

**Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zum
Interaktionspotential des Antiarrhythmikums Flecainid**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Patrick Zimmermann

geboren am 12.12.1979 in Bad Salzungen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Lupp
2. PD Dr. Surber
3. Prof. Dr. Netter

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.01.2015

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	VI
<u>1. Zusammenfassung</u>	1
<u>2. Einleitung</u>	3
2.1. Biotransformation	3
2.2. Das Cytochrom-P450-System	4
2.2.1. Cytochrom P450 2D6 und seine genetische Vielfalt	7
2.3. Dextromethorphan – Modellsubstanz zur Phänotypisierung	9
2.4. Die Genotypisierung und ihre Bedeutung	11
2.5. Die Elektrophysiologie des Herzens und ihre Pathologie	11
2.6. Behandlungsmöglichkeiten von Arrhythmien	13
2.7. Flecainid – Eigenschaften und Geschichte des Antiarrhythmikums	15
2.8. Die CAST-Studie und ihre Auswirkungen	18
<u>3. Zielstellung der Arbeit</u>	21
<u>4. Material und Methoden</u>	23
4.1. Patientencharakteristika	23
4.2. Durchführung der Untersuchung	23
4.3. Genotypisierungen	25
4.3.1. Isolierung der DNA	25
4.3.2. Polymerasekettenreaktion und Restriktionsfragmentanalyse	25
4.3.3. Cytochrom-P450-2C8-Genotypisierung	26
4.3.4. Cytochrom-P450-2C9-Genotypisierung	27
4.3.5. Cytochrom-P450-2C19-Genotypisierung	28
4.3.6. Cytochrom-P450-2D6-Genotypisierung	29
4.3.6.1. Cytochrom P450 2D6*3	30
4.3.6.2. Cytochrom P450 2D6*4	31
4.3.6.3. Cytochrom P450 2D6*5	31
4.3.6.4. Cytochrom P450 2D6*6	32

4.4.	Phänotypisierung des Cytochrom P450 2D6 mittels Dextromethorphan	33
4.5.	Bestimmung der Pharmakokinetik von Flecainid	33
4.6.	Nachweismethoden	34
4.6.1.	Nachweis von Dextromethorphan und seiner Metabolite	34
4.6.2.	Nachweis von Flecainid	36
4.7.	Statistische Aufarbeitung der Geno- und Phänotypisierungsdaten	38
4.8.	In-vitro-Versuche	39
4.8.1.	Materialgewinnung für die in-vitro-Versuche	39
4.8.2.	Herstellung der 9000g-Überstände und Bestimmung ihrer Proteingehalte	40
4.8.3.	Monooxygenase-Modellreaktionen	41
4.8.3.1.	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	41
4.8.3.2.	Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	43
4.8.3.3.	Ethylmorphin-N-Demethylierung	45
4.8.4.	Herkunft der verwendeten Substanzen und Lösungen	47
4.8.5.	Statistische Auswertung der Monooxygenase-Modellreaktionen	47
<u>5.</u>	<u>Ergebnisse</u>	48
5.1.	Genotypen der Probanden	48
5.1.1.	Cytochrom P450 2C8	48
5.1.2.	Cytochrom P450 2C9	48
5.1.3.	Cytochrom P450 2C19	48
5.1.4.	Cytochrom P450 2D6	49
5.2.	Zusammenhang zwischen Cytochrom-P450-2D6-Genotyp und Metabolisierung von Dextromethorphan	49
5.2.1.	Serumkonzentration von Dextromethorphan und seinen Metaboliten vor Flecainideinstellung	49
5.2.2.	Serumkonzentration von Dextromethorphan und seinen Metaboliten nach Flecainideinstellung	51
5.2.3.	Vergleich der Serumkonzentrationen von Dextromethorphan und seinen Metaboliten vor und nach Flecainideinstellung bei Extensive Metabolizern des Cytochrom P450 2D6	53

5.2.4.	Vergleich der Serumkonzentrationen von Dextromethorphan und seinen Metaboliten vor und nach Flecainideinstellung bei heterozygoten Extensive Metabolizern des Cytochrom P450 2D6	53
5.2.5.	Serumkonzentrationen von Dextromethorphan und seinen Metaboliten – Zusammenfassung der Ergebnisse	54
5.3.	Metabolitenquotienten als Maß für die Aktivität der beteiligten Enzyme am Abbau des Dextromethorphans	55
5.3.1.	Metabolitenquotienten vor Flecainideinstellung	55
5.3.2.	Metabolitenquotienten nach Flecainideinstellung	57
5.3.3.	Vergleich der Metabolitenquotienten der Extensive Metabolizer des Cytochrom P450 2D6 vor und nach Flecainideinstellung	59
5.3.4.	Vergleich der Metabolitenquotienten der heterozygoten Extensive Metabolizer des Cytochrom P450 2D6 vor und nach Flecainideinstellung	60
5.3.5.	Metabolitenquotienten – Zusammenfassung der Ergebnisse	60
5.4.	Pharmakokinetik von Flecainid in Abhängigkeit vom Genotyp	62
5.4.1.	Talspiegel von Flecainid unter Steady-State-Bedingungen	63
5.4.2.	Fläche unter der Serumspiegelkurve von Flecainid im Steady-State	63
5.5.	Zusammenhang zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp	67
5.5.1.	Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp vor Flecainidgabe	67
5.5.2.	Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp nach Flecainidgabe	69
5.6.	Zusammenhang zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan bzw. den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern	71
5.6.1.	Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern vor Flecainidgabe	71

5.6.2.	Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern nach Flecainidgabe	74
5.6.3.	Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern	77
5.7.	Mann-Whitney-Test	79
5.7.1.	Unterschiede zwischen Extensive Metabolizern und heterozygoten Extensive Metabolizern in Bezug auf den Dextromethorphan-Metabolismus	79
5.7.2.	Einfluss des Cytochrom-P450-2C8-, -2C9- und -2C19-Genotyps auf die pharmakokinetischen Parameter von Flecainid	79
5.7.3.	Zusammenhang zwischen Cytochrom-P450-Genotyp und Laborparametern	80
5.8.	Wilcoxon-Test	80
5.8.1.	Zusammenhang zwischen EKG-Veränderungen und Flecainid-Gabe	80
5.8.2.	Einfluss von Flecainid auf die Dextromethorphan-Metaboliten und deren Quotienten	81
5.9.	In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Flecainid auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450	85
5.9.1.	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung	85
5.9.2.	Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	85
5.9.3.	Ethylmorphin-N-Demethylierung	86
5.9.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro-Untersuchungen	86
<u>6. Diskussion</u>		93
6.1.	Genotypisierung des Cytochrom P450 2D6	94
6.2.	Zusammenhang zwischen Cytochrom-P450-2D6-Genotyp und Serumkonzentration bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan vor Flecainideinstellung	94
6.3.	Veränderung verschiedener Parameter nach Einnahme von Flecainid	96

6.3.1.	EKG-Veränderungen	96
6.3.2.	Einfluss von Flecainid auf den Dextromethorphanabbau	97
6.4.	Einfluss des Cytochrom-P450-2D6-Geno- und Phänotyps auf die Pharmakokinetik von Flecainid in vivo	98
6.5.	Einfluss von Flecainid auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450 in vitro	99
<u>7. Schlussfolgerungen</u>		100
<u>8. Literaturverzeichnis</u>		102
<u>9. Anhang</u>		120
9.1.	Lebenslauf	120
9.2.	Ehrenwörtliche Erklärung	121
9.3.	Danksagung	122

Abkürzungsverzeichnis

3-HM	3-Hydroxymorphinan
3-MM	3-Methoxymorphinan
7-OHC	7-Hydroxycoumarin
a.d.	aqua destillata
AUC	area under the curve = Fläche unter der Blutspiegelkurve
AV-Knoten	atrio-ventrikulärer Knoten
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
C _{min}	Talspiegel
CO	Kohlenmonoxid
CYP	Cytochrom P450
DEX	Dextromethorphan
DTX	Dextrorphan
ECOD	Ethoxycoumarin-O-Deethylierung
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Extensive Metabolizer (Schnell-Metabolisierer)
EMND	Ethylmorphin-N-Demethylierung
ER	Ethoxyresorufin
EROD	Ethoxyresorufin-O-Deethylierung
FAD	Flavinadenindinucleotid
Fe	Eisen
FMN	Flavinmononucleotid
G-6-P	Glukose-6-Phosphat
hetEM	heterozygote Extensive Metabolizer (Intermedär-Metabolisierer)
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
ICD	Konverter/Defibrillator
K	Kontrolle
KHK	koronare Herzkrankheit
LDH	Laktatdehydrogenase

MG	molare Masse
MQ	Metabolitenquotient
MQ _{komb}	kombinierter Metabolitenquotient
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat) nach Reduktion
Na-P-Puffer	Natrium-Phosphat-Puffer
NYHA	New York Heart Association
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	Poor Metabolizer (Langsam-Metabolisierer)
Prot.	Protein
r _p	Korrelationskoeffizient nach Pearson
r _{sp}	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SF	Standardfehler
TCA	Trichloressigsäure
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkungen
UM	Ultrarapid Metabolizer (Ultraschnell-Metabolisierer)
X	Mittelwert

1. Zusammenfassung

Die katalytische Aktivität von Biotransformationsenzymen hat einen erheblichen Einfluss auf erwünschte und unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW). Über das Enzym Cytochrom P450 (CYP) 2D6 werden besonders viele Medikamente, u.a. Antiarrhythmika, Antidepressiva, β -Blocker und Neuroleptika, metabolisiert. Zudem sind eine Reihe potenter Hemmstoffe, wie z.B. Amiodaron, Cimetidin, Fluoxetin und Haloperidol, für dieses Enzym bekannt. Mit dieser Studie sollten zum einen die wechselseitigen Beziehungen zwischen Genotyp, Phänotyp und pharmakokinetischen Parametern von Flecainid, zum anderen der mögliche Einfluss von Flecainid auf die phänotypische Prägung der Probanden und somit auf den Stoffwechsel anderer über CYP2D6 metabolisierter Medikamente untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression des genetisch polymorph exprimierten Enzyms CYP2D6 mittels Geno- und Phänotypisierung in einer Population von 17 freiwilligen Probanden untersucht (kardiologische Patienten der Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena). Hierzu wurde der Genotyp der Probanden mittels PCR und Restriktionsfragmentanalyse bestimmt und vor und nach 4-tägiger Flecainideinnahme ein Dextromethorphan-Test zur Bestimmung des Phänotyps durchgeführt. Gleichzeitig wurde der Tagesverlauf der Serumkonzentrationen von Flecainid gemessen und die pharmakokinetischen Parameter AUC (area under the curve) und C_{min} (Talspiegel) ermittelt. Anschließend wurden diese Parameter mit den Ergebnissen der Geno- bzw. Phänotypisierung korreliert. Als Aktivitätsmaß für das CYP2D6 dienten der Metabolitenquotient (MQ) aus Dextromethorphan (DEX) und Dextrorphan (DTX) ($MQ_{DEX/DTX}$) und der kombinierte Metabolitenquotient (MQ_{komb}) aus Dextromethorphan und 3-Methoxymorphinan (3-MM) zu Dextrorphan und 3-Hydroxymorphinan (3-HM) ($MQ_{komb}((DEX + 3-MM)/(DTX + 3-HM))$). Für die Aktivität des Enzyms CYP3A4 wurden der $MQ_{DEX/3-MM}$ und der $MQ_{komb}((DEX + DTX)/(3-MM + 3-HM))$ analysiert. Durch einen Vergleich der Konzentration von DEX und seinen Metaboliten bzw. der MQ's zwischen Kontrollphase (vor Flecainideinstellung) und Behandlungsphase (nach Flecainideinstellung) wurde eine mögliche Veränderung des Phänotyps durch Einnahme von Flecainid untersucht.

Eine korrekte genetische Differenzierung zwischen homozygoten Wildtyp-Trägern (Extensive Metabolizern [EM]) und heterozygoten Wildtyp-/Mutations-Trägern (heterozygote EM [hetEM]) ist ebenso wie die Identifizierung von homozygoten Mutationsträgern (Poor Metabolizer [PM]) mittels Genotypisierung möglich. Um die exakte metabolische Aktivität

eines Enzyms zu bestimmen, ist die Phänotypisierung der Genotypisierung vorzuziehen. Es zeigte sich, dass genotypisch als hetEM charakterisierte Probanden phänotypisch Schnell-Metabolisierer darstellten und umgekehrt einige EM eine verminderte Aktivität aufwiesen.

Durch Einnahme von Flecainid kam es zu einer Hemmung des Enzyms CYP2D6, so dass Probanden, die vorher einen EM-Phänotyp hatten, nun einen hetEM-Phänotyp und Probanden, die als hetEM genotypisiert worden waren, nun funktionell PM-Eigenschaften aufwiesen. Die Talspiegel (C_{min}) und die AUC von Flecainid wurden ihrerseits vom Genotyp mit bestimmt und waren bei den EM-Probanden deutlich niedriger als bei den hetEM-Probanden. Die höheren C_{min} - und AUC-Werte bei den hetEM-Probanden zeigen eine partielle Funktionseinschränkung des CYP2D6, da in gleicher Zeit weniger Flecainid metabolisiert werden konnte, als bei den EM-Probanden.

Die Darstellung als hetEM oder EM bezieht sich in der folgenden Arbeit stets auf das Enzym CYP2D6.

Es wurde auch eine Genotypisierung anderer Cytochrome (CYP2C8, 2C9, 2C19) bei den Probanden durchgeführt. Hierbei kam es zu keinem statistisch signifikanten Zusammenhang mit pharmakokinetischen Parametern von Flecainid. Man kann also davon ausgehen, dass diese Cytochrome keine Rolle im Flecainidstoffwechsel spielen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde *in vitro* der Einfluss von Flecainid auf verschiedene Cytochrome (CYP1A, 2A, 2B, 2C und 3A) mittels Modellreaktionen untersucht. Flecainid hemmte diese erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen. In therapeutischer Dosierung von Flecainid dürfte es zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Enzyme und somit auch zu keinen Interaktionen mit anderen Medikamenten, die über diese Cytochrome verstoffwechselt werden, kommen.

2. Einleitung

2.1. Biotransformation

Die Biotransformation ist die biochemische Umwandlung von körpereigenen Substanzen sowie von Fremdstoffen. Dies geschieht hauptsächlich durch Enzyme im endoplasmatischen Retikulum der Leber, wird aber auch in Niere, Lunge und Darm beobachtet. Hierbei kommt es meist zu einer besseren, selten zu einer schlechteren Ausscheidungsfähigkeit der Substanzen. In der Regel werden die Stoffe durch die Biotransformation unwirksam, andere aber erst pharmakologisch wirksam (z.B. Umwandlung von Methanol zu Formaldehyd und Ameisensäure). Dieser Effekt wird bei den so genannten „Prodrugs“ ausgenutzt. So wird z.B. bei der Therapie des Morbus Parkinson das ZNS-gängige Anti-Parkinson-Mittel Levodopa verabreicht. Dieses wird im Gehirn durch die Dopa-Decarboxylase zu Dopamin umgewandelt. Dopamin selbst ist nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren.

Es gibt 2 Phasen bei der Biotransformation (Oesch 1997, Mutschler et al. 2001):

In der Phase 1 werden die Substanzen oxidiert, reduziert oder hydrolysiert. Bei der Oxidation spielen die mischfunktionellen Oxygenasen, zu denen das Cytochrom P450 gehört, eine große Rolle. Die zweite Phase besteht aus den so genannten Konjugationsreaktionen, die die Metabolite meist ausscheidungsfähiger machen. Hierzu zählen die Kopplung an Glucuronsäure, Glycin und Schwefelsäure.

Ein spezielles Phänomen ist die Enzyminduktion, wodurch es zu einer metabolischen Interaktion zwischen verschiedenen Substanzen kommen kann. Ursächlich kann eine Mehrfachgabe von Pharmaka sein, die zu einer Zunahme der Enzyme führt. Hierdurch werden die Arzneimittel selbst (z.B. Phenobarbital, als ein sehr starker Induktor), aber auch andere Substanzen (z.B. durch das Rauchen von Zigaretten) (Schein 1995, Zevin und Benowitz 1999, Rouhos und Raaska 2012), die dieses Enzym nutzen, vermehrt abgebaut. Die Folge ist ein verminderter Wirkspiegel und somit wenig bis keine Wirkung der Medikamente. Auch ist die Induktion morphologisch anhand einer Zunahme des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Hepatozyten zu sehen. Dieser Zustand ist aber reversibel durch Absetzen der induzierenden Substanz.

Man unterscheidet pharmakokinetische von pharmakodynamischen Wechselwirkungen. Pharmakokinetische Interaktionen können bei der Resorption (durch Veränderung oder Verlängerung der Aufnahme), in der Verteilung (z.B. bei Änderungen des Blutflusses oder der

Proteinbindung), im Metabolismus (meist durch Enzyminduktion oder -Hemmung) und bei der Ausscheidung (z.B. durch Inhibition einer aktiven Sezernierung in der Niere) entstehen. Ist die erwartete Antwort ohne Veränderung der Pharmakokinetik reduziert oder verstärkt, spricht man von pharmakodynamischen Wechselwirkungen, die meist durch gleiche pharmakologische Angriffspunkte der Substanzen hervorgerufen werden.

2.2. Das Cytochrom-P450-System

Im Jahre 1958 wurde erstmals ein „zellfärbendes Pigment“ in Schweine- und Rattenleber entdeckt. Dieses hatte nach Reduktion mit Natriumdithionit und Bindung von CO ein Lichtabsorptionsmaximum bei 450 nm (Garfinkel 1958, Klingenberg 1958). Sieben Jahre später benannten Omura und Mitarbeiter dieses Pigment als Cytochrom P450 (Omura et al. 1965).

Es waren dann Nelson et al. 1993, die die heute übliche Klassifikation der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP) erarbeiteten. Sie beschrieben 221 CYP-Gene, die sie in 36 Genfamilien einteilten. CYP-Enzyme finden sich im gesamten Pflanzen- und Tierreich sowie in Bakterien und Viren. Insgesamt sind mittlerweile über 10000 CYP-Gensequenzen bekannt (Nelson 2011). Nach der neuen Nomenklatur steht die erste arabische Ziffer für die Genfamilie, der nachfolgende Buchstabe für die Unterfamilie und schließlich die letzte Ziffer für das spezielle Enzym (z.B. CYP2D6) (Nelson et al. 1996). Per Definition weisen Mitglieder der gleichen Genfamilie >40% Sequenz-Übereinstimmung auf. Innerhalb einer Unterfamilie sind die Sequenzen zu >59% identisch (Ruckpaul 1993).

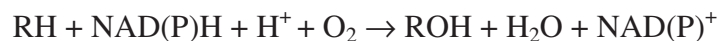
Natürlich unterscheiden sich die Aufgaben der verschiedenen Cytochromfamilien. So scheinen die Familien 1-3 beim Menschen neben Medikamenten auch Pflanzen- und Nahrungsmittelinhaltsstoffe, Umweltgifte und Karzinogene abzubauen. Die Cytochrom-P450-Enzyme der anderen Familien metabolisieren hauptsächlich endogene Substanzen, wie Fettsäuren, Gallensäuren, Prostaglandine, Steroidhormone, Vitamin A und Vitamin D.

Das Vorkommen der CYP-Enzyme ist beim Menschen in den verschiedenen Organen unterschiedlich. So konnte festgestellt werden, dass sich in der Leber die höchste Konzentration befindet (Hietanen 1980). Aber auch in Lunge, Darm, Niere und Gehirn sind sie anzutreffen. Es zeigte sich, dass alle Isoenzyme nach dem gleichen Mechanismus funktionieren (Lewis 1996).

Die humanen CYP-Enzyme sind sich im Aufbau ähnlich. Ihr N-terminales Ende ist in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. Der katalytische Bereich ragt ins Zytoplasma. Ein ca. 500 Aminosäuren umfassendes Apoprotein ist mit einer Hämgruppe assoziiert, wobei das zentrale Eisen-Atom, welches im oxidierten dreiwertigen Zustand vorliegt, mit Cystein verbunden ist. Am katalytischen Zentrum laufen Oxidationen und Peroxidationen ab, mit der Folge einer Dealkylierung, Dehalogenierung, Desaminierung, Epoxidierung oder Hydroxylierung von Substanzen.

Bevor sich bei Hydroxylierungen molekularer Sauerstoff an die Hämgruppe des Apoproteins anlagern kann, muss das Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert werden. Hierfür wird NAD(P)H oxidiert und das überschüssige Elektron auf das Eisen übertragen. Nachdem ein zweites Elektron aufgenommen wurde, zerfällt das Sauerstoffmolekül in 2 Atome. Ein Atom lagert sich an das Substrat an, das andere verbindet sich mit 2 Wasserstoffmolekülen zu Wasser.

Es ergibt sich:



Da ein CYP-Enzym nicht zwei Elektronen gleichzeitig aufnehmen kann, gibt die membrangebundene NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, die jeweils ein Molekül FAD und FMN als prosthetische Gruppe besitzt, die zu übertragenden Elektronen sukzessive ab (Vermilion und Coon 1978, Oprian und Coon 1982, Tamura et al. 1992).

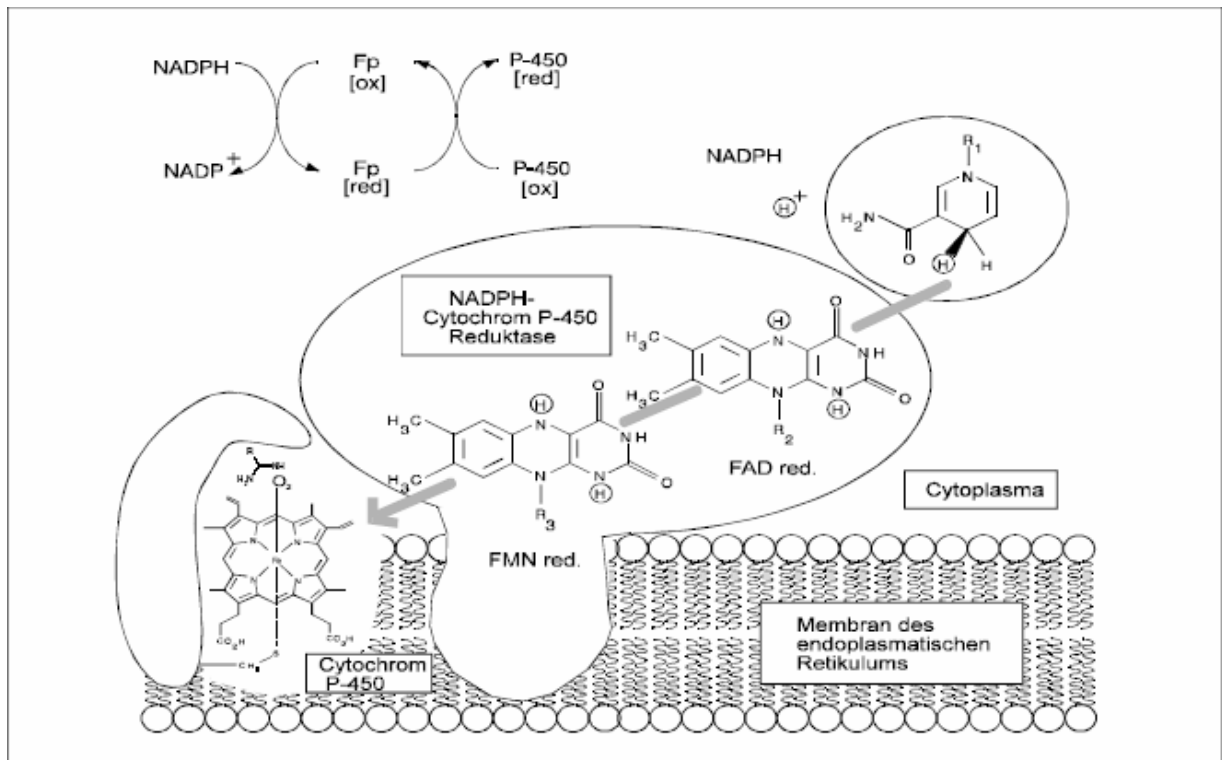


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Cytochrom P450 und NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase (modifiziert nach Ruckpaul 1993).

Wenn es zur Entkopplung des CYP-Mechanismus kommt (z.B. bei NADPH-Mangel), entstehen freie Radikale, wie z.B. Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$), Perhydroxylradikale (HOO^{\bullet}), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (HO^{\bullet}), Alkoxyradikale (RO^{\bullet}), Peroxylradikale (ROO^{\bullet}) und Hydroperoxide ($ROOH$). Freie Radikale sind Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere freie Elektronen zur Verfügung haben, wobei das freie Elektron ein Orbital allein belegt. Sie entstehen unter oxidativem Stress, d.h. es kommt zu einem erhöhten Anfall von zu oxidierenden Produkten und einem relativen oder absoluten Mangel an Elektronenakzeptoren. Ursachen dafür können Nikotin, Alkohol und Umweltbelastungen sein.

Es gibt eine Vielzahl von Erkrankungen, die durch diese besonders reaktionsfreudigen Moleküle verursacht werden. Hierzu zählen die Arteriosklerose, der Morbus Parkinson oder die rheumatoide Arthritis. Besonders anfällig für Sauerstoffradikale sind Lipide, welche ein Hauptbestandteil der Zellmembran sind. Durch Lipidperoxidationen kommt es zu einer Schädigung der Zellintegrität, die den Tod der Zelle zur Folge haben kann. Von besonderer Bedeutung sind weiterhin mögliche Schädigungen der Basen von Nukleinsäuren (v.a. Thymin und Guanin), die letztendlich eine Veränderung der Chromosomen und damit des Erbgutes nach sich ziehen können. Die Folge sind Chromosomenaberrationen, DNA-Strangbrüche und ein verlangsamtes Wachstum der Zellen (Floyd und Carney 1992, Oya et al. 1992). Weiterhin

können Schäden der DNA entstehen, die zur Mutagenität und Kanzerogenität führen (Okada 2002, O'Connor et al. 2010). Auch Proteine werden durch freie Radikale angegriffen. Sind z.B. Enzyme betroffen, kann deren Aktivität deutlich reduziert werden.

Natürlich gibt es körpereigene Abwehrmechanismen, um Radikale zu binden und zu neutralisieren. Dies sind die so genannten enzymatischen Antioxidantien, zu denen die Glutathionperoxidase, die Superoxiddismutase und die Katalase gehören. Daneben gibt es eine Reihe von nichtenzymatischen Antioxidantien wie z.B. die Vitamine A, C und E (Biesalski und Frank 1995, Proteggente et al. 2002, Linder 2012).

In einem gesunden Körper herrscht ein Gleichgewicht zwischen Radikalentstehung und Radikalinaktivierung.

Verschiedene CYPs (z.B. CYP2D6) sind genetisch polymorph exprimiert. Als genetischer Polymorphismus wird das Vorkommen von zwei oder mehr genetisch determinierten, alternativen Phänotypen in einer Population, aufgrund verschiedener Allele definiert. Ein Genlocus wird als polymorph bezeichnet, wenn verschiedene Allelvarianten vorliegen, die eine Häufigkeit von jeweils mindestens 1% in der Bevölkerung haben.

2.2.1. Cytochrom P450 2D6 und seine genetische Vielfalt

Dem genetisch polymorph exprimierten Enzym CYP2D6, welches in Leber, Darm, Lunge sowie anderen Organen vorhanden ist, kommt eine große Bedeutung im Abbau verschiedener Medikamente zu. Antiarrhythmika (z.B. Amiodaron und Flecainid), Betablocker (z.B. Carvedilol und Metoprolol), Antidepressiva (z.B. Venlafaxin, Imipramin und Amitriptylin), Neuroleptika (z.B. Olanzapin und Haloperidol) sowie Opioide (z.B. Tramadol und Codein [Aktivierung]) werden über dieses Enzym metabolisiert ([http://medicine.iupui.edu/flockhart/Cytochrome P450 drug interaction table](http://medicine.iupui.edu/flockhart/Cytochrome%20P450%20drug%20interaction%20table); last update January 2012). Es wird geschätzt, dass fast 50% aller Substanzen, welche in der Neurologie und Psychiatrie eingesetzt werden, über CYP2D6 abgebaut werden. Wegen der oft geringen therapeutischen Breite gerade dieser Arzneimittel spielt die Phäno- und oder Genotypisierung eine immer größere Rolle, da somit starke Nebenwirkungen vermieden und der gewünschte therapeutische Effekt erreicht werden kann. Ein besonders eindrucksvolles Beispiel ist das Antidepressivum Nortriptylin, welches ebenfalls über CYP2D6 abgebaut wird. Hier konnte gezeigt werden, dass, abhängig vom Metabolisierungstyp, die notwendige Dosis zwischen 10 und 500 mg pro Tag liegen kann, um

einen optimalen Effekt zu erzielen und unerwünschte Wirkungen zu vermeiden (Abbildung 2) (Schwab und Eichelbaum 1999).

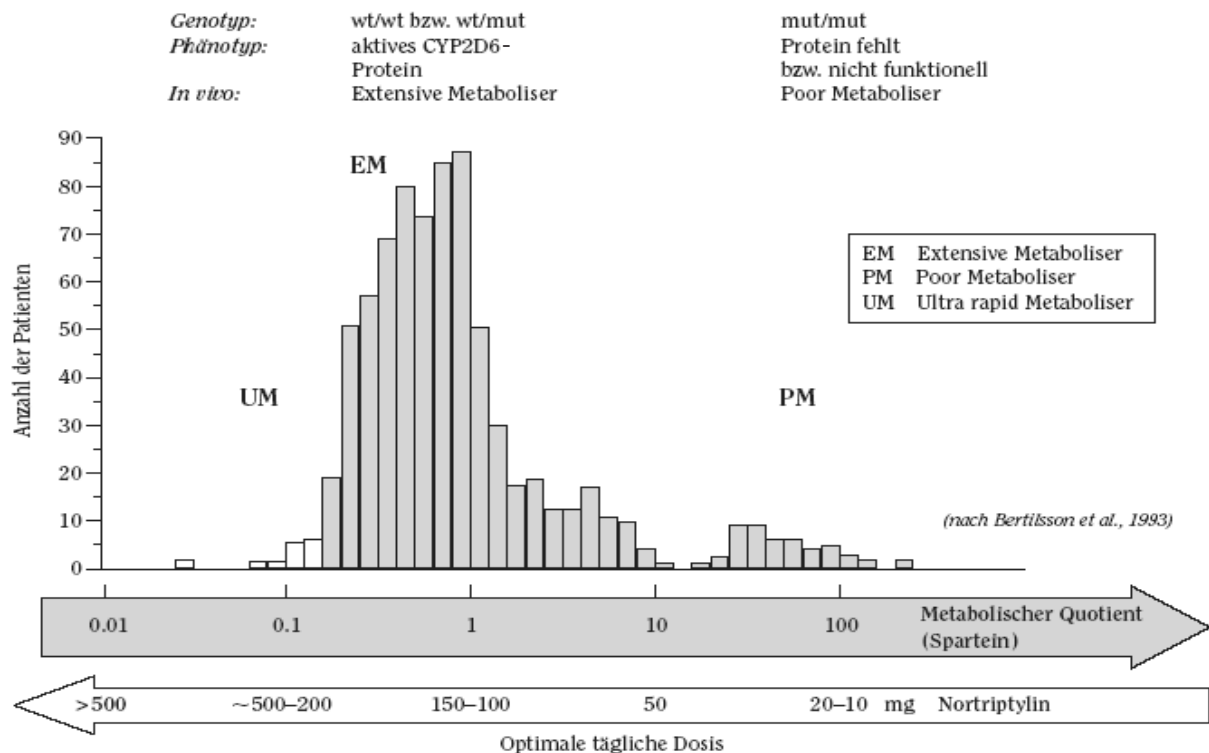


Abbildung 2: Konsequenzen des genetischen Polymorphismus von Cytochrom P450 2D6 für die Pharmakotherapie von trizyklischen Antidepressiva am Beispiel von Nortriptylin (Schwab und Eichelbaum 1999).

Die Enzymaktivität von CYP2D6 zeigt große interindividuelle Unterschiede, welche abhängig von der Funktionalität und der Anzahl der intakten Allele sind. Bis heute sind über 74 Allelvarianten und eine Reihe von Subvarianten erforscht worden (Zhou 2009). Der Phänotyp des CYP2D6 wird durch die Kombination von je einem mütterlichen und einem väterlichen Allel bestimmt. Sind nur inaktive Allele vorhanden, so handelt es sich um einen „Poor Metabolizer“ (PM). Diese Personen haben keine Enzymaktivität und somit eine fehlende Arzneimittelmetabolisierung über CYP2D6. Der Anteil der „Poor Metabolizer“ beträgt in der mitteleuropäischen Bevölkerung 5-10% (Rioux 2000) und in anderen Ethnien 1-4% (Marez et al. 1997, Sachse et al. 1997, Kouhi et al. 2009). Bei nur einem aktiven Allel spricht man nach neuer Nomenklatur vom „heterozygoten Extensive Metabolizer“ (hetEM), und wenn dieses Allel eine reduzierte Aktivität vermittelt, von einem „Intermediate Metabolizer“ (IM). Die Enzymaktivität/Metabolisierungskapazität ist vermindert. Der größte Teil der Bevölkerung hat eine normale Enzymaktivität mit zwei aktiven Allelen und metabolisiert Arzneimittel

effizient. Sie werden „Extensive Metabolizer“ (EM) genannt. Kommt es zu einer Verdopplung bzw. Vervielfältigung der Allele (Genduplikation), führt dies zu einer sehr hohen Enzymaktivität. Die so genannten „Ultraprapid Metabolizer“ (UM), deren Vorkommen ein starkes europäisch-afrikanisches Nord-Südgefälle aufweist, haben eine sehr schnelle Medikamentenmetabolisierung. Während in Deutschland nur 4% der Bevölkerung diesen Typ aufweisen, sind es in Spanien schon 7-10% und in Nordafrika sogar 20-29% (Bertilsson et al. 2002).

Es ist deshalb wichtig, bei Patienten, die trotz nachgewiesener Compliance keine adäquate (UM) oder eine überschießende (PM) Reaktion auf ein Medikament zeigen, welches über CYP2D6 abgebaut wird, den Phänotyp und/oder den Genotyp zu bestimmen.

Klinisch ist dies immer dann indiziert, wenn der Metabolismus quantitativ von einem polymorph exprimierten CYP-Enzym abhängig ist und wenn das Medikament eine geringe therapeutische Breite besitzt. Um Probleme wie Wirkstoffkumulation, mangelnde Medikamentenwirkung oder unerwünschte Interaktionen zu vermeiden, ist es deshalb bedeutsam, den Phänotyp eines bestimmten Patienten zu kennen, um eventuell eine Dosisanpassung vorzunehmen oder sogar eine andere Therapieoption zu wählen. Letztlich stellt (bei entsprechender Substratspezifität) auch das Therapeutische Drug-Monitoring (zum Beispiel bei Psychopharmaka, aber auch bei Flecainid) in gewisser Weise eine Form der Phänotypisierung dar, die eine Dosisanpassung erlaubt.

2.3. Dextromethorphan – Modellsubstanz zur Phänotypisierung

Die Aktivität des Enzyms CYP2D6 kann durch in-vivo-Bestimmungen ermittelt werden. Für die in-vivo-Analyse werden so genannte Modellsubstanzen, wie z.B. Dextromethorphan, Debrisoquin oder Spartein, verwendet.

Hierbei wird der Phänotyp eines Menschen festgestellt. Dieser wird vom determinierten Genotyp und von verschiedenen Umwelteinflüssen bestimmt. Auch können viele Medikamente, durch Induktion oder Hemmung, den Phänotyp verändern.

Dextromethorphan (DEX) ist ein rezeptfreies Antitussivum und ein Morphinderivat. Es ist der Wirkstoff in Hustenstiller Ratiopharm®. Nach oraler Applikation wird es rasch resorbiert und in der Leber metabolisiert. Liegt keine Enzymschwäche vor, erfolgt bereits präsystemisch eine nahezu vollständige Metabolisierung. Innerhalb von 2 Stunden werden maximale Plasmaspiegel von Dextromethorphan als Hauptmetabolit erreicht. Die bisher bekannten

Abbauewege sind die O-Demethylierung über CYP2D6 zu Dextrorphan (DTX) und die N-Demethylierung über CYP3A4 zu 3-Methoxymorphinan (3-MM). Sowohl 3-MM als auch DTX werden anschließend erneut durch O- bzw. N-Demethylierung zu 3-Hydroxymorphinan (3-HM) umgewandelt (Blake et al. 2007) (Abbildung 3). Hierbei sind die Substrataffinitäten für CYP3A4 jedoch deutlich niedriger (Faktor ca. 50 bis 100) als diejenigen für CYP2D6 (Yu und Haining 2001).

