

**Einfluss genomischer Varianten
von CYP2D6 auf die postoperative Analgesie mit
Tramadol**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Katja Lehen
aus Trier
2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1.Gutachter: PD Dr. U. Stamer

2.Gutachter: Prof. Dr. E. Klaschik

Tag der Mündlichen Prüfung: 08. Februar 2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

(Direktor: Prof. Dr. A. Hoeft)

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	- 9 -
1.1. Cytochrom P450	- 9 -
1.2. CYP2D6	- 12 -
1.3. Polymorphismen von CYP2D6	- 13 -
1.4. Verwendete Pharmaka	- 17 -
1.4.1. <i>Tramadol</i>	- 17 -
1.4.2. <i>Metamizol</i>	- 19 -
1.4.3. <i>Metoclopramid</i>	- 20 -
1.5. Fragestellung	- 21 -
2. Material und Methoden	- 22 -
2.1. Patientenkollektiv	- 22 -
2.1.1. <i>Ein-und Ausschlusskriterien</i>	- 22 -
2.1.2. <i>Beendigungsgründe für die Schmerztherapie</i>	- 23 -
2.2. Klinischer Untersuchungsablauf	- 23 -
2.2.1. <i>Aufklärung</i>	- 23 -
2.2.2. <i>Einteilung der Operationen</i>	- 23 -
2.2.3. <i>Anästhesie</i>	- 24 -
2.2.4. <i>Aufwachraum</i>	- 24 -
2.2.5. <i>Studienphase</i>	- 24 -
2.3. Messung	- 25 -
2.3.1. <i>Messung der Schmerzintensität</i>	- 25 -
2.4. Abschlussfragebogen	- 25 -
2.5. Einteilung der Reaktion	- 26 -
2.5.1. <i>Responder</i>	- 26 -
2.5.2. <i>Nonresponder</i>	- 26 -
2.6. Molekularbiologische Untersuchung	- 27 -
2.6.1. <i>Präparation der Genomischen DNA</i>	- 27 -
2.6.2. <i>Amplifikation Isoenzym CYP2D6</i>	- 27 -
2.6.3. <i>Primer</i>	- 29 -
2.6.4. <i>Analyse der PCR Produkte und Elektrophorese</i>	- 30 -
2.6.5. <i>Methodik der Genotypisierung</i>	- 30 -
2.6.6. <i>Analyse der gewonnenen DNA</i>	- 31 -
2.6.7. <i>Präamplifikation („Long PCR“)</i>	- 35 -
2.6.8. <i>„Multiplex PCR“ mit Protokoll</i>	- 36 -
2.6.9. <i>Null-Allel mit Protokoll</i>	- 37 -
2.7. Statistik	- 38 -
2.8. Zielkriterien	- 38 -
2.9. Material	- 39 -

2.9.1. Kleingeräte und Materialien	- 39 -
2.9.2. Technische Geräte.....	- 39 -
2.9.3. Chemikalien	- 39 -
3. Ergebnisse	- 41 -
3.1. Demographische Daten.....	- 41 -
3.2. Genotypisierung	- 44 -
3.2.1. Analyse der „Long PCR“	- 44 -
3.2.2. Analyse der „Multiplex- PCR“.....	- 44 -
3.2.3. Analyse des „Null- Allels“	- 45 -
3.3. Verteilung der Genotypen.....	- 46 -
3.4. Klinische Untersuchung.....	- 48 -
3.5. Analgetikaverbrauch und Schmerzscores	- 48 -
3.6. Ausweich-Medikation während der PCA-Zeit	- 51 -
3.7. Response und Genotyp.....	- 51 -
3.8. Unerwünschte Ereignisse: PONV (postoperative nausea and vomiting)	- 52 -
4. Diskussion	- 53 -
4.1. Klinische Untersuchung von Tramadol in der postoperativen Analgesie	- 54 -
4.2. Pharmakologie von Tramadol.....	- 55 -
4.3. Kombination mit Nicht-Opioid-Analgetika	- 58 -
4.4. PONV (postoperative nausea and vomiting)	- 60 -
4.5. CYP2D6 Genotypisierung	- 61 -
4.6. Ausblick	- 63 -
5. Zusammenfassung	- 64 -
Anhang.....	- 66 -
Patientenfragebogen.....	- 66 -
Liste der Abbildungen und Tabellen.....	- 69 -
Abbildungen	- 69 -
Tabellen	- 69 -
6. Literaturverzeichnis.....	- 70 -

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ASA	American Society of Anaesthesiologists
bp	Basenpaare
CYP2D6	Cytochrom P450 Isoenzym 2D6
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid Triphosphat
EM	Normal Verstoffwechsler (Extensive Metabolizer)
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
i.v.	intravenös
kb	kilo Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
MAC	mittlere Alveoläre Konzentration
MgCl	Magnesiumchlorid
mg	Milligramm (10^{-3} g)
min	Minuten
ml	Milliliter (10^{-3} L)
mM	Millimolar (10^{-3} M)
μl	Mikroliter (10^{-6} L)
μg	Mikrogramm (10^{-6} g)
μM	Mikromolar (10^{-6} M)
NaCl	Natriumchlorid
NRS	Numerische Rating Skala
p	Signifikanz
PCA	Patienten kontrollierte Analgesie (Patient controlled analgesia)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PM	Schlecht Verstoffwechsler (Poor Metabolizer)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

SD	Standard Abweichung (Standard deviation)
T	Thyrosin
UM	Schnell Verstoffwechsler (Ultrarapid Metabolizer)

1. Einleitung

„Ein Gen, so kann man annehmen, hat die gleiche Struktur, wie ein kleines Molekül und kann nur diskontinuierliche Veränderungen durchmachen: die Atome lagern sich um, so dass ein isomeres Molekül entsteht. Eine solche Umlagerung (Mutation) betrifft möglicherweise nur einen kleinen Abschnitt des Gens, und insgesamt ist vielleicht eine Riesenzahl solcher Veränderungen möglich“ (Erwin Schrödinger, 1945)

„Das zentrale Dogma besagt, dass einmal in Protein überführte Information nicht wieder herauskommt. Der Informationstransfer von Nukleinsäure zu Nukleinsäure oder von Nukleinsäure zu Protein dürfte möglich sein, unmöglich ist jedoch der Transfer von Protein zu Nukleinsäure. Information bedeutet hier die präzise Festlegung einer Sequenz, sei es von Basen in der Nukleinsäure oder von Aminosäuren im Protein.“ (Francis Crick, 1958, Gene S.121)

Was Schrödinger 1945 vermutete, dass die Komplexität des Lebens auf der Basis von Mutationen beruht, ist heute Grundlage unseres evolutionären Wissens. Nach intensiver Erforschung unseres Erbgutes ist es uns heute möglich, diese Mutationen in einzelnen Individuen nachzuweisen. Das zentrale Dogma von Crick ist dabei eine bis heute geltende Grundlage: die Wirkung der vererbten Gene und damit auch ihrer Mutationen, wird erst in Form von Proteinen sichtbar. Diese Studie beschäftigt sich nun mit der Form und Wirkung in einem speziellen Bereich des Proteins Cytochrom P450.

1.1. Cytochrom P450

Der Metabolismus einer Vielzahl von Medikamenten wird durch die in der Leber lokalisierten Enzyme des Cytochrom P450-Systems katalysiert (Poulsen et al., 1996). Die Variabilität der Funktion dieser CYP450-Enzyme bestimmt die unterschiedliche Wirkungsstärke eines Medikamentes gleicher Konzentration bei verschiedenen Individuen. Polymorphismen oder seltene genetische Varianten führen über die Veränderung pharmakokinetischer Prozesse zu interindividuellen Wirkungs- beziehungsweise Nebenwirkungsvarianten. Ein genetischer Polymorphismus manifestiert sich als monogen vererbtes Merkmal, das innerhalb einer Bevölkerung in mindestens zwei Genotypen auftritt und dessen Allelhäufigkeit über einem Prozent liegt (Schwab et al., 2002). Mutationen

umfassen sämtliche Veränderungen in der DNA- Sequenz und damit ein sehr weites Spektrum an verschiedenen molekularen Mechanismen. Diese reichen von Veränderungen einzelner Basen, bis hin zu einer fehlerhaften Chromosomenanzahl. Grundsätzlich gilt eine Mutation als Variation mit einer Häufigkeit von weniger als 1% in der Bevölkerung (Condit et al., 2002)

In der medizinischen Genetik wird der Begriff Mutation im Gegensatz zum Polymorphismus als eine Veränderung der DNA- Sequenz mit pathogenetischem Funktionsverlust in einem Protein beschrieben (Condit et al., 2002).

Die der Verteilung der verschiedenen Allele zugrunde liegende Theorie geht von einer Interaktion zwischen Tieren und Pflanzen aus. Pflanzen waren in der Evolution gezwungen, immer neue Biosynthese-Wege zu formen, um sich gegen ihre natürlichen Feinde auf biochemischen Wege, z.B. in der Produktion von toxischen Metaboliten, zu schützen. Die Tiere wiederum entwickelten neue genetische Varianten, z.B. im Bereich der metabolischen Enzyme, um mit diesen ständig neuen Herausforderungen zurechtzukommen (Schuler, M.A., 1996). Eines der zentralen Enzyme zur Verarbeitung von toxischen Derivaten ist das Cytochrom P450. Die immer wiederkehrende Neueinstellung auf Umwelteinflüsse führte zu einer Vielzahl an unterschiedlichen Familien und Subfamilien. Diese sind auf unserem Planeten in unterschiedlicher Anzahl und Ausprägung in allen Lebewesen vorhanden und zeigen deutliche regionale Unterschiede.

Die Mitglieder der Cytochrom P450 Familie werden entsprechend der Festlegung eines Nomenklatur-Kommittees benannt (Antonarakis, 1998). Diese Einteilung beruht auf der Aminosäure-Sequenz und der Gen-Organisation. Nach dem Hauptsymbol CYP folgt die Nummer der Familie, dann ein Buchstabe für die Unterfamilie und eine weitere Nummer für das Gen, z.B. CYP2D6.

CYP2D6 ist derjenige Genort, mit dem sich diese Studie befasst.

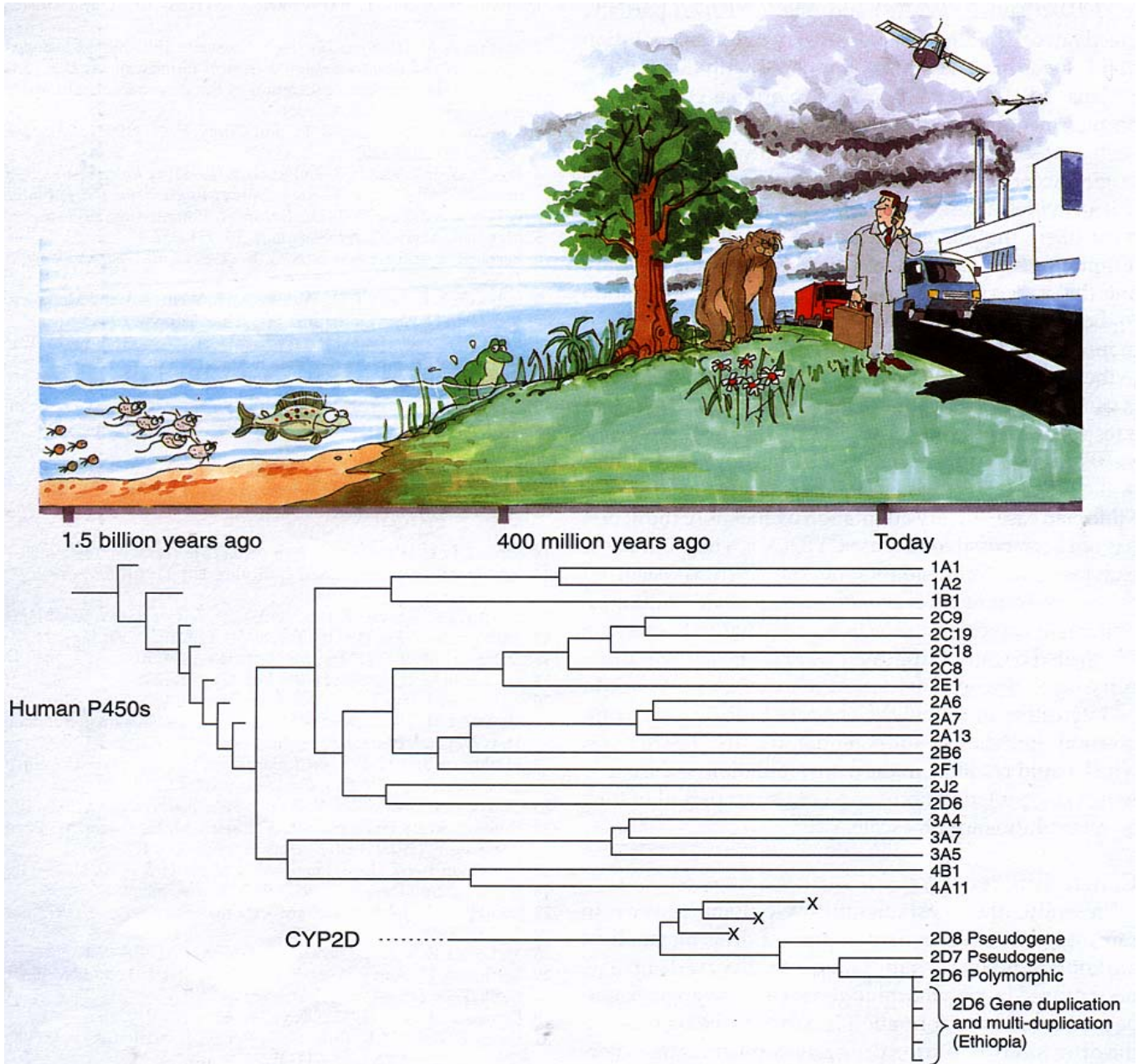


Abbildung 1: Phylogenetische Entwicklung des menschlichen Cytochrom P450.

Ingelman- Sundberg et al., Trends in Pharmac Scienc 1999, 20: 342.

1.2. CYP2D6

Cytochrom P450-Enzyme sind als Hämoproteine für den oxidativen Phase-1-Metabolismus in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert. Der Name leitet sich von seinem Absorptionsmaximum von 450nm im Kohlenmonoxid Differenzspektrum ab. CYP450-Enzyme kommen ubiquitär in Bakterien, Pflanzen und Tieren vor. Das „Ur“-Gen der circa 500 bekannten CYP450-Enzyme dürfte vor 3-3,5 Mio. Jahren entstanden sein (Ingelman-Sundberg et al., 1999). (siehe Abbildung 1)

Die menschliche Leber enthält 90-95% der bekannten CYP450-Enzyme. 60-65% davon sind für den Arzneimittelmetabolismus zuständig. Gemeinsame charakteristische Eigenschaft der am Arzneimittelmetabolismus beteiligten CYP450-Enzyme ist ihre breite Substratspezifität, die es ihnen erlaubt, durchaus unterschiedliche chemische Substratstrukturen zu verstoffwechseln.

Die für den Metabolismus von Tramadol relevante CYP-Subfamilie ist das Cytochrom P450 Isoenzym 2D6 (CYP2D6). Dieses wurde bereits Mitte der 70er Jahre beschrieben und zunächst „Debrisoquinhydroxylase“ bzw. „Sparteinhydroxylase“ genannt. Zwei unabhängige Forschergruppen untersuchten zwischen 1975 und 1977 die Wirkung des sympatholytischen und antihypertensiven Medikamentes Debrisoquin (Mahgoub et al., 1977, Eichelbaum et al., 1979). Im Verlauf der Studien kam es zu völlig entgegengesetzten Ereignissen. Einige Patienten zeigten unter Debrisoquin Überdosierungserscheinungen mit Kollapsereignissen im subtherapeutischen Bereich, während es in der anderen Gruppe unter Debrisoquin zu keinem therapeutischen Effekt kam. Dieses unterschiedliche Ansprechen auf Debrisoquin ließ sich auf eine veränderte Hydroxilierung im Rahmen der Metabolisierung zurückführen. Eine weitere Gruppe in Basel beobachtete fast gleichzeitig vermehrte Nebenwirkungen in der Testung von Sparteine, einem antiarrhythmisch wirkenden Alkaloid (Eichelbaum et al., 1982). Auch diese Nebenwirkungen ließen sich auf eine individuell unterschiedlich ausgeprägte oxidative Aktivität zurückführen, die nur durch eine molekulargenetische Variante erklärbar war. Im weiteren Verlauf konnte diese genetische Variante tatsächlich entdeckt und benannt werden.

Das kodierende Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosom 22. Das exprimierte Isoenzym zeigt sich als hoch polymorph. Mindestens 15 von 50 bekannten Mutationen führen dazu, dass CYP2D6 nicht gebildet wird, bzw. eine reduzierte Enzymaktivität aufweist.

1.3. Polymorphismen von CYP2D6

Die zur Zeit bekannten Allele werden ständig aktualisiert und erneuert und sind im Internet zu finden: www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp2d6.htm.

Zum Zeitpunkt der Beendigung dieser Arbeit sind dort 83 verschiedene Allele benannt. Bei nahezu 50 Arzneimitteln wird der Metabolismus ausschließlich, beziehungsweise hauptsächlich durch CYP2D6 katalysiert. Dies entspricht circa 20% der in der Leber metabolisierten Pharmazeutika.

Eine Tabelle zu arzneimittelrelevanten Cytochrom-P450-Enzymen und deren Interaktionen findet sich ebenfalls im Internet unter: www.medicine.iupui.edu/flockhart

Tabelle 1: Klinisch relevant Substrate für CYP2D6

Substanzklasse	Substrate
Analgetika	Tramadol, Phenacetin, Codein
β-Blocker	Metoprolol, Carvedilol, Alprenolol
Antiarrhythmika	Propafenon, Encainid, Flecainid, Mexiletin, Spartein
Antidepressiva	Amitriptylin, Clomipramin, Desipramin, Fluoxetin, Fluvoxamin, Imipramin, Maprotilin, Nortriptylin, Paroxetin
Neuroleptika	Haloperidol, Perhexilin, Perphenazin, Risperidon, Thioridazin
Diverse	Ondansetron, Amphetamin, Methoxiamphetamin

Die wichtigsten genetischen Varianten innerhalb der Mutationen sind vorzeitige Stopcodons, Frame-shift-Mutationen und große Deletionen (Gough et al.1990, Sachse et al., 1997).

Ein solcher Enzymdefekt, der mit dem Verlust der Enzymaktivität assoziiert ist, kann zu zwei verschiedenen Folgen für die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik führen:

- a) Durch einen verminderten beziehungsweise fehlenden Abbau eines Medikamentes, z.B. in Folge eines Verlustes des CYP2D6-Enzymes, kann es zu Wirkungsverlängerung und Überdosierungserscheinungen kommen (trizyklische Antidepressiva, Antiarrhythmika, β-Blocker, Haloperidol) (Siehe Tabelle 1).

b) Entfaltet ein Arzneimittel, wie z.B. Codein, seine pharmakologische Wirkung erst nach Umwandlung in seinen aktiven Metaboliten, so kommt es bei einer Defizienz von CYP2D6 zu einer fehlenden pharmakologischen Wirkung. Dies bedeutet im Fall von Codein: keine Analgesie.

Homozygote Träger einer solchen, für einen Wirkungsverlust verantwortlichen Mutation, bezeichnet man als „Poor-Metabolizer“ (PM).

