes sind bisher aber nur unzureichend erfolgt.

Uns interessierte daher zum einen die Frage, ob und wenn ja wie sich unter dem Einfluss einer therapeutischen Dosis von Reboxetin die phänotypische Prägung eines Probanden verändert und ob eine Abhängigkeit von dem vorhandenen CYP2D6 Genotyp besteht. Zum Vergleich diente uns der bekannte Effekt von Paroxetin.

Des Weiteren interessierte uns, in welchem Maße die Phänotypisierung mittels Dextromethorphan mit der Genotypisierung der Probanden übereinstimmt und ob die korrekte Unterscheidung der Genotypen in Schnell-, Intermediär- und Langsammetabolisierer eine klinische Relevanz in der Voraussage des individuellen Prä-Dosis-Spiegels und der Bioverfügbarkeit der beiden Antidepressiva besitzt.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

2.1.1. Patientencharakterisierung

An der Studie nahmen 75 gesunde Probanden, zumeist Studenten der FSU Jena, freiwillig teil. Die Rekrutierung und Untersuchung der Probanden fand in Zusammenarbeit mit der Klinik für Psychiatrie der Friedrich-Schiller-Universität Jena statt. Alle teilnehmenden Personen mussten folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Geschlecht: männlich
- Alter: 18-35 Jahre
- Körpergewicht: 60-85 kg
- Keine aktuelle Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf den Eigen- bzw. Fremdstoffwechsel des Körpers.
- Ausschluss physischer oder psychischer Erkrankungen nach ärztlicher Untersuchung und Erstellung eines EKG.

Die Untersuchungen erfolgten im Zeitraum Dezember 2000 bis Januar 2002. Die zuständige Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena äußerte keine Bedenken zur Durchführung der geplanten Studie. Eine Registrierung erfolgte beim Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM).

Nach erfolgter Voruntersuchung wurden in zufälliger Auswahl drei Gruppen mit jeweils fünfundzwanzig Probanden (Tab.1) gebildet.

- Gruppe 1 = Paroxetin
- Gruppe 2 = Reboxetin
- Gruppe 3 = Placebo

Mittlere Verteilung von Alter, Körpergewicht und Körpergröße der Probanden in den einzelnen Studiengruppen und insgesamt

	Alter (in Jahren)	Körpergewicht (in kg)	Körpergröße (in cm)
Paroxetin (n=25)	25,1 ± 3,3	74,6 ± 7,3	181 ± 6
Reboxetin (n=25)	25,1 ± 2,1	71,7 ± 6,8	180 ± 5
Placebo (n=25)	25,9 ± 3,5	71,3 ± 7,1	178 ± 5
gesamt (n=75)	25,4 ± 3,0	72,5 ± 7,1	180 ± 5

Tab.1: n = Probandenanzahl

2.1.2. Einnahme der Antidepressiva

Die Anleitung zur Medikamenteneinnahme sowie die notwendigen Blut- und Urinentnahmen und deren Analyse, erfolgten im Institut für Klinische Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Weitere Analysen erfolgten unter Mitarbeit des Neurochemischen Labors der Klinik für Psychiatrie der Universität Mainz und der Symbiomed GmbH Laboratorien, Jena.

In der so genannten Behandlungsphase erfolgte die Einnahme eines der beiden Antidepressiva oder eines Placebopräparates an 11 aufeinander folgenden Tagen (Tag 1-11), abhängig von der Gruppenzugehörigkeit.

Eingenommen wurden:

- Gruppe 1: **Paroxetin** (Tablette Seroxat®, GSK, München, Deutschland)
- Gruppe 2: **Reboxetin** (Tablette Edronax®, Pharmacia, Erlangen, Deutschland)
- Gruppe 3: **Placebo** (Tablette Placebo weiss®, Lichtenstein, Fürstenfeldbruck, Deutschland)

Die Einnahme fand regelmäßig morgens zusammen mit 200 ml Wasser nach folgender Dosierung statt:

- 1.Tag: $\frac{1}{2}$ Tablette Paroxetin (10 mg) / Reboxetin (2 mg) / Placebo
- 2.Tag: 1 Tablette Paroxetin (20 mg) / Reboxetin (4 mg) / Placebo
- 3.-11.Tag: 1 $\frac{1}{2}$ Tabletten Paroxetin (30 mg) / Reboxetin (6 mg) / Placebo

An den Tagen 10-11 der Behandlungsphase erfolgte die Medikamenteneinnahme in nüchternem Zustand, mit anschließender zwei- (Tag 10) bzw. dreistündiger (Tag 11) Nahrungskarenz und der Gabe von 200 ml Wasser. Keiner der Probanden konsumierte zwei Tage vor Beginn und während der Behandlungsphase Alkohol oder Grapefruitsaft. Während der Tage 10-11 der Behandlungsphase waren Essen und Trinken in Menge und Zeitpunkt standardisiert und die Teilnehmer verzichteten auf xanthinhaltige Speisen oder Getränke wie Kaffee, Schokolade oder Tee.

Nach Beendigung der Behandlungsphase und anschließender drei- bis vierwöchiger Pause, folgte eine Kontrollphase mit zwei weiteren Untersuchungstagen.

Behandlungsphase und Kontrollphase unterschieden sich nur durch die Einnahme der Medikation und den damit verbundenen zusätzlichen Blutentnahmen während der Behandlungsphase. Somit war neben dem interindividuellen Vergleich der verschiedenen Studiengruppen auch ein intra-individueller Vergleich zwischen Behandlungs- und Kontrollphase möglich.

2.1.3. Genotypisierung des CYP2D6

Als so genannten Wildtyp bezeichnet man das Allel CYP2D6*1. Da das Allel CYP2D6*2 in seinen funktionellen Eigenschaften und der Häufigkeit seines Auftretens (32%) ähnlich zu CYP2D6*1 (36%) ist (SACHSE et al., 1997), werden beide Allele im Folgenden unter dem Begriff Wildtyp zusammengefasst.

Die inaktiven PM- Allele CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 und CYP2D6*6 erklären in der kaukasischen Bevölkerung über 93% der PM-Phänotypen, weshalb sich die molekulare Diagnostik der PM meist auf diese vier Allele beschränkt (HERSBERGER M et al., 2000). Die Methode zur Erkennung des Defektallels CYP2D6*5 stand zum Zeitpunkt der vorliegenden Datenanalyse nicht zur Verfügung.

Am Morgen des 10. Tages der Behandlungsphase wurden 5,5 ml EDTA-Vollblut zur Analyse des CYP2D6 Genotyps entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Anschließend erfolgte die Isolation der genomischen DNA der Leukozyten mit QIAamp® DNA Blood Mini Kits. Die isolierte DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsenzym-Analyse auf die Allelmutationen CYP2D6*3 und CYP2D6*4 untersucht. Zum Nachweis der Allelmutation CYP2D6*3, eine Deletion von Adenosin, mittels des Restriktionsenzym Hpa II (268 bp), diente die Methode nach Smith (et al., 1992). Die Mutation CYP2D6*4 wird durch einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin verursacht und wurde mittels des Restriktionsenzym BstN I (334 bp) ebenfalls nach der Methode von Smith (SMITH et al., 1992) ermittelt. Die Allelmutation CYP2D6*6, eine Thymidindeletion, wurde nach allelspezifischer PCR anhand der Methode von Daly (DALY et al., 1996) analysiert. Ein Ultraschnellmetabolisierer des CYP2D6 als ein dupliziertes oder multipliziertes funktionelles Allel, kann nur in 30% der Fälle genetisch nachgewiesen werden (LOVLIE et al., 2001). Unsere Probanden wurden deshalb nicht explizit auf ein mögliches Vorkommen von UM untersucht.

2.1.4. Phänotypisierung von CYP2D6 mit Dextromethorphan

Jeder teilnehmende Proband erhielt zusätzlich zu der genotypischen Untersuchung auch eine phänotypische Testung bezüglich CYP2D6. Diese Phänotypisierung erfolgte mittels der Testsubstanz Dextromethorphan und wurde im Rahmen der Studie zweimal durchgeführt. Erstmals fand der Dextromethorphantest am Tag 11 der Behandlungsphase statt und wurde am Tag 2 der Kontrollphase, frühestens drei Wochen nach Beendigung der Behandlungsphase, wiederholt. Durch den Vergleich der Metabolitenkonzentrationen und -quotienten des Dextromethorphanabbaus aus beiden Phasen konnten die Werte sowohl interindividuell als auch intraindividuell verglichen werden.

Eine Abnahme der Substratkonzentration und/oder Zunahme der Produktkonzentration führt zu kleineren Werten des MQ und kann somit Ausdruck einer gesteigerten Enzymaktivität sein. Umgekehrt führt die Zunahme der Substratkonzentration und/oder die Abnahme der Produktkonzentration zu entsprechend größeren Werten des MQ und kann somit Ausdruck einer verminderten Enzymaktivität sein. Mittels des MQ kann eine veränderte Enzymaktivität besser beurteilt werden, da im Gegensatz zu den Absolutwerten der Metabolitenkonzentrationen das Verhältnis von Substrat und Produkt eines Metabolisierungsschrittes berücksichtigt wird. Mit dem Vergleich dieser beiden Parameter in der Kontroll- und Behandlungsphase wurde die phänotypische Prägung nach Einnahme von Paroxetin, Reboxetin oder Placebo qualitativ und quantitativ untersucht.

Jeder Proband nahm dazu 30 mg Dextromethorphanhydrobromid (1 Kapsel Hustenstilller ratiopharm®, ratiopharm, Ulm, Deutschland) zusammen mit 200 ml Wasser am Morgen des Untersuchungstages in nüchternem Zustand ein. Die Blutentnahmen zur Konzentrationsbestimmung des DEX und seiner Metaboliten DTX, 3-HM, 3-MM fanden anschließend zu folgenden Zeitpunkten statt:

- unmittelbar vor Einnahme des DEX
- 2 h nach Einnahme des DEX

Während dieser Zeit nahmen die Probanden kein Wasser und keine Nahrung zu sich. Das entnommene Blut wurde für 10 min bei 1600 g zentrifugiert und das gewonnene Serum bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen erfolgte anhand der Serumwerte 2 h nach Einnahme des DEX. Der Serumwert unmittelbar vor Einnahme des DEX diente als Leerwert.

2.1.5. Bestimmungen zur Pharmakokinetik beider Antidepressiva

Die Blutentnahmen zur Bestimmung der Pharmakokinetik und Beurteilung eines ausreichenden Plasmaspiegels der beiden Antidepressiva Paroxetin und Reboxetin fanden während der Tage 10 und 11 der Behandlungsphase zu folgenden Zeiten statt:

Tag 10:

- unmittelbar vor Einnahme des Medikamentes (= Prä-Dosis-Spiegel Tag 10),
- 9 h,
- 11¹/₂ h und
- 14 h nach Medikamenteneinnahme, sowie am

Tag 11:

- unmittelbar vor Einnahme des Medikamentes (= Prä-Dosis-Spiegel nach 24 h)

Die erste Plasmaspiegelbestimmung erfolgte neun Stunden nach oraler Applikation, da zu diesem Zeitpunkt die Verteilungsphase für Reboxetin beendet (Dostert et al., 1997) und für Paroxetin zumindest zum größten Teil abgeschlossen ist (KAYE et al., 1989). Die Blutproben (9 ml Serum-Monovetten) wurden für 10 min bei 1600 g zentrifugiert, das erhaltene Serum in 2 ml Polypropylen-Vials abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20⁰C gelagert. Nach erfolgter Analyse der Serumproben wurden folgende pharmakokinetischen Parameter berechnet:

- Prä-Dosis-Spiegel (C_{min}): entspricht der minimalen Serumkonzentration unter Sättigungsbedingungen (steady state), die beiden C_{min} zum Zeitpunkt Null (Tag 10) und 24 Stunden (Tag 11) wurden als mittlere Prä-Dosis-Spiegel zusammengefasst.
- Bioverfügbarkeit 9-24h (AUD - area under the data points): entspricht der Bioverfügbarkeit beider Antidepressiva pro Zeiteinheit ($h \cdot ng / ml$). Berechnet wird die Fläche (linear trapezoidal) unter den Datenpunkten (Messzeiten) 9, 11^{1/2}, 14 und 24 Stunden nach Medikamenteneinnahme am Tag 10.

Zur Analyse der pharmakokinetischen Parameter der Paroxetingruppe (n=25) standen nur n=24 Datensätze zur Verfügung, da die Bestimmung der Serumkonzentration zur Kinetik bei einem Probanden (CYP2D6 Genotyp EM) nicht erfolgen konnte.

2.2. Nachweismethoden

2.2.1. Nachweis von Dextromethorphan (DEX) und seiner Metaboliten Dextrorphan (DTX), 3-Hydroxymorphinan (3-HM) und 3-Methoxymorphinan (3-MM) im Serum

Der Nachweis von Dextromethorphan (DEX) und seinen Metaboliten Dextrorphan (DTX), 3-Hydroxymorphinan (3-HM) und 3-Methoxymorphinan (3-MM) im Serum erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach einer modifizierten Methode von WIELING et al. (2000).

Nach enzymatischer Spaltung der aufgetauten Serumprobe (Volumen 250 µl) und Hinzugabe von β-Glucuronidase (750 U/250 µl 0,1 M Na-acetat Puffer pH 5,0) wurden die Proben nach einer 16-stündigen Inkubation bei 37 °C mittels Flüssig-Flüssig-Phase-Extraktion aufgearbeitet. Hierzu fügte man allen Proben, außer den 0 h-Werten, zunächst einen internen Standard in Form von 50 µl Levallorphan (400 ng/ml) (Roche), eine Spatelspitze NaHCO₃ (pH-Kontrolle 8,5-9) und 6 ml n-Hexan / Ethylacetat (1:1) hinzu. Anschließend erfolgte nach 15 min Schütteln (1800 / min), 10 min Zentrifugieren (4000 U / min) und Verwerfen der wässrigen Phase ein Zusatz von 150 µl Essigsäure (3%) zur übrig gebliebenen organischen Phase. Nach weiteren 15 min Schütteln, 10 min Zentrifugieren, 15 min stehen lassen im Dunkeln und Überführen der wässrigen Phase in ein HPLC-Vial, sowie Verwerfen der organischen Phase wurden die Proben (ca. 100 µl / Vial) auf die Säulen des HPLC- Gerätes aufgebracht.

Die Kalibrierung und notwendige Qualitätskontrollen des Chromatographen wurden analog dem oben genannten Ablauf der Probenaufbereitung durchgeführt. Dabei wurden verwendet:

- Dextromethorphan (Sigma-Aldrich)
- Dextrorphan D-Tartrat (ICN Biomedicals Inc.)
- (+) -3-Methoxymorphinan-Hydrobromid (Roche)
- (+) -3-Hydroxymorphinan-Hydrobromid (Roche).

Die Konzentrationsbestimmungen fanden unter folgenden chromatographischen Bedingungen statt:

Säule:	Bischoff Waters-Spherisorb Nitrile, 250 x 4,0; 5 µm
Mobile Phase:	15 T Acetonitril / 84,94 T H ₂ O / 0,06 T Triethylamin, mit 85% Phosphorsäure auf pH 2,5 eingestellt
Flussrate:	1 ml / min
Stoppzeit:	12 min
Druck:	ca. 160 bar
Fluoreszenzdetektor:	RF-10 AxL 275 / 305 nm (Shimadzu, Japan)
Injektionsvolumen:	75 µl
Retentionszeiten:	4,5 min 3-Hydroxymorphinan (3-HM) 5,1 min Dextrorphan (DTX) 6,6 min Interner Standard Levallorphan 7,7 min 3-Methoxymorphinan (3-MM) 9,4 min Dextromethorphan (DEX)

Bei den Retentionszeiten von DEX, DTX, 3-HM und 3-MM zeigten sich im Leerserum keine interferierenden Serumpeaks untereinander.

Dagegen wiesen hohe Konzentrationen von Reboxetin eine schwache Fluoreszenz mit schmalen Peak während der Retention von DEX auf. Die DEX- Serumwerte der Reboxetingruppe wurden deshalb korrelierend zu den

Konzentrationen des Reboxetins korrigiert. Der Korrekturfaktor stammte aus der Analyse des Reboxetinstandards.

Paroxetin zeigte keine interferierende Fluoreszenz mit anderen Retentionszeiten.

Letztendlich wurden alle erhaltenen Konzentrationen in molare Verhältnisse umgerechnet.

2.2.1.1. Validierung

Die analytische Bestimmungsgrenze aller Metaboliten betrug 1 ng / ml Serum. Für geringere Konzentrationen wurden zur weiteren Datenanalyse 50 % der Bestimmungsgrenze (0,5 ng / ml) angenommen.

Die Kalibrationskurven von DEX und seinen Metaboliten DTX, 3-HM und 3-MM gewährten in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 1 – 1000 ng / ml Linearität und wurden als Variationskoeffizient (s%) des Quotienten (Peakhöhe der Metaboliten [DEX, DTX, 3-HM, 3-MM] zu Peakhöhe des internen Standards Levallorphan) zu der jeweiligen Konzentration bestimmt.

Die lineare Regression wurde unter Nutzung des Statistikprogrammes SPSS mittels der Kalibrationsproben errechnet, wobei eine Wichtung von $1 / x^2$ vorgenommen wurde.