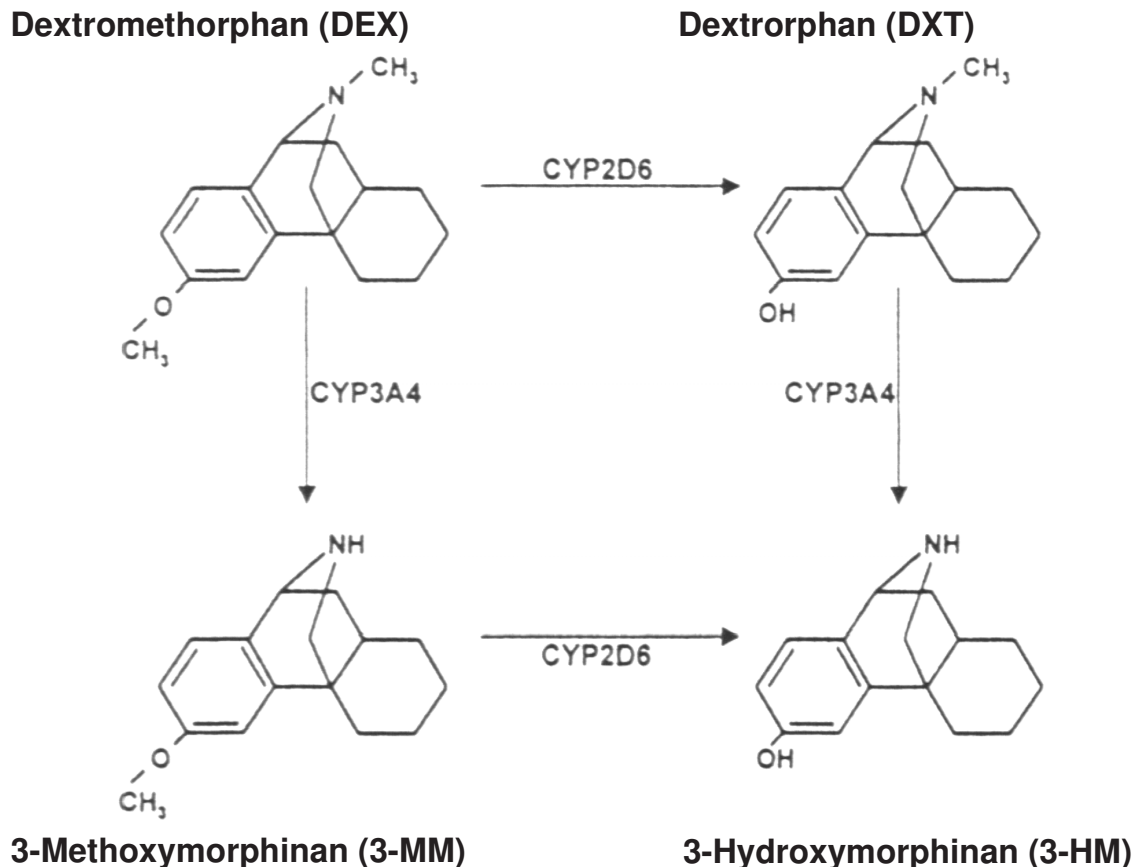


Abbildung 3: Strukturformeln von Dextromethorphan und seiner O- und N-demethylierten Metabolite, modifiziert nach Blake et al. 2007.

Um die Enzymaktivität von CYP2D6 zu bestimmen, wird die so genannte „metabolic ratio“ ermittelt. Dieser Metabolitenquotient setzt sich aus dem Quotienten der Serumkonzentrationen von DEX und DTX bzw. 3-MM und 3-HM zusammen. Analog ist es möglich, die Aktivität des CYP3A4 durch das Verhältnis von DEX/3-MM und DTX/3-HM zu messen (Ducharme et al. 1996, Jones et al. 1996a). Die Bestimmung von DEX und seiner Metabolite im Urin oder im Serum wird mittels high-performance liquid chromatography (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt.

2.4. Die Genotypisierung und ihre Bedeutung

Eine beachtliche Zahl jährlicher Todesfälle ist auf unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) zurückzuführen, die zunehmend mit genetischen Variationen, also der Individualität des Menschen, in Verbindung gebracht werden (Buchert und Woosley 1992). Deshalb hat die Genotypisierung eine enorme Bedeutung erlangt (Arcavi und Benowitz 1993, Ismail und Teh 2006, Schwaiblmair et al. 2011). Bei dieser Methode untersucht man mit molekularbiologischen Methoden die Anzahl und Gensequenz von Allelen bestimmter DNA-Abschnitte. Da hierzu keine Modellsubstanz verabreicht werden muss, ist diese Methode für die Patienten risikoärmer, aber auch teurer als die Phänotypisierung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Bestimmung des Genotyps von CYP2D6 in 99% der Fälle mit dem entsprechenden Phänotyp übereinstimmt (Schwab et al. 2002).

Das Potential der Genotypisierung ist aber bei weitem noch nicht ausgeschöpft, da im Moment nur wenige Enzyme ausreichend erforscht sind. Mit genauerer Kenntnis über die Funktionen und den Aufbau der Enzyme und immer kostengünstigeren Techniken zur Bestimmung des Genotyps wird diese Methode in Zukunft an Bedeutung gewinnen und möglicherweise dazu beitragen, das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen zu vermindern.

2.5. Die Elektrophysiologie des Herzens und ihre Pathologie

Beim gesunden Menschen breitet sich die Erregung der Herzmuskelzellen vom Sinusknoten, dem natürlichen Schrittmacher im rechten Vorhof, durch festgelegte Leitungsbahnen gleichmäßig über das gesamte Herz aus (Abbildung 4) und veranlasst so den Herzmuskel, sich zu kontrahieren. Wichtige Begriffe sind in diesem Zusammenhang „Aktionspotential“ und „Refraktärperiode“.

Unter einem Aktionspotential versteht man einen elektrischen Impuls, der zu einer Kontraktion führt. Es strömen in der Depolarisationsphase Natrium-Ionen und Kalzium-Ionen in die Zelle ein und Kalium-Ionen hinaus. In der Repolarisationsphase wird dies durch eine Natrium-Kalium-ATPase sowie durch eine Kalzium-Pumpe wieder ausgeglichen. Im Myokard führt ein Aktionspotential über eine Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern zur Kontraktion der Muskelfilamente. Unmittelbar nach einem Aktionspotential spricht die Zelle nicht auf Reize an, um sich vor Dauerkontraktionen oder kreisenden

Erregungen zu schützen. Dies ist die Refraktärperiode, welche noch in eine absolute und in eine relative unterteilt wird (Speckmann 2008).

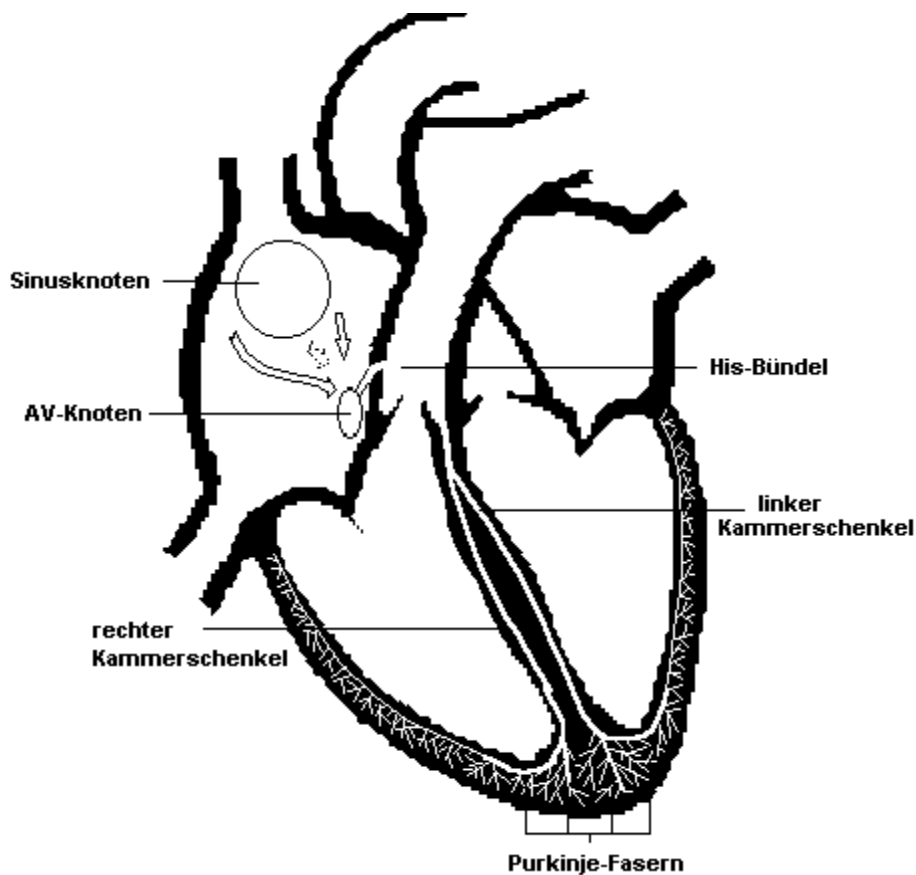


Abbildung 4: Erregungsleitung des Herzens (nach medizininfo.de/.../erregungsleitung.shtml).

Bei einem Patienten mit Herzrhythmusstörungen ist die Frequenz der Schläge entweder zu schnell (Tachykardie) oder zu langsam (Bradykardie), es fallen Herzschläge aus (Asystolen) oder es kommen zusätzliche hinzu (Extrasystolen). Bei starken Frequenzanstiegen spricht man je nach Lokalisation und Frequenz von Vorhof- oder Kammerflattern bzw. -flimmern. Kurzzeitige Brady- oder Tachykardien sowie Extrasystolen haben in vielen Fällen keinen pathologischen Wert und müssen nicht behandelt werden, denn auch viele Gesunde haben gelegentlich diese Störungen des Herzrhythmus. Erst wenn die Pumpleistung des Herzens abnimmt und Symptome wie Schwindel, Müdigkeit oder sogar Synkopen auftreten, ist eine Intervention angezeigt, da es sonst im Extremfall zum akuten Herzversagen kommen kann. Aufzeigen lassen sich diese Störungen durch Ruhe-, Langzeit- oder auch Belastungs-EKGs. Auch Laboruntersuchungen zum Ausschluss von Elektrolytstörungen, Stoffwechsell-
gleisungen oder zur Bestimmung des Spiegels bestimmter Medikamente (z.B. Digitalis-
Glykoside) werden durchgeführt.

2.6. Behandlungsmöglichkeiten von Arrhythmien

Prinzipiell hängt die Behandlung von Herzrhythmusstörungen von deren Ursachen ab.

Liegt eine Grunderkrankung vor, z.B. eine Schilddrüsendysfunktion, so wird primär erst einmal diese behandelt. Ist dies nicht erfolgreich oder liegt keine spezifische Grunderkrankung vor, stehen verschiedene chirurgische Verfahren, wie die Katheterablation der ektopen Bahnen oder die Implantation eines Schrittmachers, aber auch medikamentöse Therapien in Form von Antiarrhythmika zur Verfügung.

Bereits 1914 wurde beobachtet, dass als Nebeneffekt bei der Behandlung von Malaria mit Chinidin Arrhythmien gelindert werden konnten. Antiarrhythmika werden anhand der Vaughan-Williams-Klassifikation (Vaughan Williams 1984) nach ihren Angriffspunkten in verschiedene Klassen eingeteilt (Tabelle 1). Klasse-1-Antiarrhythmika sind Natrium-Kanal-Blocker und hemmen somit den Einstrom von Natrium in die Zellen. In dieser Klasse werden noch einmal drei Subklassen unterschieden. Die Klasse 1A führt zu einer Verlängerung, die Klasse 1B zu einer Verkürzung der Dauer des Aktionspotentials und die Klasse 1C hat keinen oder nur einen geringen Einfluss auf diese. Dafür wird bei Substanzen der Klasse 1C die Refraktärzeit verlängert. Zur Klasse 2 werden die Beta-Rezeptorenblocker gezählt. Kalium-Kanal-Blocker, also Medikamente die den Kaliumausstrom aus den Zellen hemmen, werden zur Klasse 3 zusammengefasst (Amiodaron, neuerdings Dronedaron (Hundal und Garg 2010, Schweizer et al. 2011)). Zur Antiarrhythmika-Klasse 4 zählen Medikamente, die den Kalziueinstrom in die Zellen hemmen, so genannte Kalziumantagonisten (Tabelle 1).

Leider haben besonders Klasse-1-Antiarrhythmika als Nebenwirkung auch proarrhythmische Effekte, d.h. sie können selbst Herzrhythmusstörungen verstärken (Friedman und Stevenson 1998). Dies ist bei 2-15% der Patienten der Fall und kann, abhängig von der Plasmaserumkonzentration der Substanzen, zum Tod führen (Eichelbaum und Gross 1990). Fast alle Antiarrhythmika werden über Cytochrom-P450-Enzyme metabolisiert (Trujillo und Nolan 2000) und somit gibt es große interindividuelle Unterschiede in der Plasmakonzentration bei Gabe einer Standarddosis. Das größte Risiko einer Überdosierung besteht bei „Poor Metabolizern“ mit Herzversagen und gleichzeitiger Leber- und Niereninsuffizienz. Auch können sich verschiedene Kombinationen von Medikamenten günstig oder ungünstig auf den Plasmaspiegel und somit positiv oder negativ auf den therapeutischen Effekt und/oder die Nebenwirkungen auswirken. Ebenfalls können Antiarrhythmika die Effektivität von ICD's beeinflussen, indem sie die Defibrillationsschwelle (DFT) verändern (Qi und Dorian 1999). Es konnte gezeigt werden,

dass ein Beta-Rezeptorenblocker, also ein Klasse-2-Antiarrhythmikum, den proarrhythmischen Effekt von Flecainid, das der Klasse 1C zugeordnet wird, aufheben und vor ventrikulären Tachykardien schützen kann (Myerburg et al. 1989). Daher ist die Begleittherapie mit Beta-Rezeptorenblockern bei einer solchen antiarrhythmischen Medikation heute gängige Praxis.

Tabelle 1: Klassifikation der Antiarrhythmika nach Vaughan Williams (1984)

Gruppe	Wirkungsweise	Substanzen
1	Natrium-Kanal-Blocker	
1A	- mit Verlängerung des Aktionspotentials	Chinidin, Procainamid, Disopyramid
1B	- mit Verkürzung des Aktionspotentials	Lidocain, Mexiletin, Phenytoin, Tocainid
1C	- keine signifikante Wirkung auf die Aktionspotentialdauer	Lorcainid, Flecainid, Propafenon
2	Beta-Rezeptorenblocker	Propranolol, Metoprolol
3	Kalium-Kanal-Blocker	Amiodaron, Dronedaron, Sotalol
4	Kalzium-Kanal-Blocker	Verapamil, Nifedipin, Diltiazem

Eine der häufigsten Herzrhythmusstörungen mit etwa 4 Millionen Betroffenen in Europa ist das Vorhofflimmern. Hierbei sind die Gefahren eines thrombembolischen Ereignisses (z.B. eines Schlaganfalls) erhöht. Vorhof und Ventrikel schlagen hierbei praktisch unabhängig voneinander, da die rasch aufeinander folgenden Impulse, die der Vorhof aussendet, nicht regelhaft übergeleitet werden. Die Ursachen für ein Vorhofflimmern können mannigfaltig sein, wie verschiedene kardiale Erkrankungen, eine Hyperthyreose oder eine Hypertonie. Symptome wie Schwindel, aber auch Herzklopfen und Luftnot, sind erste Anzeichen für diese Herzrhythmusstörung.

Es ist bis heute nicht geklärt, welcher Patient davon profitiert, in den normalen Sinusrhythmus überführt zu werden, und welcher Patient mit einer effektiven Antikoagulation zur Verhinderung von Embolien und entsprechender Frequenzreduzierung besser behandelt ist. Die AFFIRM-Studie (Wyse et al. 2002) und die RACE-Studie (Van Gelder et al. 2002) werteten die ventrikuläre Frequenzkontrolle, bei gleichzeitiger oraler Antikoagulation, als primäre Behandlungsoption auf. Multizentrische Studien, die unterschiedliche Antiarrhythmika bei verschiedenen Arten von Vorhofflimmern untersuchten, sind die

PAFAC-Studie (Fetsch et al. 2004) und die SOPAT-Studie (Patten et al. 2004), welche Patienten mit chronischem Vorhofflimmern umfassten, die nach elektrischer Kardioversion ein Medikament, entweder Placebo, Sotalol oder eine Kombination aus Chinidin und Verapamil, zur Rezidivprophylaxe verschrieben bekommen hatten. Es zeigte sich, dass beide Behandlungsstrategien bessere Ergebnisse erzielten als die Placebogabe, wobei die Kombinationsbehandlung mit Chinidin und Verapamil günstiger war, als die Behandlung mit Sotalol. Alle Patienten in diesen Studien erhielten ein kleines EKG-Gerät in der Größe einer Chipkarte, mit dem täglich der Herzrhythmus über einen Zeitraum von einem Jahr überprüft wurde. Durch die engmaschige Kontrolle wurde für die Patienten eine größtmögliche Sicherheit gewährleistet.

2.7. Flecainid – Eigenschaften und Geschichte des Antiarrhythmikums

Flecainid, (N-(2-Piperidinmethyl)-2,5-bis(2,2,2-trifluoroethoxy)benzamid) (Abbildung 5), ist ein Antiarrhythmikum der Klasse 1C.

Es ist als Racemat aus dem R(-)- und dem S(+)-Enantiomer im Handel erhältlich (Blaschke et al. 1985), jedoch konnte im Tierversuch kein Unterschied im antiarrhythmischen Potential zwischen beiden Enantiomeren gezeigt werden (Banitt et al. 1986). Dafür sind aber wahrscheinlich die Abbauwege dieser beiden Enantiomere unterschiedlich. Wie bei Patienten mit CYP2D6-„Poor Metabolizer“-Eigenschaft gezeigt werden konnte, ist hier nur der Metabolismus des R-Enantiomers beeinträchtigt (Gross et al. 1989). Dies spricht dafür, dass das S-Enantiomer nicht, oder nur zum Teil, über CYP2D6 abgebaut wird.

Nach oraler Aufnahme, mit rascher und fast vollständiger Resorption, wird der maximale Flecainid-Plasmaspiegel nach ca. 2-6 Stunden erreicht, bevor sich bei täglicher Gabe nach ungefähr 4 Tagen, d.h. nach etwa 5 Halbwertszeiten, ein Steady-State-Spiegel einstellt. Die Halbwertszeit bei Gesunden beträgt 7-15 Stunden (Hodges et al. 1982). Die gewählte Dosierung beträgt in der Regel 2 x 100 mg pro Tag. Die therapeutische Breite, die sehr gering ist, wird mit 200-1000 ng/ml (Plasmaspiegel) angegeben. Ab 1000 ng/ml ist mit einer wahrscheinlich toxischen Wirkung und über 1600 ng/ml mit einer sicher toxischen Wirkung zu rechnen (Spivack et al. 1984, Romain et al. 1999, Benijts et al. 2003, Palmiere et al. 2012). Flecainid kann nicht über extrakorporale Eliminationsverfahren (z.B. Hämodialyse oder Hämofiltration) entfernt werden (Pond 1991).

Der First-Pass-Effekt in der Leber ist vernachlässigbar (Hodges et al. 1979), jedoch unterliegt Flecainid einem intensiven Sekundär-Metabolismus, hauptsächlich durch das Enzym CYP2D6, welches, wie bereits oben erwähnt, einen ausgeprägten genetischen Polymorphismus zeigt (Eichelbaum et al. 1979, 1982, Haefeli et al. 1990, Lim et al. 2010). Der Metabolismus ist ähnlich dem von Spartein/Debrisoquin (Mikus et al. 1989). Die zwei Hauptmetabolite, meta-O-dealkyliertes Flecainid (MODF) und sein Laktam (MODLF) (Munafo und Biollaz 1989), haben nur eine geringe bis keine antiarrhythmische Potenz (Conard und Ober 1984, Roden und Woosley 1986), rufen aber, nach heutigem Wissensstand, auch keine Nebenwirkungen hervor. Die Bioverfügbarkeit von Flecainid beträgt über 90% (Hage et al. 1995). Es konnte aufgezeigt werden, dass Flecainid und seine Metabolite, pH-abhängig (Muhiddin et al. 1984) und in Korrelation zum Blutfluss, fast vollständig über die Niere ausgeschieden werden. Insgesamt werden in Abhängigkeit vom pH-Wert 45% (bei einem pH-Wert von 4,4 – 5,4) bis 7% (bei einem pH-Wert von 7,4 – 8,3) nicht metabolisiert renal ausgeschieden (Tambocor[®] Fachinformation, 3M Medica, Neuss, Deutschland). Nur 5% der Dosis erscheint im Stuhl (Conard und Ober 1984, McQuinn et al. 1984). Deshalb ist die Elimination bei Nierenschädigung (Braun et al. 1987, Cavalli et al. 1988, Forland et al. 1988) und Lebererkrankungen (McQuinn et al. 1988) gestört. Außerdem wurde berichtet, dass eine Herzinsuffizienz Grad 3 oder 4 nach NYHA die renale Ausscheidung beeinflusst und somit zu erhöhten Steady-State-Spiegeln führt (Nitsch et al. 1987, Cavalli et al. 1988). Ebenfalls können Medikamente die renale Ausscheidung verändern. So führt beispielsweise Chinidin zu einer Reduktion der renalen Elimination von Flecainid (Munafo et al. 1992). Flecainid ist plazentagängig (Bourget et al. 1994). Der Metabolismus von Flecainid ist geschlechtsunterschiedlich (Doki et al. 2007) und ändert sich mit dem Alter des Patienten (Doki et al. 2009, Deneer und van Hemel 2011).

Studien zeigten, dass Flecainid zu 40-60% ungebunden vorliegt (Caplin et al. 1985, Padrini et al. 1993, Zordan et al. 1993). Der Rest bindet sich an α_1 -saureres Glykoprotein und Albumin.

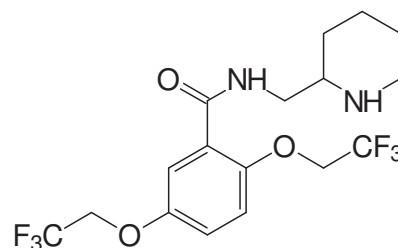


Abbildung 5: Strukturformel von Flecainid (Summenformel $C_{17}H_{20}F_3N_2O_3$).

Flecainid blockiert frequenzabhängig die schnellen Natriumkanäle, welche für den Aufstrich des Aktionspotentials verantwortlich sind, und verzögert hierdurch den Natrium-Einstrom in die Zellen des Herzmuskels. Gleichzeitig verlängert es die Refraktärzeit und unterdrückt somit ektope Schrittmacher. Es verlangsamt die Erregungsleitung (Horowitz et al. 1987, Morganroth 1987), insbesondere die intraventrikuläre, hat aber keinen Einfluss auf die Funktion eines gesunden Sinusknotens. Diese Verlangsamung der kardialen Überleitung kann möglicherweise Reentry-Mechanismen erleichtern (Soyka 1986). Durch programmierte Stimulation unterdrückt es die Induktion anhaltender ventrikulärer Tachykardien (Platia et al. 1985).

Anwendung findet Flecainid bei symptomatischen und behandlungsbedürftigen tachykarden supraventrikulären Herzrhythmusstörungen, wie z.B. AV-junktionalen Tachykardien, supraventrikulären Tachykardien, Wolff-Parkinson-White-Syndrom oder paroxysmale Vorhofflimmern (Holmes und Heel 1985, Roden und Woosley 1986). Seit einiger Zeit gibt einen neuen Therapieansatz zur Bekämpfung des paroxysmalen Vorhofflimmerns. Das „pill-in-the-pocket-Konzept“ ist für Menschen, die keine strukturelle Herzerkrankung, aber intermittierend symptomatisches Vorhofflimmern haben (Deneer et al. 2004, Alboni et al. 2005). Bei Auftreten der Symptome nimmt der Patient sofort das Medikament (z.B. 200 oder 300 mg Flecainid) ein. Die initiale medikamentöse Einstellung muss natürlich unter kontrollierten Bedingungen erfolgen. Die Erfolgsrate zur Konversion in den Sinusrhythmus liegt laut Studien bei 80% (Meinertz und Willems 2008).

Flecainid besitzt, wie andere Antiarrhythmika, einen proarrhythmischen Effekt. Es induziert QT-Zeit-Verlängerungen (Boriani et al. 1993, Padrini et al. 1993, Funck-Brentano et al. 1994, Cros et al. 2012) bis hin zu ventrikulären Tachykardien (Lui et al. 1982, Thevenin et al. 2003) und es konnte ein Zusammenhang zwischen Wirkung und Plasmakonzentration (Mikus et al. 1989) oder Dosis (Pritchett et al. 1991) hergestellt werden. 20% der proarrhythmischen Ereignisse sind auf einen zu hohen Flecainid-Plasmaspiegel zurückzuführen (Salerno et al. 1986). Es ist deshalb wichtig, einen therapeutisch günstigen Wirkspiegel von Flecainid herzustellen. Neben Über- oder Unterdosierung und langsamer oder schneller Metabolisierung können auch andere Medikamente durch verschiedene Interaktionen den Plasmaspiegel herauf- oder herabsetzen. Zum Beispiel erhöht sich der Plasmaspiegel bei gleichzeitiger Gabe von Chinidin (Birgersdotter et al. 1992), Amiodaron (Funck-Bretano et al. 1994) oder Antidepressiva, wie selektiven Serotonin-Rückaufnahme-Inhibitoren (SSRI) (Nemeroff et al. 1996, Tsao und Gugger 2009), da durch diese Substanzen das CYP2D6 gehemmt wird. Aber auch Arzneimittel, die zu einer pH-Wert-Erhöhung des Urins führen, können den

Plasmaspiegel steigen lassen, da sie die Ausscheidung von Flecainid und seinen Metaboliten verlangsamen (Johnston et al. 1985). Flecainid beeinflusst seinerseits aber auch andere Medikamente. So ist bei gleichzeitiger Einnahme von Digoxin der Digoxinspiegel um 15% erhöht (Lewis und Holtzman 1984, Weeks et al. 1986). Deshalb ist es sehr wichtig, gerade bei Beginn der Therapie mit Flecainid den Patienten zu überwachen. Als einfachste Methode der Überwachung bietet sich das EKG-Monitoring an (Detektion einer eventuell bedeutsamen Verlängerung des QRS-Intervalls), dieses ersetzt jedoch nicht die Plasmaspiegelbestimmung.

2.8. Die CAST-Studie und ihre Auswirkungen

Die CAST-Studie (The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators, 1989) war eine placebo-kontrollierte, doppelblinde und multizentrische Studie, die 1498 Patienten umfasste. Sie begann im Juni 1987 und untersuchte die Wirkung von 3 Antiarrhythmika (Encainid, Flecainid und Moricizin) auf Patienten mit vorherigem Myokardinfarkt und aktuellen asymptomatischen bzw. leicht symptomatischen ventrikulären Arrhythmien. Diese Antiarrhythmika hatten in der vorher durchgeführten Cardiac-Arrhythmia-Suppression-Pilot-Studie (CAPS-Studie) gezeigt, dass sie Arrhythmien bei der Zielpopulation adäquat unterdrücken können (The CAPS Investigators, 1986). Die Patienten mussten für die CAST-Studie folgende Voraussetzungen erfüllen:

Sie wurden 6 Tage bis 2 Jahre nach einem Myokardinfarkt rekrutiert, wenn 6 oder mehr ventrikuläre Extrasystolen pro Stunde im EKG zu beobachten waren. Außerdem mussten sie eine Herzfrequenz von ≥ 120 Schlägen pro Minute, eine Ejektionsfraktion (EF) von $\leq 55\%$ (innerhalb 90 Tagen nach Myokardinfarkt) oder von $\leq 40\%$ (bei ≥ 90 Tagen nach Myokardinfarkt) haben. Flecainid wurde nicht bei einer EF von unter 30% gegeben, um eine Verschlechterung der linksventrikulären Dysfunktion zu vermeiden (Morganroth et al. 1986, Greene et al. 1989). Die Patienten mussten adäquat auf die Therapie ansprechen, was bedeutete, dass die ventrikulären Extrasystolen um $\geq 80\%$ und ventrikuläre Tachykardien um $\geq 90\%$ reduziert werden sollten. Endpunkte der Studie waren Herzkreislauf- und Atemstillstand durch die Arrhythmie verursacht (primär) und nicht durch die Arrhythmie verursacht (sekundär). Am 18. April 1989, nach 22 Monaten, wurden die Studienarme mit Encainid und Flecainid eingestellt, da die Daten zeigten, dass die Behandlung nicht nur keinen Vorteil erbrachte, sondern sogar schädlich war. Es wurde ein vorzeitiger Bericht herausgegeben und die Studie mit Moricizin fortgesetzt. Trotz effektiver Unterdrückung der ventrikulären Extrasystolen, war die Zahl der plötzlichen Herztode in der Flecainid/Encainid-

Gruppe im Vergleich zu Moricizin und zur Placebogruppe angestiegen. Die Todesrate in der Flecainid/Encainid Gruppe war 2,6-mal so hoch wie in der Kontrollgruppe (Ha und Follath 2004) (Abbildung 6).

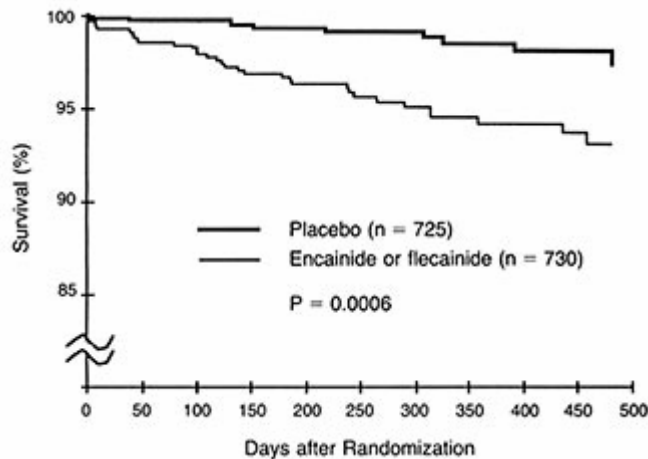


Abbildung 6: Effekt von Flecainid und Encainid auf die Mortalität (nach CAST).

Die CAST-Studie zeigte als Konsequenz, dass Flecainid nur bei Patienten mit normaler Pumpfunktion ohne Anzeichen für eine koronare Herzerkrankung (KHK) gegeben werden darf. Die Mortalität von Patienten nach einem Myokardinfarkt, welche asymptotische oder leichte symptomatische ventrikuläre Arrhythmien hatten, stieg nach Flecainideinnahme an. Hingegen profitieren Patienten ohne strukturelle Herzprobleme und mit ventrikulärer symptomatischer Arrhythmie von einer Behandlung (Aliot et al. 2011).

Flecainid wurde eigentlich entwickelt, um die Wirksamkeit von Lokalanästhetika zu erhöhen. Es wurde 1986 als Antiarrhythmikum für den deutschen Markt zugelassen. 1989 wurden etwa 1 Million Menschen weltweit mit Klasse-1-Antiarrhythmika behandelt, davon 20% mit Klasse-1C-Substanzen (Moore 1995). Nach den Veröffentlichungen der CAST-Studie fielen die Verschreibungen von Klasse-1-Antiarrhythmika um 27% (1990 zu 1985) und die der Klasse 1C sogar um 75% (1990 zu 1989). Trotzdem konnte kein Rückgang der Mortalität an koronaren Herzerkrankungen festgestellt werden, genauso wie retrospektiv (zwischen 1986 und 1989) kein Ansteigen der Mortalität, assoziiert mit steigenden Verschreibungen von Klasse-1C-Antiarrhythmika, erkennbar war. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Ärzte sich schon vor der CAST-Studie des proarrhythmischen Effekts bewusst gewesen waren und dass ein Myokardinfarkt mit leicht symptomatischen oder asymptotischen Arrhythmien schon zuvor nicht als generelle Indikation für eine Flecainid-Therapie gesehen wurde (Winkle et al. 1981, Velebit et al. 1982). Außerdem bestehen große Unterschiede zwischen den Patienten

mit Myokardinfarkten. Es gibt transmurale, die gesamte Dicke der Wandschichten des Herzens betreffende, und nicht transmurale Infarkte. Die nicht transmuralen Infarkte (Non-Q-wave-Infarkte) kommen durch eine stark reduzierte Blutzufuhr zustande. Sie gehen einher mit einem erhöhten Risiko für einen Reinfarkt. Hier war das Mortalitätsrisiko bei der Behandlung mit Flecainid hoch, während es bei transmuralen Infarkten (Q-wave-Infarkten) niedrig war (Akiyama et al. 1991, Anderson et al. 1994). Es kann gesagt werden, dass Non-Q-wave-Infarkte ein Marker für Ischämiegefahr sind, denn das Sterberisiko steigt auf das 4-5-fache gegenüber Q-wave-Infarkten.

Aktuell wird Flecainid weiterhin eingesetzt, da sich die Wirksamkeit und die Sicherheit bezüglich der Prävention des Vorhofflimmerns in einer neueren Studie bei Patienten ohne strukturelle Herzerkrankungen und mit einer normalen linksventrikulären Funktion gezeigt hat (Andersen et al. 2009, Kirchhof et al. 2012, Tamargo et al. 2012). Dies steht jedoch im Kontrast zu anderen Studien, die ein gegenteiliges Ergebnis erbrachten (Akiyama et al. 1991, Almroth et al. 2011). Die Sicherheit in der Anwendung von Flecainid sollte deshalb in weiteren Studien geklärt werden.

3. Zielstellung der Arbeit

Genetische Polymorphismen von Enzymen des Medikamentenabbaus spielen eine wichtige Rolle in der Medizin. Hierdurch können oftmals unerwünschte Nebenwirkungen oder mangelnde Wirkung erklärt werden (Lazarou et al. 1998, Spear 2001). Insbesondere dem CYP-System mit seinen zahlreichen Untergruppen kommt eine große, praxisrelevante Bedeutung zu. Seine Beteiligung an der Entgiftung zahlreicher toxischer und körperfremder Stoffe, am Abbau vieler Medikamente sowie die Bedeutung im Stoffwechsel endogener Substanzen sind in zahlreichen Studien bewiesen worden (Wrighton und Stevens 1992, Honig et al. 1993, Shimada et al. 1994, Honkakoski und Negishi 2000, Guengerich 2001, Izzo 2004, Nelson et al. 2004, Diaconu et al. 2011).

Wie schon oben im Text erläutert, wird Flecainid über CYP2D6 metabolisiert. Dieses Enzym ist genetisch polymorph exprimiert. Über CYP2D6 werden außerdem viele andere Medikamentengruppen, wie Beta-Rezeptorenblocker, Antidepressiva, Neuroleptika und Analgetika, verstoffwechselt.

Der erste Teil der Arbeit, eine klinische Studie an Patienten, sollte der Beantwortung der Frage dienen, inwiefern der CYP2D6-Genotyp und/oder -Phänotyp einen Einfluss auf die Metabolisierung und somit auf den Steady-State-Plasmaspiegel von Flecainid hat. Hierzu wurde zur Bestimmung des CYP2D6-Phänotyps ein Dextromethorphan-Test durchgeführt. Ebenfalls wurde mittels Genotypisierung der Genotyp des Patienten bestimmt. Es galt die Frage zu beantworten, ob und, wenn ja, wie sich unter dem Einfluss der Therapie der Phänotyp ändert. Außerdem sollte geklärt werden, inwiefern es eine Übereinstimmung zwischen Geno- und Phänotyp vor und nach Flecainid-Therapie gibt. Auch wurde nach Zusammenhängen zwischen pharmakokinetischen Parametern von Flecainid, wie Talspiegel (Einzelwerte, Mittelwerte), AUC (Fläche unter der Serumspiegelkurve), mittlerer Konzentration oder Halbwertszeit einerseits und Genotyp oder Phänotyp des CYP2D6 oder anderer bestimmter CYP-Genotypen (z.B. 2C8, 2C9, 2C19) andererseits gesucht.

Zusätzlich wurden renale (Kreatinin-Clearance) und hepatische (Leberenzyme, Bilirubin, ect.) Funktionsparameter bestimmt, um festzustellen, ob eine Korrelation mit dem Plasmaspiegel des Flecainids vorliegt. Auch wurden Elektrokardiogramme ausgewertet, um eventuelle EKG-Veränderungen (QT-Zeit, PQ-Zeit) in Zusammenhang mit dem Flecainidspiegel zu bringen.

In der Literatur gibt es Hinweise für eine mögliche Interaktion von Flecainid auch mit anderen CYP-Isoformen (Kobayashi et al. 1998). Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit eine in-

vitro-Untersuchung der Interaktion von Flecainid mit verschiedenen CYP-Isoformen an Leber-9000g-Überständen sowohl von Ratten als auch vom Menschen durchgeführt. Hierfür wurden folgende Modellreaktionen, die für jeweils bestimmte Isoenzyme des CYP charakteristisch sind, verwendet: die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (CYP1A), die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (CYP1A, CYP2A, CYP2B, CYP2C) und die Ethylmorphin-N-Demethylierung (CYP3A).

Gleichzeitig konnte ein Speziesvergleich zwischen Ratte und Mensch und somit eine Aussage zur Übertragbarkeit der gewonnenen Daten von der Ratte auf den Menschen durchgeführt werden.

4. Material und Methoden

4.1. Patientencharakteristika

An der Studie nahmen freiwillig 19 (9 weibliche und 10 männliche) Patienten (Alter im Durchschnitt: 62,7, Median: 63 Jahre; Durchschnittgröße: 173,7 cm; Durchschnittsgewicht: 82,9 kg; Durchschnitts-BMI: 27,5 kg/m²) mit Herzrhythmusstörungen (Vorhofflimmern) teil. Die häufigsten Comorbiditäten waren (n = Anzahl der Patienten, die diese Erkrankung aufwiesen; ein Patient konnte mehrere Erkrankung haben): Arterielle Hypertonie (n = 14), hypertensive Herzkrankheit (n = 7), Hypercholesterinämie/Hyperlipidämie (n = 6), Herzinsuffizienz (n = 4). Außerdem bestand bei drei Patienten ein Zustand nach Implantation eines Herzschrittmachers. Die Rekrutierung und Untersuchung der Patienten fand in Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin I (Kardiologie), in Vertretung von OÄ Frau Dr. Dannberg, Universitätsklinikum Jena, statt. Die Untersuchung erfolgte im Zeitraum von Oktober 2003 bis Juli 2007. Die zuständige Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena hatte keine Bedenken zur Durchführung der geplanten Untersuchungen geäußert. Die Patienten wurden anonymisiert und mit F und einer Zahl gekennzeichnet. Da die vorliegende Arbeit eine Teilstudie einer größeren Gesamtstudie war, wurden die Patienten fortlaufend nummeriert. Eingeschlossen wurden Patienten (n = Anzahl der Probanden):

1. die neu auf Flecainid eingestellt wurden (n = 18) oder
2. die bereits auf Flecainid eingestellt waren (n = 1)

4.2. Durchführung der Untersuchung

Die Untersuchung begann mit einem Aufklärungsgespräch, worin dem Patienten ein kurzer Überblick über die Studie sowie der geplante Ablauf erklärt wurde. Am Ende dieses Gespräches erhielt der Patient eine Einverständniserklärung, womit er gegenüber dem Arzt seine Teilnahme an der Studie bestätigte. Die Untersuchung erstreckte sich insgesamt über 5 Tage. Die endgültige Dosis von Tambacor[®] (Wirkstoff: Flecainid) betrug 2x täglich 100 mg.