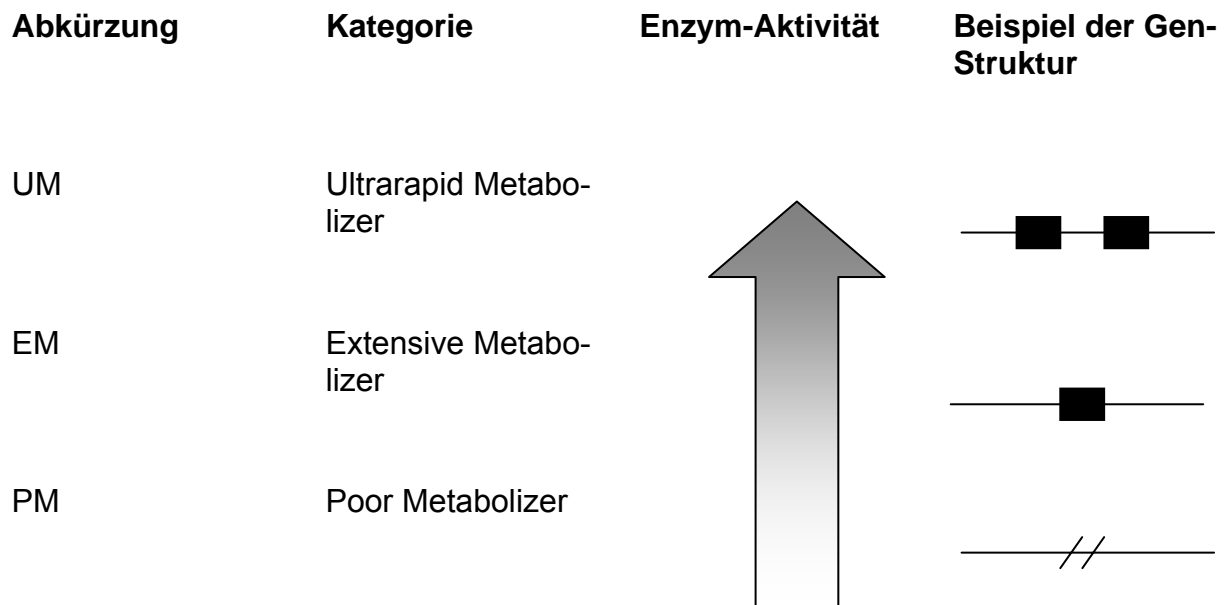


Abbildung 2: CYP2D6 Phänotypen und Beispiele für genotypische Entsprechungen
(nach Jobling et al., 2004)

8-10% der kaukasischen Bevölkerung sind von dem Polymorphismus des Isoenzym 2D6, der autosomal rezessiv vererbt wird, betroffen (Stüven et al., 1996; Sachse et al., 1997).

Tabelle 2: Allelhäufigkeiten der Polymorphismen
(modifiziert nach Sachse et al., 1997 und Ingelman- Sundberg, 2001)

	Mutation	Allelhäufigkeit
*3	A 2637 Del	1,3–3,0 %
*4	G 1934 A	18–23 %
*5	CYP 2D6 Del	1,2–2,9 %
*6	T 1795 Del	0,4 –1,7 %
*7	A 3023 C	0–0,5 %
*8	G 1846 T	0–0,3 %

Die verschiedenen Mutationen führen zu unterschiedlichen Folgen für das CYP2D6. So werden z.B. im Falle des CYP2D6*4, des häufigsten mit dem PM- Status assoziierten Polymorphismus bei Kaukasiern, durch Punktmutation instabile Proteine gebildet (Kagimoto et al., 1990). Dies betrifft auch die Mutation CYP2D*8. Ein weiterer Auslöser für die Bildung nicht funktionstüchtiger Enzyme können aber auch einzelne Basendeletionen sein, wie im Fall von CYP2D6*6 (Saxena et al., 1994; Evert et al., 1994) und CYP2D6*3 (Kagimoto et al., 1990). Bei CYP2D6*5 ist das gesamte CYP2D6 deletiert (Gaedigk et al., 1991; Steen et al., 1995). Im Falle von CYP2D6*7 wird zwar ein komplettes, aber nicht funktionelles Protein synthetisiert (Evert et al., 1994).

Diese Studie untersucht nun die so genannten „Poor-Metabolizer“ (PM) mit zwei identischen nicht funktionellen Allelen, z.B. CYP2D6*4/*4. Zu den PM zählen ebenfalls die Träger von zwei verschiedenen PM- assoziierten Mutationen, so genannte „Compound Heterozygotes“, z.B. CYP2D6*4/*3. In Abhängigkeit von ihrer Allel- Kombination sind Patienten entweder zur Gruppe der PM, also Patienten ohne aktive Allele, also ohne Expression, den „ultraschnellen Verstoffwechslern“ UM (extreme Überexpression) oder den „intermediär (verminderte Expression) oder normal Verstoffwechslern“ zu zählen.

So wie dies für die PM bedeutet, dass Verstoffwechslungsvorgänge nicht durchgeführt werden können, bedeutet dies für die UM, dass Substrate besonders schnell abgebaut werden und somit Blutspiegel des betroffenen Medikamentes unterhalb des therapeutischen Bereiches liegen. Experimentelle Schmerzstudien an gesunden Probanden zeigten bereits eine verminderte analgetische Wirkung des Tramadol bei PM (Poulsen et al., 1996). In dieser Studie wird der Einfluss des CYP2D6 Genotyps auf die postoperative Analgesie im klinischen Kontext untersucht.

Tabelle 3: Auswirkungen der Polymorphismen auf die Verstoffwechslung
(aus: Brockmöller et al., 2000)

Die folgende Tabelle zeigt verschiedene Genotypen und ihre Enzymaktivität.

Genotyp	Aktive Allele	Metabolischer Status	Enzym- Aktivität
CYP2D6*2xM/*2xM	4	UM	erhöht
CYP2D6*1/*2xM	3	UM	erhöht
CYP2D6*1/*1	2	EM	extensive
CYP2D6*1/*3	1	EM	intermediär
CYP2D6*1/*4	1	EM	intermediär
CYP2D6*1/*5	1	EM	intermediär
CYP2D6*1/*6	1	EM	intermediär
CYP2D6*3/*3	0	PM	keine
CYP2D6*3/*4	0	PM	keine
CYP2D6*3/*5	0	PM	keine
CYP2D6*3/*6	0	PM	keine
CYP2D6*4/*4	0	PM	keine
CYP2D6*4/*5	0	PM	keine
CYP2D6*4/*6	0	PM	keine
CYP2D6*5/*5	0	PM	keine
CYP2D6*5/*6	0	PM	keine
CYP2D6*6/*6	0	PM	keine

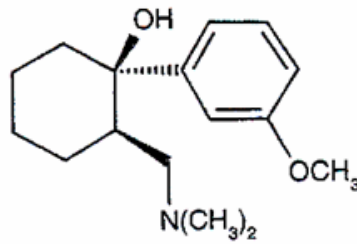
1.4. Verwendete Pharmaka

In der vorliegenden Studie wurde eine Kombination aus Tramadol, Metamizol und Metoclopramid hergestellt und den Patienten postoperativ mittels einer PCA-Pumpe (Patienten-kontrollierte-Analgesie) angeboten.

Die Verwendung von Metamizol und Tramadol in Kombination ist nun seit mehr als 20 Jahren bekannt und seine Wirksamkeit in mehreren Studien beschrieben (Krimmer et al., 1986; Lempa et al., 1999; Sprotte et al. 2000; Stamer et al., 2002). Unter der Bezeichnung „Würzburger Schmerztröpf“ (WST) findet diese Form der Kombination aus einem schwachen Opioid und einem peripher wirksamen Analgetikum eine weite Verbreitung. 1999 wurde in einer Umfrage zur postoperativen Schmerztherapie durch Stamer et al. nachgewiesen, dass 73,5% der antwortenden Kliniken eine kontinuierliche Analgetikaapplikation im Sinne des Würzburger Schmerztröpfes nutzten. Für die hier vorliegende Studie wurde das übliche Regime des WST in der Universitätsklinik Bonn, im Sinne einer Kombination aus Tramadol Metamizol und Metoclopramid, übernommen.

1.4.1. Tramadol

Tramadol ist ein synthetisch erzeugtes (+/-) 4-phenyl-piperidin Analogon des Codeins. (+/-) Tramadol bezeichnet eine racematische Mischung aus 2 Enantiomeren, jedes mit einer eigenen Affinität für unterschiedliche Rezeptoren. (+)Tramadol ist ein selektiver Agonist an μ -Opioid-Rezeptoren und hemmt die Serotonin-Wiederaufnahme (5-HT), während (-)Tramadol hauptsächlich die Noradrenalin/Norepinephrin-Wiederaufnahme hemmt (Poulsen et al., 1996). Der analgetische Effekt des Tramadols erklärt sich aus dem synergistischen Zusammenwirken seiner Enantiomere und deren Metabolite (Raffa et al., 1993; Grond et al., 1995). Tramadol wird beim Menschen im wesentlichen durch N- und O-Demethylierung sowie durch Konjugation der O-Demethylierungsprodukte mit Glucuronsäure metabolisiert. Nur O-Demethyltramadol (M1) ist pharmakologisch aktiv, tritt im Blut selbst aber in geringeren Konzentrationen auf als Tramadol selbst. Nach tierexperimentellen Befunden übertrifft O-Demethyltramadol die Wirkungsstärke der Muttersubstanz um den Faktor 2-4. Sein M1-Metabolit (O-Demethyltramadol) besitzt vermutlich die größte analgetische Potenz (Raffa et al., 1993; Poulsen et al., 1996a; Paar et al., 1997).



(+)-O-Demethyltramadol (M1) besitzt eine 200fach höhere Affinität am μ -Opioid-Rezeptor, als seine Ausgangssubstanz Tramadol (Poulsen et al., 1996). Es ist damit der Metabolit, der die eigentliche μ -Opioid-Rezeptor vermittelte Analgesie ausmacht. Aufgrund seiner schwachen agonistischen Wirkung am μ -Rezeptor, die 6000 mal schwächer ist, als die des Morphins, wird Tramadol als Opioid der WHO-Klassifikation Stufe II zugeordnet (Schug et al., 1990). Die O-Demethylierung des M1 Metaboliten erfordert das Enzym CYP2D6.

Nach oraler Einnahme zeigt Tramadol eine Bioverfügbarkeit von 68% mit der höchsten Serum-Konzentration nach 2 Stunden. Die Bioverfügbarkeit übersteigt damit die des Morphins (15-65%). Tramadol und seine Metaboliten werden fast vollständig renal eliminiert. Dabei wird etwa $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$ der verabreichten Dosis unverändert im Urin ausgeschieden. Die Halbwertszeit des Tramadols liegt bei $5,1 \pm 0,8$ Stunden (MW \pm SD), die seines M1-Metaboliten bei 9 Stunden bei einer einmaligen Gabe von 100 mg. Die empfohlene Dosierung von Tramadol liegt bei 50-100 mg alle 4-6 Stunden bei einer maximalen Tagesdosis von 400 mg/Tag. In der vorliegenden Studie warren bedingt durch das PCA-Verfahren theoretisch deutlich höhere Tagesmaximaldosen möglich.

Insgesamt ähneln die Nebenwirkungen denen starker Opiode, wenn sie auch zumeist in wenig schwerer Form in Erscheinung treten. Die unerwünschten Wirkungen umfassen neben Atemdepression und Sedierung auch eine Beeinträchtigung der Darmmotilität (Preston et al., 1991; Vickers et al., 1992; Budd, 1999; Shipton, 1999; Wilder-Smith et al., 1999; Pang et al., 2000). Diese treten jedoch im Verhältnis zu starken Opioiden seltener auf (Vickers et al., 1992 und 1995).

Die häufigsten Nebenwirkungen, Übelkeit und Erbrechen, sind dosisabhängig und treten besonders bei einer hohen Initialdosis und schneller i.v.-Gabe auf (Pang et al., 2000).

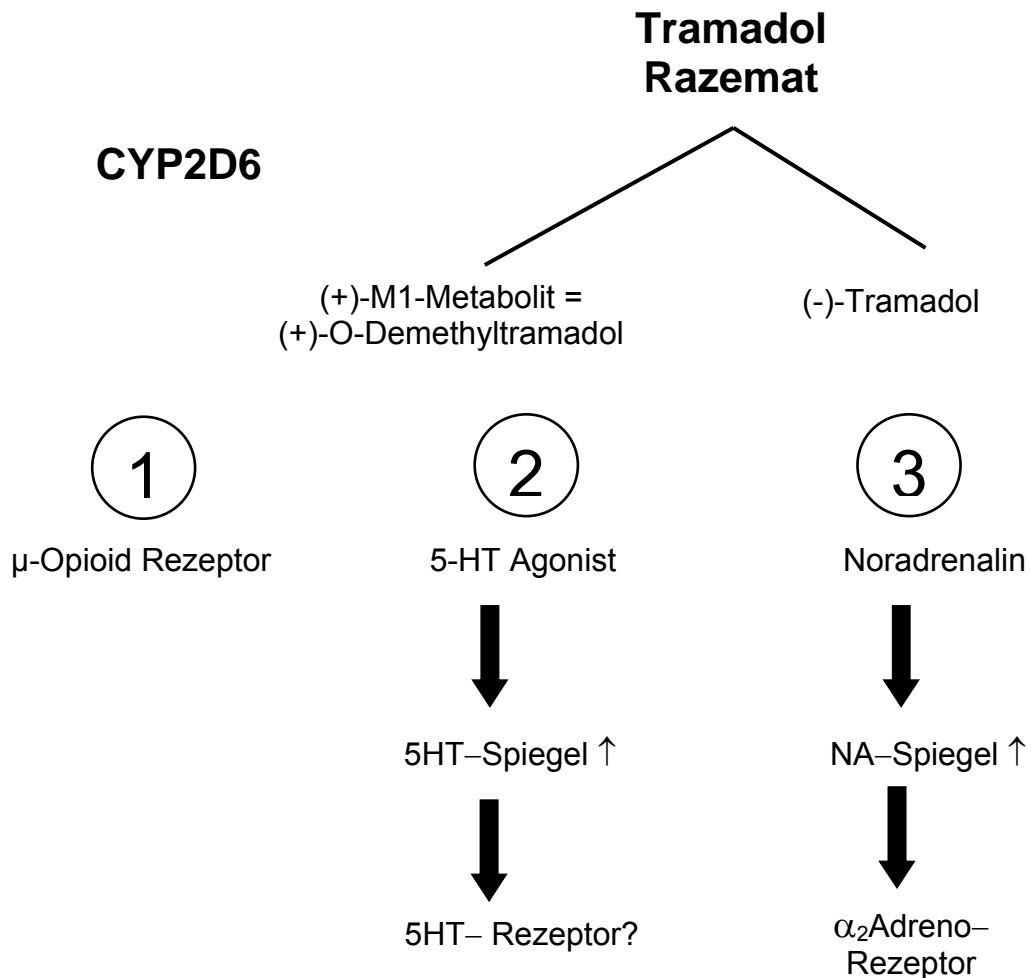


Abbildung 3: Wirkmechanismus des Tramadols

1.4.2. **Metamizol**

Als Koanalgetikum wurde in der vorliegenden Arbeit Metamizol verwendet. Unter den Nichtopioid-Analgetika besitzt Metamizol die höchste analgetische und antipyretische Potenz. Neben seiner peripheren Wirkung durch Hemmung der Cyclooxygenase und damit auch der Prostaglandinsynthese, besteht sein zentraler Mechanismus in der Aktivierung der absteigenden Schmerzhemmung im periaquäduktalen Hohlengrau. Im Gegensatz zur Acetylsalicylsäure zeigt es keine Wirkung auf die Thrombozytenaggregation und damit ist die Nebenwirkung einer vermehrten postoperativen Nachblutung zu vernachlässigen (Krimmer et al., 1986).

Durch die Hemmung der Prostaglandinsynthese vermindert Metamizol neben seiner analgetischen Wirkung auch die Azidität des Magensaftes und hat damit ein günstiges

Wirkungsspektrum bezüglich der Schleimhäute. Der Tonus der Bronchialmuskulatur nimmt ab. Unter den Nicht-Oioid-Analgetika besitzt Metamizol als einziges eine spasmolytische Wirkkomponente, was seinen bevorzugten Einsatz in der Viszeralchirurgie und Urologie mitbegründet.

Für Metamizol wurden immer wieder Überempfindlichkeitsreaktionen und ein erhöhtes Risiko einer Agranulozytose beschrieben. Seit der Boston-Studie von 1986 wird das Agranulozytose-Risiko bei Metamizol Einsatz auf 1:1.000.000 geschätzt mit einer Mortalität von ca.10% (The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study, 1986).

Seitdem eine effiziente Therapie der Agranulozytose (G-CSF) zur Verfügung steht, wurde der Vorbehalt gegen Metamizol zum Teil entkräftet (Huss et al., 1996). In dieser Studie wurde Metamizol als Analgetikum der Stufe I nach WHO aus additiven und synergistischen Erwägungen heraus mit Tramadol kombiniert. Metamizol zeigt sehr gute Eigenschaften bei alleiniger Gabe, aber auch in Kombination mit Opioiden (Maier et al., 1999).

1.4.3. **Metoclopramid**

Es können zwei verschiedene Wirkungen bei der Gabe von Metoclopramid unterschieden werden: 1. ein antiemetischer Effekt bei Übelkeit und Erbrechen und 2. eine Erhöhung des Tonus und der Peristaltik des oberen Gastrointestinaltraktes mit beschleunigter Magenentleerung und Dünndarmpassage.

Die antiemetische Wirkung wird über einen zentralen Angriffspunkt am Hirnstamm durch die Hemmung dopaminerger Neurone vermittelt. Die Motilitätssteigerung wird zum Teil ebenfalls von übergeordneten Zentren gesteuert, gleichzeitig spielt aber auch ein peripherer Wirkmechanismus über eine Aktivierung postganglionärer cholinergerezeptoren und möglicherweise eine Hemmung dopaminerger Rezeptoren des Magens und Dünndarm eine Rolle.

Nach intravenöser Verabreichung hält die Wirkung am Darm 20-40 Minuten an, die Beschleunigung der Magenentleerung etwa 3 Stunden, die antiemetische Wirkung bleibt länger bestehen. Um extrapyramidaler Störung zu vermeiden, empfiehlt der Hersteller eine maximale Tagesdosis von 80 mg. In der vorliegenden Studie konnten maximal 60 mg in 24 Stunden verabreicht werden. (Detli et al., 1996)

1.5. Fragestellung

Bei CYP2D6 handelt es sich um einen polymorphen Genort. Seine verschiedenen Allele können zu einer unterschiedlichen Enzymaktivität führen. Ist ein Patient ein Poor Metabolizer mit zwei nicht funktionstüchtigen Allelen, so kann er Tramadol nicht in seinen am μ -Rezeptor aktiven Metaboliten M1 umwandeln.

In dieser Studie soll untersucht werden, ob der CYP2D6 Genotyp die postoperative Analgesie beeinflusst. Hierfür wird der Analgetikaverbrauch und der Bedarf an Ausweichmedikation zwischen PM und Individuen mit einer erhaltenen Enzymfunktion in einem Kollektiv von 300 Patienten verglichen.

Korreliert nun ein schlechtes Ansprechen (hoher Tramadolverbrauch, eine zusätzliche Gabe von Ausweichmedikation) auf die analgetische Therapie mit Tramadol und Metamizol mit einer Mutation im Genlocus CYP2D6, der zu einer fehlenden Funktion dieses Isoenzym führt?

