Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Bern

Direktor Prof. Dr. med. H. Reuter

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. pharm. S. Mühlebach

Therapeutisches Monitoring von Phenytoin im Krankenhaus

Untersuchungen zur schnellen i.v.-Aufsättigung und Dosisvoraussage mittels Bayesian Forecasting, zur Laborbestimmung und zur Phänotypisierung der Metabolisierungsgeschwindigkeit

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Pharmazie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Bern

Vorgelegt von

MARTINELLI Enea Felice

von Vacallo TI

Von der Medizinischen Fakultät auf Antrag der Dissertationskommission als Dissertation genehmigt

Bern,

Der Dekan der Medizinischen Fakultät

Meiner Michaela
für ihre Geduld und Unterstützung

Verdankungen

Ich danke

- Herrn PD Dr. pharm. Stefan Mühlebach für die vielen konstruktiven Gespräche, die Kritik und die unzähligen Stunden, die er für mich und meine Arbeit investiert hat. Besonders danke ich ihm für das Vertrauen, das er mir entgegen gebracht hat.

- Herrn Prof. Dr. med. S. Vozeh für die Überlassung seines Programms, für die vielen ausserordentlich hilfreichen Informationen und Gedankenanstösse.

- Frau Dr. med. Ursula Reist für das Programmieren des „Expertensystems“ zur initialen Verordnung auf der Station, welches entscheidend zur korrekten Durchführung dieser Studie beigetragen hat.

- Herrn E. Sommer, Krankenpfleger, für die „technische“ Hilfe bei der Zusammenstellung der Merkblätter.

- den Herren Prof. Dr. med. D. Conen, Dr. med. K. Reist und PD Dr. H. Landolt für ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Studie.

- Herrn Prof. Dr. med. W. Bürgi und dem Team um Frau Briner für ihre Bereitschaft, auch ausserhalb der ordentlichen Zeiten Messungen für die Phendose Studie durchzuführen und für die stets zuverlässigen Resultate

- meinen Kollegen der Spitalapotheke Brigitte Rötheli-Simmen, Karin Dubach-Stutz, Dr. pharm. Franziska Bögli und Dr. pharm. Christian Schmutz für die Vertretung während meinen Abwesenheiten und für das offene Ohr, das sie jederzeit für meine Anliegen, Sorgen und Nöte hatten.

- meinem Nachfolger Patrick Steger für seine moralische Unterstützung.

- dem gesamten Team der Spitalapotheke für die ausgezeichnete Ausbildung, das tolle Arbeitsklima und die gute Zeit, die ich Aarau erleben durfte.

- dem wissenschaftlichen Fonds des Kantonsspitals Aarau, den Firmen B. Braun (Schweiz) und Glaxo (Schweiz) für ihre grosszügige finanzielle Unterstützung sowie für das Interesse für die Ausbildung in Spitalpharmazie im Allgemeinen und unsere Studien im Speziellen.

- Meinen Eltern, Schwiegereltern, Geschwistern, Verwandten, Freunden, Bekannten und Kollegen, die mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Therapeutisches Monitoring von Phenytoin im Krankenhaus

Untersuchungen zur schnellen i.v.-Aufsättigung und Dosisvoraussage mittels Bayesian Forecasting, zur Laborbestimmung und zur Phänotypisierung der Metabolisierungsgeschwindigkeit

- Klinische Erprobung eines standardisierten, schnellen i.v.-Aufsättigungschemas mit Phenytoin

- Phenytoindosisindividualisierung mittels Bayesian Forecasting

- Etablierung einer HPLC-Methode zur parallelen Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin

- Etablierung einer HPLC-Methode zur Trennung der Enantiomere des Phenytoinhauptmetaboliten p-HPPH

- Beurteilung der EMIT-Methode für die Routinebestimmung von Phenytoin im Serum

- Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus durch die Bestimmung von verschiedenen Quotienten von Phenytoin und Metaboliten mittels HPLC in Serum und Urin zur Unterstützung des Therapeutic Drug Monitoring im Nicht-Steady-State.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen 8

2. Zusammenfassung 10

3. Einführung 13

3.1. Therapeutic Drug Monitoring 13
3.1.1. Definition ... 13
3.1.2. Voraussetzungen für ein Therapeutic Drug Monitoring ... 13
3.1.3. Messungen von Arzneimittelkonzentrationen im Organismus ... 14
3.1.3.1. Biologisches Material ... 14
3.1.3.2. Messmethoden ... 14
3.1.3.3. Die Qualität der Bestimmungsmethode ... 15
3.1.4. Die Probe und ihre Entnahme ... 15
3.1.5. Das Messresultat und seine Interpretation ... 17
3.1.6. Die Zielkonzentrationsstrategie ... 17
3.1.6.1. Die Bayes-Statistik ... 19

3.2. Pharmazeutische und pharmakologische Charakteristika von Phenytoin 23
3.2.1. Phenytoin : pharmazeutische Charakterisierung ... 23
3.2.1.1. Entdeckung und Stellenwert heute ... 23
3.2.1.2. Chemie und physikalische Eigenschaften ... 23
3.2.1.3. Galenische Formen und ihre Eigenschaften ... 24
3.2.2. Phenytoin : registrierte (therapeutische) Indikationen ... 26
3.2.3. Pharmakologie von Phenytoin ... 27
3.2.3.1. Pharmakokinetik ... 27
3.2.3.1.1. Absorption ... 27
3.2.3.1.2. Distribution (Verteilung) ... 27
3.2.3.1.3. Metabolismus ... 27
3.2.3.1.4. Interaktionen ... 38
3.2.3.1.5. Exkretion ... 40
3.2.3.1.6. Pharmakogenetische Polymorphismen ... 41
3.2.3.2. Pharmakodynamik ... 44
3.2.3.2.1. Antikonvulsive Wirkung ... 44
3.2.3.2.2. Antiarrhythmische Wirkung (Klasse I: Natriumkanalblocker) ... 45
3.2.3.2.3. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) ... 45
3.2.3.2.4. Dosis-Wirkungs (UAW)-Beziehungen (therapeutischer Bereich) ... 46

3.3. Therapeutic Drug Monitoring von Phenytoin 49
3.3.1. Voraussetzungen von Phenytoin für ein TDM ... 49
3.3.2. Die Zielkonzentrationsstrategie für Phenytoin ... 50
3.3.2.1. Angestrebte Zielkonzentration im Serum ... 50
3.3.2.2. Aufsättigung ohne bekannte individuelle Kinetikparameter des Patienten ... 50
3.3.2.3. Voraussagemethoden mit einer Zielkonzentrationsstrategie unter Verwendung individueller Patientendaten ... 53
3.3.3. Phenytoin und seine Labor-Bestimmung ... 56
3.3.3.1. Die EMIT Bestimmungsmethode für Phenytoin im Serum ... 56
3.3.3.2. HPLC Bestimmungsmethode zur Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin ... 58
3.3.3.3. Trennung der R-/S-Enantiomere des Hauptmetaboliten p-HPPH mittels HPLC ... 59

4. Ziele der Untersuchung 64

5. Material und Methoden 65

5.1. Schnelle Aufsättigung und Dosisanpassung mittels Bayesian Forecasting 65
5.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien ... 65
5.1.2. Patientengut ... 66
5.1.3. Phenytoin-Applikation ... 69
5.1.4. Blutentnahme und Serumspiegelmessungen ... 70
5.1.5. Dosierungsschema zur schnellen Aufsättigung ... 70
5.1.5.1. Initialdosis ... 70
5.1.5.2. Standarderhaltungsdosis ... 72
5.1.5.3. Zeitpunkte der Serumspiegelmessungen ... 72
5.1.5.3. Spitalinterne Datenerfassung und -übermittlung ... 74
5.1.5.3.1. Erfassungsblätter und Protokolle ... 74
5.1.6. Individuelle Dosisanpassung ... 82
5.1.6.1. Individuelle Erhaltungsdosis und Serumspiegelmessungen ... 82
5.1.6.2. Programm zur Dosisanpassung und Spiegelvoraussage ... 82
5.1.6.3. Therapieverordnung ... 83
5.1.7. Statistische Auswertung der Güte der Voraussage ... 85

5.2. analytische Bestimmungsmethoden (HPLC, EMIT) 86
5.2.1. Geräte, Chemikalien, biologisches Material ... 86
5.2.2. Bestimmung von Phenyotin und p-HPPH in Serum und Urin ... 87
5.2.2.1. Eichlösungen ... 87
5.2.2.2. Probenvorbereitung ... 89
5.2.2.2.1. Aufbereitung der Serumproben ... 89
5.2.2.2.2. Aufbereitung der Urinproben ... 89
5.2.2.3. Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin, Isolierung von p-HPPH (HPLC-System I) ... 91
5.2.2.4. Trennung und Quantifizierung der Enantiomere von p-HPPH (HPLC-System 2) mittels β-Cyclodectrin-HPLC ... 103
5.2.2.5. Bestimmung der Cross-Reactivity bei der EMIT-Methode ... 106
5.2.2.6. Bestimmung von Phenytoin im Serum : Vergleich der EMIT- mit der HPLC-Methode ... 107

5.3. Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus durch die Bestimmung der Konzentrationsverhältnisse von Phenytoin und seinen Metaboliten in Serum und Urin 107

6. Resultate 108

6.1. Dosierungsstrategie zur schnellen i.v.-Aufsättigung mit Phenytoin 108
6.1.1. Standardschema für die schnelle i.v.-Aufsättigung ... 108
6.1.2. Güte des Voraussageprogramms für die individuelle Dosisanpassung ... 111
6.1.2.1. Phenytoin-Serumspiegel 4 (n = 46) ... 111
6.1.2.2. Serumspiegel 5 (n = 27) ... 114
6.1.2.3. Serumspiegel 6 (n = 9) ... 116

6.2. Phenytoin und seine Laborbestimmung 117
6.2.1. Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH im Serum und im Urin mittels HPLC mit internem Standard ... 117
6.2.2. Beurteilung der EMIT-Methode für das Phenytoin-TDM ... 118
6.2.2.1. Vergleich der EMIT-Methode mit der HPLC-Methode ... 118
6.2.2.2. EMIT : Beinflussung der Phenytoin-Messresultate durch strukturverwandte Substanzen (Cross-Reactivity) ... 120
6.2.3. Quantifizierung von R- und S-p-HPPH im Urin mittels β-Cyclodextrin-HPLC (chirales Laufmittel) ... 124

6.3. Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus : Korrelation der individuellen Eliminationshalbwertszeit (berechnet im Nicht-Steady-State) mit dem Metabolitenmuster in Urin und Serum 125
6.3.1. Korrelation mit dem Quotienten Phenytoin zu p-HPPH im Serum ... 125
6.3.1.1. Tag 1 bis 5 der Therapie (schnelle i.v.-Aufsättigung) ... 125
6.3.1.2. nach Therapietag 5 (individuelle Dosierung im Nicht-Steady-State) ... 126
6.3.2. Korrelation mit dem Konzentrationsquotienten von R- zu S-p-HPPH im Urin ... 128
6.3.2.1. Tag 1 bis 5 der Therapie (schnelle, standardisierte i.v. Aufsättigung) ... 129
6.3.2.2. nach Therapietag 5 (individuelle Dosierung im Nicht-Steady-State) ... 131

7. Diskussion 132

7.1. Effektivität des Phenytoindosierungsschemas : Bayesian Forecasting im klinischen Patientengut 132
7.1.1. Beurteilung der Zielkonzentrationsstrategie bei der Initialtherapie und im Langzeitverlauf ... 132
7.1.1.1. Phase I : Schnelle, standardisierte i.v.-Aufsättigung (Therapietag 1 bis 5) ... 132
7.1.1.2. Beurteilung des verwendeten i.v.-Aufsättigungsverfahrens gegenüber dem bisher in der Klinik verwendeten Schema ... 135
7.1.1.3. Phase II : Individuelle, spiegelorientierte Dosierung ... 136
7.1.2. Altersabhängigkeit der Pharmakokinetik von Phenytoin ... 141
7.1.3. TDM mit Bayesian Forecasting in der Klinik ... 144
7.1.3.1. „Therapeutische“ Phenytoin-Serumspiegel ... 144
7.1.3.2. Akzeptanz des TDM-Service für Phenytoin in der Klinik ... 144
7.1.3.3. Rolle des Spitalapothekers beim Therapeutic Drug Monitoring ... 145
7.1.3.4. Kosten-Nutzen Ueberlegungen zum TDM von Phenytoin ... 145

7.2. Phenytoin und seine Laborbestimmung 148
7.2.1. Gleichzeitige Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH mittels HPLC ... 148
7.2.2. Überprüfung der EMIT-Bestimmungsmethode für Phenytoin mittels HPLC ... 151
7.2.3. Chirale HPLC-Analytik zur Bestimmung von R- und S-p-HPPH im Urin ... 153

7.3. Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus durch die Korrelation der individuellen Eliminationshalbwertszeit (berechnet im Nicht-Steady-State) mit dem Metabolitenmuster in Urin und Serum 154
7.3.1. Phenytoin : p-HPPH-Quotient im Serum ... 154
7.3.2. Konzentrationsverhältnis R- : S- p-HPPH in Serum und Urin ... 155

8. Schlussfolgerungen 157

9. Literaturverzeichnis 159

1. Abkürzungen

ACA	Automatischer Clinischer Analysator
alkal.	alkalisch
Ap.	Apotheke
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
AV	Atrio-ventrikulär
B	Bolus
°C	Grad Celsius
$C_{(t)}$	Konzentration zur Zeit t
CGTase	Cyclodextrin glycosyl transferase
Cl	Clearance
C_{ss}	Konzentration im Steady-State
D	Dosis
D_m	Erhaltungsdosis
DAD	Diode Array Detector
DIN	Deutsche Industrie Norm
DOS	Disk Operation System
ec	endcapped
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique
engl.	Englisch
F	orale Bioverfügbarkeit
g	Gramm
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GOT	Glutamat-Oxalo-Acetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochdruckflüssigchromatographie)
i.v.	Intravenös
IS	Interner Standard
k'	Kapazitätsfaktor
k_e	Eliminationskonstante
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KI	Kurzinfusion
K_m	Michaelis Konstante (Substratkonzentration bei halbmaximaler Abbaugeschwindigkeit)
KSA	Kantonsspital Aarau
L	Liter
LC	Liquid Chromatograph
LD_{50}	Dosis, die bei 50% der getesteten Individuen letal wirkt
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
m/V	Masse pro Volumen
mae	**m**ean of **a**bsolute **e**rrors
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mmol	Millimol

mM	Millimolar
n	Anzahl
N	Normalität
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
nd	nicht detektierbar
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
ODS	Octadecyl (C_{18})-Silan
OP	Operation (chirurgischer Eingriff)
p-HPPH	para-Hydroxyphenyl-Phenylhydantoin
p.o.	per os
PE	Prediction Error
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Ph. Helv.	Pharmacopoea Helvetica
PHT	Phenytoin
pKa	negativer Logarithmus der Dissoziationskonstante
PP	Polypropylen
®	eingetragenes Warenzeichen
RAM	Arbeitsspeicher
rmse	**r**oot **m**ean **s**quared **e**rrors
SD	**S**tandard **D**eviation (Standardabweichung)
SEM	**s**tandard **e**rror of the **m**ean
σ^2	Varianz
τ	Dosisintervall
TDM	Therapeutic Drug Monitoring
tot.	total
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen
U/min	Umdrehungen/Minute
v	Abbau/Tag [mg/Tag] (metabolische Abbaugeschwindigkeit)
v_{max}	maximale Abbaugeschwindigkeit [mg/Tag]
Vd	Volume of Distribution (Verteilungsvolumen)

2. Zusammenfassung

Phenytoin gilt trotz seiner problematischen Pharmakokinetik noch immer als das wichtigste Basismedikament für die Behandlung der Epilepsie. Es hat seinen Nutzen auch für die Prophylaxe posttraumatischer Anfälle, bei Patienten mit Kraniotomie oder mit akuten cerebralen Störungen nach Aneurismen, Traumen etc. gezeigt. Um so schnell wie möglich effektive, therapeutische Serumspiegel zu erreichen, ist der Gebrauch eines Schemas für die schnelle i.v.-Aufsättigung und ein „Therapeutic Drug Monitoring“ zwingend. Serumkonzentrationen im Bereich von 10 bis 20 mg/L stellen einen akzeptierten therapeutischen Bereich dar. Eine individuelle Anpassung der Dosis ist nötig wegen dem kleinen therapeutischen Index, der nicht-linearen Pharmakokinetik, der interindividuell stark variierenden pharmakokinetischen Parameter (v_{max}, K_m) und wegen des Interaktionspotentials von Phenytoin.
Als Dosierungshilfe für Phenytoin existieren verschiedene Nomogramme, mit deren Hilfe die Dosis mit Konzentrationsmessungen im Steady-State individuell angepasst werden kann. Für die akute Dosiseinstellung können diese Hilfen jedoch nicht angewendet werden, weil noch kein Steady-State vorliegt.
Im ersten Teil dieser Studie wurden Effektivität und Praktikabilität einer initial standardisierten und nach 5 Tagen individualisierten Dosierung bei Klinik-Patienten, welche eine rasche Aufsättigung mit Phenytoin benötigen, untersucht. Für die rasche Aufsättigung wurde ein durch Computersimulation festgelegtes Dosierungsschema unter Klinikbedingungen evaluiert. Für die Berechnung der individuellen Dosierung wurde ein Bayesian Forecasting PC-Programm verwendet, das aufgrund von Nicht-Steady-State-Spiegeln die individuellen Parameter (v_{max}, K_m und Vd) schätzt.
96 Patienten wurden in die Studie aufgenommen, wovon 68 Patienten zur Auswertung gelangten: 43 chirurgische, 25 medizinische; 45 Männer, 23 Frauen; Alter: 50±15 Jahre; Gewicht: 74±10 kg. Die Patienten erhielten als erste Phenytoindosis 15 mg/kg Körpergewicht als Infusion über 4 Std., dann alle 12 Stunden 175 mg (für Patienten ≤ 70 kg) resp. 200 mg (>70 kg) als Kurzinfusion über 30 Minuten. Serumspiegel wurden vor der ersten Erhaltungsdosis (nach 16 Stunden) sowie vor der Morgendosis des 4. und des 5. Tages bestimmt: 16 Stunden nach Therapiebeginn lagen 79.5% (54) der Spiegel zwischen 10 und 20 mg/L. 13.2% (9) der Werte waren < 10 mg/L (6.3 bis 9.9 mg/L) und 7.3% (5) > 20 mg/L (20.1 bis 24.4). Am Tag 5 waren noch 69.2% (47) der Werte im gewünschten Bereich. 17.6% (12) der Werte lagen zu tief (2.5 bis 9.9 mg/L) und 13.2% (9) lagen zu hoch (20.2 bis 26,5 mg/L).
Die notwendige individuelle Erhaltungsdosis wurde mit diesen 3 Messungen angepasst: Alle Patientendosierungen mussten aufgrund der Computerschätzung der individuellen kinetischen Parameter um -57.5% bis +78.9% angepasst werden, um den Zielspiegel (11 mg/L) zu erreichen. Ohne Dosisanpassung wäre die Steady-State Konzentration berechnet mit den geschätzten Parametern bei 70.6 % (48) der Patienten ausserhalb des Bereichs von 10 bis 20 mg/L gelegen (50% (34) > 20 mg/L; 20.6% (14) < 10 mg/L).
Die Güte der individuellen Dosisanpassung konnte an 46 Patienten (36 Männer, 15 Frauen; 25 chirurgische, 21 medizinische Patienten) überprüft werden. Der mittlere Voraussagefehler (PE; Soll-Ist Abweichung) betrug 4.31 ± 3.43 mg/L; Der mittlere absolute Voraussagefehler (rmse; Wurzel des Mittels der Fehlerquadrate) betrug 6.35 mg/L.
Von den 68 (respektive 49) Patienten waren 15 (respektive 9 in der zweiten Phase) 65 oder mehr Jahre alt. Bei der Analyse der Daten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Die Resultate zeigten, dass mit diesem Dosierungsschema die meisten Patienten (auch solche mit potentiell interagierender Co-Medikation oder Patienten über 65 Jahre) schnell therapeutische Spiegel erreichten und dass eine individuelle Dosisanpassung nach etwa 5 Tagen notwendig war.

Ein TDM mit Serumspiegelkontrollen ist unerlässlich, um therapeutische und nicht-toxische Serumkonzentrationen zu garantieren und damit eine optimale Therapie zu erhalten. Das Bayesian Forecasting ist ein geeignetes Verfahren, um auch unter Nicht-Steady-State Bedingungen eine rationale Dosisanpassung sowie eine Planung der für sinnvolle Serumspiegelmessungen vorzunehmen.

Die Genauigkeit von EMIT® (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) Medikamenten-spiegelbestimmungen wird üblicherweise durch einen Vergleich mit nicht immunologischen Methoden bestimmt, da die Qualität eines Enzymimmunotests sehr stark von der Reinheit des Antigens das für die Immunisierung, die Kalibrierung und die Konjugation verwendet wird, sowie von der Spezifität des entsprechenden Antikörpers abhängt. Falls ein Antikörper nicht genügend spezifisch ist, können strukturähnliche Moleküle die Genauigkeit der Resultate beeinflussen. Die Richtigkeit des EMIT® der Firma Syva für die Bestimmung von Phenytoin wurde mit einer HPLC-Methode zur parallelen Quantifizierung von Phenytoin, p-Hydroxy-phenyl-Phenylhydantoin (HPPH) und Phenobarbital bestimmt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob Zumischungen von p-HPPH und Phenobarbital (in vitro) die Resultate der Phenytoin-Messungen klinisch relevant beeinflussen. Die analytische Bestimmung von Phenytoin, p-HPPH und Phenobarbital mittels HPLC erfolgte sensitiv, reproduzierbar und richtig mit einem guten Peakauflösungsvermögen durch eine isokratische Phosphatpuffer-Acetonitril-Methanol-Elution auf einer C_{18}-Säule mit UV-Dioden-Array-Detektion. Die HPLC-Methode war mit einem Injektionsvolumen von 20 µL im Serumkonzentrationsbereich von 1 bis mindestens 31 mg/L für Phenytoin linear ($n = 5$; $r^2 = 0.9989$). Die EMIT-Methode war in diesem Bereich, bestimmt mit den selben Proben, ebenfalls linear ($n = 5$, $r^2 = 0.9968$). Die analytische Ausbeute betrug 104.6 ± 4.04 % für die HPLC- und 93.9 ± 2.5 % für die EMIT-Methode.
Die Resultate gemessen mit beiden Methoden korrelierten gut miteinander ($n= 5$, $r^2 = 0.9990$).
Eine mögliche Interferenz der EMIT-Bestimmung mit steigenden Konzentrationen von Phenobarbital oder p-HPPH konnte nicht gefunden werden.
Die Resultate des EMIT sind, trotz einer etwas geringer ausgefallenen analytischen Ausbeute, für klinische Bedürfinsse gut. Relevante Interferenzen mit strukturverwandten Stoffen konnten nicht gefunden werden.

Cytochrom P_{450}, ein Enzymsystem beteiligt an der Biotransformation einer Vielzahl von Arzneistoffen, ist auch verantwortlich für den Metabolismus von Phenytoin, S-Mephenytoin und Debrisoquin. Der Abbau von S-Mephenytoin und von Debrisoquin unterliegt genetischen Polymorphismen, deren Phänotyp durch einfache analytische Methoden zu bestimmen ist. Für Phenytoin, dessen grosse interindividuelle Variabilität in der Abbaugeschwindigkeit bekannt ist, wurde versucht, eine Methode zu finden, um möglichst früh aus dem Metabolitenmuster Rückschlüsse auf die individuelle Eliminationshalbwertszeit zu ziehen.
Mit einer HPLC-Methode zur gleichzeitigen Quantifizierung von Phenytoin und seinem Hauptmetaboliten p-HPPH und mit einer HPLC-Methode zur Bestimmung der der R- und S-Enantiomere von p-HPPH im Urin, wurde die Möglichketi einer raschen „Phänotypisierung“ des Phenytoinmetabolismus analysiert, um ein TDM bereits in der Anfangsphase der Therapie zu verbessern.