Die Ungenauigkeiten innerhalb eines Tages waren für jede Substanz < 5 % und im Vergleich verschiedener Tage < 7 %.

Die mittlere Wiederfindungsrate betrug folgende Werte:

DEX = 94,3 %; DTX = 99,8 %; 3-HM = 60,8 %; 3-MM = 100,6 % und Levallorphan = 102 %.

2.2.2. Nachweis der Antidepressiva Reboxetin und Paroxetin im Serum

Die Bestimmung der Serumkonzentrationen für Reboxetin und Paroxetin erfolgte im Neurochemischen Labor der Klinik für Psychiatrie der Universität Mainz mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach den von HIEMKE und HÄRTTER entwickelten Methoden für Paroxetin (HÄRTTER et al., 1994) und Reboxetin (HÄRTTER et al., 2000). Als Material diente das bei -20°C aufbewahrte Probandenserum.

Die minimale analytische Bestimmungsgrenze für Paroxetin betrug 10 ng / ml . Für geringere Konzentrationen wurden 50% der minimalen Bestimmungsgrenze (5 ng / ml) zur weiteren Datenanalyse angenommen. Linearität zwischen gemessener und tatsächlicher Paroxetinkonzentration bestand im untersuchten Konzentrationsbereich von $0 - 500\text{ ng / ml}$ ($0 - 1500\text{ nmol / l}$). Der mittlere Korrelationskoeffizienten betrug dabei $r = 0,996 \pm 0,0035$. Die mittlere Wiederfindungsrate betrug 107% und die mittleren Variationskoeffizienten waren innerhalb eines Tages $6,6\%$ und zwischen verschiedenen Tagen $8,54\%$.

Die minimal mögliche analytische Bestimmungsgrenze für Reboxetin betrug 15 ng / ml bei 273 nm Wellenlänge. Im untersuchten Konzentrationsbereich wurden Werte von $17 - 608\text{ ng / ml}$ Reboxetin gemessen.

Die Serumkonzentrationen von Paroxetin und Reboxetin setzten sich sowohl aus dem an Plasmaproteine gebundenen als auch dem freien ungebundenen Anteil der beiden Substanzen zusammen.

2.3. Berechnung der pharmakokinetischen Parameter beider Antidepressiva

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter der beiden Antidepressiva Paroxetin und Reboxetin erfolgte anhand der Serumkonzentrationen der Tage 10 und 11. Diese wurde nach einer kompartmentunabhängigen Methode mit Hilfe des MS-DOS Programms TOPFIT (Version 2.0) durchgeführt.

Die Regressionsanalyse erfolgte über die Zeitpunkte 9 h, 11,5 h, 14 h und 24 Stunden nach Medikamentenapplikation am Tag 10.

2.4. Statistische Berechnung

Messwerte in Tabellen und grafische Darstellungen wurden als arithmetische Mittelwerte (\bar{X}) mit Standardabweichung (SD) angegeben. Zur Ermittlung einer Signifikanz diente bei allen durchgeführten statistischen Tests ein Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$. Der Vergleich von Kontroll- und Behandlungsphase einer einzigen Stichprobe erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für gepaarte Stichproben. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsphase sind an den entsprechenden Stelle der Tabellen und Grafiken mit * gekennzeichnet.

Ein statistischer Vergleich der verschiedenen Genotypen EM, IM und PM erfolgte mittels des Mann-Whitney-U-Tests für ungepaarte Stichproben. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen wurden in den Tabellen mit ° gekennzeichnet. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem PC-Programm SPSS Ausgabe 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. CYP2D6 Genotypen des Probandengutes

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließender Restriktionsfragmentlängen-Analyse der isolierten DNA wurden Anzahl und Verteilung der verschiedenen Allelkombinationen des CYP2D6 (Abb.2) und die daraus resultierende phänotypische Prägung in Schnellmetabolisierer (EM), Intermediärmetabolisierer (IM) und Langsammetabolisierer (PM) innerhalb der drei Studiengruppen Paroxetin, Reboxetin und Placebo (Abb.2, Tab.2) ermittelt (n = Anzahl der Probanden):

EM (n=42) charakterisiert durch zwei funktionelle Allele vom Wildtyp (wt / wt)

IM (n=27) charakterisiert durch ein funktionelles Allel vom Wildtyp kombiniert mit einem defekten Allel: wt / *3 (n=1), wt / *4 (n=25), wt / *6 (n=1)

PM (n=6) charakterisiert durch zwei defekte Allele: *4 / *4 (n=3), *6 / *6 (n=1), *3 / *4 (n=1), *4 / *6 (n=1)

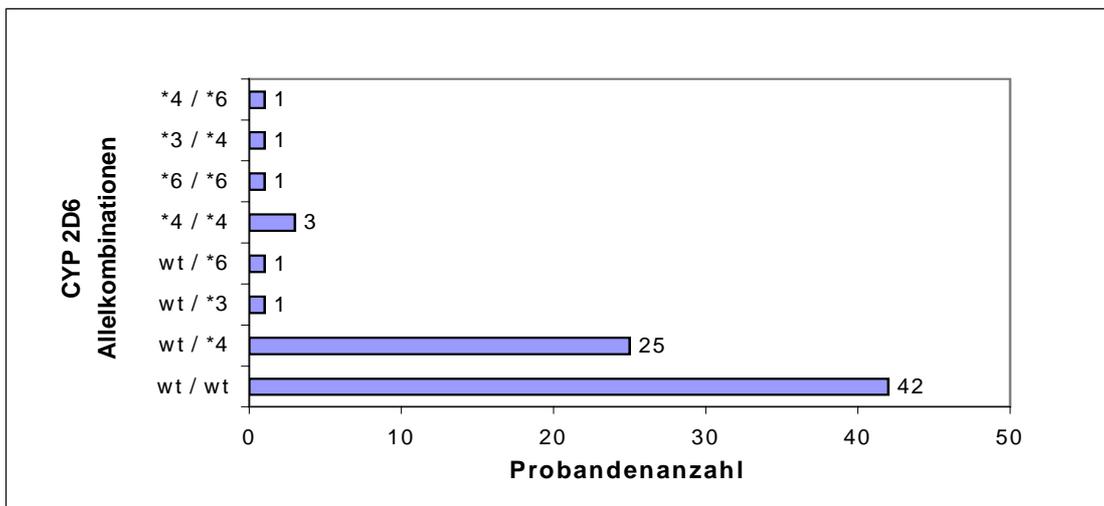


Abb.2: Anzahl und Verteilung der Allelkombinationen des CYP2D6 aller Probanden.
wt – Wildtyp (funktionelles Allel); *3, *4, *6 – Allelmutationen (funktionslos)

Anzahl und Verteilung der verschiedenen CYP2D6 Genotypen EM, IM und PM innerhalb der drei Studiengruppen Paroxetin, Reboxetin und Placebo

	EM	IM	PM
Paroxetin	18	6	1
Reboxetin	9	13	3
Placebo	15	8	2
gesamt	42	27	6

Tab.2: EM-, IM-, PM-CYP2D6 Genotyp

Die prozentuale Häufigkeit von PM, IM und EM, aller in die Studie eingeschlossenen 75 Probanden (Abb. 3a), entspricht der bekannten Verteilung der Genotypen des Enzyms CYP2D6 bei Probanden kaukasischen Ursprungs und repräsentiert somit unseren Bevölkerungsdurchschnitt. Innerhalb der einzelnen Gruppen treten teilweise abweichende Verteilungen auf. In der Reboxetingruppe (Abb. 3c) sind mehrheitlich Probanden mit IM-Genotyp (52%) vertreten, verbunden mit einer Unterrepräsentation der EM-Genotypen (36%). Innerhalb der Paroxetin- (Abb. 3b) und Placebogruppe (Abb. 3d) dagegen überwiegen deutlich die EM-Genotypen. Diese Befunde resultieren aus der randomisierten Zuordnung der Probanden.

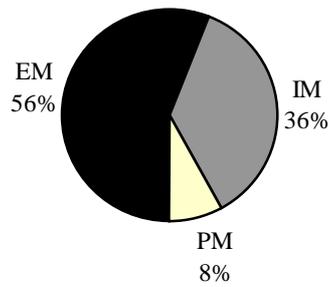


Abb. 3a
(n=75)

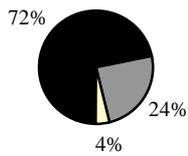


Abb. 3b (Paroxetin)

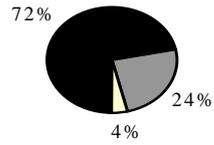


Abb. 3b (Paroxetin)

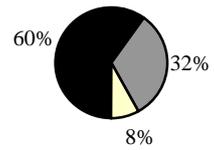


Abb. 3d (Placebo)

Abb.3: Prozentuale Verteilung der CYP2D6 Genotypen

EM  IM  und PM 

a) bei allen Probanden (n=75), **b)** in der Paroxetingruppe (n=25),
c) in der Reboxetingruppe (n=25), **d)** in der Placebogruppe (n=25)

3.2. Zusammenhang zwischen CYP2D6 Genotyp und Abbau der Testsubstanz Dextromethorphan in der Kontrollphase

3.2.1. Serumkonzentrationen von DEX und seinen Metaboliten

Eine Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von DEX und seinen Metaboliten DTX, 3-HM und 3-MM von den verschiedenen CYP2D6 Genotypen wurde wie erwartet durch den Dextromethorphan-Test der Kontrollphase bestätigt und zur Veranschaulichung grafisch dargestellt (Abb.4). Die schnellmetabolisierenden Probanden (EM) unterschieden sich von allen anderen Probanden (IM und PM) sowohl durch signifikant geringere DEX- und 3-MM-Konzentrationen als auch durch signifikant höhere Konzentrationen von DTX und 3-HM (Tab.3). Die Probanden mit IM-Genotyp unterschieden sich in selber Weise nochmals signifikant von den PM-Genotypen.

Mittlere Serumkonzentrationen (nmol/l) von DEX und seinen Metaboliten aller Probanden 2h nach Einnahme einer Testdosis von 30 mg Dextromethorphan in der Kontrollphase geordnet nach den CYP2D6 Genotypen (EM, IM, PM)

		DEX	DTX	3-HM	3-MM
EM (n=42)	X	1,8	1455	576	1,9
	SD	1,7	236	123	0,7
IM (n=27)	X	4,2*	1253*	485*	3,0*
	SD	3,9	339	141	1,2
PM (n=6)	X	40*°	27*°	11*°	5,8*°
	SD	22	12	4,5	3,5

Tab.3: X-arithmetischer Mittelwert, SD-Standardabweichung,

* = Signifikanz zur EM-Gruppe, ° = Signifikanz zur IM-Gruppe

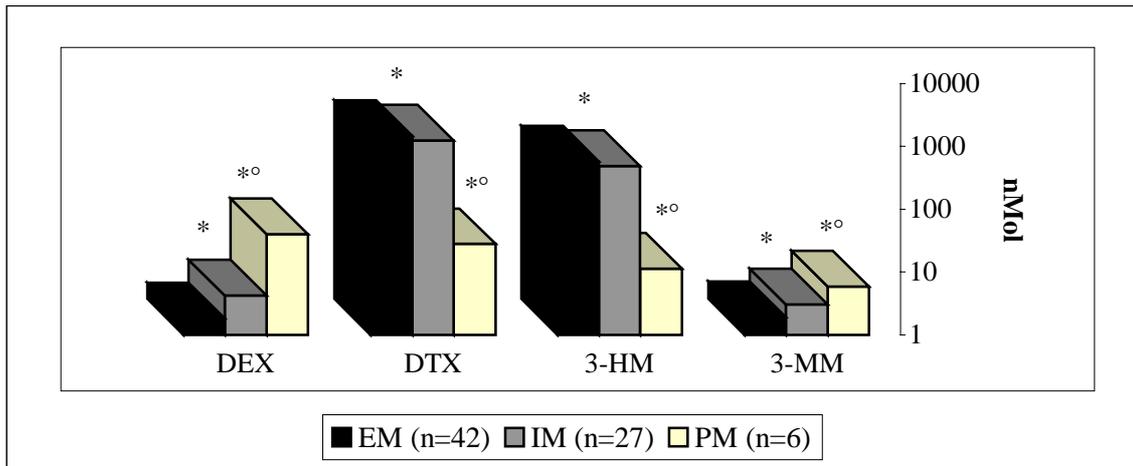


Abb.4: Serumkonzentrationen (nmol/l) von DEX und seinen Metaboliten aller Probanden der Kontrollphase 2h nach Einnahme einer Testdosis von 30 mg Dextromethorphan in Abhängigkeit der CYP2D6 Genotypen (EM, IM, PM), * = Signifikanz zum EM-Genotyp, *° = Signifikanz zum IM-Genotyp

3.2.2. Metabolitenquotienten des Dextromethorphanabbaus als Maß für die Geschwindigkeit der Metabolisierung

Die Metabolitenquotienten (MQ) des Dextromethorphanabbaus während der Kontrollphase unterschieden sich innerhalb der verschiedenen CYP2D6 Genotypen (EM, IM, PM). Das bedeutet, es bestanden unterschiedliche Geschwindigkeiten im Abbau der Testsubstanz DEX. Beide mittleren errechneten Quotienten der Metabolisierungsschritte, welche durch das Enzym CYP2D6 katalysiert werden, waren signifikant höher bei den Probanden mit IM- und PM- verglichen zu denen mit EM-Genotyp. Der MQ DEX / DTX war bei den PM (1200-fach) und IM (3-fach) höher als bei den EM. In geringerem Maße war der MQ 3-MM / 3-HM bei den PM (150-fach) und IM (2-fach) höher zu denen der EM-Gruppe (Tab.4). Diese signifikanten Unterschiede der CYP2D6-Aktivität zwischen den verschiedenen Genotypen sind am Beispiel des MQ DEX / DTX für alle Probanden dargestellt (Abb.5). In der Abbildung 5 sind trotz klarer signifikanter Unterschiede im mittleren Durchschnitt

Überschneidungen in der phänotypischen Charakterisierung zwischen den Einzelwerten der Gruppen EM und IM zu beobachten.

Die CYP3A4 katalysierten Metabolisierungsschritte ergaben einen nahezu unveränderten MQ DTX / 3-HM bei allen CYP2D6-Genotypen, wohingegen der MQ DEX / 3-MM in der IM-Gruppe geringfügig und in der PM-Gruppe signifikant höher war als der Vergleichswert in der EM-Gruppe (Tab.4.).

Mittlere Metabolitenquotienten (logarithmiert) aller Probanden während der Kontrollphase in Abhängigkeit der CYP2D6 Genotypen (EM, IM, PM)

		CYP2D6		CYP3A4	
		DEX / DTX	3-MM / 3-HM	DTX / 3-HM	DEX / 3-MM
EM (n=42)	X	-2,97	-2,51	0,41	-0,06
	SD	0,20	0,15	0,11	0,21
IM (n=27)	X	-2,64*	-2,23*	0,42	0,01
	SD	0,45	0,23	0,09	0,42
PM (n=6)	X	0,12*°	-0,33*°	0,39	0,83*°
	SD	0,26	0,15	0,06	0,11

Tab.4: X-arithmetischer Mittelwert, SD-Standardabweichung, * = Signifikanz zum EM-Genotyp, ° = Signifikanz zum IM-Genotyp

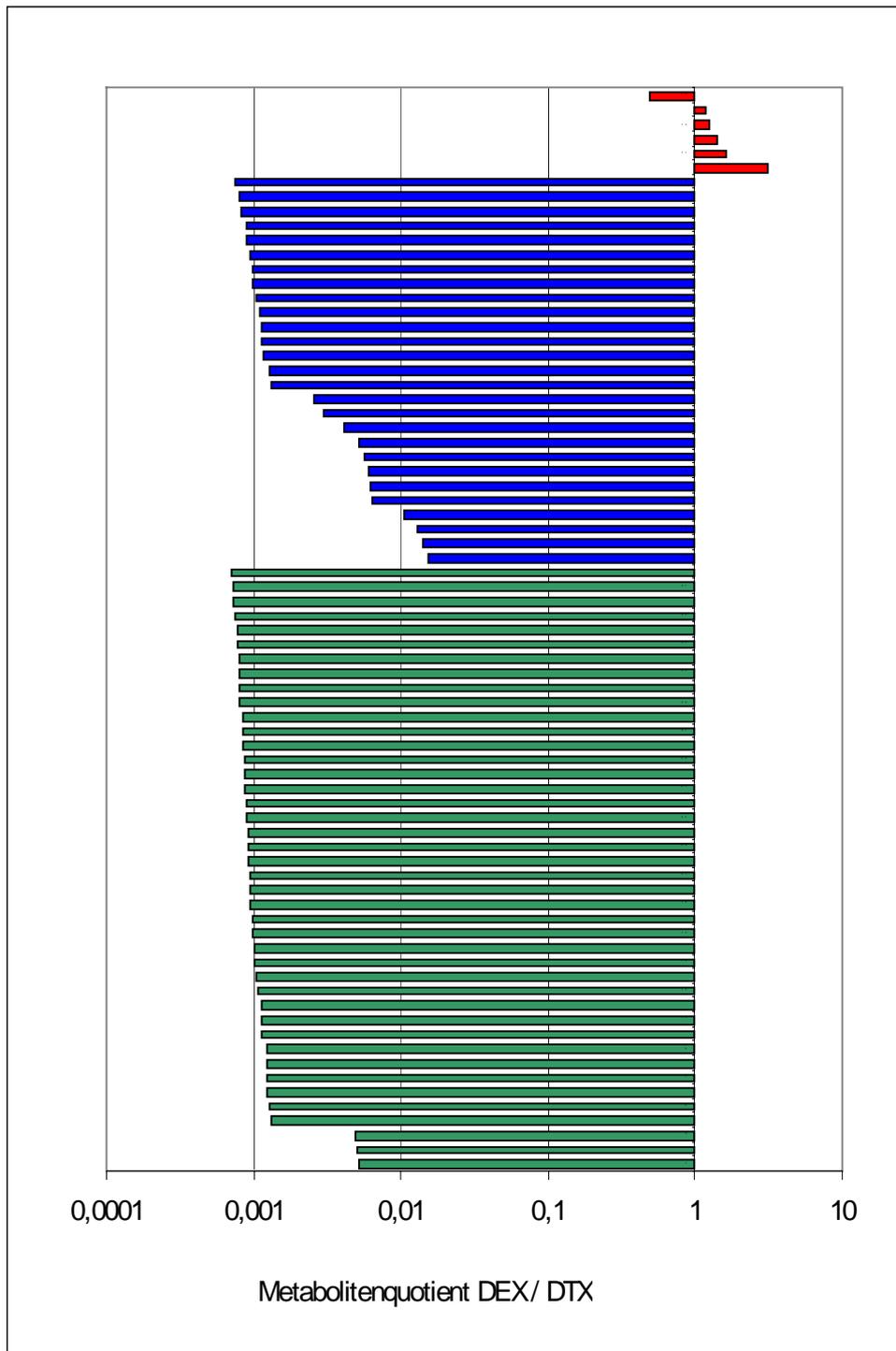


Abb.5: Zusammenhang zwischen CYP2D6-Genotyp und -Phänotyp am Beispiel des Metabolitenquotienten DEX / DTX in der Kontrollphase. grün- EM, blau- IM, rot- PM

3.3. Einfluss der Paroxetin-, Reboxetin- oder Placeboeinnahme auf den Phänotyp (Vergleich der beiden Dextromethorphan tests aus Kontroll- und Behandlungsphase)

Bei gemeinsamer Betrachtung aller Probanden konnten signifikante Unterschiede der Serumkonzentrationen und Metabolitenquotienten zwischen den drei verschiedenen CYP2D6 Genotypen nachgewiesen werden (siehe 3.2.). Aus diesem Grund werden bei der nun folgenden Auswertung der drei Probandengruppen (je nach Behandlung) auch die jeweiligen Genotypen getrennt voneinander betrachtet.