Würde ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Responseverhaltens auf Tramadol zwischen EM und PM gefunden werden, so könnte dies auch einen Einfluss auf die tägliche klinische Praxis haben.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die Untersuchung wurde entsprechend der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den gesetzlichen Grundlagen der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt. Die Ethik-Kommission der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn hat die Untersuchung geprüft und genehmigt.

Diese Studie umfasst ein Gesamtpatientenkollektiv von 300 Patienten der urologischen und chirurgischen Klinik der Universitätskliniken Bonn, die von Oktober 1998 bis Januar 2002 operiert wurden.

2.1.1. Ein-und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien

- Mittlere bis große Eingriffe, bei denen erfahrungsgemäß eine postoperative Schmerztherapie nötig ist. (Siehe Kapitel 2.2.2)
- Die Patienten sollten in der Lage sein, das System der patientenkontrollierten Analgesie zu verstehen und anzuwenden.
- ASA Klassifikation I – III der Amerikanischen Gesellschaft der Anästhesie
- Schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie.

Ausschlusskriterien

- Alter >80 Jahre oder <18 Jahre
- andere Schmerztherapien (z.B. Periduralkatheter)
- schwerwiegende peri- oder postoperative Komplikationen
- Drogenabhängigkeit, Schmerzmittelabusus, vorbestehende Therapie mit Analgetika
- bekannte Opioidunverträglichkeit
- Psychische Erkrankungen
- Epilepsie
- gravierende Herz-, Kreislauf-, Lungenerkrankung
- längerfristige postoperative Beatmung
- Allergien gegen die verwendeten Medikamente
- sprachliche Verständigungsprobleme mit dem Patienten

2.1.2. **Beendigungsgründe für die Schmerztherapie**

Reguläre Gründe für Beendigung der Schmerztherapie:

- keine Analgetika mehr notwendig
- Umstellung auf orale Medikation

Vorzeitige Beendigung bei:

- nicht beherrschbare Übelkeit oder Erbrechen im Zusammenhang mit Schmerzmitteltherapie
- mangelnde Kooperation des Patienten
- erneute Operation während der 48-stündigen Studiendauer
- längere postoperative Nachbeatmung

2.2. **Klinischer Untersuchungsablauf**

2.2.1. **Aufklärung**

Am Vortag der Operation wurde jeder Patient über den Ablauf der Studie aufgeklärt und sein schriftliches Einverständnis zur Studie eingeholt. Die Handhabung einer numerischen Ratingskala (NRS) zur subjektiven Bewertung der Schmerzstärke und der PCA-Pumpen wurde mit dem Patienten besprochen.

2.2.2. **Einteilung der Operationen**

Demographische und operationsbezogene Daten wurden erfasst und ausgewertet. Hierzu gehörten Alter, Geschlecht, Gewicht, ASA Klassifikation, Operationsart- und Dauer, Größe der Operation. Drei verschiedene Schweregrade des operativen Eingriffes, abhängig vom chirurgischen Vorgehen, wurden definiert.

- (1) kleiner Eingriff-offene Cholezystektomie, diagnostische Laparatomie
- (2) mittlerer Eingriff-Prostatektomie, Darmoperationen, Nephrektomie
- (3) großer Eingriff-Gastrektomie, Resektionen der Leber oder des Pankreas, ausgedehnte chirurgische oder urologische Operationen aufgrund einer Tumorerkrankung

2.2.3. Anästhesie

Nach Prämedikation mit jeweils 10 mg Tranxilium am Vorabend und OP-Tag wurde eine standardisierte Allgemeinnarkose durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Disoprivan 2-2,5 mg/kg, Cisatracurium 0,1 mg/kg und Remifentanil 0,5 µg/kg/min. Bei ausreichender Narkosetiefe wurde Remifentanil auf 0,1-0,2 µg/kg/min reduziert. Die Beatmung erfolgte mit O₂/Air (FiO₂ = 0,5) und Isofluran 0,5 MAC. Die weitere Relaxierung erfolgte nach Bedarf mit 0,03 mg/kg/KG Cisatracurium. Eine Antagonisierung von Opioid und Muskelrelaxans war nicht vorgesehen.

30 Minuten vor OP-Ende wurden 100 mg Tramadol, 1 g Metamizol und 10 mg Metoclopramid gemischt in 100 ml NaCl-Lösung infundiert.

2.2.4. Aufwachraum

Im Aufwachraum konnte bei einem Schmerzscore > 40 zunächst Tramadol nach Bedarf bis zu einer Maximaldosis von 3 mg/kg/KG und bei weiter persistierenden Schmerzen als Ausweichmedikation Piritramid injiziert werden. War eine ausreichende Analgesie erzielt (NRS ≤ 40), erfolgte die weitere postoperative Schmerztherapie mit einem Infusionsgemisch aus Tramadol (20 mg/ml), Metamizol (200 mg/ml) und Metoclopramid (0,4 mg/ml), das als PCA (Patienten kontrollierte Analgesie) i.v. appliziert wurde.

2.2.5. Studienphase

Die Patienten wurden mit PCA-Pumpen (Injektomat®-CP PACOM, Fresenius AG, Bad Homburg) im Aufwachraum versorgt. Der Inhalt der 50 ml PCA-Spritzen setzte sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 4: **Programmierung der PCA-Pumpe**

1. Bolus	20 mg Tramadol + 200 mg Metamizol + 0,4 mg Metoclopramid
2. Sperrzeit	8 Minuten
3. Bolusintervall	1 ml in 1,5 Minuten
4. Maximaldosis in 1 h	150 mg Tramadol
5. Maximaldosis in 4 h	400 mg Tramadol
6. Maximaldosis in 12h	600 mg Tramadol

2.3. Messung

2.3.1. Messung der Schmerzintensität

Der Analgetikaverbrauch wurde über 48 Stunden zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten dokumentiert.

Postoperativ wurde sofort im Aufwachraum und anschließend in stündlichen Intervallen bis zur 8. Stunde, dann nach 13, 18, 24, 30, 36 42 und 48 Stunden die Schmerzintensität in Ruhe und unter Belastung (tiefes Einatmen, Husten, Mobilisierung) dokumentiert. Schmerzscores wurden anhand einer numerischen Ratingskala von 0 bis 100 (0 = keine Schmerzen, 100 = schlimmster vorstellbarer Schmerz) erfasst.

Im Schmerzprotokoll wurde zusätzlich zur NRS, Blutdruck, Puls, Atemfrequenz und Sedierung festgehalten.

Bei unzureichender Analgesie konnte eine zusätzliche Kurzinfusion von 100 mg Tramadol und 1 g Metamizol erfolgen. Klage der Patient weiterhin über Schmerzen wurde zusätzlich Piritramid nach Bedarf bis zur Schmerzfreiheit intravenös injiziert.

Die Sedierung wurde anhand einer 5-Punkte-Skala ermittelt: 1 = Patient wach, spontane Kommunikation möglich; 2 = Patient schläfrig, Kommunikation möglich; 3 = Patient schläft, leicht erweckbar; 4 = Patient stark sediert, mit starken Stimuli weckbar; 5 = Patient nicht erweckbar.

Unerwünschte Ereignisse (Übelkeit und Erbrechen) wurden jeweils zu den Untersuchungszeitpunkten erfragt und dokumentiert

Der exakte Schmerzmittelverbrauch in mg, sowie die Anzahl und Uhrzeit der geforderten und gegebenen Boli, konnte durch Ausdruck des PCA-Protokolls (der gespeicherten Computerdaten im Gerät) ermittelt werden. In die Auswertung der Studie wurde der Schmerzmittelverbrauch der ersten 48 Stunden postoperativ berücksichtigt.

2.4. Abschlussfragebogen

Nach Beendigung der Schmerztherapie wurden die Patienten gebeten, einen Fragebogen auszufüllen, der sich auf die Zufriedenheit der Patienten mit der Schmerztherapie und deren Umsetzung beschäftigte (siehe Anhang).

Entscheidend für die spätere Auswertung waren folgende Fragen:

1. Gab es Situationen, in denen Sie trotz Schmerzbehandlung weiter Schmerzen hatten? Ja / Nein
2. Wenn ja, wann hat sich die Schmerzlinderung eingestellt? Innerhalb der ersten Minute, in den nächsten Stunden, gar nicht?
3. Wie beurteilen Sie die Schmerztherapie? Beurteilt in einer 5-Punkte-Skala von 1 =sehr gut bis 5 = schlecht.
4. Würden Sie die gleiche Schmerzbehandlung bei einer späteren, ähnlichen OP wieder in Anspruch nehmen wollen? Ja / Nein

2.5. Einteilung der Reaktion

2.5.1. Responder

Patienten wurden als Responder eingestuft, wenn sie folgende Bedingungen erfüllten:

- keine Ausweichmedikation während der 48-stündigen Therapie
- Anhand des Fragebogens:
 - Die gleiche Schmerztherapie würde auch bei einer zukünftigen OP erneut gewählt werden
 - Bewertung der Schmerztherapie mit 1, 2 oder 3 (Skala 1-5)
 - postoperativ keine längeren Phasen starker Schmerzen auftraten

2.5.2. Nonresponder

Patienten wurden als Non-Responder eingestuft, wenn sie folgende Bedingungen erfüllten:

- Wenn die Therapie aufgrund von Nebenwirkung oder insuffizienter Schmerztherapie abgebrochen wurde
- Ausweichmedikation (Piritramid) aufgrund unzureichender Analgesie nötig wurde
- Anhand des Fragebogens
 - Wenn der Patienten diese Form der Schmerztherapie nicht wieder wählen würden
 - Bewertung der Schmerztherapie mit 4 oder 5 (Skala 1-5)
 - Die Schmerzmittelwirkung erst nach Stunden oder gar nicht einsetzte

2.6. Molekularbiologische Untersuchung

2.6.1. Präparation der Genomischen DNA

Da alle kernhaltigen Zellen eines Menschen genomische DNA enthalten, gibt es in der isolierten DNA eine große Anzahl identischer DNA Sequenzen. Dies ermöglicht es mithilfe einer Restriktionsendonuklease die DNA so zu verdauen, dass eine zufällige Verteilung von Schnittstellen in der DNA entsteht. So erhält man repräsentative Sequenzen des Ausgangsmaterials. Basierend auf einer Salz-Präzipitationsmethode wird genomische, leukozytäre DNA aus unkoaguliertem, peripheren EDTA-Vollblut gewonnen.

Nach dieser Standardmethode werden die Zellen in Anwesenheit eines DNA schützenden anionischen Detergenz lysiert. Diese Lyse-Lösung zerstört zum Einen zelluläre Komponenten, zum Anderen schützt es die DNA indem es die Aktivität DNA-verdauernder Enzyme, im Besonderen die der DNase, unterdrückt. DNasen kommen in jeder Zelle ubiquitär vor und können die Präparation stark beeinträchtigen. Ebenfalls verschmutzt wird die entstehende Lösung durch RNA, die durch zugegebene RNasen verdaut werden. Kontaminierende zytoplasmatische und nukleäre Proteine werden durch Salz-Präzipitation entfernt.

2.6.2. Amplifikation des microsomalen Cytochrom P450 Isoenzym CYP2D6

Die PCR (Polymerase Chain Reaktion oder Polymerasekettenreaktion) ist eine in vitro Methode um zellunabhängig spezifische DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Das Ausgangsmaterial dafür kann die gesamte genomische DNA, gewonnen aus Vollblut, sein. Man kann auch aus einer heterogenen Sammlung an DNA-Sequenzen selektive Abschnitte vervielfältigen. Voraussetzung für diese gezielte Amplifikation ist die Kenntnis der die Zielsequenz einrahmenden Nucleotide.

Als Startmoleküle dienen Oligonucleotide, die so genannten Primer, die an die Matrizen-DNA hybridisieren. Von deren 3`-Ende aus synthetisiert eine hitzstabile DNA-Polymerase den neuen DNA-Doppelstrang. Im ersten Zyklus entstehen zwei neue DNA Stränge, deren Größe durch die 5`Enden der Primer bestimmt wird, die 3`Enden sind variabel. Die neuen DNA Stränge sind komplementär zu Ihrer DNA-Zielsequenz und überlappen einander. Nach nur wenigen Zyklen sind die 3`Enden fixiert, da die Synthese nicht über die Primer hinausgehen kann. Man erhält die Hauptzahl der Produkte in der gewünschten Länge.

Da die PCR eine Kettenreaktion ist, sind die neu-synthetisierten Stränge jeweils die Matrix für die folgende Reaktion, woraus sich eine exponentielle Vermehrung ergibt

(Siehe Abbildung 5)

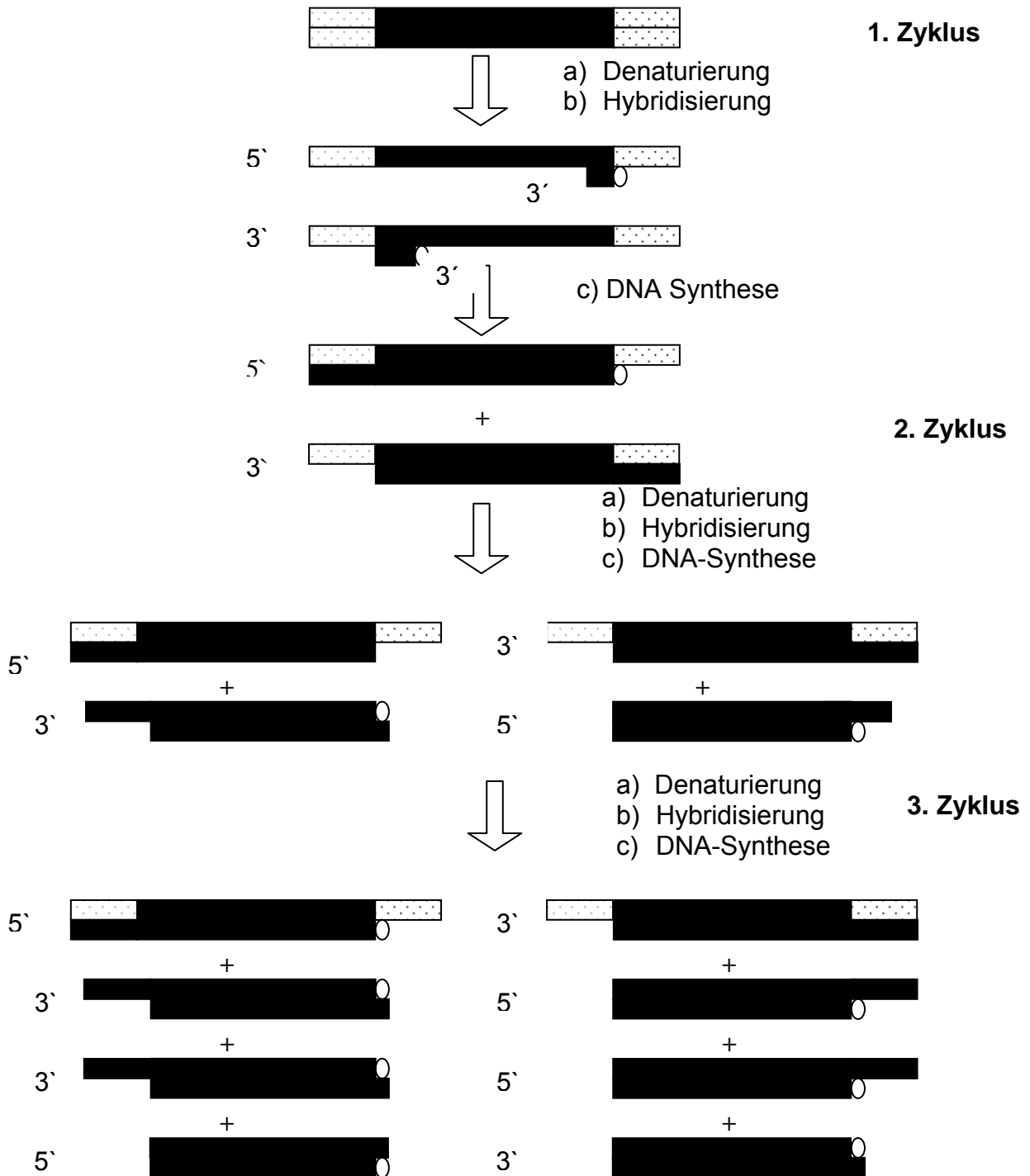


Abbildung 4: Schema der PCR (nach Singer und Berg 1992).

Ziel der PCR ist die Vermehrung einer bestimmten DNA-Sequenz. Die PCR besteht aus sich wiederholenden Zyklen, die ihrerseits jeweils drei Schritte beinhalten:

- Denaturierung der DNA-Doppelstränge
- Hybridisierung der Primer an die komplementären Stellen
- Synthese des zwischen den Primern liegenden DNA-Bereiches durch hitzestabile DNA-Polymerase.

2.6.3. **Primer**

Die verwendeten Primer wurden nach folgenden Prinzipien entworfen:

1. Länge: so nah wie möglich an CYP2D6, in der Präamplifikation sogar spezifisch für CYP2D6
2. Basenzusammensetzung: Vermeidung tandemförmiger Wiederholungen, da die Gefahr der intra-/inter Strang-Basenpaarung besteht. Der Gesamtprozentsatz an GC muss so sein, dass der ganze Strang eine möglichst gleiche Schmelztemperatur hat.
3. 3'Ende: Vermeidung komplementärer 3'Enden, da die Primer sonst Dimere bilden können.

2.6.4. Analyse der PCR Produkte und Elektrophorese

Die Elektrophorese basiert auf dem Prinzip der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Die DNA ist in einem neutralen pH-Bereich negativ geladen. Da die Längen der in einer PCR entstehenden DNA-Fragmente unterschiedlich sind, kann man sie mithilfe der Elektrophorese in einem elektrischen Feld voneinander separieren.

Die als Grundlage für die Elektrophorese genutzte Gelphase besteht aus Agarose, ein lineares Polymer, gewonnen aus Algen. In Anwesenheit eines geeigneten Puffers wandelt sich das getrocknete Agarose-Extrakt unter Hitzeeinwirkung in eine klare, transparente Flüssigkeit.

Die DNA wird mit Ethidiumbromid markiert, um sie nach der Elektrophorese unter einem UV-Licht sichtbar zu machen. Ethidiumbromid (EtBr) interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und entwindet sie. Je weniger Ethidiumbromid enthalten ist, desto dichter sind die EtBr-DNA-Komplexe.

Wird diese Lösung in eine Form gegeben, so entsteht bei Abkühlung eine Matrix, deren Dichte durch den Gehalt an Agarose bestimmt wird. In vorgeformte Laschen kann die DNA, gelöst in einer Trägersubstanz im angelegten elektrischen Feld wandern. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die DNA-Fragmente dabei zur Anode.

Abhängig ist die Wanderungstrecke von verschiedenen Parametern, wie der molekularen DNA Größe, ihrer Konformation, der angelegten Spannung, der Anwesenheit eines interkalierenden Farbstoffe und der Zusammensetzung der Puffer. Moleküle einer einfachen, doppelsträngigen DNA wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Gelmatrix, die umgekehrt proportional zu \log_{10} der Anzahl ihrer Basenpaare ist (Sambrook et al., 1989).

2.6.5. Methodik der Genotypisierung

Noch während des Aufenthaltes im Aufwachraum wurde den Patienten aus dem liegenden venösen Zugang eine Blutprobe (2 ml EDTA-Blut) entnommen. Das Vollblut wurde eingefroren und bei -20 °C bis zur Isolation der genomischen DNA gelagert. Die Genotypisierung schloss sich an die Beendigung des klinischen Teils der Studie an.