Tag 0: Der Patient wurde angeleitet, über 24 h Urin zu sammeln (Anfang 7:30 Uhr), sowie seine Tabletten erst zu bestimmten Zeitpunkten, die vorgegeben wurden,

einzunehmen. Bei Neueinstellung des Patienten, nahm er an diesem Tag noch kein Flecainid. Der Patient erhielt die Anweisung, nüchtern zu bleiben sowie die Morgenmedikamente am nächsten Tag erst nach dem Dextromethorphanst einzunehmen.

- Tag 1:** Nach 24 Stunden Abschluss des Sammelns von Urin (7:30 Uhr), welcher zusammen mit einer Blutentnahme zur Kreatinin-Clearance-Bestimmung genutzt wurde. Eine weitere Blutentnahme wurde zwecks genetischer Analyse der CYP-Enzyme durchgeführt. Danach (8:00 Uhr) erfolgte der Dextromethorphanst. Vor und 2 Stunden nach der Einnahme von Dextromethorphan, in Form von Hustenstillerratiopharm[®] (1 Kapsel enthält 30 mg Dextromethorphanhydrobromid), wurde Blut entnommen. Nun nahm der Patient seine Frühmedikation sowie sein Frühstück ein; bei Neueinstellung erfolgte der Start der Therapie mit Flecainid, in Form von Tambocor[®] (1 Tablette enthält 100 mg Flecainidacetat).
- Tag 3:** Blutentnahme (20:00 Uhr) und anschließende Einnahme der Medikamente.
- Tag 4:** Dem Patienten wurde eine Venenverweilkanüle gelegt und er begann erneut über 24 Stunden Urin zu sammeln (Anfang: 7:30 Uhr). Danach erfolgte der Start der Flecainid-Kinetik (8:00 Uhr). Hierzu wurde dem Patienten aus der Venenverweilkanüle Blut vor sowie 1, 2, 3, 4, 6, 9 und 12 Stunden nach der Flecainid-Einnahme abgenommen. Die Mittagsmedikation wurde regulär eingenommen, die abendlichen Medikamente um 20:00 Uhr, nach der letzten Blutentnahme. Wiederum sollte der Patient am nächsten Tag nüchtern bleiben und auch seine Medikamente erst nach dem Dextromethorphanst einnehmen.
- Tag 5:** Abschluss des Sammelns von Urin nach 24 Stunden (7:30 Uhr). Blutentnahme 24 Stunden nach Flecainideinnahme vom Vortag, um die Kinetik zu vervollständigen. Danach wurde der Dextromethorphanst wie am 1. Tag durchgeführt. Anschließend (10:00 Uhr) Einnahme der Morgenmedikation sowie des Frühstücks und Beendigung der Untersuchung.

4.3. Genotypisierungen

4.3.1. Isolierung der DNA

Am Morgen des 1. Tages der Untersuchung wurde ein Röhrchen mit 5,5 ml EDTA-Vollblut zur Analyse des CYP2D6-, CYP2C8-, CYP2C9- und CYP2C19-Genotyps entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Isolation der DNA der Leukozyten aus der Blutprobe erfolgte mittels QIAamp® DNA Blood Mini Kits. Die DNA wurde mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragmentanalyse auf bestimmte Allelmutationen hin untersucht.

4.3.2. Polymerasekettenreaktion und Restriktionsfragmentanalyse

Mit der PCR lassen sich winzige Mengen von Erbinformationen (Desoxyribonukleinsäure, DNA) innerhalb weniger Stunden milliardenfach vervielfältigen. Sie besteht aus drei verschiedenen Reaktionsschritten, die bei drei verschiedenen Temperaturen stattfinden (Abbildung 7).

Im ersten Schritt wird die DNA auf 94°C erhitzt und somit in ihre Einzelstränge denaturiert. Nach Abkühlung auf ca. 60°C, abhängig von der jeweiligen Sequenz, binden die Primer, bestehend aus 12 – 20 Nukleotiden, im zweiten Schritt an die entsprechenden Stellen der einsträngigen DNA-Matrize (Hybridisierung = Annealing). Nun wird im dritten Schritt die Temperatur wieder angehoben auf 72°C (Amplifikationstemperatur mit methodischen Anpassungen). Dies ist die ideale Arbeitstemperatur der verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen, z.B. der Taq-Polymerase, die den Primer mit den ebenfalls zugesetzten DNA-Einzelbausteinen verlängern. Als Vorlage für diesen Vorgang dient die einzelsträngige DNA, die so wieder zum Doppelstrang komplettiert wird.

Am Ende des Zyklus liegen 2 neu synthetisierte Doppelstränge vor, die im nächsten Zyklus selbst als Matrize dienen und an ihren Enden die Sequenz der Primer tragen. Ab dem vierten Durchlauf erfolgt eine exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz.

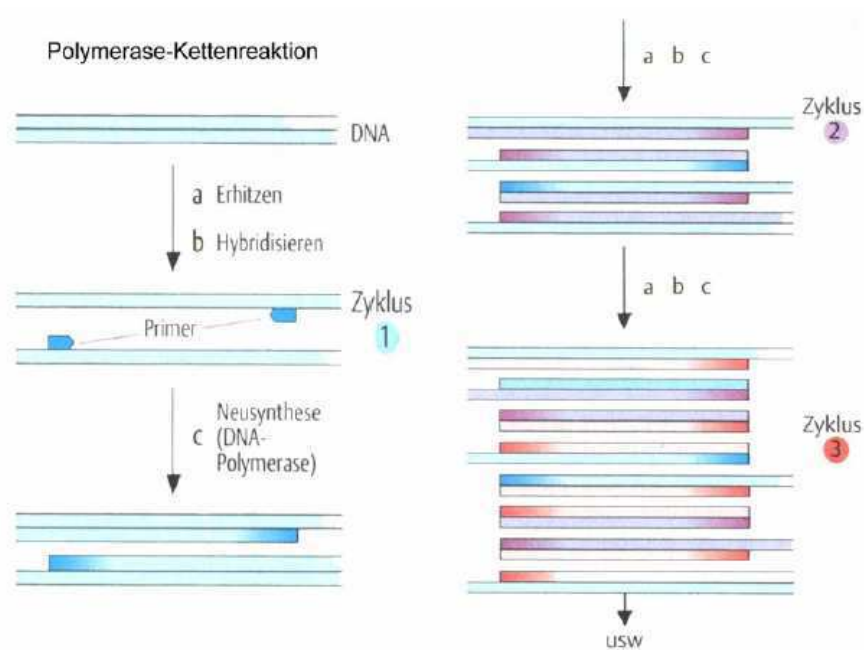


Abbildung 7: Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz durch PCR.

Anschließend wurde die vervielfältigte DNA durch Restriktionsenzyme „verdaut“. Diese erkennen bestimmte Basensequenzen und schneiden sie an genau definierten Stellen.

Wenn dies zur Allelbestimmung nicht möglich war, wurde eine allelspezifische PCR durchgeführt. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Primerpaare, mit der Sequenz des Wildtyp- bzw. des Mutationsallels, verwendet.

Nun wurden die DNA-Fragmente durch eine Gel-Elektrophorese aufgetrennt und die Banden mit dem Farbstoff Ethidiumbromid, der unter UV-Licht fluoresziert, versetzt, um sie sichtbar zu machen.

4.3.3. Cytochrom-P450-2C8-Genotypisierung

Beim CYP2C8 wurde auf das Vorliegen der Mutationen CYP2C8*3 (Lys³⁹⁹Arg, Arg¹³⁹Lys) hin untersucht. Auf die Bestimmung von CYP2C8*2 (Ile²⁶⁹Phe) wurde verzichtet, da diese Mutation nicht bei Kaukasiern gefunden wird (Dai et al. 2001). CYP2C8*1 ist das funktionelle Enzym, der so genannte Wildtyp (wt). Wie oben ersichtlich, besitzt CYP2C8*3 zwei Mutationen, die bei Mitteleuropäern praktisch immer gekoppelt auftreten (Ding und Kaminsky 2003). Deshalb wurde nur die Mutation Lys³⁹⁹Arg, mit dem Restriktionsenzym XmnI (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA), untersucht. Die jeweiligen Primer-Sequenzen sind in Tabelle 2 und die Fragmentmuster in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: Primer-Sequenzen für CYP2C8*3

Primer	Sequenz	Restriktionsenzym
8MF (5')	5'-CTT CCG TGC TAC ATG AT-3'	XmnI
8MR (3')	5'-CTG CTG AGA AAG GCA TGA AG-3'	

Tabelle 3: Fragmentmuster von CYP2C8*3

		Fragmentmuster		
Restriktionsenzym	bp	wt/wt	wt/m	m/m
XmnI	117		—————	—————
	92	—————	—————	
	25	

bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; m: Mutation

Homozygote Wildtyp-Allelträger (wt/wt) wurden gemäß Literatur (Kirchheiner et al. 2002) als schnelle Metabolisierer, heterozygote Wildtyp-Allelträger (wt/m) als heterozygote Schnell-Metabolisierer und homozygote Mutations-Allelträger (m/m) als langsame Metabolisierer kategorisiert.

4.3.4. Cytochrom-P450-2C9-Genotypisierung

Der Nachweis der beiden Allelvarianten CYP2C9*2 (C₄₃₀>T) und CYP2C9*3 (A₁₀₇₅>C), welche hauptsächlich in der mitteleuropäischen Bevölkerung vorkommen (London et al. 1996), erfolgte entsprechend der Beschreibung von Sullivan-Klose et al. (1996). Hierzu wurde zur Bestimmung der Allelvariante CYP2C9*2 (C₄₃₀>T) das Restriktionsenzym AvaII (Hybaid AGS, Ashford, UK) und zur Ermittlung des Mutationsallels CYP2C9*3 (A₁₀₇₅>C) das Restriktionsenzym KpnI (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet. Die jeweiligen Primer-Sequenzen sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Fragmente wurden anschließend mit der Gel-Elektrophorese aufgetrennt und ausgewertet (Tabelle 5).

Tabelle 4: Primer-Sequenzen für CYP2C9*2 und CYP2C9*3

Primer	Sequenz	Restriktionsenzym
2F (5')	5'-TAC AAA TAC AAT GAA AAT ATC ATG-3'	AvaII
2R (3')	5'-CTA ACA ACC AGA CTC ATA ATG-3'	
3,1F (5')	5'-AAT AAT AAT ATG CAC GAG GTC CAG AGG TAC-3'	KpnI
3R (3')	5'-GAT ACT ATG AAT TTG GGA CTT C-3'	

Tabelle 5: Fragmentmuster von CYP2C9*2 und CYP2C9*3

Restriktionsenzym	bp	Fragmentmuster		
		wt/wt	wt/m	m/m
AvaII für CYP2C9*2	691		—————	—————
	527	—————	—————	
	164	
KpnI für CYP2C9*3	141	—————	—————	
	111		—————	—————
	30	

bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; m: Mutation

Den schnellen Metabolisierern (EM) wurden der Literatur entsprechend (Kirchheiner et al. 2002) Probanden mit dem Genotyp wt/wt, sowie den CYP2C9*2-Genotypen wt/m und m/m zugeordnet. Wenn ein Proband den Genotyp CYP2C9*3 wt/m oder ein Allel CYP2C9*2 und ein Allel CYP2C9*3 aufwies (m*2/m*3), wurde er als heterozygoter Schnell-Metabolisierer (hetEM) betrachtet. Probanden mit dem Genotyp CYP2C9*3 m/m wurden als langsame Metabolisierer (PM) eingestuft (Kirchheiner et al. 2002).

4.3.5. Cytochrom-P450-2C19-Genotypisierung

Die Genotypisierung von CYP2C19 beschränkte sich auf den Nachweis der Mutation CYP2C19*2 (G₆₈₁>A), wodurch ca. 83% der europäischen Langsam-Metabolisierer identifiziert werden können (de Morais et al. 1994). Fand man diese Mutation nicht, wurde der Wildtyp angenommen. In der PCR entstanden Basenpaar-Fragmente, die mit dem Restriktionsenzym SmaI (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) verdaut und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Tabelle 6: Primersequenzen für CYP2C19

Primer	Sequenz	Restriktionsenzym
M1F (5')	5'-AAT TAC AAC CAG AGC TTG GC-3'	SmaI
M2R (3')	5'-TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA G-3'	

Tabelle 7: Fragmentmuster von CYP2C19

		Fragmentmuster		
Restriktionsenzym	bp	wt/wt	wt/m	m/m
SmaI	169		—————	—————
	120	—————	—————	
	49	—————	—————	

bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; m: Mutation

Als langsame Metabolisierer (PM) wurden homozygot mutante Allelträger (m/m), als schnelle Metabolisierer (EM) heterozygote (wt/m) oder homozygote Wildtyp-Allelträger (wt/wt) klassifiziert (Kirchheiner et al. 2002).

4.3.6. Cytochrom-P450-2D6-Genotypisierung

Das kodierende Gen für CYP2D6 liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 22, besteht aus 9 Exons sowie 8 Introns, und hat zusammen mit seinen 2 Pseudogenen CYP2D7P und CYP2D8P eine Größe von 4681 Basenpaaren (Gonzalez et al. 1988, Kimura et al. 1989, Heim und Meyer 1992). Bis jetzt sind fast 100 verschiedene Allele dieses Enzyms beschrieben worden (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>. Karolinska Institutet National Institute of Environmental Medicine 1999: Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee), die, wie in der Genetik üblich, über eine mit einem Stern versehene Nummer am Ende des Isoenzymnamens gekennzeichnet sind (z.B. CYP2D6*1; Daly et al. 1996). Dabei werden CYP2D6*1 sowie CYP2D6*2 als Wildtyp bezeichnet. In der kaukasischen Bevölkerung erklären die inaktiven Allele CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5 und CYP2D6*6 über 93% der PM-Phänotypen, weshalb sich die molekulare Diagnostik der PM meist auf diese vier Allele beschränkt (Hersberger et al. 2000). Andere Allelvarianten, wie z.B. CYP2D6*9, CYP2D6*10, CYP2D6*17 und CYP2D6*41, tragen zur Ausbildung eines

intermediären Metabolisierungstyps bei (Sachse et al. 1997, Raimundo et al. 2000, Lim et al. 2008). Komplizierter wird es für die genetische Abklärung der phänotypischen „Ultrarapid Metabolizer“ (UM). Eine Duplikation oder Multiplikation des Genes erklärt nur in 15-30% der Fälle den Phänotyp UM (Løvlie et al. 1996, Sachse et al. 1997). Es wurde in unserer Untersuchung auf das Vorliegen der Allele CYP2D6*3, *4, *5 und *6 hin untersucht. Wenn diese nicht nachgewiesen werden konnten, wurde der Wildtyp (CYP2D6*1) angenommen. Es erfolgte eine Klassifikation in schnelle (homozygoter und heterozygoter Wildtyp) und langsame (zwei mutierte Allele) Metabolisierer (Hersberger et al. 2000).

Als „Poor Metabolizer“ wurden Personen mit folgenden CYP2D6-Alleleigenschaften eingestuft:

1. homozygot für *3, *4, *5, *6;
2. heterozygot in Bezug auf zwei Defekt-Allele.

Für „Extensive Metabolizer“ wurden folgende Allelkonstitutionen festgelegt:

*3, *4, *5, *6 sind nicht nachweisbar.

Die Einstufung als „heterozygoter Extensive Metabolizer“ erfolgte, wenn:

nur eine Heterozygotie in Bezug auf eines der Defekt-Allele *3 oder *4 oder *5 oder *6 vorlag.

4.3.6.1. Cytochrom P450 2D6*3

Nach Smith et al. (1992) erfolgte eine PCR mit anschließender Restriktionsfragmentanalyse des Allels CYP2D6*3 (2549delA). Es wurden die Primer E und F (Tabelle 8) verwendet und im Anschluss ein Verdau mit dem Enzym HpaII (Hybaid AGS, Ashford, UK) durchgeführt. Die Fragmentmuster nach der Gel-Elektrophorese sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 8: Primersequenzen für CYP2D6*3

Primer	Sequenz	Restriktionsenzym
E	5'-GAT GAG CTG CTA ACT GAG CCC-3'	HpaII
F	5'-CCG AGA GCA TAC TCG GGA C-3'	

Tabelle 9: Fragmentmuster von CYP2D6*3

		Fragmentmuster		
Restriktionsenzym	bp	wt/wt	wt/m	m/m
HpaII	188	————	————	
	168		————	————
	82	————	————	————

bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; m: Mutation

4.3.6.2. Cytochrom P450 2D6*4

Das CYP2D6*4-Allel ist durch den Nukleotidaustausch (G₁₈₄₆>A) gekennzeichnet. Es wurden, ebenfalls nach der Beschreibung von Smith et al. (1992), die Primer C und D verwendet und anschließend mit dem Enzym BstNI (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) verdaut.

Tabelle 10: Primersequenzen für CYP2D6*4

Primer	Sequenz	Restriktionsenzym
C	5'-GCC TTC GCC AAC CAC TCC G-3'	BstNI
D	5'-AAA TCC TGC TCT TCC GAG GC-3'	

Tabelle 11: Fragmentmuster von CYP2D6*4

		Fragmentmuster		
Restriktionsenzym	bp	wt/wt	wt/m	m/m
BstNI	334		————	————
	230	————	————	
	105	————	————	

bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; m: Mutation

4.3.6.3. Cytochrom P450 2D6*5

Dieses Allel ist gekennzeichnet durch eine vollständige Deletion des CYP2D6-Allels. Nach der Methode von Hersberger und Mitarbeitern (2000) wurde das Allel mit einer Long-PCR bearbeitet. Hierzu wurden die in Tabelle 12 aufgelisteten Primer verwendet.

Tabelle 12: Primersequenzen für CYP2D6*5

Primer	Sequenz
D up	5'-CAC ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA-3'
D low:	5'-CAG GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C-3'
DPK up:	5'-GTT ATC CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A-3'
DPK low:	5'-GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA-3'

Tabelle 13: Fragmentmuster von CYP2D6*5

Kbp	Fragmentmuster		
	wt/wt	wt/m	m/m
5,1	—————	—————	
3,2		—————	—————

bp: Basenpaare; wt: Wildtyp; m: Mutation

4.3.6.4. Cytochrom P450 2D6*6

Nach der Beschreibung von Daly und Mitarbeitern (1996) wurde die Allelvariante CYP2D6*6, gekennzeichnet durch eine Deletion von T₁₇₀₇, durch eine allelspezifische PCR aufgearbeitet. Für die Vervielfältigung des Wildtyp-Allels wurden die Primer 2G und 9G, für die Mutation 2G und 10G verwendet. Der entsprechende Nachweis erfolgte direkt ohne weitere Restriktionsfragmentanalyse.

Tabelle 14: Primersequenzen für CYP2D6*6

Primer	Sequenz	
9G	5'-CAA GAA GTC GCT GGA GCT GT-3'	Wildtyp (T1707)
2G	5'-CTC GGT CTC TCG CTC CGC AC-3'	
10G	5'-CAA GAA GTC GCT GGA GCT GG-3'	Mutation (T1707 >del)

4.4. Phänotypisierung des Cytochrom P450 2D6 mittels Dextromethorphan

Neben einer Genotypisierung wurde an den Probanden auch eine Phänotypisierung von CYP2D6 durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie erfolgte die Testung auf Unterschiede im CYP2D6-Phänotyp mittels Dextromethorphan. Der Dextromethorphan-Test wurde einmal am ersten Tag, vor dem Start der Behandlung mit Flecainid, sowie am fünften Tag, im Steady-State der Therapie mit Flecainid, durchgeführt. Dieses Schema wurde auch bei Patienten, die mit Flecainid bereits vorbehandelt waren, eingehalten. Es wurden die verschiedenen Metabolitenkonzentrationen und -quotienten (MQ) des Dextromethorphanabbaus bestimmt und sowohl intraindividuell als auch interindividuell verglichen.

Jeder Proband erhielt 30 mg Dextromethorphanhydrobromid (entspricht 1 Kapsel Hustenstilller ratiopharm[®], Ratiopharm, Ulm, Deutschland), die er mit 200 ml Wasser im nüchternen Zustand einnehmen sollte. Unmittelbar vor und 2 Stunden nach der Einnahme wurde Blut zur Konzentrationsbestimmung von Dextromethorphan und seiner Metabolite DTX, 3-HM und 3-MM entnommen (Monovetten[®], Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Der Proband durfte in diesen 2 Stunden weder Wasser noch Nahrung zu sich nehmen. Das entnommene Blut wurde bei 1600g für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend das gewonnene Serum bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Eine Abnahme der Substratkonzentration und/oder eine Zunahme der Produktkonzentration führt zu niedrigeren Werten des MQ und ist somit Ausdruck einer gesteigerten Enzymaktivität. Umgekehrt ist eine höhere Substratkonzentration und/oder geringere Produktkonzentration mit hohen MQ-Werten ein Zeichen für eine verminderte Enzymaktivität.

Die Metabolitenkonzentration wurde anhand der 2-Stunden-Serumwerte nach Einnahme des Dextromethorphan bestimmt. Das Serum vor der Einnahme des Dextromethorphan diente als Leerwert.

4.5. Bestimmung der Pharmakokinetik von Flecainid

Um einen ausreichenden Plasmaspiegel von Flecainid (Standard-Zieldosis 2 x 100 mg täglich) zu gewährleisten, wurde Blut zur Bestimmung der Pharmakokinetik am 4. und 5. Tag der Behandlungsphase entnommen (Fachinformation Tambocor[®], 3M Medica, Neuss,

Deutschland). Dies geschah am 4. Tag unmittelbar vor (= Prä-Dosis-Spiegel) und 1, 2, 3, 4, 6, 9 und 12 Stunden nach der Einnahme von 100 mg Flecainidacetat (Tambacor[®], 3M Medica, Neuss, Deutschland). Am 5. Tag wurde erneut Blut vor Einnahme der Medikamente (= Prä-Dosis-Spiegel) entnommen.

Die Blutproben (9 ml Serum-Monovetten[®], Sarstedt Nümbrecht, Deutschland) wurden anschließend bei 1600g über 10 Minuten zentrifugiert, das erhaltene Serum abpipettiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

Folgende pharmakokinetische Parameter wurden berechnet:

Prä-Dosis-Spiegel (C_{min}): entspricht der minimalen Serumkonzentration von Flecainid unter Sättigungsbedingungen (Steady-State); beide C_{min} (am 4./5. Tag) wurden gemittelt.
Bioverfügbarkeit (AUC): entspricht der Bioverfügbarkeit von Flecainid pro Zeiteinheit. Berechnet wurde die Fläche unter den Messzeiten 1, 2, 3, 4, 6, 9 und 12 Stunden nach Medikamenteneinnahme.

4.6. Nachweismethoden

4.6.1. Nachweis von Dextromethorphan und seiner Metabolite

Die Metabolite Dextrophan (DTX), 3-Hydroxymorphinan (3-HM) und 3-Methoxymorphinan (3-MM), sowie Dextromethorphan (DEX) selbst, wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie, modifiziert nach einer Methode von Wieling et al. (2000), bestimmt.

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) hat einen weiten Anwendungsbereich und ist für Trennungen von Stoffgemischen gut geeignet. Hiermit können polare (nichtionische organische Verbindungen), unpolare (gesättigte und ungesättigte Kohlenwasserstoffe), ionische (Salze, Säuren, Basen) Substanzgruppen sowie Isomere und Biopolymere getrennt werden.

Die Proben wurden aufgetaut und zur enzymatischen Spaltung mit β -Glucuronidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (750 U/250 μ l 0,1 M Na-Acetat-Puffer pH 5,0) 16 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend fügte man den 2-Stundenwerten, nach Zugabe des internen Standards (3M Medica, Neuss, Deutschland), 50 μ l Levallorphan (Hoffmann-la-Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) (400 ng/ml), eine Spatelspitze NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland) (bei pH 8,5-9) und 6 ml n-Hexan/Ethylacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (im Verhältnis 1:1) hinzu. Danach wurden die Proben 15 Minuten

geschüttelt (bei 1800/min) und 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (4500g) (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Nach Verwerfen der wässrigen Phase fügte man einen Zusatz von 150 µl Essigsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (3%) zur übrig gebliebenen organischen Phase hinzu. Nach weiteren 15 Minuten Schütteln und 10 Minuten Zentrifugieren wurden die Proben für 15 Minuten im Dunkeln stehen gelassen. Die organische Phase wurde verworfen und die Proben (75 µl/Vial) auf die Säule der HPLC aufgetragen.

Die Auftrennung einer Probe in Einzelsubstanzen erfolgte in der Chromatographiesäule, die in einem Edelmantel einen dichten Verband poröser Teilchen mit großer Gesamtoberfläche enthält und von einer mobilen Phase (Eluent) durchströmt wird. Bei der Flüssigkeits-Flüssigkeits-Chromatographie ist die stationäre Phase eine Flüssigkeit, die als dünne Schicht auf den porösen Teilchen des Säulenbetts auf Grund von schwachen Adhäsionskräften haftet. Die eigentliche Auftrennung in die stofflichen Einzelbestandteile erfolgt nach dem Aufbringen des Substanzgemisches auf der Basis der unterschiedlichen Verweilzeiten, die sich beim Herunterwaschen von der Säule für die Einzelsubstanzen ergeben. Die unterschiedlichen Verweilzeiten in der stationären Phase kommen durch die verschiedenen Verteilungsgleichgewichte der Einzelsubstanzen zustande.

Die Aufarbeitung zur Erstellung der Standardkurve erfolgte mit Leerserum analog zur oben für die Serumproben beschriebenen Methode für die folgenden Substanzen:

- Dextromethorphan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Dextrophan D-Tartat (ICN Biomedicals Inc., Seven Hills, NSW, Australien)
- (+)-3-Methoxymorphinan-Hydrobromid (Hoffmann-la-Roche Ltd., Basel, Schweiz)
- (+)-3-Hydroxymorphinan-Hydrobromid (Hoffmann-la-Roche Ltd., Basel, Schweiz)

Unter folgenden Bedingungen wurden die Konzentrationsbestimmungen durchgeführt:

Säule:	Bischoff-Waters-Spherisorb Nitrile, 250 x 4,0; 5 µm
mobile Phase:	15 Teile Acetonitril / 84,94 Teile H ₂ O / 0,06 Teile Triethylamin mit 85% Phosphorsäure auf pH 2,5 eingestellt
Flussrate:	1 ml/min
Stoppzeit:	12 min
Druck:	ca. 160 bar
Fluoreszenzdetektor:	RF-10 A _{xl} 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 (3MM)
	9,4 min: Dextromethorphan (DEX)

Bei den Retentionszeiten von DEX, DTX, 3-HM und 3-MM zeigten sich im Leerserum (0-Stundenwert) keine interferierenden Serumpeaks.

4.6.2. Nachweis von Flecainid

Die Bestimmung von Flecainid im Serum wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie, adaptiert an die Methode von Chang et al. (1984), durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Aufreinigung der Proben durch Festphasen-Extraktion. Um die Festphasen-Extraktions-Säule (SPE-Säule) zu aktivieren, wurden 2 x 1 ml Methanol (Baker, Deventer, Niederlande) sowie 2 x 1 ml aqua dest. hinzugegeben. Nach dem Auftauen der Proben wurden diese für 5 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert (4500g) (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland). Anschließend wurden 100 µl interner Standard, N-(2-Piperidylmethyl)-2,3-bis(2,2,2-trifluoroethoxy)benzamid-hydrochlorid (3M Medica, Neuss, Deutschland) und 100 µl 1 M Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland) (bei pH 10-11) zugegeben. Auf gleiche Weise wurden Standardlösungen mit Flecainidacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in verschiedenen Konzentrationen (5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 ng/ml Plasma) erstellt. Nach dem Waschen der Säule mit 2 x 1 ml aqua dest. und 1 x 1 ml 30% Methanol (Baker, Deventer, Niederlande), wurden diese für 5 Minuten in ein Vakuum gebracht. Nach Elution mit 2 x 0,5 ml Methanol erfolgte ein erneutes Einbringen in ein Vakuum für 5 Minuten. Das Lösungsmittel Methanol wurde bei 45°C eingedampft und die Probe in 100 µl der mobilen Phase aufgenommen, um die Konzentration von Flecainidacetat im HPLC-Gerät zu messen.

Folgende Chemikalien und Substanzen wurden verwendet:

- Acetonitril - HPLC-grade (Baker, Deventer, Niederlande)
- Methanol - HPLC-grade (Baker, Deventer, Niederlande)
- Triethylamin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

- Ortho-Phosphorsäure (85%ig) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Blutplasma (Patienten des Universitätsklinikums Jena)
- Essigsäure (99,5%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Wasser (aqua bidest.)
- Interner Standard (3M Medica, Neuss, Deutschland)
- Flecainidacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Unter folgenden Bedingungen wurden die Konzentrationsbestimmungen durchgeführt:

Pumpen:	Shimadzu Serie LC-10AT
Autoinjektor:	Shimadzu Serie SIL-10A XL
Detektor:	Shimadzu Serie RF-10AXL bei 300/370 nm
Ofen:	Shimadzu Serie CTO-10AC mit 25°C
Software:	Shimadzu CLAAS-LC10 Vers. 1.64
Säule:	SPHERISORB 80-5 ODS-2, 250 x 4.6 mm
Mobile Phase:	Pumpe B: 47 Teile H ₃ PO ₄ 0,06% (706 µl 85%ige H ₃ PO ₄ in 1 l aqua dest.) + 600 µl Triethylamin Pumpe A: 53 Teile Acetonitril
Flussrate	2 ml/min
Stoppzeit:	15 min
Druck:	ca. 190 bar
Injektionsvolumen:	50 µl
Retentionszeiten:	9.6 min Flecainid 8.6 min Interner Standard (IS) N-(2-Piperidylmethyl)-2,3-bis (2,2,2-trifluoroethoxy)benzamid-hydrochlorid (NPtbH)

Die Nachweisgrenze von Flecainid in den Proben betrug 0,8 ng/100µl. Die Bestimmungsgrenze lag bei 5 ng/ml Serum. Der mittlere Intra-Assay-Variationskoeffizient (s%) über alle Konzentrationen betrug 2,10%. Über alle Konzentrationen von Flecainid wurde ein mittlerer Inter-Assay-Variationskoeffizient (s%) von 4,58% ermittelt. Die mittlere Wiederfindungsrate von Flecainid lag bei 80,8% und die des Internen Standards bei 80,3%. Eine Linearität war in dem untersuchten Konzentrationsbereich von 5-2000 ng/ml gegeben.

Es zeigte sich keine Interferenz zwischen den Peaks von Flecainid und dem des internen Standards im Leerplasma. Auch die Anwesenheit von Dextromethorphan, Dextrorphan, 3-Hydroxymorphinan und 3-Methoxymorphinan, sowie von Metoprolol oder Bisoprolol hatte keinen Einfluss auf die Detektion von Flecainid im Plasma.

4.7. Statistische Aufarbeitung der Geno- und Phänotypisierungsdaten

In den im Ergebnisteil aufgeführten Tabellen sind die Messwerte als arithmetische Mittelwerte (\bar{X}) mit Standardfehler (SF) angegeben. Es wurde der t-Test (gepaart und ungepaart) verwendet. Bei allen durchgeführten statistischen Tests bestätigte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ eine Signifikanz.

Für alle Probanden, sowie getrennt für die verschiedenen Genotypen EM und hetEM, wurde überprüft, ob eine lineare Korrelation nach Pearson (r_p) und/oder eine nicht lineare Korrelation nach Spearman (r_{sp}) zwischen den Metaboliten/Metabolitenquotienten des DEX-Abbaus und verschiedenen Labor-Parametern bzw. dem BMI vor und nach Flecainideinnahme besteht.

Die Kreatinin-Clearance wurde im 24-Stunden-Sammelurin nach folgender Formel bestimmt: $(\text{Kreatinin im Urin} \times \text{Volumen des Urins}) / (\text{Kreatinin im Serum} \times \text{Zeit})$.

Der BMI wurde mit folgender Formel berechnet: $\text{Körpergewicht in [kg]} / \text{Körpergröße}^2$ in [m].

Der Mann-Whitney-Test ist ein nichtparametrischer statistischer Test. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also ob zwei unabhängige Verteilungen zu derselben Grundgesamtheit gehören. Man hat zwei Stichproben vor sich, Stichprobe A (Genotyp hetEM) mit n_1 Werten und Stichprobe B (Genotyp EM) mit n_2 Werten. Man vergleicht jeden Wert der Stichprobe A mit jedem Wert der Stichprobe B. Es gibt also $n_1 \times n_2$ Vergleiche. Der Test funktioniert einseitig oder zweiseitig. Beim einseitigen Test wird geprüft ob $A < B$ oder $A > B$, beim zweiseitigen Test ob $A = B$ ist.

In dieser Arbeit wurden mit dem Mann-Whitney-Test zusätzlich zum t-Test für unabhängige Stichproben die Unterschiede zwischen den Genotypen hetEM und EM bezüglich der Abbauprodukte sowie den Metabolitenquotienten von Dextromethorphan untersucht.

Der Wilcoxon-Test ist ein statistischer Test für die Häufigkeitsverteilung gepaarter Stichproben. Der Test ermöglicht die Untersuchung zweier abhängiger Variablen. Im Anwendungsbereich ergänzt er den Vorzeichentest, da er nicht nur die Richtung der

Differenzen, sondern auch die Stärke der Differenzen zwischen zwei gepaarten Stichproben berücksichtigt. Der hier vorgestellte Test ist unabhängig vom Verteilungstyp und wird daher als nichtparametrisch bezeichnet.

Es wurden die Einflüsse von Flecainid auf die EKG-Zeiten sowie (zusätzlich zum gepaarten t-Test) auf die Abbauprodukte und Metabolitenquotienten von Dextromethorphan, sowohl in der alle Probanden umfassenden Gesamtgruppe als auch getrennt nach den Genotypen hetEM und EM, untersucht.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm SPSS, Ausgabe 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

4.8. In-vitro-Versuche

4.8.1. Materialgewinnung für die in-vitro-Versuche

Die menschlichen Lebergewebeproben stammten aus dem makroskopisch tumorfreien Randgebiet von chirurgischen Resektaten aus der Metastasen Chirurgie, allesamt Proben von Lebern mit Metastasen eines kolorektalen Karzinoms. Die Proben wurden von der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung gestellt. Ein positives Votum der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena sowie das Einverständnis seitens der Patienten lag vor.

Die Rattenleberproben wurden aus männlichen HAN:WIST Ratten, die im Durchschnitt 60 Tage alt waren, gewonnen. Die Tiere wurden im Tierhaus des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena unter standardisierten Bedingungen (ca. 50% Luftfeuchte, durchschnittliche Raumtemperatur: 22°C, 12h/12h Hell/Dunkelrhythmus) gehalten und erhielten Wasser und Standardfutter (Altromin 1316) ad libitum.

Den in Ether-Narkose getöteten Tieren wurde die Leber herauspräpariert und diese anschließend gewogen.

4.8.2. Herstellung der 9000g-Überstände und Bestimmung ihrer Proteingehalte

Ein Teil Lebergewebe wurde mit zwei Teilen 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer (Na-P-Puffer), pH 7,4, homogenisiert und anschließend bei 4°C und 9000g 20 Minuten in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5403, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert (Matsubara et al. 1976).

Um den Proteingehalt der 9000g-Überstände zu ermitteln, wurde eine modifizierte Biuret-Reaktion nach Klinger und Müller (1974) verwendet. Diese Methode beruht darauf, dass Proteine mit Kupfersulfat in einem alkalischen Milieu einen blauvioletten Komplex bilden, dessen Intensität sich im Spektralphotometer messen lässt. Man erhält so ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Für die Hauptwerte wurde 0,25 ml 1:4 verdünnter 9000g-Überstand mit 0,25 ml 5%iger Natrium-Desoxycholatlösung 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 4,5 ml Biuret-Reagenz (1,5 g CuSO₄, 6 g KNaC₄H₄O₆, 300 ml 10%ige NaOH-Lösung, aqua bidest. ad 1000 ml) versetzt. Bei den zugehörigen Trübungswerten wurde anstatt Biuret-Reagenz 3%ige NaOH zugesetzt. Zu diesen Haupt- und Trübungswerten wurden nun Leerwerte angefertigt, die anstelle des Überstandes 0,25 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, enthielten, sonst aber gleich behandelt wurden. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Haupt- und Trübungswerte am Spektralphotometer (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei 1 cm Schichtdicke und einer Wellenlänge von 546 nm gegen die Leerwerte ermittelt.

Anstelle der 9000g-Überstände wurde als Referenzgröße eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin angefertigt, die aus 10 verschiedenen Proteinkonzentrationen (0,5–5 mg/0,25 ml) sowie einem Leerwert, bestand. Die Extinktionen wurden, wie vorher, gegen den Leerwert gemessen. Für alle 10 Lösungen wurde ein Faktor errechnet (Konzentration des Proteins in der Lösung / Extinktion), dessen Mittelwert den Faktor der Eichkurve ergab.