3.3.1. Auswirkungen auf die Langsammetabolisierer unter den Probanden

Unabhängig von der Einnahme von Paroxetin, Reboxetin oder eines Placebopräparates blieben die Serumkonzentrationen von DEX und seiner Metaboliten aller Langsammetabolisierer (PM) sowohl vor als auch nach der Behandlung unverändert (Tab.5, Abb.6). In die folgende Auswertung werden deshalb nur IM und EM einbezogen.

Sowohl in der Kontroll- als auch Behandlungsphase waren die Serumkonzentrationen der PM signifikant unterschiedlich zu den Genotypen EM und IM. Im Speziellen bedeutete das höhere Konzentrationen der CYP2D6-Substrate DEX und 3-MM bzw. niedrigere Konzentrationen der Metaboliten DTX und 3-HM bei den PM im Vergleich zu den Probanden mit den Genotypen EM und IM.

Mittlere Serumkonzentrationen (nmol/l) von DEX und seinen Metaboliten aller Probanden mit dem CYP2D6 Genotyp PM (n=6) in Kontroll- und Behandlungsphase

	DEX		DTX		3-HM		3-MM	
	K	B	K	B	K	B	K	B
X	34	40	29	28	12	11	6	6
SD	14	22	14	12	5	4	3	4

Tab.5: X-arithmetischer Mittelwert, SD-Standardabweichung, K-Kontrolle, B-Behandlung

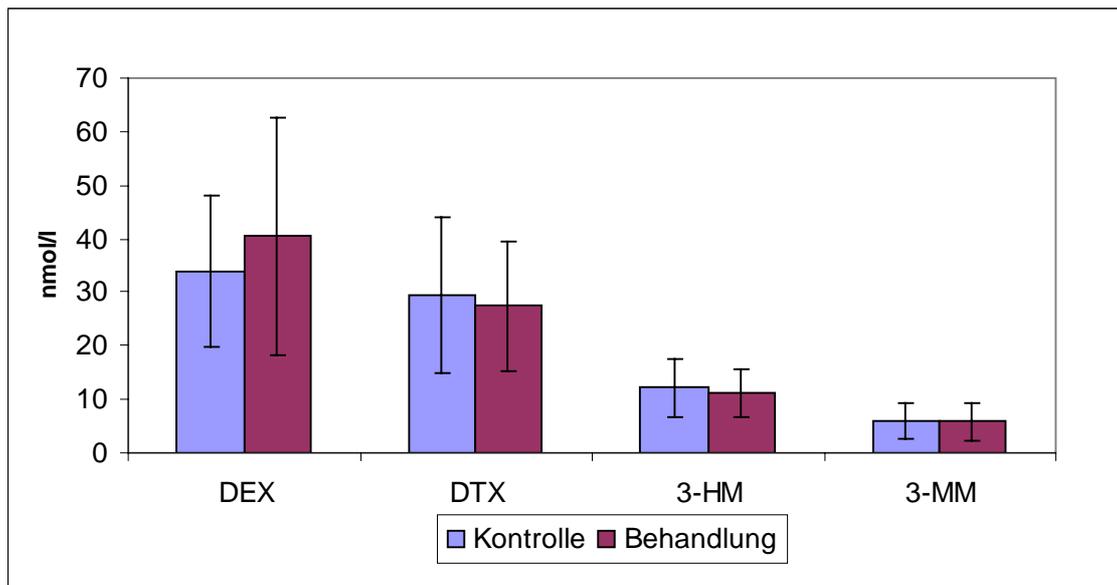


Abb.6: Serumkonzentrationen (nmol/l) von DEX und seinen Metaboliten aller Probanden mit dem CYP2D6 Genotyp **PM** (n=6) in Kontroll- und Behandlungsphase

3.3.2. Auswirkungen auf die Schnell- und Intermediärmetabolisierer unter den Probanden

3.3.2.1. Gegenüberstellung von Kontroll- und Behandlungsphase der Paroxetingruppe

Die Metabolitenkonzentrationen der Paroxetingruppe waren in der Behandlungsphase bei allen Probanden mit EM- bzw. IM- Genotyp signifikant verändert im Vergleich zu der Kontrollphase. Dabei waren die Konzentrationen von DEX und 3-MM höher bzw. von DTX und 3-HM niedriger als in der Kontrollphase (Abb.7). Für die Abbildung 7 wurde eine logarithmische Skalierung der Grafik gewählt, um die Serumkonzentrationen aller vier Substanzen gemeinsam abzubilden. Ein vorhandener signifikanter Unterschied zwischen EM-Genotypen und IM-Genotypen innerhalb der Behandlungsphase kommt aufgrund der logarithmischen Skalierung nicht ausreichend zur Geltung, ist aber mit ° an entsprechender Stelle gekennzeichnet und in Tabelle 9 zusammenfassend für alle Gruppen numerisch ausgedrückt.

Auch beide CYP2D6 spezifischen Metabolitenquotienten DEX / DTX , $3-MM / 3-HM$ und ihr kombinierter MQ ($DEX+3-MM / DTX+3-HM$) waren für EM und IM signifikant größer in der Behandlungsphase. EM-Genotypen unterschieden sich nochmals signifikant von den IM-Genotypen (Tab.6, oberer Teil).

Die CYP3A4 spezifischen Metabolitenquotienten zeigten ebenfalls Veränderungen gegenüber der Kontrollphase. Ein signifikanter Unterschied trat aber nur bei der Probandengruppe mit EM-Genotyp auf, die in der Behandlungsphase kleinere Werte für den MQ $DTX / 3-HM$ und den kombinierten MQ $DEX+DTX / 3-MM+3-HM$ aufwiesen (Tab.6, unterer Teil). Alle MQ in der Tabelle 6 und in den entsprechenden Tabellen der Reboxetin- und Placebogruppe wurden zur übersichtlicheren Erfassung in logarithmierten Werten dargestellt.

Es ergaben sich in der Paroxetingruppe somit signifikante Unterschiede bei DEX und allen anderen Metabolitenkonzentrationen und weiterhin bei allen Metabolitenquotienten des CYP2D6 sowie bei $DTX / 3-HM$ und den kombinierten MQ des CYP3A4.

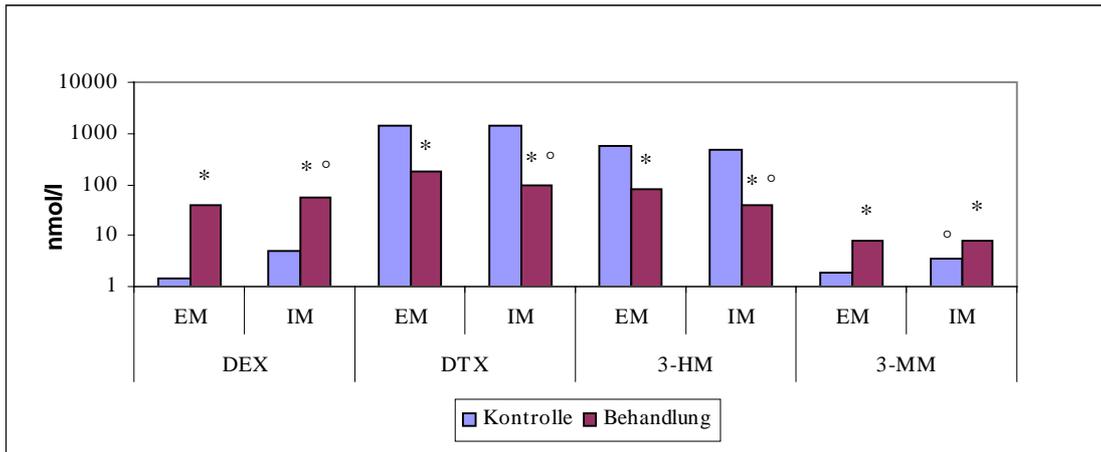


Abb.7: Logarithmische Darstellung der Serumkonzentrationen (EM und IM) von Dextromethorphan und seinen Metaboliten der Paroxetingruppe während Kontroll- und Behandlungsphase, * = signifikant ($p < 0.05$) zur Kontrolle, ° = signifikant ($p < 0.05$) zum EM-Genotyp

Logarithmierte MQ der Probanden mit den CYP2D6 Genotypen EM / IM der Paroxetingruppe in Kontroll- und Behandlungsphase

CYP2D6		DEX / DTX		3-MM / 3-HM		DEX+3-MM / DTX+3-HM	
		Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung
Paroxetin	EM	-3,02 ± 0,07	-0,66* ± 0,20	-2,51 ± 0,142	-1,0* ± 0,18	-2,80 ± 0,07	-0,73* ± 0,18
	IM	-2,62 ± 0,45	-0,24*° ± 0,13	-2,15 ± 0,05	-0,69*° ± 0,15	-2,39 ± 0,24	-0,33*° ± 0,13

CYP3A4		DTX / 3-HM		DEX / 3-MM		DEX+DTX / 3-MM+3-HM	
		Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung
Paroxetin	EM	0,41 ± 0,12	0,36 ± 0,11	-0,10 ± 0,13	0,70* ± 0,14	0,41 ± 0,12	0,41 ± 0,09
	IM	0,47 ± 0,08	0,39* ± 0,10	-0,01 ± 0,50	0,84* ± 0,12	0,47 ± 0,08	0,50 ± 0,10

Tab.6: * = signifikant zur Kontrolle, ° = signifikant zum EM-Genotyp

3.3.2.2. Kontroll- und Behandlungsphase der Reboxetingruppe

Unter der Einnahme von Reboxetin waren niedrigere DTX-Konzentrationen von Probanden mit EM-Genotyp die einzigen signifikanten Unterschiede zur Kontrollphase (Abb.8). Im Vergleich der MQ von Kontroll- und Behandlungsphase ergaben sich signifikant niedrigere Werte bei Probanden mit EM-Genotyp für den CYP3A4 assoziierten MQ DTX / 3-HM und den kombinierten MQ DEX+DTX / 3-MM+3-HM (Tab.7). Zusätzlich zu den erwähnten Signifikanzen zwischen Kontroll- und Behandlungsphase gab es Unterschiede zwischen Schnellmetabolisierern und Intermediärmetabolisierern. Die EM hatten unter Reboxetieneinnahme signifikant höhere DTX- und 3-HM-Konzentrationen sowie signifikant geringere 3-MM-Konzentrationen als die IM (Abb. 8).

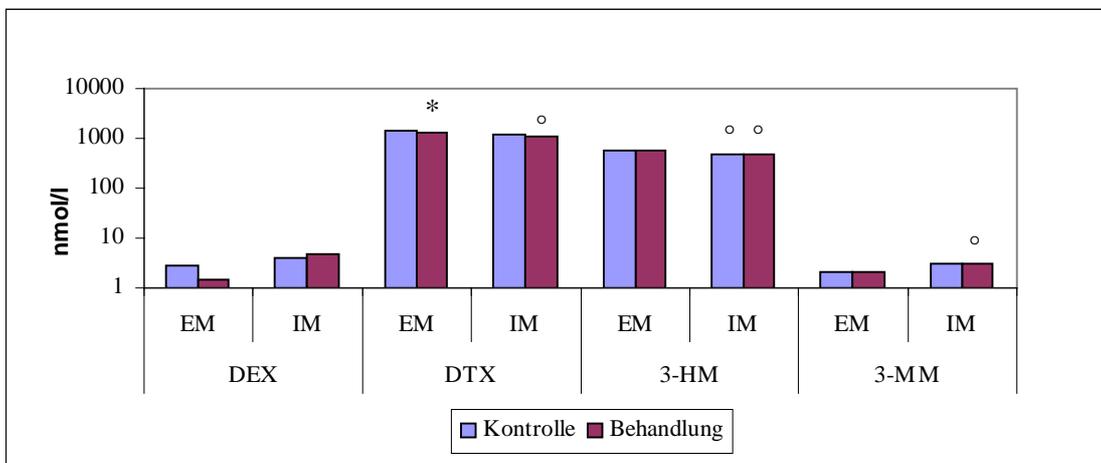


Abb.8: Logarithmische Darstellung der Serumkonzentrationen (EM und IM) von Dextromethorphan und seinen Metaboliten der Reboxetingruppe während Kontroll- und Behandlungsphase, * = signifikant ($p < 0.05$) zur Kontrolle, ° = signifikant ($p < 0.05$) zum EM-Genotyp

**Logarithmierte MQ der Probanden mit den CYP2D6 Genotypen EM / IM
der Reboxetingruppe in Kontroll- und Behandlungsphase**

CYP2D6		DEX / DTX		3-MM / 3-HM		DEX+3-MM / DTX+3-HM	
		Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung
Reboxetin	EM	-2,85 ± 0,32	-2,98 ± 0,06	-2,47 ± 0,18	-2,49 ± 0,18	-2,68 ± 0,24	-2,76 ± 0,11
	IM	-2,62 ± 0,43	-2,52 ± 0,36	-2,24 ± 0,24	-2,20 ± 0,231	-2,43 ± 0,28	-2,37 ± 0,23

CYP3A4		DTX / 3-HM		DEX / 3-MM		DEX+DTX / 3-MM+3-HM	
		Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung
Reboxetin	EM	0,39 ± 0,09	0,34* ± 0,07	0,01 ± 0,33	-0,15 ± 0,15	0,39 ± 0,09	0,34* ± 0,07
	IM	0,41 ± 0,1	0,37 ± 0,08	0,03 ± 0,42	0,05 ± 0,36	0,40 ± 0,10	0,37 ± 0,08

Tab.7: * = signifikant zur Kontrolle

3.3.2.3. Kontroll- und Behandlungsphase der Placebogruppe

Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsphase für die Serumkonzentrationen von DEX und seinen Metaboliten sowie die Metabolitenquotienten (Abb.9, Tab.8). Auch die Probanden mit dem Genotyp EM unterschieden sich nicht signifikant von denen mit Genotyp IM (Tab.8).