Nach einer einfachen Probenaufbereitung (Abspaltung der Glucuronsäure von p-HPPH durch β-Glucuronidase und Ausfällung der Serumproteine durch Acetonitril) erfolgte die analytische Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH im Wasser, im Serum und im Urin sensitiv, reproduzierbar und mit einem guten Peakauflösungsvermögen mit einer isokratischen Phosphatpuffer-Acetonitril-Methanol-Elution mit internem Standard (Hexobarbital) auf einer C_{18}-Säule und mit UV-Dioden-Array-Detektion. Die HPLC-Methode war mit einem Injektionsvolumen von 20 µL im Konzentrationsbereich von 1 bis mindestens 60 mg/L für Phenytoin in allen Medien linear (Wasser n = 12; r^2 = 0.9944; Urin n = 13, r^2 = 0.9919; Serum n = 14 r^2 = 0.9983). Für p-HPPH war die Methode mit einem Injektionsvolumen von ebenfalls 20 µL in einem Bereich von 1 bis mindestens 30 mg/L linear (Wasser n = 12; r^2 = 0.9961; Urin n = 13, r^2 = 0.9958, Serum n = 14 r^2 = 0.9939). Die analytische Ausbeute war für beide Stoffe gut (Phenytoin: Urin 99.8± 6.6%, Serum 101.1± 4.5%; p-HPPH: Urin 100.7 ± 16.2%; Serum 121.6± 42.3%).

Zur Bestimmung des Konzentrationsquotienten der p-HPPH-Enantiomere wurde der p-HPPH Peak direkt aus der Phenytoin-HPLC-Analytik (Injektionsvolumen 100 µL) isoliert und anschliessend mit einer zweiten HPLC-Methodik unter Verwendung einer wässerigen β-Cyclodextrinlösung und Methanol, in einer 50 mm C_{18} ec Säule getrennt. Diese Bestimmung war ebenfalls sensitiv, reproduzierbar und mit einem guten Peakauflösungsvermögen für beide Enantiomere. Die Methode war mit einem Injektionsvolumen von 100 µL in einem Konzentrationsbereich von 0.05 bis 30 mg/L für beide Enantiomere linear
(R-HPPH : n = 11; r^2 = 0.9960; S-HPPH : n = 11, r^2 = 0.9959).

Eine Korrelation zur individuellen Eliminationshalbwertszeit, berechnet mit dem Bayesian Forecasting Programm, war im Nicht-Steady-State weder mit den Quotienten Phenytoin- zu p-HPPH im Serum, noch mit den Quotienten R- zu S- p-HPPH im Urin feststellbar
(r^2 = 0.0001 bis 0.023).
Die Gründe sind einerseits in der unterschiedlichen Kinetik von Phenytoin und seinem Hauptmetaboliten p-HPPH andererseits auch in der offensichtlichen Existenz mehrerer Phenytoin-hydroxylierenden Enzyme zu suchen.

3. Einführung

3.1. Therapeutic Drug Monitoring

3.1.1. Definition

Unter „Therapeutic Drug Monitoring (TDM)“ versteht man die Bestimmung von Arzneimittel-(Plasma-) Spiegeln mit dem Ziel, die individuelle Pharmakokinetik des betreffenden Patienten kennen zu lernen, und dadurch, falls erforderlich, die Arzneimitteldosierung gezielt anzupassen. (angepasst nach [1])

Folgende Ziele können mit einem Therapeutic Drug Monitoring erreicht werden[2, 3] :

- Steigerung der Effektivität und Sicherheit der Pharmakotherapie
- Abklärung eines Verdachts auf Arzneimittelüberdosierung
- Abklärung der Gründe eines Therapieversagens
- Erstellung von Dosierungsschemata bei Patienten mit veränderter Pharmakokinetik

3.1.2. Voraussetzungen für ein Therapeutic Drug Monitoring

Bei bestimmten Medikamenten ist es wichtig, den Konzentrationsverlauf individuell zu bestimmen, um erwünschte Effekte zeitgerecht zu erreichen oder um unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) auf ein Minimum zu reduzieren. Dies erfordert die genaue Kenntnis der Pharmakokinetik, der Pharmakodynamik, pharmakogenetischer Unterschiede, sowie anderer Einflussgrössen, die den Konzentrationsverlauf eines Arzneistoffs beeinträchtigen können.
Die Absorption von Arzneistoffen, ihre Verteilung im Organismus, der Metabolismus und ihre Ausscheidung können von Patient zu Patient sehr verschieden sein. Die genetische Prädisposition, Alter, Geschlecht, Organfunktionen (z.B. von Niere und Leber), Erkrankungen und individuelle Empfindlichkeit, aber auch mögliche Interaktionen zwischen Nahrung und Arzneistoff sowie zwischen verschiedenen Arzneistoffen gehören zu den Faktoren, die die Wirkung (Pharmakodynamik) und das Schicksal (Pharmakokinetik) eines Wirkstoffs im Körper beeinflussen können[2].

Für ein TDM müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein :

Tabelle 1

Voraussetzungen für ein sinnvolles TDM (angepasst nach [4])

1. Zwischen der gemessenen Arzneimittelkonzentration und therapeutischen und/oder toxischen Effekten soll eine Korrelation bestehen.
2. Der Unterschied zwischen therapeutischer und toxischer Dosis soll klein sein (kleine therapeutische Breite).
3. Die bei Standarddosen erreichten Konzentrationen sollten grosse interindividuelle Unterschiede zeigen.
4. Für die Bestimmung der Serumkonzentration muss eine reproduzierbare und sensible Messmethodik zur Verfügung stehen, deren Handhabung eine Routinebestimmung zulässt (einfache Probeentnahme, einfache Bestimmung).

Wenn diese Kriterien erfüllt und das kinetische Modell bekannt ist, kann ein TDM in Betracht gezogen werden.

Der Nutzen eines TDM gilt als :

- *allgemein akzeptiert* bei der Therapie mit Antiepileptika, Lithiumsalzen, Theophyllin, Aminoglycosid-Antibiotika und Ciclosporin.
- *fraglich* bei Antiarrhytmika und Herzglycosiden[1].
- *unsinnig* bei den meisten übrigen Arzneimitteln.

Ein TDM ist meistens nicht sinnvoll, wenn der Therapieerfolg (Wirkung des Medikaments) direkt gemessen werden kann (zum Beispiel durch Messung des Blutzuckers oder des Blutdrucks); dort kann die Medikation einfacher und besser anhand der klinischen Beobachtungen gesteuert werden.

3.1.3. Messungen von Arzneimittelkonzentrationen im Organismus

3.1.3.1. Biologisches Material

Arzneistoff-Konzentrationen können im Körper sinnvoll nur in ein paar wenigen biologischen Flüssigkeiten bestimmt werden, die meist nicht mit denjenigen an den Wirkorten, z.B. an den Rezeptoren im Gewebe, identisch sind. Zwischen der Konzentration im Messmedium und der Konzentration am Wirkort muss demnach eine bekannte Korrelation bestehen.
Meistens wird die Wirkstoff-Konzentration im Plasma als Parameter für das TDM benutzt. Das TDM kann, je nach Ziel und Ausgangslage, auch mit Konzentrationsbestimmungen z.B. im Speichel oder im Urin gemacht werden.

3.1.3.2. Messmethoden

Eine genaue, reproduzierbare, sensitive und billige Messmethode ist die wichtigste Voraussetzung für ein sinnvolles, in der Kosten-Nutzen-Relation günstiges TDM.

Die Methoden werden laufend verbessert, um :

- die Reproduzierbarkeit zu steigern
- allfällige Interferenzen mit anderen endogenen oder exogenen Substanzen auszuschalten
- die Detektionslimiten zu senken, um auch mit kleinsten verfügbaren biologischen Proben zuverlässige Resultate zu erhalten.

Für die quantitative Messung von Pharmaka in biologischen Medien werden verschiedene Methoden routinemässig verwendet :

Spektrophotometrische Methoden

Chromatographische Methoden :

z.B. Gaschromatographie (GC)
GC kombiniert mit Massenspektroskopie (GC-MS)
Hochdruck-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Immunologische Methoden :

z.B. EMIT (Enzyme-Multiplied Immunoassay-Technique; siehe 3.3.3.1. Die EMIT Bestimmungsmethode für Phenytoin im Serum)
ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay)
RIA (Radioimmunoassay)

In der Routineuntersuchung werden heute vor allem immunologische Methoden verwendet, da der Aufwand zur Probenvorbereitung vernachlässigbar ist und die Bestimmung schnell, billig und für klinische Zwecke exakt genug abläuft.

3.1.3.3. Die Qualität der Bestimmungsmethode[5]

Mit Hilfe der statistischen Qualitätskontrolle wird die Zuverlässigkeit der eigenen Analysenergebnisse überprüft und überwacht. Die interne Qualitätskontrolle erfordert bei Routine-Untersuchungen stets ein Mitanalysieren eines Kontrollserums. Einige klinisch-chemische Laboratorien sind zudem verpflichtet (z.B. in Deutschland), an Ringversuchen teilzunehmen (externe Qualitätskontrollen).

Die Qualität einer Methode wird durch 2 Kenngrössen beurteilt :

Die Präzision

Die Präzision, das heisst das Ausmass des zufälligen Fehlers (durch Laborgeäte etc.) wird ausgedrückt durch den Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung).
Die Richtlinien der deutschen Ärztekammer verlangen für Methoden mit hoher Präzision eine Gesamtvariation von höchstens 5%. Für Methoden mit weniger hoher Präzision (wo aus labortechnischen Gründen mit einer grösseren Streuung zu rechnen ist) lassen sie Variationen bis 10% zu.

Die Richtigkeit

Die Richtigkeit, das heisst die Übereinstimmung zwischen Soll- und Ist-Wert, wird durch die Wiederfindungsrate einer Methode ausgedrückt und bestimmt die Grösse des systematischen Fehlers. Zur Ermittlung der Richtigkeit einer Methode wird ein von Referenzlaboratorien analysiertes „Richtigkeitskontrollserum“ in die Analysenreihe integriert. Die Richtigkeit gilt dann als zufriedenstellend, wenn sich das Resultat dieser Messung innerhalb von bestimmten prozentualen Abweichungen vom Sollwert des Referenzlabors befindet.

Die Analysenresultate eines klinisch-chemischen Labors werden dann als zuverlässig angesehen, wenn sowohl Präzision als auch Richtigkeit den entsprechenden Anforderungen genügen.

3.1.4. Die Probe und ihre Entnahme

Die Präzision und die Richtigkeit der Methode allein genügen nicht für die aussagekräftige Konzentrationsbestimmung, wenn nicht gleichzeitig die Art und der Zeitpunkt der Probeentnahme betrachtet werden. Eine entnommene Probe sollte repräsentativ und nicht durch Fehler bei der Entnahme beeinflusst sein.

Zeitpunkt der Probeentnahme

Interindividuelle Unterschiede in der Bioverfügbarkeit und der Clearance bestimmen die Konzentration zum Zeitpunkt der Messung. Eine einzelne Messung während eines Dosisintervalls wird durch die Zeit seit der letzten Dosisanpassung sowie durch die Anzahl der seither verabreichten Dosen beeinflusst. Nach intravenöser Verabreichung von Arzneimitteln muss bis zum Zeitpunkt der Probeentnahme die initiale Verteilungsphase abgewartet werden. Bei der oralen Verabreichung muss die Absorptionsrate, sowie die absolute und die relative Bioverfügbarkeit in die Berechnung miteinbezogen werden.
Konzentrationsmessungen in Serum oder Urin können bestenfalls semiquantitativ die Menge des applizierten Pharmakons während einer bestimmten Zeit wiederspiegeln (d.h. Laborresultate bedürfen einer genaueren Analyse und Interpretation; siehe 3.1.5. Das Messresultat und seine Interpretation).

Das Probenmedium

Serum

Die Blutentnahme sollte bei einer Dauertherapie im Idealfall im Steady-State erfolgen, das heisst im Zustand des Fliessgleichgewichtes (die tägliche Einnahmemenge des Pharmakons ist gleich der täglich eliminierten Menge). Üblicherweise wird dieses Gleichgewicht bei einer Behandlung mit einer konstantem Dosisregime erst nach ca. 4 Eliminationshalbwertszeiten erreicht (Faustregel).
Die Entnahme der Probe wird, entsprechend der klinischen Fragestellung, auf verschiedene Zeitpunkten fixiert: zum Beispiel bei der maximalen Serumkonzentration, wenn das Medikament einen bestimmten Serumspiegel nicht überschreiten darf (Beurteilung der Kumulation; z.B. Aminoglycoside) und/oder unmittelbar vor der Verabreichung der nächsten Dosis, wenn das Medikament einen festgelegten Wert nicht unterschreiten sollte (z.B. bei Phenytoin). Die Bestimmung der minimalen und maximalen Serumkonzentration ist wichtig bei Arzneimitteln mit einem engen therapeutischen Bereich und einer kurzen Halbwertszeit (wie z.B. Theophyllin, Gentamicin). Bei anderen Medikamenten ist der Zeitpunkt der Blutentnahme nicht relevant, weil die Unterschiede zwischen minimaler und maximaler Serumkonzentration im Steady-State gering sind.

Urin

Grundlage einer Urinbilanz ist die zuverlässige Urinsammlung und -protokollierung (Menge, Zeitpunkt) während der gesamten untersuchten Periode. Es wird empfohlen Sammelproben immer mit dem ersten Morgenurin zu beenden. Urinbestimmungen, besonders wenn sie ambulant durchgeführt werden, ergeben oft unzuverlässige Resultate[6].
Manchmal werden auch Konzentrations- und Mengenverhältnisse von Pharmaka und seinen Metaboliten oder von Metaboliten unter sich gemessen. In diesem Fall spielt die Bestimmung des Urinvolumens eine untergeordnete Rolle. Dafür ist die Kenntnis des Zeitpunktes der Messung wieder notwendig. Die relativen Urinkonzentrationen stabilisieren sich erst, wenn sich alle bestimmten Stoffe im Steady-State befinden.

Entnahme und Aufbewahrung von Proben

folgende Faktoren können die Serumspiegelbestimmung beeinflussen :

- Das Blut darf nicht über dieselbe Kanüle oder über denselben Katheter entnommen werden, über die oder den das Pharmakon zuvor infundiert wurde.

- Wird das sofort abzentrifugierte Plasma oder Serum länger als 6 Stunden aufbewahrt, muss die Probe tiefgefroren werden.

Im Urin beeinflussen folgende Faktoren das Resultat[6] :

- Die Ausscheidungsprodukte sind einem Abbau durch Bakterien oder Pilze ausgesetzt. Es ist daher notwendig, den Urin, der nicht sofort aufgearbeitet wird, tiefzugefrieren (unter -20° C) oder eventuell zu konservieren (z.B. mit Thymol-Isopropanol).

3.1.5. Das Messresultat und seine Interpretation

Zur Interpretation der Arzneimittelkonzentrationen ist nicht nur die Kenntnis der Messmethodik entscheidend. Weitere Faktoren spielen eine ebenso wichtige Rolle[7] :

Das spezifische Krankheitsbild

Die klinische Symptomatik muss bei der Interpretation von Wirkstoff-Konzentrationen in Betracht gezogen werden. Eventuell müssen zusätzliche Parameter beigezogen werden, um den Konzentrationsverlauf eines Arzneimittels zu beurteilen, wie zum Beispiel die Serumalbuminkonzentration (bei Arzneimitteln mit geringem Verteilungsvolumen und starker Proteinbindung z.B. Phenytoin) oder die Kreatininclearance (zur Bestimmung der Nierenfunktion bei vorwiegend renal eliminierten Arzneimitteln, wie zum Beispiel den Aminoglycosiden).

Beurteilung der Beziehung zwischen Konzentration und Wirkung

Eine ausreichende Wirkung tritt gelegentlich schon bei subtherapeutischen oder erst bei potentiell toxischen Spiegeln auf (pharmakodynamische Variabilität). Die Konzentrationsgrenzen des therapeutischen Bereichs können sich durch synergistische oder antagonistische Medikamentenwirkungen, bei Wirkstoffen mit stark variabler Serumproteinbindung (z.B. Phenytoin) oder beim Vorliegen anderer Faktoren (veränderte metabolische Stoffwechsellage, genetische Faktoren etc.) ändern.

Beeinflussung der Wirkung durch Arzneimittelinteraktionen

Neben dem erfassten Hauptwirkstoff können pharmakologisch aktive Metabolite in relevanten Konzentrationen auftreten (z.B. Primidon und sein aktiver Metabolit Phenobarbital) und zur Wirkung des Medikamentes beitragen. In diesem Fall sollte ein Monitoring alle aktiven Substanzen erfassen.
Ausserdem können zwischen verschiedenen Pharmaka Interaktionen auftreten, die die Absorbtion, die Verteilung, den Metabolismus oder die Exkretion beeinflussen können (Beispiele siehe 3.2.3.1.4. Interaktionen).

3.1.6. Die Zielkonzentrationsstrategie

Um eine Therapie rational zu gestalten, muss für jedes Medikament ein gewünschter Effekt, das heisst ein Therapieziel, definiert werden. Das Erreichen dieses Ziels wird durch die Messung eines relevanten klinischen Parameters kontrolliert und die Dosis nötigenfalls angepasst.

Ein Therapeutic Drug Monitoring verfolgt meistens das Ziel, die Effektivität und die Sicherheit von Medikamenten zu verbessern, deren individelle Dosierung schwierig ist. In diesem Fall muss in Kenntnis der Dosis-Wirkungs-Beziehung eine Zielkonzentration (z.B. im Plasma) definiert werden, bei der der gewünschte Effekt mit grosser Wahrscheinlichkeit eintritt.
Die Kenntnis der Pharmakokinetik wird zudem eingesetzt, um die notwendige erste Dosis (Initialdosis) und die folgenden Erhaltungsdosen zu berechnen, das heisst, um möglichst schnell in einen therapeutischen Bereich zu gelangen und dort zu verbleiben.

Es gibt zwei verschiedene Ausgangssituationen für eine Dosisberechung :

1. Vor Beginn der Therapie :
   Die Kenntnisse über die Pharmakokinetik und die Pharmakodynamik des Arzneistoffes werden zur Festlegung der Initialdosis verwendet. In diesem Fall werden Patientendaten wie die Körperoberfläche oder die Nierenfunktion (renale Clearance) zur Dosisberechung einbezogen.

2. Nach eingeleiteter Therapie :
   Wenn der Arzneistoff bereits verabreicht wurde und Beobachtungen wie erreichte Spiegel, erzielter Effekt oder erzielte UAW vorhanden sind, kann eine Anpassung der Dosis erfolgen, welche die individuelle Pharmakokinetik und Pharmakodynamik in die Betrachtung mit einbezieht[8].

Für diese Zwecke existieren verschiedene Voraussagemethoden, mit deren Hilfe die Dosis zum Erreichen der Zielkonzentration berechnet werden kann.
Einige Methoden, vor allem Nomogramme, basieren auf kinetischen Duchschnittsparametern und schliessen eine individuelle Variation aus. Diese Methoden zeigen oft ungenügende Dosisberechnungen (siehe 3.3.2.4. Voraussagemethoden einer Zielkonzentrationsstrategie unter Verwendug individueller Patientendaten).

Im Gegensatz dazu existieren verschiedene Methoden (z.B für Phenytoin[9,10], Digoxin[11], Lidocain[12], Aminoglycoside[13] und für Theophyllin[14]), die auf der Bayes-Statistik (siehe 3.1.6.1. Die Bayes-Statistik) aufbauen und sowohl die individuellen wie auch die interindividuellen Schwankungen in die Berechnung mit einbeziehen.

3.1.6.1. Die Bayes-Statistik

Thomas Bayes (1702-1761) stellte das heute als Bayes Theorem bekannte Modell auf. Sein Freund Richard Price (1723-1791) schickte die Aufzeichnungen im Jahr 1763, zwei Jahre nach dem Tod von Bayes, an Mr. John Canton, Mitglied der Royal Society von London[15]

Die Anwendung des Bayesian Forecasting für das Therapeutic Drug Monitoring wurde unter anderen von Oellerich und Schneider beschrieben[16]. Die folgenden Passagen sind Auszüge einer Übersetzung des Buchtextes ins Deutsche und erklären die Unterschiede zwischen klassischer, auf geschätzten Variabeln beruhender Statistik sowie der Bayes-Statistik mit zufällig verteilten, im voraus geschätzten Variabeln :

Der grundlegende Unterschied zwischen der klassischen Statistik und der Bayes Statistik liegt in der Behandlung der Populationsdaten, das heisst, in der numerischen Charakteristik der Wahrscheinlichkeitsverteilung für die Stichprobe in Bezug auf die Gesamtpopulation.

Während in der klassischen Statistik angenommen wird, dass diese Parameter feste, aber unbekannte Werte für alle Stichproben haben, werden sie in der Bayesian Statistik als Zufallsvariabeln, zufällig variierend zwischen den Einheiten der Messdaten oder der Gesamtpopulation angesehen (interindividuelle Variation).
Dieser fundamentale Unterschied führt zu zwei unterschiedlichen Näherungen in der Schätzung von Parametern.
In der klassischen Statistik wird ein Schätzwert verlangt, der optimalerweise dem Wert des unbekannten Parameters entspricht. Der Wert, der die Wahrscheinlichkeitsfunktion maximiert, ist solch ein optimaler Schätzwert. Die Wahrscheinlichkeitsfunktion ist die Wahrscheinlichkeits- oder Verteilungsdichte (für mehrere zufällige Variabeln) der beobachteten Stichprobe, dargestellt als Funktion der geschätzten Parameter.

In der Bayes Statistik ist die Schätzung eines einzelnen Punktes wertlos, da die Parameter als zufällige Variabeln und nicht als feste Werte angenommen werden. Deshalb muss in Kenntnis der Werte der gezogenen Stichprobe, die Wahrscheinlichkeitsverteilung oder die -dichte der Parameter geschätzt werden. Oder, um genauer zu sein, muss die vorher gefundene Wahrscheinlichkeitsverteilung oder -dichte ("a priori" Verteilung) mit den gefundenen Werten angepasst werden. Die Annahme von a priori-Werten ist für Bayesian Methoden essentiell und gibt Statistikern seit über hundert Jahren Anlass zu vielen Kontroversen.
Diese a priori-Wahrscheinlichkeit ist die erste Annahme vor dem Beginn des Experimentes.
Wenn von den Parametern nichts bekannt ist, kann eine sogenannte "uninformative", erste Wahrscheinlichkeitsverteilung benutzt werden, das heisst eine Normalverteilung im Bereich der möglichen Parameter-Variation. Wenn die Resultate vorangegangener Experimente verfügbar sind, kann die erste Wahrscheinlichkeitsverteilung angepasst werden. Diese Näherung nennt sich "Empirische Bayes Näherung" :
Wenn die Resultate der Experimente in die Berechnung einbezogen werden, wird die erste Annahme der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Parameter revidiert, indem eine neue Verteilung berechnet wird. Diese Verteilung wird dann "a posteriori" Verteilung genannt.
(...)

(...) bezeichnet in der Übersetzung ausgelassene Stellen

Die Anwendung für die Schätzung pharmakokinetischer Parameter sieht wie folgt aus :

In einer pharmakokinetischen Berechnung mit einem Patienten werden zu den Zeiten $t_1,...,t_m$ Serumkonzentrationen von $C_1,...,C_m$ gemessen. Diese Serumkonzentration C_i kann zusätzlich in eine Funktion $C^\bullet(t_i;p_1,...,p_m)$ (abhängig von n individuellen kinetischen Parametern $p_1,...p_n$) und in eine Funktion e_i gefasst werden (e_i = residual plasma concentration error).

Dies ergibt die Funktion

$C_i = C^\bullet(t_i;p_1,...,p_n) + e_i$ ***Formel 1***

Formel 1

Die kinetischen Parameter eines Individuums schwanken immer um einen Mittelwert; dies ist die intraindividuelle Variabilität. In der Variation der einzelnen Parameter fliesst ebenfalls die Schwankung der Plasmaspiegel um den Mittelwert ein, die nicht im kinetischen Modell verankert ist. Welchen Wert die Plasmakonzentration auch immer annimmt, sie wird immer mit einem zusätzlichen "zufälligen" Fehler behaftet sein.
Dieser Fehler wird "residual plasma concentration error" (e_i) genannt [11].

Der residual plasma concentration error wird in einigen Programmen berechnet : [17,10] :

$e_i = 1 + 0.1Cp_j$ ***Formel 2***

Formel 2

Cp_j : ist die i 'te vorausgesagte Konzentration.
Das heisst, dass je höher die Konzentrationen sind, desto grösseres Gewicht erhalten erhält dieser Fehler in der Berechnung.

(...)

Es wird angenommen, dass die e_i-Werte unabhängige, normalverteilte, zufällige Variabeln mit dem Mittelwert 0 und der Varianz σ^2_e sind. Mit dieser Annahme sind die resultierenden Serumspiegel aus der Funktion der Parameter p_1 ...p_n ebenfalls unabhängige, normalverteilte, zufällige Variabeln mit dem Mittelwert $C^\bullet(t_i;p_1,...,P_n)$ und der Varianz σ^2_e.

Die Wahrscheinlichkeit wird demnach nach der Formel für die Normalverteilung berechnet.

(...)