Arbeitsschritte (Pure Gene DNA Isolations Kit, Genra Systems):

1. Lyse der Erythrozyten: Es wurden 300 µl venöses Vollblut der Patienten aus den Proben entnommen und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, während dieser Zeit wurde die Probe einmal invertiert.
2. Lyse der kernhaltigen Zellen: Hiernach wurde die Probe für 20 Sekunden bei 12.000 U/min zentrifugiert, 300µl Zell-Lösungs-Suspension zugegeben und der Überstand abpipettiert und verworfen.
3. RNase Behandlung: Nach Hinzufügen von 1,5 µl RNase A Lösung wurde das Röhrchen 25 Mal invertiert und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert.
4. Protein Präzipitation (Salz): 100 µl Protein Präzipitations Lösung wurden beigegeben, 20 Sekunden gevortext und bei 12.000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert.
5. DNA-Präzipitation (Isopropanol/Ethanol): Der Überstand wurde in ein zweites Röhrchen, das bereits 300 µl Isopropanol (2-Propanol) enthielt übertragen. Invertierung der Probe circa 50 Mal, bis ein weißlicher Überstand sichtbar wurde. Erneutes Zentrifugieren bei 12.000 U/min für 1 Minute und Dekantieren des Überstandes. Die Reste des Alkohols wurden mit einem sauberen Tuch abgesaugt. Die DNA wurde ein weiteres Mal mit Alkohol, jetzt mit 300 µl Ethanol 70 % versetzt, die Lösung weitere 5 Mal invertiert, zentrifugiert, der Überstand dekantiert und von Resten des Alkohol entfernt. Zum Abschluss wurde 100 µl DNA Hydrations Lösung zugesetzt und die Probe bei 65 °C im Thermomixer für 30 Minuten inkubiert.
6. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.
Die entstehenden DNA Fragmente mit einer durchschnittliche Länge von 100-200 kb, bilden die Grundsubstanz für die weitere Analyse.

2.6.6. **Analyse der gewonnenen DNA**

Die entstehenden DNA Fragmente mit einer durchschnittliche Länge von 100-200 kb, bilden die Grundsubstanz für die weitere Analyse.

Um ein schnelleres Verfahren zur simultanen Darstellung der wichtigsten PM-assozierten Polymorphismen CYP2D6*3, *4, *6, *7 und *8 zu erreichen, wurden „Long distance“ und „Multiplex PCR“ Techniken kombiniert.

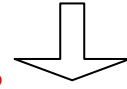
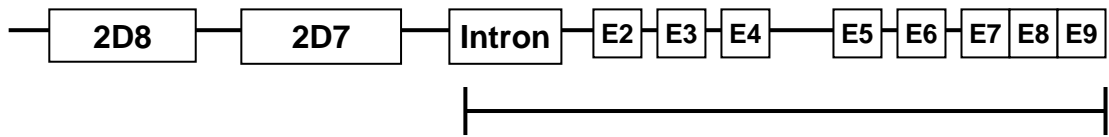
Unter „Long-PCR“ versteht man die Amplifikation eines langen Produktes aus der genomischen DNA, die sicher die gesuchten DNA-Abschnitte enthält. Das Produkt der in dieser Studie durchgeführten „Long-PCR“ ist ein 1647 bp großes Fragment. Der Primer für diesen Arbeitsschritt ist so designed, dass die Pseudogene CYP2D7 und CYP2D8 sicher nicht enthalten sind, und es nicht zu einer ungewollten Amplifikation in der weiteren PCR kommt.

Eine „Multiplex-PCR“ beschreibt das Verwenden verschiedener Primer in einem PCR Reaktion. Insgesamt laufen in dieser Multiplex PCR 5 einzelne PCR Reaktionen ab. Die 10 Reverse Primer setzen sich aus 5 wildtypspezifischen (cy *3, cy *4, cy *6, cy *7, cy *8) und 5 mutationsspezifischen Primern (cym *3, cym *4, cym *6, cym *7, cym *8) zusammen.

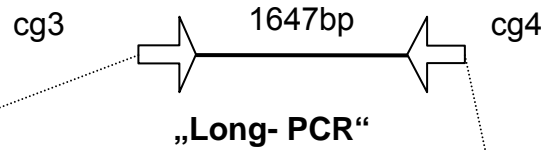
Als Forward Primer dient für alle Reaktionen der Primer cy/cym. Dieser 5'Primer cy/cym liegt eng an diesen Mutationen *4, *6 und *8.

Für jeden Patienten wurde ein Ansatz mit den Wildtyp- und ein Ansatz mit den Mutantenspezifischen Primern gefahren. Dies ist nötig, um die verschiedenen Allele zweifelsfrei zu identifizieren. Ein Mutations-Allel ist eindeutig durch sein Erscheinen in der Gel-Elektrophorese zu erkennen. Erscheint hier nur die mutationsspezifische Bande und nicht die dazugehörige Wildtyp-Bande, zeigt dies einen PM-Genotyp an, da diese Situation nur mit einer Homozygotie für diesen Polymorphismus zu vereinbaren ist.

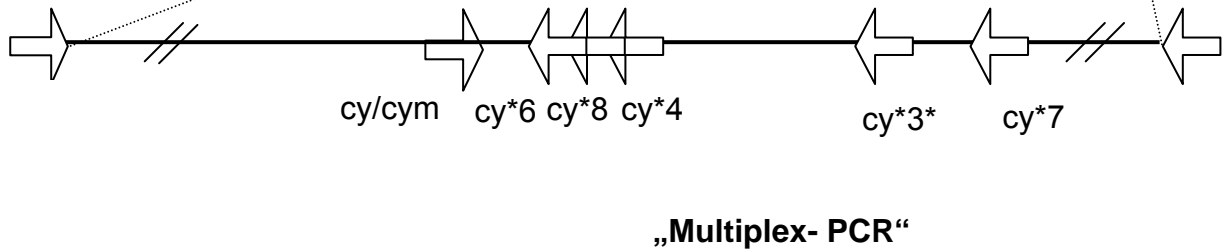
Sind alle Wildtyp-Banden vorhanden, repräsentiert dies eindeutig einen EM Genotyp. Sind zwei verschiedene Polymorphismen im selben Lauf zu sehen, zeigt dies einen „compound“ Heterozygoten PM Genotyp



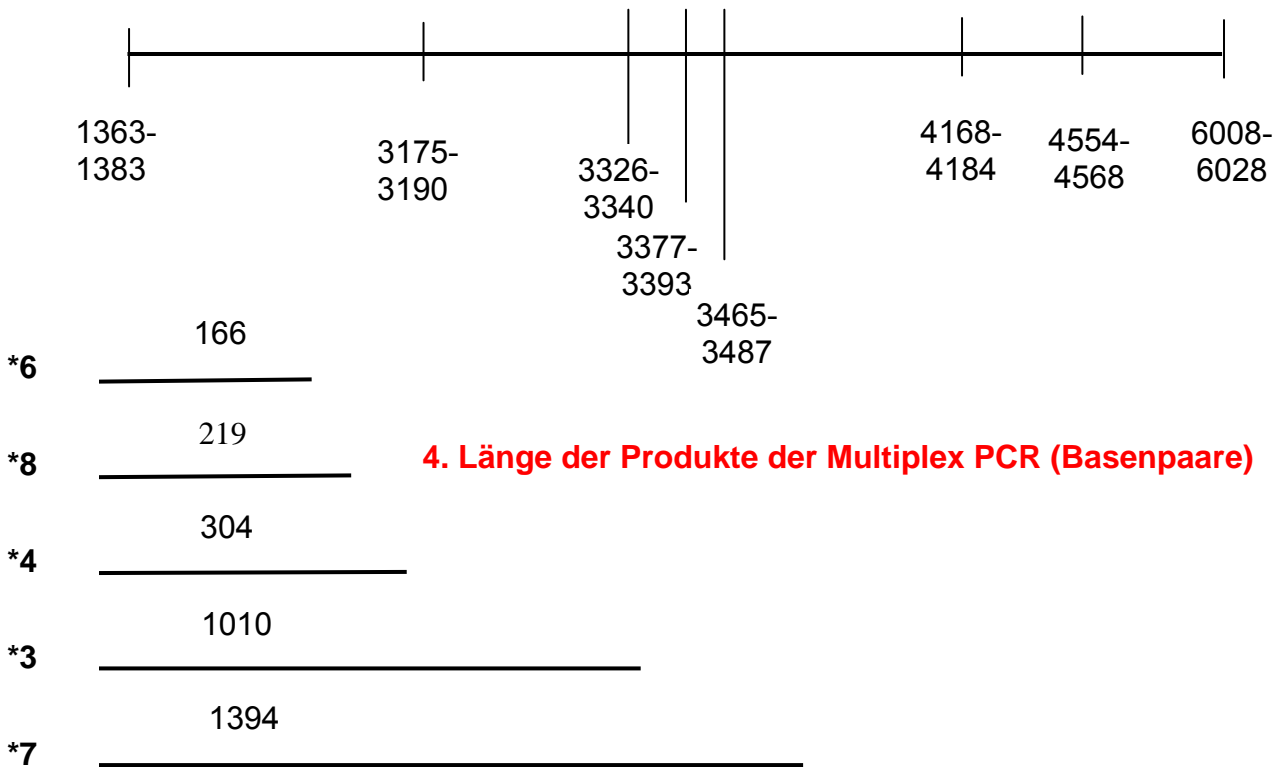
1. Genabschnitt und resultierendes erstes Produkt der PCR



2. mittels der Multiplex PCR werden die einzelnen Mutationen sichtbar



3. Positionsnummern des Ansatzes der Primer



4. Länge der Produkte der Multiplex PCR (Basenpaare)

Abbildung 5: Genotypisierung von CYP2D6 (angelehnt an Stüven et al., 1996)

Kommentar zu Abbildung 5:

Darstellung der einzelnen Schritte von der genomischen DNA zur Angabe der genauen Längen, der durch die „Multiplex-PCR“ gewonnenen Produkte.

1. Mittels „Long-PCR“ wird aus dem Genabschnitt auf Chromosom 22 ein Produkt synthetisiert. Der zur Amplifizierung notwendigen Primer wurde so gewählt, dass alle Mutationsabschnitte im betreffenden DNA-Abschnitt zu finden sind.

2. Im anschließenden Arbeitsschritt wurden die mutationstragenden Abschnitte mittels einer „Multiplex-PCR“ dargestellt. In diesem Abschnitt der Graphik ist die Laufrichtung der Primer dargestellt. Der reverse Weg des Primers cy/cym führt zur exakten Darstellung der eng aneinander liegenden Mutationen *4, *6 und *8.

3. Dargestellt sind die exakten Ausgangspositionsnummern der mutationsspezifischen Primer.

4. Angaben zu den Längen in Basenpaaren der gewonnenen Produkte aus der „Multiplex-PCR“.

Tabelle 5: Verwendete Multiplex-Primer mit Positionsnummern“.
Nummerierung nach Kimura et al., 1989

Name	Sequenz	Position	Autor
cy/cym	GTG GGG CTA ATG CCT T	1644/1659	Stüven et al. 1996
cy *3	GGG TCC CAG GTC ATC CT	2653/2637	Stüven et al. 1996
cy *3m	GGG TCC CAG GTC ATC CG		Stüven et al., 1995
cy *4	CGA AAG GGG CGT CC	1947/1934	Heim & Meyer 1990
cy *4m	CGA AAG GGG CGT CT		Heim & Meyer 1990
cy *6	CTC CTC GGT CAC CCA	1809/1795l	Stüven et al. 1996
cy *6m	CTC CTC GGT CAC CCC		Stüven et al. 1996
cy *7	GCT GCA CAT CCG GAT	3037/3023	Stüven et al. 1996
cy *7m	GCT GCA CAT CCG GAG		Stüven et al. 1996
cy *8	TCT GCC CAT CAC CCA CC	1862/1846	Broly et al., 1995
cy *8m	TCT GCC CAT CAC CCA CA		Broly et al., 1995

2.6.7. Präamplifikation („Long PCR“)

Die Primersequenz für den von uns benannten Primer cg3 und cg4 lautet:

cg 3: 5`-CAAGGTGGATGCACAAAGAGT-3`

cg 4: 5`-ACACTCCTTCTTGCCTCCTAT-3`

Konzentration: Ein 20 µl Ansatz einer Probe enthält: 9,8 µl ddH₂O, 2 µl MgCl 15 mM, PCR Puffer, je 2 µl Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2,5 mM, jeweils 2 µl Primer.

2 µl genomische DNA (dies entspricht 200 ng) wurden dem Ansatz beigefügt und der Gesamtansatz auf Eis gegeben. Nach Beigabe von 0,2 µl Taq Polymerase (2,5 U/µl) erfolgte die Amplifizierung nach folgendem PCR Protokoll:

Tabelle 6: PCR Programmierung

	Temperatur	Zeit (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3:00	1
Denaturierung	95 °C	0:30	} 35
Annealing	62 °C	0:30	
Extension	72 °C	0:30	
Finale Extension	72 °C	6:00	
Abkühlung	4 °C	∞	1

Anschließend wurden die PCR Produkte mittels Gel-Elektrophorese dargestellt. Für die „Long-PCR“ wurde ein 1,6%iges Agarose Gel verwendet.

2.6.8. „Multiplex PCR“ mit Protokoll

Ein 20 µl Ansatz für eine DNA Probe enthält für einen Mischansatz mit Wildtyp- (Ansatz A) und mutationsspezifischen Primern (Ansatz B). Ansatz : 13,39 µl ddH₂O, 2 µl MgCl 15 mM PCR-Puffer, je 2 µl Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2,5 mM, 1,88 µl Primer-Ansatz A und 1,6 µl Primer-Ansatz B, je 20 µM .

Tabelle 7: Ansatz der Primer in der „Multiplex-PCR“

Wildtyp PCR		Mutantenspezifische PCR	
Primer A	Absolutmenge	Primer B	Absolutmenge
cym	0,8 µl	cym	0,8 µl
cy *3	0,04 µl	cy *3m	0,04 µl
cy *4	0,48 µl	cy *4m	0,48 µl
cy *6	0,3 µl	cy *6m	0,05 µl
cy *7	0,1 µl	cy *7m	0,07 µl
cy *8	0,16 µl	cy *8m	0,16 µl
	ges.: 1,88 µl		ges.: 1,6 µl

2 µl genomische DNA (200 ng) wurden dem Ansatz beigefügt und der Gesamtansatz auf Eis gegeben. Nach Beigabe von 2 µl Taq Polymerase (2,5 U/µl) erfolgte die Amplifizierung nach folgendem PCR Protokoll:

Tabelle 8 Programmierung des PCR Gerätes für die „Multiplex PCR“

	Temperatur	Zeit (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	0:30	1
Denaturierung	95 °C	0:30	} 20
Annealing	62 °C	0:15	
Extension	72 °C	1:00	
Finale Extension	72 °C	4:00	1
Abkühlung	4 °C	∞	

Für die in dieser Studie verwendete „Multiplex PCR“ mit DNA-Produkten in einer Größenordnung von 167-1394 bp wurde ein 2,5 %iges Agarosegel unter einer angelegten Spannung von 130 Volt über 30 Minuten verwendet.

2.6.9. Null-Allel mit Protokoll

Eine sechste Mutation, das so genannte "Null-Allel" (2D6*5), erzeugt keine Bande im Multiplex-Ansatz. Um eine fälschlicherweise fehlende Amplifikation bei der „Multiplex-PCR“ sicher ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine „Long-distance-PCR“ (Stehen et al., 1995; Stamer et al., 2002) durchgeführt, um die *5 Mutation sicher nachweisen zu können. Für diese PCR wurden zwei Primer verwendet, die beim Vorliegen der *5 Mutation eine 3,5 kb Bande erzeugen. PF Del : 5`ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA 3` und PR Del: 5`GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C 3`. Ein weiterer Kontrollprimer (PF KontrDel: 5` CGT CTA GTG GGG AGA CAA AC 3`) wurde hinzugefügt, um ein 4,2-kb Fragment im Wildtyp-Allel nachzuweisen.

Eine Reaktion beinhaltet 5 ng genomischer DNA, 2,5 mM Desoxynukleotid-Trisphosphat und 3,5 U/µl Expand Long DNA Polymerase.

Tabelle 9 Programmierung des PCR Gerätes für die „Null-Allel“ PCR

	Temperatur	Zeit (min)	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	2:00	1
Denaturierung	96 °C	0:10	} 35
Annealing	66 °C	0:20	
Extension	68 °C	9 :00	
Finale Extension	68 °C	7:00	1
Abkühlung	4 °C	∞	

Das PCR Produkt wurde auf einer 0,9% Agarose Gel Elektrophorese sichtbar gemacht.

2.7. Statistik

In einer Studie von Stamer et al., 2003, in der ebenfalls Tramadol und Metanizol zum Einsatz kamen, fanden sich 18 % Non-Responder in den 48 Stunden der Studiendauer. Bei der Annahme, dass bei den PM die Rate de Non-Responder doppelt so hoch ist wie bei den EM, also ca. 40% versus 20%, errechnet sich eine Mindestanzahl von 31 PM, um eine statistische Aussagekraft von $1-\beta = 0,8$ zu erhalten.

Um eine ausreichende Zahl von PM bei einer Inzidenz des PM-Status von 10 % in die Untersuchung einzuschliessen, errechnet sich eine nötige Gesamtzahl von 300 Patienten.

Die statistische Auswertung wurde anhand Statistica Version 5.1 durchgeführt. Demographische-, chirurgische- und schmerzbezogene Daten, wie Schmerzmittelverbrauch, Schmerzintensitäten und der Bedarf an Ausweichmedikation wurden zwischen Patienten mit erhaltener Enzymfunktion, im Folgenden als „EM“ bezeichnet, und PM verglichen. Normal verteilte Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung, nicht normalverteilte Werte als Mediane (25-75 %-Perzentile) angegeben. T-Test und Mann-Whitney-U-Tests wurden zur statistischen Beurteilung zwischen den beiden Gruppen, χ^2 -Test für den Vergleich der Häufigkeiten genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

2.8. Zielkriterien

1. Vergleich des Responseverhaltens für Extensive Metabolizer und Poor Metabolizer:
Gibt es einen Unterschied in der Anzahl der Responder / Nonresponder zwischen EM und PM?
2. Analgetikaverbrauch und Bedarf an Ausweichmedikation für EM und PM.