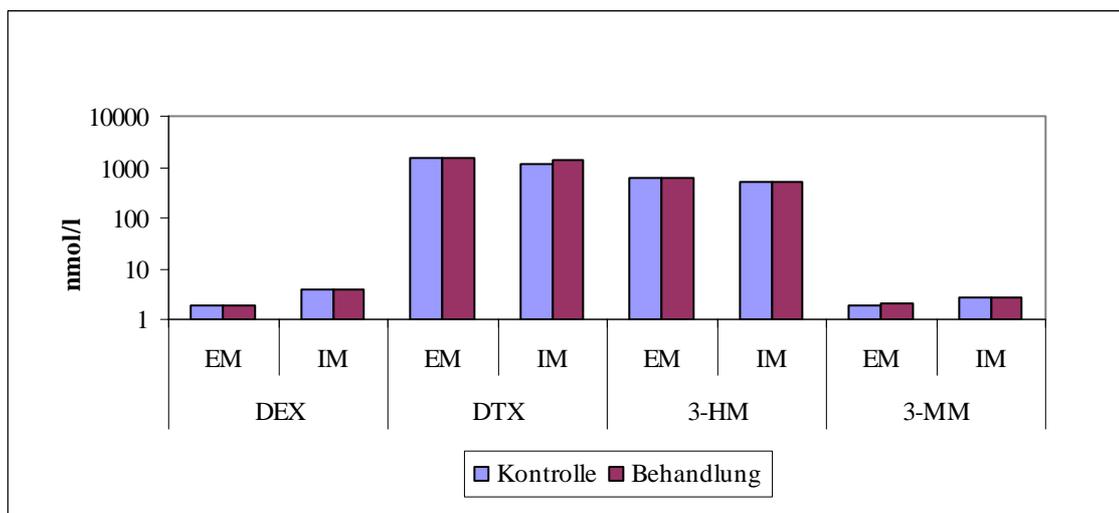


Abb.9: Logarithmische Darstellung der Serumkonzentrationen (EM und IM) von Dextromethorphan und seinen Metaboliten der Placebogruppe während Kontroll- und Behandlungsphase

**Logarithmierte MQ der Probanden mit den CYP2D6 Genotypen EM / IM
der Placebogruppe in Kontroll- und Behandlungsphase**

CYP2D6		DEX / DTX		3-MM / 3-HM		DEX+3-MM / DTX+3-HM	
		Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung
Placebo	EM	-2,99 ± 0,21	-2,96 ± 0,22	-2,52 ± 0,14	-2,51 ± 0,16	-2,80 ± 0,16	-2,76 ± 0,18
	IM	-2,67 ± 0,54	-2,74 ± 0,52	-2,27 ± 0,31	-2,29 ± 0,25	-2,48 ± 0,41	-2,53 ± 0,37

CYP3A4		DTX / 3-HM		DEX / 3-MM		DEX+DTX / 3-MM+3-HM	
		Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung	Kontrolle	Behandlung
Placebo	EM	0,42 ± 0,12	0,39 ± 0,07	-0,05 ± 0,22	-0,06 ± 0,20	0,42 ± 0,12	0,39 ± 0,07
	IM	0,39 ± 0,07	0,41 ± 0,14	-0,01 ± 0,41	-0,04 ± 0,38	0,39 ± 0,07	0,41 ± 0,14

Tab.8: EM-Schnellmetabolisierer, IM-Intermediärmetabolisierer,

3.3.3 Gemeinsamer Vergleich von Paroxetin-, Reboxetin- und Placebogruppe während Kontroll- und Behandlungsphase

3.3.3.1. Serumkonzentrationen von DEX und seinen Metaboliten

In Tabelle 9 sind die mittleren Serumkonzentrationen für DEX und seine Metaboliten aller Probanden mit Genotyp EM bzw. IM aufgeführt. Daraus geht deutlich hervor, dass es unter Einnahme von *Paroxetin* zu signifikanten Konzentrationsänderungen der Muttersubstanz DEX und der weiteren Metaboliten im Vergleich zur Kontrolle kommt. Im Einzelnen heißt das, eine Konzentrationsabnahme der Abbauprodukte des CYP2D6 Metabolismus (DTX und 3-HM) und eine starke Konzentrationszunahme der Ausgangssubstanz DEX bzw. weniger stark von 3-MM. Diese Änderungen wirkten sich stärker bei den Probanden mit EM-Genotyp als bei denen mit IM-Genotyp aus.

Unter der Einnahme von *Reboxetin* kam es durch Konzentrationsabnahme des Metaboliten DTX bei den EM-Genotypen zu der einzigen signifikanten Veränderung im Vergleich zur Kontrollphase. Weiterhin unterschieden sich die Genotypen EM und IM signifikant in den Konzentrationen der Metabolite DTX und 3-MM in der Behandlungsphase sowie bei 3-HM in beiden Phasen.

Die Einnahme eines Placebopräparates hatte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede im Vergleich zur Kontrollphase zur Folge.

Die nahezu einheitlichen Konzentrationen beim Abbau von DEX und seinen Metaboliten der Langsammetabolisierer aller drei Behandlungsgruppen wurden gemeinsam bereits im Kapitel 3.3.1. beurteilt.

Serumkonzentrationen (nmol/l) von DEX und seinen Metaboliten während der Kontroll- und Behandlungsphase für Probanden mit dem CYP2D6 Genotyp EM und IM in den Studiengruppen Paroxetin, Reboxetin, Placebo

		DEX		DTX		3-HM		3-MM	
		K	B	K	B	K	B	K	B
Parox	EM	1,4 ± 0	39* ± 13	1420 ± 233	177* ± 58	566 ± 147	79* ± 32	1,8 ± 0,6	7,8* ± 2,6
	IM	4,8 ± 4,2	56*° ± 19	1403 ± 353	94*° ± 15	477 ± 125	39*° ± 8,4	3,4° ± 1,0	7,9* ± 1,5
Rebox	EM	2,8 ± 2,8	1,4 ± 0	1433 ± 205	1306* ± 184	589 ± 82	599 ± 68	2,1 ± 0,9	2,0 ± 0,8
	IM	4,1 ± 3,4	4,6 ± 3,8	1226 ± 258	1138° ± 212	487° ± 135	496° ± 148	3,0 ± 1,2	3,1° ± 0,8
Plac	EM	1,8 ± 1,7	1,9 ± 1,5	1511 ± 260	1478 ± 174	582 ± 119	608 ± 108	1,8 ± 0,7	2,0 ± 0,7
	IM	4,0 ± 5,0	3,9 ± 5,0	1185 ± 447	1313 ± 449	487 ± 180	529 ± 212	2,7 ± 1,5	2,8 ± 1,4

Tab.9: K-Kontrolle, B-Behandlung, Parox-Paroxetin, Rebox-Reboxetin, Plac-Placebo, EM- Schnellmetabolisierer, IM- Intermediärmetabolisierer, * = signifikant zur Kontrolle, ° = signifikant zum EM-Genotyp

3.3.3.2. Metabolitenquotienten

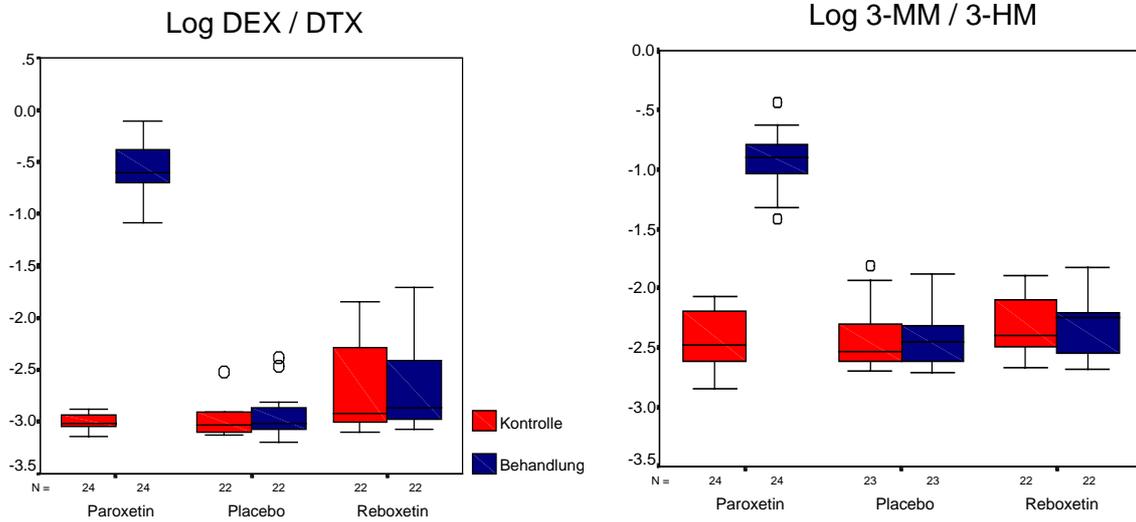
Die Abbildung 10 zeigt die vier Metabolitenquotienten des Dextromethorphanabbaus DEX / DTX , $DEX / 3-MM$, $DTX / 3-HM$ und $3-MM / 3-HM$ in logarithmierten Werten der Kontroll- und Behandlungsphase. In der Abbildung wurde eine gemeinsame Darstellung der MQ- Werte für die Probanden mit EM- und IM- Genotyp gewählt. Dadurch soll gezeigt werden, dass trotz fehlender genotypischer Differenzierung zwischen EM- und IM- Genotyp die möglichen Veränderungen der MQ- Werte nach einer Einnahme von Paroxetin, Reboxetin oder Placebo in der Boxplotdarstellung deutlich zu erkennen sind. Nach Einnahme von Paroxetin vermindert sich, in der Abb.10 deutlich sichtbar, die Aktivität des Enzyms CYP2D6. Zum Ausdruck gebracht, wird das auch durch die signifikante Vergrößerung der Quotienten DEX / DTX (270-fach) und $3-MM / 3-HM$ (33-fach) unter Paroxetineinnahme.

Ebenfalls signifikant größer in der Behandlungsphase war der CYP3A4-spezifische MQ $DEX / 3-MM$ (7-fach), wohingegen der andere CYP3A4-spezifische MQ $DTX / 3-HM$ unter Paroxetineinnahme leicht abnahm (0,9-facher Wert).

Ein Vergleich aller Metabolitenquotienten zwischen Kontrolle und dem Einfluss einer 11-tägigen Einnahme von Reboxetin zeigte bei fehlender genotypischer Differenzierung zwischen EM- und IM-Genotyp im Mittel keine signifikanten Unterschiede der Metabolisierung durch CYP2D6 und CYP3A4 (Abb.10). Betrachtet man allerdings die Schnellmetabolisierer (EM) isoliert, so sind der Quotient $DTX / 3-HM$ und der kombinierte CYP3A4-spezifische Quotient $(DEX+DTX / 3-MM+3-HM)$ signifikant größer als in der Kontrollphase (Tab.7).

Die Verabreichung eines Placebopräparates führte - wie erwartet - zu keiner Veränderung zwischen Kontroll- und Behandlungsphase (Abb.10).

CYP2D6



CYP3A4

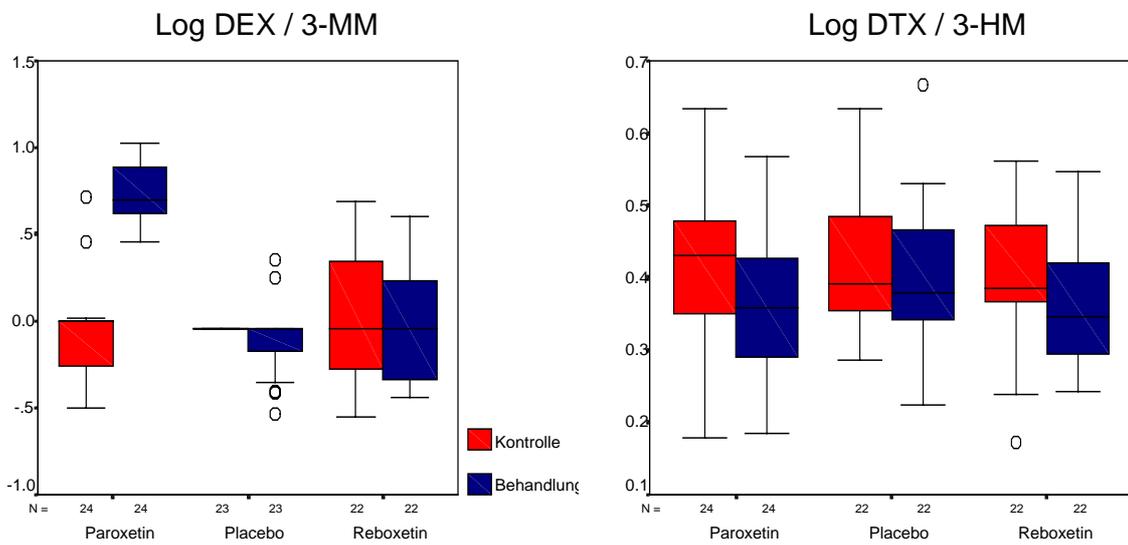


Abb.10: Boxplotdarstellung der logarithmierten Metabolitenquotienten des Abbaus von DEX, geordnet nach Kontroll- und Behandlungsphase der jeweiligen Studiengruppe (Paroxetin, Placebo, Reboxetin), O = Ausreißer

3.4. Pharmakokinetik der Antidepressiva Reboxetin und Paroxetin mit Bezugnahme auf die verschiedenen CYP2D6 Genotypen

In Abbildung 10 (Paroxetin) und 11 (Reboxetin) sind die Verläufe der mittleren Serumkonzentrationen für beide untersuchten Antidepressiva am 10. und 11. Einnahmetag dargestellt.

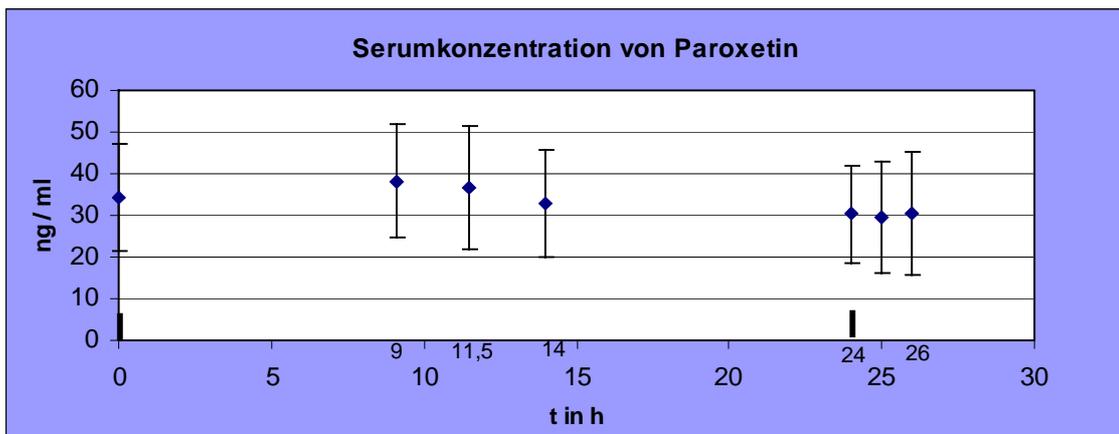


Abb. 10: Serumkonzentrationen vor (0h + 24h) bzw. nach Einnahme (|) von 30 mg Paroxetin (9h; 11,5h; 14h; 25h; 26h) am 10. und 11. Untersuchungstag

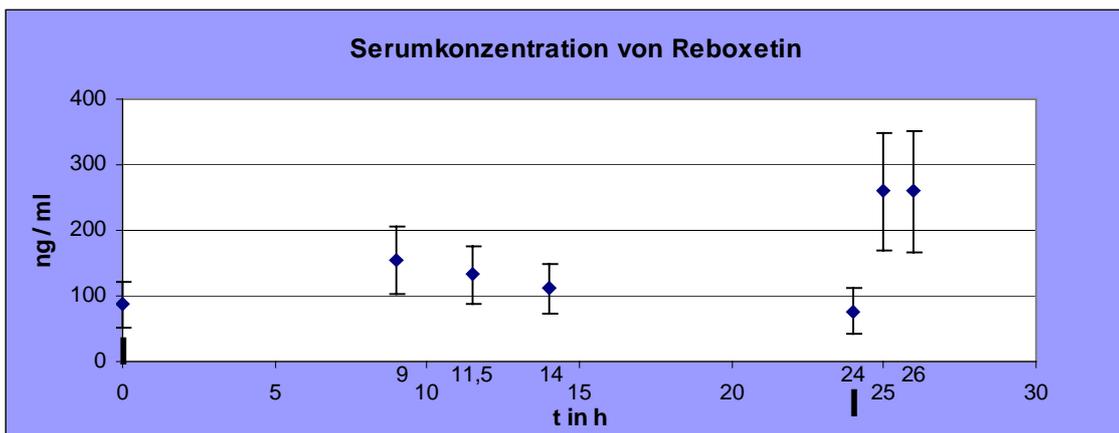


Abb. 11: Serumkonzentrationen vor (0h + 24h) bzw. nach Einnahme (|) von 6 mg Reboxetin (9h; 11,5h; 14h; 25h; 26h) am 10. und 11. Untersuchungstag

3.4.1. Prä-Dosis-Spiegel (C_{min}) von Paroxetin

Nach Einnahme von Paroxetin lag der Prä-Dosis-Spiegel in der Gruppe der Intermediärmetabolisierer im Durchschnitt bei $42,0 \pm 16,6$ ng / ml und somit signifikant höher als in der Gruppe der Schnellmetabolisierer mit einer mittleren Konzentration von $27,4 \pm 13,7$ ng / ml (Tab.10). Der einzelne als Langsammetabolisierer charakterisierte Proband hatte einen deutlich höheren Prä-Dosis-Spiegel von 56 ng / ml, verglichen zu den Mittelwerten der beiden anderen Gruppen (Tab.10). Wegen der Probandenanzahl $n=1$ war aber kein statistischer Vergleich mit den anderen Gruppen möglich.