Nach verschiedenen Näherungsschritten lautet die Bayes Gleichung für die a posteriori Verteilung wie folgt :

$$\sum_{j=1}^{n} \frac{(p_j - p_j^\bullet)^2}{\sigma^2_{pj}} + \sum_{j=1}^{m} \frac{(c_j - c_j^\bullet(t_j; p_1, \ldots p_n))^2}{\sigma^2_e} \quad \textbf{Formel 3}$$

Formel 3

(...)

Der Vektor des Wertes p, der den Logarithmus der a posteriori Verteilung (Resultat der Formel 3) *minimiert, ist nicht linear, deshalb muss dieser Prozess in Iterationsschritten ablaufen*[18,19] *(nicht-lineare Regression)*

Für die Gleichung des Bayes Theorem gilt :

Wenn m = 0 (Formel 3) heisst das, dass keine Spiegelmessungen verfügbar sind und der zweite Term nicht existiert. Die a priori Verteilung bestimmt dann alleine die Funktion und der Ausdruck wird minimalisiert, wenn p_j den Populationsdurchschnitten entsprechen.

Wenn m, das heisst, die Anzahl der zur Verfügung stehenden Serumspiegel sehr gross ist, wird die Funktion von der rechten Seite des Ausdrucks dominiert. Die a priori Verteilung wird ignoriert und die beobachteten Serumspiegel alleine bestimmen die Gleichung.

Wenn m mittelgross ist (zwischen 1 und 10), wird die Funktion durch beide Terme in etwa gleich gewichtet. Es kann eine echte Anpassung der a priori Verteilung erfolgen[11].

3.2. Pharmazeutische und pharmakologische Charakteristika von Phenytoin

***Prinzip : Das detaillierte Verstehen der Pharmakokinetik eines Arzneistoffes bildet, insbesondere wenn sie atypisch ist, die Grundlage für die rationale Dosierung*[20].**

3.2.1. Phenytoin : pharmazeutische Charakterisierung

3.2.1.1. Entdeckung und Stellenwert heute

Phenytoin wurde im Jahr 1908 von Biltz[21] durch eine Kondensation von Benzil mit Harnstoff in wässerig-alkoholischer Lauge synthetisiert (Abbildung 1). Es dauerte jedoch bis 1938, als in Anlehnung an Phenobarbital eine Reihe von Substanzen auf ihre antikonvulsive Wirksamkeit getestet wurden. Nachdem die antikonvulsive Wirkung an Katzen gezeigt worden war[22], testeten schliesslich Merritt und Putnam[23] als erste Phenytoin an 200 Patienten .

Heute, nach über 50 Jahren, ist Phenytoin noch immer eines der wichtigsten Basis-Antikonvulsiva und aus der Therapie der Epilepsie, sei es zur Prophylaxe, zur Behandlung des Status Epilepticus oder zur Langzeitbehandlung, nicht mehr wegzudenken.

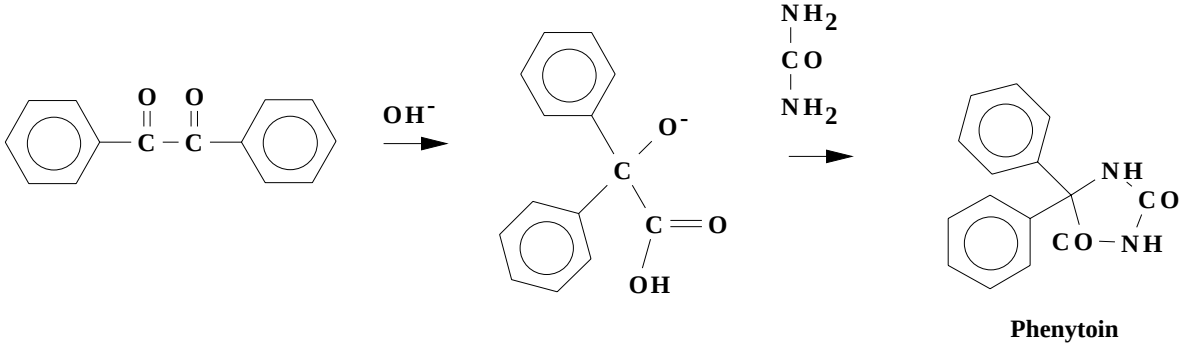
Im Pharmakologiebuch von Rang und Dale[24] (1992) ist zu lesen :

Trotz vieler Nebenwirkungen und einer nicht vorhersagbaren Pharmakokinetik ist Phenytoin wahrscheinlich das nützlichste Arzneimittel zur Behandlung der meisten Formen der Epilepsie.

3.2.1.2. Chemie und physikalische Eigenschaften

Abbildung 1

Synthese von Phenytoin (5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidindion)[25]



Kondensation von Benzil mit Harnstoff

Stoffeigenschaften :

Molekulargewicht :	Phenytoin-Säure ($C_{15}H_{11}N_2O_2^-$)	252.3
	Phenytoin-Natrium	274.3

Phenytoin ist eine schwache Säure : pKa ca. 8.06 [26]

Lipophilie (Octanol/Wasser Verteilungskoeffizient) : hoch[27] (Log P = 2[28])

Phenytoinsäure ist ein weisses, kristallines, geruch- und geschmackloses Pulver.
Das Natriumsalz ist ebenfalls weiss, kristallin, leicht hygroskopisch und hat einen bitteren, seifigen Geschmack. Bei Luftexposition absorbiert es CO_2 und setzt die Säure frei.

Tabelle 2

Löslichkeit von Phenytoin[29]
(Gewichtsteile Phenytoin + Gewichtsteile Lösungsmittel)

	Wasser	Ethanol	Aceton	Ether	Dichlormethan
Phenytoin-Säure	Unlöslich	1 + 70	1 + 25	1 + 450	1 + 850
Phenytoin-Natrium	1 + 66	1 + 10.5			

Phenytoin ist gut löslich in stark alkalischer, wässeriger Lösung (pH 10 bis 12)[30]

Die Löslichkeit von Phenytoin im Vollblut (bei 37°C) beträgt ungefähr 75 mg/L [31]

3.2.1.3. Galenische Formen und ihre Eigenschaften

Wirkstoffdeklaration

Bei der Deklaration des Wirkstoffegehaltes wird bei verschiedenen galenischen Formen zum Teil ein unterschiedlicher Bezug gemacht : z.B. wird bei Epanutin® Kapseln und Ampullen der Bezug auf Phenytoin-Natrium, bei der Suspension auf Phenytoinsäure gemacht. Andere Präparate wie zum Beispiel Phenhydan® sind mit Phenytoin und Phenytoin-Natrium deklariert. Der Unterschied zwischen den beiden Deklarationsangaben beträgt in Gewichtseinheiten immerhin fast 10% (siehe Molekulargewicht). Diese Differenz ist meist nicht im Bewusstsein der behandelnden Ärzte verankert.

Orale Formen

Die orale Bioverfügbarkeit von Phenytoin kann in Abhängigkeit des Präparates unterschiedlich sein. So zeigten verschiedene Studien, dass bei einem Präparatewechsel grosse Unterschiede in den resultierenden Serumspiegeln entstanden[32,33] und im Einzelfall eine wesentliche Veränderung der Wirkung verursachten. Aus diesem Grund muss der Spiegelverlauf bei einem Präparatewechsel überwacht werden.

Die Ursache für dieses Verhalten ist zum Teil auf unterschiedliche Löslichkeit zurückzuführen. Offenbar spielt die vorliegende Kristallgrösse von Phenytoin für das Ausmass und die Geschwindigkeit der Freisetzung im Gastrointestinaltrakt eine entscheidende Rolle [34].

Ebenfalls von Wichtigkeit ist die Formulierung selbst und die dabei verwendeten Hilfsstoffe, wie bei Kapseln mit unterschiedlichen Füllstoffen gezeigt wurde. Bei der Umstellung von

Calciumsulfat auf Lactose wiesen einige Patienten toxische Symptome auf, die beim Zurückwechseln auf Calciumsulfat wieder verschwanden[35].
(siehe auch 3.2.3.1.4. Interaktionen; Seite 38)

Phenytoin wird bei der Gabe über eine Magen-Sonde sehr unregelmässig resorbiert[36], was bei der Interpretation der resultierenden Serumspiegel berücksichtigt werden muss.

Parenterale Formen

Da Phenytoin in Wasser nur bei stark alkalischem pH in Lösung bleibt (pH 10 bis 12)[30], hat die Injektionslösung eine schlechte Venenverträglichkeit und führt deshalb bei Bolusapplikation häufig zu Thrombophlebitiden[37].
Epanutin®-Injektionslösung 50 mg/mL enthält ein Lösungsmittelgemisch aus Ethanol, Propylenglycol und Wasser[38], besitzt also auch eine hohe Osmolalität. Da Phenytoin auch aus Gründen der unerwünschten Arzneimittelwirkungen (siehe Seite 45) langsam appliziert werden muss, steht die Anwendung als Infusion im Vordergund.
In einer nicht publizierten mikroskopischen Untersuchung[39] wurde festgestellt, dass Epanutin® in Infusionslösungen von NaCl 0.9% bis zu einer maximalen Konzentration von 7.5 mg/mL löslich blieb. Als Trägerlösung scheint NaCl 0.9% oder Ringerlactat geeignet zu sein. Mit Glucose als Trägerlösung entstehen bereits bei geringer Konzentration Ausfällungen[40].

3.2.2. Phenytoin : registrierte (therapeutische) Indikationen

Gemäss dem Arzneimittelkompendium der Schweiz von 1993[41], wird Phenytoin (Epanutin®) für folgende Indikationen eingesetzt :

orale Form

- *Grand-mal Epilepsie (besonders Schlaf-Epilepsie und sogenannte diffuse Epilepsie).*
- *psychomotorische Anfälle : Kombinationen von Grand mal mit anderen epileptischen Anfallsformen.*
- *Chorea Sydenham* (extrapyramidale Hyperkinesien, die nach einer Streptokokkeninfektion zwischen dem 6. und dem 13. Lebensjahr, vor allem bei rheumatischem Fieber auftreten können[42]).
- *Morbus Parkinson*
- *Migräne*
- *Trigeminusneuralgie*
- *Reduktion der Reizbarkeit bei Psychosen.*
- *Schwere Verhaltensstörungen bei Kindern.*
- *Arrhytmien, insbesondere bei Rhytmusstörungen infolge toxischer Herzglycosidwirkung, zur Erhaltungstherapie im Anschluss an i.v. Gaben von Epanutin parenteral bei akut auftretenden Arrhytmien.*

parenterale Form

- *Status epilepticus*
- *persistierende Krampfzustände anderer Genese.*
- *Prophylaxe von Krampfanfällen in der Neurochirurgie.*
- *akute, kardiale Arrhytmien infolge toxischer Herzglycosidwirkung, nach Myokardinfarkt*
- *bei Allgemein-Anästhesien in der Herzchriurgie, bei Herzkatheterisierung und elektrischer Defibrillation.*

3.2.3. Pharmakologie von Phenytoin

3.2.3.1. Pharmakokinetik

siehe dazu auch zusammenfassend Tabelle 5 (Pharmakokinetische Kenngrössen)

3.2.3.1.1. Absorption

Die Absorption, die einer Permeation durch eine biologische (Lipid-) Membran entspricht, ist abhängig von Faktoren wie dem pKa der Substanz und dem pH des Mediums, der Wasserlöslichkeit und Lipophilie des Stoffes, sowie dem Konzentrationsgradienten als treibende Kraft der Diffusion.

Im Magensaft ist Phenytoin als schwache Säure (pKa ca. 8) nur schlecht löslich und wird daher nur wenig resorbiert[43]. Im Duodenum (alkalischer pH) verbessert sich die Löslichkeit und somit auch die Absorption[44]. Nach einer oralen Dosis wird Phenytoin langsam, jedoch fast vollständig im oberen Teil des Dünndarms absorbiert. Der absorbierte Teil einer Dosis nimmt mit deren Erhöhung ab [27]. Die absolute orale Bioverfügbarkeit schwankt beträchtlich zwischen verschiedenen Präparaten, ist also auch durch technologische Bedingungen beeinflusst[30] (siehe 3.2.1.3. Galenische Formen und ihre Eigenschaften). In den unteren Darmabschnitten ist die Absorption eingeschränkt. Eine rektale Absorption findet nicht statt[44].
Durch die Interaktion mit bestimmten Arzneimitteln oder galenischen Hilfsstoffen kann die Absorbtion beeinflusst werden (siehe 3.2.3.1.4. Interaktionen)

3.2.3.1.2. Distribution (Verteilung)

Nach einer oralen Dosis wird die höchste Plasmakonzentration meist nach 2-4 Stunden erreicht, mit einer grossen individuellen Schwankung bis zu 12 Stunden[44].

Im Blut bindet Phenytoin rasch an Plasmaproteine (v.a. Albumin). Der durchschnittliche Anteil an proteingebundenem Phenytoin im Blut beträgt 90% [44]. Dieser Anteil ist bei Neugeborenen deutlich tiefer. Er verändert sich altersabhängig, ist aber unabhängig vom Geschlecht.
Die Plasmabindung von Phenytoin ist direkt abhängig vom Albuminspiegel; es wird durch Bilirubin aus der Plasmabindung verdrängt[45]. Die Phenytoinkonzentration im Liquor sowie die Konzentration im Speichel entspricht der freien Fraktion im Plasma[46]. Die Konzentration im Speichel wird deshalb auch zur Bestimmung der freien Fraktion im Serum benutzt[47].

Nach der Absorption wird Phenytoin rasch in alle Gewebe verteilt; beim Blut-pH von 7.4 liegt Phenytoin zu ca. 80 % in der nicht-ionisierten Form vor. Die freie Konzentration in Hirn und Plasma entsprechen sich innert Minuten [46].

Das scheinbare Verteilungsvolumen beträgt 0.5 bis 0.7 L/kg, was die Bedeutung der Plasmabindung für die Verteilung unterstreicht[27].

Ungebundenes, nicht-ionisiertes Phenytoin gelangt in die Muttermilch (25 - 50% der Plasmakonzentration), passiert die Plazentaschranke und wird in vielen extrazellulären Flüssigkeiten gefunden : Speichel, Galle, Darmflüssigkeit, Liquor, Sperma [27].
Das durch die Galle ausgeschiedene Phenytoin unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf.

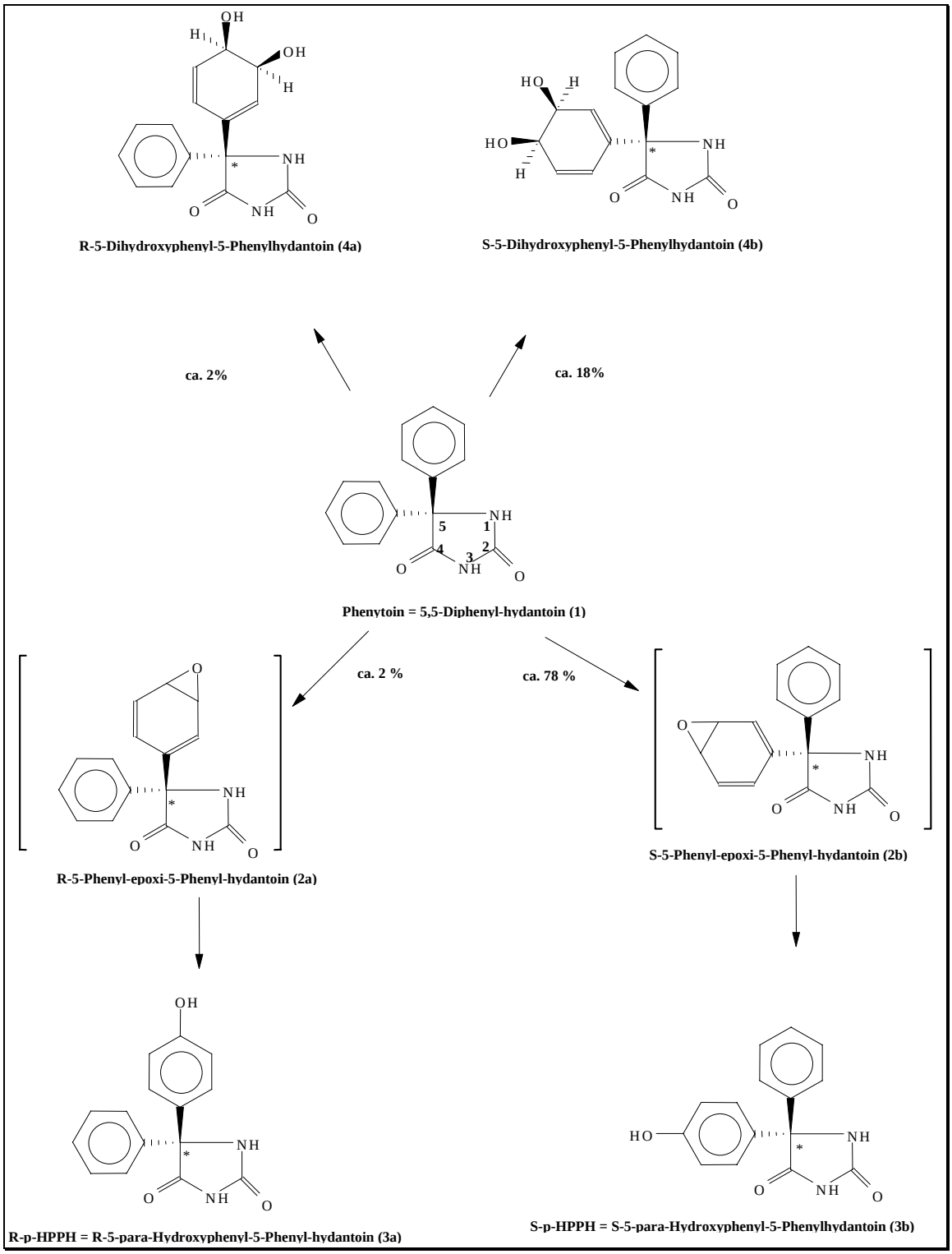
3.2.3.1.3. Metabolismus

Struktur der Phenytoinmetaboliten

Metaboliten der Phase I (Oxidation über Cytochrom P_{450})

Abbildung 2

Phenytoin-Metabolismus (Phase I Reaktionen)



Der Metabolismus von Phenytoin birgt wegen seiner Dosisabhängigkeit und seinen interindividuellen Unterschieden die Hauptproblematik in der therapeutischen Anwendung.
Die Metabolisierung ist Voraussetzung für die Ausscheidbarkeit und die pharmakologische Inaktivierung dieser lipophilen Verbindung und wird durch den Abbau über das Cytochrom P_{450}-Enzymsystem der Leber bestimmt. Keiner der Metaboliten hat eine antikonvulsive Aktivität.

Phenytoin selbst ist ein "prochirales", also optisch noch inaktives Molekül. Es wird in der Phase I des Metabolismus durch Cytochrom P_{450} , über ein Epoxid als Intermediat[48] (Metabolit 2a und b), in para-Stellung hydroxyliert (Metabolit 3a und b, Abbildung 2). Zu über 90% geschieht dies am pro-S-Phenyl-Substituten. Die Reaktionen der Phase I bestimmen die Abbaugeschwindigkeit von Phenytoin.

Die Strukturaufklärung von p-HPPH (3a, 3b) und seine Identifizierung als Hauptmetabolit von Phenytoin, gelang Butler 1957[49]. Er fand heraus, dass etwa 60 bis 70% einer therapeutischen Dosis als p-HPPH im Urin als Glucuronid oder unglucuronidiert erscheinen.

Weitere Metaboliten :

m-HPPH wurde nach Säurehydrolyse des Glucuronids im Urin gefunden. Wurde anstelle der Säurehydrolyse β-Glucuronidase eingesetzt, konnten nur noch sehr geringe Mengen von m-HPPH festgestellt werden[50] Ein Artefakt durch die Säurehydrolyse muss also vermutet werden.

R- und S- Dihydrodiol (4a, 4b) stellen quantitativ die zweitwichtigsten Metaboliten dar. Der Anteil am Gesamtgehalt der Phenytoinmetaboliten im Urin wird mit 20% angenommen [50].

4,4'-HPPH, kommt zu ca. 1% im Urin vor[51]

5-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-5-phenylhydantoin und 5-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-phenyl-hydantoin sind als sogenannte Catecholmetabolite bekannt, wobei angenommen wird, dass diese durch einen weiteren Abbau von p-HPPH (durch Catechol-O-Methyltransferase) zustande kommen. Billings[52] konnte dies in vitro und in vivo bei Ratten zeigen.

Metaboliten der Phase II (Glucuronide)

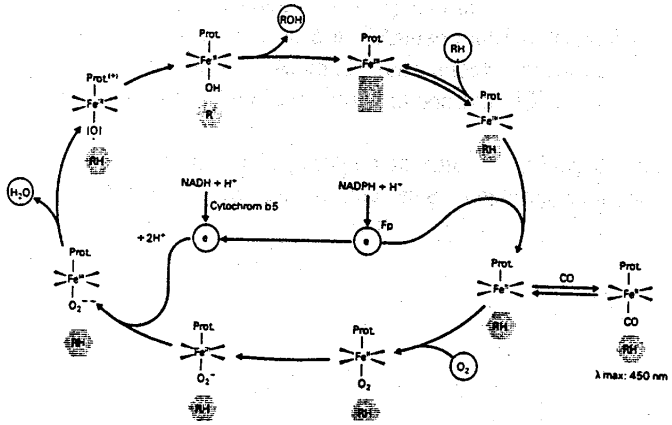
N-3-Glucuronyl-5,5-diphenylhydantoin wird durch die direkte Glucuronidierung von Phenytoin gebildet[53].
Die durch den oxidativen Abbau über Cytochrom P_{450} entstandenen Metabolite werden im Urin zum überwiegenden Teil als Glucuronide vorgefunden. Gemäss der Studie von Fritz, Küpfer et al.[54] werden die beiden Isomere von R- und S-p-HPPH in gleichem Masse glucuronidiert, so dass die geringere Ausscheidung des R-Enantiomers nicht auf diesen Konjugationsmechanismus zurückgeführt werden kann.

Das Cytochrom P_{450} Enzymsystem der Leber

Die Cytochrom P_{450}-Emzyme sind an der Phase I Reaktion des Phenytoin-Metabolismus als Monooxidasen beteiligt : Phenytoin und andere lipophile Stoffe gelangen in die Leberzelle und werden durch die membrangebundenen Monooxigenasen des glatten endoplasmatischen Retikulums metabolisiert. Sie verlassen die Zelle in hydroxylierter, das heisst hydrophiler Form und werden dadurch besser exkretierbar (bei manchen Arzneistoffe sind weitere Schritte notwendig, um die Exkretierbarkeit zu verbessern : Phase II Reaktionen).
Bei der Oxidation werden molekularer Sauerstoff und Reduktionsäquivalente über Flavoproteine und NADPH bereitgestellt.

Abbildung 3

<u>Oxidation über die Monooxigenase</u>[55]



Das eine der beiden Sauerstoffatome erscheint im oxidierten Reaktionsprodukt (ROH), das zweite im zusätzlich entstehenden Wassermolekül. Es sind also mehrere Enzyme an der Oxidation, z.B. von Phenytoin, beteiligt : Cytochrom P_{450} zur Übertragung des Sauerstoffs und die NADPH-Cytochrom P_{450}-Reduktase, welche die Reduktionsäquivalente auf das Cytochrom überträgt :
Cytochrom P_{450} bindet in seiner oxidierten Form (als dreiwertiges Eisen) das Substrat (RH) im hydrophoben Bereich des Enzyms. Darauf wird das dreiwertige Eisen des Cytochrom P_{450} zu zweiwertigem Eisen reduziert. In dieser Form bindet es Sauerstoff (oder mit vergleichbarer Affinität auch Kohlenmonoxid). Dabei entsteht ein Komplex mit einem UV-Maximum von 450 nm (daher stammt der Name P_{450}). Nach der Aufnahme des Sauerstoffs wird ein weiteres Reduktionsäquivalent übertragen, so dass O_2- und wiederum ein reaktionsfähiges Cytochrom P_{450} entstehen kann.
Nebst den Monooxidasen existieren in der Leber weitere Enzymgruppen : z.B. die Epoxidhydrolasen und die an der Phase II-Reaktion des Phenytoin-Metabolismus beteiligte Glucuronyltransferase[55].
Funktion und Nomenklatur von Cytochrom P_{450}-Enzymen

Die in Säugetieren vorkommenden Cytochrom P_{450}-Enzyme können aufgrund ihrer Funktion in zwei Klassen eingeteilt werden: jene, die in die Steroidsynthese und die Synthese von Gallensäuren eingebunden sind und jene, die in erster Linie Xenobiotika (körperfremde Stoffe) metabolisieren. Letztere zeigen zum Teil eine ausserordentliche, genetisch determinierte Variabilität (siehe pharmakokinetische Polymorphismen), die auf die Bedeutung dieses Enzyms in der Evolution hinweisen.