Der Proteingehalt wurde wie folgt errechnet:

$$\text{Protein [mg/ml]} = (\text{Ext.}_{\text{Biuret}} - \text{Ext.}_{\text{NaOH}}) * F_{\text{Ek}} * 16$$

Ext._{Biuret} = Extinktion der Hauptwerte

Ext._{NaOH} = Extinktion der Trübungswerte

F_{Ek} = Faktor der Eichkurve

16 = Verdünnungsfaktor

4.8.3. Monooxygenase-Modellreaktionen

An jeweils 6 verschiedenen 9000g-Überständen von Ratten- sowie menschlichen Lebern wurden die Modellreaktionen Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD), Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) sowie Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND) durchgeführt.

Es wurden verschiedene Konzentrationen der Modellsubstanzen bei den Versuchen eingesetzt, um eine Michaelis-Menten- und eine Lineweaver-Burk-Darstellung zu ermöglichen und so den Hemmtyp (kompetitiv, nicht kompetitiv oder Mischtyp) von Flecainid zu ermitteln. Flecainid wurde bei allen Versuchen in 4 verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 100, 1000 μM) zugesetzt. Außerdem wurden Kontroll- sowie Leerwerte mitgeführt.

4.8.3.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Die Bestimmung der 7-Ethoxyresorufin-O-Dealkylaseaktivität (EROD) wurde in Anlehnung an Pohl und Fouts (1980) durchgeführt und dient der Bestimmung der CYP1A1-Aktivität (Wei et al. 1995). Bei dieser Reaktion entsteht durch Dealkylierung des Ethoxyresorufins unter Anwesenheit von O_2 , NADPH, Glukose-6-Phosphat (G-6-P) und MgCl_2 Resorufin, das auf Grund seiner ausgezeichneten Fluoreszenz in sehr kleinen Konzentrationen nachweisbar ist. Die quantitative Bestimmung erfolgt mit dem Fluorimeter bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm.



Es wurden je sechs Versuche mit Rattenleber und mit Menschenleber durchgeführt. Das Ethoxyresorufin (ER) wurde in verschiedenen Konzentrationen (0, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 μM) in Methanol gelöst. Nachdem alle Reagenzgläser mit 0,1 ml der verschiedenen ER-Konzentrationen versetzt worden waren, wurde das Lösungsmittel Methanol im 90°C heißen Wasserbad verdampft.

Mit Hilfe von destilliertem H_2O wurde eine Verdünnungsreihe (1, 10, 100, 1000 μM) von Flecainid hergestellt. Anstatt 0,1 ml Flecainid verschiedener Konzentrationen wurde in die Leer- und Kontrollwerte 0,1 ml aqua dest. pipettiert. Um eine Reaktion der Leerwerte zu verhindern, erfolgte die Zugabe von 1 ml Methanol.

Tabelle 15: Pipettierschema EROD, ECOD, EMND (Konzentrationen am Beispiel der EROD): Erstellung von insgesamt 42 Proben pro Einzel-Versuch

Substratkonz. ER [μ M]	Substanz (Flecainid) [mM]				Kontrolle	Leerwert
	Hauptwerte					
	1	0,1	0,01	0,001		
100	1	2	3	4	5	6
50	7	8	9	10	11	12
25	13	14	15	16	17	18
12,5	19	20	21	22	23	24
6,25	25	26	27	28	29	30
3,125	31	32	33	34	36	36
0	37	38	39	40	41	42

In den Inkubationsansatz kamen weiterhin folgende Substanzen:

0,1 ml 0,1 M MgCl₂, gelöst in aqua dest.,

0,1 ml 25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4.

Der 9000g-Überstand wurde 1:10 mit 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, verdünnt und davon anschließend 0,1 ml dem Ansatz zugegeben. Die Reaktion wurde mit NADPH (0,1 ml, 2,5 mM, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4) gestartet. Nach Inkubation über 5 Minuten in einem Schüttel-Wasserbad bei 37°C wurde die Reaktion mit 1 ml Methanol gestoppt. Alle Proben wurden bei 5500 U/min zentrifugiert (= 5000g) (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland) und danach mit einem Fluorimeter (F2000, Hitachi, Kyoto, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 540 nm und einer Emissionswellenlänge von 585 nm gemessen. Es gab zu jeder Versuchsreihe eine Eichkurve mit verschiedenen Konzentrationen (0, 0,5, 1, 2, 4 μ M) an Resorufin. Nach Verdampfen des Lösungsmittels Methanol wurden 0,5 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, und 1 ml Methanol zugesetzt. Weitere Substanzen oder 9000g-Überstände wurden hier nicht verwendet.

Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$A_{\text{Resorufin}} = \frac{\Delta I \times F_{\text{EK}} \times 1000}{5 \times \text{Prot.}}$$

$A_{\text{Resorufin}}$	= Enzymaktivität [pmol/(mg Protein*min)]
ΔI	= Differenz der Intensitäten zw. Haupt- und Leerwert
F_{EK}	= Faktor der Eichkurve (Konzentration / Intensität)
Prot.	= Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]
5	= Inkubationszeit [min]
1000	= Verdünnungsfaktor

4.8.3.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) wurde nach der Methode von Aitio (1978) durchgeführt. Die Reaktion basiert auf einer CYP-abhängigen C-Hydroxylierung der Ethylgruppe von 7-Ethoxycoumarin. Anschließend erfolgt eine nichtenzymatische Abspaltung von Acetaldehyd und die Entstehung von 7-Hydroxycoumarin (7-OHC), welches im alkalischen Medium fluorimetrisch (Exzitationswellenlänge bei 375 nm, Emissionswellenlänge bei 454 nm) bestimmt werden kann. Diese Modellreaktion dient zur Aktivitätsbestimmung von CYP1A, 2A, 2B und 2C (Burke et al. 1985, Busse et al. 1995, Yamazaki et al. 1996).



Es wurden wiederum je 6 Versuche mit Menschen- sowie Rattenleber durchgeführt. Eine Verdünnungsreihe von Flecainid (1, 10, 100, 1000 μM) wurde, wie bei der EROD-Versuchsanordnung, mit Hilfe von aqua dest. angesetzt. Die Verdünnungsreihe von 7-Ethoxycoumarin (0, 0,0125, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 mM) wurde mit dem Lösungsmittel Methanol hergestellt, welches anschließend, nach Zugabe von 0,1 ml der verschiedenen Verdünnungen in die entsprechenden Reagenzröhrchen, in einem Wasserbad bei 90°C verdampfte wurde. Anschließend wurde, laut Pipettierschema, 0,1 ml Flecainid verschiedener Konzentrationen zugesetzt. Die Kontroll- und Leerwerte erhielten anstatt Flecainid 0,1 ml aqua dest. Der 9000g-Überstand wurde 1:10 mit 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, verdünnt.

In den Inkubationsansatz kamen zusätzlich:

0,1 ml 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,1 ml 0,1 M MgCl₂, gelöst in aqua dest.,

0,1 ml 25 mM G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,1 ml 1:10 verdünnter 9000g-Überstand.

Es erfolgte eine Zugabe von 0,5 ml 0,31 M Trichloressigsäure (TCA) in die Leerwerte, um eine Reaktion zu verhindern. Die Reaktion wurde mit NADPH (0,1 ml, 2,5 mM, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4) gestartet. Nun wurden die Proben, bis auf die Leerwerte, in einem 37°C warmen Schüttel-Wasserbad für 10 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 ml 2,5 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, gestartet. Nach 10 Minuten wurde die Reaktion mit 0,5 ml TCA gestoppt. Um die Lösungen zu alkalisieren, wurde allen Proben 4 ml 0,05 M NaOH zugesetzt.

Für die Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen an 7-OHC angesetzt (0, 0,25, 0,5, 1, 2 mM) und mit 0,5 ml TCA die Reaktion verhindert. Anschließend kamen (mit Ausnahme von 7-Ethoxycoumarin) exakt die gleichen Substanzen mit identischen Volumina wie im Inkubationsansatz hinzu. Die Eichwerte wurden, wie die Leerwerte, nicht inkubiert, aber mit 0,1 ml 2,5 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, sowie mit 4 ml 0,05 M NaOH versetzt.

Die Messung der Proben erfolgte an einem Fluorimeter (F2000, Hitachi, Kyoto, Japan) bei einer Exzitationswellenlänge von 375 nm und einer Emissionswellenlänge von 454 nm.

Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$A_{7\text{-OHC}} = \frac{\Delta I \times F_{\text{Ek}} \times 1000}{10 \times 162 \times \text{Prot.}}$$

$A_{7\text{-OHC}}$ = Enzymaktivität in [pmol/(mg Protein*min)]

ΔI = Differenz der Intensitäten zw. Haupt- und Leerwert

F_{Ek} = Faktor der Eichkurve (Konzentration / Intensität)

Prot. = Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]

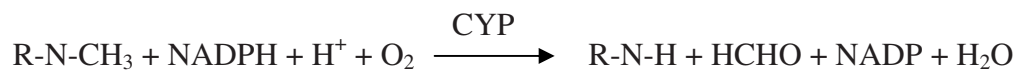
162 = Molekulargewicht von 7-Hydroxycoumarin [g/mol]

10 = Inkubationszeit [min]

4.8.3.3. Ethylmorphin-N-Demethylierung

Die Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND) ist eine Modellreaktion für den Aktivitätsnachweis vorwiegend der CYP3A-Familie. Es zeigte sich, dass beim Menschen vor allem CYP3A4 an der N-Demethylierung von Ethylmorphin beteiligt ist (Gonzalez 1988, Ladona et al. 1989, Liu et al. 1995). Es besteht eine strukturelle Verwandtschaft zwischen dem humanen CYP3A und dem CYP3A1 und 3A2 der Ratte (Oesch 1997). Bei Versuchen an Ratten wurde nachgewiesen, dass auch andere CYP-Enzyme für die N-Demethylierung verantwortlich sind, wie z.B. CYP2C11 (Rane und Ask 1992). Dennoch bleibt die EMND eine wichtige Modellreaktion für das CYP3A4, welches beim Menschen mit 60% den Hauptanteil des gesamten CYP in der Leber ausmacht (Gonzalez und Gelboin 1994).

Bei der EMND findet eine CYP-abhängige C-Hydroxylierung an der N-Methylgruppe des Ethylmorphins statt. In der Folgereaktion entsteht nichtenzymatisch Formaldehyd (Klinger und Müller 1977, Kleeberg und Klinger 1982).



Dieses reagiert mit Acetylaceton und Ammoniumionen zu 3,5-Diacetyl-1,4-Dihydrolutidin, dessen Konzentration im Spektralphotometer bestimmt werden kann (Nash 1953).

Es wurden wiederum je 6 Versuche mit Menschen- und mit Rattenleber durchgeführt. Mit destilliertem Wasser wurden verschiedene Konzentrationen von Flecainid (1, 10, 100, 1000 μM) angefertigt. Laut Pipettierschema wurde 0,1 ml Flecainid in den entsprechenden Konzentrationen den Inkubationsansätzen zugesetzt. Die Kontroll- und Leerwerte erhielten stattdessen 0,1 ml destilliertes Wasser. Die Verdünnungsreihe von Ethylmorphin (0, 0,1875, 0,325, 0,75, 1,5, 3, 6 mM) wurde mit 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, angesetzt und 0,1 ml laut Schema (siehe Tabelle 15) zugegeben. Der 9000g-Überstand wurde mit 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, 1:4 verdünnt.

In den Inkubationsansatz kamen weiterhin:

0,5 ml 0,5 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,05 ml 0,1 M G-6-P, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,05 ml 0,2 M Semicarbazid, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4,

0,05 ml 0,1 M MgCl_2 , gelöst in aqua dest.,

0,2 ml 1:4 verdünnter 9000g-Überstand.

Um eine Reaktion zu verhindern, wurde 0,1 ml 75%ige Trichloressigsäure (TCA) in die Leerwerte gegeben. Die Reaktion wurde in den übrigen Probenansätzen mit 0,05 ml 6 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, gestartet. Die Proben, bis auf die Leerwerte, wurden nun in einem 37°C warmen Schüttel-Wasserbad für 10 Minuten inkubiert. Mit 0,1 ml 75%iger TCA wurde nach 10 Minuten die Reaktion gestoppt. Nachdem alle Proben gut geschüttelt worden waren, wurden sie für 10 Minuten in einer Zentrifuge bei 5500 Umdrehungen pro Minute (5000g) (Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Anschließend wurden 0,5 ml des klaren Überstandes mit 0,5 ml Nash-Reagenz (30 g Ammoniumacetat + 0,4 ml Acetylaceton + 0,6 ml Eisessig ad 100 ml aqua dest.) für 40 Minuten bei 37°C inkubiert.

Für die Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen an Formaldehyd (0, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 µM, gelöst in aqua dest.) eingesetzt und die Reaktion mit Gabe von 0,1 ml 75%iger TCA verhindert. Anschließend wurden die gleichen Substanzen gleicher Volumina, mit Ausnahme von Ethylmorphin, wie im Inkubationsansatz hinzugegeben. Die Eichwerte wurden, wie die Leerwerte, nicht inkubiert, aber mit 0,05 ml 6 mM NADPH, gelöst in 0,1 M Na-P-Puffer, pH 7,4, versetzt und ansonsten genauso wie die Proben des Inkubationsansatzes behandelt.

Gemessen wurden die Proben an einem Spektralphotometer (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei einer Extinktionswellenlänge von 412 nm gegen aqua dest.

Die Enzymaktivität wurde wie folgt berechnet:

$$A_{FA} = \frac{\Delta E \times F_{EK}}{\text{Prot.} \times 10}$$

A_{FA}	=	Enzymaktivität in [nmol/(mg Protein*min)]
ΔE	=	Differenz der Extinktion zw. Haupt- und Leerwert
F_{EK}	=	Faktor der Eichkurve (Konzentration / Intensität)
Prot.	=	Proteingehalt des 9000g-Überstandes [mg/ml]
10	=	Inkubationszeit [min]

4.8.4. Herkunft der verwendeten Substanzen und Lösungen

7-Ethoxycoumarin, 7-Ethoxyresorufin, Flecainid, Glukose-6-Phosphat, NADPH, 7-Hydroxycoumarin, Resorufin, Semicarbazid: Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland.

Alle anderen Substanzen und Lösungen besaßen höchsten Reinheitsgrad und wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland, bezogen.

4.8.5. Statistische Auswertung der Monooxygenase-Modellreaktionen

In allen Versuchen wurde 9000g-Überstand aus jeweils 6 verschiedenen Ratten- bzw. Menschenlebern verwendet.

Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem gepaarten t-Test nach Student durchgeführt. Dabei zeigte eine Irrtumswahrscheinlichkeit $\leq 5\%$ eine Signifikanz an.

5. Ergebnisse

5.1. Genotypen der Probanden

5.1.1. Cytochrom P450 2C8

Es wurde auf das Vorliegen des CYP2C8*3-Allels hin untersucht. Auf die Analyse von CYP2C8*2 wurde verzichtet, da sie fast nie bei Kaukasiern vorkommt (Dai et al. 2001). Wenn keine Mutation gefunden wurde, nahm man den Wildtyp (wt) an (n = Anzahl der Probanden).

EM (n=18) - charakterisiert durch zwei funktionelle Allele vom Wildtyp (wt/wt).

hetEM (n=1) - charakterisiert durch wt/m hinsichtlich CYP2C8*3.

5.1.2. Cytochrom P450 2C9

Um die Probanden einem Metabolisierungstyp zuzuordnen, wurden die Mutationen CYP2C9*2 und CYP2C9*3 untersucht. Der Wildtyp ergab sich, wenn keine Mutation gefunden wurde (n = Anzahl der Probanden).

EM (n=17) - charakterisiert durch zwei funktionelle Allele vom Wildtyp (wt/wt) oder durch wt/m sowie m/m hinsichtlich CYP2C9*2.

hetEM (n=2) - charakterisiert durch wt/m hinsichtlich CYP2C9*3 sowie durch die Kombination CYP2C9*2 in einem Allel und CYP2C9*3 im anderen Allel (beide hetEM waren wt/m für CYP2C9*3 und wt/wt für CYP2C9*2).

5.1.3. Cytochrom P450 2C19

Die CYP2C19-Genotypisierung beschränkte sich auf die Mutation CYP2C19*2, da durch diese Mutation die Mehrzahl der Langsam-Metabolisierer (PM) identifiziert werden kann (de Morais et al. 1994). Fand man diese Mutation nicht, wurde der Wildtyp angenommen und der Proband war ein Schnell-Metabolisierer (EM) (n = Anzahl der Probanden).

- EM (n=18) - charakterisiert durch zwei funktionelle Allele vom Wildtyp (wt/wt) oder durch ein funktionelles Allel und eine Mutation (wt/m).
- PM (n=1) - charakterisiert durch zwei Mutationen (m/m).

5.1.4. Cytochrom P450 2D6

Um die Anzahl und Verteilung der verschiedenen Allele des CYP2D6 zu ermitteln, wurde eine Polymerasekettenreaktion sowie anschließend eine Restriktionsfragmentlängenanalyse der isolierten DNA durchgeführt. Hierdurch konnte man die Probanden einem CYP2D6-Metabolisierungstyp, heterozygote Extensive Metabolizer (hetEM) oder Extensive Metabolizer (EM), zuordnen (n = Anzahl der Probanden).

- EM (n=12) - charakterisiert durch zwei funktionelle Allele vom Wildtyp (wt/wt).
- hetEM (n=7) - charakterisiert durch ein funktionelles Allel vom Wildtyp und ein defektes Allel: wt/*3 (n=1), wt/*4 (n=5) oder wt/*6 (n=1);
der Genotyp wt/*5 wurde nicht gefunden.

5.2. Zusammenhang zwischen Cytochrom-P450-2D6-Genotyp und Metabolisierung von Dextromethorphan

5.2.1. Serumkonzentration von Dextromethorphan und seinen Metaboliten vor Flecainideinstellung

Hinsichtlich der Serumkonzentrationen von DEX und seinen Metaboliten zeigte sich zwischen hetEM und EM bei den durch CYP2D6 katalysierten Abbauprodukten DTX und 3-HM ein signifikanter Unterschied nur beim Endprodukt 3-HM. Hierbei waren in der EM- im Vergleich zur hetEM-Gruppe höhere Werte auffällig (Tabelle 16, Abbildung 8). Jedoch fanden sich auch für DTX bei den EM-Patienten tendenziell höhere Konzentrationen als bei den hetEM-Patienten, wohingegen die DEX-Werte bei der hetEM-Gruppe tendenziell gesteigert waren (Tabelle 16, Abbildung 8).

Die Nachweisgrenze bei dieser Untersuchung lag bei 5 ng/ml. Befand sich ein Wert unter dieser Nachweisgrenze, wurde eine Konzentration von 2,5 ng/ml angenommen.

Bei 8 Probanden (2 hetEM und 6 EM) wurde nur am fünften Tag ein Dextromethorphan-Test durchgeführt, weshalb die Probandenzahl zwischen dem 1. und 5. Tag unterschiedlich ist.

Tabelle 16: Mittlere Konzentration [ng/ml] von DEX und seinen Abbauprodukten im Serum der Probanden vor Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme einer Testdosis von 30 mg Dextromethorphan, geordnet nach CYP2D6-Genotypen (EM, hetEM)

		DEX	DTX	3-MM	3-HM
EM (n=6)	X	2,50	661,13	2,50	157,15 *
	SF	0,00	73,22	0,00	15,37
hetEM (n=5)	X	3,89	507,62	2,50	108,92
	SF	0,90	57,33	0,00	12,69

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (t-Test für unabhängige Stichproben):

* = signifikanter Unterschied der EM-Gruppe zur hetEM-Gruppe

Dextromethorphan und seine Metaboliten am Tag 1 vor Flecainideinstellung

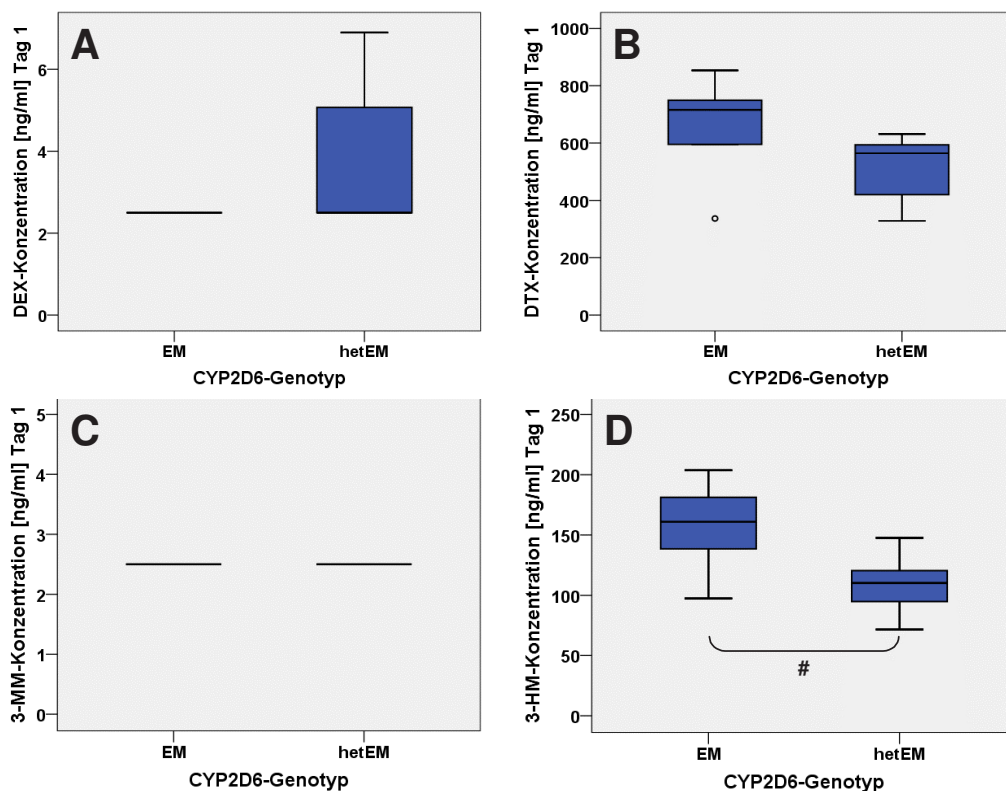


Abbildung 8: Konzentration [ng/ml] von DEX (A) und seinen Metaboliten DTX (B), 3-MM (C) und 3-HM (D) im Serum der Probanden vor Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme von 30 mg Dextromethorphan bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; $n = 6$ (EM) bzw. 5 (hetEM); #: signifikanter Unterschied zwischen EM und hetEM ($p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben).

5.2.2. Serumkonzentration von Dextromethorphan und seinen Metaboliten nach Flecainideinstellung

Nach Flecainideinstellung zeigten sich ebenfalls tendenziell erhöhte DTX- und 3-HM-Plasmaspiegel in der EM-Gruppe im Vergleich zur hetEM-Gruppe, es konnten jedoch keine Signifikanzen festgestellt werden (Tabelle 17, Abbildung 9).

Tabelle 17: Mittlere Konzentration [ng/ml] von DEX und seinen Abbauprodukten im Serum der Probanden nach Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme einer Testdosis von 30 mg Dextromethorphan, geordnet nach CYP2D6-Genotypen (EM, hetEM)

		DEX	DTX	3-MM	3-HM
EM (n=12)	X	8,30	282,05	4,94	63,78
	SF	4,35	52,21	2,44	10,49
hetEM (n=7)	X	8,27	233,34	3,07	46,38
	SF	1,75	43,29	0,41	7,12

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (t-Test für unabhängige Stichproben)

Dextromethorphan und seine Metaboliten am Tag 5 nach Flecainideinstellung

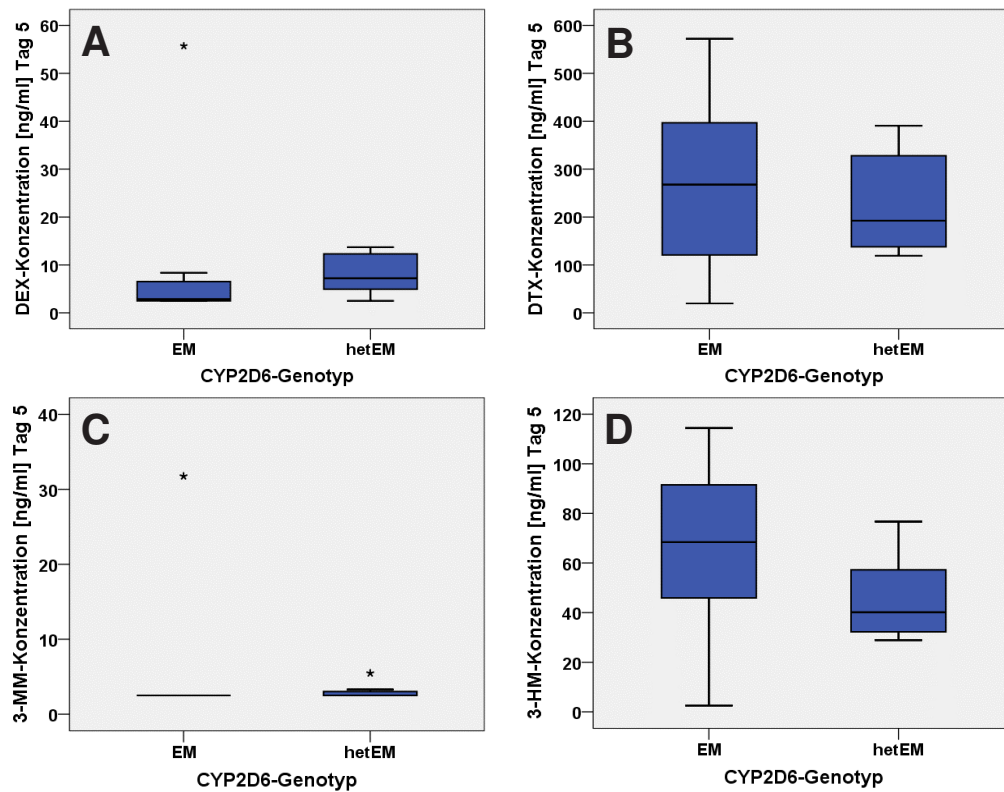


Abbildung 9: Konzentration [ng/ml] von DEX (A) und seinen Metaboliten DTX (B), 3-MM (C) und 3-HM (D) im Serum der Probanden nach Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme von 30 mg Dextromethorphan bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 12 (EM) bzw. 7 (hetEM).

5.2.3. Vergleich der Serumkonzentrationen von Dextromethorphan und seinen Metaboliten vor und nach Flecainideinstellung bei Extensive Metabolizern des Cytochrom P450 2D6

Es bestand ein starker Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen von DTX und 3-HM vor und nach Flecainideinstellung. Hierbei waren nach Flecainideinstellung deutlich niedrigere DTX- und 3HM-Plasmaspiegel zu detektieren (Tabelle 18). Zum Endprodukt 3-MM konnte keine Aussage getroffen werden, da es unterhalb der Nachweisgrenze von 5 ng/ml lag und somit ein Wert von 2,5 ng/ml angenommen wurde.

Tabelle 18: Mittlere Konzentration [ng/ml] von DEX und seinen Abbauprodukten im Serum bei EM-Probanden des CPY2D6 vor und nach Flecainideinstellung (FE)

		DEX	DTX	3-MM	3-HM
EM vor FE (n=6)	X	2,50	661,13	2,50	157,14
	SF	0,00	73,22	0,00	15,37
EM nach FE (n=6)	X	4,26	395,60 #	2,50	86,98 #
	SF	0,80	64,57	0,00	10,51

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (gepaarter t-Test):

= signifikanter Unterschied zur Serumkonzentration der EM-Gruppe vor Flecainideinstellung

5.2.4. Vergleich der Serumkonzentrationen von Dextromethorphan und seinen Metaboliten vor und nach Flecainideinstellung bei heterozygoten Extensive Metabolizern des Cytochrom P450 2D6

Bei hetEM waren die Serumkonzentrationen von DTX und von 3-HM als Abbauprodukte des CYP2D6 nach Flecainideinstellung signifikant niedriger als vor der Gabe des Antiarrhythmikums. Umgekehrt war der DEX-Serumspiegel nach Flecainideinstellung tendenziell höher. Über die Serumkonzentration von 3-MM lässt sich nur bedingt eine Aussage treffen, da diese wiederum meist unter der Nachweisgrenze lag (Tabelle 19).

Tabelle 19: Mittlere Konzentration [ng/ml] von DEX und seinen Abbauprodukten bei hetEM- Probanden des CYP2D6 vor und nach Flecainideinstellung

		DEX	DTX	3-MM	3-HM
hetEM vor FE (n=5)	X	3,89	507,62	2,50	108,92
	SF	0,90	57,33	0,00	12,69
hetEM nach FE (n=5)	X	6,40	210,09 ^	3,25	42,04 ^
	SF	1,81	49,81	0,58	8,88

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (gepaarter t-Test):

^ = signifikanter Unterschied zur Serumkonzentration der hetEM-Gruppe vor Flecainideinstellung

5.2.5. Serumkonzentrationen von Dextromethorphan und seinen Metaboliten – Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zeigten, dass eine Abhängigkeit der Serumkonzentrationen von DEX und seinen Metaboliten zum einen vom CYP2D6-Genotyp, zum anderen aber auch von der zusätzlichen Gabe von Flecainid existierte. Diese war zwar nicht immer signifikant, aber es konnte eine deutliche Tendenz bei den Metaboliten, die über CYP2D6 gebildet werden, aufgezeigt werden. Die EM wiesen im Vergleich zu den hetEM höhere DTX- und 3-HM-Serumspiegel auf. Nach Flecainideinstellung sanken die Serumspiegel von DTX und 3-HM signifikant und es erhöhten sich die Serumspiegel von DEX und 3-MM, sowohl bei den hetEM als auch bei den EM. Dass die Ergebnisse nicht immer signifikant waren, liegt einerseits an der geringen Stichprobenanzahl, andererseits aber auch an den niedrigen Serumkonzentrationsspiegeln der Probanden, die oft im nicht zu messenden Bereich lagen.

Aufgrund fehlender Dextromethorphanstestdaten am 1. Untersuchungstag konnten nicht alle Probanden vor und nach Flecainideinstellung verglichen werden. So sind die unterschiedlichen Probandenzahlen in den Tabellen 17-19 zu erklären.

5.3. Metabolitenquotienten als Maß für die Aktivität der beteiligten Enzyme am Abbau des Dextromethorphans

Die Metabolitenquotienten (MQ) errechneten sich aus den Serumkonzentrationen der einzelnen Substrate und Metabolite. Dabei sind die MQ DEX/DTX und 3-MM/3-HM ein Maß für die CYP2D6-Aktivität und die MQ DEX/3-MM und DTX/3-HM ein Nachweis für die Aktivität des Enzyms CYP3A4. Außerdem wurden kombinierte Metabolitenquotienten (MQ_{komb}) für CYP2D6 ((DEX + 3-MM)/(DTX + 3-HM)) und CYP3A4 ((DEX + DTX)/(3-MM + 3-HM)) berechnet.

5.3.1. Metabolitenquotienten vor Flecainideinstellung

Die Metabolitenquotienten (MQ) des Dextromethorphanabbaus unterschieden sich teilweise deutlich (wenn auch nicht statistisch signifikant) zwischen hetEM und EM (Tabelle 20, Abbildungen 10 und 11). Dies bedeutet, dass unterschiedliche Geschwindigkeiten im Abbau von Dextromethorphan bestanden. So zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen EM und hetEM im MQ 3-MM/3-HM, welcher durch das Enzym CYP2D6 katalysiert wird. Der MQ lag bei den EM niedriger als bei den hetEM. Auch der kombinierte MQ für CYP2D6 zeigte eine Abhängigkeit vom CYP2D6-Genotyp. Hingegen war (erwartungsgemäß) kein Bezug des CYP3A4-MQ zum CYP2D6-Genotyp gegeben.

Der kombinierte Metabolitenquotient von CYP2D6 ((DEX+3-MM)/(DTX+3-HM)) war stets deutlich niedriger als der MQ_{komb} von CYP3A4 ((DEX+DTX)/(3-MM+3-HM)). Dies ließ sich sowohl für alle Probanden, als auch einzeln für die hetEM-Gruppe und die EM-Gruppe belegen und steht im Einklang mit einer *in vitro* deutlich höheren Substrataffinität (Faktor 50-100) des CYP2D6 im Vergleich zum CYP3A4 im DEX-Stoffwechsel (Yu und Haining 2001). Die Probandenzahlen vor und nach Flecainideinstellung variieren hier ebenfalls wegen des nicht durchgeführten Dextromethorphan-Tests bei 8 Probanden am ersten Tag.

Tabelle 20: Mittlere Metabolitenquotienten der Probanden vor Flecainideinstellung, geordnet nach CYP2D6-Genotypen (EM, hetEM)

		CYP2D6		CYP2D6 _{komb}	CYP3A4		CYP3A4 _{komb}
		DEX — DTX	3-MM — 3-HM	(DEX+3-MM) — (DTX+3-HM)	DEX — 3-MM	DTX — 3-HM	(DEX+DTX) — (3-MM+3-HM)
EM (n=6)	X	0,0041	0,0168 ~	0,0066 √	1,0000	4,1762	4,1245
	SF	0,0007	0,0020	0,0010	0,0000	0,1998	0,1987
hetEM (n=5)	X	0,0088	0,0243	0,0115 √	1,5575	4,7463	4,6712
	SF	0,0031	0,0031	0,0031	0,3605	0,4640	0,4479

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$:

~ = starke Tendenz, aber kein signifikanter Unterschied der EM-Gruppe zur hetEM-Gruppe (t-Test für unabhängige Stichproben) ($p = 0,06$)

√ = signifikanter Unterschied zwischen dem CYP2D6-MQ_{komb} und dem jeweiligen CYP3A4-MQ_{komb} (gepaarter t-Test)

Metabolitenquotienten am Tag 1 vor Flecainideinstellung

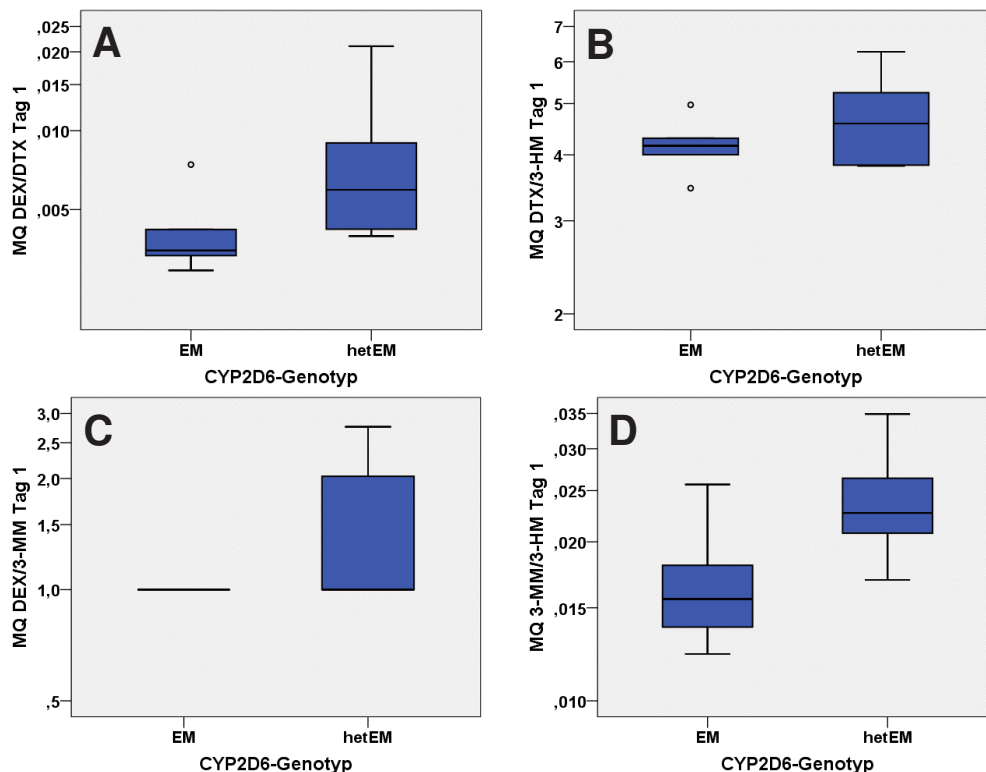


Abbildung 10: Metabolitenquotienten (MQ) von DEX (A: DEX/DTX, B: DTX/3-HM, C: DEX/3-MM, D: 3-MM/3-HM) vor Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme von 30 mg Dextromethorphan bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 6 (EM) bzw. 5 (hetEM).

Kombinierte Metabolitenquotienten am Tag 1 vor Flecainideinstellung

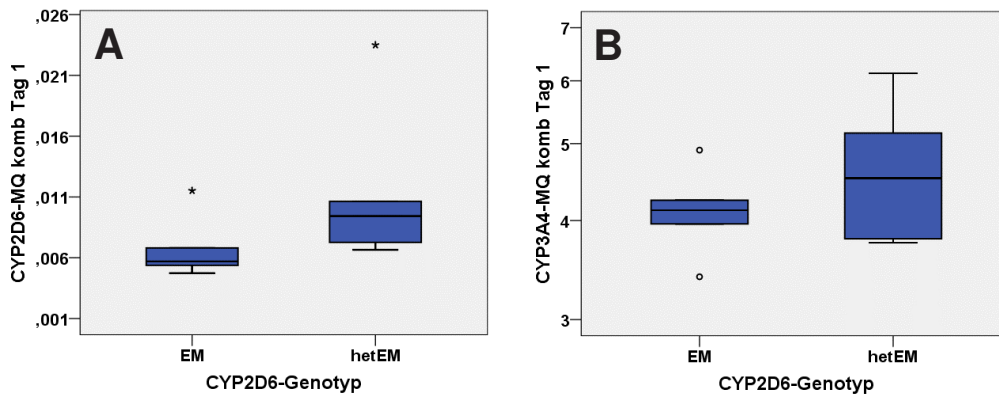


Abbildung 11: Kombinierte Metabolitenquotienten (MQ) von DEX (A: CYP2D6-MQ_{komb}, B: CYP3A4-MQ_{komb}) vor Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme von 30 mg Dextromethorphan bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 6 (EM) bzw. 5 (hetEM).