Mittlerer Prä-Dosis-Spiegel vor Einnahme von einmal täglich 30 mg Paroxetin am 10. und 11. Untersuchungstag

Paroxetin	Genotyp	C _{min}
	EM (n=17)	$27,4 \pm 13,7$
	IM (n=6)	$42,0^{\circ} \pm 16,6$
	PM (n=1)	56

Tab.10: C_{min} – Prä-Dosis-Spiegel (ng / ml), EM- Schnellmetabolisierer, IM- Intermediärmetabolisierer, PM- Langsammetabolisierer
° = signifikant zum EM-Genotyp

In der Abbildung 12 sind die individuellen Prä-Dosis-Spiegel aller Probanden nach Einnahme von Paroxetin dargestellt. Trotz des signifikanten Unterschiedes zwischen den mittleren Konzentrationen von Schnell- (EM) und Intermediärmetabolisierern (IM) (Tab.10), kommt es neben den interindividuellen Schwankungen zwischen Probanden gleichen Genotyps auch zu Überschneidungen zwischen den Probanden verschiedenen Genotyps. Beides ist aus der Abbildung 12 deutlich erkennbar.

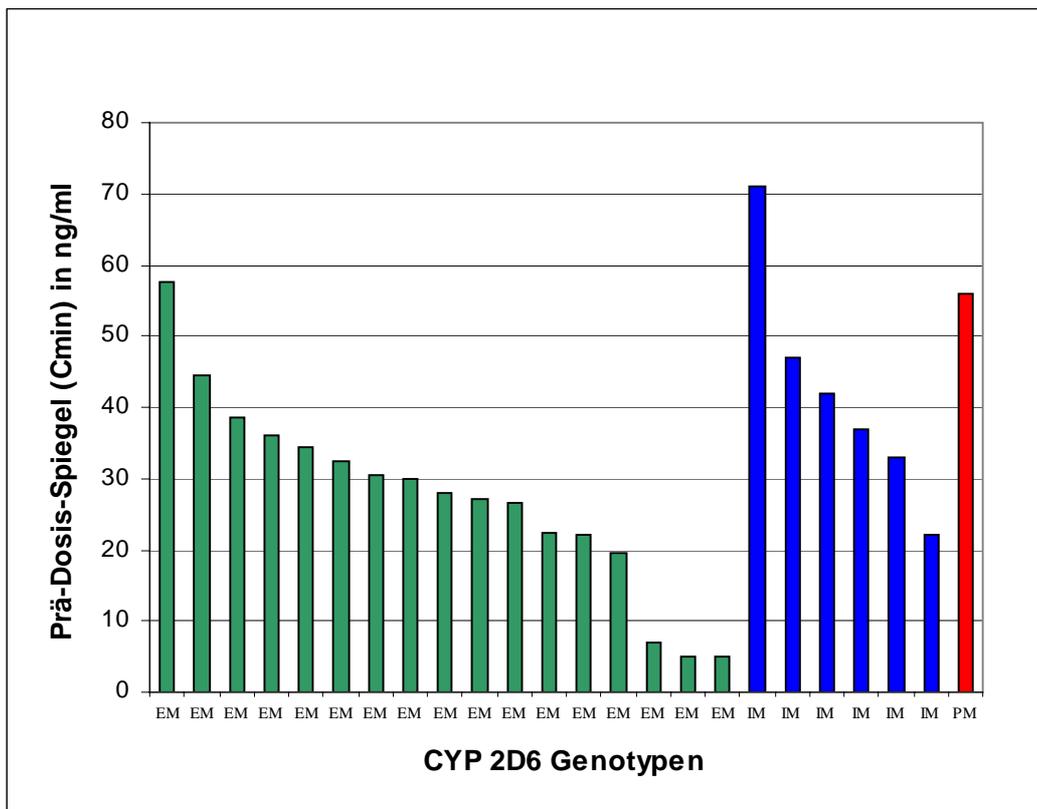


Abb.12: Prä-Dosis-Spiegel (ng / ml) aller Probanden der Paroxetingruppe
 EM- Schnellmetabolisierer, IM- Intermediärmetabolisierer,
 PM- Langsammetabolisierer

3.4.2. Prä-Dosis-Spiegel (Cmin) von Reboxetin

Nach Einnahme von Reboxetin betrug der mittlere Prä-Dosis-Spiegel $82,2 \pm 45,2$ ng / ml. Zwischen den verschiedenen Genotypen EM (77 ± 59 ng / ml), IM (86 ± 39 ng / ml) und PM (78 ± 38 ng / ml) trat kein signifikanter Unterschied auf (Tab.11).

Mittlerer Prä-Dosis-Spiegel vor Einnahme von einmal täglich 6 mg Reboxetin am 10. und 11. Untersuchungstag

Reboxetin	Genotyp	Cmin
	EM (n=9)	$76,6 \pm 58,7$
	IM (n=13)	$86,4 \pm 39,0$
	PM (n=3)	$77,6 \pm 38,1$

Tab.11: Cmin – Prä-Dosis-Spiegel (ng / ml), n = Probandenanzahl

In der Abbildung 13 sind die individuellen Prä-Dosis-Spiegel aller Probanden nach Einnahme von Reboxetin dargestellt. Ähnlich wie in der Paroxetingruppe sind sowohl die interindividuellen Schwankungen innerhalb als auch Überschneidungen zwischen den Probanden der beiden Gruppen EM und IM in der Abbildung erkennbar. Im Unterschied zur Einnahme von Paroxetin bestand aber kein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren Konzentrationen von EM-, IM- und PM- Genotypen (Tab.11).

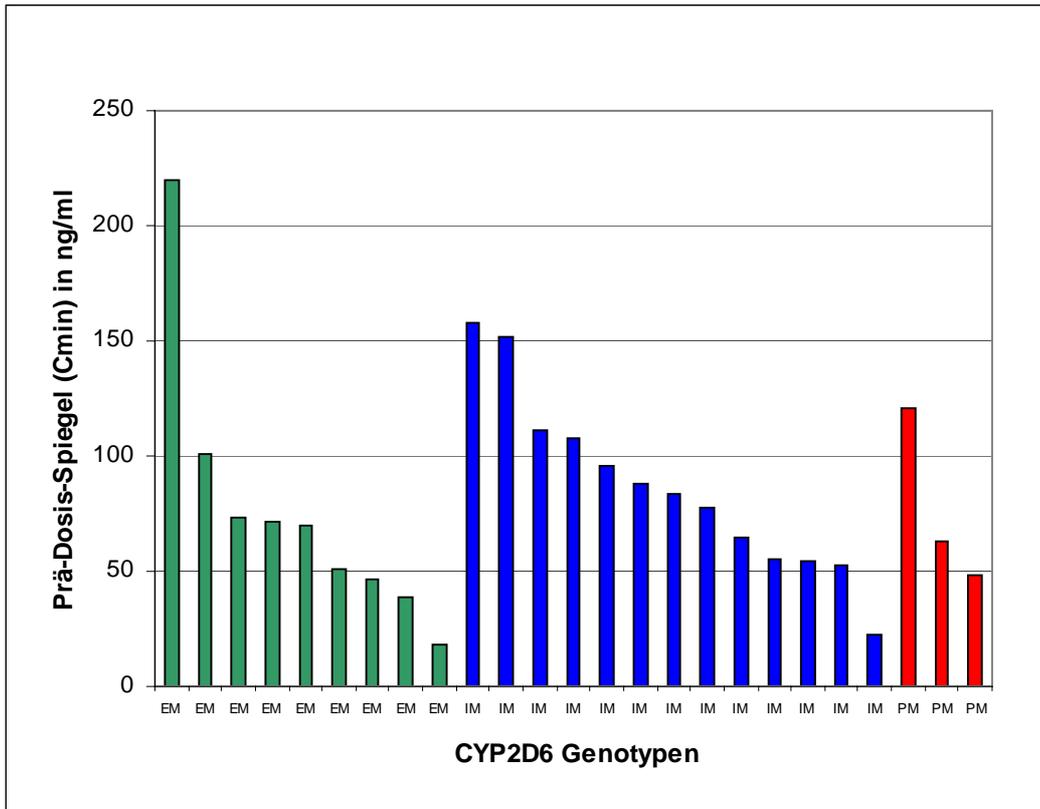


Abb.13: Prä-Dosis-Spiegel (ng / ml) aller Probanden der Rebooxetingruppe
 EM- Schnellmetabolisierer, IM- Intermediärmetabolisierer,
 PM- Langsammetabolisierer

3.4.3. AUD (9-24 h) von Paroxetin

In der Paroxetingruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den CYP2D6 Genotypen EM und IM bezüglich der mittleren AUD (Tab.12). Die AUD der EM- Genotypen (426 ± 216 ng / ml *h) war kleiner als die der IM- Genotypen (618 ± 241 ng / ml *h). Der einzelne Proband mit PM- Genotyp wies mit 954 ng / ml *h die höchste AUD nach Einnahme von Paroxetin auf.

**Mittlere AUD (9-24 h)
nach Einnahme von 30 mg Paroxetin am 10. Untersuchungstag**

Paroxetin	Genotyp	AUD (9-24 h)
	EM (n=17)	426 ± 216
	IM (n=6)	618 ± 241
	PM (n=1)	954

Tab.12: AUD in ng / ml *h

3.4.4. AUD (9-24 h) von Reboxetin

Nach Einnahme von Reboxetin betrug die mittlere AUD des Antidepressivums bei den Probanden der Reboxetingruppe 1588 ± 843 ng / ml *h. Zwischen den Probanden mit unterschiedlichen CYP2D6 Genotyp traten keine signifikanten Unterschiede der AUD auf (Tab.13).

AUD (9-24 h)
nach Einnahme von 6 mg Reboxetin am 10. Untersuchungstag

Reboxetin	Genotyp	AUD (9-24 h)
	EM (n=9)	1535 ± 1123
	IM (n=13)	1718 ± 662
	PM (n=3)	1183 ± 684

Tab.13: AUD in ng / ml *h

3.4.5. Zusammenhänge zwischen pharmakokinetischen Parametern und ermittelten Phänotyp im Vergleich zum bestehenden CYP2D6 Genotyp

Die Darstellung der mittleren Prä-Dosis-Spiegel als Einzelwerte für jeden Probanden, gegliedert nach genetisch charakterisierten Typ (EM, IM, PM), verdeutlicht in beiden Behandlungsgruppen (Abb.14 und 15) die großen inter-individuellen Schwankungen dieses Parameters (jeweils linke Grafik der Abb. 14 und 15). Dies gilt für den Parameter MQ DEX / DTX nicht, wie aus der jeweils rechten Grafik in der Abb. 14 und 15 hervorgeht. Obwohl sich die mittleren Konzentrationen von Paroxetin zwischen Probanden mit IM- und EM-Genotyp signifikant voneinander unterscheiden, zeigt die Betrachtung der

Einzelwerte, wie sich im Individualfall die Paroxetin-Konzentrationen bei den Probanden mit unterschiedlichem Genotyp auch gleichen können. Die großen Schwankungen der Prä-Dosis-Spiegel, z.B. innerhalb der Schnellmetabolisierer, sind bei Betrachtung des MQ DEX / DTX dagegen nicht zu finden (Abb.14).

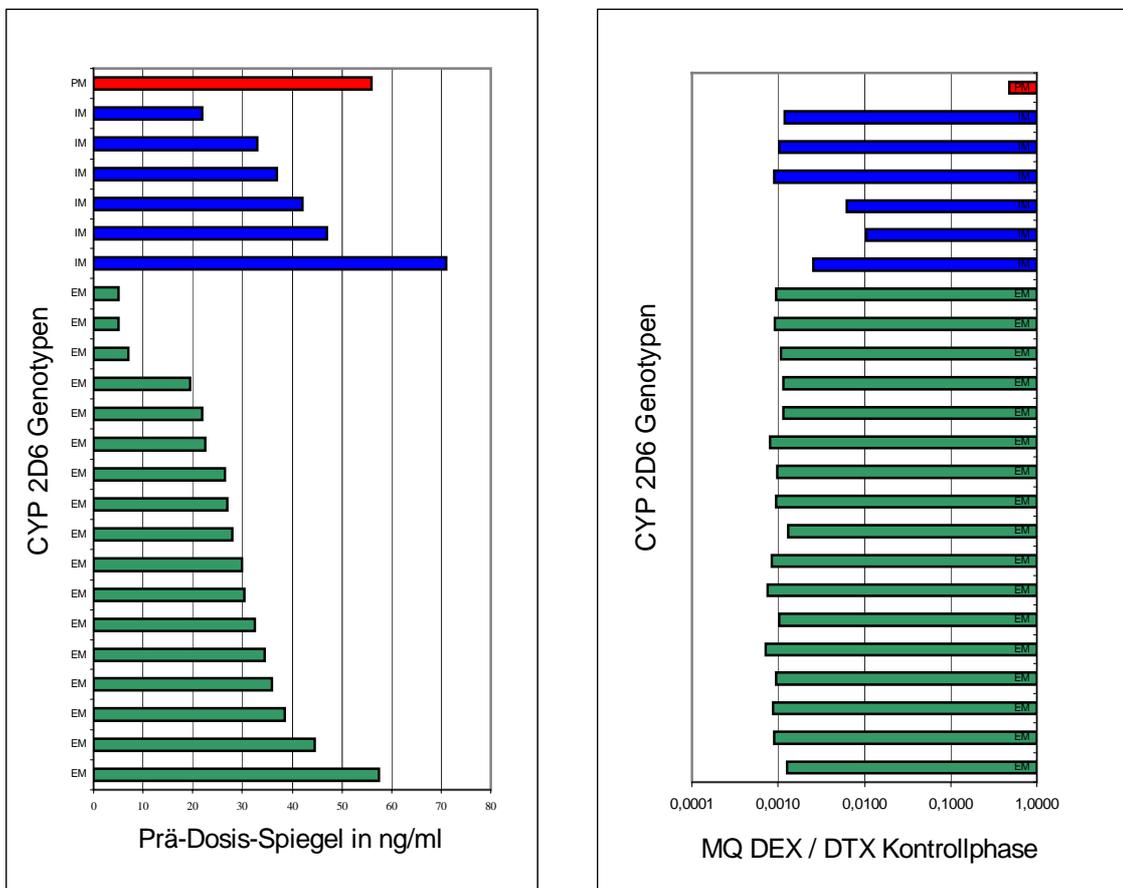


Abb.14: Gegenüberstellung des Paroxetin- Prä-Dosis-Spiegels gegliedert nach Genotyp (links) und CYP2D6-spezifischen MQ DEX / DTX (rechts) der entsprechenden Probanden in der Kontrollphase (n=24)

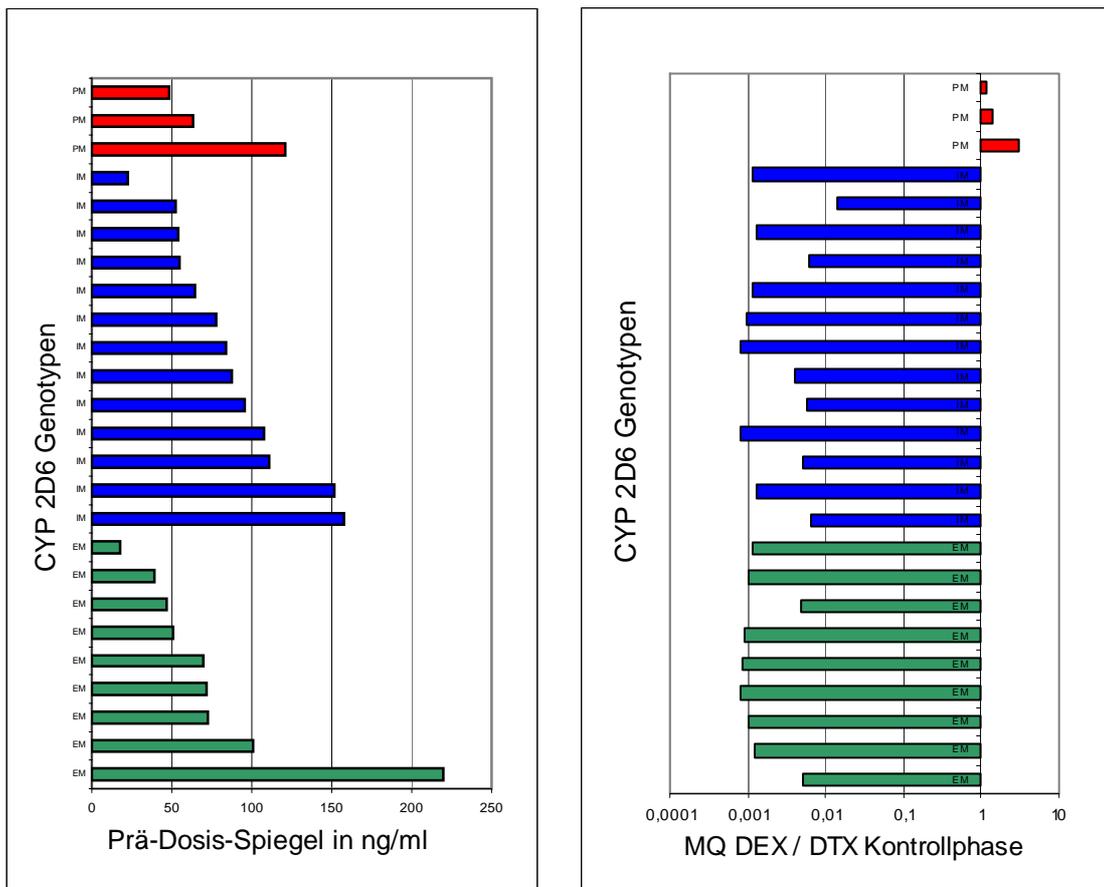


Abb.15: Gegenüberstellung des Reboxetin- Prä-Dosis-Spiegels gegliedert nach Genotyp (links) und CYP2D6-spezifischen MQ DEX / DTX (rechts) der entsprechenden Probanden in der Kontrollphase (n=25)

3.4.6. Korrelation der pharmakokinetischen Parameter der Antidepressiva zu den Metabolitenquotienten des DEX- Abbaus vor und nach der Behandlung

3.4.6.1. Paroxetin

Für alle Probanden (außer PM, n=1) der Paroxetingruppe wurde überprüft, ob eine lineare Korrelation nach Pearson zwischen den MQ des DEX- Abbaus und den pharmakokinetischen Parametern C_{min} bzw. AUD vor und nach Paroxetineinnahme besteht. Dabei zeigte sich, dass unter der Behandlung mit Paroxetin der C_{min} sehr gut (Signifikanz $p \leq 0,01$) mit dem MQ 3-MM / 3-HM der EM- Genotypen ($r = 0,687$; $p = 0,002$) sowie mit dem MQ von IM- und EM- Genotypen gemeinsam ($r = 0,604$; $p = 0,002$) korrelierte. Weniger stark (Signifikanz $p \leq 0,05$) korrelierte C_{min} mit den kombinierten MQ DEX+3-MM / DTX+3-HM ($r = 0,442$; $p = 0,031$) und DEX+DTX / 3-MM+3-HM ($r = 0,422$; $p = 0,040$).