Wegen seiner besonderen Funktion kann ein Defekt eines solchen Enzyms (z.B. durch eine Mutation der entsprechenden DNA-Sequenz) eine im Einzelfall schwerwiegende Auswirkung auch auf die Überlebensfähigkeit eines Organismus haben.

Die einzelnen Isoenzyme zeigen eine unterschiedliche Induzierbarkeit, so dass schlussendlich nicht nur speziesabhängige, sondern auch individuelle und organspezifische Enzymmuster auftreten (siehe Tabelle 3). Die nach aussen feststellbare Unspezifität dieses Enzymsystems ist deshalb vorwiegend das Ergebnis der Anwesenheit vieler Enzyme unterschiedlicher Spezifität.

Die Bedeutung, die die Cytochrom P_{450}-Enzyme unter anderen Funktionen im oxidativen Abbau von Arzneistoffen einnehmen, ist seit langem bekannt. Erst mit Hilfe molekularbiologischer Methoden und Klonierungstechniken konnten beim Menschen mindestens 19 Isoenzyme von Cytochrom P_{450} identifiziert werden, jedes mit einer eigenen, zum Teil mit anderen Cytochromen überlappenden Substratspezifität[56].
Diese Superfamilie der Cytochrom P_{450}-Enzyme wird in Familien und Unterfamilien unterteilt, die aufgrund ihrer Übereinstimmung in der Aminosäurensequenz unterschieden werden. Innerhalb einer Unterfamilie beträgt diese Übereinstimmung mindestens 55%.

Die Nomenklatur besteht aus dem Präfix 'CYP', gefolgt von einer Nummer, die die Familie bezeichnet, einem Buchstaben für die Unterfamilie und einer weiteren Nummer für die individuelle Form des P_{450}-Isoenzyms[57].

Tabelle 3

Einige Cytochrom P_{450}-Enzyme und ausgewählte Modellsubstrate[57]

P450	Lokalisation	Induzierbarkeit	Modellsubstrat
CYP1A2	Leber	möglich	Aflatoxin b1 Coffein Phenacetin
CYP2A6	Leber	möglich	Coumarin Diethylnitrosamin
CYP2B6	Leber	möglich	Ciclophosphamid
CYP2C8	Leber Darm		Tolbutamid R-Mephenytoin
CYP2C9	Leber Darm		R-Mephenytoin Tolbutamid S-Warfarin
CYP2D6	Leber Darm Nieren		Bufurarol Debrisoquin Spartein
CYP2E1	Leber Darm Leukozyten	Ja	Kohlentetrachlorid Ethanol Dimethylnitrosamine
CYP3A3	Leber	Ja	Aflatoxin b1 Ciclosporin Nifedipin Testosteron
CYP3A5	Leber Placenta		Ciclosporin Nifedipin Testosteron

Im Phenytoin-Metabolismus involvierte Cytochrom P_{450}-Enzyme

Nach den bisherigen Erkenntnissen ist vor allem die Familie CYP2C für den Phenytoin-Metabolismus verantwortlich. Welche Isoenzyme genau daran beteiligt sind, ist bis heute nicht bekannt[58], jedoch spielen beim Menschen die Unterfamilien CYP2C9[59] und CYP2C3[60] eine Rolle, weitere Unterfamilien werden vermutet. In der Ratte sind bisher die Cytochrome CYP2B1[61], CYP2B9 und CYP2B10[62] mit Phenytoin in Zusammenhang gestellt worden. Ob diese gefundenen Unterfamilien auch beim Menschen eine Bedeutung für den Phenytoinmetabolismus haben, oder ob es sich dabei um Speziesunterschiede handelt, konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden.

Das besondere Merkmal des Phenytoin-Metabolismus liegt darin, dass im Gegensatz zu anderen Arzneistoffen (z.B. Debrisoquin) mehrere Enzyme am Metabolismus beteiligt sind, was ein äusserst komplexes metabolisches Verhalten zur Folge hat .

Die Kinetik des Phenytoin-Metabolismus

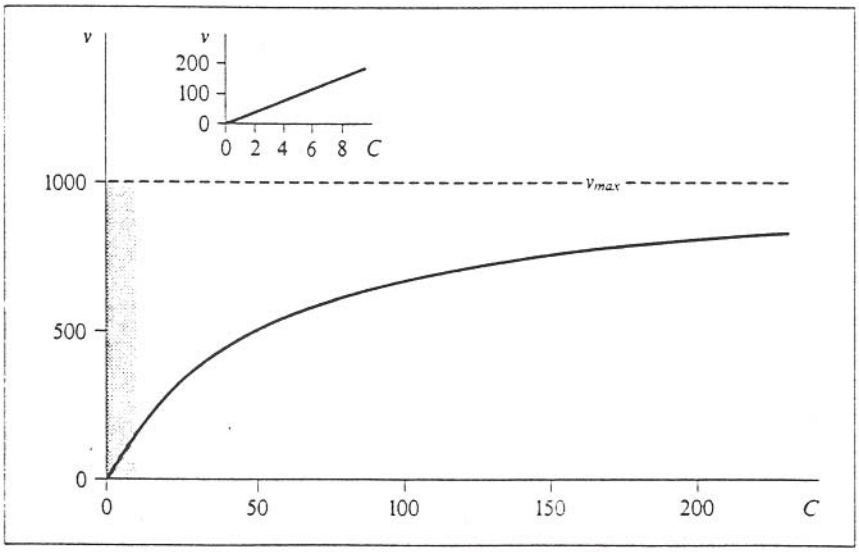
Bei der Elimination von Phenytoin, einer schwach sauren, lipophilen Substanz, ist die para-Hydroxylierung über Cytochrom P_{450} in der Leber (siehe Abbildung 3) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Dieser Metabolismusschritt ist unabhängig vom Leberdurchfluss, das heisst, die Leberclearance ist einzig von der metabolischen Kapazität des Organs abhängig. Die renale Phenytoin-Clearance spielt für die Elimination eine untergeordnete Rolle, da nur höchstens 5% unverändert über den Urin ausgeschieden wird[27] (Die extrarenale Dosisfraktion bei niereninsuffizienten Patienten beträgt 1.0, respektive der Anteil der renalen Clearance ist vernachlässigbar[20])

Der Phenytoin-Metabolismus ist bereits im therapeutischen Bereich nicht linear und sättigbar, was in der Pharmakotherapie zwar ungewöhnlich ist, aber eine typische Kinetik enzymatischer Reaktionen darstellt[63]. Für die meisten Arzneistoffe wird bei therapeutischen Konzentrationen die Kapazitätsgrenze der abbauenden Enzyme (v_{max}) bei weitem nicht erreicht und die Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsetzungsgeschwindigkeit (K_m) liegt weit über den therapeutischen Konzentrationen, so dass eine nahezu lineare Beziehung zwischen der Substratkonzentration und der Umsetzungsgeschwindigkeit besteht.
Bei Phenytoin liegen die Werte für v_{max} im Bereich üblicher Dosen pro Tag und K_m liegt bei nahezu therapeutischen Serumkonzentrationen.

Abbildung 4

Relation zwischen Umsetzungsgeschwindigkeit v und Substratkonzentration C einer enzymatisch katalysierten Reaktion nach Michaelis Menten[64]

v_{max}- und K_m-Werte sind arbiträre Einheiten (1000 respektive 50).
Der Ausschnitt mit gedehnter Abszisse (links oben) stellt die angenähert lineare Beziehung von v zu C dar ($C << K_m$)



Mathematisch lässt sich die Abbaurate von Phenytoin nach einer einfachen Michaelis-Menten Kinetik[65] beschreiben :

Falls die Phenytoinzufuhr (Dosis pro Zeitintervall) kleiner als v_{max} ist :

$$v = \frac{v_{max} * C_{ss}}{K_m + C_{ss}} \quad \textbf{\textit{Formel 4}}$$

Formel 4

Falls die Phenytoinzufuhr (Dosis pro Zeitintervall) gleich oder grösser als v_{max} ist :

$$v = v_{max} \quad \textbf{\textit{Formel 5}}$$

Formel 5

v	Abbaurate [mg/Tag]
v_{max}	maximale Abbaugeschwindigkeit [mg/Tag]
K_m	Michaelis Konstante (Konz. bei halbmaximaler Abbaugeschwindigkeit [mg/L])
C_{ss}	Konzentration im Steady-State [mg/L]

Bei Phenytoin kommt erschwerend hinzu, dass die Werte für K_m und v_{max} interindividuell sehr verschieden sind (siehe Abbildung 5). Wenn in der täglichen Dosierung v_{max} überschritten wird, dann erfolgt der Metabolismus nach einer Kinetik nullter Ordnung, das heisst, es wird unabhängig vom Phenytoin-Körperbestand nur die maximal mögliche Menge pro Zeiteinheit (v_{max}) abgebaut (Formel 5). Die Serumkonzentration steigt kontinuierlich an.
Da der Wert von v_{max} bei vielen Patienten im Bereich von üblichen Tagesdosierungen liegt, können kleine Unterschiede in der Dosierung zu stark unterschiedlichen Serumspiegeln und damit auch leicht zu Intoxikationen führen.

Die Eliminationshalbwertszeit (siehe Tabelle 5)

Die Eliminationshalbwertszeit von Phenytoin ist konzentrationsabhängig[65] und kann berechnet werden als :

$$t_{1/2} = \frac{(0.5 * C_i) + K_m}{v_{max} / Vd} * \ln 2 \quad \textbf{\textit{Formel 6}}\ ^{88}$$

Formel 6 [88]

C_i	Plasma-Talspiegel
v_{max}	maximale Abbaugeschwindigkeit [mg/Tag]
K_m	Michaelis Konstante (Konz. bei halbmaximaler Abbaugeschwindigkeit [mg/L])

v_{max} und K_m (siehe Tabelle 5)

Die Werte wurden in einer grossen populationskinetischen Studie mit einem Computerprogramm (NONMEM) untersucht[66]. Ebenfalls wurde in dieser Studie der Einfluss des Alters, des Geschlechts, der Grösse, des Gewichts und der Herkunft der Patienten untersucht.
v_{max} wird in der Gesamtpopulation nicht von Geschlecht, Alter oder Herkunft beeinflusst. Hingegen wurde festgestellt, dass v_{max} der Körperoberfläche am besten mit dem Faktor (Körpergewicht)$^{0.6}$ angepasst wird, da die Körperoberfläche den Wert von v_{max} in nicht linearer Weise beeinflusst. Die genaue Erhebung der für die Berechnung der Körperoberfläche benötigten Körpergrösse wird durch die Einführung dieses Faktors überflüssig.

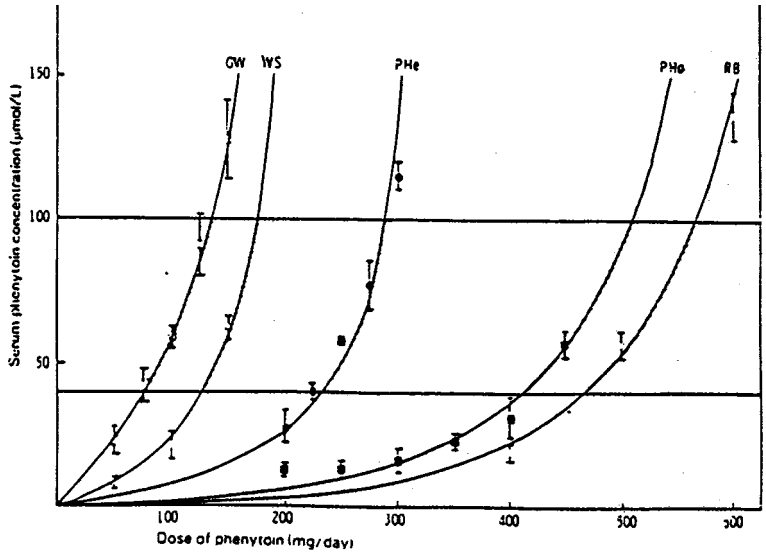
K_m wird durch das Alter und die ethnische Herkunft der Patienten beeinflusst: K_m ist signifikant tiefer bei Patienten unter 15 Jahren (57% tiefer als bei Erwachsenen) und bei Patienten japanischer Herkunft (67% tiefer als bei Nordeuropäern). Diese beiden Einflüsse sind voneinander unabhängig.
Die meistens angenommenen Populationsdaten für K_m und v_{max} stammen von Nordeuropäern (Alter > 15 Jahre).

Die Abhängigkeit der Phenytoin-Gesamtkinetik von diesen Metabolismuseigenheiten und den daraus resultierenden, interindividuell sehr grossen Unterschieden wurde durch Richens auch an Patienten gezeigt[67] : An 5 Epileptikern untersuchten sie die Beziehung zwischen einer bestimmten Tagesdosis und der daraus resultierenden Phenytoin-Serumkonzentration im Steady-State.

Abbildung 5

Beziehung zwischen Phenytoin Serumkonzentration und Tagesdosis bei 5 Eplileptikern[67]

Jeder Punkt zeigt den Mittelwert (± die Standardabweichung) von 3 bis 8 Messungen von Serumphenytoin im Steady-State. Die Kurven wurden mit der Michaelis-Menten Gleichung erhalten.



Die Zeit, die benötigt wird, um einen Steady-State zu erreichen, ändert sich mit der Höhe der Dosis [68], in Abhängigkeit der individuellen pharmakokinetischen Parameter der Patienten[69].

Dies wird auch aus der von Vozeh et al.[70] aufgezeigten Differenzialgleichung zur Berechnung der Zeit bis zum Erreichen eines Steady-State klar :

$$\frac{dC_{(t)}}{dt} = \frac{D}{Vd} - \frac{v_{max} * C_{(t)}}{(K_m + C_{(t)}) * Vd} \quad \textbf{\textit{Formel 7}}$$

Formel 7

oder besser noch aus der Lösung dieser Differenzialgleichung :

$$t = \ln\left[\frac{(D - v_{max})D + D * K_m}{D * K_m} * \left(\frac{D * K_m}{D - v_{max}} - \frac{D * K_m * Vd}{(D - v_{max})^2}\right) + \frac{Vd * C}{D - v_{max}} \right] \quad \textbf{\textit{Formel 8}}$$

Formel 8

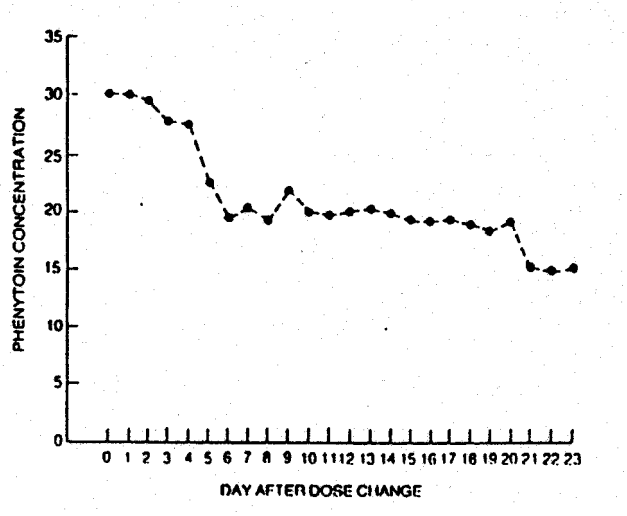
C_t	Konzentration zur Zeit t [mg/L]
D	Dosis [mg]
Vd	Verteilungsvolumen [L]
v	Abbaurate [mg/Tag]
v_{max}	maximale Abbaugeschwindigkeit [mg/Tag]
K_m	Michaelis Konstante (Konz. bei halbmaximaler Abbaugeschwindigkeit [mg/L])
t	Zeit zum erreichen des Steady-State

Theodore et al.[71] haben bei Phenytoin ein sogenanntes „Pseudo-Steady-State“ Phänomen gezeigt. Sie haben bei zehn mit Phenytoin eingestellten Patienten im Steady-State die Dosis geändert und anschliessend täglich die Phenytoin-Konzentration gemessen.
Ein Pseudo-Steady-State wurde nach durchschnittlich 5 Tagen erreicht und dauerte bis zum Tag 11. Der effektive Steady-State wurde durchschnittlich aber erst 23 Tage nach der Dosisanpassung erreicht.

Abbildung 6

Verlauf des Serumspiegels nach einer Dosisänderung [71]

Repräsentatives Beispiel aus einer Gruppe von 10 Patienten



Taylor et al.[72] zeigten die interindividuellen kinetischen Unterschiede in einer grösseren Gruppe von Patienten. Unter einer Standarddosierung von 300 respektive 400 mg Phenytoin pro Tag wurden Steady-State Konzentrationen gemessen :

Tabelle 4

Verteilung der Serumphenytoinspiegel bei Standarddosen [72]

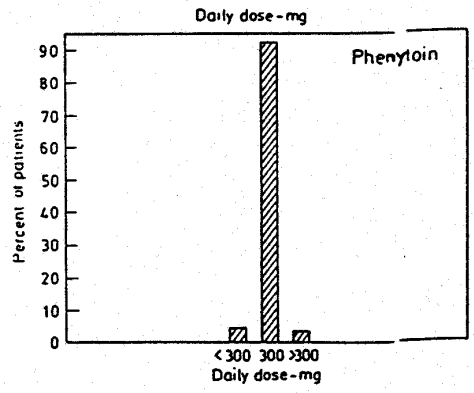
Tägliche Dosis Phenytoin-Natrium	**< 10 mg/L**	**10 bis 20 mg/L**	**> 20 mg/L**
300 mg (n= 45)	75.6%	20%	4.4%
400 mg (n=37)	40.5%	37.8%	21.6%

Daraus wird ersichtlich, dass es nicht möglich ist, mit einer fixen Dosis eine Mehrheit der Patienten in einen Serumspiegelbereich zwischen 10 und 20 mg/L zu bringen.

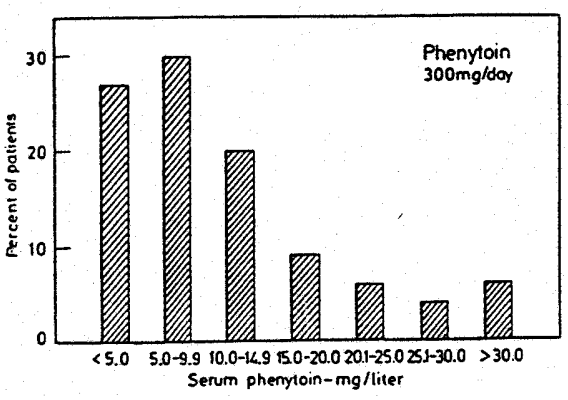
Schon 1975 hatte Koch-Weser[73] bei 200 ambulanten Patienten, die mit Phenytoin therapiert wurden, untersucht, welche Dosen verordnet wurden und welche Serumspiegel aus einer fix verordneten Dosis von 300 mg/Tag resultierten:

Abbildung 7

a) Verteilung der Phenytoindosis während unkontrollierter Dauerbehandlung [73]



b) Verteilung der Phenytoin-Serumspiegel während unkontrollierter Dauerbehandlung mit 300 mg Phenytoin pro Tag[73]



Wegen der grossen interindividuellen Unterschiede ist es ist schwierig, Phenytoin richtig zu dosieren, um in einen gewünschten "therapeutischen Bereich" zu gelangen. Da die verordnenden Ärzte, wegen der zwischendurch auftretenden epileptischen Anfälle, oft nicht wussten, ob Phenytoin tatsächlich von therapeutischem Nutzen war oder nicht, zogen sie es vor, das Antikonvulsivum zu wechseln, statt die Dosis so anzupassen, dass ein therapeutischer oder nebenwirkungsfreier Zielspiegel erreicht werden konnte.

Auch heute werden zur Einleitung einer Phenytoin-Therapie meist Standard-Dosen, wie zum Beispiel 300 mg Phenytoin pro Erwachsener und Tag verabreicht, da keine validierten Ausättigungsschemen vorliegen und rationale Voraussagemethoden über zu erwartende Steady-State-Spiegel mit Nicht-Steady-State-Bedingungen als Grundlage fehlen.

3.2.3.1.4. Interaktionen

Prinzip : Die Kenntnis von Arzneistoff-Arzneistoff Interaktionen hilft dem Verschreibenden den Verlauf der Therapie zu optimieren. Trotzdem muss eine bekannte Interaktion nicht zwangsläufig bei allen Patienten in Erscheinung treten. Ebenso unsicher ist es, dass eine Interaktion nicht auftreten wird, wenn sie nicht schon beschrieben wurde. Es ist auch möglich, dass durch die Modifikation der Dosierung, die durch eine kinetische Interaktion möglichen unerwünschten Wirkungen vermieden werden können[20].

Bekannte Interaktionen mit Phenytoin werden aufgrund ihrer klinischen Bedeutung (gross, mittel, gering) und ihres Mechanismus eingeteilt[74] :

1. Die Absorbtion und Bioverfügbarkeit betreffend :
   z.B. Beeinflussung der gastrointestinalen Absorption

2. Die Verteilung betreffend : Bindungskompetition z.B. um Plasmaproteine.

3. Den Metabolismus betreffend :
   Arzneistoffe mit induzierendem oder hemmendem Einfluss auf die Enzyme des Cytochrom P_{450}-Systems

Stoffe, die die Absorption verzögern[20]

Mittlere Bedeutung :	Zytostatika :	Bleomycin, Carmustin, Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin
	Antacida :	Sucralfat
	Diuretika :	Furosemid

Interaktionen durch Verdrängung aus der hohen Plasmaeiweissbindung :

Zum Beispiel Tolbutamid, Salicylate, Valproat, Phenylbutazon und andere stark an Plasmaproteine bindende Arzneistoffe können zu einer Verdrängung von Phenytoin aus der Plasmaprotein-Bindung führen, wodurch sich der freie Anteil erhöht[75].

Interaktionen über Cytochrom P_{450} :

Durch Phenytoin wird die Synthese von Cytochrom P_{450} gesteigert. Das heisst, dass Phenytoin ein Autoinduktor ist, aber auch den Abbau einer Reihe von Substanzen durch höhere Enzymaktivität steigert. Letztere sind klinisch von mittlerer bis geringer Bedeutung :

Mittlere Bedeutung :	Antiasthmatika :	Theophyllin
	Antiepileptica :	Valproinsäure
	Anthelmintika :	Mebendazol
	Corticosteroide	
	Orale Kontrazeptiva	
	Trizyklische Antidepressiva :	Imipramin
	Herz- Kreislauf Medikamente :	Digitalis Glycoside
	Immunsuppressiva :	Ciclosporin
	starke Analgetika :	Methadon
Geringe Bedeutung :	Zytostatika :	Cyclophosphamid
	schwache Analgetika :	Paracetamol (Erhöhung der Hepatotoxizität)

Der Abbau von Phenytoin selbst ist den Einflüssen anderer Induktoren und Inhibitoren des Cytochrom P_{450} unterworfen :

Induktoren

Mittlere Bedeutung :	Antibiotika :	Rifampicin
	Anticonvlusiva :	Clonazepam, Carbamazepin
Geringe Bedeutung :	Ethanol	
	Antiasthmatika :	Theophyllin
	Zytostatika :	Carmustin, Cisplatin, Methotrexat, Vinblastin

Inhibitoren

Grosse Bedeutung :	Antibiotika :	Chloramphenicol
	Antituberkulotika :	Isoniazid
	Mittel gegen Alkoholabusus :	Disulfiram
Mittlere Bedeutung :	Antibiotika :	Erythromycin, Sulfadiazin, Sulfamethizol, Trimethoprim
	Antimycotica :	Fluconazol
	Antiarrhytmika :	Amiodaron
	Trizyklische Antidepressiva :	Imipramin
	H_2-Antagonisten :	Cimetidin
	Protonenpumpenblocker :	Omeprazol
	Lokalanästhetika :	Lidocain
	Orale Kontrazeptiva	
	Antianaemica :	Folsäure
	Orale Antikoagulantien	
Geringe Bedeutung :	Anticonvulsiva :	Phenobarbital, Carbamazepin
	Gichtmittel :	Allopurinol

Andere Interaktionen

Phenytoin stört die Insulinfreisetzung aus den Langerhans'schen Inselzellen des Pankreas. Daraus lässt sich eine Interaktion mit oralen Antidiabetika und mit Glucagon (Hemmung des stimulierender Effeks auf die Insulinfreisetzung) ableiten. Die klinische Relevanz dieses Phänomens ist aber gering.

3.2.3.1.5. Exkretion

Weniger als 5% einer Phenytoindosis werden unverändert im Urin, ein verschwindend kleiner Teil über die Fäzes (siehe 3.2.3.1.2. Distribution, Seite 27) ausgeschieden. Die in der Leber entstandenen Metabolite werden durch glomeruläre Filtration und über eine aktive tubuläre Sekretion in der Niere ausgeschieden[44]. Eine Alkalisierung des Urins erhöht die Ausscheidungsrate. Der Hauptmetabolit (das para-Hydroxyderivat, p-HPPH) ist inaktiv und wird zum grössten Teil als Glucuronid über den Urin ausgeschieden. Sein Anteil im Urin beträgt ca 60 bis 70% einer Einzeldosis[46].