5.3.2. Metabolitenquotienten nach Flecainideinstellung

Nach Flecainideinstellung gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Allerdings waren wiederum signifikant deutlich niedrigere CYP2D6- als CYP3A4-MQ_{komb} nachzuweisen (Tabelle 21, Abbildungen 12 und 13).

Tabelle 21: Mittlere Metabolitenquotienten der Probanden nach Flecainideinstellung, geordnet nach CYP2D6-Genotypen (EM, hetEM)

		CYP2D6		CYP2D6 _{komb}	CYP3A4		CYP3A4 _{komb}
		DEX — DTX	3-MM — 3-HM	(DEX+3-MM) — (DTX+3-HM)	DEX — 3-MM	DTX — 3-HM	(DEX+DTX) — (3-MM+3-HM)
EM (n=12)	X	0,0783	0,1420	0,0929 ∨	1,6106 ~	5,5191	4,7512
	SF	0,0533	0,0625	0,0552	0,2402	1,0658	0,6866
hetEM (n=7)	X	0,0404	0,1826	0,0452 ∨	2,8535	5,1232	4,9690
	SF	0,0117	0,1367	0,0102	0,6749	0,7402	0,7203

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; p ≤ 0,05:

∨ = signifikanter Unterschied zwischen dem CYP2D6-MQ_{komb} und dem jeweiligen CYP3A4-MQ_{komb} (gepaarter t-Test)

~ = starke Tendenz, aber kein signifikanter Unterschied der EM-Gruppe zur hetEM-Gruppe (t-Test für unabhängige Stichproben) (p = 0,053)

Metabolitenquotienten am Tag 5 nach Flecainideinstellung

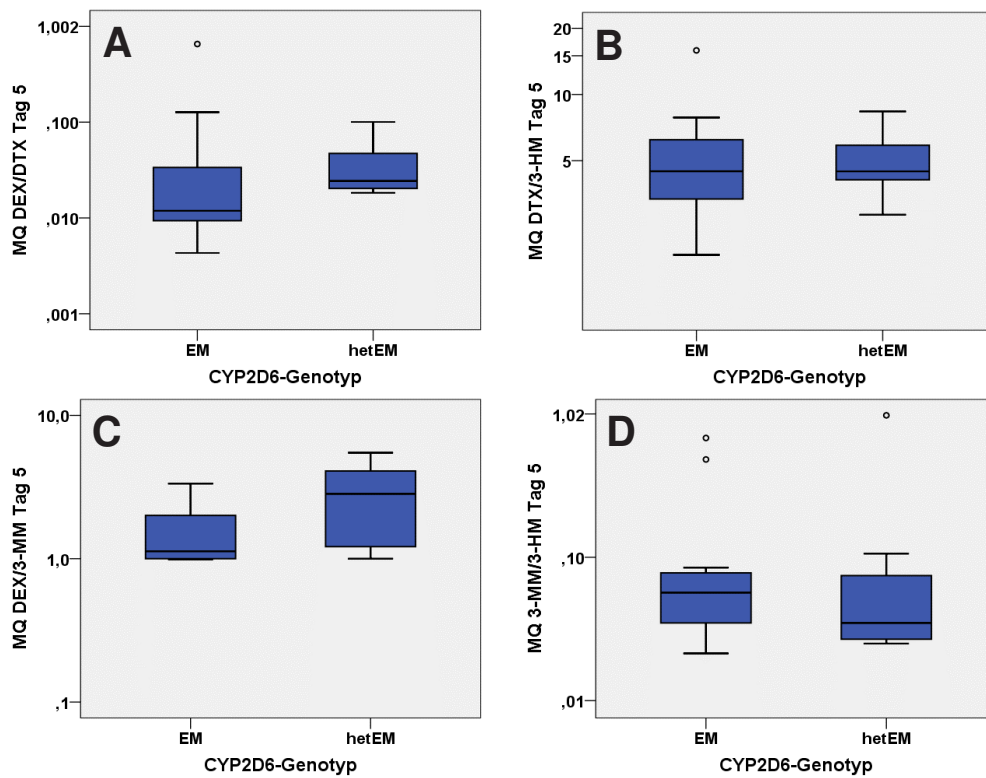


Abbildung 12: Metabolitenquotienten (MQ) von DEX (A: DEX/DTX, B: DTX/3-HM, C: DEX/3-MM, D: 3-MM/3-HM) nach Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme von 30 mg Dextromethorphan bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 12 (EM) bzw. 7 (hetEM).

Kombinierte Metabolitenquotienten am Tag 5 nach Flecainideinstellung

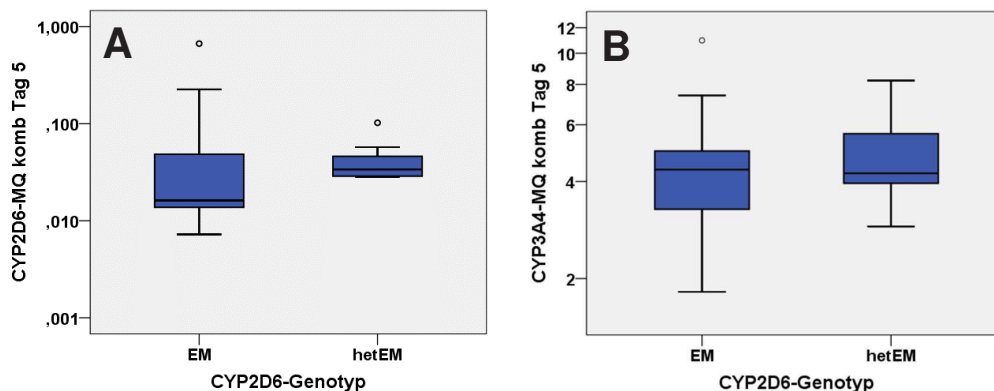


Abbildung 13: Kombinierte Metabolitenquotienten (MQ) von DEX (A: CYP2D6-MQ_{komb}, B: CYP3A4-MQ_{komb}) nach Flecainideinstellung und 2 h nach der Einnahme von 30 mg Dextromethorphan bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 12 (EM) bzw. 7 (hetEM).

5.3.3. Vergleich der Metabolitenquotienten der Extensive Metabolizer des Cytochrom P450 2D6 vor und nach Flecainideinstellung

Zwischen den Zeitpunkten vor und nach Flecainideinstellung fanden sich deutliche, wenn auch nach Berechnung mit Hilfe des gepaarten t-Tests nicht immer signifikante, Unterschiede im CYP2D6-abhängigen MQ DEX/DTX und im kombinierten CYP2D6-Metabolitenquotienten (CYP2D6-MQ_{komb}) (vergleiche hierzu auch die statistischen Berechnungen mit Hilfe des Wilcoxon-Tests mit graphischer Darstellung (Abbildungen 19 bis 21) in Kapitel 5.8.2.). Die Gegenüberstellung des CYP2D6-MQ_{komb} und des CYP3A4-MQ_{komb}, sowohl vor als auch nach Flecainideinstellung, ergab einen klaren und signifikanten Unterschied. Der CYP2D6-MQ_{komb} war hierbei jeweils deutlich niedriger als der CYP3A4-MQ_{komb} (Tabelle 22).

Tabelle 22: Mittlere Metabolitenquotienten der EM-Probanden des CYP2D6 vor und nach Flecainideinstellung (FE)

		CYP2D6		CYP2D6 _{komb}	CYP3A4		CYP3A4 _{komb}
		DEX — DTX	3-MM — 3-HM	(DEX+3-MM) — (DTX+3-HM)	DEX — 3-MM	DTX — 3-HM	(DEX+DTX) — (3-MM+3-HM)
EM vor	X	0,0041	0,0168	0,0066 √	1,0000	4,1762	4,1245
FE (n=6)	SF	0,0007	0,00120	0,0010	0,0000	0,1998	0,1987
EM nach	X	0,0136 ~	0,1480	0,0169 # √	1,7058	4,4073	4,3310
FE (n=6)	SF	0,0048	0,1097	0,0048	0,3198	0,2716	0,2687

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (gepaarter t-Test):

= signifikanter Unterschied zur EM-Gruppe vor Flecainideinstellung

~ = starke Tendenz, aber kein signifikanter Unterschied zur EM-Gruppe vor Flecainid-Einstellung ($p = 0,070$)

√ = signifikanter Unterschied zwischen dem CYP2D6-MQ_{komb} und dem CYP3A4-MQ_{komb}

5.3.4. Vergleich der Metabolitenquotienten der heterozygoten Extensive Metabolizer des Cytochrom P450 2D6 vor und nach Flecainideinstellung

Im t-Test für gepaarte Stichproben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Metabolitenquotienten bei den hetEM vor und nach Flecainideinstellung (vergleiche hierzu auch die statistischen Berechnungen mit Hilfe des Wilcoxon-Tests in Kapitel 5.8.2.). Dennoch zeigten sich auch hier nach Flecainidgabe bei den CYP2D6-vermittelten Metabolitenquotienten höhere Werte als vor der Einstellung mit dem Antiarrhythmikum (Tabelle 23). Der CYP2D6-MQ_{komb} war vor und nach Flecainideinstellung signifikant niedriger als der CYP3A4-MQ_{komb} (Tabelle 23). Dies weist darauf hin, dass auch bei hetEM das CYP2D6 bei der Metabolisierung von Dextromethorphan eine größere Bedeutung hat als das CYP3A4.

Tabelle 23: Mittlere Metabolitenquotienten der hetEM-Probanden des CYP2D6 vor und nach Flecainideinstellung (FE)

		CYP2D6		CYP2D6 _{komb}	CYP3A4		CYP3A4 _{komb}
		DEX — DTX	3-MM — 3-HM	(DEX+3-MM) — (DTX+3-HM)	DEX — 3-MM	DTX — 3-HM	(DEX+DTX) — (3-MM+3-HM)
hetEM vor FE (n=5)	X	0,0088	0,0243	0,0115	1,5575	4,7463	4,6712
	SF	0,0032	0,0031	0,0031	0,3605	0,4644	0,4479
hetEM nach FE (n=5)	X	0,0368	0,0498	0,0444	2,0064	4,9302	4,7314
	SF	0,0160	0,0155	0,0145	0,5497	0,5925	0,5746

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (gepaarter t-Test)

5.3.5. Metabolitenquotienten — Zusammenfassung der Ergebnisse

Es zeigten sich bei der statistischen Berechnung mit Hilfe des gepaarten t-Tests nicht immer signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen hetEM und EM. Wenn sich Signifikanzen statistisch errechnen ließen, waren sie ausnahmslos bei den Metabolitenquotienten zu verzeichnen, die durch CYP2D6 katalysiert werden. Vor Flecainideinnahme waren alle Metabolitenquotienten der hetEM höher als die der EM. Nach Flecainideinstellung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den hetEM- und EM-Probanden.

Auch im Vergleich vor und nach Flecainideinstellung konnten nur beim MQ DEX/DTX und beim CYP2D6-MQ_{komb} und auch nur bei den EM signifikante Unterschiede festgestellt werden. Sowohl bei den hetEM- als auch bei den EM-Probanden waren die Metabolitenquotienten nach Flecainidgabe höher als in der Kontrollphase ohne Flecainid. Ein Einfluss auf den CYP3A4-MQ_{komb} konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den kombinierten Metabolitenquotienten von CYP2D6 ((DEX + 3-MM)/(DTX + 3-HM)) und CYP3A4 ((DEX + DTX)/(3-MM + 3-HM)) stellte sich ebenfalls dar. Der CYP2D6-MQ_{komb} war deutlich niedriger als der CYP3A4-MQ_{komb}. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Enzymaktivitäten und Substrataffinitäten für die Enzyme CYP2D6 und CYP3A4 im DEX-Stoffwechsel (Yu und Haining 2001).

Insgesamt belegen die Ergebnisse, dass über das CYP2D6 der Hauptteil des DEX metabolisiert wird und dass Flecainid hierauf eine hemmende Wirkung ausübt. Der Metabolisierungsweg verläuft nur zu einem geringen Prozentsatz über CYP3A4. Dieser wird durch Flecainid offensichtlich nicht beeinflusst.

5.4. Pharmakokinetik von Flecainid in Abhängigkeit vom Genotyp

Im Allgemeinen werden bei täglicher Gabe von Tambocor[®] nach ca. 4 Tagen Steady-State-Bedingungen erreicht (Fachinformation Tambocor[®], 3M Medica, Neuss, Deutschland). Die Patienten bekamen als Standard-Zieldosis 2x täglich 100 mg Flecainidacetat alle 12 Stunden (jeweils um 8:00 und 20:00 Uhr eines Tages) verabreicht. Am 4. Tag wurde 0, 1, 2, 3, 4, 6, 9, 12 und 24 Stunden nach Flecainideinnahme der Serumspiegel gemessen. Dabei entsprechen die Zeiten 0, 12 und 24 Stunden dem Serumspiegel vor Flecainideinnahme (Abbildung 14).

Außerdem wurde eine statistische Analyse zwischen den Mittelwerten der Serumkonzentrationen von hetEM und EM zu verschiedenen Zeitpunkten vor bzw. nach Flecainideinnahme durchgeführt (Tabelle 24). Die Serumkonzentrationen der EM lagen zu allen Zeitpunkten im Mittel niedriger als bei den hetEM. Statistisch war dies ebenfalls belegbar.

Ein Proband (F65) wurde in die Berechnungen nicht mit einbezogen, da für ihn nicht alle Flecainid-Kinetik-Daten vorlagen.

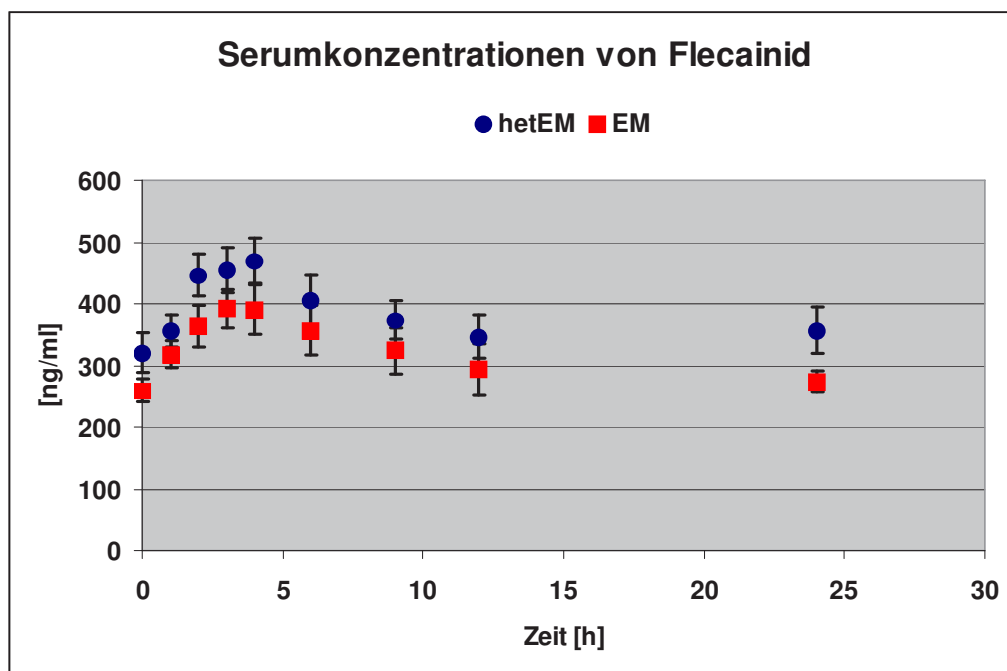


Abbildung 14: Mittlere Serumkonzentration vor (Zeitpunkte 0 h, 12 h, 24 h) bzw. 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h und 9 h nach Einnahme von 100 mg Flecainid am 4. und 5.Tag der Untersuchung bei EM und hetEM. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 11$ (EM) bzw. 7 (hetEM).

Tabelle 24: Mittlere Serumkonzentration von Flecainid bei EM und hetEM zu verschiedenen Zeitpunkten

		Tag 4 0 h	Tag 4 1 h	Tag 4 2 h	Tag 4 3 h	Tag 4 4 h	Tag 4 6 h	Tag 4 9 h	Tag 4 12 h	Tag 5 24 h
EM (n=11)	X	240,96*	285,75*	336,58*	361,14*	368,79*	325,14	295,54*	289,56	275,05*
	SF	17,32	16,33	26,94	18,12	29,20	25,34	17,49	31,83	18,54
hetEM (n=7)	X	320,65	355,73	446,57	454,31	470,81	404,80	375,02	346,31	356,55
	SF	31,49	27,08	33,88	36,60	36,02	41,37	31,04	34,65	37,53

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler; $p \leq 0,05$ (ungepaarter t-Test):

* = signifikanter Unterschied zur hetEM-Gruppe

5.4.1. Talspiegel von Flecainid unter Steady-State-Bedingungen

Der Talspiegel (Cmin) oder auch Prä-Dosis-Spiegel wird vor der Einnahme des Medikaments, in diesem Fall Flecainid, gemessen. Die Probanden nahmen 100 mg Flecainid alle 12 h ein.

In der Gruppe der hetEM lag der durchschnittliche Talspiegel (Cmin ges.) am 4./5. Untersuchungstag unter Steady-State-Bedingungen bei $341,17 \pm 32,02$ ng/ml und somit signifikant höher als in der EM-Gruppe mit einer mittleren Konzentration von $268,53 \pm 22,56$ ng/ml (Tabelle 25, Abbildung 15).

5.4.2. Fläche unter der Serumspiegelkurve von Flecainid im Steady-State

Mit der Fläche unter der Serumspiegelkurve (AUC) wird die Bioverfügbarkeit einer Substanz oder eines Medikaments berechnet.

Die mittlere AUC der EM im Steady-State am 4. Untersuchungstag über 12 h war mit 3784 ± 207 ng/ml*h signifikant niedriger als die der hetEM mit 4780 ± 392 ng/ml*h (Tabelle 25, Abbildung 15).

Tabelle 25: Pharmakokinetische Parameter von Flecainid

		AUC	Cmin ges.	Cmin 4T0h	Cmin 4T12h	Cmin 5T0h
EM (n=11)	X	3784,14 *	268,53 *	240,97 *	289,56	275,07 *
	SF	206,66	22,56	17,32	31,83	18,53
hetEM (n=7)	X	4779,69	341,17	320,65	346,31	356,55
	SF	391,82	32,02	31,49	34,65	37,53

AUC (0-12h) [ng/ml*h] und Cmin [ng/ml] der hetEM- und EM-Probanden

X - arithmetischer Mittelwert, SF - Standardfehler, Cmin 4T0h - Talspiegel am 4. Tag 8:00 Uhr, Cmin 4T12h - Talspiegel am 4. Tag 20:00 Uhr, Cmin 5T0h - Talspiegel am 5. Tag 8:00 Uhr, sowie hieraus abgeleitet ein durchschnittlicher Talspiegel (Cmin ges.)

* - signifikanter Unterschied zur hetEM-Gruppe, $p \leq 0,05$ (t-Test für unabhängige Stichproben)

Pharmakokinetik von Flecainid

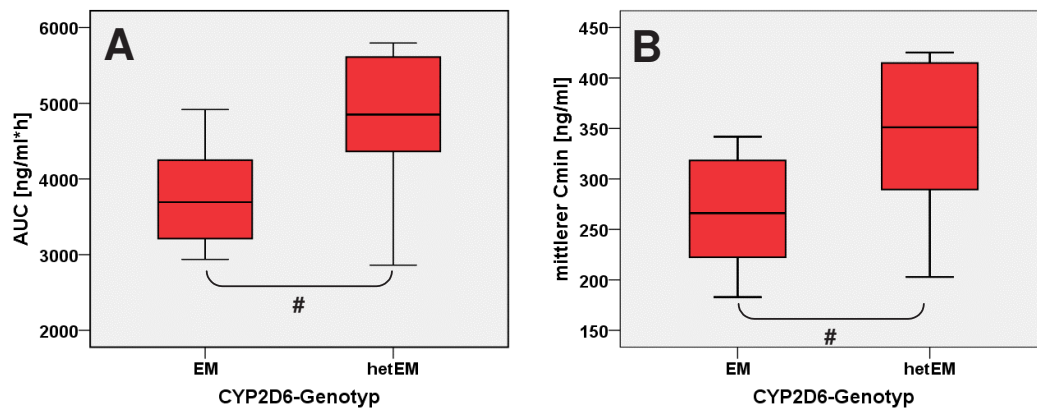


Abbildung 15: AUC (A) und Cmin ges. (B) bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 11 (EM) bzw. 7 (hetEM); #: signifikanter Unterschied zwischen EM und hetEM ($p \leq 0,05$; t-Test für unabhängige Stichproben).

In Abbildung 16 sind die individuellen durchschnittlichen Talspiegel (mittlerer Talspiegel = C_{min} ges.) der Einzel-Probanden vor Einnahme von Flecainid dargestellt. Trotz des signifikanten Unterschieds zwischen den mittleren Konzentrationen der Talspiegel der Gesamt-EM und Gesamt-hetEM kam es neben den interindividuellen Schwankungen zwischen den Probanden gleichen Genotyps auch zu Überschneidungen in den Werten zwischen den Probanden verschiedenen Genotyps.¹

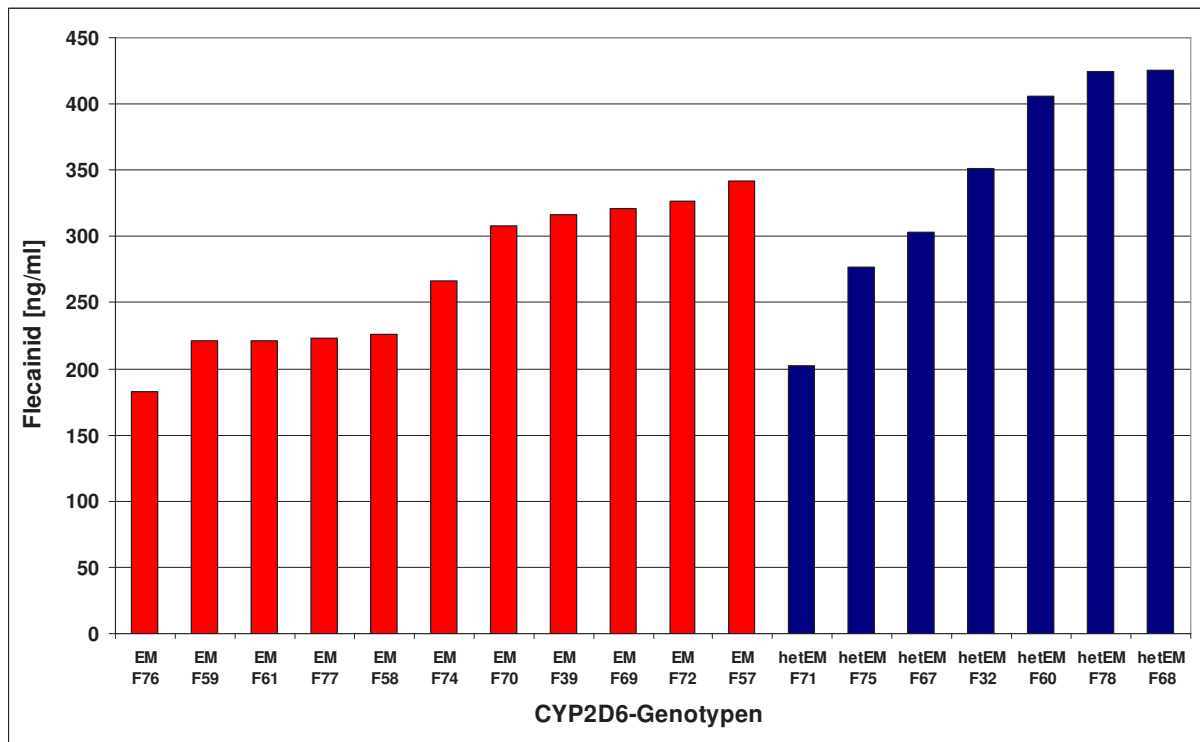


Abbildung 16: Gemittelte Flecainid-Talspiegel am 4./5. Untersuchungstag bei den einzelnen Probanden.

¹ Bei zwei Probanden lag zum Zeitpunkt der Kinetikbestimmungen eine in der Verordnung abweichende Dosierung vor. Im ersten Fall (F68: 2 x 50 mg) erscheint die niedrigere Dosierung aufgrund der gefundenen Messwerte jedoch nicht plausibel, so dass auch hier von einer tatsächlichen Gabe der Standarddosierung ausgegangen wurde. Im zweiten Fall (F71: 3 x 100 mg) entspricht die höhere Dosierung dem deutlich erhöhten Körpergewicht. Es konnte daher in beiden Fällen ein Einbezug in die Gesamtstatistik erfolgen.

In Abbildung 17 sind die individuellen AUC's aller Einzel-Probanden unter Flecainideinnahme dargestellt. Trotz der im Mittel niedrigeren AUC's der Gesamt-EM im Vergleich zu den Gesamt-hetEM waren wiederum neben den interindividuellen Schwankungen zwischen den Probanden gleichen Genotyps auch Überschneidungen zwischen den Probanden verschiedenen Genotyps zu beobachten.

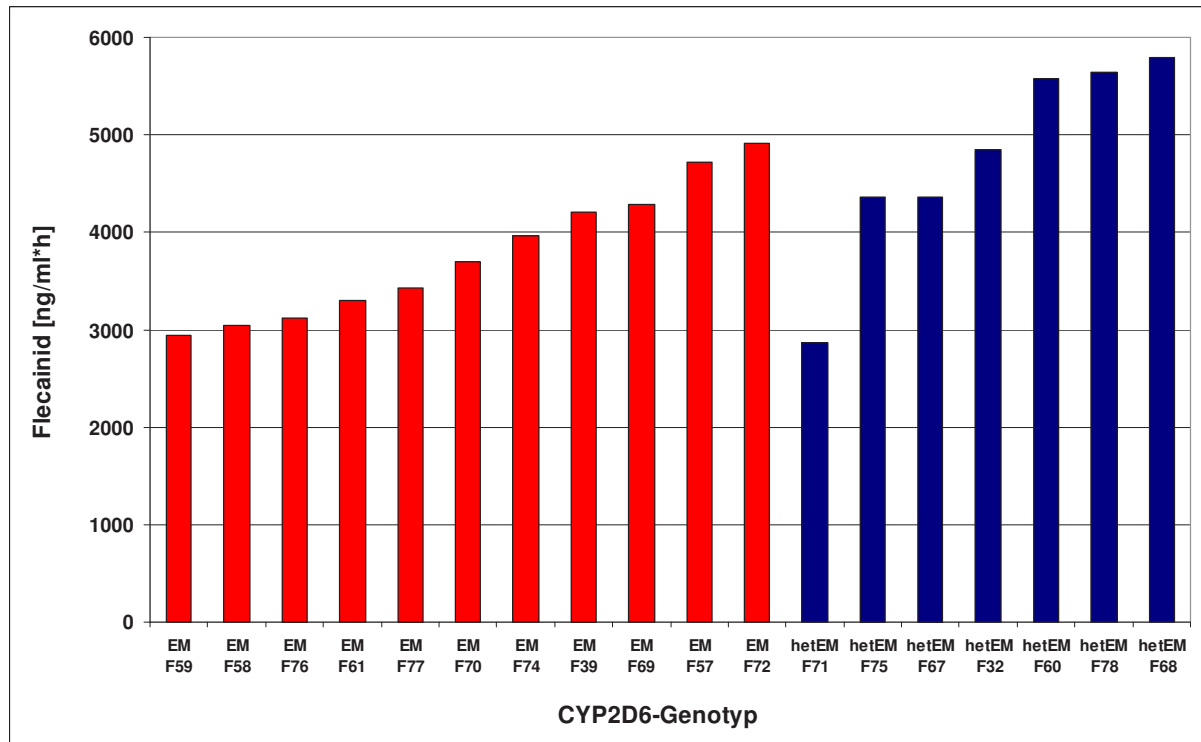


Abbildung 17: AUC von Flecainid bei den einzelnen Probanden am 4. Tag (0-12 h) der Untersuchung.

5.5. Zusammenhang zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp

5.5.1. Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp vor Flecainidgabe

In der **Gesamtgruppe** der Probanden korrelierten vor Flecainideinstellung die AUC und die C_{min} von Flecainid signifikant sowohl nach Pearson als auch nach Spearman mit den DEX-Spiegeln und dem MQ DEX/3-MM (Tabelle 26). Ein ähnlicher Zusammenhang war auch bei den **hetEM** zu verzeichnen (Tabelle 28). Bei den **EM-Probanden** fanden sich dagegen keine signifikanten Korrelationen (Tabelle 27).

Tabelle 26: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp bei **allen Probanden** vor Flecainid-Einstellung

Gesamtgruppe vor Flecainideinstellung		
	AUC	C _{min}
DEX	rp = 0,720 * rsp = 0,674 *	rp = 0,785 ** rsp = 0,674 *
DTX		
3-MM		
3-HM		
MQ DEX/DTX		
MQ 3-MM/3-HM		
MQ DEX/3-MM	rp = 0,720 * rsp = 0,674 *	rp = 0,785 ** rsp = 0,674 *
MQ DTX/3-HM		
CYP2D6-MQ _{komb}		
CYP3A4-MQ _{komb}		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 11

Tabelle 27: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp beim **EM-Genotyp** des CYP2D6 vor Flecainid-Einstellung

EM-Gruppe vor Flecainideinstellung		
	AUC	Cmin
DEX		
DTX		
3-MM		
3-HM		
MQ DEX/DTX		
MQ 3-MM/3-HM		
MQ DEX/3-MM		
MQ DTX/3-HM		
CYP2D6-MQ _{komb}		
CYP3A4-MQ _{komb}		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 6

Tabelle 28: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp beim **hetEM-Genotyp** des CYP2D6 vor Flecainid-Einstellung

hetEM-Gruppe vor Flecainideinstellung		
	AUC	Cmin
DEX	rsp = 0,894 *	rp = 0,890 * rsp = 0,894 *
DTX		
3-MM		
3-HM		
MQ DEX/DTX		
MQ 3-MM/3-HM		
MQ DEX/3-MM	rsp = 0,894 *	rp = 0,890 * rsp = 0,894 *
MQ DTX/3-HM		
CYP2D6-MQ _{komb}		
CYP3A4-MQ _{komb}		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 5

5.5.2. Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp nach Flecainidgabe

Nach Flecainidgabe (Behandlungsphase) zeigte sich bei **Zusammenfassung beider Genotypen** eine signifikante Korrelation nach Pearson zwischen der Flecainid-AUC und dem MQ DTX/3-HM (Tabelle 29).

Eine signifikante Beziehung zwischen der AUC bzw. der Cmin von Flecainid und dem CYP2D6-MQ_{komb} wurde auch beim **Genotyp hetEM** beobachtet (Tabelle 31).

Beim **Genotyp EM** fanden sich dagegen auch nach Flecainidgabe keine signifikanten Korrelationen (Tabelle 30).

Tabelle 29: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp **aller Probanden** nach Flecainid-Einstellung

Gesamtgruppe nach Flecainideinstellung		
	AUC	Cmin
DEX		
DTX		
3-MM		
3-HM		
MQ DEX/DTX		
MQ 3-MM/3-HM		
MQ DEX/3-MM		
MQ DTX/3-HM	rp = 0,514 *	
CYP2D6-MQ _{komb}		
CYP3A4-MQ _{komb}		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 18

Tabelle 30: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp beim **EM-Genotyp** des CYP2D6 nach Flecainid-Einstellung

EM-Gruppe nach Flecainideinstellung		
	AUC	Cmin
DEX		
DTX		
3-MM		
3-HM		
MQ DEX/DTX		
MQ 3-MM/3-HM		
MQ DEX/3-MM		
MQ DTX/3-HM		
CYP2D6-MQ _{komb}		
CYP3A4-MQ _{komb}		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 11

Tabelle 31: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Dextromethorphan-Phänotyp beim **hetEM-Genotyp** des CYP2D6 nach Flecainid-Einstellung

hetEM-Gruppe nach Flecainideinstellung		
	AUC	Cmin
DEX		
DTX		
3-MM		
3-HM		
MQ DEX/DTX		
MQ 3-MM/3-HM		
MQ DEX/3-MM		
MQ DTX/3-HM		
CYP2D6-MQ _{komb}	rsp = 0,786 *	rsp = 0,786 *
CYP3A4-MQ _{komb}		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 7

5.6. Zusammenhang zwischen den Metaboliten und Metabolitenquotienten von Dextromethorphan bzw. den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern

5.6.1. Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern vor Flecainidgabe

Body-Mass-Index (BMI)

Bei der Zusammenfassung **beider Genotypen** zeigte sich vor Flecainidgabe (Kontrollphase) kein Zusammenhang zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI (Tabelle 32).

In der **EM-Gruppe** korrelierte der BMI negativ mit dem MQ DEX/DTX, dem MQ 3-MM/3-HM bzw. dem CYP2D6-MQ_{komb} (Tabelle 33).

Bei der **hetEM-Gruppe** zeigte sich ein signifikanter positiver Zusammenhang zwischen dem BMI und dem MQ 3-MM/3-HM (Tabelle 34).

Kreatinin-Clearance

Vor Flecainideinnahme korrelierte in der **Gesamtgruppe** und bei den Patienten mit **EM-Genotyp** die Kreatinin-Clearance sowohl nach Pearson als auch nach Spearman signifikant negativ mit dem MQ DTX/3-HM und dem CYP3A4-MQ_{komb} (Tabellen 32 und 33).

Beim **hetEM-Genotyp** korrelierte die Kreatinin-Clearance vor Flecainideinnahme nach Spearman mit 3-HM (positiv) und dem MQ 3-MM/3-HM (negativ) (Tabelle 34).

Laktatdehydrogenase (LDH)

Der Laborwert LDH zeigte nur beim **hetEM-Genotyp** in der Kontrollphase signifikante Zusammenhänge nach Spearman mit DEX, dem MQ DEX/DTX, dem MQ DEX/3-MM und dem CYP2D6-MQ_{komb} (Tabelle 34).

Bei der Zusammenfassung **beider Genotypen** und bei den **EM-Probanden** konnten dagegen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. den Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und LDH verzeichnet werden (Tabellen 32 und 33).

Alkalische Phosphatase (AP)

Bei den **Gesamtprobanden** fand sich in der Kontrollphase eine signifikante positive Korrelation nach Pearson zwischen den Werten der AP und den Serumkonzentrationen von 3-HM und DTX sowie ein negativer Zusammenhang mit dem MQ 3-MM/3-HM und dem CYP2D6-MQ_{komb}. Eine negative Korrelation zwischen der AP und dem MQ 3-MM/3-HM konnte auch nach Spearman ermittelt werden (Tabelle 32).

In der Gruppe der **EM-Probanden** zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der AP und der 3-HM-Konzentration nach Pearson sowie mit den DTX- und 3-HM-Werten nach Spearman. Die MQ DEX/DTX und 3-MM/3-HM und der CYP2D6-MQ_{komb} korrelierten nach Spearman dagegen negativ mit der AP (Tabelle 33).

Keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den DEX-Metaboliten bzw. -Metabolitenquotienten und der AP ergaben sich bei den **hetEM-Probanden** (Tabelle 34).

Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Gesamt-Bilirubin

In der Kontrollphase konnte keine signifikante Beziehung zwischen den Leberwerten und den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von DEX nachgewiesen werden.

Tabelle 32: Signifikante Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI, der Kreatinin (Krea)-Clearance und den Laborparametern LDH und AP bei **allen Probanden** vor Flecainideinstellung

Gesamtgruppe vor Flecainideinstellung				
	BMI	Krea-Clearance	LDH	AP
DEX				
DTX				rp = 0,933 *
3-MM				
3-HM				rp = 0,985 **
MQ DEX/DTX				
MQ 3-MM/3-HM				rp = -0,944 * rsp = -0,900 *
MQ DEX/3-MM				
MQ DTX/3-HM		rp = -0,645 * rsp = -0,655 *		
CYP2D6-MQ _{komb}				rp = -0,881 *
CYP3A4-MQ _{komb}		rp = -0,650 * rsp = -0,655 *		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 9 - 11

Tabelle 33: Signifikante Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI, der Kreatinin (Krea)-Clearance und den Laborparametern LDH und AP bei **EM-Probanden** des CYP2D6 vor Flecainideinstellung

EM-Gruppe vor Flecainideinstellung				
	BMI	Krea-Clearance	LDH	AP
DEX				
DTX				rsp = 0,943 **
3-MM				
3-HM				rp = 0,985 * rsp = 0,886 *
MQ DEX/DTX	rp = -0,891 *			rsp = -0,943 **
MQ 3-MM/3-HM	rp = -0,840 *			rsp = -0,886 *
MQ DEX/3-MM				
MQ DTX/3-HM		rp = -0,910 * rsp = -0,829 *		
CYP2D6-MQ_{komb}	rp = -0,887 *			rsp = -0,943 **
CYP3A4-MQ_{komb}		rp = -0,909 * rsp = -0,829 *		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 4 - 6

Tabelle 34: Signifikante Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI, der Kreatinin (Krea)-Clearance und den Laborparametern LDH und AP bei **hetEM-Probanden** des CYP2D6 vor Flecainideinstellung

hetEM-Gruppe vor Flecainideinstellung				
	BMI	Krea-Clearance	LDH	AP
DEX			rsp = 0,894 *	
DTX				
3-MM				
3-HM		rsp = 0,900 *		
MQ DEX/DTX			rsp = 0,900 *	
MQ 3-MM/3-HM	rp = 0,918 *	rsp = -0,900 *		
MQ DEX/3-MM			rsp = 0,894 *	
MQ DTX/3-HM				
CYP2D6-MQ_{komb}			rsp = 0,900 *	
CYP3A4-MQ_{komb}				

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 5

5.6.2. Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern nach Flecainidgabe

Body-Mass-Index (BMI)

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang nach Flecainidgabe zwischen dem BMI der **Gesamtprobanden** und DEX und dem MQ DEX/3-MM (Tabelle 35).