In der Kontrollphase korrelierte der C_{min} der IM- Genotypen signifikant mit den MQ DEX / DTX ($r = 0,833$; $p = 0,039$) und DEX / 3-MM ($r = 0,814$; $p = 0,049$) dieser Probanden. Ebenso korrelierte der gemeinsame C_{min} der IM- und EM- Genotypen mit den gemeinsamen MQ DEX / DTX ($r = 0,589$; $p = 0,002$), MQ DEX / 3-MM ($r = 0,465$; $p = 0,022$) und den kombinierten MQ DEX+3-MM / DTX+3-HM ($r = 0,507$; $p = 0,011$).

Zwischen der AUD und den MQ kam es in der Behandlungs- und Kontrollphase in keinem Fall zu einer signifikanten Korrelation.

3.4.6.2. Reboxetin

Nach Einnahme von Reboxetin bestanden keine signifikanten Unterschiede der pharmakokinetischen Parameter C_{min} und AUD zwischen den verschiedenen CYP2D6- Phänotypen der Probanden.

Eine signifikante lineare Korrelation zwischen den MQ und AUD bzw. C_{min} bestand in der gesamten Reboxetingruppe nur einmalig für die Probanden mit PM- Genotyp zwischen den MQ DEX / 3-MM der Behandlungsphase und dem C_{min} ($r = -1,000$; $p = 0,017$) (Tab.15).

Alle Probanden mit Genotyp EM oder IM wiesen Korrelationskoeffizienten (r) zwischen $-0,3 \geq r \leq 0,3$ auf und zeigten dabei keine Signifikanzen. In der Tabelle 15 sind deshalb nur die Korrelationskoeffizienten der PM- Genotypen präsentiert.

Korrelationskoeffizienten (r) nach PEARSON zwischen den MQ und AUD bzw. MQ und C_{min} der PM nach Einnahme von DEX und Reboxetin

		DEX / DTX		3-MM / 3-HM		DTX / 3-HM		DEX / 3-MM	
		K	B	K	B	K	B	K	B
PM	AUD	0,921	-0,285	0,672	-0,571	-0,983	-0,792	0,904	-0,960
	C _{min}	0,996	0,020	0,865	-0,294	-0,881	-0,940	0,732	-1,000*

Tab.15: AUD- Bioverfügbarkeit, C_{min}- Prä-Dosis-Spiegel, K- Kontrolle, B- Behandlung,

* = Korrelation ist auf dem Niveau $p \leq 0,05$ (2-seitig) signifikant,

4. Diskussion

4.1. Genotypisierung des CYP 2D6

Die Häufigkeit der einzelnen Allele innerhalb unseres Probandengutes stimmt mit der angenommenen Verteilung in der kaukasischen Bevölkerung (SACHSE et al., 1997) überein. Neben dem intakten Allel vom Wildtyp wurden die Mutationen CYP2D6*3, CYP2D6*4 und CYP2D6*6 festgestellt. Als häufigste Allelmutation unter Kaukasiern gilt CYP2D6*4 (SACHSE et al., 1997). Bei 25 Probanden unseres Probandengutes trat CYP2D6*4 heterozygot zusammen mit einem Allel vom Wildtyp auf und bedingte somit die Mehrzahl aller aufgetretenen IM (n = 27). Drei Probanden zeigten ein homozygotes Vorkommen dieses Mutationstyps, wodurch dieser auch die häufigste Ursache (50%) für das Auftreten eines PM darstellte.

Die Allelmutation CYP2D6*5, welche bei homozygoten Vorkommen, d.h. kein Erhalt eines PCR- Produktes, ebenfalls zur Ausprägung eines manifesten PM führt, trat nicht homozygot auf, dies wäre durch fehlende Banden in der PCR zu sehen gewesen. Daraufhin wurde auf eine genaue Überprüfung der Probanden bezüglich eines heterozygoten Auftretens dieser Allelmutation verzichtet. Die Häufigkeit der Mutation CYP2D6*5 wird, wie die des CYP2D6*3, mit ca. 2% beschrieben (SACHSE et al., 1997). Es ist daher möglich, dass einige Probanden in der Genotypisierung als EM eingestuft wurden, tatsächlich aber IM- Genotypen sind und als solche unentdeckt blieben.

4.2. Zusammenhang zwischen CYP2D6 Genotyp und Serumkonzentrationen bzw. Metabolitenquotienten des Dextromethorphanabbaus in der Kontrollphase

Unterscheidet man in der Aktivität des CYP2D6 nur zwischen EM und PM so werden im Allgemeinen gute Korrelationen zwischen Phänotyp und Genotyp gefunden (WIELING et al., 2000; SCHWAB et al., 2002). Trotz der Etablierung zuverlässiger Verfahren zur Genotypisierung spielt die Phänotypisierung als eine weit verbreitete und gut etablierte Methode zur Bestimmung der CYP2D6-Aktivität mittels der Messung des Metabolismus der Modellsubstanz Dextromethorphan (JACQZ-AIGRAIN et al., 1993; KÖHLER et al., 1997), weiterhin eine wichtige Rolle. Als Aktivitätsmarker von CYP2D6 dient der Quotient von Muttersubstanz (DEX) und O-demethyliertem Hauptmetabolit (DTX), der nach einer gewissen Zeit post applicationem bestimmt wird (SCHMID et al., 1985). Der alternative Abbauweg von DEX, eine N-Demethylierung zu 3-MM, wird hauptsächlich durch das Enzym CYP3A4 katalysiert. Trotz der vermuteten Beteiligung anderer CYP-Enzyme an dieser Reaktion (WANG and UNADKAT, 1999; VON MOLTKE et al., 1998) dient die Bestimmung des MQ DEX / 3-MM als Aktivitätsmarker für das Enzym CYP 3A4 (JONES et al., 1996b). Die erforderlichen Konzentrationsmessungen von DEX und seinen Metaboliten können entweder im Urin (SCHMID et al., 1985) oder im Serum (MORTIMER et al., 1989) erfolgen. Beide Verfahren sind qualitativ gleichwertig (CHLADEK et al., 2000), wobei interindividuelle Variabilitäten der molaren Konzentrationen im Serum geringer als im Urin sind (KÖHLER et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit haben wir deshalb die Konzentrationsbestimmung im Serum der im Urin vorgezogen.

Beim Vergleich unserer Ergebnisse der Genotypisierung mit der Phänotypisierung zeigte sich bei den Langsammetabolisierern eine Übereinstimmung von 100 %. Das bedeutet, dass bezüglich der PM-Differenzierung eine Genotypisierung in der Praxis ausreichend ist. Anders verhält es sich bei der Differenzierung von Schnell- und Intermediärmetabolisierern. Bei ihnen ist eine exakte genetische Unterscheidung anhand der funktionellen Allele möglich,

jedoch kann mittels Genotypisierung die tatsächliche metabolische Kapazität des CYP2D6 nicht vorhergesagt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die mittleren MQ DEX / DTX von EM (MQ = 0,001) und IM (MQ = 0,004) zwar signifikant unterscheiden (Tab.4), doch war bei 15 von insgesamt 27 Probanden mit Genotyp IM festzustellen, dass der MQ DEX / DTX sich auf dem Niveau der EM befand (Abb.5). Da über 90% der IM durch heterozygotes Vorkommen von CYP2D6*4 bedingt sind, müssen Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Allelen des Wildtyps vorhanden sein. Tatsächlich ist beschrieben, dass CYP2D6*1 eine geringfügig höhere Aktivität als CYP2D6*2 aufweist (SACHSE et al., 1997), was möglicherweise der Grund für diese Differenzen ist. Innerhalb der EM-Gruppe grenzten sich 3 Probanden mit höheren MQ DEX / DTX (MQ = 0,005) von den anderen EM (MQ = 0,001; n = 39) ab. Ihre CYP2D6 Metabolisierungskapazität liegt damit im durchschnittlichen Bereich der IM. Es ist wahrscheinlich, dass diese Probanden genetisch zu den IM gehören aber im Rahmen der Genotypisierung als solche nicht erkannt wurden, weil sie Träger von CYP2D6*5 oder einer anderen selteneren Allelmutation sind. Aufgrund der Vielzahl der bereits bekannten Allelmutationen ist es kurz- und sicherlich auch mittelfristig nicht möglich, eine exakte Genotypisierung zur Erkennung jeglicher IM- Genotypen kosteneffizient und in angemessenen Zeitrahmen zu etablieren. Eine präventive Erkennung der IM ist aber besonders bei der Einnahme von Medikamenten mit geringer therapeutischer Breite ebenso von Bedeutung wie bei den PM. Es empfiehlt sich somit die Phänotypisierung als das einfachere und effektivere Verfahren zur exakten Beurteilung der tatsächlichen metabolischen Aktivität eines Enzyms.

Im Abbau des Dextromethorphan bestehen quantitative Unterschiede zwischen den beiden hauptsächlich beteiligten Enzymen CYP2D6 und CYP3A4. Die Ergebnisse zeigen, dass die Probanden der EM-Gruppe zum Messzeitpunkt, 2 h nach der Einnahme, nur eine sehr geringe Konzentration der Ausgangssubstanz DEX aufweisen. Zu diesem Zeitpunkt ist die maximale Serumkonzentration von DEX erreicht (Hustenstillerratiopharm®, Fachinformation, 1998) und die gemessenen sehr hohen DTX-Konzentrationen bzw.

niedrigen 3-MM-Konzentrationen weisen somit deutlich auf die überwiegende, nahezu vollständige Metabolisierung des DEX durch CYP2D6 hin (Hustenstillerratiopharm®, Fachinformation, 1998).

Bei den Probanden die genotypisch als IM und PM charakterisiert wurden, sind die signifikant höhere Konzentration von DEX und die erheblich niedrigere Konzentration des Metaboliten DTX ein klares Zeichen dafür, dass bei IM- und PM-Genotypen die Aktivität des Enzyms CYP2D6 gegenüber den EM-Genotypen vermindert ist. IM und PM unterscheiden sich dabei noch einmal um ein Vielfaches.

Die Probanden mit verminderter CYP2D6-Aktivität zeigen auch signifikant höhere 3-MM-Konzentrationen als die Vergleichsgruppe der EM-Genotypen. Infolge der mangelnden Aktivität von CYP2D6 wird also DEX vermehrt zu 3-MM abgebaut, dessen Entstehung über CYP3A4 katalysiert wird. Dass die Konzentration von DEX bei den IM ($4,2 \pm 3,9$ nmol/l) nicht so niedrig ist wie bei den EM ($1,8 \pm 1,7$ nmol/l) zeigt aber, dass CYP3A4 DEX langsamer abbaut als CYP2D6. Bei den PM ist die 3-MM-Konzentration doppelt so hoch verglichen zu den IM und dreifach höher als bei den EM, trotzdem ist die DEX-Konzentration der PM (40 ± 22 nmol/l) noch ca. 20-fach höher im Vergleich zu den EM und auch 10-fach höher als bei den IM. Bei der Betrachtung des betreffenden MQ DEX / 3-MM müsste im Falle einer ausreichenden Kompensation durch CYP3A4 eine Erniedrigung dieses MQ bei den IM und PM auftreten. Tatsächlich kam es aber bei den IM und PM zu höheren Werten des MQ DEX / 3-MM als im Vergleich zu der EM-Gruppe. Die Ursache sind die vielfach höheren DEX-Konzentrationen bei nur mäßig höheren 3-MM-Konzentrationen. Insgesamt ist somit festzustellen, dass bei Probanden mit eingeschränkter (IM) oder fehlender (PM) CYP2D6-Aktivität, welche bei EM die tragende Rolle im Dextromethorphanabbau spielt, zwar eine mäßig gesteigerte Stoffwechselaktivität des alternativen Abbauwegs von DEX zu 3-MM auftritt, aber dennoch CYP3A4 keine vollständige Kompensation der mangelnden CYP2D6-Aktivität erreichen kann.

4.3. Auswirkungen einer Einnahme von Paroxetin oder Reboxetin auf die Aktivität der am Abbau von Dextromethorphan beteiligten Enzyme

Eine Einnahme von *Paroxetin* hat gegenüber der Kontrollphase aufgrund höherer Konzentrationen der Muttersubstanz DEX (27-fach) und niedrigeren Konzentrationen des Metaboliten DTX (9-fach) einen stark erhöhten (270-fach) CYP2D6 spezifischen MQ DEX / DTX zur Folge. Das heißt, infolge therapeutischer Dosen von Paroxetin erscheinen die genotypisch als EM charakterisierten Probanden jetzt phänotypisch als PM des CYP2D6. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen weisen auf die stark verminderte Aktivität des Enzyms CYP2D6 nach der Einnahme des Antidepressivums *Paroxetin* hin und bestätigen hiermit ähnliche Ergebnisse früherer Untersuchungen (SINDRUP et al., 1992; KÖHLER et al., 1997).

Unter dem Einfluss von Paroxetin verändert sich auch das Metabolitenverhältnis von DEX zu 3-MM (MQ DEX / 3-MM 7-fach höher) und von DTX zu 3-HM (MQ DTX / 3-HM 0,9-fach). Diese Veränderungen der beiden CYP3A4-spezifischen MQ, im Besonderen der Anstieg von MQ DEX / 3-MM imponiert wie ein Hemmeffekt. Betrachtet man aber die Konzentrationen in Zähler und Nenner, so muss festgestellt werden, dass die Konzentration von 3-MM nach Paroxetineinnahme viel höher und somit Ausdruck eines erhöhten Metabolismus ist. Da aber die Konzentration von DEX ($43,3 \pm 16,3$ nmol / l) infolge der Hemmung zu DTX sehr viel größer ist, errechnet sich ein hoher Quotient DEX / 3-MM. Die vermehrte Metabolisierung von DEX zu 3-MM muss als Kompensationsmechanismus angesehen werden, der aber nicht voll-ständig ist. Dies zeigt die Begrenztheit der Aussagekraft des Metabolitenquotienten.

Bezüglich des Antidepressivums *Reboxetin* geben unsere Ergebnisse keinen Anhalt darauf, dass die tägliche Einnahme von 6 mg dieses Medikamentes einen klinisch relevanten Hemmeffekt auf das Enzym CYP2D6 ausübt. Bei der Beurteilung der Aktivität des Enzyms CYP3A4 hingegen fiel auf, dass es bei einer isolierten Betrachtung der Probanden mit EM-Genotyp unter der Einnahme von Reboxetin zu einer signifikanten Konzentrationsabnahme des

Metaboliten DTX von 1433 ± 205 ng / ml auf 1306 ± 184 ng / ml kommt. Diese Veränderung geht mit einer nicht signifikanten Erniedrigung der DEX- und nicht signifikanten Erhöhung der 3-HM-Konzentration einher, was somit eine geringe Aktivitätssteigerung von CYP3A4 anzeigt. Bestätigt wird dieses Ergebnis durch die Erniedrigung aller CYP3A4 spezifischen MQ, wobei DTX / 3-HM und der kombinierte MQ (DEX+DTX / 3-MM+3-HM) sogar signifikant kleiner als in der Kontrollphase sind. Bei Probanden mit IM- und PM- Genotyp stellten wir diese Veränderungen nicht fest. Eine ähnliche Untersuchung mit weniger Probanden ($n = 10$) fand übereinstimmende Ergebnisse für CYP2D6, aber im Gegensatz zu uns keinerlei Aktivitätsänderung des CYP3A4 (AVENOSO et al., 1999). In einer anderen vergleichbaren klinischen Untersuchung an gesunden Probanden mit der Gabe von 2 x 2 mg Reboxetin pro Tag, über insgesamt 5 1/2 Tage, wurde 48 h nach der letzten Medikamenteneinnahme eine geringfügig erhöhte aber nicht signifikante Ausscheidung von 6-beta-Hydroxycortisol im Urin, ein Marker für die CYP3A4-Aktivität, gemessen (PELLIZZONI et al., 1996). Aufgrund der nur geringen Änderungen wurde von den Autoren aber keine gesteigerte CYP3A4-Aktivität angenommen. Mittels In-vitro-Untersuchungen an Lebermikrosomen wurde nachgewiesen, dass Reboxetin in sehr hohen Dosen einen Hemmeffekt auf CYP2D6 und CYP3A4 ausübt (WIENKERS et al., 1999; RASMUSSEN et al., 2000). Dass die bei uns festgestellten signifikanten Veränderungen der CYP3A4- Aktivität nur bei EM nicht aber bei IM und PM auftreten, kann durch die erhöhte Ausgangskonzentration von DTX bei den EM bedingt sein. DTX, das hier als Substrat dieser Reaktion fungiert, wird bei diesen Probanden stärker metabolisiert als bei den übrigen Personen. Insgesamt lässt sich sagen, dass unter der Einnahme von Reboxetin scheinbar eine geringe Aktivitätssteigerung von CYP3A4 stattfindet.