Tabelle 5

Pharmakokinetische Kenngrössen von Phenytoin

pKa[26] :	ca. 8.06
Perorale Bioverfügbarkeit[44]	über 85%
Lipophilie (Octanol/Wasser)[27] Log P[28]	hoch 2
Verteilungsvolumen[76]:	1 ± 0.23 L/kg
Proteinbindung[27] :	> 90 % 80% bei Urämie und normalem Serumalbumin[77] 75% bei Urämie und reduziertem Serumalbumin[77]
v_{max} [66] K_m [66]:	415 ± 83 mg/Tag/70 kg 5.7 ± 2.9 mg/L
Eliminationshalbwertszeit[27] : (dosisabhängig)	Bereich : 7 bis 60 Stunden Mittel : 22 ± 9 Stunden

3.2.3.1.6. Pharmakogenetische Polymorphismen

Definition

Meyer[78] definiert einen pharmakogenetischen Polymorphismus wie folgt :

„Ein pharmakogenetischer Polymorphismus eines Merkmals liegt dann vor, wenn das verantwortliche Gen in der gleichen Population durch mehr als eine einzige Allelform und durch mehr als einen Phänotyp geprägt ist. Die Frequenz des weniger verbreiteten Allels muss grösser als 1% sein."

Für Cytochrom P_{450} sind verschiedene Polymorphismen bekannt: Der Debrisoquin- und der Mephenytoin-Polymorphismus werden häufig genannt.
Bei diesen Polymorphismen kann die Zuteilung in rasche und langsame Metabolisierer (Phänotypisierung) mit relativ einfachen Bestimmungsmethoden gemacht werden.

Der pharmakogenetische Polymorphismus von Phenytoin

Zum ersten Mal wurde 1964 über einen Patienten mit einer Phenytoinintoxikation berichtet, die wegen einer ungenügenden Hydroxylierung zustande kam[79]. Aufgrund einer Familienstudie wurde vermutet, dass diese ungenügende Hydroxylierung vererbt war. Spätere Studien bestätigten dies auch bei anderen Familien[80,81]. Dieser defekte Phenytoinmetabolismus ist mit einer Inzidenz von 1 : 500 selten[82]. Noch nicht ganz geklärt ist der Vererbungsweg, jedoch scheint eine autosomal rezessive Vererbung wahrscheinlich[83]. Ob diese eingeschränkte Hydroxylierung in einen direkten Zusammenhang mit der grossen Variabilität der pharmakokinetischen Parameter gebracht werden kann, wurde nur indirekt über die Plasmahalbwertszeit untersucht. Eine klare Aussage darüber ist jedoch wegen der geringen Patientenzahlen nicht möglich.

Der Zusammenhang von Phenytoin mit anderen genetischen Polymorphismen

Fritz, Küpfer et al.[54] untersuchten die Bedeutung der genetischen Hydroxylierungs-Polymorphismen von Debrisoquin und Mephenytoin für die stereoselektive Hydroxylierung von Phenytoin. Es gab signifikante Unterschiede im Verhältnis von R- zu S-p-HPPH für effiziente und ineffiziente Mephenytoin-Hydroxylierer, jedoch nicht für die unterschiedlichen Debrisoquintypen. In dieser Sudie, sowie in der Studie von Steiner et al.[84] konnte die Vermutung von Sloan et al. [85] wiederlegt werden, wonach ein Zusammenhang zwischen dem Phenytoin-Metabolismus und dem Debrisoquin-Hydroxylierungsdefekt bestehen soll.

Wegen der chemischen Strukturverwandtschaft wird der Mephenytoin-Hydroxylierungsdefekt immer wieder in Zusammenhang mit Phenytoin gebracht. Eine in vitro Studie hat jedoch gezeigt, dass Phenytoin kein Inhibitor der Mephenytoin-Hydroxylaseaktivität ist[86]. Fritz, Küpfer et al.[54] fanden, dass "poor metabolizer" von S-Mephenytoin auch eine deutlich geringere R-p-HPPH-Bildung aufwiesen. Daraus folgerten sie, dass für die S-Hydroxylierung von Mephenytoin und die R-Hydroxylierung von Phenytoin dasselbe Isoenzym beteiltigt sei. Das Verhältnis von R- zu S- p-HPPH könnte daher zur Phänotypisierung des S-Mephenytoin Hydroxylatortyps herangezogen werden.

Das Verhältnis von R- : S- p-HPPH im Urin wurde, soweit bekannt, bisher nicht zur Korrelation mit der Abbaugeschwindigkeit von Phenytoin selbst herangezogen. Deshalb interessiert die Frage, inwiefern sich die Phänotypisierung der Phenytoinhydroxylierung über das Enantiomerenverhältnis von R- : S-p-HPPH erreichen lässt.

(Bestimmungsmethoden siehe 3.3.3.3. Trennung der R-/S-Enantiomere des Hauptmetaboliten p-HPPH mittels HPLC)

Durch die Messung von verschiedenen Metaboliten im Serum und im Urin wurde bereits versucht, Methoden zu finden, welche es erlaubten, eine rasche Phänotypisierung von schnellen und langsamen Metabolisierern zu erreichen, um damit ein TDM in der Anfangsphase der Therapie zu erleichtern. Durch die rasche Phänotypisierung könnte die Dosis rascher an die individuellen Voraussetzungen des Patienten angepasst werden. Durch diese Methode könnten auch die langen Wartezeiten überbrückt werden, die bis zum Erreichen eines Steady-State (dem idealen Zeitpunkt zur Messung eines Serumspiegels) abgewartet werden müssen.

Das Verhältnis p-HPPH zu Phenytoin im Urin

Da Phenytoin nur zu etwa 5% unverändert über die Niere ausgeschieden wird, dominiert die Urinkonzentration von p-HPPH dieses Verhältnis.

Um die Phänotypisierung zu machen wurde früher die Menge des total ausgeschiedenen p-HPPH gemessen[79]. Um das Problem der unkorrekten Urinsammlung (standardisierte Zeit der Urinsammlung) oder der unterschiedlichen Absorption der Dosis zu umgehen wurde der "Phenytoinindex"[87], das Verhältnis zwischen p-HPPH und Phenytoin im Urin, eingeführt.

Tatsächlich konnten Albani et al.[87] zeigen, dass dieser Index einer sehr grossen Variabilität unterworfen ist. Sie zeigten, dass sowohl bei Kleinkindern (1-6 Jahre) als auch bei Kindern und Jugendlichen (7 - 18 Jahre) mit diesem Index, gemessen im Steady-State, eine Zuteilung in langsamere und schnellere Metabolisierer gemacht werden konnte. Wegen der geringen Patientenzahl (6 Kleinkinder, 16 Jugendliche) muss diese Aussage jedoch mit Vorsicht interpretiert werden.

Auch Bourgeois und Wad[88] untersuchten den "Phenytoinindex" im Steady-State an 6 Patienten und bestätigten diese Ergebnisse, indem sie den Index mit der Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$ berechnet nach Formel 6 [88] und/oder direkt gemessen) korrelierten.

Das Verhältnis von Phenytoin zu p-HPPH im Serum

Dieses Verhältnis wird im Gegensatz zum Urin, von der Grösse der Phenytoinkonzentration dominiert. p-HPPH kommt im Serum nur in geringen Mengen (1-2 mg/L)[89], vorallem als Glucuronid (90%) vor[90].

Hoppel et al.[91] fanden, dass zwischen der Phenytoindosis und dem Quotienten von Phenytoin zu konjugiertem oder unkonjugiertem p-HPPH im Serum keine Korrelation besteht.
Sie fanden zudem, dass die Variabilität dieses Quotienten vielfach grösser war als die Variabilität der verabreichten Dosierung. Diese Resultate wurden durch die Arbeit von Bourgeois und Wad[88] bestätigt. Diese untersuchten gleichzeitig die Korrelation Konzentrationsquotienten von Serumphenytoin zu Serum-p-HPPH mit der Eliminations-halbwertszeit ($t_{1/2}$ berechnet nach Formel 6 [88] und/oder direkt gemessen) im Steady-State. Die Resultate zeigten eine klare Korrelation nicht nur intraindividuell (beim gleichen Patienten bei verschiedenen Steady-State-Serumspiegeln gemessen), sondern auch interindividuell (n=16 Patienten).

Glazko et al[92] zeigten ebenfalls, dass der Phenytoin : p-HPPH-Quotient im Serum gut mit den Plasmaeliminationshalbwertszeiten im Steady-State (direkt gemessen mit mehreren Serumspiegelmessungen) korrelierte und schlugen vor, diesen Index bei Problempatienten zu verwenden. Patienten mit einer kurzen Halbwertszeit hatten bei einer Standarddosis tiefe Serumphenytoinspiegel und relativ hohe p-HPPH Serumspiegel, Patienten mit einer langen Halbwertszeit hatten eher hohe Serumphenytoinspiegel und tiefe p-HPPH Serumspiegel.

Bestimmungsmethoden siehe 3.3.3.2. HPLC Bestimmungsmethode zur Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin

Im Steady-State ist, gemäss den vorliegenden Studien, eine Korrelation zwischen der individuellen Eliminationshalbwertszeit und dem Verhältnis von Phenytoin zu p-HPPH in Serum und Urin möglich. Um eine Phänotypisierung auch in der Anfangsphase der Phenytointherapie zu erreichen, interessierte die Frage, ob eine Korrelation zwischen der individuellen Eliminationshalbwertszeit und dem Verhältnis von Phenytoin : p-HPPH bereits im Nicht-Steady-State zu finden wäre.

3.2.3.2. Pharmakodynamik

3.2.3.2.1. Antikonvulsive Wirkung

Phenytoin wirkt stark antikonvulsiv, ist aber im Gegensatz zu den Barbituraten nur sehr schwach sedativ oder zum Teil sogar erregend. Es reduziert die Ionenpermeabilität von Membranen (membranstabilisierender Effekt) und erschwert die Erregungsausbreitung[93]

Phenytoin wirkt auf eine Vielzahl erregbarer Membranen von Zellen wie Neuronen und Muskelzellen des Herzens. Es hemmt durch die Beeinflussung spannungsabhängiger Natriumkanäle den transmembranären Natriumfluss im Ruhepotential oder während einem induzierten Aktionspotential. Diese Hemmung ist frequenz- und spannungsabhängig (ähnlich wie Lokalanästhetika) [46], das heisst, dass Phenytoin Entladungen mit hoher Frequenz abblockt und Aktivitäten mit tiefer Frequenz zulässt[24]. Bei Konzentrationen über 10 μM (2.5 mg/L) verzögert Phenytoin in den Nervenzellen den Kaliumausstrom während eines Aktionspotentials, was zu einer verlängerten Refraktärzeit führt. Phenytoin kann in Nervenzell-Kulturen in vitro auch das Ausmass und die Dauer von calciumabhängigen Aktionspotentialen reduzieren. Weiter wurde festgestellt, dass Phenytoin mit einem rasch inaktivierenden Calciumkanal in Neuronen interagiert und dass dessen hemmende Wirkung durch eine Membran-Depolarisation noch verstärkt wird. Es ist jedoch bisher noch unklar, ob therapeutische Konzentrationen von Phenytoin die Calciumströme in Neuronen unter bestimmten Bedingungen, zum Beispiel Entladungen mit hoher Frequenz, beeinflussen können[46].

Die Wirkung über die spannungsabhängigen Natriumkanäle wird heute als Hauptwirkung angesehen[27].

Obwohl Phenytoin detailliert studiert wurde, bleibt der genaue Wirkungsmechanismus aber, wie bei vielen ZNS-wirksamen Medikamenten, weiterhin weitgehend unbekannt[24]:

As so often when one reads the solemn opinions of experts on how drugs affect the function of the nervous system, the impression gained is that achieving a therapeutically useful effect resembles nothing so much as sauce-blending, better done by cooks than scientists. This can be a discouraging thought to those involved in trying to develop new drugs on rational principles [24]

3.2.3.2.2. Antiarrhythmische Wirkung (Klasse I: Natriumkanalblocker)

Die klinisch gute Wirksamkeit gegen Kammerrhythmusstörungen wurde erst viel später als die antikonvulsive Wirkung entdeckt : Phenytoin beeinflusst vor allem die Ruhepermeabilität der Herzmuskelzellmembranen. Der Kaliumausstrom wird gegenüber dem Natriumeinstrom erhöht. Dies bedeutet eine Zunahme des Membranpotentials, was sich besonders bei geschädigten Zellen mit niedrigem Membranpotential bemerkbar macht. Das Membranpotential wird dadurch stabiler, die Neigung zu spontanen Aktionspotentialen wird reduziert.[94]
Bei einer Digitalisintoxikation wird die oft auftretende, heterotrope Automatie (spontane Aktionspotentiale) im Purkinjesystem durch Phenytoin günstig beeinflusst. Die unter Phenytoin beobachtete Zunahme des repolarisierenden Kalium-Ausstroms führt zur Beseitigung der Digitalis-bedingten heterotropen Automatie auf der Basis verzögerter Nachpotentiale. Die Refraktärzeit der Zellen des AV-Knotens und die effektive Refraktärzeit des Purkinjesystems wird an Patienten mit Digitalisintoxikation unter Phenytoin verlängert.[95]

3.2.3.2.3. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)

Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Phenytoin sind abhängig von der Applikationsart, der Therapiedauer und der Dosis respektive dem Serumspiegel.

Neurologische UAW : (spiegelabhängig[79])	Nystagmus, Ataxie, Bewusstseinsstörungen, Koma
Kardiovaskuläre UAW :	Hypotension, Bradykardie, AV-Block, Kammerflimmern, Asystolie, Vorhofflattern

Die kardiovaskulären UAW treten vor allem dort auf, wo Phenytoin schnell in hoher Konzentration im Blut erscheint (i.v. Applikation schneller als 50 mg/Minute)[96]. Mit einer Verlangsamung der Infusionsgeschwindigkeit ist diese zu korrigieren oder zu verhindern[97].

andere UAW [46] :	Allergien, Blutbildveränderungen (z.B. megaloblastische Anämie), Gingivahyperplasie, Osteomalazie, Hirsutismus, Folatmangel, Vitamin D-Mangel, gastrointestinale Symptome, foetale Malformationen

3.2.3.2.4. Dosis-Wirkungs (UAW)-Beziehungen (therapeutischer Bereich)

Wegen der ungewöhnlichen Pharmakokinetik und deren grosser interindividueller Variabilität ist die Beziehung Serumspiegel-Wirkung aussagekräftiger als die Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Die untere Grenze des therapeutische Serumspiegel Bereichs

Therapie der Epilepsie

Im Jahre 1960 haben Buchtal et al.[98] eine Korrelation zwischen Serumspiegel und der Wirkung von Phenytoin gezeigt : Sie beobachteten retrospektiv während 3 bis 4 Wochen zwölf hospitalisierte Patienten mit schwerer Epilepsie. Mit einem Serumspiegel von unter 10 mg/L konnten sie keine klinische Besserung beobachten. Danach wurden 51 andere Patienten in Gruppen eingeteilt (1. Gruppe : Serumspiegel von 0-10 mg/L; 2. Gruppe : Serumspiegel von 11 bis 48 mg/L). In der zweiten Gruppe konnte bei 75% der Patienten eine klinische Besserung beobachtet werden; in der ersten Gruppe hingegen nur bei 25% der Patienten. Weiter wurden 174 Patienten auf UAW untersucht : 136 Patienten hatten keine, 21 milde und 17 Patienten ausgeprägte UAW. Ausgeprägte UAW traten erst ab 30 mg/L auf. Im Bereich zwischen 10 und 30 mg/L hatte niemand ausgeprägte UAW.
Da in dieser Studie nur Epileptiker mit schwerem Krankheitsbild retrospektiv betrachtet wurden, hat Lund[99] 1974 in einer prospektiven Studie bei 32 Epileptikern gezeigt, dass mit Phenytoin allein, oder in Kombination mit anderen Antikonvulsiva, die Häufigkeit der epileptischen Anfälle bei Serumspiegeln über 10 mg/L deutlich vermindert war. Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurde die untere Grenze des therapeutischen Bereichs von Phenytoin als 10 mg/L festgesetzt[100].

Andere Autoren konnten zeigen, dass auch mit Serumspiegeln unter 10 mg/L eine gute Kontrolle der Epilepsie erreicht werden kann[101,102]. Diese Arbeiten haben eine Kontroverse um die untere Grenze des therapeutischen Bereichs ausgelöst, die bis heute anhält :

Woo et al.[103] sind 1988 der Frage nachgegangen, ob "subtherapeutische" (<10 mg/L) Serumspiegel angehoben werden müssen. In ihrer Studie wurden 79 Patienten mit "subtherapeutischen" Serumspiegeln (durchschnittlich 4,5 mg/L) und gut kontrollierter Epilepsie (d.h. zwischen 3 Monaten und 2 Jahren ohne Anfall) in zwei Gruppen eingeteilt. In der einen Gruppe wurde der Phenytoinserumspiegel über 10 mg/L angehoben, in der anderen auf dem gleichen Niveau belassen. Zwischen den beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied, was die Anfallshäufigkeit betrifft. Die Häufigkeit von UAW war jedoch in der Gruppe im „therapeutischen Bereich“ bedeutend grösser. Die Autoren kommen zum Schluss, dass bei gut kontrollierten Epileptikern eine Anpassung nach oben weder hilfreich noch erstrebenswert ist. Die Kontrolle der Epilepsie sei jedoch individuell verschieden, deshalb dürfe aus dieser Studie nicht abgeleitet werden, dass ein TDM für Antiepileptika nicht geeignet ist .

Epilepsieprophylaxe

Ebenfalls umstritten ist die Effizienz von Phenytoin zur Epilepsieprophylaxe (z.B. nach neurochirurgischen Eingriffen oder Schädel-Hirn-Verletzungen). Einige Studien wollten zeigen, dass Phenytoin nicht geeignet ist, einen Patienten vor einem epileptischen Anfall zu bewahren. Diese Studien wurden aber wegen der ungenügenden Anzahl Patienten, fehlendem Drug- und Compliance Monitoring und unvollständigem Follow-Up häufig kritisiert [104],[105],[106]

Temkin et al.[107] haben in einer prospektiven, randomisierten Doppelblindstudie mit 404 Patienten (208 mit Phenytoin, 196 mit Placebo) zeigen können, dass Phenytoin in einer Konzentration zwischen 10 und 20 mg/L zumindest während der ersten 7 Tage nach Kraniotomie zur Prophylaxe der Epilepsie sinnvoll und effektiv ist. In dieser Studie wurden jedoch Patienten, die einen Anfall hatten, in der Folge jeweils ausgeschlossen, was ein verzerrtes Bild über die effektiven Resultate liefert und eine Aussage über den längerfristigen Nutzen einer Prophylaxe verunmöglicht.

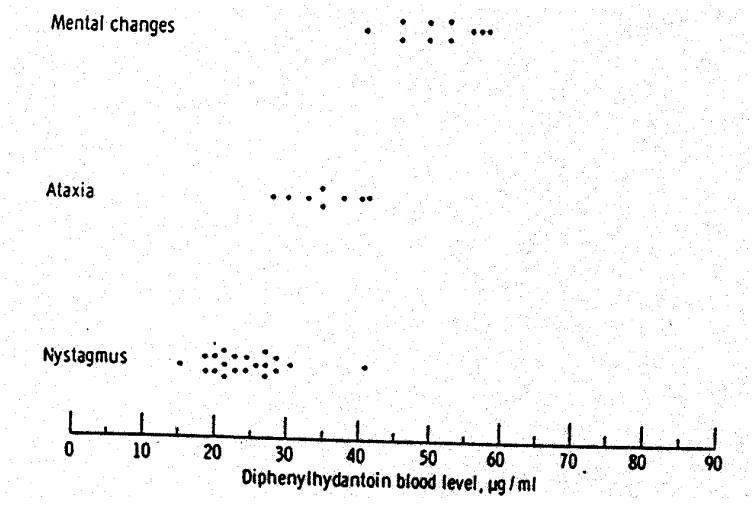
Für die Epilepsieprophylaxe kann gefolgert werden, dass Phenytoin zumindest während der ersten 7 Tage effektiv ist. Es ist daher sinnvoll, den Patienten möglichst rasch in einen Serumspiegel-Bereich von 10 bis 20 mg/L zu bringen, und ihn in diesem Bereich zu halten.

Die obere Grenze des therapeutischen Bereichs

Kutt[54] hat bei 32 Patienten zeigen können, dass die UAW Nystagmus, Ataxie und „Mental changes“ serumspiegelabhängig ab circa 20 mg/L auftreten.
In seiner Studie hatten Patienten mit einem Serumspiegel über 20 mg/L (beginnend bei ca 15 mg/L) Symptome des Nystagmus. In der folgenden Abbildung (aus Kutt et al.[79]) ist der Zusammenhang zwischen UAW und Serumspiegel aufgezeigt :

Abbildung 8

Zusammenhang zwischen UAW und Serumspiegel von Phenytoin[79]



20 mg/L stellen keine absolute obere Grenze des therapeutischen Bereichs dar : einerseits können bei gewissen Patienten bereits toxische Symptome unter dieser Grenze gefunden werden[103], andererseits gibt es Patienten, die zur Behandlung ihrer Epilepsie eine Serumkonzentration von deutlich über 20 mg/L brauchen und diese auch ertragen[108].

Aus all diesen Arbeiten ist ersichtlich, dass der therapeutische Serumspiegelbereich von Phenytoin nicht klar definiert ist und eine gewisse Unsicherheit über dessen Einsatz besteht, zumindest was die Epilepsieprophylaxe betrifft.
Im Gegensatz zur unteren Grenze, scheint die obere Grenze des therapeutischen (respektive die untere Grenze des toxischen) Bereiches mit 20 mg/L klarer definiert zu sein. Seit der Arbeit von Kutt et al. [79] (1964) und seiner Bestätigung durch Lund [99] hat niemand diese Grenze in Frage gestellt. Es ist sicherlich nicht möglich, für einen neu einzustellenden Patienten im Status Epilepticus im voraus zu sagen welchen Serumspiegel er minimal benötigt, um seine Epilepsie effektiv zu behandeln.

Richens[67] folgerte bereits 1979 aus der Kontroverse um den therapeutischen Bereich von 10 bis 20 mg/L:

No patient should be considered to be resistent to phenytoin until his serum concentration has been within this range for an acceptable period of time.

3.3. Therapeutic Drug Monitoring von Phenytoin

3.3.1. Voraussetzungen von Phenytoin für ein TDM

Zusammenfassend können bei Phenytoin die Kriterien für ein sinnvolles TDM erfüllt werden : (siehe Tabelle 1) :

1. Zwischen der Serumkonzentration und therapeutischen respektiven toxischen Effekten besteht eine Korrelation.
   (siehe 3.2.3.2.4. Dosis-Wirkungs (UAW)-Beziehungen (therapeutischer Bereich)

2. Der Unterschied zwischen therapeutischer und toxischer Dosis ist klein
   (siehe 3.2.3.1.3. Metabolismus)

3. Die bei Standarddosen erreichten Serumkonzentrationen zeigen grosse interindividuelle Unterschiede.
   (siehe 3.2.3.1.3. Metabolismus)

4. Die Bioverfügbarkeit verschiedener Präparate ist unterschiedlich.
   (siehe 3.2.1.3. Galenische Formen und ihre Eigenschaften)

5. Es gibt relevante Interaktionen mit anderen Arzneistoffen, die für die Kinetik von Phenytoin bedeutsam sein können.
   (siehe 3.2.3.1.4. Interaktionen)

6. Die Pharmakokinetik von Phenytoin ist nicht linear.

3.3.2. Die Zielkonzentrationsstrategie für Phenytoin

3.3.2.1. Angestrebte Zielkonzentration im Serum

Die Serumkonzentration soll im therapeutischen Bereich liegen (10 bis 20 mg/L). Da für Phenytoin meistens Talspiegel (Minimalspiegel) gemessen werden, soll die Zielkonzentration im unteren Teil des definierten therapeutischen Bereichs liegen (z.B. 10 mg/L).

3.3.2.2. Aufsättigung ohne bekannte individuelle Kinetikparameter des Patienten

Im Gegensatz zur gut eingestellten Dauerbehandlung einer Epilepsie, ist die individuelle optimale Wirkkonzentration und -dosis von Phenytoin bei der akuten Behandlung des Status Epilepticus oder bei der Epilepsieprophylaxe nicht zum vornherein bekannt. Verschiedene Studien zeigen aber, dass im akuten Fall möglichst rasch ein Serumspiegel zwischen 10 und 20 mg/L erreicht werden soll. Wegen der langen Zeit, die vergeht bis die Patienten einen Steady-State (oder den erforderlichen Minimalspiegel) erreichen, ist es erforderlich, eine erhöhte Initialdosis zu verabreichen, um dieses Ziel in kurzer Zeit zu erreichen. Wegen der grossen interindividuellen Variabilität der pharmakokinetischen Parameter ist jedoch das Festlegen eines Aufsättigungs- und Erhaltungsschemas problematisch. Zudem können Messungen im Steady-State erst nach zirka 20 Tagen durchgeführt werden, was eine individuelle Dosisoptimierung (Erhaltungsdosis) in der akuten Phase zusätzlich erschwert.