In der **EM-Gruppe** fand sich keine signifikante Korrelation (Tabelle 36).

Bei den **het-EM-Probanden** konnte nach Flecainidgabe eine signifikante Korrelation nach Pearson zwischen dem BMI und DEX, dem MQ DEX/DTX und dem CYP2D6-MQ_{komb} festgestellt werden (Tabelle 37).

Kreatinin-Clearance

In der Behandlungsphase ließ sich in der **Gesamtgruppe** und beim **EM-Genotyp** eine signifikante negative Korrelation zwischen der Kreatinin-Clearance und dem MQ 3-MM/3-HM darstellen (Tabellen 35 und 36).

Bei den **hetEM-Patienten** korrelierte nach Spearman die Kreatinin-Clearance nach Flecainideinnahme mit DEX und dem MQ DEX/3-MM ebenfalls negativ (Tabelle 37).

Laktatdehydrogenase (LDH)

Bei dem Laborwert LDH kam es zu signifikanten Korrelationen ($p \leq 0,05$) in der Behandlungsphase der **Gesamtprobanden** mit DEX, 3-MM, dem MQ DEX/DTX und dem CYP2D6-MQ_{komb} (Tabelle 35).

Bei getrennter Betrachtung der Genotypen zeigte sich beim **EM-Genotyp** nur eine signifikante Korrelation zwischen LDH und 3-MM (Tabelle 36).

In der **hetEM-Gruppe** ließen sich nach Flecainidgabe signifikante Zusammenhänge zwischen LDH und dem MQ 3-MM/3-HM sowie (negativ) zwischen dem MQ DTX/3-HM und dem CYP3A4-MQ_{komb} nachweisen (Tabelle 37).

Alkalische Phosphatase (AP)

Nach Flecainideinstellung konnte sowohl bei den **Gesamtprobanden** als auch bei den **hetEM-Patienten** kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Dextromethorphan-Metaboliten bzw. -Metabolitenquotienten und der AP festgestellt werden.

Bei den **EM-Probanden** fand sich dagegen eine signifikante Korrelation sowohl nach Pearson als auch nach Spearman mit dem MQ DTX/3-HM.

Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Gesamt-Bilirubin

In der Behandlungsphase zeigten sich bei den **Gesamtprobanden** signifikante Korrelationen zwischen der ASAT bzw. dem Gesamt-Bilirubin und der 3-MM-Konzentration im Serum sowie zwischen der ASAT, der ALAT, der GGT oder dem Gesamt-Bilirubin und dem MQ 3-MM/3-HM.

Bei den **EM-Probanden** korrelierte die ASAT signifikant mit DEX, 3-MM und dem MQ DEX/DTX sowie mit dem CYP2D6-MQ_{komb}. Ebenso fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Gesamt-Bilirubin und dem MQ DEX/3-MM.

Auch bei den **hetEM-Probanden** korrelierten die ASAT, die ALAT und das Gesamt-Bilirubin signifikant mit den 3-MM-Werten sowie die ASAT, die ALAT und die GGT mit dem MQ 3-MM/3-HM.

In den Tabellen 35 bis 37 sind stellvertretend die Korrelationen für die ASAT aufgeführt.

Tabelle 35: Signifikante Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI, der Kreatinin (Krea)-Clearance und den Laborparametern LDH und ASAT bei **allen Probanden** nach Flecainideinstellung

Gesamtgruppe nach Flecainideinstellung				
	BMI	Krea-Clearance	LDH	ASAT
DEX	rsp = 0,577 **		rp = 0,514 *	
DTX				
3-MM			rp = 0,505 * rsp = 0,494 *	rsp = 0,586 *
3-HM				
MQ DEX/DTX			rp = 0,498 *	
MQ 3-MM/3-HM		rp = -0,616 ** rsp = -0,498 *		rp = 0,989 **
MQ DEX/3-MM	rp = 0,466 * rsp = 0,634 **			
MQ DTX/3-HM				
CYP2D6-MQ _{komb}			rp = 0,471 *	
CYP3A4-MQ _{komb}				

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 16 - 19

Tabelle 36: Signifikante Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI, der Kreatinin (Krea)-Clearance und den Laborparametern LDH und ASAT bei **EM-Probanden** des CYP2D6 nach Flecainideinstellung

EM-Gruppe nach Flecainideinstellung				
	BMI	Kreatinin-Clearance	LDH	ASAT
DEX				rp = 0,814 **
DTX				
3-MM			rp = 0,580 *	rp = 0,797 **
3-HM				
MQ DEX/DTX				rp = 0,791 *
MQ 3-MM/3-HM		rp = -0,734 ** rsp = -0,629 *		
MQ DEX/3-MM				
MQ DTX/3-HM				
CYP2D6-MQ_{komb}				rp = 0,785 *
CYP3A4-MQ_{komb}				

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 9 - 12

Tabelle 37: Signifikante Korrelationen zwischen den Metaboliten bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan und dem BMI, der Kreatinin (Krea)-Clearance und den Laborparametern LDH und ASAT bei **hetEM-Probanden** des CYP2D6 nach Flecainideinstellung

hetEM-Gruppe nach Flecainideinstellung				
	BMI	Krea-Clearance	LDH	ASAT
DEX	rp = 0,764 *	rsp = -0,857 *		
DTX				
3-MM				rsp = 0,795 *
3-HM				
MQ DEX/DTX	rp = 0,908 *			
MQ 3-MM/3-HM			rsp = 0,929 **	rp = 0,997 **
MQ DEX/3-MM		rsp = -0,821 *		
MQ DTX/3-HM			rsp = -0,821 *	
CYP2D6-MQ_{komb}	rp = 0,852 *			
CYP3A4-MQ_{komb}			rsp = -0,786 *	

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 7

5.6.3. Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem Body-Mass-Index, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern

Body-Mass-Index (BMI)

Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem BMI der **Gesamtprobanden** und der C_{min} von Flecainid (Tabelle 38).

Bei getrennter Betrachtung der **EM-** und **hetEM-Genotypen** konnte dagegen keine signifikante Korrelation mehr ausgemacht werden.

Kreatinin-Clearance

In der **Gesamtgruppe** der Probanden und beim **EM-Genotyp** ließ sich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Kreatinin-Clearance und der Flecainid-AUC und -C_{min} darstellen (Tabellen 38 und 39).

Kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Kreatinin-Clearance und den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid konnten dagegen bei den **hetEM-Probanden** festgestellt werden (Tabelle 40).

Laktatdehydrogenase (LDH)

Sowohl bei den **Gesamtprobanden** als auch beim **EM-Genotyp**, nicht jedoch bei den **hetEM-Probanden**, zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der LDH und der AUC bzw. der C_{min} von Flecainid (Tabellen 38 bis 40).

Alkalische Phosphatase (AP)

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der AP und der AUC bzw. der C_{min} von Flecainid konnte nur bei den **Gesamtprobanden** verzeichnet werden, nicht jedoch nach Auftrennung der Patienten in den **EM- oder hetEM-Genotyp** (Tabellen 38 bis 40).

Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Gesamt-Bilirubin

Lediglich bei den **EM-Probanden** und auch nur für die ALAT und die AUC von Flecainid konnte eine signifikante Korrelation aufgezeigt werden. Bei den **Gesamtprobanden** und beim **hetEM-Genotyp** fand sich dagegen kein Zusammenhang zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und den Leberwerten.

Tabelle 38: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem BMI, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern bei **allen Probanden**

Gesamtgruppe		
	Flecainid-AUC	Flecainid-Cmin
BMI		rp = 0,477 *
Kreatinin-Clearance	rsp = -0,531 *	rp = -0,553 * rsp = -0,659 **
LDH	rp = 0,473 * rsp = 0,527 *	rp = 0,578 * rsp = 0,649 **
AP	rsp = 0,709 *	rsp = 0,648 *
ASAT		
ALAT		
GGT		
Gesamt-Bilirubin		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 15 - 18

Tabelle 39: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem BMI, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern bei **EM-Probanden** des CYP2D6

EM-Gruppe		
	Flecainid-AUC	Flecainid-Cmin
BMI		
Kreatinin-Clearance	rp = -0,605 * rsp = -0,636 *	rp = -0,796 ** rsp = -0,764 **
LDH	rsp = 0,700 *	rp = 0,734 * rsp = 0,782 **
AP		
ASAT		
ALAT	rp = 0,680 * rsp = 0,683 *	
GGT		
Gesamt-Bilirubin		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 8 - 11

Tabelle 40: Signifikante Korrelationen zwischen den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid und dem BMI, der Kreatinin-Clearance und verschiedenen Laborparametern bei **hetEM-Probanden** des CYP2D6 nach Flecainideinstellung

hetEM-Gruppe		
	Flecainid-AUC	Flecainid-Cmin
BMI		
Kreatinin-Clearance		
LDH		
AP		
ASAT		
ALAT		
GGT		
Gesamt-Bilirubin		

rp - Korrelation nach Pearson, rsp - Korrelation nach Spearman; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; n = 7

5.7. Mann-Whitney-Test

5.7.1. Unterschiede zwischen Extensive Metabolizern und heterozygoten Extensive Metabolizern in Bezug auf den Dextromethorphan-Metabolismus

In der Kontrollphase wurden signifikante Unterschiede zwischen hetEM und EM nur für den MQ DEX/DTX gefunden, bei den 3-HM- und DTX-Werten sowie bei dem MQ 3-MM/3-HM und dem CYP2D6-MQ_{komb} fand sich nur eine Tendenz ($p = 0,082$) zu unterschiedlichen Werten zwischen den beiden Genotypen. Demgegenüber zeigten sich in der Behandlungsphase keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen EM und hetEM im Dextromethorphan-Metabolismus. Insgesamt fanden sich ähnliche Ergebnisse wie nach den statistischen Berechnungen mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben (vgl. Kapitel 5.2.1., 5.2.2., 5.3.1. und 5.3.2.).

5.7.2. Einfluss des Cytochrom-P450-2C8-, -2C9- und -2C19-Genotyps auf die pharmakokinetischen Parameter von Flecainid

Es wurde zusätzlich der Einfluss des Genotyps bei den Enzymen CYP2C8, CYP2C9 und CYP2C19 auf die pharmakokinetischen Parameter von Flecainid (Cmin, AUC) untersucht. Hier konnten keine statistisch signifikanten Zusammenhänge verzeichnet werden.

5.7.3. Zusammenhang zwischen Cytochrom-P450-Genotyp und Laborparametern

Weiterhin wurde der Einfluss des CYP2D6-, des CYP2C8-, des CYP2C9- und des CYP2C19-Genotyps auf bestimmte Laborparameter (u.a. Leberwerte, Serum-Kreatinin, Blutbild, Thromboplastinzeit (Quick-Wert/INR) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)) untersucht. Hier konnten jedoch keine signifikanten Zusammenhänge gefunden werden.

5.8. Wilcoxon-Test

5.8.1. Zusammenhang zwischen EKG-Veränderungen und Flecainid-Gabe

Die Patienten bekamen jeweils vor und nach Flecainideinstellung ein EKG geschrieben. Hier wurden dann das QRS-Intervall und die QT-Zeit vor und nach Flecainideinstellung gemessen und eine statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Tests durchgeführt.

Es konnte eine signifikante ($p \leq 0,05$) Verlängerung des QRS-Intervalls und der QT-Zeit in der **Gesamtgruppe** der Patienten nach Flecainideinstellung festgestellt werden (Abbildung 18). Beim **EM-Genotyp** zeigte sich eine signifikante Zunahme des QRS-Intervalls, nicht jedoch der QT-Zeit, wohingegen bei den **hetEM-Probanden** die QT-Zeit signifikant verlängert war.

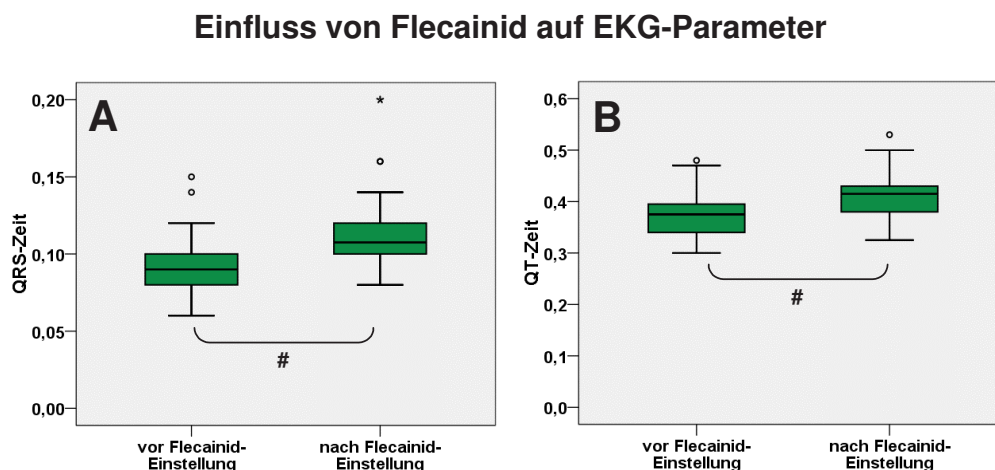


Abbildung 18: Einfluss von Flecainid auf die QRS-Zeit (A) und auf die QT-Zeit (B) bei den **Gesamtprobanden**. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 19; #: signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor und nach Flecainid-Einstellung ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Test).

5.8.2. Einfluss von Flecainid auf die Dextromethorphan-Metaboliten und deren Quotienten

In der **Gesamtgruppe** der Patienten fanden sich im Vergleich zu Kontrollphase nach Flecainideinstellung deutlich und signifikant erniedrigte Serumspiegel von 3-HM und DTX, wohingegen die DEX-Werte signifikant erhöht waren. Bei den Metabolitenquotienten erhöhten sich nach Flecainid-Gabe der MQ DEX/DTX, der MQ 3-MM/3-HM und der CYP2D6-MQ_{komb} signifikant. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch beim **EM-** und beim **hetEM-Genotyp** (Abbildungen 19, 20 und 21). Anders als in der Gesamtgruppe konnte hier bei DEX allerdings keine Signifikanz festgestellt werden, jedoch konnte bei den EM-Probanden zumindest eine Tendenz ($p = 0,080$) zu erhöhten DEX-Werten verzeichnet werden (Abbildung 19). In Abbildung 22 sind zusätzlich die individuellen CYP2D6-MQ_{komb}-Werte der einzelnen Probanden vor und nach Flecainid-Einstellung noch einmal vergleichend dargestellt.

Insgesamt konnten bei der statistischen Berechnung mit Hilfe des Wilcoxon-Tests mehr signifikante Unterschiede zwischen den Metaboliten und Metabolitenquotienten von DEX vor und nach Flecainideinstellung festgestellt werden als bei der Berechnung mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben (vergleiche Kapitel 5.3.3., 5.3.4. und 5.3.5.).

Sowohl in der Gesamtgruppe als auch bei den einzelnen Genotypen war in der Kontroll- und in der Behandlungsphase der CYP2D6-MQ_{komb} signifikant niedriger als der CYP3A4-MQ_{komb}.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich bei der Analyse aller Probanden die Serumkonzentration von DEX und die CYP2D6-vermittelten Metabolitenquotienten unter Flecainidgabe erhöhten und die Serumkonzentrationen von DTX und 3-HM verminderten. Betrachtet man die verschiedenen Genotypen einzeln, waren ähnliche Signifikanzen auffällig. Dies bedeutet, dass Flecainid den Abbauweg von DEX über CYP2D6 hemmt.

Dextromethorphan und seine Metaboliten vor und nach Flecainideinstellung

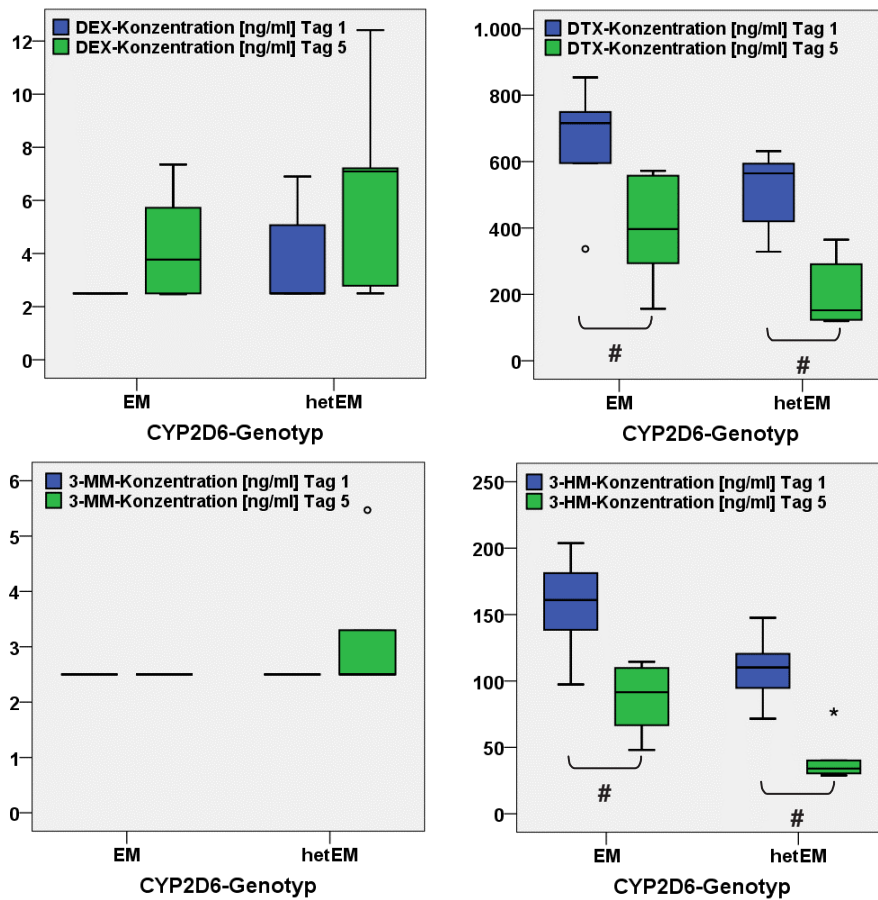


Abbildung 19: Konzentration (ng/ml) von DEX und seinen Metaboliten im Serum der Probanden vor und nach Flecainideinstellung bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 6 (EM) bzw. 5 (hetEM); #: signifikanter Unterschied zwischen den Serumkonzentrationen vor und nach Flecainideinstellung ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Test).

Metabolitenquotienten vor und nach Flecainideinstellung

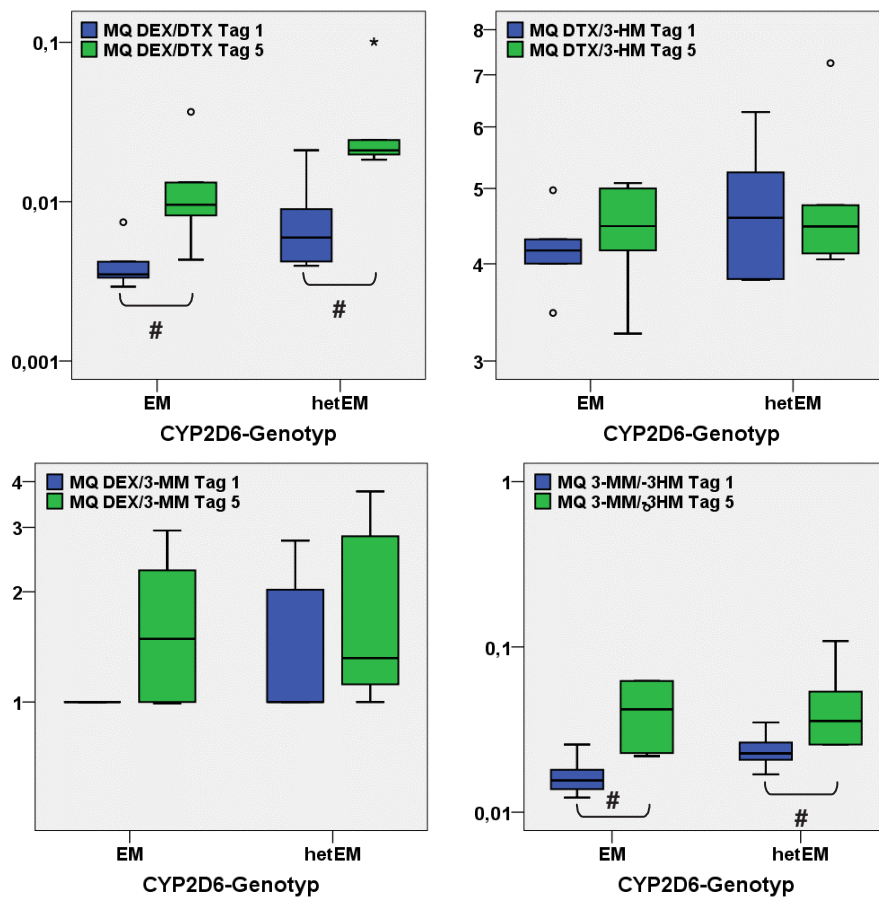


Abbildung 20: Metabolitenquotienten (MQ) von DEX vor und nach Flecainideinstellung bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 6 (EM) bzw. 5 (hetEM); #: signifikanter Unterschied zwischen EM und hetEM ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Test).

Kombinierte Metabolitenquotienten vor und nach Flecainideinstellung

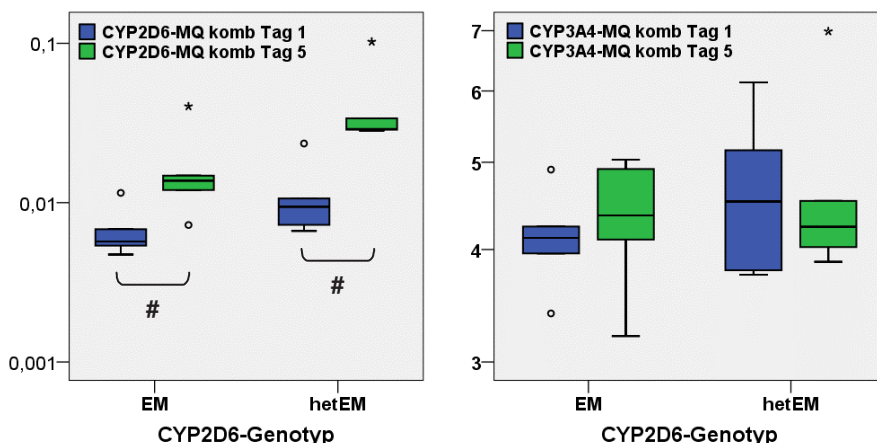


Abbildung 21: Kombinierte Metabolitenquotienten (MQ) von DEX vor und nach Flecainideinstellung bei CYP2D6-EM und -hetEM. Angegeben ist der Median, das obere und untere Quartil, der Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer; n = 6 (EM) bzw. 5 (hetEM); #: signifikanter Unterschied zwischen EM und hetEM ($p \leq 0,05$; Wilcoxon-Test).

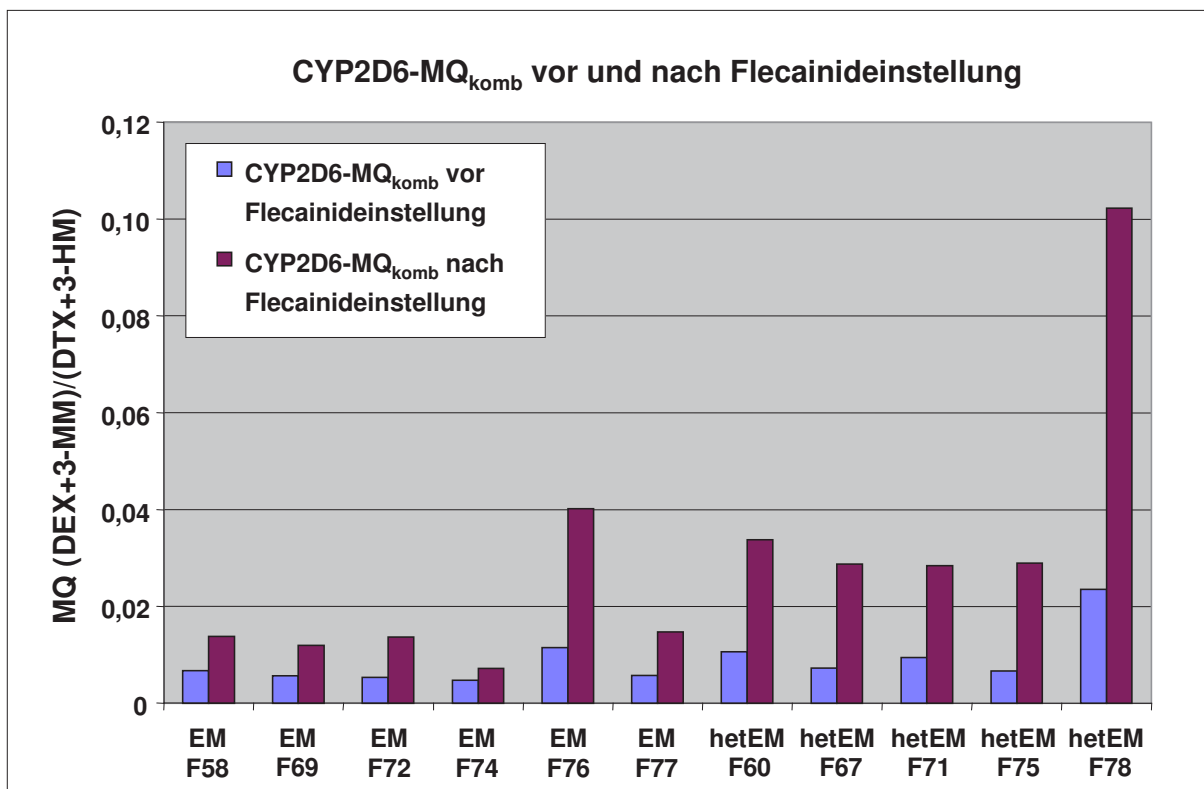


Abbildung 22: Individuelle CYP2D6-MQ_{komb} der einzelnen Probanden vor und nach Flecainideinstellung.

5.9. In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Flecainid auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450

Der Einfluss von Flecainid auf die Monooxygenasefunktion des CYP wurde anhand verschiedener Modellreaktionen für unterschiedliche CYP-Isoformen ermittelt. Zur Verwendung kamen menschliche Leberproben sowie Rattenlebern.

Signifikante Unterschiede wurden durch einen gepaarten t-Test nach Student mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ ermittelt.

In den Abbildungen sind die arithmetischen Mittelwerte ($n = 6$) dargestellt. Signifikant unterschiedliche Werte ($p \leq 0,05$) zu den entsprechenden Werten der Kontrollkurve wurden mit einem Sternchen gekennzeichnet.

5.9.1. Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Flecainid hemmte die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD) in der Menschen- sowie in der Rattenleber in den Konzentrationen 0,1 mM und 1 mM. Der Substratumsatz sank bei menschlicher Leber bei der höchsten Ethoxyresorufinkonzentration um etwa 20% bei 0,1 mM und um ca. 48% bei 1 mM Flecainid. Ähnlich war es bei der Rattenleber. Hier sank der Substratumsatz um 12% bei 0,1 mM und um 44% bei 1 mM Flecainid (Abbildung 23). Der Hemmtyp war kompetitiv, da die Kurven in der Lineweaver-Burk-Darstellung auf der y-Achse zusammenlaufen (Abbildung 24).

5.9.2. Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Abbildung 25 verdeutlicht die Wirkung von Flecainid auf unterschiedliche Konzentrationen von 7-Ethoxycoumarin. Hier zeigte sich, dass Flecainid die CYP-Subtypen 1A, 2A, 2B und 2C kompetitiv hemmt. Bei beiden Spezies wurde die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) in den Lebern erst ab einer Konzentration von 1 mM Flecainid kompetitiv gehemmt. Der Substratumsatz bei der höchsten Konzentration von Ethoxycoumarin sank bei den Menschenleberproben nur um 6%. Im Gegensatz hierzu war bei Rattenlebern der Substratumsatz bei der höchsten Ethoxycoumarinkonzentration um 29% vermindert (Abbildungen 25 und 26).

5.9.3. Ethylmorphin-N-Demethylierung

Das bei dieser Modellreaktion entstehende Formaldehyd gibt vorwiegend Auskunft über die Aktivität des CYP3A4. Während Flecainid die Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND) bei der Rattenleber nur bei einer Konzentration von 1 mM signifikant kompetitiv hemmte, geschah dies bei der Menschenleber schon bei 0,1 mM. Der Substratumsatz sank bei den menschlichen Leberproben bei der höchsten Ethylmorphinkonzentration um 37% bei 1 mM und um 6% bei 0,1 mM Flecainid. Bei der Rattenleber sank der Umsatz um 27% (Abbildungen 27 und 28).

5.9.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der in-vitro-Untersuchungen

Die EROD, ECOD und EMND gelten als Modellreaktionen für die Monooxygenasefunktion der CYP-Familien 1A, 2A, 2B, 2C und 3A. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Flecainid diese nur in den Konzentrationen von 0,1 und 1 mM signifikant hemmte. Der Referenzbereich für Flecainid wird bis maximal 1000 ng/ml (1 mg/l) angegeben (Fachinformation Tambocor[®], 3M Medica, Neuss, Deutschland). Da das Molekulargewicht von Flecainid 474,4 g/mol (474,4 mg/mmol) beträgt, wäre die Konzentration von Flecainid bei 0,1 mM 47,44 mg/l. Dies ist aber mehr als 40-mal höher als die Konzentration, die im medizinischen Alltag erreicht wird. Der Hemmtyp war stets kompetitiv.

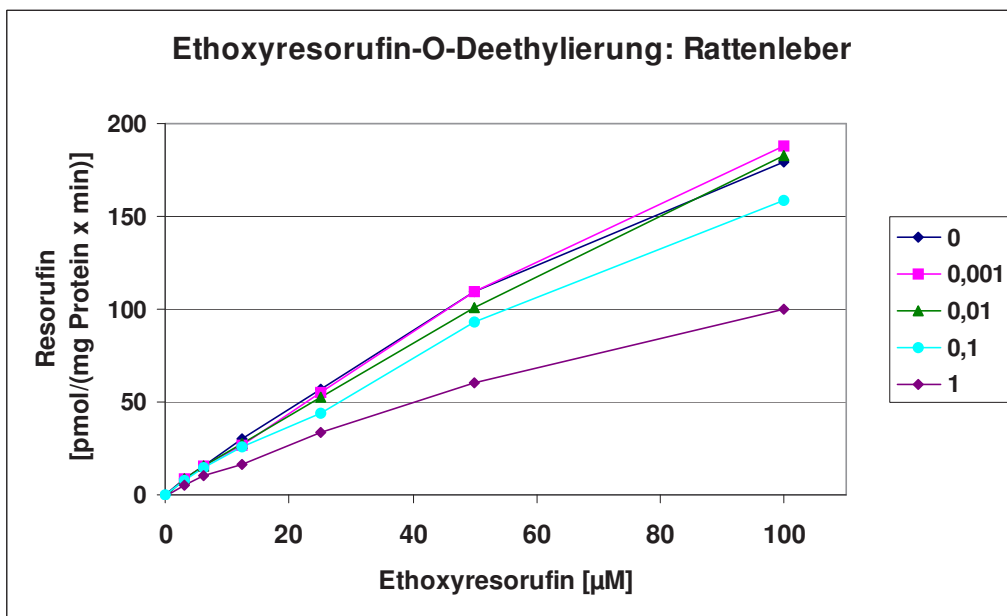
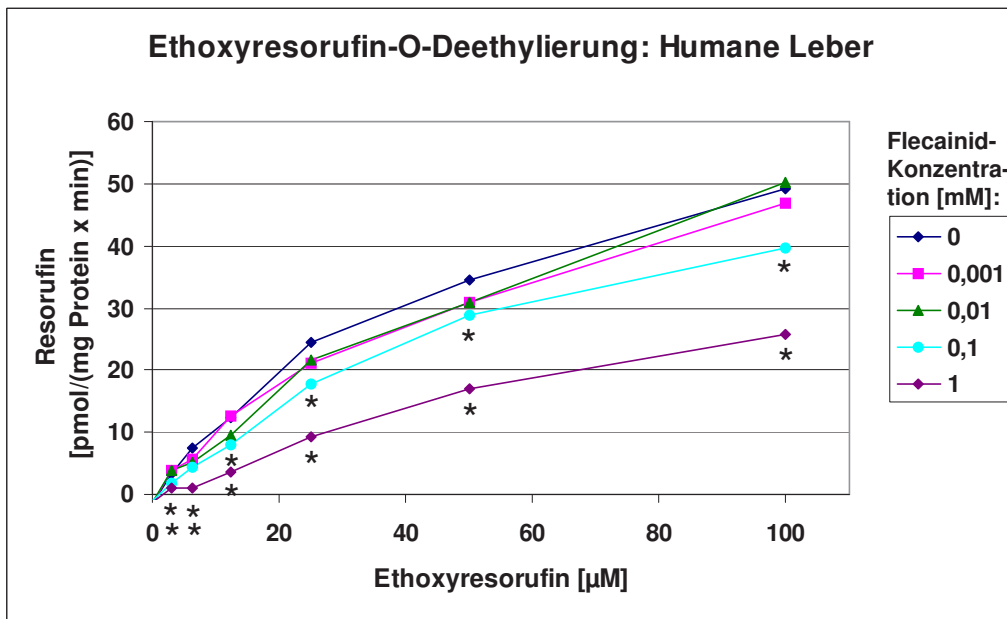


Abbildung 23: Einfluss verschiedener Flecainid-Konzentrationen auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung in 9000g-Überständen von humaner Leber (oben) und Rattenleber (unten). Michaelis-Menten-Darstellung. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert (Flecainid-Konzentration = 0).

Lineweaver-Burk-Darstellung

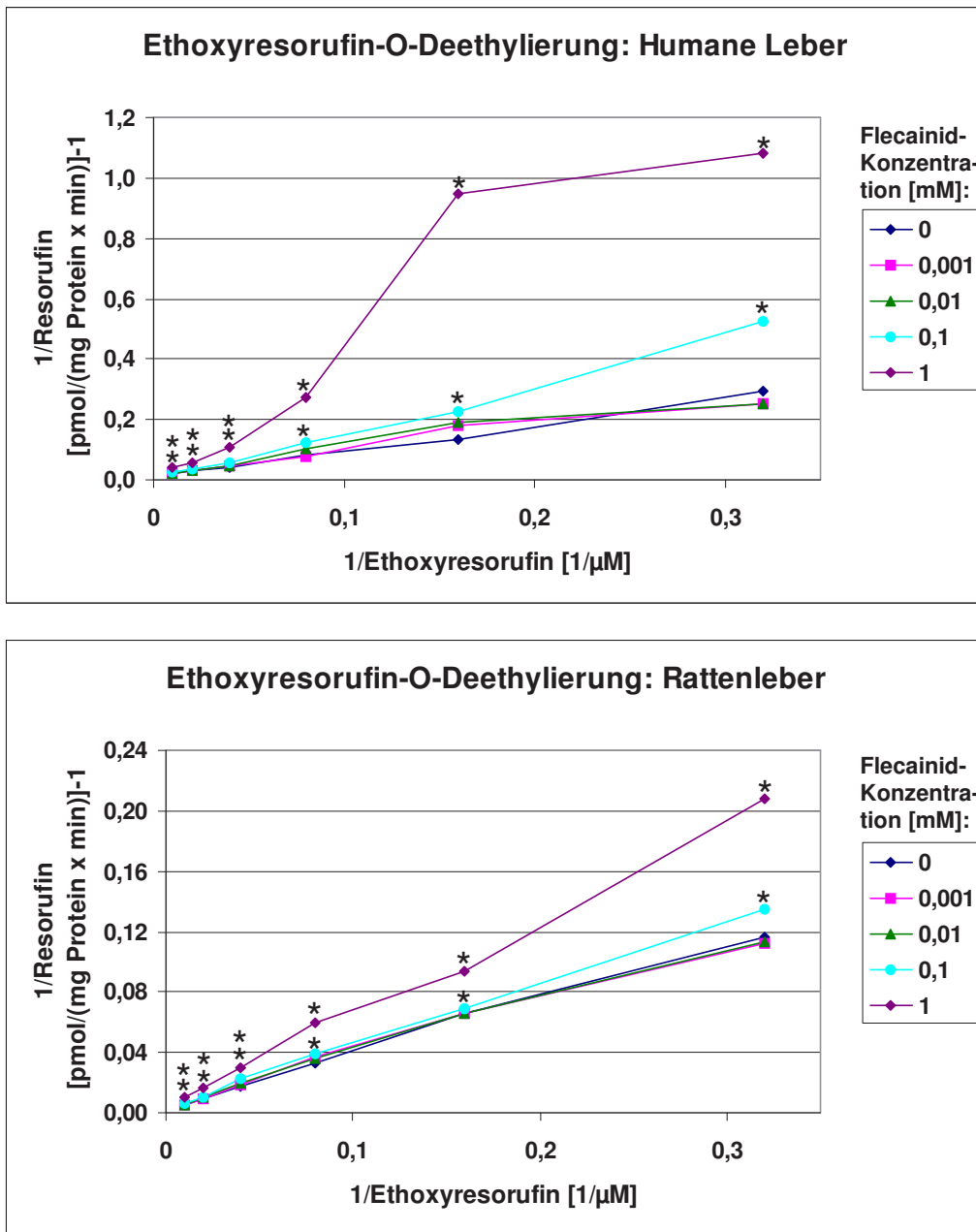


Abbildung 24: Einfluss verschiedener Flecainid-Konzentrationen auf die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung in 9000g-Überständen von humaner Leber (oben) und Rattenleber (unten).