4.4. Einfluss des CYP2D6- Genotyps auf die Pharmakokinetik der Antidepressiva Paroxetin und Reboxetin

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich ferner erkennen, dass die pharmakokinetischen Parameter von *Paroxetin*, Prä-Dosis-Spiegel und AUD bei Probanden mit verschiedenem CYP2D6- Genotyp unterschiedlich sind. Allgemein kann gesagt werden, je niedriger die Aktivität des CYP2D6 eines Probanden ist, desto höher ist der C_{min} und die AUD von *Paroxetin* zu erwarten. Auch andere Autoren bestätigen diesbezügliche Erkenntnisse (SINDRUP et al., 1992; BLOOMER et al., 1992). Bei der Frage nach einer linearen Korrelation zwischen den MQ des DEX- Abbaus und den pharmakokinetischen Parametern C_{min} und AUD vor und nach Paroxetineinnahme stellten wir fest, dass signifikante Korrelationen nach Pearson in der Paroxetingruppe sowohl in der Kontroll- als auch Behandlungsphase auftraten. Aus den Korrelationskoeffizienten (r) lässt sich das Bestimmtheitsmaß (r^2) errechnen, dessen Wert die wahrscheinliche Vorhersagbarkeit des Prä-Dosis-Spiegels (C_{min}) entspricht. Im Fall der signifikanten Korrelation zwischen C_{min} und den MQ DEX / DTX ($r = 0,589$; $p = 0,002$) in der Kontrollphase beträgt $r^2 = 0,347$. D.h. der Prä-Dosis-Spiegel von Paroxetin ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 34,7 % mit Hilfe der zugehörigen Regressionsgeraden vorhersagbar. Tatsächlich unterscheiden sich zwar die mittleren Prä-Dosis-Spiegel von EM ($27,4 \pm 13,7$ ng/ml) und IM ($42,0 \pm 16,6$ ng/ml) der Paroxetingruppe signifikant voneinander aber innerhalb der Gruppen mit gemeinsamen CYP2D6-Genotyp existieren teils erhebliche interindividuelle Schwankungen, so dass neben der Aktivität von CYP2D6 auch andere Einfluss nehmende Faktoren in Frage kommen müssen (KAYE et al., 1989). In einer vergleichbaren Untersuchung (SINDRUP et al., 1992), ebenfalls mit der täglichen Gabe von 30 mg Paroxetin im steady state aber älteren, komorbiden (Diabetes mellitus) Patienten mit Begleitmedikation, lagen die Konzentrationen bei den drei vorhandenen PM zwischen 108 und 220 ng / ml Paroxetin. Der Prä-Dosis-Spiegel des einzelnen PM unserer Paroxetingruppe ist mit 56 ng / ml zwar weitaus geringer als jene Werte aber entspricht trotzdem dem

Doppelten des mittleren Wertes der EM- Gruppe. Anzumerken ist, dass sich die Prä-Dosis-Spiegel von drei Probanden mit EM-Genotyp unterhalb der Nachweisgrenze von 10 ng / ml befanden. Eine ausreichende Compliance der Medikamenteneinnahme ist gesichert und der MQ DEX / DTX dieser Probanden ist im Normbereich, so dass sie keinen Ultraschnellmetabolisierer des CYP 2D6 entsprechen. Errechnet man die Paroxetindosis, die jeder Proband pro kg Körpergewicht erhielt und versucht diese in Zusammenhang mit dem Prä-Dosis-Spiegel von Paroxetin zu bringen, so ergibt sich nach Pearson ein Korrelationskoeffizient von $r = -0,75$ mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,56. D. h. zu 56 % wird die Paroxetinkonzentration von der verabreichten Dosis bestimmt. Daraus schlussfolgert, dass auch andere Faktoren die Serumkonzentration von Paroxetin mitbestimmen müssen. Im Falle einer gewichtsadaptierten Dosierung verkleinert sich der Variationskoeffizient von 50,0 % (ohne Gewichtadaptation) auf 10,1 %, d.h. ein Teil der großen Schwankungen ist dadurch bedingt, dass pro Individuum und nicht gewichtsadaptiert dosiert wurde. Außerdem wird Paroxetin nicht nur über CYP 2D6 sondern auch auf einem Nebenweg über CYP 3A4 abgebaut. Der Metabolismus durch CYP 3A4 unterliegt im Allgemeinen großen Schwankungen. Dies könnte auch für die Substanz Paroxetin der Fall sein. Es ist zu vermuten, dass interindividuelle Unterschiede im Ausmaß der Metabolisierung von Paroxetin zu den unterschiedlichen steady state Konzentrationen von Paroxetin beitragen.

Hingegen war der Plasmaspiegel des Antidepressivums *Reboxetin* unverändert in Abhängigkeit von dem individuellen CYP2D6 Geno- bzw. Phänotyp und wird dementsprechend, im Gegensatz zu Paroxetin, nicht von ihm geprägt. Bei den Probanden mit EM- und IM- Genotyp der Reboxetingruppe bestand keine signifikante lineare Korrelation nach Pearson zwischen den MQ des DEX-Abbaus und den pharmakokinetischen Parametern C_{min} und AUD. Nur für die Probanden mit PM-Genotyp ($n = 3$) konnte eine Korrelation zwischen den MQ DEX / 3-MM und dem C_{min} ($r = -1,000$; $p = 0,017$) festgestellt werden. Das Bestimmtheitsmaß beträgt hier $r^2 = 1$, d.h. mit der Wahrscheinlichkeit von 100 % lässt sich bei den PM anhand des MQ DEX /

3-MM der C_{min} von Reboxetin vorhersagen, wobei die Untersuchung einer größeren Probandenzahl wahrscheinlich kleinere Werte von r^2 aufweisen würde. Die klinische Relevanz dieser Vorhersagbarkeit ist zudem eher gering, da wie erwähnt, der C_{min} von Reboxetin keine Unterschiede zwischen den CYP2D6-Genotypen aufweist.

5. Schlussfolgerung

Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnten wir zeigen, dass die Einnahme des Antidepressivums Reboxetin, im Gegensatz zu einer Therapie mit dem Antidepressivum Paroxetin, weder einen klinisch relevanten Hemmeffekt auf das Enzym CYP2D6 bewirkt, noch eine Abhängigkeit seiner Serumkonzentration von dem CYP2D6-Geno- bzw. -Phänotyp besteht. Somit bedarf eine beabsichtigte Therapie mit Reboxetin nach unseren Erkenntnissen keiner präventiven Genotypisierung von CYP2D6. Darüber hinaus stellten wir fest, dass unter der Einnahme von Reboxetin eine geringe Aktivitätssteigerung des CYP3A4 stattfindet.

Bei einer beabsichtigten Therapie mit dem Antidepressivum Paroxetin hingegen ist aufgrund der deutlichen Konzentrationsunterschiede des Paroxetins zwischen Personen mit verschiedenen CYP2D6-Genotyp die präventive Untersuchung des individuellen CYP2D6-Genotyps zur Vermeidung von UAW sinnvoll und ratsam. Hierfür ist nach unseren Erkenntnissen zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Phänotypisierung mittels Modellsubstraten der molekularbiologischen Genotypisierung vorzuziehen, da sie im Individualfall exakter die zu erwartende Paroxetinkonzentration vermuten lässt und die Risiken einer solchen Therapie somit besser zu kalkulieren sind.

Zur wirklich erfolgreichen und überzeugenden Etablierung genetischer Tests bedarf es noch einer Reihe prospektiver Studien mit großen Fallzahlen. Es ist deshalb von besonderem Interesse, die bestehenden Kenntnisse über das Vorkommen und die klinischen Auswirkungen von Enzypolymorphismen weiter auszubauen und diese in der Arzneimitteltherapie anzuwenden.

PHÄNO- / GENOTYPISIERUNG ZUR ABWEHR VON UNERWÜNSCHTEN ARZNEIMITTELRWIRKUNGEN AM BEISPIEL ZWEIER ANTIDEPRESSIVA

Zusammenfassung

Die katalytische Aktivität von Enzymen der Biotransformation hat erheblichen Einfluss auf erwünschte und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW). Das Enzym CYP 2D6, eine Isoform des Cytochrom P450, welches am Abbau zahlreicher Medikamente, vor allem Psychopharmaka, beteiligt ist, besitzt eine ausgeprägte Anzahl an Polymorphismen. Zudem sind eine Reihe potenter Hemmstoffe, wie z.B. das Antidepressivum *Paroxetin*, für dieses Enzym bekannt. Für das Antidepressivum *Reboxetin* sind dagegen trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Fluoxetin, einem potentiellen Hemmstoff des CYP 2D6, keine klinisch relevanten inhibitorischen Effekte bekannt. In vivo Untersuchungen hierzu sind bisher aber nur unzureichend erfolgt. Mit der vorliegenden Studie sollten zum einen die wechselseitigen Beziehungen von Genotyp, Phänotyp und Pharmakokinetik eines Medikamentes am Beispiel der beiden Antidepressiva, Paroxetin und Reboxetin, und zum anderen der mögliche Einfluss einer therapeutischen Dosis von Reboxetin auf die phänotypische Prägung eines Probanden näher untersucht werden.

Methode: Die Charakterisierung der Enzymaktivität erfolgte mittels der Modellsubstanz Dextromethorphan (DEX). Nach einer Testdosis von 30 mg DEX wurde 2 Stunden später bei gesunden männlichen Probanden (pro Gruppe n=25) vor und nach einer 11-tägigen Einnahme von Reboxetin (6 mg /d), Paroxetin (30 mg /d) und Placebo die Konzentration der Muttersubstanz Dextromethorphan und seiner drei Metaboliten Dextrorphan (DTX), 3-Hydroxymorphinan (3-HM) und 3-Methoxymorphinan (3-MM) im Serum determiniert. Simultan wurde der Tagesverlauf der Serumkonzentrationen beider Antidepressiva gemessen und anschließend die Parameter AUD (9-24 h) und Prä-Dosis-Spiegel auf eine Korrelation mit den Ergebnissen der Geno- bzw. Phänotypisierung überprüft. Als Aktivitätsparameter des CYP 2D6 dienten die Metabolitenquotienten (MQ) von DEX / DTX und 3-MM / 3-HM. Die Parameter

der CYP 3A4 Aktivität waren die MQ DEX / 3-MM und DTX / 3-HM. Mit dem Vergleich der Parameter aus Kontroll- und Behandlungsphase wurde die phänotypische Prägung durch Einnahme von Paroxetin, Reboxetin oder Placebo qualitativ und quantitativ untersucht.

Ergebnisse: Mittels Genotypisierung ist eine korrekte genetische Differenzierung der Probanden in Langsam- (PM), Intermediär- (IM) und Schnellmetabolisierer (EM) des Enzyms CYP 2D6 möglich. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation bezüglich der PM- Differenzierung betrug 100 %. Eine Beurteilung der tatsächlichen metabolischen Kapazität eines CYP 2D6- IM kann jedoch mittels einer durchgeführten Phänotypisierung eindeutig genauer als mit einer bloßen Genotypisierung erfolgen, denn es zeigte sich vereinzelt, dass genotypisch als IM charakterisierte Probanden phänotypisch Schnellmetabolisierer des CYP 2D6 darstellten und umgekehrt einige EM- Genotypen eine verminderte Enzymaktivität aufwiesen. Ursächlich sind hierfür die unterschiedlichen Aktivitäten intakter Allele. Eine Phänotypisierung sowohl für IM als auch EM erscheint deshalb sinnvoll.

Der Prä-Dosis-Spiegel von Paroxetin wird im Mittel deutlich durch den Genotyp und Phänotyp geprägt. Die Phänotypisierung mittels DEX- Test kann aber im Individualfall den Prä-Dosis-Spiegel, außer bei Langsammetabolisierern, nicht vorhersagen. Andere Faktoren – außer der Aktivität von CYP 2D6 – scheinen diesen Parameter zusätzlich zu beeinflussen.

Der Prä-Dosis-Spiegel von Reboxetin wird nicht von der Aktivität des CYP 2D6 geprägt. Veränderungen im Sinne einer Hemmung der Enzymfunktion unter dem Einfluss von Reboxetin (intraindividuelle Paarvergleich) waren im Ausmaß viel geringer im Vergleich zum bereits bekannten Paroxetin-Effekt. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Einnahme des Antidepressivums Reboxetin, im Gegensatz zu einer Therapie mit dem Antidepressivum Paroxetin, weder einen klinisch relevanten Hemmeffekt auf das Enzym CYP 2D6 bewirkt, noch eine Abhängigkeit seiner Serumkonzentration von dem CYP 2D6 Geno- bzw. Phänotyp besteht.

Literaturverzeichnis

- ALFARO CL, LAM YWF and SIMPSON J et al. (2000): CYP 2D6 inhibition by fluoxetine, paroxetine, sertraline, and venlafaxine in a crossover study: intraindividual variability and plasma concentration correlations. *J Clin Pharmacol* 40: 58-66
- ALVAN G (1992): Genetic polymorphisms in drug metabolism. *J Intern Med* 231:571-573
- Arzneiverordnung in der Praxis (1999): Pharmakogenetische Aspekte der Arzneimitteltherapie. Ausgabe 2:21-5
- AVENOSO A, FACCIOLA G, SCORDO MG and SPINA E (1999): No effect of the new antidepressant Reboxetine on CYP2D6 activity in healthy volunteers. *Therap Drug Monit* 21(5): 577-579
- BERGMANN JF, LANEURY JP, DUCHENE P, FLEISHAKER JC, HOUIN G and SEGRESTAA JM (2000): Pharmacokinetics of reboxetine in healthy, elderly volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 25(3-4): 195-8
- BERTILSSON L, LOU YQ, DU YL, LIU Y, KUANG TY, LIAO XM and et al. (1992): Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 51:388-97
- BERTILSSON L, DAHL ML, DALEN P and AL SHURBAJI A (2002): Molecular genetics of CYP 2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 53:111-122
- BLOOMER JC, WOODS FR, HADDOCK RE, LENNARD MS and TUCKER GT (1992): The role of cytochrome P4502D6 in the metabolism of paroxetine by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 33:521-23
- BRUNELLO N, MENDLEWICZ J, KASPER S, LEONARD B, MONTGOMERY S, NELSON JC, PAYKEL E, VERSIANI M and RACAGNI G (2002): The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 12: 461-475
- BUUS LASSEN J (1989): Introduction to the development of paroxetin, a novel antidepressant. *Acta Psychiatr Scand* 80(Suppl. 350):13.
- CHLADEK J, ZIMOVA G, BERANEK M and MARTINKOVA J (2000): In-vivo indices of CYP 2D6 activity: comparison of dextromethorphan metabolic - ratios in 4-h urine and 3-h plasma. *Eur J Clin Pharmacol* 56: 651-657

- CHEN ZR, SOMOGYI AA and BOCHNER F (1990): Simultaneous determination of Dextromethorphan and three metabolites in plasma and urine using High-Performance Liquid Chromatography with application to their disposition in man. *Ther Drug Monit* 12(1): 97-104
- CHOU WH, YAN FX, ROBBINS-WEILERT DK, RYDER TB, LIU WW, PERBOST C, FAIRCHILD M, DE LEON J, KOCH WH and WEDLUNG PJ (2003): Comparison of two CYP 2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships. *Clin Chem* 49(4):542-551
- COCCHIARA G, BATTAGLIA R, PEVARELLO P, STROLIN BENEDETTI M and et al. (1991): Comparison of the disposition and of the metabolic pattern of reboxetine, a new antidepressant, in the rat, dog, monkey and man. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 16: 231-239
- DALY AK, STEEN VM, FAIRBROTHER KS and IDLE JR (1996): CYP 2D6 multiallelism. *Methods Enzymol* 272:199-210
- DOSTERT P, BENEDETTI MS and POGESSI I (1997): Review of the pharmacokinetics and metabolism of reboxetine, a selective noradrenaline reuptake inhibitor. *Eur Neuropsychopharmacol* 7:S23-S25
- DUBINI A, BOSCH M and POLIN V (1997): Noradrenaline-selective versus serotonin-selective antidepressive therapy: differential effects on social functioning. *Psychopharmacol* 11(4): 17-23
- DUCHARME J, ABDULLAH S and WAINER IW (1996): Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A4 activity. *J Chromatog B.* 678,113-128
- EDRONAX® 4 mg, Fachinformation (1997); Pharmacia & Upjohn GmbH
- EDWARDS DMF, PELLIZZONI C, BREUEL HP, BERARDI A, CASTELLI MG, FRIGERIO E, POGESSI I, ROCCHETTI M, DUBINI A and STROLIN BENEDETTI M: Pharmacokinetics of reboxetine in healthy volunteers. Single oral doses, linearity and plasma protein binding. *Biopharm. Drug Dispos.* 1995;16:443-60
- EICHELBAUM M and GROSS AS (1990): The genetic polymorphism of debrisoquine / spartein metabolism – clinical aspects: *Pharmac Ther* 46: 377-394
- EVANS WE and RALLING MV (1999): Pharmacogenomics: Translating functional genomics into rational therapeutics. *Science-Evans and Relling* 286(5439): 487