Initialdosis zur schnellen Aufsättigung

Salem et al.[109] und Abernethy et al.[110] (für übergewichtige Patienten) empfehlen ein Schema für die Kurzzeitsättigung (15 mg/kg Körpergewicht i.v. verabreicht mit einer Geschwindigkeit von 30 bis 50 mg/Minute). Diese Untersuchungen können für die Klinik nicht als repräsentativ betrachtet werden, da sie an einer geringen Anzahl gesunder Patienten durchgeführt wurden[76].

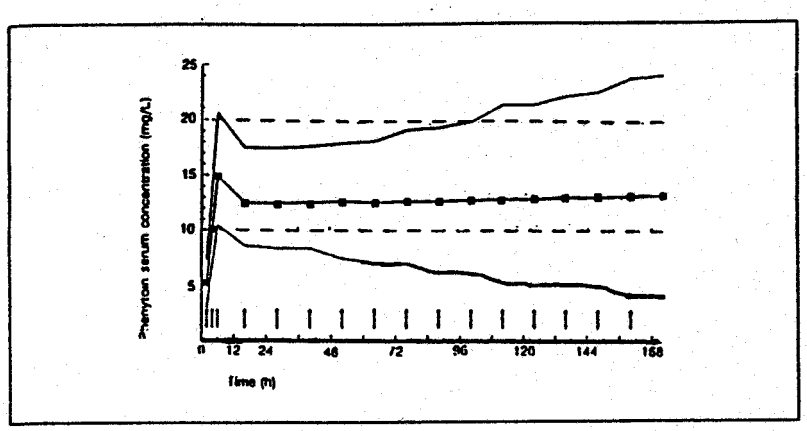
Cranford et al.[97] analysierten eine grössere Anzahl Patienten mit epileptischen Anfällen und empfahlen, eine Initialdosis von 18 mg/kg Körpergewicht in einer Kurzinfusion über 30 Minuten zu verabreichen. Die durchschnittliche Konzentration im Serum, 30 Minuten nach Verabreichung dieser Infusion lag bei 24.6 mg/L, also über dem therapeutischen Bereich. Bei 2 von 28 Patienten sogar über 30 mg/L. Kardiovaskuläre UAW waren häufig, und eine Anpassung der Infusionsdauer beim Auftreten dieser Symptome wurde nötig.

Vozeh et al.[88] bestimmten in einer am Kantonsspital Basel durchgeführten klinischen Studie bei 49 Patienten das Verteilungsvolumen für Phenytoin im Steady-State. Eine populationskinetische Analyse ergab ein Verteilungsvolumen von 1.0 ± 0.04 L/kg. Alter, Geschlecht, Serum- Kreatinin und Serum-Albumin hatten keinen wesentlichen Einfluss auf das Verteilungsvolumen. Mit einer Computersimulation (Monte-Carlo-Simulation) wurde ein Dosierungsschema erarbeitet, das bei 90% der Patienten über 5 Tage eine Konzentration im optimalen Bereich (10 - 20 mg/L) ohne Dosisanpassung garantieren sollte.

Abbildung 9

Computer-simulierter Talspiegelverlauf (■ Mittelwert ± 90% Vertrauensintervall)

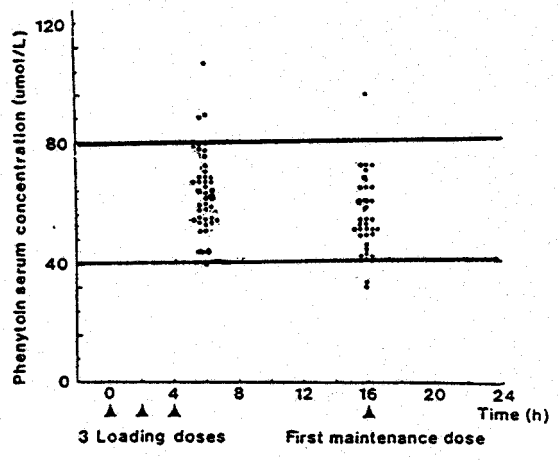
Die Pfeile (↑) bezeichnen die Zeitpunkte der Dosisverabreichung .
Initialdosis : 15 mg/kg Körpergewicht, verteilt auf 3 Teildosen innerhalb von 4 Stunden, anschliessend alle 12 Stunden 150 mg i.v. Die Simulation wurde für 1000 70 kg schwere Patienten gemacht : K_m 5.7 mg/L ± 50% ; v_{max} 32.4 mg∗(Körpergewicht)$^{0.6}$ ± 20%[66]



Blaser et al [111] zeigten in einer prospektiven Studie an 40 Patienten, dass eine Initialdosis von 15 mg/kg Körpergewicht (verabreicht in drei Teildosen innerhalb von 4 Stunden) sowohl nach 6 Stunden (das heisst 2 Stunden nach der Gabe der letzten Teil-Initialdosis), wie auch nach 16 Stunden (also unmittelbar vor der Gabe der ersten Erhaltungsdosis) bei 90% aller Patienten einen Phenytoinserumspiegel von 10 bis 20 mg/L, also innerhalb des gewünschten Bereichs, ergab.

Abbildung 10

Phenytoin Serumkonzentration 2 und 12 Stunden nach Verabreichung einer i.v. Initialdosis von 15 mg/kg KG (n=40 Patienten)[111]



Diese Patientenmessungen stimmten mit der Computersimulation (Abbildung 9) überein. Bei 4 von 21 Patienten, bei denen der Blutdruck gemessen wurde, sank dieser um mehr als 20%. Kein Patient musste wegen der aufgetretenen Hypotension behandelt werden.

Erhaltungsdosis nach der initialen Aufsättigung

Neben dem schnellen Erreichen des gewünschten initialen Serumspiegels, stellt sich das Problem der Erhaltungsdosierung. Nach der Verabreichung der Initialdosis sind noch keine patientenspezifische Messdaten vorhanden, die gebraucht werden können, um mit einfachen, Methoden eine individuelle Dosisanpassung zu machen (Nicht-Steady-State-Zustand).

Koup et al.[112] schlugen vor, 2 und 24 Stunden nach der Initialdosis einen Serumspiegel zu bestimmen und daraus die Clearance abzuschätzen. Sie nahmen für die Kinetik ein 1-Kompartiment-Modell mit einer Elimination 1. Ordnung an. Aus der Schätzung der Clearance konnten sie eine Erhaltungsdosis berechnen, die zum Erreichen der erforderlichen Serumspiegel nötig war. Zur Abschätzung der Clearance wurde die Methode von Sawchuk und Zaske[113] verwendet, die ursprünglich für Gentamicin gebraucht wurde (lineare Kinetik mit geringerer interindividueller Variabilität).

Zur Berechnung einer Erhaltungsdosis zum Erreichen eines Ziel-Steady-State-Spiegels wurde folgende Formel verwendet :

$$D_m = Cl * \tau * C_{ss}$$ ***Formel 9***

Formel 9

D_m Erhaltungsdosis [mg]
Cl Clearance [L/Zeit]
τ Dosisintervall [Zeit]
C_{ss} Durchschnittskonzentration Konzentration im Steady-State [mg/L]

Crowley et al.[114] haben diese Methode mittels eines Bayesian Forecasting Programms, welches Nicht-Steady-State-Serumspiegel verwendet, validiert und gefunden, dass durch den Gebrauch dieser Methode die Variabilität der gemessenen Steady-State-Serumspiegel kleiner ausfällt, als bei der Gabe einer gängigen Standarddosis von 4 mg/kg Körpergewicht.

Mit der Computersimulation von Vozeh et al.[88] (siehe Abbildung 9) konnte im Anschluss an die Initialdosis eine geeignete Phenytoin-Standarderhaltungsdosis berechnet werden, die für die meisten Patienten während 5 Tagen einen Serumspiegel zwischen 10 und 20 mg/L ergeben sollte. Nach Ablauf dieser Zeit muss die Dosis individuell angepasst werden. (Diese individuelle Anpassung muss aufgrund von Nicht-Steady-State Serumspiegeln erfolgen, da nach 5 Tagen das Fliessgleichgewicht im Organismus noch nicht erreicht ist).

Da diese Computersimulation über 5 Tage bisher klinisch nur für ausgewählte Patienten bezüglich der Initialdosierung überprüft wurde, fehlt eine Validierung unter Klinikbedingungen im üblichen Patientengut, insbesondere über eine Beobachtungszeit von 5 Tagen (Standard-Initial- und -Erhaltungsdosierung). Diese Fragestellung ist deshalb zur Verbesserung und Vereinfachung der notfallmässig eingeleiteten Phenytointherapie von grundsätzlicher Bedeutung.

3.3.2.3. Voraussagemethoden mit einer Zielkonzentrationsstrategie unter Verwendung individueller Patientendaten

Über die Langzeitbehandlung mit Phenytoin lassen sich aus der Literatur [9,115,116,117] folgende Schlüsse ziehen :
Die Dosierung wird nach einem einmal erreichten Steady-State-Serumspiegel mittels Nomogrammen oder einer Bayesian Forecasting Methode angepasst, um einen Ziel-Steady-State-Serumspiegel zu erreichen (Ziel-Konzentrationsstrategie).

Voraussagemethoden unter Steady-State Bedingungen

Unter Steady-State Bedingungen ist die Berechnung eines nächsten Steady-State Serumspiegels mit Hilfe des aus Formel 4 abgeleiteten Ausdrucks relativ einfach :

$$C_{ss} = \frac{v * K_m}{v_{max} - v} \quad \textbf{\textit{Formel 10}}$$

Formel 10

v	Abbaurate [mg/Tag]
v_{max}	maximale Abbaugeschwindigkeit durch Cytochrom P_{450} [mg/Tag]
K_m	Michaelis Konstante (Konzentration bei halbmaximaler Abbaugeschwindigkeit [mg/L]
C_{ss}	Konzentration im Steady-State [mg/L]

Aus der Formel wird ersichtlich, dass v_{max} und K_m die beiden Variabeln sind, die zur Berechnung von C_{ss} notwendigerweise bekannt sein müssen.

Richens und Dunlop[117] haben ein Nomogramm zur Dosisberechnung unter Steady-State Bedingungen entwickelt. Rambeck et al.[118] haben dieses Nomogramm später angepasst.

Abbildung 11

Dosisanpassung von Phenytoin im Steady-State :
Nomogramm nach Richens und Dunlop[117]

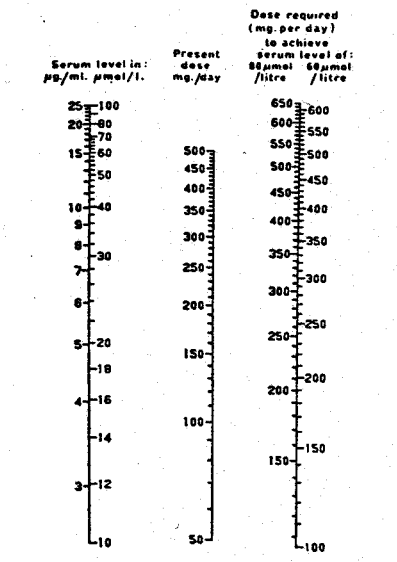


Fig. 2—Nomogram for adjusting phenytoin dosage.

Given a single reliable serum level on a given daily dose of the drug, the dose required to achieve a serum level of 60 µmol/l. (15 µg./ml.) or 80 µmol/l. (20 µg./ml.) can be predicted. A line is drawn connecting the measured serum level (left-hand scale) with the dose administered (centre scale), and then by extending this line to the right-hand scale the dose required to produce a therapeutic level of the drug can be read off.

Der Nachteil dieses Nomogramms, sowie desjenigen von Chiba et al.[119] ist, dass sie von einem Mittelwert für K_m respektive v_{max} (bei Chiba) ausgehen, und daraus den anderen Parameter berechnen. Damit schliessen sie eine individuelle grössere Variabilität entweder von K_m (Richens) oder v_{max} (Chiba) aus; die Variabeln werden voneinander abhängig.

Martin et al.[116] versuchten die Dosis mittels Bayesian Forecasting anzupassen. Diese Methode erlaubt, unter Verwendung initialer Populationsdaten (K_m und v_{max} mit Standardabweichung), eine Voraussage für den nächsten Steady-State Serumspiegel zu machen. Die Variabeln sind also voneinander unabhängig (siehe 3.1.6.1. Die Bayes-Statistik).

Vozeh et al.[120] haben den Voraussagefehler (definiert als Abweichung von der Zielkonzentration im Steady-State) des Nomogramms respektive der Bayesian Forecasting Methode mit demjenigen von Ärzten, die in der Phenytoindosierung Erfahrungen hatten, verglichen : Die rechnerischen Methoden unterschätzten zwar fast alle Serumspiegel mit einer sehr grossen Variabilität, aber keiner der Ärzte machte eine bessere Voraussage. Ausserdem stellten Sie fest, dass das Bayesian Forecasting die Resultate mit der kleinsten Variabilität lieferte. Sie vermuteten allerdings, dass die verwendeten Populationsdaten, die von gesunden Freiwilligen stammten, nicht optimal waren.

Später haben Vozeh et al.[9], aufbauend auf zwei Arbeiten von Sheiner et al.[11,121] eine graphische, sowie eine für den Taschenrechner geeignete Berechnungsmethode gezeigt, mit welchen sämtliche zur Verfügung stehenden Datenpaare (Dosis - Steady-State-Serumspiegel) in die Voraussage einbezogen werden konnten. Damit flossen sowohl die inter- wie auch die intraindividuelle Variabilität in die Berechnung ein.

Sie schlossen, dass die mit einer bestimmten Dosis erhaltenen Steady-State Konzentrationen (C_{ss}) zwar eine gute Grundlage zur Berechnung einer Dosisanpassung darstellen, dass aber die Gesamtpopulationsdaten ebenfalls in die Berechnung miteinzubeziehen sind.
Da im klinischen Alltag, vor allem in der Phase der initialen Sättigung, meistens Nicht-Steady-State-Serumspiegel gemessen werden, wurde nach einer Methode gesucht, welche eine Voraussage auch aufgrund von Nicht-Steady-State-Spiegeln erlaubte.

Voraussage unter Nicht-Steady-State Bedingungen

Zur Schätzung der individuellen pharmakokinetischen Parameter aufgrund von Nicht-Steady-State Spiegeln existieren bisher einzig Methoden auf der Grundlage des Bayesian Forecasting (siehe 3.1.6.1. Die Bayes-Statistik).

Vozeh und Follath[70] haben für ein 1-Kompartiment-Modell eine Formel aufgestellt, mit der die Serum Phenytoinkonzentration für jeden gegebenen Zeitpunkt berechnet werden konnte :
siehe Formel 7

(Die Annahme, dass die orale Absorption von Phenytoin einer Kinetik erster Ordnung entsprechen würde, führte zu keinem signifikanten Fehler, auch bei nur einmal täglicher Verabreichung [68, 69]).

Mit der Verknüpfung dieser Formel mit dem Bayes Theorem können aus Nicht-Steady-State Spiegeln die Variabeln Vd, v_{max} und K_m berechnet werden.

$$\frac{(v_{max_{pop}} - v_{max_{geschä\,tzt}})^2}{\sigma^2{}_{v_{max\,pop}}} + \frac{(K_{m_{pop}} - K_{m_{geschä\,tzt}})^2}{\sigma^2{}_{K_{m_{pop}}}} + \frac{(Vd_{pop} - Vd_{geschä\,tzt})^2}{\sigma^2{}_{Vd_{pop}}} + \sum_{j=1}^{m} \frac{(C_{(t)\,j_{gemessen}} - C_{(t)\,j_{geschä\,tzt}})^2}{\sigma^2{}_{e}}$$

Formel 11

D Dosis [mg]
Vd Verteilungsvolumen [L]
$C_{(t)}$ Serumkonzentration zur Zeit t [mg/L]
v_{max} Maximale Abbaugeschwindigkeit pro Tag [mg/L]
K_m Serumkonzentration bei halbmaximaler Umsetzungsgeschwindigkeit [mg/L]

Die individuelle Anpassung der Dosis wurde bisher nicht nach dieser Formel berechnet.

Um bei peroraler Therapie zusätzlich den Faktor der Bioverfügbarkeit einzuführen, kann in Analogie der Algorithmus von Beal[122] benutzt werden (Formel 12) und als zusätzliche Variable in die Bayes'sche Formel eingefügt [10, 17,123] werden.

$$\frac{dC_{(t)}}{dt} = \frac{D}{Vd * \frac{1}{F}} - \frac{v_{max} * \frac{1}{F} * C_{(t)}}{(K_m + C_{(t)}) * Vd * \frac{1}{F}}$$ ***Formel 12***

Formel 12

F = orale Bioverfügbarkeit

Diese Berechnungsart zur Festlegung der individuell benötigten Phenytoindosis im Anschluss an die standardisierte Dosierungsphase, wurde bisher für Patienten nicht durchgeführt. Mit Hilfe eines geeigneten, auf Formel 7 und Formel 11 beruhenden Computerprogramms, sollte sie unter geeigneten Voraussetzungen im Spitalbetrieb evaluierbar (Voraussagefehler) und für eine rationale Phenytointherapie brauchbar sein.

3.3.3. Phenytoin und seine Labor-Bestimmung

Die grosse Zahl von Publikationen über die Quantifizierung von Phenyotin im Serum bestätigt das Interesse an einer zuverlässigen und für die Routine geeigneten Methode. Sie basieren auf unterschiedlichen analytischen Methoden :

Spektrophotometrisch

Colorimetrie : z.B. Oxidation von Phenytoin zu Benzophenon[124]

Chromatographisch

Gaschromatographie [125]
Hochdruckflüssigchromatographie [126]

Immunologisch

EMIT : Enzyme-Multiplied Immunoassay-Technique
z.B. im DuPont-deNemours aca®
Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay[127] : z.B. im Abbott TDx®

Die reine spektrophotometrische Bestimmung von Phenytoin wird heute kaum mehr angewendet, da der Aufwand zur Vorbereitung der Proben erheblich ist.

Chromatographische Methoden werden insbesondere zur parallelen Bestimmung mehrerer Pharmaka oder Metabolite (z.B. Phenytoin und Phenobarbital oder Phenytoin und p-HPPH) oder zur Qualitätskontrolle immunologischer Methoden eingesetzt.

Im Vordergrund stehen aber immunologische Methoden.

3.3.3.1. Die EMIT Bestimmungsmethode für Phenytoin im Serum

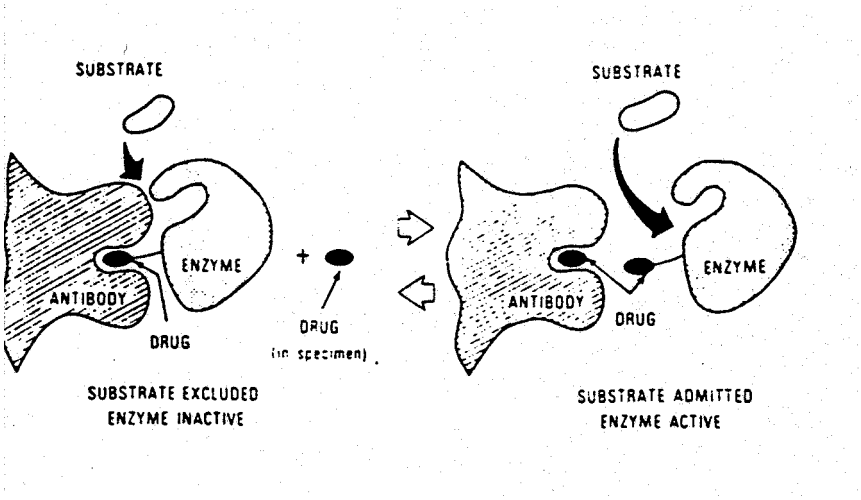
Der homogene Enzymimmunotest wurde im Jahr 1972 erstmals von einer Forschergruppe des Syva Research Institute in Californien für die Bestimmung von Morphium beschrieben[128].

Der EMIT wird homogen genannt, weil alle Reagentien im Reaktionsmedium vorhanden sind.

Abbildung 12

Der homogene Enzym-Immunoassay[129]

Links : Enzym-Konjugat des Medikamets gebunden an den Antikörper (inaktives Enzym)
Rechts : An den Antikörper gebundenes Medikament des Patienten (z.B. im Serum). Das Medikament-Enzym-Konjugat ist aus der Antikörperbindung verdrängt (aktives Enzym).



Phenytoin wird mit einem bakteriellen Enzym (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) konjugiert (PHT-G6PDH). Dieses Konjugat entwickelt keine enzymatische Aktivität, wenn es an einen Phenytoin-spezifischen Antikörper gebunden ist.
Ein Antikörper mit einer definierten Anzahl Bindungsstellen wird von freiem, das heisst unkonjugiertem (= zu bestimmendem) Phenytoin und dem Phenytoin-Konjugat im Gleichgewicht besetzt. Der Anteil des nicht mehr an den Antikörper gebundenen Phenytoin-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Konjugats entwickelt nun seine Enzymaktivität (Reduktion von NAD zu NADH), die quantitativ erfasst werden kann und mit der Menge des Phenytoins der Probe korreliert.

Die Zunahme der Extinktion bei 340 nm, hervorgerufen durch die Bildung von NADH, ist zur Aktivität direkt proportional. Die Phenytoin-Konzentration wird mit Hilfe einer vorher erstellten chargenspezifischen Kalibrierungskurve bestimmt.[130]

Die Qualität eines Enzymimmunoassays hängt sehr stark von der Reinheit des für die Immunisierung, die Kalibrierung und die Konjugation verwendeten Antigens (Phenytoin) sowie der Spezifität des verwendeten Antikörpers ab [127]. Falls die Spezifität eines Antikörpers nicht genügend hoch ist, ist es möglich, dass strukturähnliche Moleküle die Genauigkeit der Resultate beeinflussen.

Qualitätskontrolle

Wie bereits beschrieben (siehe 3.1.3.3. Die Qualität der Bestimmungsmethode ; Seite 15) kann die Qualität einer Labormethode durch die Teilnahme an Ringversuchen überprüft werden. Eine andere Möglichkeit ist die gleichzeitige Bestimmung identischer Proben mit zwei grundsätzlich verschiedenen Methoden.

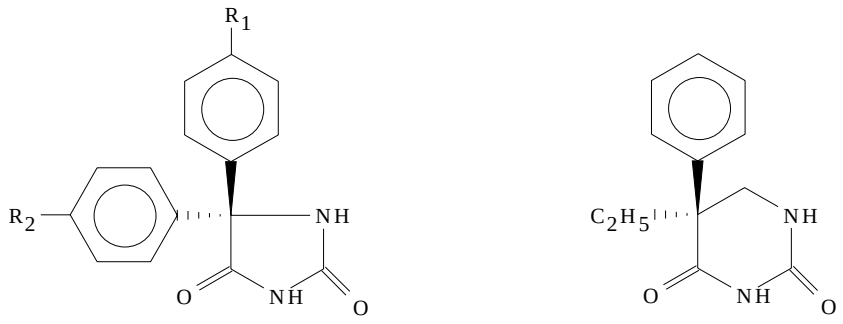
Oellerich et al.[131] haben in der Bestimmung von Phenytoin mittels EMIT eine Interferenz mit

p-HPPH sowie mit Mephenytoin finden können. Diese kann mit einer zweiten Analysenmethode mit anderer Spezifität (z.B. HPLC) untersucht und quantifiziert werden.

Von besonderem therapeutischem Interesse ist die Abklärung einer Interferenz zwischen Phenobarbital und Phenytoin, da eine Strukturverwandtschaft besteht und die beiden Substanzen in Kombination als Antikonvulsiva eingesetzt werden. In der Arbeit von Oellerich konnte zwischen diesen beiden Substanzen keine Interferenz gefunden werden.

Abbildung 13

Strukturverwandtschaft von Phenytoin zu Phenobarbital



Phenytoin **Phenobarbital**

Aus Gründen der Qualitätskontrolle und der Qualitätssicherung ist eine Überprüfung der Spezifität und Sensitivität einer Labormethode durch strukturverwandte Substanzen sinnvoll und notwendig.