2.9. Material

2.9.1. Kleingeräte und Materialien

Eppendorf Reference Pipetten, Eppendorf
Eppendorf, Reaktionsgefäße, Sarstedt
PCR Reaktionsgefäße, Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen, Biozym, Oldendorf

2.9.2. Technische Geräte

Elektrophoresekammer Wide Mini-Sub DNA Electrophoresis cell, Bio Rad, Richmond, USA
Gene Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus, Connecticut, USA
Kühlzentrifuge, Biotech 15 R, Heraeus, Sepatech, Osterode
Microwelle De Luxe M 686, Miele
Polaroidkamera CU 5, Desaga GmbH, Heidelberg
Spannungsquelle Model 200/2,0, Constant Voltage Power Supply, Bio Rad, Richmond, USA
UV Lichtquelle Transluminator, Stratagene Ag
Waage Laboratory BP 310 S, Sartorius
Zentrifuge 400 R, Kendro Laboratory Products, Osterode

2.9.3. Chemikalien

10x Tris-Borsäure-EDTA Puffer, Bio Rad, Richmond, USA
Ampuwa (Steriles pyrogenfreies Aqua ad injectabilia), Fresenius AG
Bromphenol Blau, Sigma Cematic Co, St.Louis, USA
Loading Puffer (Na_2CO_3 , NaHCO_3 ; NaN_3 , pH 9,5 bei 4N HCl), Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen
Ethanol, 70% und 100%, Sigma chemical Co, St.Louis, USA
Ethidium Bromid Tabletten, Sigma Cematic Co, St.Louis, USA
Expand Long Template PCR System DNA Polymerase, Roche Penzberg Germany)
Phosphate buffered Saline (NaCl , KCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4), Sigma Aldrich GmbH, Deisenhofen

Pure Gene DNA Isolations Kit, Gentra Systems

Ultrapure dTNP-set, Pharmacia Biotech, USA

Vent DNA Polymerase Puffer (100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mM Tris-HCl (pH 8,8; bei 25 °C), 20 mM MgSO_4 und 0,1 % Triton X-100), New England Bio Labs, Beverly, USA

Vent DNA Polymerase, New England Bio Labs, Beverly, USA

Xylene Cyanol FF, Sigma Chemical Co, St.Louis, USA

Taq Polymerase Applied Biosystems, Darmstadt

3. Ergebnisse

3.1. Demographische Daten

Insgesamt wurden 300 Personen in die Studie aufgenommen und genotypisiert. Es handelte sich dabei um 115 Frauen und 185 Männer im Alter zwischen 18-79 Jahren (ASA I-III).

271 Patienten nahmen auch am klinischen Teil der Studie mit der 48-stündigen PCA-Phase teil und konnten so hinsichtlich Genotypisierung und Responseverhalten auf Tramadol beurteilt werden. Die Patienten verteilen sich auf die Hauptgruppen mit kleinem, mittleren und grossem operativen Eingriff. Hauptkriterien zur Zugehörigkeit der einzelnen Gruppen ist zum Einen die Grösse des verwendeten Schnittes, der zu postoperativ vermehrten Schmerzen führt, als auch das Ausmass der geschaffenen Wundhöhle. Es ergibt sich eine Verteilung von jeweils 13% für die grossen und kleinen, sowie 74% für die mittleren Eingriffe.

Tabelle 10: Verteilung der Eingriffe

Grösse des Eingriffes	Operation	Anzahl
Kleiner Eingriff	Offene Colezystektomie	40
	Diagnostische Laparotomie	
Mittlerer Eingriff	Prostatektomie, Nephrektomien	220
	Darmeingriffe	
Grosser Eingriff	Ausgedehnte Tumoreingriffe	39
	Resektionen Leber/Pankreas	

Innerhalb dieser Studie konnten 35 PM und 236 EM identifiziert werden. Bei 29 Patienten konnte kein kompletter Datensatz erhoben werden. Gründe für den Studienabbruch waren im Einzelnen: Längere postoperative Nachbeatmung (n = 4), Re-Operation innerhalb 48 Stunden (n = 4), Intraoperative chirurgische Probleme (n = 2), Fehlende Daten (z.B. fehlender PCA-Ausdruck oder fehlender Fragebogen, n = 19). Unter diesen 29 Patienten befanden sich weitere 5 PM und 24 EM.

Zwischen EM und PM ergab sich kein Unterschied hinsichtlich demographischer Daten oder Schweregrad der Operation (siehe Tabelle 7). Die Schwere der operativen Eingriffe spiegelt sich in der Dauer der Operation und der Anästhesie wieder.

Tabelle 11: Verteilung der Operations-/Anästhesiedauer auf Operationsgruppe.
Angabe ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung

Operationsgruppe	Dauer der Operation (min)	Dauer der Anästhesie (min)
I	159.2 \pm 64.4	201.3 \pm 70.3
II	208.2 \pm 76.2	255.9 \pm 80.1
III	250.4 \pm 101.6	306.5 \pm 104.7
	p<0,001	p<0,001

In der PCR zeigte sich eine Allel -Verteilung, die mit vorausgegangenen Studien in der kaukasischen Bevölkerung übereinstimmte. Diese gehen von einer 10 %igen Rate der kaukasischen Bevölkerung aus, die zwei nicht-funktionelle Allele für Cytochrom P4502D6 tragen (Alvan et al., 1990; Kalow, 1991).

Tabelle 12 : Demographische Daten der 300 an der Studie beteiligten Patienten. Angegeben ist jeweils Mittelwert \pm Standardabweichung, bzw. Anzahl (%) der Patienten

	Extensive Metabolizer (EM) n=236	Poor Metabolizer (PM) n=35	p	Patienten, die nicht an der klinischen Ana- lyse teilnah- men n=29
Alter (Jahre)	52,3 \pm 13,5	52,8 \pm 10,4	n.s.	61,4 \pm 12,7
Geschlecht: männlich/weiblich	150/91	19/11	n.s.	16/13
Gewicht (kg)	75,4 \pm 13,5	73,4 \pm 12,4	n.s.	72,7 \pm 19,5
Größe (cm)	172,5 \pm 10,2	172,0 \pm 11,1	n.s.	168,5 \pm 7,5
Dauer der OP (min)	204,1 \pm 78,9	207,0 \pm 82,4	n.s.	218,3 \pm 111,0
Dauer der Anästhesie (min)	251 \pm 83,0	258 \pm 89,6	n.s.	266 \pm 120,2
ASA-Klassifikation	31/165/45	1/26/3	n.s.	3/15/11
Schweregrad der OP				
I	34 (14,1%)	3 (10%)	n.s.	6 (20,7%)
II	178 (73,9%)	23 (76,7%)	n.s.	17 (58,6%)
III	29 (12,0%)	4 (13,3%)	n.s.	6 (20,7%)

3.2. Genotypisierung

3.2.1. Analyse der „Long PCR“

In der Analyse der Gele wurde nach „Long- PCR“ unter Nutzung des cg3, cg 4 Primers die entscheidende Bande unter UV-Licht sichtbar. Alle Patienten, bis auf den Genotypus *5/*5, zeigen die zu erwartende Bande bei 1647bp. Hiermit konnte das Produkt amplifiziert werden, dass die entscheidenden Genabschnitte für die Schlüsselmutationen beinhaltet. Zur Beurteilung des Molekulargewichtes ist links der Molekulargewichtsmarker (Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9) aufgetragen.

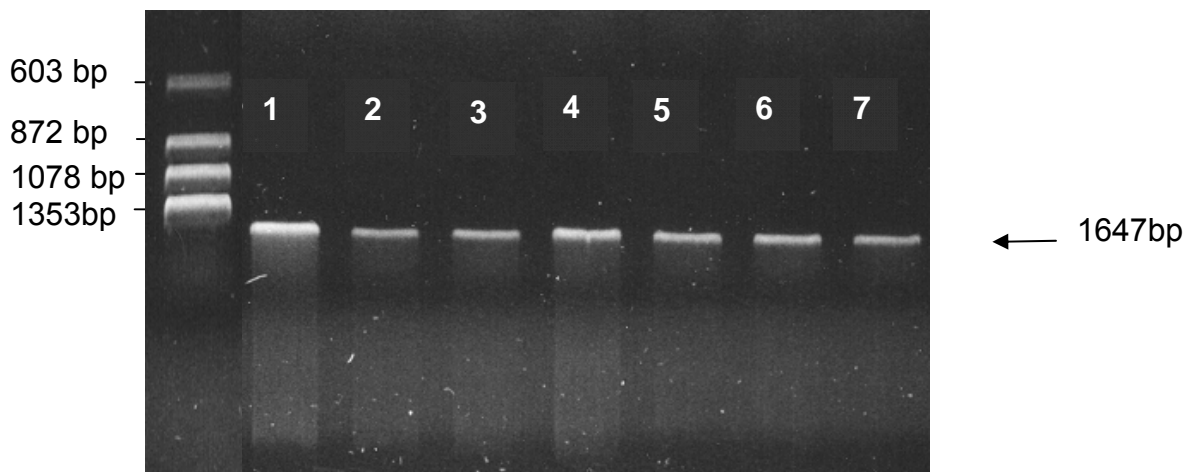


Abbildung 6: Gelelektrophorese „Long PCR“ mit Primer cg3 und cg4

3.2.2. Analyse der „Multiplex- PCR“

Für jeden Patienten wurden zwei PCR-Ansätze gefahren, einmal mit spezifischen Primern für den Wildtyp (jeweils Bahn b) und einmal mit spezifischen Primern für die fünf Mutanten (jeweils Bahn a, Abb. 7). Bei Patient 1, 2, und 5 handelt es sich um Wildtypen ohne Nachweis einer Mutation. Patient 3 ist homozygot für die Mutation *4 und somit ein "Poor Metabolizer". Patient 4 ist heterozygot für die Mutation *4 und damit zur Gruppe der "Extensive Metabolizer" zu zählen.

Bei jeder PCR wurde standardmäßig sowohl eine Primertesting, als auch eine Negativ-Kontrolle, in der keine DNA beigegeben ist, mitgefahren. Es zeigten sich die erwarteten Banden für die Mutanten *3 (1010 bp), *4 (304 bp), *6 (166 bp), *7 (1394 bp) und *8 (219 bp). Der rechts aufgetragene Marker entspricht dem Marker der Long PCR (Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9).

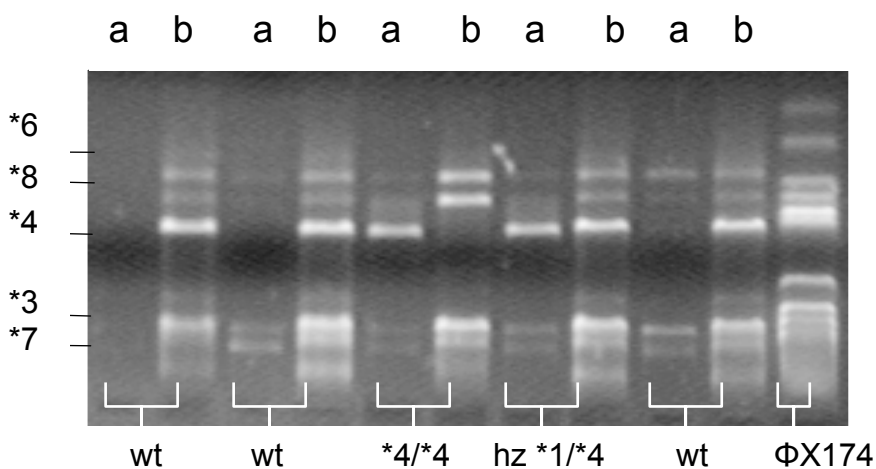


Abbildung 7: Gelelektrophorese der „Multiplex- PCR“ („wt“= Wildtyp, „hz“= heterozygot)

3.2.3. Analyse des „Null- Allels“

Abbildung 8 zeigt das Bild einer Gelelektrophorese der Mutation *5. Bei den hier dargestellten Patienten wird in der separaten Darstellung des „Null- Allels“ durch den PFKontrDel- Primer die Bande eines 4,2 kb Fragmentes sichtbar, wenn das Wildtyp- Allel vorliegt. Bei allen Patienten ist diese Bande nachweisbar. Patient 1 und 3 zeigten zusätzlich ein 3,5 kb umfassendes Produkt, dass der Mutation CYP2D6*5

entspricht. Bei diesen Patienten handelt es sich um Träger einer heterozygoten Mutation von *5 (Genotyp *1/*5). Diese zeigten im Präamplifikationsprotokoll keine Bande.

Der am linken Bildrand aufgetragene Primer entspricht dem Lambda DNA/EcoR1+ Hind III Marker, 3.

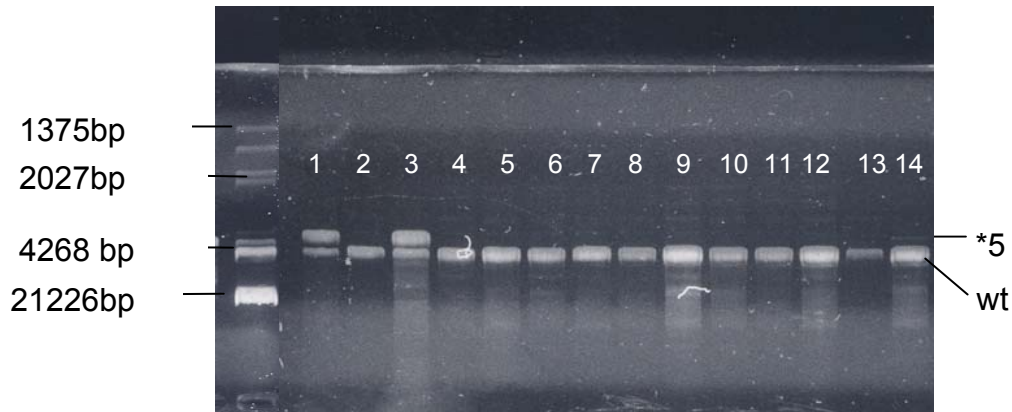


Abbildung 8: Gelelektrophorese Null- Allel CYP2D6

3.3. Verteilung der Genotypen

Unter den PM erschien CYP2D6*4 als häufigster Genotyp. Vier Patienten hatten einen kombinierten Genotyp, bestehend aus einer homozygoten *6 und einer heterozygoten *4 Mutation. Alle Patienten mit mindestens einem funktionell unauffälligen Allel wurden als Patienten mit erhaltener Enzymaktivität eingestuft und wurden im weiteren kurz als EM bezeichnet. Dies bedeutet, dass nicht nur heterozygote Allelträger, sondern auch Ultrarapid Metabolizer (UM; schnell Verstoffwechsler) in die Gruppe der EM (hier gleichbedeutend mit Patienten mit erhaltener Enzymfunktion) zusammengefasst wurden.

Unter den EM fanden sich 98 heterozygoter Ausprägungen

Tabelle 13: Polymorphismen in der PCR

Genotyp	Anzahl der Patienten	% der Patienten
Poor Metabolizer	35	11,7
*3/*3	1	0,3
*4/*4	20	6,7
*5/*5	1	0,3
*6/*6	7	2,3
*4/*5	2	0,7
*6/*6 und *4 heterozygot	4	1,3
Heterozygote Patienten	98	32,7
*1/*3*	5	1,7
*1/*4	81	27
*1/*5	8	2,7
1/*6	2	0,7
*1/*4 und Genduplikation	2	0,7
Genduplikation	9	3,0
Keine Mutationen gefunden	156	52,0
Total	300	100,0

3.4. Klinische Untersuchung

Die Daten von 271 Patienten konnten komplett gesammelt und hinsichtlich des Schmerzmittelverbrauches und der Effizienz der Schmerztherapie analysiert werden.

3.5. Analgetikaverbrauch und Schmerzscores

Im Aufwachraum zeigten 85 (35,3 %) der EM und 7 (23,3 %) der PM einen Schmerzscore von 40 oder weniger und bedurften keiner weiteren Tramadolgabe. Bei ihnen war die intraoperative Gabe von 100 mg Tramadol ausreichend. Die PCA- Pumpe wurde direkt an den i.v.- Zugang angeschlossen und die Patienten konnten sich in den folgenden 48 Stunden ihren Schmerzmittelbedarf selbst bestimmen. Den anderen 179 Studienteilnehmern wurde eine weitere Tramadol- Dosis im Aufwachraum als Kurzinfusion titriert. Die hier benötigte Titrationsdosis war unter den EM-Patienten um 33 % geringer, als unter den PM-Patienten (108,2 mg versus 144.7 mg, p=0,004).

Tabelle 14: Vergleich von EM und PM in Bezug auf Schmerzmittelverbrauch und Response (n.s.= nicht signifikant)

	EM n=241	PM n=30	p
Erstdosis Tramadol im Aufwachraum mg (MW ± SD)	108,2 ± 56,9	144,7 ± 22,6	0,04
Piritramid im Aufwachraum n (%)	52 (21,6%)	13 (43,3%)	0,02
Piritramid im Aufwachraum Nur Patienten die Piritramid bekamen mg (MW ± SD)	3,4 ± 5,3	4,6 ± 6,2	n.s.
Tramadol via PCA in den ersten 24 Std mg (MW ± SD)	523,1 ± 264,6	670,6 ± 393,4	0,01
Tramadol via PCA in den ersten 48 Std mg (MW ± SD)	865,2 ± 531,5	1090,4 ± 543,9	0,04
Patienten mit Ausweichmedikation während PCA-Zeit n (%)	28 (11,6%)	8 (26,7%)	0,04
Abschlussfragen Anzahl der Patienten (%), die die Therapie mit 4 oder 5 bewerteten oder sie nicht mehr wählen würden	10 (4,1%)	3 (10%)	n.s.
Non-Responder n (%)	52 (21,6%)	14 (46,7%)	0,005

Bei 52 der EM- Patienten und 13 der PM- Patienten erreichte man auch mit der Titration von Tramadol keine ausreichende Schmerzreduktion, und es musste zusätzlich Ausweichmedikation gegeben werden. Die mittlere Dosis von Piritramid bei Patienten mit Ausweichmedikation lag bei 3,4 mg bei den EM und 4,6 mg bei den PM. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Insgesamt lag der 24 Stunden- und 48 Stunden-Verbrauch an Tramadol bei den PM signifikant höher als bei den EM. Der vermehrte Bedarf sowohl an Grundmedikation mittels Tramadol, wie auch der vermehrte Bedarf an Ausweichmedikation spiegelt sich auch in den beiden nun folgenden Graphiken wieder. Sie zeigen zum einen den kumulativen Verbrauch an Tramadol und Metamizol über 48 Stunden (Abb. 9), als auch den kumulativen Verbrauch an Tramadol und der eventuell notwendigen Ausweichmedikation an Piritramid über 48 Stunden (Abb.10).

Betrachtet man nun den kumulativen Verbrauch von Tramadol und Metamizol über 48 Stunden im Vergleich zwischen Poor Metabolizern und Extensive Metabolizern, so zeigt sich ein höherer Verbrauch bei den PM mit $p=0,003$ (Abb.9).