- FLEISHAKER JC, MUCCI M, PELLIZZONI C and POGESSI I (1999): Absolute bioavailability of reboxetine enantiomers and effect of gender on pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos* 20: 53-57
- FLEISHAKER JC (2000): Pharmacokinetics and metabolism of Reboxetine. *Rev. Contemp. Pharmacother* 11: 283-293
- FROMM MF, KROEMER HK and EICHELBAUM M (1997): Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 27:171-99
- GRIESE EU, ZANGER UM, BRUDERMANN S U, GAEDIGK A, MIKUS G, MORIKE K and et al. (1998): Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP 2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 8:15-26
- GRÖZINGER M, DRAGICEVIC A, HIEMKE C, SHAMS M, MÜLLER MJ and HÄRTTER S (2003): Melperone is an inhibitor of the CYP 2D6 catalyzed O-demethylation of Venlafaxine. *Pharmacopsychiatry* 3-6
- GORMAN JM and NEMEROFF CB (1999): The role of norepinephrine in the treatment of depression. *J Clin Psychiatry* 60:623-631
- HÄRTTER S, KÖHLER D, FUCHS K, SIEGHART W and HIEMKE C (1997): Dextrorphan N-demethylation, a marker reaction for CYP3A activity? (Abstract) *Eur J Clin Pharmacol* 52:401
- HÄRTTER S, HERMES B, SZEGEDI A and HIEMKE C (1994): Automated determination of Paroxetine and its Main Metabolite by Column-Switching and On-Line High-Performance Liquid Chromatography. *Ther Drug Monit* 16:400-406
- HÄRTTER S, WEIGMANN H and HIEMKE C (2000). Automated determination of reboxetine by high-performance liquid chromatography with column-switching and ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B* 740, 135-140
- HALLIER E (2001): Genetische Disposition bei fremdstoffbedingten Erkrankungen. *Dtsch Ärztebl* 98: A112-114 [Heft 3]
- HENDERSHOT PE, FLEISHAKER JC, LIN KM, NUCCIO ID and POLAND RE (2001): Pharmacokinetics of reboxetine in healthy volunteers with different ethnic descents. *Psychopharmacology* 155(2): 148-53
- HERSBERGER M, MARTI-JAUN J, RENTSCH K and HANSELER E (2000): Rapid detection of the CYP 2D6*3, CYP 2D6*4 and CYP 2D6*6 by Tetra-Primer PCR and of the CYP 2D6*5 allele by Multiplex-Long PCR. *Clin Chem* 46:1072-7

- HERSBERGER and RENTSCH K (2002): Cytochrom P450 2D6: vom Genotyp zur Dosis-Anpassung. Schweiz Med Forum 48:1158-61
- HUMAN CYTOCHROM P450 (CYP) ALLELE NOMENCLATURE COMMITTEE.
Available from URL:<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>[Accessed 2000 Dec 1]
- HUSTENSTILLER-RATIOPHARM®, Fachinformation (1998), ratiopharm GmbH
- JACQZ-AIGRAIN E, FUNCK-BRENTANO C and CRESTEIL T (1993): CYP2D6- and CYP3A4-dependent metabolism of dextromethorphan in humans. Pharmacogen 3:197-204
- JANUZZO MG, STROLIN BENEDETTI M, DUCHENE P, DUBINI A and DOSTERT P (1994): Pharmacokinetics of reboxetine in the elderly. Advances in simultaneous pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling. 2nd International Symposium. Measurement and Kinetics of In Vivo Drug effects. Nordwijkerhout, The Netherlands, 14-16 April. Book of Abstracts pp.94-96
- JANUZZO MG, RYDE M, KARLMARK B, RONN O, PELLIZZONI C, POGESSI I, ROCCHETTI M, FRIGERIO E, DOSTERT P and STROLIN BENEDETTI M (1995): Pharmacokinetics of reboxetine in healthy volunteers of different ages. Eur. Neuropsychopharmacol 5:300.
- JONES DR, GORSKI JC, HAMMAN MA and HALL SD (1996a): Quantification of Dextromethorphan and metabolites: a dual phenotypic marker for cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 activity. J Chromatog B, 678; 105-111
- JONES DR, GORSKI JC, HAEHNER BD, O'MARA EM and HALL SD (1996b): Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation. Clin Pharmacol & Therap 60(4): 374-384
- KADHE NG, CHILLAR AJ and DESHMUKH YA (2003): Reboxetine: A Novel Antidepressant. J Postgrad Med 49: 373-375
- KASHUBA ADM, NAFZIGER AN, KEARNS GL, LEEDER S, GOTSCHALL R, ROCCI ML, KULAWY RW, BECK DJ and BERTINO JS (1998): Effect of fluvoxamine therapy on the activities of CYP 1A2, CYP 2D6, and CYP 3A as determined by phenotyping. Clin Pharmacol & Therapeut Vol 64 (3): 257-268
- KASPER S, EL GIAMAL N and HILGER E (2000): Reboxetine: the first selective noradrenaline re-uptake inhibitor. Expert opin Pharmacother 1(4): 771-82

- KAYE CM, HADDOCK RE, LANGLEY PF, MELLOWS G, TASKER TC, ZUSSMAN BD and GREB WH (1989): A review of the metabolism and pharmacokinetics of paroxetine in man. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 350: 60-75
- KENWOTHY KE, BLOOMER JC, CLARKE SE and HOUSTON JB (1999): CYP 3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *Br J Clin Pharmacol* 48(5): 716-727
- KÖHLER D, HÄRTTER S, FUCHS K, SIEGHART W and HIEMKE C (1997): CYP 2D6 genotype and phenotyping by determination of dextromethorphan and - metabolites in serum of healthy controls and of patients under psychotropic medication. *Pharmacogenetics* 7:453-461
- KRECIC-SHEPARD ME, BARNAS CR, SLIMKO J, GORSKI JC, WAINER IW and SCHWARTZ JB (1997): In vivo comparison of putative probes of CYP3A4/5 activity: Erythromycin, dextromethorphan, and verapamil. *Clin Pharmacol and Therap*. Volume 66, Number 1
- KUSS HJ and HEGERL U (1999): Paroxetine serum concentration in antidepressant treatment. *Psychopharmakotherapie* 6:160-162
- LLERENA A, HERRAIZ AG, COBALEDA J, JOHANSSON I and DAHL ML (1993): Debrisoquin and mephenytoin hydroxylation phenotypes and CYP 2D6 genotype in patients treated with neuroleptic and antidepressant agents: *Clin Pharmacol Ther* 54(6): 606-611
- LOVLIE R, DALY AK, MATRE GE, MOLVEN A and STEEN VM (2001): Polymorphisms in CYP 2D6 duplication-negative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP 2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? *Pharmacogenetics* 11: 45-55
- MANCINELLI L, CRONIN M and SADEE W (2000): Pharmacogenomics: the promise of personalized medicine. *AAPS PharmSci* 2:30-7
- McCUNE JS, HAWKE RL, LeCLUYSE EL, GILLENWATER HH, HAMILTON G, RITCHIE J and LINDLEY C (2000): In vivo and in vitro induction of human cytochrome P450 3A4 by dexamethasone. *Clin Pharmacol Ther* 68(4):356-66
- MELLONI F, CARNIEL G and DELLA TORRE A (1984). Potential antidepressant agents. α -Aryloxy-benzyl derivatives of ethanolamine and morpholine. *Eur J Med Chem Chim Ther* 19:235-242

- MOGHADAMNIA AA, ROSTAMI-HODJEGAN A, ABDUL-MANAP R, WRIGHT CE, MORICE AH and TUCKER GT (2003): Physiologically based modelling of inhibition of metabolism and assessment of the relative potency of drug and metabolite: dextromethorphan vs. Dextrorphan using quinidine inhibition. *Br J Clin Pharmacol* 56: 57-67
- MOLDEN E, JOHANSEN PW, BOE GH, BERGAN S, CHRISTENSEN H, RUGSTAD HE, ROOTWELT H, REUBSAET L and LEHNE G (2002): Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites in relation to CYP 2D6 genotype. *Clin Pharmacol and Therapeutics* 72(3):333-342
- MOLTKE LL VON, GREENBLATT DJ, GRASSI JM, GRANDA BW, VENKATAKRISHNAN K, SCHMIDER J, HARMATZ JS and SHADER RI (1998): Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of Dextromethorphan in vitro: role of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:997-1004
- MORTIMER O, LINDSTRÖM B, LAURELL H; BERGMAN U and RANE A (1989): Dextromethorphan: polymorphic serum pattern of the O-demethylated metabolites in man. *Br J Clin Pharmacol* 27: 223-227
- MULDER AB, VAN LIJF HJ, BON MA, VAN DEN BERGH FA, TOUW DJ, NEEF C and VERMES I (2001): Association of polymorphism in the cytochrome CYP 2D6 and the efficacy and tolerability of simvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 70: 546-51
- NEBERT DW: Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist? *CRC Crit Rev Toxicol* 1997; 20:153-117.
- PELLIZZONI C, POGESSI I, JORGENSEN NP, EDWARDS DMF, PAUS E and STROLIN BENEDETTI M (1996): Pharmacokinetics of reboxetine in healthy volunteers. Single against repeated oral doses and lack of enzymatic alterations. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 17: 623-633
- POGESSI I, PELLIZZONI C and FLEISHAKER JC (2000): Pharmacokinetics of reboxetine in elderly patients with depressive disorders. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38(5): 254-9
- RAIMUNDO S, FISCHER J, EICHELBAUM M, GRIESE EU; SCHWAB M and ZANGER UM (2000): Elucidation of the genetic basis of the common „intermediate metabolizer“ phenotype for drug oxidation by CYP 2D6. *Pharmacogenetics* 10: 577-81
- RASMUSSEN BB and BROSEN K (2000). Is therapeutic drug monitoring a case for optimizing clinical outcome and avoiding interactions of the selective serotonin reuptake inhibitors? *Ther Drug Monit* 22: 143-154

- RELLING MV, CHERRIE J, SCHELL MJ, PETROS WP, MEYER WH and EVANS WE (1991): Lower prevalence of the debrisoquin oxidative poor metabolizer phenotype in American black versus white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 50:308-13.
- RIOUX PP (2000). Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: methods and applications. *Am J Health Syst Pharm* 57:887-901
- RIVA M, BRUNELLO N, ROVESCALLI AC, GALIMBERTI R, CARFAGNA N, CARMINATI P, POZZI O, RICCIARDI S, RONCUCCI R, ROSSI A and RACAGNI C (1989): Effect of Reboxetine, a new antidepressant drug, on the central noradrenergic system: behavioral and biochemical studies. *J Drug Develop* 1:243-53.
- SACHSE C, BROCKMÖLLER J, BAUER ST and ROOTS I (1997): Cytochrome P450 2D6 Variants in a Caucasian population: Allele Frequencies and phenotypic consequences. *Americ J Hum Gen* 60:284-295
- SCHMID B, BIRCHER J, PREISIG R and KÜPFER A (1985): Polymorphic dextromethorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquine hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* 38: 618-624
- SCHULZ M and SCHMOLDT A (1997): Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 500 drugs. *Pharmazie* 52:895-911
- SCHULZE J und ENDRES ST (1999): Genotyp, Phänotyp und unerwünschte Arzneimittelreaktionen. *Arzneimitteltherapie/17.Jahrgang/Heft6*
- SCHWAB M, MARX C, ZANGER UM und EICHELBAUM M (2002): Pharmakokinetik der Zytochrom-P-450-Enzyme. *Dtsch Arztebl* 99:A 497-504 (Heft 8)
- SEROXAT ® Filmtabletten, Fachinformation (2000); Smith Kline Beecham Pharma
- SHIMADA T, YAMAZAKI H, MIMURA M, INUI Y and GUENGERICH FP (1994): Interindividual variations in human liver cytochrome P450 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* 270:414-423
- SINDRUP SH, BROSEN K and GRAM LF (1992): Pharmacokinetics of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine: nonlinearity and relation to the sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 51:288-95
- SLAUGHTER RL and EDWARDS DJ (1995): Recent advances: The cytochrome P450 enzymes. *Ann Pharmacotherap* 29:619-24

- SMITH CA, GOUGH AC, LEIGH PN, SUMMERS BA, HARDING AE, MARAGANORE DM and et al. (1992): Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 339:1375-1377
- SPINA E, ANCIONE M, DI ROSA AE, MEDURI M and CAPUTI A (1992): Polymorphic debrisoquin oxidation and acute neuroleptic induced adverse effects. *Eur J Clin Pharmacol* 41: 467-70
- STEINER E, BERTILSSON L, SAWE J, BERTLING I and SJOQVIST F (1988): Polymorphic debrisoquin hydroxylation in 757 Swedish subjects. *Clin Pharmacol Ther* 44:431-5.
- STREETMAN DS, BERTINO JS JR and NAFZIGER AN (2000a): Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrom P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* 10:187-216
- STREETMAN DS, BLEAKLEY JF, KIM JS, NAFZIGER AN, LEEDER JS, GAEDIGK A, GOTSCHALL R, KEARNS GL and BERTINO JS JR (2000b): Combined phenotypic assessment of CYP 1A2, CYP 2C19, CYP 3A4, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase with the "Cooperstown cocktail". *Clin Pharmacol & Therapeut Vol* 68(4): 375-383
- TAMMINGA WJ, WEMER J, OOSTERHUIS B, BRAKENHOFF JPG, GERRITS MGF, DE ZEEUW RA, DE LEIJ LFMH and JONKMAN JHG (2001): An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP 2D6 and CYP 2C19. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 143-146
- VILLIKKA K, VARIS T, BACKMAN JT, NEUVONEN PJ and KIVISTÖ KT (2001): Effect of methylprednisolone on CYP 3A4-mediated drug metabolism in vivo. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 457-460
- VOLZ HP und MAURER I (1999): Reboxetin. *Fundamenta Psychiatrica* 13: 147-52
- WANG Y and UNADKAT JD (1999): Enzymes in addition to CYP 3A4 and 3A5 mediate N-demethylation of Dextromethorphan in human liver microsomes. *Biopharm. Drug Dispos.* 20: 341-346
- WIELING J, TAMMINGA WJ, SAKIMAN EP, OOSTERHUIS B, WEMER J and JONKMAN JHG (2000): Evaluation of analytical and clinical performance of a dual-probe phenotyping method for CYP2D6 polymorphism and CYP3A4 activity screening. *Ther Drug Monit* 22: 486-496
- WIENKERS LC, ALLIEVI C, HAUER MJ and WYNALDA MA (1999). Cytochrome P-450-mediated metabolism of the individual enantiomers of the antidepressant agent reboxetine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 27:1334-1340

WONG EHF, GRAVEEL CR, KAGEY ML, CAFAGNA N and SMITH MW (1989):
Pharmacological selectivity of reboxetine: a selective noradrenaline
reuptake inhibitor (NARI). Abstract, Reboxetin® Symposium, Cagliari

ZANGER UM, RAIMUNDO S and EICHELBAUM M (2004): Cytochrome P450
2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 369(1):23-37

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mir folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. A. Balogh, Herr Dr. U.-D. Kuhn,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde, und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe, und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den _____

Lebenslauf

Michael Kirsch
01.05.1978 Greiz

09/84 – 08/90 Grund- und Regelschule Berga/Elster
09/90 – 06/96 Pestalozz gymnasium Greiz
20.06.1996 Abitur
09/96 – 06/97 Allgemeiner Wehrdienst
10/97 – 11/03 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-
Universität Jena

13.11.2004 Ärztliche Prüfung mit Abschluss des Studiums der
Humanmedizin

03/04 – 04/04 AiP Innere Medizin
Katholisches Krankenhaus Erfurt

seit 06/04 AiP Innere Medizin
Krankenhaus Waltershausen-Friedrichroda

Jena, 20.08.2004

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei der ehemaligen Direktorin des Institutes für Klinische Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Frau Prof. Dr. med. habil. A. Hoffmann, für die Überlassung des Themas bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. med. habil. A. Balogh für die hilfreiche und umfassende wissenschaftliche Betreuung und Herrn Dr. med. U. D. Kuhn für die ausführliche Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und des Neurochemischen Labors der Klinik für Psychiatrie des Universitätskrankenhauses Mainz sowie der Symbiomed GmbH Laboratorien Jena für die Analyse des umfangreichen Probenmaterials.

Weiterhin bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit mit der Klinik für Psychiatrie der Friedrich-Schiller-Universität Jena bei der Rekrutierung der Probanden sowie für die hilfreichen Ratschläge des Institutes für Statistik der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Nicht zuletzt gilt ganz besonderer Dank meinen Eltern für die Ermöglichung zum Studium der Humanmedizin und natürlich meiner Frau für ihre moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.