Lineweaver-Burk-Darstellung. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert (Flecainid-Konzentration = 0).

Michaelis-Menten-Darstellung

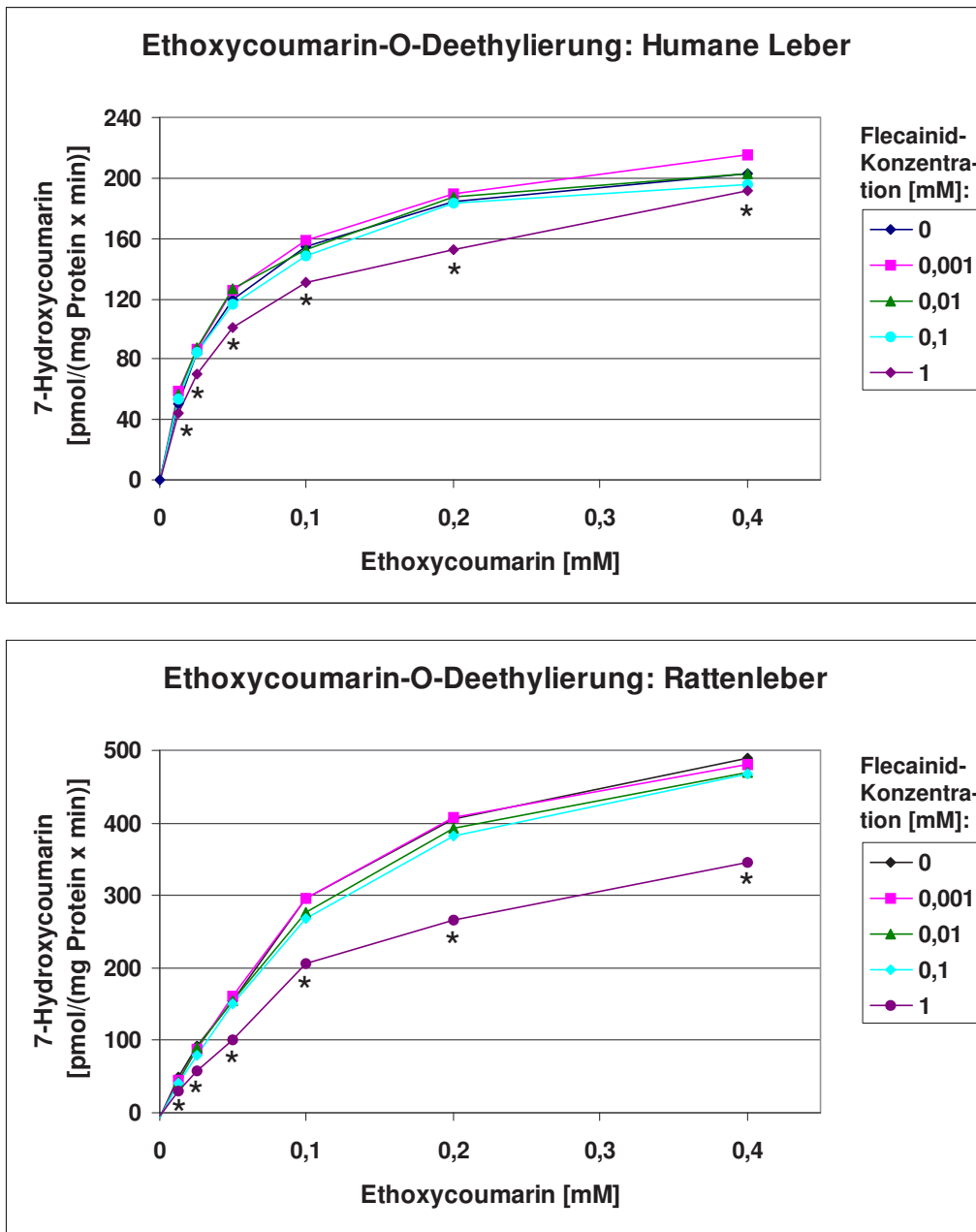


Abbildung 25: Einfluss verschiedener Flecainid-Konzentrationen auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung in 9000g-Überständen von humaner Leber (oben) und Rattenleber (unten).

Michaelis-Menten-Darstellung. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert (Flecainid-Konzentration = 0).

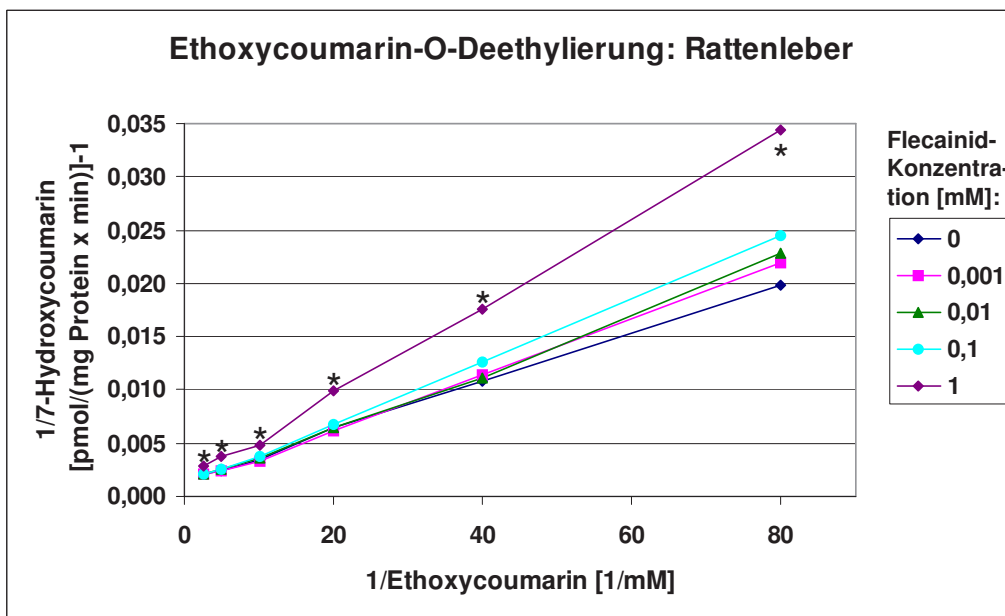
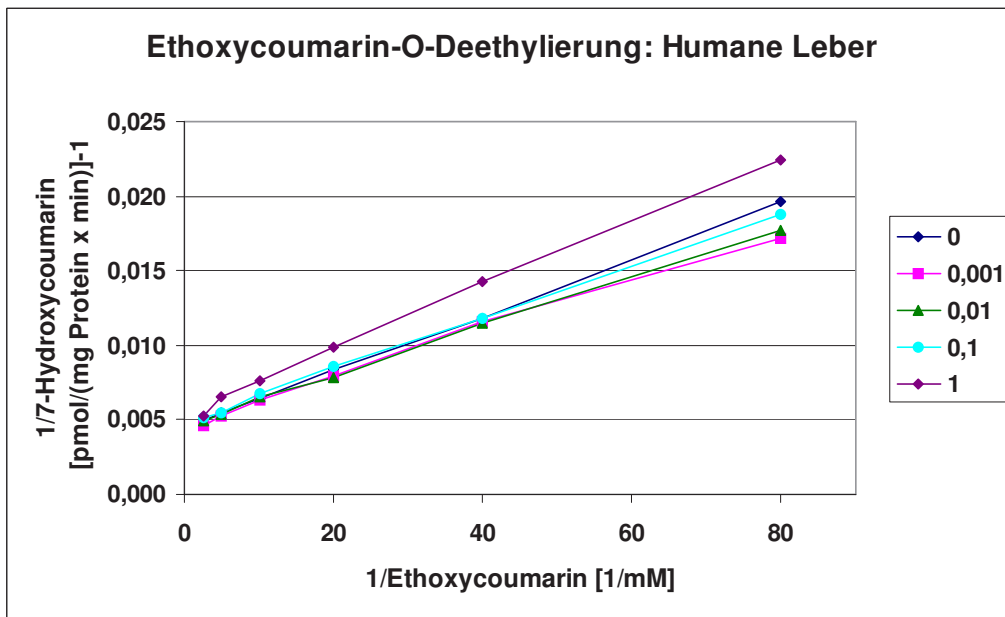


Abbildung 26: Einfluss verschiedener Flecainid-Konzentrationen auf die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung in 9000g-Überständen von humaner Leber (oben) und Rattenleber (unten). Lineweaver-Burk-Darstellung. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert (Flecainid-Konzentration = 0).

Michaelis-Menten-Darstellung

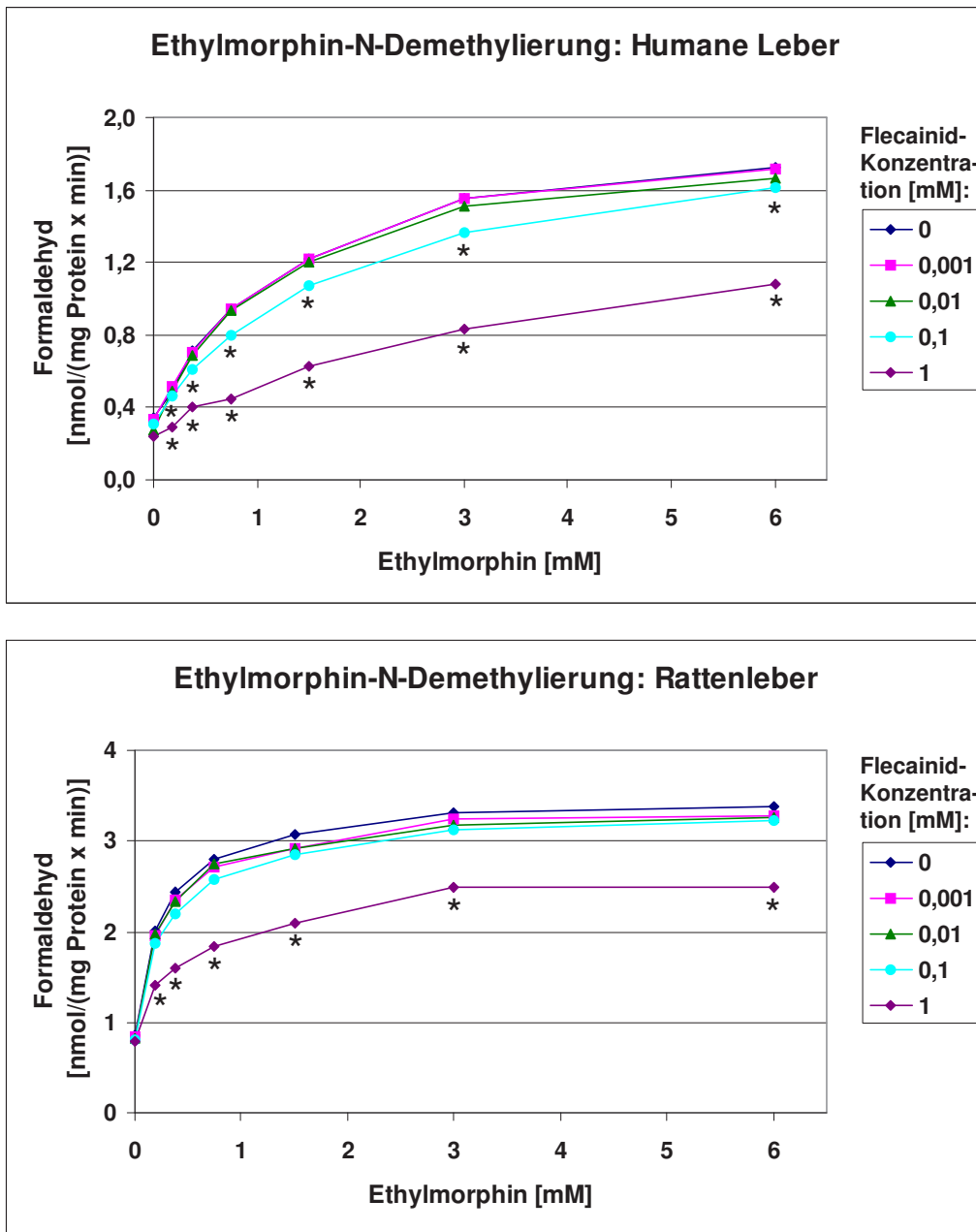


Abbildung 27: Einfluss verschiedener Flecainid-Konzentrationen auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung in 9000g-Überständen von humaner Leber (oben) und Rattenleber (unten).

Michaelis-Menten-Darstellung. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert (Flecainid-Konzentration = 0).

Lineweaver-Burk-Darstellung

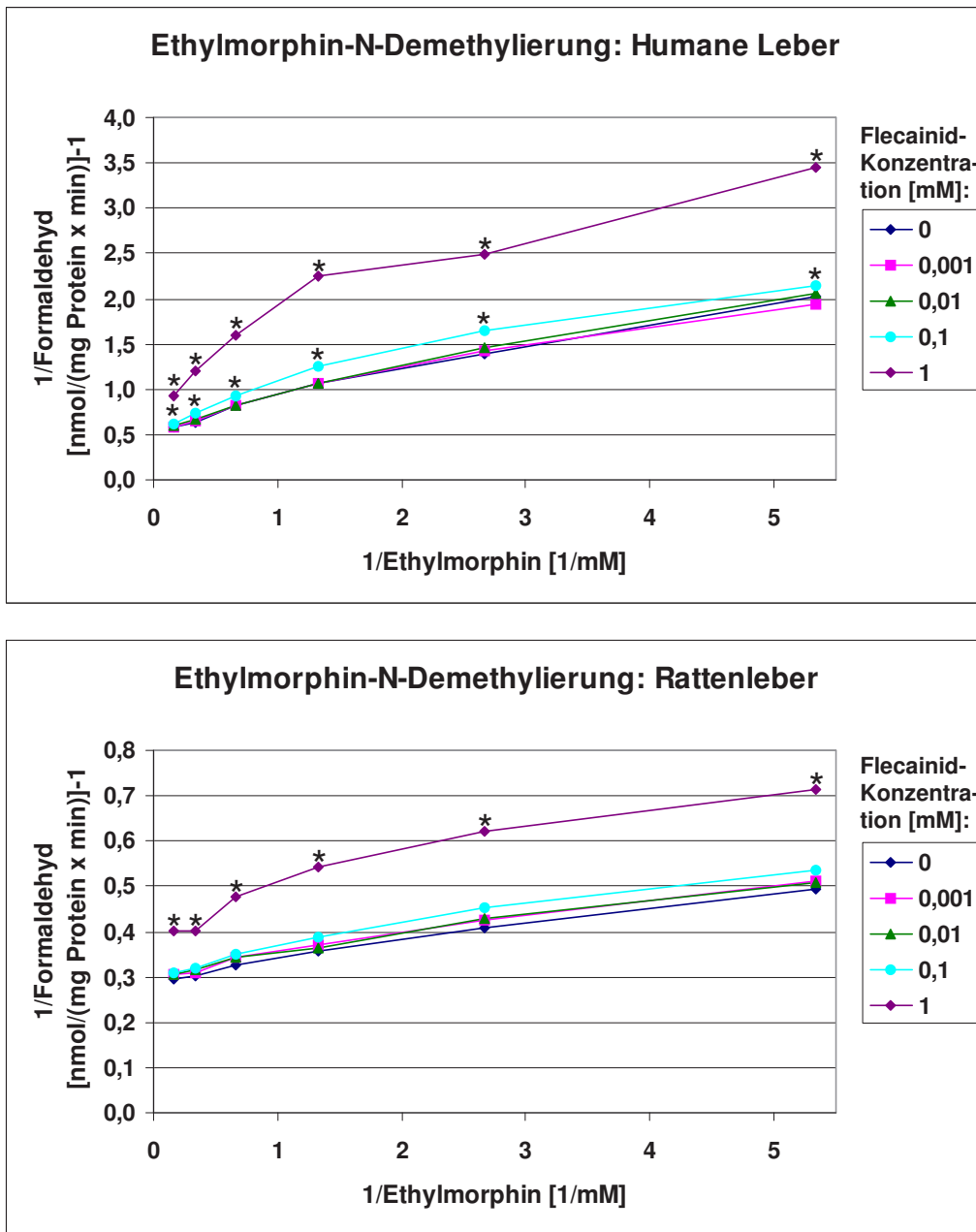


Abbildung 28: Einfluss verschiedener Flecainid-Konzentrationen auf die Ethylmorphin-N-Demethylierung in 9000g-Überständen von humaner Leber (oben) und Rattenleber (unten).

Lineweaver-Burk-Darstellung. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte; *: signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) im Vergleich zum entsprechenden Kontrollwert (Flecainid-Konzentration = 0).

6. Diskussion

Flecainid kann unter bestimmten Voraussetzungen einen erhöhten, in den toxischen Bereich gehenden Plasmaspiegel bei verschiedenen Patienten haben (Auzinger und Scheinkestel 2001). Einerseits spielt hier der Genotyp, andererseits aber auch eine Interaktion mit anderen Pharmaka, die über das Enzym CYP2D6 abgebaut werden, eine Rolle. Besonders β -Blocker (z.B. Metoprolol), Opioide (z.B. Morphin, Dextromethorphan), Neuroleptika (z.B. Haloperidol), Antidepressiva (z.B. Paroxetin) und andere Antiarrhythmika werden über dieses Enzym abgebaut. Fast jeder Patient bekommt heutzutage als Co-Medikation einen β -Blocker verabreicht, da dieser die proarrhythmischen Effekte von Flecainid reduziert (Vaughan Williams 1991). Ebenfalls nimmt die Anzahl der diagnostizierten Depressionen und somit die Verschreibungshäufigkeit von Antidepressiva zu. Diese Interaktionen sind in der aktuellen Fachinformation von Tambocor[®] als möglich ausgewiesen. Viele Antidepressiva, die teilweise als CYP2D6-Inhibitoren wirken (Amitriptylin, Desipramin, Fluvoxamin, Fluoxetin u.a.), können so zu einem erhöhten Plasmaspiegel von Flecainid führen (Fachinformation Tambocor[®], 3M Medica, Neuss, Deutschland). Deswegen sollten mögliche Interaktionen vor einer Therapie bedacht werden. Ein starker Inhibitor des CYP2D6 ist Cinacalcet (Mimpara[®]), welches zur Therapie des sekundären Hyperparathyreodismus eingesetzt wird (Padhi und Harris 2009). Hier sollte eine Dosisanpassung erfolgen.

Die Hemmung von CYP2D6 wurde im ersten Teil der Arbeit *in vivo* an Patienten untersucht. Außerdem wurde analysiert, ob der Genotyp der CYP-Enzyme 2C8, 2C9 oder 2C19 einen Einfluss auf die Flecainidserumkonzentration hat. Hierzu wurden die Patienten auf Mutationen der oben genannten CYP-Enzyme hin getestet. Beim CYP2C8 waren bis auf einen Patienten, welcher hetEM war, alle anderen EM. Das CYP2C9 wurde auf zwei verschiedene Mutationen, CYP2C9*2 und CYP2C9*3, hin untersucht. Unter allen Patienten fanden sich nur 2 hetEM. Der Rest war EM. Ein PM-Proband konnte bei der Analyse des CYP2C19 gefunden werden. Allerdings konnten keine Zusammenhänge zwischen diesen letztgenannten CYP-Isoformen und deren Mutationen und dem Flecainidstoffwechsel festgestellt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit galt es zu klären ob, und wenn ja, bei welcher Konzentration andere CYP-Enzyme durch Flecainid gehemmt werden können. Hierzu wurde der Einfluss von Flecainid auf die CYP-Modellreaktionen ECOD, EROD und EMND untersucht, welche

die CYP-Unterfamilien 1A, 2A, 2B, 2C und 3A charakterisieren. Diese CYP-Unterfamilien haben für die Metabolisierung von Fremdstoffen die größte Bedeutung.

6.1. Genotypisierung des Cytochrom P450 2D6

Neben dem intakten Wildtyp-Allel wurden bei den untersuchten Probanden die Mutationen CYP2D6*3, CYP2D6*4 und CYP2D6*6 festgestellt. Als häufigste Allelmutation unter Kaukasiern gilt CYP2D6*4 (Sachse et al. 1997). Bei 5 Patienten trat CYP2D6*4 zusammen mit einem Wildtyp-Allel auf und bedingte so die Mehrzahl der hetEM-Genotypen (5 von 7 Patienten). Weitere Kombinationen waren CYP2D6*3/wt (1 Patient) und CYP2D6*6/wt (1 Patient).

Die Patienten wurden auch auf die Mutation CYP2D6*5 hin untersucht. Bei homozygotem Vorliegen dieser Mutation kommt es zur Manifestation eines PM-Phänotyps, d.h. es liegt kein Enzym vor. In der vorliegenden Untersuchung war diese Mutation in keinem Fall, weder heterozygot noch homozygot, festzustellen.

Eine Untersuchung auf einen UM-Genotyp hin wurde nicht vorgenommen, da dieser sehr selten in der kaukasischen Bevölkerung vorkommt. Es ist daher möglich, dass ein Proband (F76) als EM-Genotyp eingestuft wurde, tatsächlich aber einen UM-Genotyp besitzt.

Neben den CYP2D6-Null-Allelen (wie die oben beschriebenen und in unserer Studie untersuchten wichtigsten Allele CYP2D6*3, *4, *5, *6) wurden zuletzt weitere Mutationen beschrieben, die zu einer eingeschränkten Enzymaktivität führen können (wie z.B. CYP2D6*41; Raimundo et al. 2004, Toscano et al. 2006, Abduljalil et al. 2010). Diesbezügliche Analysetechniken standen zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht zur Verfügung.

6.2. Zusammenhang zwischen Cytochrom-P450-2D6-Genotyp und Serumkonzentration bzw. Metabolitenquotienten von Dextromethorphan vor Flecainideinstellung

Trotz zuverlässiger Verfahren zur Genotypisierung spielt die Phänotypisierung mittels der Messung des Metabolismus von Dextromethorphan immer noch eine wichtige Rolle (Jacqz-Aigrain et al. 1993, Köhler et al. 1997). Als Aktivitätsmarker für das Enzym CYP2D6 dienen der Quotient von Dextromethorphan (DEX) und dem O-demethylierten Metabolit

Dextrorphan (DTX) sowie der kombinierte Quotient. Der alternative, in der Regel weniger bedeutsame, Abbauweg von DEX durch eine N-Demethylierung zu 3-Methoxymorphinan (3-MM) wird hauptsächlich über das Enzym CYP3A4 katalysiert. Auch eine Beteiligung anderer Cytochrome an dieser Reaktion wurde vermutet (von Moltke et al. 1998, Wang und Unadkat 1999), trotzdem gilt die Bestimmung des MQ DEX/3-MM als ein Maß für die Aktivität des CYP3A4 (Jones et al. 1996 a und b). Die Konzentrationsmessungen von DEX und seinen Metaboliten können entweder im Urin (Schmid et al. 1985) oder im Serum (Mortimer et al. 1989) erfolgen, wobei beide Verfahren qualitativ gleichwertig sind (Chladek et al. 2000). Da die interindividuellen Variabilitäten in den molaren Konzentrationen im Serum geringer sind als im Urin (Köhler et al. 1997), wurden in dieser Arbeit die Konzentrationsbestimmungen im Serum durchgeführt.

Eine exakte genetische Differenzierung zwischen EM- und hetEM-Genotyp ist anhand der funktionellen Allele möglich, die tatsächliche metabolische Kapazität des CYP2D6 kann jedoch nicht genau vorhergesagt werden. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im MQ DEX/DTX zwischen den Probanden mit EM- und hetEM-Genotyp aufgezeigt werden, obwohl dieser MQ bei Probanden mit EM-Genotyp im Mittel niedriger war. Jedoch lagen einige hetEM-Probanden auf dem Niveau der Werte der EM. Ein hetEM-Proband (F78) hatte einen deutlich höheren MQ DEX/DTX, obwohl er nicht als PM eingestuft wurde. Da ein hoher Anteil der hetEM durch ein heterozygoten Vorkommen von CYP2D6*4 bedingt ist, müssen Unterschiede in der Aktivität der Wildtypallele vorhanden sein. Es gibt Studien, die die Aktivität des CYP2D6*1 höher einstufen als die des CYP2D6*2 (Sachse et al. 1997), was ein Grund für die in der vorliegenden Studie beobachteten Ergebnisse sein könnte. Es ist auch heutzutage nicht möglich, sowohl aufgrund der Vielzahl der bereits bekannten, aber auch aufgrund der noch nicht entdeckten Mutationen, eine exakte und kostengünstige Analyse der verschiedenen Genotypen durchzuführen. Eine genaue Bestimmung der Metabolisierungskapazität von CYP2D6 ist aber notwendig, besonders bei einer Behandlung mit Medikamenten, die eine geringe therapeutische Breite besitzen. Hier empfiehlt sich die schnellere und kostengünstigere Phänotypisierung zur Beurteilung der metabolischen Aktivität des Enzyms.

Bei Probanden, die genotypisch als hetEM eingestuft wurden, fanden sich tendenziell niedrigere DTX- und signifikant geringere 3-HM-Konzentrationen im Vergleich zu EM (Tabelle 16), was ein Beweis für die eingeschränkte metabolische Kapazität der hetEM- im Vergleich zu den EM-Genotypen ist. Bei beiden Genotypen waren die DEX- und 3-MM-Konzentrationen meist so niedrig, dass sie unter der Nachweisgrenze von 5 ng/ml lagen. Diese

Werte wurden alle mit einer Konzentration von 2,5 ng/ml angegeben. Deshalb ist ein genauer Vergleich nicht möglich.

Es konnte gezeigt werden, dass der Hauptabbauweg des DEX die O-Demethylierung zu DTX, welche über CYP2D6 vermittelt wird, ist. Innerhalb von 2 Stunden nach oraler Applikation wird der maximale Plasmaspiegel an DTX erreicht (Hustenstiller-ratiopharm[®], Fachinformation, 1998), weshalb die Ausgangssubstanz DEX kaum nachzuweisen ist. Die Serumkonzentration von 3-MM, welches aus DEX über CYP3A4 gebildet wird, war stets an der unteren Nachweisgrenze. Dies lässt vermuten, dass entweder wenig über diesen Abbauweg metabolisiert und/oder das 3-MM sofort über CYP2D6 in 3-HM, welches hohe Serumkonzentrationen aufwies, umgewandelt wird. Auch der kombinierte MQ, welcher die Aktivität des Enzyms CYP2D6 anzeigt, war signifikant niedriger als der kombinierte MQ, welcher für die Aktivität von CYP3A4 steht.

Betrachtet man jetzt den MQ DEX/3-MM sowie den kombinierten MQ CYP3A4_{komb}, die das Enzym CYP3A4 repräsentieren, so müssten diese kompensatorisch bei den hetEM-Genotypen niedriger sein, aufgrund der geringeren Aktivität des CYP2D6-Enzyms. Es ist zwar schwierig, eine Aussage hierzu zu treffen, da die Werte im unteren Bestimmungsbereich liegen, jedoch waren in diesem Fall die MQ's der hetEM höher als die der EM (Tabellen 20 und 21). Somit ließ sich kein Kompensationsmechanismus des CYP3A4 bei den hetEM-Probanden nachweisen. Die Ursache könnte sein, dass bei den hetEM-Probanden die metabolische Kapazität des CYP2D6 noch nicht voll ausgeschöpft ist. Um diese Problematik genauer beurteilen zu können, müsste man Probanden mit PM-Genotyp untersuchen und prüfen, ob hier ein Kompensationsmechanismus vorliegt. Es konnte aber tendenziell ein hemmender Einfluss des Flecainids auf die CYP2D6-Aktivität aufgezeigt werden.

6.3. Veränderung verschiedener Parameter nach Einnahme von Flecainid

6.3.1. EKG-Veränderungen

Nach Einnahme von Flecainid verlängerten sich die QRS- und die QT-Zeiten der Probanden signifikant, was auch in anderen Studien beobachtet werden konnte (Salerno et al. 1986, Boriani et al. 1993, Padrini et al. 1993, Funck-Brentano et al. 1994, Ohmura et al. 2000). Bei einer separaten Betrachtung der beiden Genotyp-Gruppen war die QRS-Zeit bei den EM- und

die QT-Zeit bei den hetEM-Probanden signifikant verlängert. Dies deutet auf einen Einfluss von Flecainid auf die Erregungsausbreitung im Myokard hin.

6.3.2. Einfluss von Flecainid auf den Dextromethorphanabbau

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für abhängige Variablen wurde zusätzlich zum gepaarten t-Test noch einmal der Einfluss einer Flecainideinnahme auf die Konzentration der DEX-Metaboliten, sowie die Metabolitenquotienten untersucht. Die Metaboliten DTX und 3-HM waren nach Flecainideinnahme signifikant niedriger.

Nach Flecainideinnahme änderten sich auch die Metabolitenquotienten. So zeigten sich signifikant höhere CYP2D6-abhängige DEX/DTX- und 3-MM/3-HM-Metabolitenquotienten nach Flecainid-Gabe sowohl in der Gesamtgruppe als auch bei Betrachtung der einzelnen Genotypen. Der CYP2D6-MQ_{komb} war signifikant höher nach Flecainideinnahme und somit die CYP2D6-Aktivität vermindert. Der Vergleich der beiden kombinierten MQ miteinander zeigte, wie auch vor Flecainideinnahme, signifikant niedrigere Werte für den CYP2D6- als für den CYP3A4-vermittelten MQ_{komb} sowohl in der Gesamtgruppe als auch bei beiden Genotyp-Gruppen, entsprechend der offensichtlich nach wie vor höheren Enzymaktivität des CYP2D6. Die Ergebnisse der Untersuchung weisen auf einen, durch Flecainid verursachten, stark verminderten DEX-Abbau über CYP2D6 hin, über das aber immer noch DEX hauptsächlich metabolisiert wird. Die MQ's, die für das Enzym CYP3A4 stehen (der MQ DEX/3-MM, DTX/3-HM und der kombinierte CYP3A4-MQ) wiesen vor und nach Flecainidgabe keine signifikanten Unterschiede auf. Aufgrund der methodologisch kaum nachzuweisenden 3-MM-Konzentrationen ist es schwer zu sagen, ob eine Kompensation zu Gunsten des Enzyms CYP3A4 stattgefunden hat. Es bleibt aber festzustellen, dass, wie schon vorher beschrieben (Martinez-Sellés et al. 2005), infolge therapeutischer Dosen an Flecainid die genotypisch als EM charakterisierten Probanden jetzt phänotypisch eher als hetEM erscheinen. Es zeigte sich deutlich, dass nach Flecainidgabe beim EM-Genotyp die DEX- und 3-MM-Konzentrationen über und die DTX- und 3-HM-Konzentrationen unter den Werten der hetEM-Gruppe vor Flecainidgabe lagen (Tabellen 16 und 17). Ähnlich verhielt es sich auch bei den Metabolitenquotienten (Tabellen 20 und 21). Dies beweist noch einmal, dass eine Hemmung des CYP2D6 und eventuell auch des CYP3A4 durch Flecainid stattgefunden hat und sich somit der Phänotyp von EM zu hetEM und von hetEM zu PM verlagert hat.

6.4. Einfluss des Cytochrom-P450-2D6-Geno- und Phänotyps auf die Pharmakokinetik von Flecainid in vivo

Es zeigte sich, dass die pharmakokinetischen Parameter von Flecainid sich in Abhängigkeit vom CYP2D6-Genotyp unterscheiden. Insgesamt zeigte sich, dass die CYP2D6-Enzymaktivität negativ mit den AUC- und C_{min}-Werten von Flecainid korreliert.

Es traten signifikante lineare Korrelationen nach Pearson sowie nicht lineare Korrelationen nach Spearman zwischen AUC bzw. C_{min} von Flecainid und Dextromethorphan bzw. seinen Metaboliten oder Metabolitenquotienten in der Kontroll- und Behandlungsphase mit Flecainid auf. Diese fanden sich in der Kontrollphase bei den Gesamtprobanden und hetEM (nicht jedoch bei den EM allein) für DEX und den MQ DEX/3-MM, welcher für das Enzym CYP3A4 steht, und in der Behandlungsphase bei den Gesamtprobanden für den MQ DTX/3-HM und bei den hetEM für den CYP2D6-MQ_{komb}. Dies zeigt, dass ein Zusammenhang zwischen dem Dextromethorphan-Metabolismus und den pharmakokinetischen Parametern von Flecainid vorhanden ist. Beide werden normalerweise hauptsächlich über CYP2D6 metabolisiert. Da bei den hetEM die Funktion des CYP2D6 eingeschränkt ist, wird sowohl der Dextromethorphan- als auch der Flecainidstoffwechsel langsamer und verläuft eventuell vermehrt über andere CYP-Enzyme wie CYP3A4.

Wie aus Tabelle 25 und Abbildung 15 ersichtlich ist, waren sowohl die AUC- als auch die C_{min}-Mittelwerte der EM-Gruppe signifikant niedriger als die der hetEM-Gruppe. Trotzdem gab es erhebliche interindividuelle Schwankungen in den Werten in beiden Gruppen (Abbildungen 16 und 17), so dass neben der CYP2D6-Aktivität auch andere Faktoren einen Einfluss auf den Flecainid- (und auch Dextromethorphan-) Metabolismus haben müssen. So fand sich in der vorliegenden Untersuchung sowohl für die Metaboliten und Metabolitenquotienten von Dextromethorphan als auch für die pharmakokinetischen Parameter von Flecainid in einigen Fällen eine signifikante negative Korrelation mit der Kreatinin-Clearance (und damit mit der Nierenfunktion) sowie ein Zusammenhang mit verschiedenen Leberwerten als Ausdruck für die Leberfunktion. In manchen Punkten zeigte sich auch ein Bezug zum Body-Mass-Index. Auch zusätzliche weitere Medikamente, wie z.B. Betablocker, Cumarine oder ACE-Hemmer, die zu einer Induktion oder Hemmung der CYP-Enzyme führen können, könnten für die beobachtete Variabilität im Flecainid- und Dextromethorphan-Metabolismus in Frage kommen. Die Komedikation wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls mit erfasst. Aufgrund der geringen Fallzahlen war eine

aussagekräftige statistische Analyse hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf den Dextromethorphan-Metabolismus und auf die Pharmakokinetik von Flecainid jedoch nicht möglich.

6.5. Einfluss von Flecainid auf die Monooxygenasefunktion des Cytochrom P450 in vitro

Alle Modellreaktionen wurden mit menschlichen Leberproben und Rattenleber durchgeführt.

Die Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD) steht für den Einfluss der Testsubstanz Flecainid auf die CYP1A-Subfamilie. Flecainid hemmte diese Reaktion ab einer Konzentration von 0,1 mM sowohl in der Menschen- als auch in der Rattenleber.

Die Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD) zeigt den Einfluss von Flecainid auf die CYP-Subtypen 1A, 2A, 2B und 2C. Hier gab es ebenfalls keine Unterschiede zwischen Menschen- und Rattenleber. Bei beiden Spezies wurde die Modellreaktion von Flecainid ab einer Konzentration von 1 mM inhibiert.

Unterschiede zeigten sich bei der Ethylmorphin-N-Demethylierung (EMND), welche beim Menschen über die CYP-Unterfamilie 3A vermittelt wird (Gonzalez 1988, Ladona et al. 1989). Hier beeinflusste Flecainid die Enzymaktivität ab einer Konzentration von 0,1 mM in der Menschen- und ab 1 mM in der Rattenleber.

CYP3A4 bildet mit mehr als 60% den Hauptteil des CYP der menschlichen Leber (Gonzalez und Gelboin 1994). Beispiele für Substanzen, die über CYP3A4 metabolisiert werden, sind Diazepam, Lovastatin oder Makrolid-Antibiotika (Lewis 1996), aber auch körpereigene Substanzen wie Testosteron (Correia 1995). Die EMND wird beim Menschen größtenteils durch CYP3A4 katalysiert, so dass diese Modellreaktion CYP3A4 gut charakterisiert (Gonzalez 1988, Landona et al. 1989, Müller 1990). Die Rattenleberproben für die vorliegenden Untersuchungen stammten von männlichen Ratten, da diese gegenüber den weiblichen Tieren einen höheren Gehalt an CYP3A aufweisen (Lewis 1996).

Die Lineweaver-Burk-Darstellungen zeigen, dass Flecainid in hohen Konzentrationen eine kompetitive Hemmung bei allen untersuchten Modellreaktionen hervorruft. Dies bedeutet theoretisch, dass Flecainid in hohen Konzentrationen mit anderen Substanzen um den Substratbindungsplatz des entsprechenden CYP-Subtyps konkurriert. In der Praxis ist dies allerdings nicht relevant, da solche Konzentrationen in vivo nicht vorkommen.