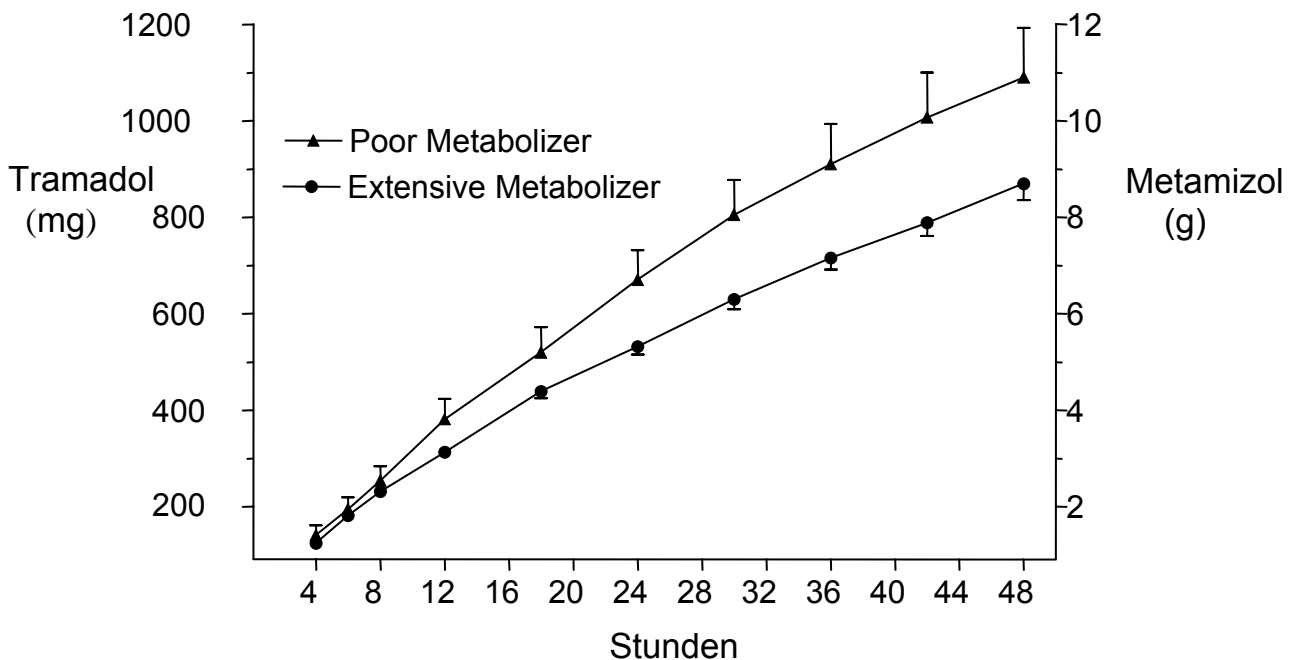


Abbildung 9: kumulativer Verbrauch an Tramadol und Metamizol (Mittelwert +/- SEM)

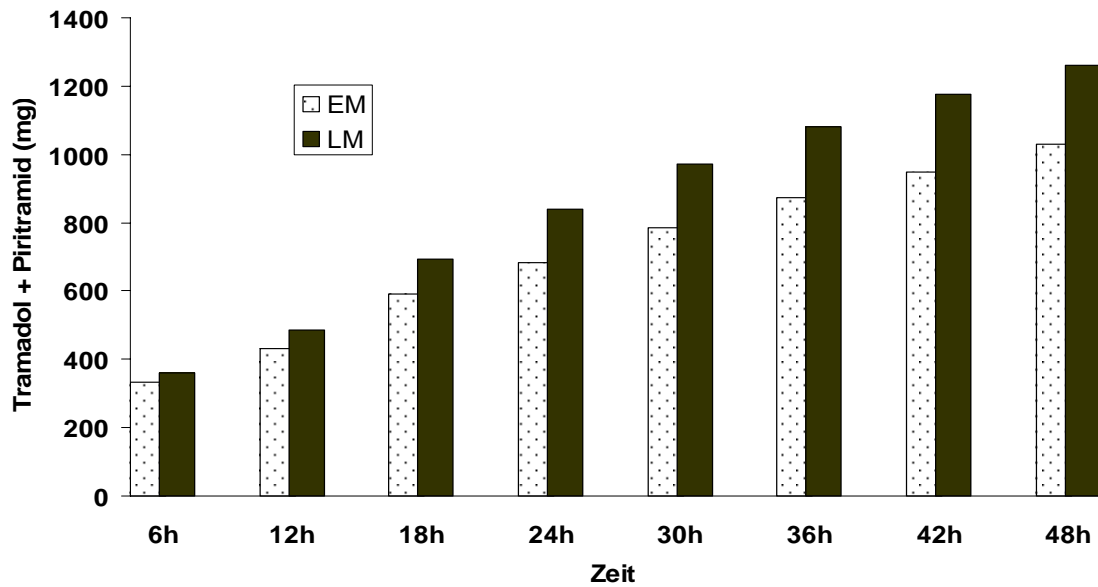


Abbildung 10: kumulativer Verbrauch von Piriramid und Tramadol.

Für die Umrechnung Piriramid- Tramal verwendete Äquivalenzdosis: 15mg Piriramid entspricht 100mg Tramal (Umrechnungsfaktor 6,6) Angegeben ist jeweils der Mittelwert

Die Verteilung der individuell über die PCA- Pumpe geforderten Boli konnten mittels der gespeicherten Daten genau ausgewertet werden. Insgesamt zeigt die kumulativ geforderte und verabreichte PCA- Dosis eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität. Jedoch zeigte sich in den ersten 24 Stunden eine signifikant höhere Anzahl an geforderten Boli innerhalb der PM-Patienten. Ein Unterschied in den erhaltenen Boli ergab sich dahingegen nicht. Das bedeutet, auch wenn die PM- Patienten vermehrt Schmerzmittel forderten, erhielten sie doch aufgrund der Sperrzeiten nicht mehr Boli.

Tabelle 15: Anzahl der PCA- Boli in den ersten 24 Stunden (MW ± SD) *= siehe Abbildung 11

	EM	PM	p<
Geforderte Boli	30,5 ± 28,0	49,4 ± 43,1	0,002*
Gegebene Boli	24,5 ± 13,6	29,2 ± 13,3	n.s.

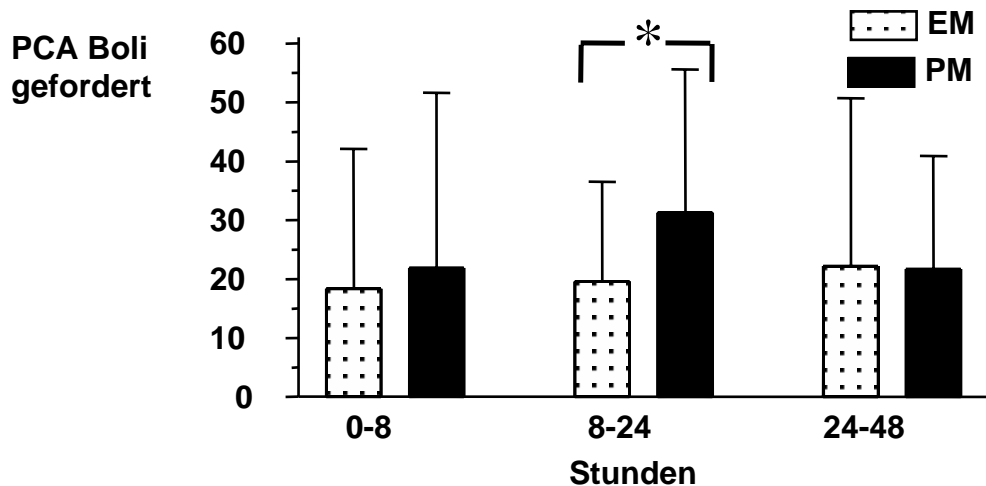


Abbildung 11: Anzahl geforderter Boli in Abhängigkeit von Zeitintervallen (MW ± SD)

3.6. Ausweich-Medikation während der PCA-Zeit

Während der 48 Stunden dauernden Studiendauer benötigten mehr PM als EM eine Ausweichmedikation. Die Mehrzahl dieser Patienten (EM:17, PM:5) hatten bereits im Aufwachraum Ausweichmedikation erhalten. Bis auf zwei Ausnahmen erhielten die Patienten Piritramid wegen unzureichender Analgesie. Einer der EM erhielt aufgrund von Übelkeit und Erbrechen Piritramid als Ersatz für Tramadol über die PCA.

Sieht man sich die geforderten Boli nochmals gesondert in den verschiedenen Zeitabschnitten an, erkennt man einen signifikanten Unterschied zwischen EM und PM zwischen der 8. und 24. Stunde. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass die zusätzlich gegebene Ausweichmedikation nicht in diese Auswertung mit eingeflossen ist. Patienten, die auf eine Piritramid- PCA umgestellt wurden, sind nicht berücksichtigt.

3.7. Response und Genotyp

Im Hinblick auf das Responseverhalten wurden von den bewerteten 271 Patienten, von denen komplette klinische Daten vorlagen, 205 Patienten als Responder und 66 als Non-Responder kategorisiert. Bei 65 Patienten kommt es zu einer Zuteilung in die Gruppe der Non-Responder aufgrund der Notwendigkeit einer Ausweichmedikation schon im Aufwachraum. Der Anteil der PM an dieser Gruppe zeigt sich im Vergleich zu den EM als signifikant mit $p=0,02$. Auch die im weiteren Verlauf benötigte Ausweichme-

dikation zeigt sich mit einer Signifikanz von $p=0,04$ signifikant auf Seiten der PM erhöht. Im Abschlussfragebogen bewerteten 4,1% der EM und 10% der PM die Therapie als unzureichend, oder würden sie nicht nochmals wählen. Der Unterschied zwischen EM und PM ist nicht signifikant.

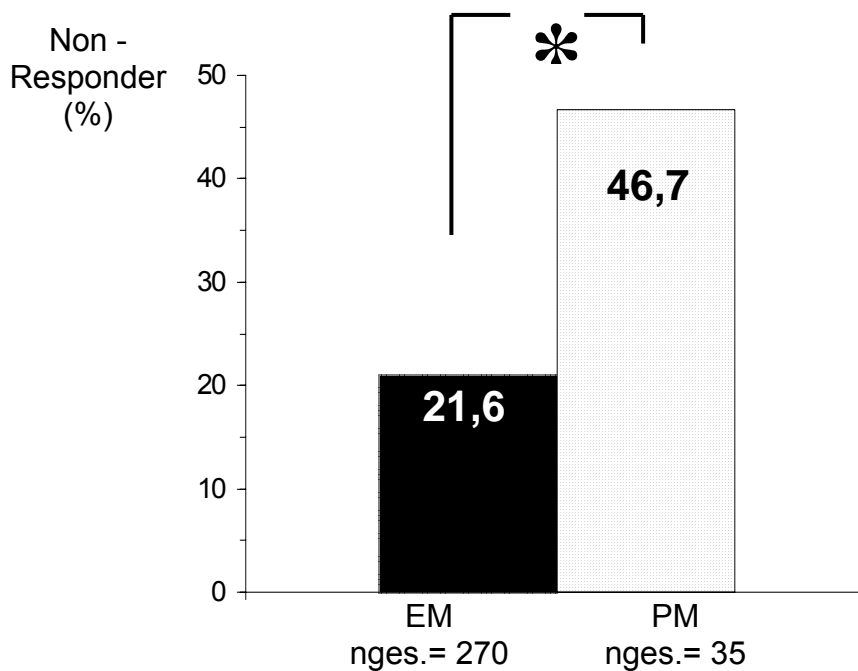


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der Non-Respondern in der EM und PM Gruppe

3.8. Unerwünschte Ereignisse: PONV (postoperative nausea and vomiting)

Übelkeit und Erbrechen waren die am häufigsten benannten unerwünschten Wirkungen während der Studienbeobachtung. Insgesamt war ihre Inzidenz jedoch gering. Innerhalb der ersten Stunde klagten 6,7 % der Patienten über diese Symptome, darunter kein „PM“. Während der dritten und sechsten Stunde waren Übelkeit und Erbrechen am häufigsten zu beobachten mit 9,2 % und 10,1 % der Patienten, die über die Symptome klagten. Insgesamt litten 18 % der Patienten an dieser Nebenwirkung. Es zeigt sich jedoch, dass besonders die ersten Zeitintervalle die kritischen zu sein scheinen.

Obwohl kein PM in der ersten Stunde an Übelkeit oder Erbrechen litt, so zeigt sich insgesamt eine gleiche Verteilung für diese Symptome zwischen EM und PM.

Dabei ließ sich jedoch nicht sicher differenzieren, ob diese Symptome durch den operativen Eingriff, die Narkose oder das Tramadol hervorgerufen wurden.

4. Diskussion

In dieser Studie wurde der Einfluss der fünf häufigsten genetischen Varianten des CYP2D6 auf die postoperative Analgesie mit Tramadol untersucht. Neben dem Nachweis eines Polymorphismus, wurden die Patienten nach Schmerzmittelverbrauch und Zufriedenheit in die Gruppen der Responder und Non-Responder eingeteilt. Zielkriterium war die Frage, ob sich ein Unterschied im analgetischen Effekt des Tramadol in der postoperativen Phase im Genotypus der EM und PM widerspiegelt. Im Unterschied zu vorausgegangenen Studien, die auf Basis experimenteller Schmerzmodelle an gesunden freiwilligen Probanden beruhten (Collart et al., 1993, Poulsen et al., 1996), basiert die hier vorgestellte Studie auf klinischen Daten von Patienten in der postoperativen Phase nach großen Baueingriffen.

Durch die Applikationsform mittels PCA- Pumpe ist der Schmerzmittelverbrauch exakt nachvollziehbar. Schmerzmittelverbrauch und Schmerzscore können so in zeitlich genauen Zusammenhang gebracht werden. Daneben bietet diese Form der Schmerztherapie einen Vorteil für den Patienten in dem er ohne Zeitverzögerung selbständig in der Lage ist, sich Analgetikum selbständig zu applizieren. Die PCA- Pumpe erscheint unter ethischen Gesichtspunkten daher als die geeignete Methode im Rahmen dieses Studiendesigns.

Die Anwendung der PCA- Pumpe setzt das Verständnis des Patienten für das System voraus, Patienten, die hierzu aus sprachlichen Gründen, höheren Lebensalters oder aufgrund einer verlängerten postoperativen Beatmung nicht in der Lage waren, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Um Interaktionen mit ebenfalls durch CYP2D6 metabolisierte Pharmaka zu vermeiden, schlossen wir alle Patienten unter medikamentöser Therapie einer psychischen Erkrankung oder einer Epilepsie aus. Des Weiteren musste eine Verfälschung der Schmerzmittelwirkung durch Einnahme zusätzlicher Substanzen bei Schmerzmittelabusus, Drogenabhängigkeit oder Verwendung einer zusätzlichen Schmerztherapie ausgeschlossen werden.

Aus diesem Studienaufbau ergibt sich auch die im Vordergrund stehende Fragestellung, nach den klinisch evaluierbaren Unterschieden im Reaktionsverhalten von Patienten mit CYP2D6 „Poor Metabolizer“-und „Extensive Metabolizer“-Genotyp bei einer Schmerztherapie mit Tramadol.

Schätzungen gehen davon aus, dass bis zum Jahre 1998 50 Millionen Patienten Tramadol in 90 Ländern dieser Erde erhalten haben (Bamigbade und Langford, 1998). So ergibt sich eine grosse Erfahrung in Bezug auf den klinischen Gebrauch von Tramadol. Jedoch könnte der Einfluss der genetischen Faktoren auf die Wirksamkeit von Tramadol Konsequenzen für die Verwendung dieses Präparates haben.

4.1. Klinische Untersuchung von Tramadol in der postoperativen Analgesie

Tramadol, appliziert als Patienten kontrollierte Analgesie (PCA), ist hinsichtlich seiner analgetischen Wirkung nach großen chirurgischen einem Placebo überlegen und mit Morphin vergleichbar, wenn es in einer angemessenen Dosis intravenös verabreicht wird (Vickers et Paravicini, 1995; Stamer et al., 1997; Hopkins et al., 1998). Seine daraus erwachsende Rolle in der postoperativen Schmerztherapie wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Da Tramadol nur einen minimalen Einfluss auf die viszerale Funktionen (Wilder-Smith et al., 1999) und gastrale Entleerung zeigt (Crighton et al., 1998), kommt ihm eine ganz besondere Rolle in der abdominalen Chirurgie zu. In seiner auch hier genutzten Dosierung von 3 mg/kg/KG konnte nachgewiesen werden, dass seine analgetischen Effekte in der frühen postoperativen Phase mit der des Morphins übereinstimmte. Zusätzlich erwies sich Tramadol gegenüber Morphin hinsichtlich der Rate an Erholung der psychomotorischen Funktion als überlegen (Coetzee und van Loggerenberg, 1998).

Der kumulative Tramadolverbrauch wurde in verschiedenen Studien postoperativ mit bis zu 600 mg in 24 Stunden beschrieben (Vickers et al., 1992; Hopkins et al., 1999; Stamer et al., 2002). Eine Studie berichtet über einen Verbrauch von maximal 975 mg in 24 Stunden (Ünlügenç et al., 2002). Verglichen mit diesen Angaben liegen die Ergebnisse dieser Studie in einem ähnlichen Bereich mit einem durchschnittlichen Verbrauch von 596 mg Tramadol in 24 Stunden. Die Schwere der Operationen war im Vergleich zu früheren Studien jedoch deutlich größer. In früheren Studien wurden Patienten nach Hysterektomien (Striebel et al., 1992) oder laparoskopische Cholezystektomien untersucht (Steffen et al., 1997), während in der vorliegenden Studie Patienten nach grossen, ausgedehnten Abdominaleingriffen eingeschlossen wurden. Zusätzlich erfordert eine intraoperative Gabe von Remifentanyl zumeist eine höhere Dosierung an postoperativen Analgetika. Dies erklärt sich durch die spezielle Remifentanyl-Kinetik, die

sich u.a. durch ein kleines Verteilungsvolumen, eine rasche Verteilungsphase sowie eine extrem kurze Eliminationsphase auszeichnet. Damit kommt es postoperativ zu einem raschen Wirkungsabfall.

Um eine möglichst lückenlose Dokumentation der Schmerzscores zu erhalten, wählten wir im ersten Untersuchungszeitraum bis 8h ein einstündliches Befragungsintervall. Bereits im Aufwachraum wurde dadurch eine engmaschige Beurteilung der Schmerzsituation erzielt. 37% der PM-Patienten und nur 22% der EM-Patienten erreichten mittels der Titration keine ausreichende Analgesie und bedurften einer Ausweichmedikation. Die mittlere Dosis an Piritramid, die verabreicht wurde, war bei EM und PM in etwa vergleichbar. Jedoch unterschied sich die Anzahl der Patienten, die Ausweichmedikation benötigten signifikant zwischen der EM und der PM-Gruppe. Der Unterschied zwischen EM und PM ist zu diesem Zeitpunkt der Studienphase, höchstwahrscheinlich aufgrund hoher postoperativer Schmerzniveaus in beiden Gruppen und einem hohen Anteil an Fremdregie durch die betreuenden Ärzte und Pfleger beeinflusst, zeigt jedoch schon hier einen Trend zu einem vermehrten Bedarf in der Gruppe der PM.

Das nächste Intervall wählten wir nach 24 Stunden, denn bis zum nächsten Morgen erfolgt spätestens die erste Mobilisation und damit grösste Schmerzbelastung postoperativ. Anhand der geforderten Boli innerhalb der ersten 24 Stunden zeigt sich ein signifikant höherer Bedarf bei den PM im Vergleich zu den EM ($p < 0,002$).

Insgesamt wiesen die „Poor Metabolizer“ verglichen mit den „Extensive Metabolizern“ einen um 33 % höheren Tramadolverbrauch auf. Zusätzlich benötigten 43,3 % der Poor Metabolizer und nur 21,6 % der Extensive Metabolizer eine Ausweichmedikation während der ersten Stunde postoperativ im Aufwachraum.

4.2. Pharmakologie von Tramadol

Nachdem man lange davon ausging, dass der antinozizeptive Effekt des Tramadol allein auf seinem schwachen Agonismus am μ -Opioid-Rezeptor beruhe, konnte zu Beginn der 90er Jahre, nach einer erneuten Erforschung der Pharmakologie des Tramadols, ein neuer Wirkmechanismus ermittelt werden. Dieser Nicht-Opioid-Mechanismus besteht auf einer Hemmung des Reuptakes von Serotonin (5-HT) und Noradrenalin/ Norepi-

nephrin (Raffa et al., 1992; Eggers und Power, 1995). Wegweisend für diese Entdeckung waren sowohl der α_2 -Rezeptor-Antagonist Yohimbin, als auch der 5-HT₂-Antagonist Ketanserin, die anhand experimenteller Schmerzmodelle eine ganz neue Sichtweise auf die Wirkung des Tramadols eröffneten (Raffa et al., 1993; Desmeulen et al., 1996; Oliva et al., 2002). Eine erhöhte Konzentration der genannten Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin an den entsprechenden Rezeptoren bewirkt insgesamt eine Hemmung inhibitorischer Bahnen. Die Möglichkeit des Tramadol in derselben Konzentration inhibitorische Bahnen zu hemmen, in der es an μ -Opioid-Rezeptoren bindet, macht Tramadol im Gegensatz zu Morphin zu einem „atypischen“ Opioid (Raffa und Friderichs, 1996)

Als weiterer Wirkmechanismus wurden von Raffa et al. 1993 eine Freisetzung von 5-HT durch Tramadol postuliert. Dies konnte jedoch tierexperimentell nicht bestätigt werden. (Frink et al., 1994).