3.3.3.2. HPLC Bestimmungsmethode zur Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin

Die HPLC-Methode eignet sich nicht nur für die Überprüfung der EMIT-Methode, sondern auch für die gleichzeitige Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH im Serum und im Urin (Quotient).

p-HPPH liegt im Serum und im Urin vor allem als Glucuronid vor. Um die Lipophilie und dadurch auch die Retentionszeit auf einer Reverse-Phase-HPLC-Säule zu erhöhen, wird die Glucuronsäure zur einfachen analytischen Bestimmung abgespalten.
Erst eine vorangegangene Deglucuronidierung erlaubt, glucuronidiertes und unglucuronidiertes p-HPPH gemeinsam als urspüngliche Hydroxymetaboliten zu erfassen und damit eine Aussage über die Cytochrom P_{450}-abhängige Metabolisierung zu erhalten.

Deglucuronidierung von p-HPPH

Es wurden verschiedene Methoden beschrieben :

In der Arbeit von Fritz, Küpfer et al.[54] wurde die Glucuronsäure mittels Säurehydrolyse abgespalten (konzentrierte Salzsäure während 120 Minuten bei 100°C).

Eine weit spezifischere Methode brauchten Vree et al[132] :
Sie spalteten die Glucuronsäure mit Hilfe der β-Glucuronidase ab. Durch die Evaluation von verschiedenen Glucuronidasen fanden sie, dass die Glucuronidase Typ VII (aus Escherichia coli) bei einem pH von 6.8 am effektivsten und die Abspaltung der Glucuronsäure bereits nach 30 Minuten vollständig war (beim Typ H2, aus Helix promatia, war dies nach 2 Stunden, beim Typ BI, aus Stierenleber, und beim Typ LII, aus Patella vulgata, nach 24 Stunden der Fall)

Gleichzeitige Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH mittels HPLC

Folgende Methoden wurden bisher beschrieben :

Hermansson et al[133] sowie McClanahan et al.[134] publizierten Methoden in denen p-HPPH-Glucuronid[133], respektive p-HPPH und weitere Metabolite[134], nach einer Festphasenextraktion mittels HPLC bestimmt wurden. Roy et al.[135] bestimmten nach einer Extraktion mit Ethylacetat fünf Phenytoin-Metaboliten nebeneinander.

Mit Ausnahme der Arbeit von Vree et al.[132] sind keine Methoden publiziert, die es erlauben, sowohl Phenytoin als auch p-HPPH direkt, ohne Aufbereitung aus Serum und Urin, zu bestimmen, was für eine Bestimmung einer grösseren Probenzahl eine wesentliche Erleichterung darstellt.

3.3.3.3. Trennung der R-/S-Enantiomere des Hauptmetaboliten p-HPPH mittels HPLC

Vor der Verfügbarkeit von HPLC-Methoden zur Trennung von Enantiomeren, war deren Bestimmung sehr aufwendig und ungenau oder für grössere Probenzahlen ungeeignet. Butler bestimmte 1976 das Verhältnis der p-HPPH Isomere durch die Messung der optischen Drehung nach vorhergehender komplizierter Extraktion und Kristallisation[136]. Cavalier und Toussaint verabreichten deuteriertes Phenytoin und untersuchten die Metabolite mit einer GC-MS Methode[137].

Die auf HPLC beruhenden Methoden sind wesentlich weniger aufwendig und somit für die routinemässige Bestimmung sicher geeigneter.

Probenaufbereitung

Da die Enantiomere von p-HPPH wegen ihrer identischen Löslichkeits- und Sorptionseigenschaften in einem üblichen HPLC-System ein (nahezu) identisches Retentionsverhalten zeigen, ist bei deren Quantifizierung mit speziellen Trennungssystemen auf ein möglichst störungsfreies Umfeld zu achten. Deshalb werden, vor der eigentlichen Trennung der Enantiomere mittels HPLC aus Serum oder Urin, die "Ballaststoffe" abgetrennt.

In der Arbeit von Fritz, Küpfer et al.[54] wurde der Urin mit Ethylacetat ausgeschüttelt und der Rest der eingedampften organischen Phase mittels TLC getrennt, um dann die entsprechenden Banden mit Methanol zu extrahieren und p-HPPH mittels HPLC zu bestimmen.

Eto et al[138] machten eine Festphasenextraktion mit einer Extrelut-1® Säule und tertiärem Butyl-Methyl-Ether.

Die zur parallelen Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH verwendete Methode von Vree et al[132] wurde ebenfalls zur Abtrennung der Ballaststoffe als präparative HPLC Methode verwendet, mit dem Vorteil, dass gleichzeitig mit der eigentlichen Isolierung der Gehalt von Phenytoin und p-HPPH bestimmt werden konnte.

McClanahan et al[133] entfernten den Ballast ebenfalls über eine präparative HPLC-Methode, ohne jedoch zuvor die Phenytoin und p-HPPH Konzentration zu bestimmen.

Quantifizierung der Enantiomere mittels HPLC

Bisher sind einige HPLC Methoden zur Bestimmung des Enantiomerenquotienten von p-HPPH bekannt, die sich in ihren Grundsatz nach der Abtrennung der übrigen "Ballaststoffe" auf zwei Methoden reduzieren lassen :

<u>Chirale Liganden-Austausch-Chromatographie</u>

Die in der Arbeit von Fritz, Küpfer et al.[54] verwendete Methode benutzte zur Trennung der Enantiomere dem Laufmittel zugegebenes C_8-L-Prolinamid und Nickel-II-acetat, welche zu chiralen Nickel- L-Prolin-p-HPPH-Komplexen führten. Die mit L-Prolin über eine Amidbrücke verknüpfte C8- Kette dient als sogenannter "Spacer" zum Trägermaterial.
Da C_8-L-Prolinamid kommerziell nicht erhältlich ist, muss es im Labor synthetisiert werden. Heute sind im Handel Säulen erhältlich, auf denen das Trägermaterial der Säule bereits mit L-Prolinamid verknüpft ist. Bisher wurden keine Untersuchungen von p-HPPH mit solchen Säulen beschrieben.

Chromatographie mit Cyclodextrinen

McClanahan et al. [133] entwickelten eine Methode, welche eine β-Cyclodextrinsäule verwendet :

Cyclodextrine

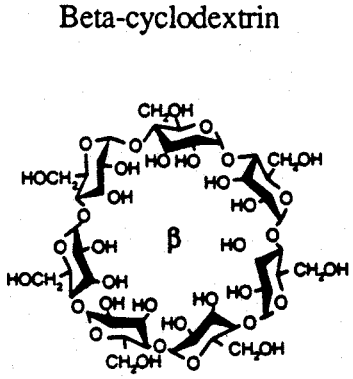
Cyclodextrine werden im enzymatischen Abbau von Stärke (Enzym : Cyclodextrin-Glycosyl-Transferase; CGTase) durch verschiedene Bakterien (v.a. Bacillus macerans) hergestellt.

Die Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide mit einer unterschiedlichen Anzahl von Glucoseeinheiten (6 bis 8), die jeweils über die C1 und C4 Atome glycosidisch verknüpft sind. Sie haben chirale Struktur (z.B. weisen β-Cyclodextrine 35 asymetrische C-Atome auf)[139].

Die Verknüpfung der Glucoseeinheiten ergibt die leicht konische Form des Moleküls, ähnlich einem Becher. Im Inneren des Bechers, wo sich die Glycosidbindungen befinden, ist das Molekül lipophil, aussen am Becher hydrophil. Je nach Polymerisationsgrad unterscheidet man verschiedene Cyclodextrine (siehe Tabelle 6).

Abbildung 14

Cyclodextrin-Becher[139]



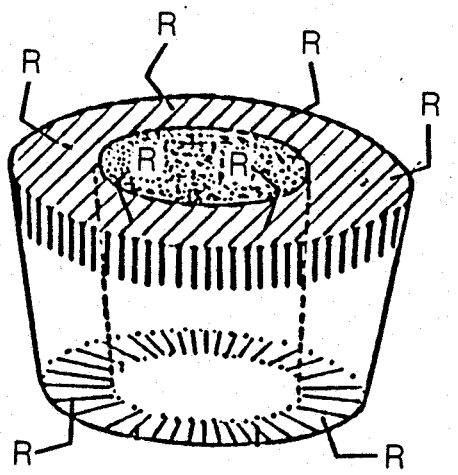


Tabelle 6

Eigenschaften der am häufigsten gebrauchten Cyclodextrine[140]

Cyclodextrin	Anzahl Glucose-einheiten	Molekular-gewicht [Dalton]	Wasser-löslichkeit (g/L)	Tiefe des Bechers [Angström]	Innendurchmesser [Angström]	Aussendurch-messer [Angström]
α	6	972	14.5	7.9-8.0	4.7-5.2	14.6±0.4
β	7	1'135	18.5	7.9-8.0	6.0-6.1	15.4±0.4
γ	8	1'297	23.2	7.9-8.0	7.5-8.3	17.5±0.4

Arzneimittel mit Cyclodextrin als Hilfsstoff sind zur Zeit in Erprobung :
Zum Beispiel Indometacin und β-Cyclodextrin zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit[141] oder Vitamin D_3 und β-Cyclodextrin zur Verbesserung der Stabilität gegen Sauerstoff, Hitze und Licht[142].

Zur Trennung optisch aktiver Enantiomerenpaare mittels HPLC finden sie breite Anwendung. Cyclodextrine werden nicht nur zur Analyse (Quantifizierung) dieser Arzneistoffe eingesetzt, sondern auch als Schritt zur Isolierung einzelner Enantiomere. Da eine Vielzahl von Arzneistoffen optisch aktiv ist und ein genauer Nachweis der pharmakologischen Aktivität der einzelnen Enantiomere gefordert wird, gewinnen diese Methoden immer mehr an Bedeutung.

Am häufigsten wird β-Cyclodextrin verwendet, da α-Cyclodextrin für viele Moleküle einen zu kleinen Innendurchmesser aufweist γ-Cyclodextrin heute für die breite Anwendung noch zu teuer ist.

β-Cyclodextrine für die Trennung der R- und S- Enantiomere von p-HPPH mittels HPLC

Maguire[143] hat untersucht, welche strukturellen Gegebenheiten massgebend für eine Trennung von Hydantoin-Enantiomeren sind. Er vermutet, dass der Phenylsubstituent den Einschlusskomplex am Rand der kleineren Öffnung des Cyclodextrin-Bechers (siehe Abbildung 14) über eine Hydrogenbindung mit den Hydroxylgruppen bildet. Die räumlich unterschiedliche Hydroxylierung eines Phenylrings (p-HPPH) ergibt eine zusätzliche Bindungsstelle mit dem Cyclodextrin. Weiter ist die Anordnung der Carbonyl-, Imid- und Amidgruppen entscheidend für die unterschiedlichen Retentionszeiten. Es sind also vorwiegend sterische Unterschiede, die eine Trennung von Enantiomeren mit Cyclodextrin ermöglichen.

Eine wichtige Grösse für die Charakterisierung von Cyclodextrin Einschlusskomplexen ist deren Stabilitätskonstante. Die Stabilitätskonstante für HPLC-Systeme entspricht dem Verhältnis zwischen dem reziproken Wert des Kapazitätsfaktors (k') und der Konzentration von β-Cyclodextrin in der mobilen Phase im Bereich zwischen 0 bis 8 mM.
Die Stabilitätskonstante zeigt, wie gut ein Molekül in den Cyclodextrinbecher passt, und wie gut sich dieses Molekül wieder aus dem Becher entfernen lässt. Je grösser der Unterschied, desto besser wird die Möglichkeit die entsprechenden Moleküle zu trennen.

Für R und S p-HPPH haben Eto et al [138] die Stabilitätskonstante mittels β-Cyclodextrin-HPLC bestimmt.

Sie fanden folgende Stabilitätskonstanten :

R-p-HPPH : 3.2 mM
S-p-HPPH : 2.0 mM

Ein weiterer Faktor, der die Stabilitätskonstante beeinflusst, ist die Temperatur : Im allgemeinen sind Einschlusskomplexe bei tieferen Temperaturen stabiler[140], weshalb z.B. Wasserkühlungen für den Säulenraum verwendet werden. Damit kann die Stabilität der Einschlusskomplexe erhöht und die Retentionszeit verkürzt werden (β-Cyclodextrin als Laufmittelzusatz).

Es sind zwei Möglichkeiten beschrieben, wie die Eigenschaften von Cyclodextrin für die HPLC nutzbar gemacht werden können.

1. β-Cyclodextrin wird an die stationäre Phase gebunden :
   Die in der Publikation von Vree et al. [132] benutzte Methode beruht auf der Methode von McClanahan et al. [133], welche eine 250 mm lange β-Cyclodextrin-Säule verwendeten.
   Auf diese Art werden die zu trennenden Stoffe je nach Stabilitätskonstante auf der Säule zurückgehalten, mit dem Effekt, dass Moleküle mit einer hohen Stabilitätskonstante zuerst im Detektor erscheinen (R- p-HPPH vor S- p-HPPH)
   Diese Säulen sind sehr teuer und anfällig auf kleinste Verunreinigungen, die bei Analysen von Blut und Urin immer wieder auftreten können.

2. β-Cyclodextrin wird der mobilen Phase zugegeben :
   Diese HPLC-Methode entspricht jener von Eto et al. [138] , in der β-Cyclodextrin dem Laufmittel zugegeben wird. Die zu trennenden Stoffe werden also in Abhängigkeit der Stabilitätskonstante mehr oder weniger gut mit dem Laufmittel mitgerissen. Moleküle mit einer tiefen Stabilitätskonstante erscheinen im Gegensatz zur vorher beschriebenen Methode zuerst im Detektor (S-p-HPPH vor R-HPPH).

Die Methode zur Trennung der Enantiomere von R- und S-p-HPPH soll zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der individuellen Eliminationshalbwertszeit von Phenytoin und dem Quotienten von R- : S-p-HPPH dienen.

(siehe dazu 3.2.3.1.6. Pharmakogenetische Polymorphismen)

4. Ziele der Untersuchung

- Da die Computersimulation von Vozeh et al.[66] bisher klinisch nur für ausgewählte Patienten bezüglich der Initialdosierung überprüft wurde, fehlt eine Validierung unter Klinikbedingungen im üblichen Patientengut, insbesondere über eine Beobachtungszeit von 5 Tagen (Standard- Initial- und -Erhaltungsdosierung). Diese Fragestellung ist deshalb zur Verbesserung und Vereinfachung der notfallmässig eingeleiteten Phenytointherapie von grundsätzlicher Bedeutung.

- Die Berechnung mittels Bayesian Forecsting und nur 3 Serumkonzentrationsbestimmungen zur Festlegung der individuell benötigten Phenytoindosis im Anschluss an die standardisierte Dosierungsphase wurde bisher an Patienten nicht erprobt. Mit Hilfe eines geeigneten, auf Formel 7 und Formel 11 beruhenden Computerprogramms, soll sie im Spitalbetrieb evaluiert (Voraussagefehler), der Nutzen für eine rationale Phenytoindosierung beurteilt und ein entsprechendes TDM organisiert werden.

- Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH sowie zur Trennung der Enantiomere von R- und S-p-HPPH soll erarbeitet und spezifiziert werden.

- Aus Gründen der Qualitätskontrolle und der Qualitätssicherung soll eine Überprüfung der Phenytoin-Spezifität und -Sensitivität der im Labor routinemässig verwendeten EMIT-Metode sowie deren Beeinflussung durch strukturverwandte Substanzen mit HPLC angegangen werden.

- Im Steady-State ist, gemäss vorliegenden Studien eine Korrelation zwischen der individuellen Eliminationshalbwertszeit und dem Konzentrationsverhältnis von Phenytoin zu p-HPPH in Serum und Urin ableitbar. Um durch eine schnelle Phänotypisierung auch in der Anfangsphase der Phenytointherapie zu erreichen, soll die Frage, ob eine Korrelation zwischen der individuellen Eliminationshalbwertszeit und dem Quotienten von Phenytoin : p-HPPH bereits im Nicht-Steady-State untersucht werden.

- Das Konzentrationsverhältnis von R- : S- p-HPPH im Urin wurde, soweit bekannt, bisher nicht zur Korrelation mit der individuellen Eliminationshalbwertszeit von Phenytoin herangezogen. Deshalb soll untersucht werden, inwiefern sich eine Phänotypisierung über die Bestimmung des Enantiomerenquotienten von R- : S-p-HPPH erreichen lässt.

5. Material und Methoden

5.1. Schnelle Aufsättigung und Dosisanpassung mittels Bayesian Forecasting

5.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden erwachsene Patienten, die aus therapeutischen Gründen schnell (i.v.) mit Phenytoin aufgesättigt werden mussten (siehe Tabelle 8 und 3.2.2. Phenytoin : registrierte (therapeutische) Indikationen)

Ausschlusskriterien :

- Mit phenytoinhaltigen Präparaten vorbehandelte Patienten.

- Patienten mit bekannter Allergie gegen Phenytoin.

- Patienten, bei denen eine Kontraindikation für die Phenytoinbehandlung bestand : Schwere Hypotonie, Herzinsuffizienz schweren Grades, AV-Block[41].

- Sondenernährte Patienten mit enteraler Phenytoin-Zufuhr über die Sonde (unregelmässige Bioverfügbarkeit)

5.1.2. Patientengut

Über einen Zeitraum von 2 Jahren wurden 96 Patienten in die Studie aufgenommen.

Tabelle 7

Patientencharakteristik

		Tag 1 bis 5	Serumspiegel 4	Serumspiegel 5	Serumspiegel 6	Serumspiegel 7
Geschlecht	Männer	45	36	12	5	4
	Frauen	23	15	15	4	4
Disziplin	Chirurgie	43	25	6	4	4
	Medizin	25	21	21	5	4
Alter [Jahre]	Durchschnitt ± SD	50 ± 15	51 ± 16	48 ± 14	52 ± 18	50 ± 18
	Median	53	53	50	54	52
	Minimum	18	18	18	18	18
	Maximum	83	76	72	72	72
Gewicht [kg]	Durchschnitt ± SD	74 ± 10	73 ± 10	74 ± 11	76 ± 19	77 ± 20
	Median	75	75	75	75	73
	Minimum	53	53	53	53	53
	Maximum	120	120	120	120	120

Tabelle 8

Hospitalisierte Patienten mit Indikation für eine schnelle i.v. Aufsättigung mit Phenytoin

(Studiengruppe n = 96 Patienten)

Schädelhirntrauma (ohne genauere Angaben)	34
Status epilepticus	15
Schädelbruch	9
Cerebrovaskulärer Insult	8
OP eines Hirntumors	9
Subarachnoidalblutung	7
Hirnödem	5
Contusio cerebri	4
Commotio cerebri	3
Meningitis	1
Erhöhter Hirndruck	1

Tabelle 9

Im Verlauf der Studie ausgeschiedene Patienten; Gründe und Zeitpunkt

Grund	Vor Serumspiegel III	Zwischen Serumspiegel III und IV	IV und V	V und VI	VI und VII	später	Total
Verlegung in ein anderes Spital, Entlassung	5	9	9	8		2	**33**
Anordung des Arztes	5	5	5	5		4	**24**
Exitus	3	3	3	3		2	**14**
Falsche Applikation, fehlende Messung	10	3					**13**
Exzessiver Metabolisierer (i.v. Dosis > 625 mg/Tag)		1	1	2			**4**
extrem langsamer Metabolisierer (i.v. Dosis < 100 mg/Tag)		1	1				**2**
Hypotensive Krise	2						**2**
Allergie	2						**2**
Veränderung des Blutbildes (Hb)	1						**1**
Ungenügende Überwachung durch Hausarzt					1		**1**

Total ausgeschlossen	28	22	19	18	1	8	
auswertbar für den folgenden Serumspiegel	**68**	**46**	**27**	**9**	**8**		

5.1.3. Phenytoin-Applikation

Präparate

Es wurde Epanutin® (Parke Davis und Co., Vertrieb für die Schweiz : Warner-Lambert AG, Baar) in folgenden Formulierungen verwendet (Gehalt in mg Phenytoin-Natrium) :

Ampullen 5 mL (50 mg/mL) Hilfsstoffe : NaOH, Ethanol, Propylenglycol, Wasser[38]
Kapseln (100 mg und 50 mg) Hilfsstoffe : Magnesiumstearat, Lactose

Verwendete Trägerinfusion :

NaCl 9g/L 100 mL und 500 mL in PP-Beutel, Bioren S.A., Couvet (Schweiz)
250 mL in Infusionsglas, Apotheke Kantonsspital Aarau

Applikation als i.v. Infusion (siehe Tabelle 10 und 5.1.5.2. Standarderhaltungsdosis)

Die Zufuhr erfolgte standardisiert als verdünnte Infusion (Konzentration < 7.5 mg Phenytoin pro mL); es durften keine anderen Arzneistoffe beigemischt werden. Mussten trotzdem andere Medikamente während der Phenytoin-Zufuhr über denselben Katheter verabreicht werden, musste die Infusion unterbrochen und die Infusionsleitung mit NaCl 0.9% vor- und nachgespült werden. Die Applikation erfolgte, falls vorhanden, immer über einen doppellumigen Zentralvenenkatheder (z.B. Arrow-Katheter; Homedica). Die Infusion wurde über einen Drei-Wegehahn so proximal wie möglich angeschlossen. Eine periphere Applikation über eine grosse Vene war erlaubt.
Das Totvolumen (Füllvolumen) der verwendeten Infusionsbestecke betrug im Schnitt ca. 20 mL, deshalb wurde nach jeder Applikation mit mindestens 20 mL NaCl 0.9% in der gleichen Geschwindigkeit nachgespült, um eine vollständige Phenytoin-Zufuhr zu garantieren.

Während der ersten 5 Tage (standardisierte Phase) durfte nicht auf orale Therapie umgestellt werden.

Das Dosisintervall betrug im Anschluss an die Initialdosis 12 Stunden, gerechnet ab Beginn der Infusionen.

Vor und nach jeder i.v. Verabreichung musste Puls und Blutdruck protokolliert werden.

orale Zufuhr

Ab der Abenddosis des 5. Therapietages, das heisst, mit der ersten individuellen Dosierung konnte, bei fehlendem intravenösem Zugang, auf orale Applikation umgestellt werden. Dies war auf dem Kontrollblatt zu protokollieren (siehe Abbildung 20). Für die Berechnung der oralen Dosis wurde mit einer Bioverfügbarkeit von 85% gerechnet (siehe Tabelle 5).

Mit der Umstellung auf eine orale Therapie wurde auch auf für den Patienten übliche Einnahmezeitpunkte umgestellt, wobei das Dosisintervall zwischen der letzten i.v. und der ersten p.o. Applikation mindestens 8 Stunden betragen musste. In der Regel wurden die Kapseln um 7 Uhr und um 19 Uhr verabreicht (Dosisintervall : 12 Stunden).

5.1.4. Blutentnahme und Serumspiegelmessungen

Die Blutentnahme für die Serumspiegelmessung erfolgte über eine periphere Vene und nicht über den Zufuhr-Katheter für Phenytoin. Das Vollblut wurde in Röhrchen ohne Natriumcitrat gegeben (Vakutainer® Blutentnahmesystem) und sofort per Rohrpost ins Labor geschickt. Nach der Aufbereitung zu Serum wurde die Probe entweder unmittelbar anschliessend gemessen oder tiefgekühlt (-20°C) gelagert.

Die quantitative Bestimmung erfolgte im Zentrallabor des Kantonsspitals Aarau als homogener Enzym-Immunotest der Firma Syva (EMIT®) auf dem "Automatischen Clinischen Analysator mit Computer" (aca II®) der Firma Du Pont Nemours.
(siehe 3.3.3.1. Die EMIT Bestimmungsmethode für Phenytoin im Serum)

5.1.5. Dosierungsschema zur schnellen Aufsättigung

(vgl. Abbildung 15)

5.1.5.1. Initialdosis

15 mg Phenytoin/kg Körpergewicht wurden über 4 Stunden infundiert. Als Infusomaten standen die Modelle Volumed (Firma Arcomed), Einstellung in mL/Stunde, und PE02 (Arcomed), Einstellung in Tropfen/Minute, zur Verfügung.
Da bei Therapiebeginn das Gewicht des Patienten meist nur grob geschätzt werden konnte, wurde dieses zur Berechnung der Dosis nur in 5 kg Schritten abgestuft (Tabelle 10).

Die Verdünnung der Ampullenlösung erfolgte unter Berücksichtigung folgender Kriterien :

- Löslichkeit : Phenytoin-Injektionslösung (pH 11) zugemischt in einer pH-neutralen wässerigen Lösung ist nur beschränkt löslich (≤ 7.5 mg/mL in isotoner NaCl-Lösung laut einer unveröffentlichten mikroskopischen Untersuchung).

- Volumenzufuhr : Beim Schädel-Hirn-Traumatiker sollte möglichst wenig Flüssigkeit zugeführt werden[144].