Zusammenfassend haben die verschiedenen Modellreaktionen gezeigt, dass Flecainid die Cytochrome 1A, 2A, 2B, 2C und 3A erst ab einer unphysiologisch hohen Dosis beeinflusst. Der normale Serumspiegel von Flecainid beträgt 0,2-1 µg/ml. Bei einem Serumspiegel ab 1,6 µg/ml ist mit einer toxischen Wirkung zu rechnen. Hier können Nebenwirkungen wie z.B. Arrhythmien, Schlaflosigkeit, Schwindel, Sehstörungen, Übelkeit und Erbrechen auftreten. Eine Konzentration von 1 mM entspricht einem Serumspiegel von 414 µg/ml. Dies bedeutet, dass die niedrigste Flecainid-Konzentration, die in den Modellversuchen gehemmt hat, bei 41,4 µg/ml lag. Dieser Serumspiegel ist 40-mal höher als der zulässige Höchstwert. Es konnte also gezeigt werden, dass Flecainid in therapeutischen Dosen die verschiedenen *in vitro* untersuchten Cytochrome nicht beeinflusst und somit mit Interaktionen mit anderen Pharmaka, die über diese Enzyme metabolisiert werden, nicht zu rechnen ist. Weiterhin gab es keine Unterschiede in den Befunden zwischen menschlicher und Rattenleber, womit man, was Flecainid angeht, die *in-vitro*-Ergebnisse von der Ratte auf den Menschen übertragen kann. Eine *in-vitro*-Untersuchung der CYP2D6-Aktivität, für die *in vivo* ein gewisser Hemmeffekt durch Flecainid in unserer Studie gesehen wurde, war aus methodischen Gründen nicht möglich. Die *ex-vivo*-Analytik ließ sich (trotz entsprechender Bemühungen) nicht auf eine *in-vitro*-Testung übertragen.

7. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Untersuchung konnten gute Korrelationen zwischen dem CYP2D6-Genotyp und dem CYP2D6-Phänotyp jeweils vor und nach Flecainideinstellung nachgewiesen werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Flecainid-Serumkonzentration zwischen Personen verschiedenen CYP2D6-Genotyps. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass Flecainid das Enzym CYP2D6 hemmt und somit den Phänotyp für andere Medikamente verändert. Patienten, die vorher einen EM-Phänotyp hatten, wurden nach Flecainidgabe funktionell zu hetEM-Phänotypen. Weiterhin konnte anhand des Dextromethorphan-Tests gezeigt werden, dass die Metabolisierungsfunktion des CYP2D6 durch Flecainid für andere CYP2D6-Substrate eingeschränkt wird. Dies bedeutet, dass anders als der Genotyp vermuten lässt, höhere Serumspiegel für andere Substanzen, die ebenfalls über CYP2D6 verstoffwechselt werden, auftreten können. Deshalb ist es möglich, dass trotz einer Genotypisierung des CYP2D6 unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können. Die Phänotypisierung mittels Modellsubstanzen, wie z.B. Dextromethorphan, ist zum

gegenwärtigen Zeitpunkt der Genotypisierung vorzuziehen, da sie im Individualfall exakter die zu erwartende Substanzkonzentration im Serum vorhersagen lässt und somit hilft, die Therapie besser zu kalkulieren. Dies ist gerade dann wichtig, wenn viele unterschiedliche CYP2D6-Substrate (wie z.B. Antiarrhythmika, Antidepressiva, β -Blocker, Neuroleptika) gleichzeitig verabreicht werden.

Für andere CYP-Familien (CYP1A, 2A, 2B, 2C und 3A) konnte in vitro, mittels verschiedener Modellreaktionen, keine relevante Beeinflussung durch Flecainid aufgezeigt werden. Eine Beeinflussung der Biotransformation anderer Substanzen, die über diese CYPs verstoffwechselt werden, ist daher nicht zu erwarten.

8. Literaturverzeichnis

Abduljalil K, Frank D, Gaedigk A, Klaassen T, Tomalik-Scharte D, Jetter A, Jaehde U, Kirchheiner J, Fuhr U. 2010. Assessment of activity levels for CYP2D6*1, CYP2D6*2, and CYP2D6*41 genes by population pharmacokinetics of dextromethorphan. *Clin Pharmacol Ther*, 88: 643-651.

Aitio, A. 1978. A simple and sensitive assay of 7-ethoxycoumarin deethylation. *Anal Biochem*, 85: 488-491.

Akiyama T, Pawitan Y, Greenberg H, Kuo CS, Reynolds-Haertle RA. 1991. Increased risk of death and cardiac arrest from encainide and flecainide in patients after non-Q-wave acute myocardial infarction in the Cardiac Arrhythmia Suppression Trial. CAST Investigators. *Am J Cardiol*, 68: 1551-1555.

Alboni P, Botto GL, Baldi N. 2005. Outpatient treatment of recurrent atrial fibrillation with the "pill-in-the-pocket" approach: practical aspects. *Ital Heart J*, 6 Suppl: 335-340.

Aliot E, Capucci A, Crijns HJ, Goette A, Tamargo J. 2011. Twenty-five years in the making: flecainide is safe and effective for the management of atrial fibrillation. *Europace*, 13: 161-173.

Almroth H, Andersson T, Fengsrud E, Friberg L, Linde P, Rosenqvist M, Englund A. 2011. The safety of flecainide treatment of atrial fibrillation: long-term incidence of sudden cardiac death and proarrhythmic events. *J Intern Med*, 270: 281-290.

Andersen SS, Hansen ML, Gislason GH, Schramm TK, Folke F, Fosbøl E, Abildstrøm SZ, Madsen M, Køber L, Torp-Pedersen C. 2009. Antiarrhythmic therapy and risk of death in patients with atrial fibrillation: a nationwide study. *Europace*, 11: 886-891.

Anderson JL, Platia EV, Hallstrom A, Henthorn RW, Buckingham TA, Carlson MD, Carson PE. 1994. Interaction of baseline characteristics with the hazard of encainide, flecainide and moricizine therapy in patients with myocardial infarction. A possible explanation for increased mortality in the Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST). *Circulation*, 90: 2843-2852.

- Arcavi L, Benowitz NL. 1993. Clinical significance of genetic influences on cardiovascular drug metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther*, 7: 311-324.
- Auzinger GM, Scheinkestel CD. 2001. Successful extracorporeal life support in a case of severe flecainide intoxication. *Critical Care Medicine*, 29: 887-890.
- Banitt EH, Schmid JR, Newmark RA. 1986. Resolution of flecainide acetate, N-(2-piperidylmethyl)-2,5-bis(2,2,2-trifluoroethoxy) benzamide acetate, and antiarrhythmic properties of the enantiomers. *J Med Chem*, 29: 299-302.
- Benijts T, Borrey D, Lambert WE, De Letter EA, Piette MHA, Van Peteghem C, De Leenheer AP. 2003. Analysis of flecainide and two metabolites in biological specimens by HPLC: Application to a fatal intoxication. *J Anal Toxicol*, 27: 47-52.
- Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al Shurbaji A. 2002. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 53: 111-122.
- Biesalski HK, Frank J. 1995. Antioxidants in nutrition and their importance in the anti-oxidative balance in the immune system. *Immun Infekt*, 23: 166-173.
- Birgersdotter UM, Wong W, Turgeon J, Roden DM. 1992. Stereoselective genetically-determined interaction between chronic flecainide and quinidine in patients with arrhythmias. *Br J Clin Pharmacol*, 33: 275-280.
- Blake MJ, Gaedigk A, Pearce RE, Bomgaars LR, Christensen ML, Stowe C, James LP, Wilson JT, Kearns GL, Leeder JS. 2007. Ontogeny of dextromethorphan O- and N-demethylation in the first year of life. *Clin Pharmacol Ther*, 81: 510-516.
- Blaschke G, Scheidemantel U, Walther B. 1985. Herstellung, optische Reinheit und Konfiguration der Flecainid-Enantiomeren. *Chem Ber*, 118: 4616-4619.
- Boriani G, Capucci A, Strocchi E, Calliva R, Santarelli A, Biffi M, Magnani B. 1993. Flecainide acetate: concentration-response relationships for antiarrhythmic and electrocardiographic effects. *Int J Clin Pharmacol Res*, 13: 211-219.
- Bourget P, Pons JC, Delouis C, Fermont L, Frydman R. 1994. Flecainide distribution, transplacental passage, and accumulation in the amniotic fluid during the third trimester of pregnancy. *Ann Pharmacother*, 28: 1031-1034.

- Braun J, Kollert JR, Becker JU. 1987. Pharmacokinetics of flecainide in patients with mild to moderate renal failure compared with patients with normal renal function. *Eur J Clin Pharmacol*, 31: 711-714.
- Buchert E, Woosley RL. 1992. Clinical implications of variable antiarrhythmic drug metabolism. *Pharmacogenetics*, 2: 2-11.
- Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT. 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem Pharmacol*, 34: 3337-3345.
- Busse D, Cosme J, Beaune P, Kroemer HK, Eichelbaum M. 1995. Cytochromes of the P450 2C subfamily are the major enzymes involved in the O-demethylation of verapamil in humans. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 353: 116-121.
- Caplin JL, Johnston A, Hamer J, Camm AJ. 1985. The acute changes in serum binding of disopyramide and flecainide after myocardial infarction. *Eur J Clin Pharmacol*, 28: 253-255.
- Cavalli A, Maggioni AP, Marchi S, Volpi A, Latini R. 1988. Flecainide half-life prolongation in 2 patients with congestive heart failure and complex ventricular arrhythmias. *Clin Pharmacokinet*, 14: 187-188.
- Chang SF, Miller AM, Fox JM, Welscher TM. 1984. Application of a bonded-phase extraction column for rapid sample preparation of flecainide from human plasma for high-performance liquid chromatographic analysis — fluorescence or ultraviolet detection. *Ther Drug Monit*, 6: 105-111.
- Chladek J, Zimova G, Beranek M, 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.
- Conard GJ, Ober RE. 1984. Metabolism of flecainide. *Am J Cardiol*, 53: 41B-51B.
- Correia MA. 1995. Rat and human liver cytochromes P450. *Cytochromes P450: structure, mechanism and biochemistry*. New York: Plenum Press.

Cros C, Skinner M, Moors J, Laine P, Valentin JP. 2012. Detecting drug-induced prolongation of the QRS complex: New insights for cardiac safety assessment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 265: 200-208.

Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA. 2001. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*, 11: 597-607.

Daly AK, Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelmann-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Steen VM, Wolf CR, Zanger UM. 1996. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics*, 6: 193-201.

de Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. 1994. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem*, 269: 15419-15422.

Deneer VH, Borgh MB, Kingma JH, Lie-A-Huen L, Brouwers JR. 2004. Oral antiarrhythmic drugs in converting recent onset atrial fibrillation. *Pharm World Sci*, 26: 66-78.

Deneer VH, van Hemel NM. 2011. Is antiarrhythmic treatment in the elderly different? A review of the specific changes. *Drugs Aging*, 28: 617-633.

Diaconu CH, Cuciureanu M, Vlase L, Cuciureanu R. 2011. Food-drug interactions: grapefruit juice. 2011. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 115: 245-250.

Ding X, Kaminsky LS. 2003. Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43: 149-173.

Doki K, Homma M, Kuga K, Aonuma K, Sakai S, Yamaguchi I, Kohda Y. 2007. Gender-associated differences in pharmacokinetics and anti-arrhythmic effects of flecainide in Japanese patients with supraventricular tachyarrhythmia. *Eur J Clin Pharmacol*, 63: 951-957.

Doki K, Homma M, Kuga K, Aonuma K, Kohda Y. 2009. Effects of CYP2D6 genotypes on age-related change of flecainide metabolism: involvement of CYP1A2-mediated metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 68: 89-96.

Ducharme J, Abdullah S, Wainer IW. 1996. Dextromethorphan as an in vivo probe for the simultaneous determination of CYP2D6 and CYP3A activity. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 678: 113-128.

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Dengler HJ. 1979. Influence of the defective metabolism of sparteine on its pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol*, 16: 189-194.

Eichelbaum M, Bertilsson L, Säwe J, Zekorn C. 1982. Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther*, 31: 184-186.

Eichelbaum M, Gross AS. 1990. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism – clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 46: 377-394.

Fetsch T, Bauer P, Engberding R, Koch HP, Lukl J, Meinertz T, Oeff M, Seipel L, Trappe HJ, Treese N, Breithardt G, Prevention of Atrial Fibrillation after Cardioversion Investigators. 2004. Prevention of atrial fibrillation after cardioversion: results of the PAFAC trial. *Eur Heart J*, 16: 1385-1394.

Floyd RA, Carney JM. 1992. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol*, 32 Suppl: 22-27.

Forland SC, Burgess E, Blair AD, Cutler RE, Kvam DC, Weeks CE, Fox JM, Conard GJ. 1988. Oral flecainide pharmacokinetics in patients with impaired renal function. *J Clin Pharmacol*, 28: 259-267.

Friedman PL, Stevenson WG. 1998. Proarrhythmia. *Am J Cardiol*, 82: 50N-58N.

Funck-Brentano C, Becquemont L, Kroemer HK, Bühl K, Knebel NG, Eichelbaum M, Jaillon P. 1994. Variable disposition kinetics and electrocardiographic effects of flecainide during repeated dosing in humans: contribution of genetic factors, dose-dependent clearance, and interaction with amiodarone. *Clin Pharmacol Ther*, 55: 256-269.

Garfinkel D. 1958. Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 77: 493-509.

Gonzalez FJ. 1988. The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacol Rev*, 40: 243-288.

- Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA. 1988. Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*, 2: 174-179.
- Gonzalez FJ, Gelboin HV. 1994. Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab Rev*, 26: 165-183.
- Greene HL, Richardson DW, Hallstrom AP, McBride R, Capone RJ, Barker AH, Roden DM, Echt DS. 1989. Congestive heart failure after acute myocardial infarction in patients receiving antiarrhythmic agents for ventricular premature complexes (Cardiac Arrhythmia Pilot Study). *Am J Cardiol*, 63: 393-398.
- Gross SA, Mikus G, Fischer C, Hertrampf R, Gundert-Remy U, Eichelbaum M. 1989. Stereoselective disposition of flecainide in relation to the sparteine/debrisoquine metaboliser phenotype. *Br J Clin Pharmacol*, 28: 555-566.
- Guengerich FP. 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*, 14: 611-650.
- Ha HR, Follath F. 2004. Metabolism of antiarrhythmics. *Curr Drug Metab*, 5: 543-571.
- Haefeli WE, Bargetzi MJ, Follath F, Meyer UA. 1990. Potent inhibition of cytochrome P450IID6 (debrisoquine 4 hydroxylase) by flecainide in vitro and in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol*, 15: 776-779.
- Hage K, Buhl K, Fischer C, Knebel NG. 1995. Estimation of the absolute bioavailability of flecainide using stable-isotope technique. *Eur J Clin Pharmacol*, 48: 51-55.
- Heim MH, Meyer UA. 1992. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics*, 14: 49-58.
- Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Hänseler E. 2000. Rapid detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4 and CYP2D6*6 alleles by tetra-Primer PCR and of the CYP2D6*5 allele by multiplex long PCR. *Clin Chem*, 46: 1072-1077.
- Hietanen V. 1980. Role of hepatic metabolism. In: Testa B, Jenner P, Hrsg. *Concepts of drug metabolism*. New York, Basel: Dekker, 251-284.

Hodges M, Haugland JM, Conard GJ, Carlson GL, Frost JW, Ober RE. 1979. Human plasma pharmacokinetics of flecainide acetate (R-818), a new antiarrhythmic, following single oral and intravenous doses. *Clin Pharmacol Ther*, 25: 218.

Hodges M, Haugland JM, Granrud G, Conard GJ, Asinger RW, Mikell FL, Krejci J. 1982. Suppression of ventricular ectopic depolarizations by flecainide acetate, a new antiarrhythmic agent. *Circulation*, 65: 879-885.

Holmes B, Heel RC. 1985. Flecainide. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 29: 1-33.

Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC, Cantilena LR. 1993. Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA*, 269: 1550-1552.

Honkakoski P, Negishi M. 2000. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J*, 347: 321-337.

Horowitz LN, Greenspan AM, Rae AP, Kay HR, Spielman SR. 1987. Proarrhythmic responses during electrophysiologic testing. *Am J Cardiol*, 59: 45E-48E.

Hundal M, Garg RK. 2010. Dronedaron – a new alternative for management of atrial fibrillation. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*, 5: 47-53.

<http://medicine.iupui.edu/flockhart/>. 2009. Cytochrome P450 drug interaction table; last update January 2012.

<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>. Karolinska Institutet National Institute of Environmental Medicine 1999: Human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature committee.

Hustenstilller-ratiopharm[®] 30 mg, Fachinformation. 1998. ratiopharm GmbH.

Ismail R, Teh LK. 2006. The relevance of CYP2D6 genetic polymorphism on chronic metoprolol therapy in cardiovascular patients. *J Clin Pharm Ther*, 31: 99-109.

Izzo AA. 2004. Drug interactions with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the clinical evidence. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 42: 139-148.

Jacqz-Aigrain E, Funck-Brentano C, Cresteil T. 1993. CYP2D6- and CYP3A4-dependent metabolism of dextromethorphan in humans. *Pharmacogenetics*, 3: 197-204.

Johnston A, Warrington S, Turner P. 1985. Flecainide pharmacokinetics in healthy volunteers: the influence of urinary pH. *Br J Clin Pharmacol*, 20: 333-338.

Jones DR, Gorski JC, Hamman MA, Hall SD. 1996a. Quantification of dextromethorphan and metabolites: a dual phenotypic marker for cytochrome P450 3A4/5 and 2D6 activity. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 678: 105-111.

Jones DR, Gorski JC, Haehner BD, O'Mara EM, Hall SD. 1996b. Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation. *Clin Pharmacol Ther*, 60: 374-384.

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzales FJ. 1989. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*, 45: 889-904.

Kirchheiner J, Bauer S, Meinecke I, Rohde W, Prang V, Meisel C, Roots I, Brockmüller J. 2002. Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Pharmacogenetics*, 12: 101-109.

Kirchhof P, Andresen D, Bosch R, Borggreffe M, Meinertz T, Parade U, Ravens U, Samol A, Steinbeck G, Treszl A, Wegscheider K, Breithardt G. 2012. Short-term versus long-term antiarrhythmic drug treatment after cardioversion of atrial fibrillation (Flec-SL): a prospective, randomised, open-label, blinded endpoint assessment trial. *Lancet*, 380: 238-246.

Kleeberg U, Klinger W. 1982. Sensitive formaldehyde determination with Nash's reagent and a 'tryptophan reaction'. *J Pharmacol Methods*, 8: 19-31.

Klingenberg M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 75: 376-386.

Klinger W, Müller D. 1974. The influence of age on the protein concentration in serum, liver and kidney of rats determined by various methods. *Z Versuchstierkd*, 16: 149-153.

- Klinger W, Müller D. 1977. Ethylmorphine N-demethylation by liver homogenate of newborn and adult rats; Enzyme kinetics and age course of Vmax and Km. *Acta Biol Med Ger*, 36: 1149-1159.
- Kobayashi K, Nakajima M, Chiba K, Yamamoto T, Tani M, Ishizaki T, Kuroiwa Y. 1998. Inhibitory effects of antiarrhythmic drugs on phenacetine O-deethylation catalysed by human CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol*, 45: 361-368.
- Köhler D, Härtter S, Fuchs K, Sieghart W, 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.
- Kouhi H, Hamzeiy H, Barar J, Asadi M, Omid Y. 2009. Frequency of five important CYP2D6 alleles within an Iranian population (Eastern Azerbaijan). *Genet Test Mol Biomarkers*, 13: 665-670.
- Ladona MG, Spalding DJ, Ekman L, Lindström B, Rane A. 1989. Human fetal and adult liver metabolism of ethylmorphine. Relation to immunodetected cytochrome P-450 PCN and interactions with important fetal corticosteroids. *Biochem Pharmacol*, 38: 3147-3155.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. 1998. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 279: 1200-1205.
- Lewis GP, Holtzman JL. 1984. Interaction of flecainide with digoxin and propranolol. *Am J Cardiol*, 53: 52B-57B.
- Lewis DFV. 1996. *Cytochromes P450: structure, function and mechanism*. London, Bristol: Taylor and Francis.
- Lim KS, Cho JY, Jang IJ, Kim BH, Kim J, Jeon JY, Tae YM, Yi S, Eum S, Shin SG, Yu KS. 2008. Pharmacokinetic interaction of flecainide and paroxetine in relation to the CYP2D6*10 allele in healthy Korean subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 66: 660-666.
- Lim KS, Jang IJ, Kim BH, Kim J, Jeon JY, Tae YM, Yi S, Eum S, Cho JY, Shin SG, Yu KS. 2010. Changes in the QTc interval after administration of flecainide acetate, with and without coadministered paroxetine, in relation to cytochrome P450 2D6 genotype: data from an open-label, two-period, single-sequence crossover study in healthy Korean male subjects. *Clin Ther*, 659-666.

Linder J. 2012. The science behind vitamins. *Plast Surg Nurs*, 32: 180-181.

Liu Z, Mortimer O, Smith CA, Wolf CR, Rane A. 1995. Evidence for a role of cytochrome P450 2D6 and 3A4 in ethylmorphine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*, 39: 77-80.

London SJ, Daly AK, Leathart JB, Navidi WC, Idle JR. 1996. Lung cancer risk in relation to the CYP2C9*1/CYP2C9*2 genetic polymorphism among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, California. *Pharmacogenetics*, 6: 527-533.

Løvlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. 1996. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*, 392: 30-34.

Lui HK, Lee G, Dietrich P, Low RI, Mason DT. 1982. Flecaïnide-induced QT prolongation and ventricular tachycardia. *Am Heart J*, 103: 567-569.

Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. 1997. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*, 7: 193-202.

Martinez-Selles M, Castillo I, Montenegro P, Martin ML, Almendral J, Sanjurjo M. 2005. Pharmacogenetic study of the response to flecaïnide and propafenone in patients with atrial fibrillation. *Revista Espanola De Cardiologia*, 58: 745-748.

Matsubara T, Koike M, Touchi A, Tochino Y, Sugeno K. 1976. Quantitative determination of cytochrome P-450 in rat liver homogenate. *Anal Biochem*, 75: 596-603.

McQuinn RL, Quarfoth GJ, Johnson JD, Banitt EH, Pathre SV, Chang SF, Ober RE, Conard GJ. 1984. Biotransformation and elimination of ¹⁴C-flecaïnide acetate in humans. *Drug Metab Dispos*, 12: 414-420.

McQuinn RL, Pentikäinen PJ, Chang SF, Conard GJ. 1988. Pharmacokinetics of flecaïnide in patients with cirrhosis of the liver. *Clin Pharmacol Ther*, 44: 566-572.

medizininfo.de/kardio/herzrhythmus/erregungsleitung.shtml

Meinertz T, Willems S. 2008. Treatment of atrial fibrillation in every days practice. *Internist (Berl)*, 49: 1437-1442, 1444-1445.

- Mikus G, Gross AS, Beckmann J, Hertrampf R, Gundert-Remy U, Eichelbaum M. 1989. The influence of the sparteine/debrisoquine phenotype on the disposition of flecainide. *Clin Pharmacol Ther*, 45: 562-567.
- Moore TJ. 1995. *Deadly medicine: Why tens of thousands of heart patients died in America's worst drug disaster*. New York: Simon & Schuster.
- Morganroth J, Anderson JL, Gentzkow GD. 1986. Classification by type of ventricular arrhythmia predicts frequency of adverse cardiac events from flecainide. *J Am Coll Cardiol*, 8: 607-615.
- Morganroth J. 1987. Risk factors for the development of proarrhythmic events. *Am J Cardiol*, 59: 32E-37E.
- Mortimer O, Lindström B, Laurell H, Bergman U, Rane A. 1989. Dextromethorphan: polymorphic serum pattern of the O-demethylated metabolites in man. *Br J Clin Pharmacol*, 27: 223-227.
- Müller D. 1990. Influence of xenobiotics on drug metabolism and its sensitive detection. *Exp Pathol*, 39: 187-194.
- Muhiddin KA, Johnston A, Turner P. 1984. The influence of urinary pH on flecainide excretion and its serum pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol*, 17: 447-451.
- Munafò A, Biollaz J. 1989. High-performance liquid chromatographic assay with fluorometric detection for flecainide and its major metabolites in urine and serum. *J Chromatogr*, 490: 450-457.
- Munafò A, Buclin T, Tuto D, Biollaz J. 1992. The effect of a low-dose of quinidine on the disposition of flecainide in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 43: 441-443.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Hrsg. 2001. *Arzneimittelwirkungen* 8. Auflage, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 21-37.
- Myerburg RJ, Kessler KM, Cox MM, Huikuri H, Terracall E, Interian A Jr, Fernandez P, Castellanos A. 1989. Reversal of proarrhythmic effects of flecainide acetate and encainide hydrochloride by propranolol. *Circulation*, 80: 1571-1579.

Nash T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J*, 55: 416-421.

Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 12: 1-51.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 1: 1-42.

Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW. 2004. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, 14: 1-18.

Nelson DR. 2011. Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochim Biophys Acta*, 1: 14-18.

Nemeroff CB, DeVane CL, Pollock BG. 1996. Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry*, 153: 311-320.

Nitsch J, Neyses L, Köhler U, Lüderitz B. 1987. Erhöhte Flecainid-Plasmakonzentrationen bei Herzinsuffizienz. *Dtsch Med Wschr*, 112: 1698-1700.

O'Connor PM, Lapointe TK, Beck PL, Buret AG. 2010. Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16: 1411-1420.

Oesch F. 1997. Fremdstoffmetabolismus. In: Marquardt H, Schäfer SG, Hersg. *Lehrbuch der Toxikologie* 2. Auflage, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 68-93.

Ohmura H, Nukada T, Mizuno Y, Yamaya Y, Nakayama T, Amada A. 2000. Safe and efficacious dosage of flecainide acetate for treating equine atrial fibrillation. *J Vet Med Sci*, 62: 711-715.

- Okada F. 2002. Inflammation and free radicals in tumor development and progression. *Redox Rep*, 7: 357-368.
- Omura T, Sato R, Cooper DY, Rosenthal O, Estabrook RW. 1965. Function of cytochrome P-450 of microsomes. *Fed Proc*, 24: 1181-1189.
- Oprian DD, Coon MJ. 1982. Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P450-reductase during reduction by NADPH. *J Biol Chem*, 257: 8935-8944.
- Oya Y, Takenaka A, Ochi T, Yamamoto K. 1992. The biological activity of hydrogen peroxide. V. The crystal structure of a histidine-peroxide adduct and its biological activities. *Mutat Res*, 266: 281-289.
- Padhi D, Harris R. 2009. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of cinacalcet hydrochloride. *Clin Pharmacokinet*, 48: 303-311.
- Padrini R, Piovan D, Busa M, Al-Bunni M, Maiolino P, Ferrari M. 1993. Pharmacodynamic variability of flecainide assessed by QRS changes. *Clin Pharmacol Ther*, 53: 59-64.
- Palmiere C, Lesta M, Sabatasso S, Mangin P, Augsburger M, Sporkert F. 2012. Usefulness of postmortem biochemistry in forensic pathology: illustrative case reports. *Leg Med (Tokyo)*, 14: 27-35.
- Patten M, Maas R, Bauer P, Lüderitz B, Sonntag F, Dluzniewski M, Hatala R, Opolski G, Müller HW, Meinertz T; SOPAT Investigators. 2004. Suppression of paroxysmal atrial tachyarrhythmias - results of the SOPAT trial. *Eur Heart J*, 25: 1395-1404.
- Platia EV, Estes M, Heine DL, Griffith LS, Garan H, Ruskin JN, Reid PR. 1985. Flecainide: electrophysiologic and antiarrhythmic properties in refractory ventricular tachycardia. *Am J Cardiol*, 55: 956-962.
- Pohl RJ, Fouts JR. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem*, 107: 150-155.
- Pond SM. 1991. Extracorporeal techniques in the treatment of poisoned patients. 9. *Med J Austral*, 154: 617-622.

- Pritchett EL, DaTorre SD, Platt ML, McCarville SE, Hougham AJ. 1991. Flecainide acetate treatment of paroxysmal supraventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation: dose-response studies. The Flecainide Supraventricular Tachycardia Study Group. *J Am Coll Cardiol*, 17: 297-303.
- Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van de Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radic Res*, 36: 217-233.
- Qi X, Dorian P. 1999. Antiarrhythmic drugs and ventricular defibrillation energy requirements. *Chin Med J (Engl)*, 112: 1147-1152.
- Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM. 2000. Elucidation of the genetic basis of the common „intermediate metabolizer“ phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics*, 10: 577-581.
- Raimundo S, Toscano C, Klein K, Fischer J, Griese EU, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2004. A novel intronic mutation, 2988>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*, 76: 128-138.
- Rane A, Ask B. 1992. A conspicuous down-regulating effect of morphine on essential steroid hydroxylation reactions and certain drug N-demethylations. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41: 91-98.
- Rioux PP. 2000. Clinical trials in pharmacogenetics and pharmacogenomics: methods and applications. *Am J Health Syst Pharm*, 57: 887-898.
- Roden DM, Woosley RL. 1986. Drug therapy. Flecainide. *New Engl J Med*, 315: 36-41.
- Romain N, Giroud C, Michaud K, Augsburger M, Mangin P. 1999. Fatal flecainide intoxication. *Forensic Sci Int*, 106: 115-123.
- Rouhos A, Raaska K. 2012. Smoking and drug interactions. *Duodecim*, 128: 1073-1080.
- Ruckpaul K. 1993. Cytochrome P450 dependent enzymes – target enzymes for drug action. *Pharm Unserer Zeit*, 22: 296-304.

Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. 1997. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*, 60: 284-295.

Salerno DM, Granrud G, Sharkey P, Krejci J, Larson T, Erlien D, Berry D, Hodges M. 1986. Pharmacodynamics and side effects of flecainide acetate. *Clin Pharmacol Ther*, 40: 101-107.

Schein JR. 1995. Cigarette smoking and clinically significant drug interactions. *Ann Pharmacother*, 29: 1139-1148.

Schmid B, Bircher J, Preisig R, Kűpfer A. 1985. Polymorphic dextromethorphan metabolism: Co-segregation of oxidative O-demethylation with debrisoquine hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther*, 38: 618-624.

Schwab M, Eichelbaum M. 1999. Pharmakokinetische Aspekte der Arzneimitteltherapie. *Arzneiverordnung in der Praxis*, 1999: 2-5.

Schwab M, Marx C, Zanger UM, Eichelbaum M. 2002. Pharmakokinetik der Zytochrom-P450-Enzyme. *Dtsch  rzteblatt*, 99: A 497-504.

Schwaiblmair M, Behr W, Foerg W, Berghaus T. 2011. Cytochrome P450 polymorphisms and drug-induced interstitial lung disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7: 1547-1560.

Schweizer PA, Becker R, Katus HA, Thomas D. 2011. Dronedaron: current evidence for its safety and efficacy in the management of atrial fibrillation. *Drug Des Devel Ther*, 5: 27-39.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*, 270: 414-423.

Smith DA, Gough AC, Leigh PN, Summers BA, Harding AE, Maranganore DM, Sturman SG, Schapira AHV, Williams AC, Spurr NK, Wolf CR. 1992. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinsons-disease. *Lancet*, 339: 1375-1377.

Soyka LF. 1986. Safety of encainide for the treatment of ventricular arrhythmias. *Am J Cardiol*, 58: 96C-103C.

Spear BB. 2001. Pharmacogenetics and antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 42 Suppl 5: 31-34.

Speckmann EJ. 2008. Physiologie. 5.Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, 390-397.

Spivack C, Gottlieb S, Miura DS, Somberg JC. 1984. Flecainide toxicity. *Am J Cardiol*, 53: 329-330.

Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, Miners JO, Birkett DJ, Goldstein JA. 1996. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*, 6: 341-349.

Tamargo J, Capucci A, Mabo P. 2012. Safety of flecainide. *Drug Saf*, 35: 273-289.

Tambocor[®] 100 mg, Fachinformation. 2006. 3M Medica, Zweigniederlassung der 3M Deutschland GmbH.

Tamura S, Korzekwa KR, Kimura S, Gelboin HV, Gonzalez FJ. 1992. Baculovirus-mediated expression and functional characterization of human NADPH-P450 oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys*, 293: 219-233.

The CAPS Investigators. 1986. The Cardiac Arrhythmia Suppression Pilot Study. *Am J Cardiol*, 57: 91-95.

The Cardiac Arrhythmia Suppression Trial (CAST) Investigators. 1989. Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmia suppression after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 321: 406-412.

Thevenin J, Da Costa A, Roche F, Romeyer C, Messier M, Isaaz K. 2003. Flecainide induced ventricular tachycardia (torsades de pointes). *Pacing Clin Electrophysiol*, 26: 1907-1908.

Toscano C, Klein K, Bliedernicht J, Schaeffeler E, Saussele T, Raimundo S, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2006. Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988 > A: evidence of modulation of splicing events. *Pharmacogen Genom*, 16: 755-766.

Trujillo TC, Nolan PE. 2000. Antiarrhythmic agents - Drug interactions of clinical significance. *Drug Safety*, 23: 509-532.

Tsao YY, Gugger JJ. 2009. Delirium in a patient with toxic flecainide plasma concentrations: The role of a pharmacokinetic drug interaction with paroxetine. *Ann Pharmacother*, 43: 1366-1369.

Van Gelder IC, Hagens VE, Bosker HA, Kingma JH, Kamp O, Kingma T, Said SA, Darmanata JI, Timmermans AJ, Tijssen JG, Crijns HJ. Rate Control versus Electrical Cardioversion for Persistent Atrial Fibrillation Study Group. 2002. A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 347: 1834-1840.

Vaughan Williams EM. 1984. A classification of antiarrhythmic actions reassessed after a decade of new drugs. *J Clin Pharmacol*, 24: 129-147.

Vaughan Williams EM. 1991. Significance of classifying antiarrhythmic actions since the cardiac arrhythmia suppression trial. *J Clin Pharmacol*, 31: 123-125.

Velebit V, Podrid P, Lown B, Cohen BH, Graboyz TB. 1982. Aggravation and provocation of ventricular arrhythmias by antiarrhythmic drugs. *Circulation*, 65: 886-892.

Vermilion JL, Coon MJ. 1978. Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P450-reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J Biol Chem*, 253: 2694-2704.

Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Grassi JM, Granda BW, Venkatakrishnan K, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI. 1998. Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of dextromethorphan in vitro: role of CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A. *J Pharm Pharmacol*, 50: 223-227.

Wang Y, Unadkat JD. 1999. Enzymes in addition to CYP3A4 and 3A5 mediate N-demethylation of dextromethorphan in human liver microsomes. *Biopharm Drug Dispos*, 20: 457-460.

Weeks CE, Conard GJ, Kvam DC, Fox JM, Chang SF, Paone RP, Lewis GP. 1986. The effect of flecainide acetate, a new antiarrhythmic, on plasma digoxin levels. *J Clin Pharmacol*, 26: 27-31.

Wei X, Loi CM, Jarvi EJ, Vestal RE. 1995. Relative potency of mexiletine, lidocaine, and tocainide as inhibitors of rat liver CYP1A1 activity. *Drug Metab Dispos*, 23: 1335-1338.

Wieling J, Tamminga WJ, Sakiman EP, Oosterhuis B, Wemer J, Jonkman JH. 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.

Winkle RA, Mason JW, Griffin JC, Ross D. 1981. Malignant ventricular tachyarrhythmias associated with the use of encainide. *Am Heart J*, 102: 857-864.

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

Wyse DG, Waldo AL, DiMarco JP, Domanski MJ, Rosenberg Y, Schron EB, Kellen JC, Greene HL, Mickel MC, Dalquist JE, Corley SD; Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM) Investigators. 2002. A comparison of rate control and rhythm control in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*, 347: 1825-1833.

Yamazaki H, Inoue K, Mimura M, Oda Y, Guengerich FP, Shimada T. 1996. 7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 51: 313-319.

You A, Haining RL. 2001. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A4 activities? *Drug Metab Dispos*, 29: 1514-1520.

Zevin S, Benowitz NL. 1999. Drug interactions with tobacco smoking - An update. *Clin Pharmacokin*, 36: 425-438.

Zhou SF. 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance. Part I. *Clin Pharmacokin*, 48: 689-723.

Zordan R, Padrini R, Bernini V, Piovan D, Ferrari M. 1993. Influence of age and gender on the in vitro serum protein binding of flecainide. *Pharmacol Res*, 28: 259-264.

9. Anhang

9.1. Lebenslauf

Name	Patrick Zimmermann
12.12.1979	geboren in Bad Salzungen
08/86 - 06/90	Grundschule Bad Salzungen
08/90 – 06/98	Gymnasium Bad Salzungen
09.07.1998	Abitur
09/98 – 10/99	Zivildienst Kreiskrankenhaus Bad Salzungen
11/99 – 09/00	Arbeit als Verkäufer
10/00 – 03/03	Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
04/03 – 09/03	Freiwilligendienst in Indien
10/03 – 12/07	Klinisches Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
ab 06/07	Assistenzarzt für Innere Medizin im SRH Waldklinikum Gera

Jena,

9.2. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, 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, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. A. Lupp, 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,

Patrick Zimmermann

9.3. Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Frau apl. Prof. Dr. med. A. Lupp für die hilfreiche und umfassende wissenschaftliche Betreuung der in-vitro-Experimente und bei Herrn Dr. med. U. D. Kuhn für die Betreuung der in-vivo-Untersuchungen bedanken. Weiterhin möchte ich Frau Karge für ihre Einführung in die in-vitro-Methoden danken. Mein Dank gilt auch dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena für die Bereitstellung von Materialien und für die Analyse von Proben.

Ich danke den Probanden, die freiwillig an dieser Studie teilgenommen haben. Auch möchte ich mich bei den Ärzten der Klinik für Innere Medizin/Kardiologie des Universitätsklinikums Jena, insbesondere bei Frau OÄ Dr. Dannberg, bedanken für die gute Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Probanden.

Nicht zuletzt gilt besonderer Dank meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums der Humanmedizin und meiner Freundin für die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.