Insgesamt wurden diese über Serotonin-und Noradrenalin-Regelkreisläufe laufende antinozizeptive Effekte nun generell als Teil des analgetischen Wirkmechanismus von Tramadol akzeptiert (Raffa et al., 1996).

Ergibt sich die analgetische Wirkung des Tramadol nun zum Teil auf Nicht-Opioid-Mechanismen, so muss die Frage gestellt werden, in welchem Maße CYP2D6 Poor Metabolizer, denen die Opioidrezeptor vermittelte analgetische Wirkung nicht zur Verfügung steht, von der Analgesie mit Tramadol profitieren.

Studien zu dieser Fragestellung wurden bereits veröffentlicht. Sie befassten sich jedoch nur mit gesunden Probanden, die experimentellen Schmerzreizen ausgesetzt wurden. So beschrieben Poulsen und Mitarbeiter 1996 einen variierenden analgetischen Effekt von Tramadol abhängig vom experimentellen Aufbau der Studie. Probanden mit dem Genotyp eines Poor-Metabolizers zeigten einen verminderten, jedoch messbaren analgetischen Effektes des Tramadol. Eine schweizer Untersuchungsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass der analgetische Effekt des Tramadol bei gesunden Probanden um bis zu 31 % gesenkt wird, wenn man im experimentellen Schmerzversuch Naloxon verabreicht (Collart et al., 1993). Dies bedeutet, dass man die analgetische Wirkung des Tramadols durch einen Opiat-Antagonisten teilweise aufheben kann und unterstützt auch klinisch die Koexistenz eines dualen analgetischen Mechanismuses. Dieser duale

Wirkmechanismus ist rückführbar auf die verschiedenen Interaktionen der Enantiomere des Tramadol.

Schließlich zeigten Paar und Mitarbeiter 1997, dass die Serumkonzentration von (+)-O-Demethyltramadol (M1), also des wichtigsten analgetisch wirksamen Metaboliten des Tramadols höhere Spiegel bei Extensive Metabolizern zeigt. Sie schlossen daraus, dass der CYP2D6 Metabolismus eine entscheidende Rolle für die Konzentration von (+)-O-Demethyltramadol (M1) spielt (Paar et al., 1997). Sind diese Ergebnisse nun auf einen klinischen Versuchsablauf übertragbar? Lässt sich ein höherer Verbrauch von Tramadol bei 10 % der Patienten, die genetisch den Poor Metabolizern zugerechnet werden, bestätigen?

Im Unterschied zu einer Therapie mit Morphin waren die bisherigen Untersucher bei Tramadol zurückhaltend in der Übertragung ihrer experimentellen Schmerzerforschung in die klinische Praxis (Poulsen et al., 1996). Le Roux und Coetzee wiesen 2000 noch einmal darauf hin, dass der Einsatz von Tramadol in der Klinik nicht vernachlässigt werden sollte. So war es bis jetzt ungewiss, ob genetische Varianten von CYP2D6 bei Poor Metabolizern zu einer relevanten Verminderung des analgetischen Effektes von Tramadol führt.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass PM-assozierte Polymorphismen von CYP2D6 einen deutlichen Einfluss auf die postoperative Analgesie mit Tramadol haben. Poor Metabolizer zeigten eine höhere Rate an Non-Respondern und einen höheren Verbrauch an Tramadol und Ausweichmedikation als Extensive Metabolizern. Bedenkt man diese deutlich nachweisbare, klinisch relevante Veränderung des Tramadol-Metabolismus, so mag auch die Verstoffwechslung anderer CYP2D6 abhängiger Substrate, wie zum Beispiel trizyklische Antidepressiva, selektive Serotonin-Reuptake-Hemmer oder Methadon beeinflusst werden.

Weiterhin können sowohl kompetitive, als auch nicht-kompetitive Hemmer Wechselwirkungen verursachen (Meyer et al., 1996). Ein bekannter Inhibitor von CYP2D6 ist z.B. das Amiodaron, das jedoch selbst nicht von diesem Enzym metabolisiert wird. Diese Interaktion könnte den Metabolismus der CYP2D6 abhängigen Substrate betreffen und damit ihre Effektivität und Wirkdauer verändern (Budd et al., 1999).

4.3. Kombination mit Nicht-Opioid-Analgetika

Möglicher Ursprung von Schmerz kann bei abdominellen Eingriffen zerstörte Haut, Muskelgewebe und peritoneale Reizung sein. Entzündliche und nicht-entzündliche Prozesse, sowie die verschiedenen Übertragungswege für Schmerz stellen einen hohen Anspruch an die analgetische Therapie. Bei den verschiedenen Facetten von Schmerz profitiert eine analgetische Therapie von einer Kombination aus verschiedenen Analgetika (Raffa et al. 2001). Die potentiellen Vorteile einer Kombinationstherapie liegen in der erhöhten Effektivität und einer Verminderung unerwünschter Wirkungen durch Dosisreduktion bei additiven Effekten der Präparate. Dieses spiegelt sich auch in den Schmerzbehandlungsempfehlungen der WHO (Schug et al., 1990) und der American Pain Society (1999) wieder. Um den Opioid-Verbrauch zu senken und damit zu einer Reduktion unerwünschter Ereignisse und einer Verbesserung der analgetischen Wirkung zu kommen, kombiniert man Opioide mit Nicht-Opioiden (Wilder-Smith et al., 2001).

So ist die Kombination von Tramadol mit Metamizol oder Piritramid übliche Praxis (Maier, 1999; Sprotte, 2000; Stamer und Henn, 2000; Stamer et al., 2002). Die Einsparung an Opioiden beläuft sich dabei auf bis zu 60 % (Tempel et al., 1995; Steffen et al., 1997). Mittlerweile ist dieses multimodale Konzept ein Standard-Prozedere in vielen deutschen Kliniken (Lempa und Köhler, 1999; Spacek et al., 1999; Montes, 2000; Stamer et al., 2002). Doch obwohl sich Tramadol in klinischen Studien bereits in Form der patientenkontrollierten Applikation bewährt hat und auch Metamizol bereits als Analgetikum in dieser Form untersucht wurde, liegen nur wenige Studien über deren Kombination vor. Die gleichzeitige Gabe von Metamizol kann aufgrund seiner additiven und synergistischen Eigenschaften zu Tramadol die analgetischen Effekte verbessern und dessen unerwünschten Wirkungen reduzieren (Krimmer et al., 1986; Lempa et al., 1999; Sprotte et al. 2000; Stamer et al., 2002).

Es ist nicht auszuschließen, dass der bereits beschriebenen additive und synergistische Effekt der Nicht-Opioid-Analgetika die analgetische Wirkung des Tramadol beeinflusst hat. So könnte bei einigen Patienten Metamizol alleine schon zu einer ausreichenden Analgesie geführt haben. Montes et al. beschrieben im Jahre 2000 eine Äquivalenzdosis zwischen Tramadol und Metamizol von 1:12. Aus praktischen Gründen dosierten wir

Tramadol und Metamizol im Verhältnis 1:10. Somit blieben wir zwar unter der von Montes et al. angegebenen Äquivalenzdosis von 1:12 aber weiterhin in einem Bereich, der eine synergistische Wirkung beider Analgetika vermuten lässt.

Aus ethischen Gründen und wegen der bevorzugten Verwendung der genannten Kombination aus Nicht-Opioid-Analgetika und Tramadol in unseren operativen Abteilungen, wurde dem multimodalen Konzept vor der Monotherapie der Vorzug gegeben. Trotzdem ist das Ergebnis dieser Studie eindeutig und bestätigt die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen mit Tramadol (Collart et al., 1993; Poulsen et al., 1996a; Paar et al., 1997).

4.4. PONV (postoperative nausea and vomiting)

Als wichtigste unerwünschte Wirkung einer Therapie mit Tramadol sind die Übelkeit und das Erbrechen zu nennen. Diese Nebenwirkungen führten so weit, dass Eggers und Power 1995 äußerten, dass dieses Problem ein klarer Nachteil des Tramadols sei, wenn man dieses Analgetikum in hohen Dosierungen oberhalb der empfohlenen Maximaldosis von 400mg/d zu einer effizienten Schmerztherapie nach großen Eingriffen einsetzt. Die Inzidenz der Übelkeit und deren Folgen wurde mit einem Anteil von bis zu 30 % beschrieben (Vickers et al., 1992; Stamer et al., 1997; Ünlügenç et al., 2002). Eine hohe Anfangsdosis von 5 mg/kg KG kann diesen Nebeneffekt mit einer Inzidenz von bis zu 41-48% potenzieren (Pang et al., 2000). Umgekehrt kann die Inzidenz durch langsame Titration von Tramadol, entweder bei oraler Gabe (Ruoff, 1999) oder bei intravenöser Verabreichung (Stamer et al., 1997) deutlich gesenkt werden. Erfolgt die Gabe der Anfangsdosis bereits intraoperativ, kann die mit der Anfangsdosis vergesellschaftete Übelkeit fast ausnahmslos umgangen werden (Pang et al., 2000). In der vorliegenden Studie wurde diese erste Aufsättigungsdosis intraoperativ verabreicht, und die Inzidenz von Übelkeit und Erbrechen lag mit 6,7 % in der ersten Stunde deutlich niedriger als in vorausgegangenen Studien.

Um zusätzlich das Auftreten von Übelkeit und Erbrechen zu vermindern, wurde Metoclopramid dem Analgetikagemisch zugesetzt. Eine PCA mit Tramadol und Metoclopramid führt zu einem verminderten Auftreten und einer reduzierten Intensität von PONV, als eine PCA mit alleiniger Tramadol-Füllung (Pang et al., 2002). Für eine Kombination von Metoclopramid mit Tramadol wurde eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Sedierung beschrieben. Allerdings besitzt Tramadol im antiemetischen Dosisbereich keine sedierenden Eigenschaften (Omoigui, 1995). In der vorliegenden Studie trat bei keinem Patienten eine übermäßige Sedierung auf.

Auffällig war, dass kein Poor Metabolizer unter Übelkeit (PONV) litt. Dieses Resultat war allerdings bei der nur kleinen Patientenzahl in der PM-Gruppe nicht signifikant. Eine Erklärung könnte aber auch sein, dass der für diesen Effekt vermutlich M1-Metabolit (M1), der an den Morphin-Rezeptor bindet, in der Gruppe der Poor-Metabolizer zu vernachlässigen ist. Bei einer Untersuchung von Grond und Mitarbeitern (1995) wurde Patienten jeweils nur eines der Enantiomere des Tramadol postoperativ i.v. verabreicht. Dabei be-

obachteten die Autoren eine signifikant höhere Rate an PONV bei den Patienten, die (+) Tramadol erhielten, als bei denjenigen, die (-) Tramadol zu sich nahmen. Ebenso könnten aber auch erhöhte Konzentrationen von Neurotransmittern im synaptischen Spalt Ursache für das emetische Potential des Tramadol sein. Diese Hypothese wurde bis jetzt jedoch noch nicht untersucht.

Insgesamt muss man feststellen, dass PONV auch nach Placebo-Gabe verbreitet ist (Stamer et al., 1997). Es steht ebenso zur Diskussion, dass diese Nebeneffekte unabhängig vom Tramadol auch durch andere Medikamente, wie zum Beispiel Anästhetika, die während der Operation verabreicht wurden, hervorgerufen werden. Weitere Gründe für PONV könnte die chirurgischen Irritationen, die verminderte gastrointestinale Motilität, Schmerz, vasovagale Reaktionen, eine postoperative Hypovolämie und niedriger Blutdruck, sowie die erste postoperative oraler Nahrungsaufnahme sein.

4.5. CYP2D6 Genotypisierung

Die große interindividuelle Variabilität der Konzentration von Medikamenten im Blut kann oft Ausdruck einer Variabilität der für diese Medikamente verantwortlichen metabolisierenden Enzyme sein. Dieses kann die Nebenwirkungen und Toxizität von Medikamenten entscheidend beeinflussen. Die therapeutische Breite eines Medikamentes kann dadurch deutlich eingeschränkt werden (Ingelmann-Sundberg et al., 1999).

Durch die Bestimmung des Genotypes eines Individuums kann die enzymatische Aktivität eines metabolisierenden Enzyms abgeschätzt werden, um damit die Sicherheit und Effizienz einer medikamentösen Therapie zu maximieren.

Im Rahmen dieser Studie wurde eine bereits beschriebene molekularbiologische Methodik zur Genotypisierung modifiziert und im Labor der Anästhesiologie etabliert.

Bereits 1996 beschrieb Stüven et al. ein Präamplifikations-Protokoll zur Darstellung des entscheidenden DNA-Abschnittes in der „Long-PCR“, wie das in der hier vorliegenden Studie verwendete. Stüven amplifizierte ein 4666 bp langes DNA-Fragmente, das die kodierenden Abschnitte der 5 Polymorphismen enthielt. Das Protokoll von Stüven et al. führte in unseren Versuchsreihen nicht zum gewünschten Ergebnis. Die Primer wurden daher durch uns angepasst. Das resultierende, mit 1647 bp deutlich kürzere Präamplikon diente als Template für eine allelspezifische „Multiplex-PCR“.

Weiterhin bot diese Studie im Vergleich zu früheren Publikationen (Abdel-Rahman et al., 2002, Paar et al., 1997, Poulsen et al., 1996) den Vorteil eines großen Patientenkollektivs von 300 Patienten. Damit bestand die Chance auch seltenere Polymorphismen nachzuweisen.

Die Extensive Metabolizer dieser Studie sind im Gegensatz zu den Poor Metabolizern eine heterogene Gruppe. Sie besitzen entweder ein, zwei, drei oder mehr funktionell intakte Allele. Theoretisch könnte auch ein PM in dieser Gruppe vertreten sein, wenn er über einen Genotypen verfügt, der in der hier verwendeten Methodik nicht nachgewiesen werden kann (zum Beispiel: *11, *12, *13, *15, *16). Insgesamt zeigte sich eine Allelhäufigkeit, die mit den Angaben der Literatur übereinstimmt. Eine Mutation *8 oder *7 konnte nicht nachgewiesen werden.

Einige weitere wenige Patienten mögen zu den Extensive Metabolizern gezählt worden sein, obwohl auch sie über eine verminderte enzymatische Aktivität verfügen. Diese oben genannten Mutationen sind in der kaukasischen Bevölkerung jedoch sehr selten mit einer Allelfrequenz von weniger als 0,001 %. Die routinemässige Testung dieser Allele bei Kaukasiern bleibt fragwürdig. Jedoch auch unabhängig von dieser möglichen falschen Zuordnung einiger weniger Patienten, erwiesen sich 46,7% der PM und nur 21,6% der EM als Non-Responder ($p < 0,005$).

Im Abschlussfragebogen bewerteten 10% der PM und 4,1% der EM die Schmerztherapie als unzureichend. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Es ist hierbei zu beachten, dass die Patienten im Rahmen der Studie sehr engmaschig betreut und befragt werden. Auch auf Schmerzen bei verminderter Wirkung des Tramadol konnte so rasch reagiert werden, z.B. durch die Gabe zusätzlicher Analgetika.

Die Gruppe der Poor Metabolizer zeigte einen signifikanten Unterschied in ihrem Ansprechen auf Tramadol im Vergleich zu den Extensive Metabolizern mit mindestens einem Wildtyp-Allel. Dies bezieht sich sowohl auf die benötigte Titrationsdosis, den Verbrauch an Ausweichmedikation und den kumulativen Gesamtverbrauch an Tramadol. Eine Differenzierung der Patienten mit erhaltener Enzymfunktion in Patienten mit einem, zwei oder drei funktionellen Allelen entsprechend heterozygoten, EM und UM und ihrem Response auf Tramadol war in dieser Studie nicht geplant und auch nicht möglich. Dazu wäre eine Gesamtzahl von ca. 1000 Patienten notwendig gewesen, um

eine ausreichende statistische Aussagekraft zu erzielen. Insgesamt zeigt diese Untersuchung, dass PM-assoziierte Polymorphismen des CYP2D6 einen Einfluss auf die postoperative Analgesie mit Tramadol haben.

4.6. Ausblick

Im Zuge der zunehmenden Entwicklung in der Pharmakogenetik wird es höchstwahrscheinlich schon in naher Zukunft einfachere, kosteneffizientere und verbreitetere Methoden zur Genotypisierung eines Patienten geben. Schon heute sind zahlreiche Polymorphismen beschrieben, die Einfluss auf die Metabolisierung vieler Pharmaka haben, auch auf einige in der Schmerztherapie häufig verwendete Analgetika und Koanalgetika.

So profitieren CYP2D6 Poor Metabolizer nicht vom analgetischen Effekt des Codeins und leiden unter Wechselwirkungen mit trizyklischen Antidepressiva, einer Substanzgruppe, die besonders oft chronischen Schmerzpatienten verschrieben wird (Poulsen et al., 1996, Fagerlund und Braaten, 2001).

Eine aus dem Jahre 1998 stammende, im Journal der American Medical Association publizierte Studie, geht in den USA von jährlich 106.000 Todesfällen infolge unerwünschter pharmakologischer Nebenwirkungen aus. Insgesamt schätzt man die Fallquote auf 2,2 Millionen Patienten mit schweren Medikamentennebenwirkungen. Als ursächlich ist hier zum einen die Nichtbeachtung pharmakologischer Interaktionen, aber auch die Unkenntnis interindividueller Medikamentenverträglichkeit zu werten.

Das bereits heute vorhandene Wissen über die Pharmakogenetik sollte zu einer individuellen Anpassung und Auswahl von Medikamenten führen. Kliniker sollten über diesen pharmakogenetischen Hintergrund informiert sein, um Veränderungen im Ansprechen auf ein Medikament einordnen zu können und entsprechende Konsequenzen zu ziehen.

Die Möglichkeit, bereits vor einer Therapie abhängig von der genetischen Prädisposition eines Patienten ein Präparat zu wählen, wird in Zukunft eine große Herausforderung darstellen.

5. Zusammenfassung

Das Cytochrom CYP2D6 besitzt einen polymorphen Genort, dessen verschiedene Allele zu einer veränderten Enzymaktivität des Cytochroms führen können. "Poor Metabolizer" (PM, ca. 10 % der Kaukasier) mit zwei nicht funktionellen Allelen weisen keine Enzymaktivität auf und können im Gegensatz zu "Extensive Metabolizern" (EM) Tramadol nicht in seinen am μ -Opioidrezeptor aktiven M1-Metaboliten (+)O-Demethyltramadol umwandeln. Hingegen bleibt der analgetische Effekt vermittelt über eine Serotonin- und Noradrenalin Reuptake-Hemmung von diesen Polymorphismen unberührt.

In dieser Studie wurde der Einfluss von sechs mit dem PM-Genotyp assoziierten Mutationen auf die postoperative Analgesie mit Tramadol untersucht.

300 Patienten konnten nach größeren viszeralchirurgischen und urologischen Eingriffen in die Studie aufgenommen werden. Den Patienten wurde kurz vor Beendigung der Operation, die in standardisierter Allgemeinanästhesie durchgeführt wurde, 1g Metamizol, 100 mg Tramadol und 10 mg Metoclopramid i.v. infundiert. Im Aufwachraum konnte zusätzlich bei Bedarf Tramadol (maximal 3 mg/kg KG) titriert werden, bis ein Schmerzscore von <40 (Numerische Rating-Skala 0-100) erreicht wurde. Die weitere Analgesie erfolgte mit Tramadol (20 mg/ml), Metamizol (200 mg/ml) und Metoclopramid (0,4 mg/ml) als PCA (Bolus 1 ml, Sperrzeit 8 Minuten) über 48 Stunden. Bei unzureichender Analgesie wurde Ausweichmedikation Piritramid i.v. titriert.

Demographische und OP-relevante Daten, Analgetikaverbrauch, Bedarf an Ausweichmedikation und die Schmerzscores in Ruhe und unter Belastung wurden über 48 Stunden dokumentiert und zwischen PM und EM verglichen. Entscheidend war das Ansprechen der Patienten auf die Medikation (Response). Patienten wurden als Responder eingestuft, wenn sie während der 48-stündigen Untersuchungsphase keine Ausweichmedikation benötigten und im abschließenden Patientenfragebogen ihre Zufriedenheit mit der Schmerztherapie äußerten. Ein Patient wurde als Non-Responder eingestuft, wenn er Ausweichmedikation benötigte oder im abschließenden Fragebogen eine negative Beurteilung abgab.

Die Genotypisierung erfolgte aus EDTA-Blut des Patienten. Mit PCR wurden die Mutationen *3 (A 2637 del), *4 (G 1934 A), *6 (T 1795 del), *7 (A 3023 C), *8 (G 1846 T) sowie die *5-Deletion untersucht.

Die Allelhäufigkeit im Gesamtkollektiv entsprach Befunden aus früheren Untersuchungen, mit dem CYP2D6*4 Polymorphismus als am häufigsten gefundene genomische PM-assoziiertes Variabilität. Insgesamt 35 Patienten wiesen zwei nicht funktionelle Allele auf und wurden als PM eingestuft. Alle Patienten mit mindestens einem Wildtypallel (98 heterozygote, 9 mit Duplikationen, 158 ohne Nachweis einer Mutation) wurden als EM kategorisiert.

Von 271 Patienten standen vollständige Daten für die 48-stündige klinische Untersuchungsphase zur Verfügung. Demographische und OP-abhängige Variablen waren vergleichbar zwischen EM (n=241) und PM (n=30). Der Anteil der Non-Responder war in der PM-Gruppe (46,7%) signifikant höher als in der EM-Gruppe (21,6%, $p=0,005$). Im Aufwachraum musste bei den PM mehr Tramadol titriert werden als bei EM: $144,7 \pm 22,6$ vs. $108,2 \pm 56,9$ mg ($p < 0,001$). Weiterhin benötigten PM häufiger Ausweichmedikation im Aufwachraum als Patienten mit wenigstens einem Wildtyp-Allel (43,3% versus 21,6%, $p=0,02$). Der kumulative, über PCA applizierte Tramadolverbrauch betrug bis zur 24. Stunde bei den PM 656 ± 265 mg, bei den EM 532 ± 240 mg. Während der 48-stündigen PCA-Periode erhielten zusätzlich 26,7% der PM und 11,6% der EM Ausweichmedikation.

Trotz der gleichzeitigen Applikation von Metamizol gab es mehr Non-Responder bei Patienten mit einer PM-assoziierten Mutation. Genetische Varianten im Bereich von CYP 2D6 tragen somit zur individuellen Variabilität des Ansprechens auf Schmerzmedikation mit Tramadol bei.

6.) Verglichen mit dem, was Sie erwartet haben, wie waren Ihre Schmerzen nach der Operation?

- weniger, als erwartet
- soviel, wie erwartet
- ein wenig mehr, als erwartet
- viel mehr, als erwartet

7.) Gab es Situationen, in denen Sie **trotz Schmerzbehandlung** weiter Schmerzen hatten?

- ja
- nein

Wenn ja, wann hat sich die Schmerzlinderung eingestellt?

- innerhalb der ersten Minute
- innerhalb von Minuten
- in den nächsten Stunden
- gar nicht

8.) Hatten Sie das Gefühl, dass die Dosis ausreichend war (z.B. bei PCA der Bolus)?

- ja
- nein

9.) Um wie viel besser wurden die Schmerzen nach einem Bolus?

10%.....20%.....30%.....40%.....50%.....60%.....70%.....80%.....90%...100%

10.) Wer sollte über den **Zeitpunkt** der Schmerzmittelgabe entscheiden?

- Sie selbst (Schmerzstärke des Patienten)
- Arzt
- Pflegepersonal
- Andere

Liste der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abbildung 1: Phylogenetische Entwicklung des menschlichen Cytochrom P450.	- 11 -
Abbildung 2: CYP2D6 Phänotypen.....	- 14 -
Abbildung 3: Wirkmechanismus des Tramadols	- 19 -
Abbildung 4: Schema der PCR (nach Singer und Berg 1992).	- 28 -
Abbildung 5: Genotypisierung von CYP2D6 (angelehnt an Stüven et al., 1996) ..	- 33 -
Abbildung 6: Gelelektrophorese „Long PCR“ mit Primer cg3 und cg4	- 44 -
Abbildung 7: Gelelektrophorese der „Multiplex- PCR“	- 45 -
Abbildung 8: Gelelektrophorese Null- Allel CYP2D6.....	- 46 -
Abbildung 9: kumulativer Verbrauch an Tramadol und Metamizol.....	- 49 -
Abbildung 10: kumulativer Verbrauch von Piritramid und Tramadol.	- 50 -
Abbildung 11: Anzahl geforderter Boli in Abhängigkeit von Zeitintervallen	- 51 -
Abbildung 12: Prozentualer Anteil der Non-Respondern	- 52 -

Tabellen

Tabelle 1: Klinisch relevant Substrate für CYP2D6.....	- 13 -
Tabelle 2: Allelhäufigkeiten der Polymorphismen	- 15 -
Tabelle 3: Auswirkungen der Polymorphismen auf die Verstoffwechslung	- 16 -
Tabelle 4: Programmierung der PCA-Pumpe	- 24 -
Tabelle 5: Verwendete Multiplex-Primer mit Positionsnummern“	- 34 -
Tabelle 6: PCR Programmierung	- 35 -
Tabelle 7: Ansatz der Primer in der „Multiplex-PCR“	- 36 -
Tabelle 8 Programmierung des PCR Gerätes für die „Multiplex PCR“	- 36 -
Tabelle 9 Programmierung des PCR Gerätes für die „Null-Allel“ PCR.....	- 37 -
Tabelle 10: Verteilung der Eingriffe.....	- 41 -
Tabelle 11: Verteilung der Operations-/Anästhesiedauer auf Operationsgruppe..	- 42 -
Tabelle 12 : Demographische Daten.....	- 43 -
Tabelle 13: Polymorphismen in der PCR.....	- 47 -
Tabelle 14: Vergleich von EM und PM (Schmerzmittelverbrauch und Response) -	48 -
Tabelle 15: Anzahl der PCA- Boli in den ersten 24 Stunden.....	- 50 -

6. Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman SM, Leeder JS, Wilson JT, Gaedigk A, Gotschall RR, Medve R, Liao S, Spielberg SP, Kearns GL: Concordance between tramadol and dextromethorphan parent/metabolite ratios: the influence of CYP2D6 and non-CYP2D6 pathways on biotransformation. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42: 24-29.

American Pain Society: Principles of Analgesic Use in the Treatment of Acute Pain and Cancer Pain 1999; American Pain Society, Glenview, IL.

Bamigbade TA und Langford RM: The clinical use of tramadol hydrochlorid. *Pain Rev* 1998; 5: 155-182.

Brockmüller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I: Pharmacogenetic diagnostics of cytochrom P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000; 10: 125-151.

Broly F, Marez D, Lo-Guidice JM, Sabbagh N, Legrand M, Boone P, Meyer UA: A non-sense mutation in the cytochrom P450 CYP2D6 gene identified in a caucasian with an enzyme deficiency. *Hum Genet* 1996; 5: 601-603.

Broly F, Gaedigk A, Heim M, Eichelbaum M, Morike K, Meyer UA: Debrisoquine/sparteine Hhydroxilation genotype and phenotype: analysis of common mutations and alleles of CYP2D6 in a European population . *DNA Cell Biol* 1999; 10: 545-558.

Budd K: The role of tramadol in acute pain management. *Acute Pain* 1999, 4: 189-196.

Coetzee JF, van Loggerenberg H: Tramadol or morphine administered during operation: a study of immediate postoperative effects after abdominal hysterectomy. *British J Anaesth* 1998; 81:737-741.

Collart L, Luthy C, Favario-Constantin C, Dayer P: Duality of the analgesic effect of tramadol in humans. *Schweiz Med Wochenschr* 1993;123: 2241-2253.

Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E: The changing meanings of "mutation": a contextualized study of public discourse. *Hum Mutat* 2002; 19: 69-75.

Crichton IM, Martin PH, Hobbs GJ, Cobby TF, Fletcher AJP, Stewart PD: A comparison of the effect of intravenous tramadol, codeine, and morphine on gastric emptying in human volunteers. *Anesth Analg* 1998; 87: 445-449.

Dettli L. Pharmakokinetische Daten für die Dosisanpassung. In: Grundlagen der Arzneimitteltherapie. Herausgegeben durch die Sektion Klinische Pharmakologie der Schweizerischen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie. 14. Auflage. Basel: Documed; 1996. S. 13-21.

Eggers KA, Power I: Tramadol. *Brit J Anaesth* 1995; 74: 247-249.

Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ: Defective N-oxidation of sparteine in man: A new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 1979a; 16: 183-187.

Eichelbaum M, Spannbrücker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: A new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 1979b ; 16 : 183-187.

Eichelbaum M, Bertilsson L, Sawe B, Zekorn C: Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: Related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther* 1982; 31: 184-186.

Evert B, Griese E-U, Eichelbaum M: Cloning and sequencing of a new functional CYP2D6 Allele: Deletion of T1795 in exon 3 generates a premature stop codon. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 271-274.

Frink MC, Hennies HH, Englberger W, Haurand M, Wilffert B: Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittelforschung*. 1996 Nov; 46(11): 1029-36.

Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA: Deletion of the entire cytochrom P4502D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 943-950.

Grond S, Meuser T, Zech D, Hennig U, Lehmann KA: Analgesic efficacy and safety of tramadol enantiomers in comparison with the racemate: a randomised, double-blind study with gynaecological patients using intravenous patient-controlled analgesia. *Pain* 1995; 62: 313-320.

Grond S, Meuser T, Uragg H, Stahlberg J und Lehmann K, Br J Clin Pharmacol 1999; 48(2) : 254-257.

Hopkins D, Shipton EA, Potgieter D, van der Merwe CA; Boon J, De Wett C, Murphy J: Comparison of tramadol and morphine via subcutaneous PCA following major orthopaedic surgery. Can J Anaesth 1998; 45: 435-442.

Huss B, Bogosyan S, Müller E, Gotzn E. Behandlung einer medikamentös induzierten Agranulozytose mit Granulozyten-Colony-Stimulating Factor (G-CSF) auf einer operativen Intensivstation. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1996; 31: 529-530.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan R: Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. Trends Pharmacol Sci 1999; 20: 342-349.

Ingelmann M: Pharmacogenetics: an opportunity for a safer and more efficient phyrmaco-therapy. J Intern Med 2001; 250: 186-200.

Jobling M, Hurles M, Tyler-Smith C: Health implications of our evolutionary heritage. In: Human evolutionary genetics. New York: Garland Publishing, 2004: 439-471.

Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA: Multiple mutations of the human Cytochrom P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine: a study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. J Biol Chem 1990; 265: 17209-17216.

Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ: The human debrisoquine 4-hydroxy-lase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. Am J Hum Genet 1989; 45: 889-890.

Krimmer H, Pfeiffer H; Arbogast H, Sprotte,G: Die kombinierte Infusionsanalgesie-Ein alternatives Konzept zur postoperativen Schmerztherapie. Chirurg 1986; 57: 327-320.

Le Roux PJ, Coetzee JF : Tramadol today. Curr Opinion Anaesthesiol 2000; 13: 457-461.

Lempa M, Köhler L: Postoperative pain relief in the morbidly obese patient: feasibility study of a combined dipyrone / tramadol infusion. Acute Pain 1999; 2: 172-175.

Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL: Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977; ii: 584-586.

Maier C: Dipyron (metamizol) -a never ending story. *Acute Pain* 1999; 2: 163-165.

Montes A, Warner W, Puig MM: Use of intravenous patient-controlled analgesia for the documentation of synergy between tramadol and metamizol. *Br J Anaesth* 2000; 85: 217-229.

Omoigui S. *The Pain Drugs Handbook*. St Louis, Missouri: Mosby-Year Book Inc., 1995: 287.

Paar WD, Frankus P, Dengler HJ: The metabolism of tramadol by human liver microsomes. *Clin Investig* 1992; 70(8) :706-10.

Paar WD, Poche S, Gerloff J, Dengler HJ: Polymorphic CYP2D6 mediates O-demethylation of the opioid analgesic tramadol. *Eur J Clin Pharmacol* 1997; 53: 235-239.

Palmer SN, Giesecke NM, Body S, Shernan SK, Amanda A, Collard C. *Anesth.* 2005; 102(3) :663-671.

Pang WW, Mok MS, Huang S, Hung CP, Huang MH: Intraoperative loading attenuates nausea and vomiting of tramadol patient-controlled analgesia. *Can J Anaesth* 2000; 47: 968-973.

Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brosen K, Sindrup SH: The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60: 636-644.

Raffa RB, Friderichs E, Reimann W et al.: Complimentary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 331-340.

Raffa RB, Friderichs E: The basic science aspect of Tramadol hydrochloride. *Pain Reviews* 1996; 3: 249-271.

Raffa RB: Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. *J Clin Pharm Ther* 2001; 26: 257-264.

Ruoff GE: Slowing the initial titration rate of tramadol improves tolerability. *Pharmacotherapy* 1999; 19: 88-93.

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

Saxena R, Shaw GL, Reillin MV, Frame JNm Moir DT, Evans WE, Caporaso N, Weiffenbach B: Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 923-926.

Schwab M, Marx C, Zanger U, Eichelbaum M, Fischer M: Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme: Bedeutung für Wirkung und Nebenwirkung von Medikamenten. *Dtsch Arztebl* 2002; 99: A 497-504.

Shipton EA: Tramadol -present and future. *Anaesth Intens Care* 2000; 28: 363-374.

Schug SA, Zech D, Dorr U: Cancer pain management according to WHO analgesic guidelines. *J Pain Symptom Manage* 1990; 5: 27-32.

Spacek A: Kombinations-Infusionsanalgesie: Eine Alternative zur PCA? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1999; 34: 363-366.

Sprotte G: "Ist der Würzburger Schmerztröpf eine Alternative zur i.v. PCA?" *Pro. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2000; 35: 32-34.

Stamer UM, Maier C, Grond S, Veh-Schmidt B, Klaschik E, Lehmann KA: Tramadol in the management of postoperative pain: a double-blind, placebo-and active drug-controlled study. *Eur J Anaesthesiol* 1997; 14: 646-654.

Stamer UM, Grond S, Maier C: Responders and non responders to postoperative pain treatment: Loading dose predicts analgesic needs. *Eur J Anaesthesiol* 1999; 16: 103-110.

Stamer U, Henn P: "Ist der Würzburger Schmerztröpf eine Alternative zur i.v. PCA?" *Contra. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2000; 35: 31-32.

Stamer U, Mpasios N, Laubenthal H, Maier C: Postoperative Schmerztherapie in Deutschland: Ergebnisse einer Umfrage. *Anaesthesist* 2002; 51: 248-257.

Stamer UM, Bayerer B, Wolf S, Hoeft A, Stüber F: Rapid and reliable method for Cytochrome P450 2D6 Genotyping. *Clin Chemistry* 2002; 48: 1412-1417.

Stamer UM, Höthker F, Lehnen K, Stüber F: Postoperative Analgesie mit Tramadol und Metamizol: Kontinuierliche Infusion versus PCA. *Anaesthesist* 2003; 52: 33-41.

Stamer UM, Lehnen K, Höthker F, Bayerer B, Wolf S, Hoefft A, Stuber, F: Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain* 2003; 105: 231-238.

Steen VM, Andreassen OA, Daly AK, Tefre T, Børresen AL, Jeffrey RI, Gulbrandsen AK: Detection of the poor metabolizer-associated CYP2D6(D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 215-223.

Steffen P, Schuhmacher I, Weichel T, Georgieff, M Seeling W: Untersuchungen zum differenzierten Einsatz von Nichtopioiden zur postoperativen Analgesie Quantifizierung des analgetischen Effektes von Metamizol mittels der patientenkontrollierten Analgesie. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1996; 31: 143-147.

Steffen P, Seeling W, Kunze R, Schuhmacher I: Postoperative analgesia after endoscopic abdominal operations. A randomized double-blind study of postoperative effectiveness of metamizole. *Chirurg* 1997; 68: 806-810.

Striebel HW, Hackenberg J: Vergleich einer Tramadol-/Metamizol-Infusion mit der Kombination Tramadol-Infusion plus Ibuprofen-Suppositorien zur postoperativen Schmerztherapie nach Hysterektomien. *Anästhesist* 1992; 41: 354-360.

Stüven T, Griese EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance-and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 417-421.

Tempel G, von Hundhausen B, Reeker W. The opiate sparing effect of dipyrrone in postoperative pain therapy with morphine using a patient-controlled analgesia system. *Intens Care Med* 1995; 22: 1043-1047.

The International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study: Risks of agranulocytosis and aplastic anemia. A first report of their relation to drug use with special reference to analgesics. *JAMA* 1986; 256: 1749-1757.

Ünlügenç H, Gündüz M, Özalevli M, Akman H. A comparative study on the analgesic effect of tramadol, tramadol plus magnesium, and tramadol plus ketamine for postopera-

tive pain management after major abdominal surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 1025-1030.

Vickers MD, O'Flaherty D, Szekely SM, Read M, Yoshizumi J. Tramadol: pain relief by an opioid without depression of respiration. *Anaesthesia* 1992; 47: 291-296.

Vickers MD, Paravicini D: Comparison of Tramadol with morphine in post-operative pain following abdominal surgery. *Eur J Anaesthesiol* 1995; 12/3: 265-271.

Wilder-Smith CH, Hill L, Spargo K, Kalla A. Treatment of severe pain from osteoarthritis with slow-release tramadol or dihydrocodeine or combination with NSAID's: a randomised study comparing analgesia, antinociception and gastrointestinal effects. *Pain* 1991; 91: 23-31.

Wilder-Smith CH, Hill L, Wilkins J, Denny L. Effects of morphine and tramadol on somatic and visceral function and gastrointestinal motility after abdominal surgery. *Anesthesiology* 1999; 91: 639-647.

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an meine Betreuerin PD Dr. Ulrike Stamer, sowie an Makbule Kobilay und Alexandra Casalter für ihre fachliche Unterstützung im Labor.

Sowie an die Ärzte und das Pflegepersonal der Klinik für Anästhesiologie, der Klinik für Allgemein -, Viszeral -, Thorax -, und Gefäßchirurgie und der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Bonn für ihre Kooperation und Unterstützung dieser Studie.