- Einfachheit der Verdünnung und Anwendung

Tabelle 10

Berechnung und Verabreichung der Phenytoin-Initialdosis

Gewicht [kg]	Dosierung [mL Epanutin]	Dosierung [mg Phenytoin]	Verdünnung und Infusionsdauer	Verabreichungsart Volumed [mL/h]	Verabreichungsart PE02 [Tr/min]
40 45	13 15	598 690	**100** mL Infusion NaCl 9g/L (PP-Beutel) über 4 Stunden	25	8
50 55 60 65 70 75 80 85 90	16 18 20 21 23 25 26 28 29	736 828 920 966 1068 1150 1196 1288 1334	**250** mL Infusion NaCl 9g/L (Glas) über 4 Stunden	63	21
95 100 105 110 115 120 125 130 135	31 33 34 36 38 40 41 43 44	1426 1518 1564 1656 1702 1840 1886 1978 2024	**500** mL Infusion NaCl 9g/L (PP-Beutel) über 4 Stunden	125	42

5.1.5.2. Standarderhaltungsdosis

Die Erhaltungsdosierung erfolgte in den ersten 5 Tagen standardisiert :

≤ 70 kg Körpergewicht :	alle 12 Stunden 3.8 mL Epanutin® (50 mg/mL) (190 mg Phenytoin-Natrium = 175 mg Phenytoin) als Kurzinfusion über 15 Minuten
> 70 kg Körpergewicht :	alle 12 Stunden 4.4 mL Epanutin® (50 mg/mL) (220 mg Phenytoin-Natrium = 202 mg Phenytoin) als Kurzinfusion über 15 Minuten

5.1.5.3. Zeitpunkte der Serumspiegelmessungen

(vgl. Abbildung 15)

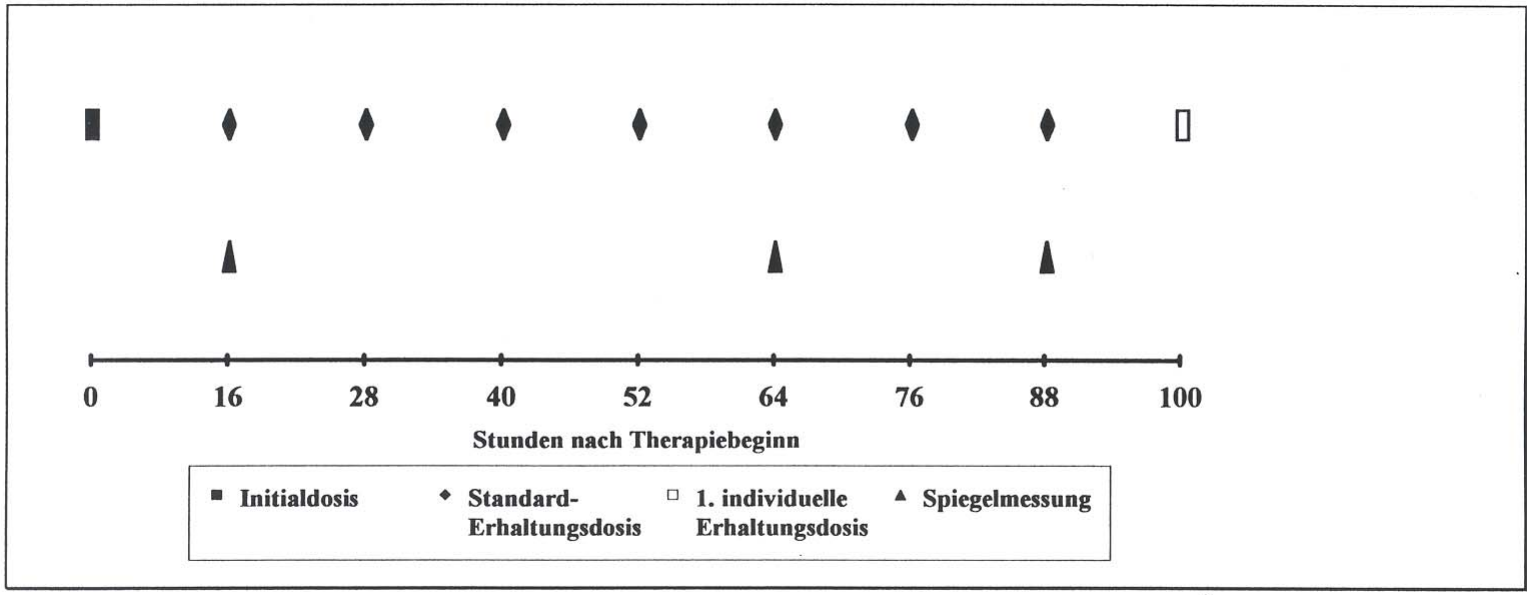
Serumspiegel 1 : Unmittelbar vor der 1. Erhaltungsdosis
(16 Stunden nach dem Therapiebeginn).

Serumspiegel 2 : am 4. Tag, unmittelbar vor der Morgendosis.

Serumspiegel 3 : am 5. Tag, unmittelbar vor der Morgendosis.

Abbildung 15

Zeitlicher Ablauf der schnellen i.v. Phenytoin-Sättigung : Dosierungen und Serumspiegelmessungungen



5.1.5.3. Spitalinterne Datenerfassung und -übermittlung

Für jeden Patienten wurde für das Patientendossier auf der Pflegestation über ein computergestütztes Expertensystem ein individuelles Verordnungsblatt erstellt.

Folgende Angaben waren erforderlich :

Name und Vorname des Patienten
Körpergewicht
Datum und Zeitpunkt des Therapiebeginns
Eingesetzter Infusomat zur Applikation der Initialdosis

Das Expertensystem erstellte neben dem individuellen Verordnungsblatt auch die notwendigen Therapieüberwachungs- oder Kontrollblätter zur Datenübermittlung (Pflegestation ↔ Spitalapotheke). Die Berechnung der individuellen Phenytoindosierung aufgrund der Serumkonzentrationsmessungen erfolgte zentral in der Spitalapotheke.

5.1.5.3.1. Erfassungsblätter und Protokolle

(Ablaufschema siehe Abbildung Abbildung 16)

Mit dem Expertensystem erstellte Datenblätter

- Blatt **1** (Abbildung 17) ***Informationsblatt***
  Zweck : zur sofortigen Information der Apotheke bei Indikationsstellung
  Uebermittlungsweg : Fax/Rohrpost
  Absender : Arzt
  Adressat : Apotheke

- Blatt **2** (Abbildung 17) ***Serumspiegelblatt***
  Zweck : Protokollierung der Serumspiegel und besonderer Ereignisse (z.B. Epi-Anfälle)
  Uebermittlungsweg : direkte Übergabe
  Absender : Arzt
  Adressat : Pflegepersonal

  am 5. Therapietag :
  Uebermittlungsweg : Telephon oder direktes „Holprinzip“ durch Apotheke
  Adressat : Apotheke (zur Berechnung)

- Blatt **3** (Abbildung 18) ***Standard-Verordungsblatt***
  Zweck : Verordnungsblatt zur standardisierten Dosierung (Tag 1 - 5)
  Uebermittlungsweg : direkte Übergabe
  Absender : Arzt
  Adressat : Pflegepersonal

Apothekenprotokoll (Protokoll) *(Abbildung 19 a, b, c)*

Zur Erfassung der allgemeinen Patientendaten im Rahmen der Studie :
Indikation, Laborparameter, Komedikationen, Serumspiegelwerte (Daten für die Berechnung) und Dosisempfehlungen.
Ebenso wurden besondere Ereignisse, sowie Gründe für einen Therapieabbruch protokolliert.
Das Protokoll blieb in der Apotheke und wurde für jeden Patienten einzeln geführt.

Neuverordnungsblatt (Kontrollblatt 3*) *(*Abbildung 20*)*

Das "Kontrollblatt" wurde jeweils durch den Apotheker nach der Berechnung der Dosisempfehlung und dem dazu erwarteten Steady-State Spiegel ausgefüllt und an den zuständigen Stationsarzt (per Fax oder Rohrpost) geschickt. Dieser visierte und verordnete die empfohlene Dosis oder nahm bei Änderungswünschen Rücksprache mit dem Apotheker auf (siehe 5.1.6. Individuelle Dosisanpassung).

Die Datenblätter waren aufgrund der unterschiedlichen Bedürfnisse der Benutzer und nach verschiedenen Testphasen zusammengestellt worden.
Zur Information waren zusätzliche Dossiers zusammengestellt worden, die die wichtigsten Hinweise und Hintergrundinformationen zur Phenytoinpharmakokinetik, -dosierung und -andwendung enthielten. Sie waren als Version für den Arzt respektive den Pflegedienst nach einer Einführungsinformation durch den studienverantwortlichen Apotheker abgegeben worden. Ebenso waren Bildschirmoberflächen, angepasst an die Bedürfnisse der datenerfassenden Apotheker realisiert worden. Zusammen mit dem Info-Dossier erlaubten sie an 7 Tagen pro Woche jedem Pikettdienst leistenden Spitalapotheker die notwendigen Berechnungen zur Dosisempfehlung sowie zur Spiegelvoraussage druchzuführen. Mit dieser notwendigen Standardisierung der Therapie konnte eine sinnvolle Auswertung erreicht werden.

Abbildung 16

Ablaufschema des Therapeutic Drug Monitoring von Phenytoin
(Legende siehe 5.1.5.3.1. Erfassungsblätter und Protokolle)

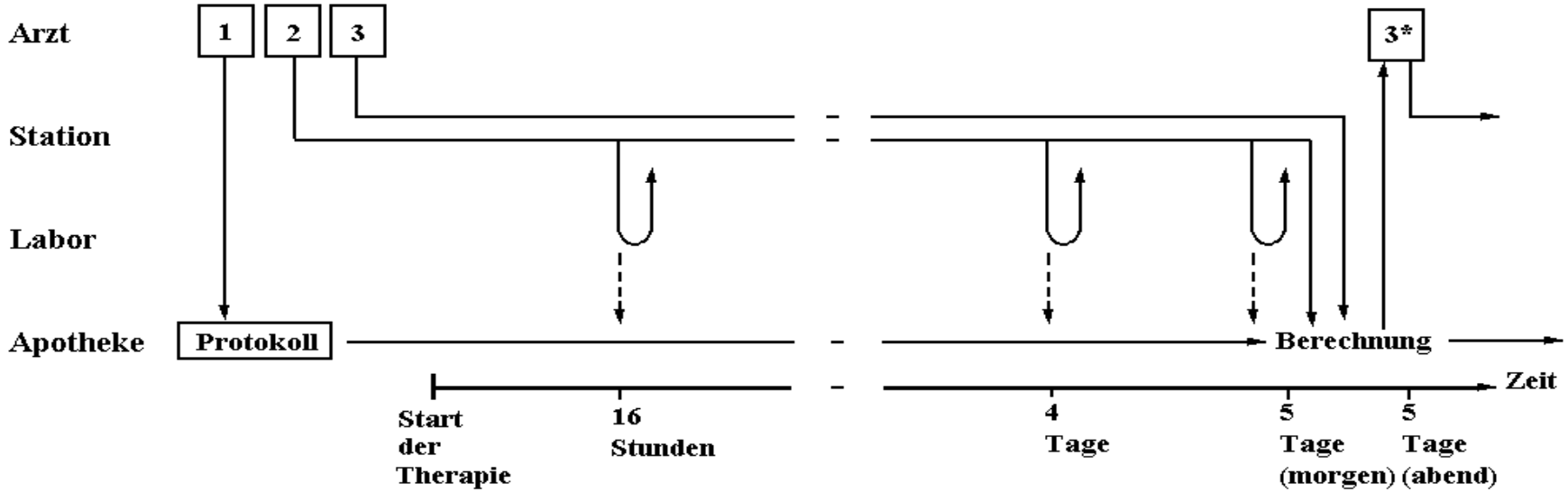


Abbildung 17

Informationsblatt für die Apotheke (Blatt 1)
(ist identisch mit dem Serumspiegelblatt ; Blatt 2)

Name, Vorname : Muster, Peter
IPS Nr. : 122

Datum Behandlungsbeginn : 10.9.1993 Visum : em
Startzeit der Infusion : 15.00 Uhr
Gewicht des Patienten : 80 kg
Initialdosis (mL Epanutin) : 26 mL

Messung 1 VOR Dosis > 11.10.1993 7.00 Uhr

Zeit der Blutentnahme ..... Uhr Visum : .....
Datum : ....
Zeit und Datum auf Röhrchen und Karte vermerkt
Spiegel ab Labor > ..... mg/L

Erhaltungsdosis (mL Epanutin) : ..... > 4.4 mL

Bemerkungen : .....
.....

Messung 2 VOR Dosis > 13.10.1993 7.00 Uhr

Zeit der Blutentnahme ..... Uhr Visum : .....
Datum : ....
Zeit und Datum auf Röhrchen und Karte vermerkt
Spiegel ab Labor > ..... mg/L

Bemerkungen : .....
.....

Messung 3 VOR Dosis > 14.10.1993 7.00 Uhr

Zeit der Blutentnahme ..... Uhr Visum : .....
Datum : ....
Zeit und Datum auf Röhrchen und Karte vermerkt
Spiegel ab Labor > ..... mg/L

Bemerkungen : .....
.....

Hatte der Patient während der ersten 5 Tage einen epileptischen Anfall ? Ja/Nein
Datum : ..... Zeit : ..... Visum : .....

Soll der Patient auf orale Therapie umgestellt werden ? Ja/ Nein Visum : .....

Auf welche Station wird/wurde der Patient verlegt ? ....

Abbildung 18

Standard-Verordnungsblatt für die schnelle, standardisierte i.v. Phenytoin-Aufsättigung

Name, Vorname : Muster Peter
Datum Behandlungsbeginn : 20.4.1994
Startzeit der Infusion : 15.00 Uhr
Gewicht des Patienten : 80 kg
Initialdosis (mL Epanutin) : 26 mL = 1300 mg

A) VERORDNUNG :

Initialdosis :		1)	20.4.	15.00	Uhr	26.0 mL	Volumed 125 mL pro h
Standarddosis :	*	1)	21.4.	7.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
		2)	21.4.	19.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
		3)	22.4.	7.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
		4)	22.4.	19.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
	*	5)	23.4.	7.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
		6)	23.4.	19.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
	*	7)	24.4.	7.00	Uhr	4.4 mL	Kurzinfusion
		8)	24.4.	19.00	Uhr	gemäss DOSIERUNG APOTHEKE	

*Spiegelbestimmung : 1. Bestimmung -----> 21.4. 7.00 Uhr
2. Bestimmung -----> 23.4. 7.00 Uhr
3. Bestimmung -----> 24.4. 7.00 Uhr

> weitere Bestimmungen 1x pro Woche (Mo/Do)

> Spiegelbestimmung jeweils VOR nächster Dosis
> Messungen unbedingt vor 11 Uhr ins Labor

B) INFORMATION :

1. Verabreichung :	Volumed PE02	25 mL/h : 8 Tr/min :	>	NaCl 0,9% 100 mL PP-Beutel über 4 Stunden
	Volumed PE02	63 mL/h : 21 Tr/min :	>	NaCl 0,9% 250 mL Glas über 4 Stunden
	Volumed PE02	125 mL/h : 42 Tr/min :	>	NaCl 0,9% 500 mL PP-Beutel über 4 Stunden
	Kurzinfusionen :		>	NaCl 0,9% 100 mL PP-Beutel über 15 Minuten

2. Nach jeder Phenytoin Kurzinfusion muss mit mindestens 20 mL NaCl 0,9% mit der gleichen Geschwindigkeit nachgespült werden
3. Phenytoin auf KEINEN Fall mit anderen Medikamenten mischen (AUCH NICHT KALIUM !!);
   Gefahr der Ausfällung. Falls andere Medikamente gleichzeitig verabreicht werden müssen, Epanutinzufuhr unterbrechen und mit NaCl 0.9% vor- und nachspülen. Bei Mehrlumenkatheter : Zufuhr über proximalen Schenkel allein laufen lassen, andere Medikamente dürfen parallel dazu über den anderen Schenkel laufen.
4. Patienten mit Sondenernährung müssen Epanutin i.v. erhalten

Abbildung 19

Apothekenprotokoll

a) allgemeine Patientendaten (Seite 1)

Allgemeines Ap. Nummer :

Name : ..... Station : .....
Vorname :..... verlegt auf Station : ..... Datum : .....
Gewicht : ..... verlegt auf Station : ..... Datum : .....

Umgestellt auf oral ab Datum : Zeit :
Indikation : .....
.....
.....
.....
Laborparameter (falls vorhanden) :

Datum				
Bilirubin (ges.)				
Serum Kreatinin				
Alkal.Phosphatase				
Serum GOT				
Serum GPT				
Serum Albumin				
Urämie (ja/nein)				

grössere Blutverluste
Datum : Grund :
Datum : Grund :

andere Medikamente
Datum : Medikamente : .....
.....
.....

Datum : Medikamente : .....
.....
.....

Therapieabbruch : Datum : Grund : .....

Bemerkungen : .....

---

b) Standardisierte Phase; Tag 1 bis 5 (Seite 2)

Therapiebeginn : Datum ..... Zeit : .....
Standardisierte-Phase

Typ (L/B/M)	Stunden nach Beginn	Dosis resp. Spiegel (je nach Eingabe mg oder mL)	Datum und Zeit
B	0		
L	16		
B	16		
B	28		
B	40		
B	52		
L*	64*		
B	64		
L**	76**		
B	76		
L*	88*		
B**	88**		
L**	100**		

* falls Therapiebeginn nach 8 Uhr morgens. Nicht Zutreffendes streichen
** falls Therapiebeginn vor 8 Uhr morgens. Nicht Zutreffendes streichen

B = i.v. Bolus (jeweils Startzeit der Infusion)
M = orale Erhaltungsdosis
L = Talspiegel

Empfohlene Dosis : ***..... mg i.v. pro Tag***
..... mL Epanutin/12 Stunden

..... mg oral pro Tag *Verteilung: ..... mg morgens*
..... mg abends

orale Dosis ja nein

Nächste Serumspiegelbestimmung : Datum :.....Zeit :.....

c) Individuelle Dosierung (Seite 3)
(siehe 5.1.6. Individuelle Dosisanpassung)

---

1. Kontrollmessung

Typ (L/B/M)	Stunden nach Beginn	Dosis resp. Spiegel (je nach Eingabe mg oder mL)	Dosierungs-intervall	Anzahl Dosen	Datum und Zeit
B *					
M **					
B ***					
L					

* zum Zeitpunkt des letzten Spiegels (vorherige Messung)
** zum Zeitpunkt der ersten Gabe der oralen Erhaltungsdosis
*** i.v. Einzel- oder Erhaltungsdosen (die i.v. Erhaltungsdosis als i.v. Bolus für jeden Zeitpunkt)

Nicht Zutreffendes streichen

Empfohlene Dosis : ***.....*** ***mg i.v. pro Tag***
..... ***mL Epanutin/12 Stunden***

..... ***mg oral pro Tag*** *Dosisverteilung:* *..... mg morgens*
..... mg abends

orale Dosis ja nein

Nächste Serumspiegelbestimmung : Datum :.....Zeit :.....

Dieses Protokoll konnte je nach Anzahl der Kontrollmessungen beliebig erweitert werden.

5.1.6. Individuelle Dosisanpassung

5.1.6.1. Individuelle Erhaltungsdosis und Serumspiegelmessungen

Aufgrund der während der schnellen Sättigung (Therapietag 1 bis 5) erhaltenen 3 Nicht-Steady-State-Serumspiegel (Serumspiegel 1, 2 und 3) wurde die individuelle Erhaltungsdosis (i.v. oder oral) zum Erreichen eines Ziel-Steady-State-Serumspiegels von 11 mg/L berechnet (siehe 5.1.6.2. Programm zur Dosisanpassung)

Die weiteren Serumspiegelmessungen erfolgten in zirka wöchentlichem Abstand, an den vom Labor für Phenytoin-Routinebestimmungen vorgesehenen Tagen (Montag und Donnerstag)

5.1.6.2. Programm zur Dosisanpassung und Spiegelvoraussage

Das Bayesian Forecasting-Programm zur Dosisindividualisierung von Phenytoin wurde von S. Vozeh entwickelt[145].

PC :	IBM PS/2 80386 Prozessor 640 KBite RAM DOS-Version 3.1
Programmiersprache :	Turbo Pascal 6.0 (Borland Inc.)
Speicherplatzbedarf für das Programm :	40 kBite
Dateneingabe :	Gewicht des Patienten. Dosis als i.v. Bolus oder als orale Erhaltungsdosis (orale Dosis wird berechnet als 24 Stunden Dauerinfusion) zum entsprechenden Zeitpunkt. Talspiegel zum entsprechenden Zeitpunkt.
berechnete Resultate :	Patientenparameter (Vd, v_{max}, K_m) ± 68% Vertrauensintervall.
zum	Empfohlene 12- und 24-Stunden-Erhaltungsdosis (oral oder i.v.) Erreichen des Ziel-Steady-State-Spiegels. Voraussage des Serumspiegels zum Zeitpunkt der nächsten Bestimmung (Steady-State- und Nicht-Steady-State).

Vorgaben und Populationsdaten für das Voraussageprogramm :

Ziel Steady-State Serumspiegel : 11 mg/L

v_{max} pro Tag :	32.42 mg $*$ (Körpergewicht)$^{0.6}$ 415 mg für einen 70 kg schweren Patienten	σ_{vmax} :	20%
K_m :	5.7 mg/L	σ_{Km} :	51%
Vd :	1 L/kg	σ_{Vd} :	23%

p.o. Bioverfügbarkeit : 85%

Restfehler in der Plasmakonzentrationsbestimmung : 15%

Zur Berechnung wurde ein Algorithmus verwendet, der das Bayes Theorem (Formel 11) mit einer numerischen Intergrationsmethode (Formel 7) verknüpfte.
(siehe 3.3.2.3. Voraussagemethoden einer Zielkonzentrationsstrategie unter Verwendug individueller Patientendaten)

Der Populationsdurchschnitt von v_{max} (maximale Abbaugeschwindigkeit pro Tag [mg/Tag]) wird an das Körpergewicht nach Formel 13 angepasst

$$\frac{v_{\max_{pop}}}{70} * (Körpergewicht)^{0.6} \quad \textbf{\textit{Formel 13}}$$

Formel 13

Zur Berechnung der erforderlichen Dosis für den Ziel-Steady-State-Serumspiegel von 11 mg/L wurde Formel 4 (siehe Seite 34) verwendet.

5.1.6.3. Therapieverordnung

Aufgrund der Angaben der Station und des Labors (Blatt 2; Abbildung 17) wurde die Dosisempfehlung in der Apotheke berechnet, auf dem Kontrollblatt (Abbildung 20) vermerkt und an den Stationsarzt weitergeleitet. Mit ärztlichem Visum wurde die neue Verordnung durchgeführt.

Abbildung 20

Neuverordnungsblatt (Kontrollblatt)

Kontrollmessung Nr.: .....

Station	**Ap. Nr. .....**
Patientenname :	**Vorname : .....**

Alte Dosierung :

Dosis Epanutin in mL i.v. (12 Stunden)..... (=mg Phenytoin-Na)
Dosis in mg Epanutin p.o. morgens: ..... abends : .....

Letzter Serum-Phenytoinspiegel : ..... mg/L (=.....µmol/L)

Neue Dosierung :

ab Datum und Zeit :.....

Dosis Epanutin in mL i.v. (alle 12 Stunden) ..... (=mg Phenytoin-Na)

Dosis verdünnt in 100 mL NaCl 0,9% als Kurzinfusion über 15 Minuten. Anschliessend an die Epanutininfusion muss das Besteck unbedingt mit mindestens 20 mL NaCl 0,9% mit der gleichen Geschwindigkeit nachgespült werden.

(Falls von i.v. auf p.o. umgestellt wird : mg Phenytoin-Na (i.v.) * 1.15, Apotheke, 8-7698, informieren)

Dosis Epanutin in mg (p.o.) morgens : .....Kapseln à 100 mg
.....Kapseln à 50 mg

abends : .....Kapseln à 100 mg
.....Kapseln à 50 mg

Erwarteter Spiegel (mg/L) : .....(=.....µmol/L)

Nächste Serumspiegel-Bestimmung: .....
unmittelbar vor der Morgendosis
Meldung aller Probleme, Aenderungen, sowie der Verlegung des Patienten (andere Station oder Spital) an die Apotheke (8-7698; E. Martinelli) !

Visum Apotheker ..... Visum Arzt.....

5.1.7. Statistische Auswertung der Güte der Voraussage

Diese erfolgte nach Sheiner et al.[146] mit dem

Prediction error (PE) :

$$\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(berechnet_i - gemessen_i) \qquad \textbf{\textit{Formel 14}}$$

Formel 14

und dem root mean squared errors (rmse) :

$$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} PE_i^2}{n}} \qquad \textbf{\textit{Formel 15}}$$

Formel 15

5.2. analytische Bestimmungsmethoden (HPLC, EMIT)

5.2.1. Geräte, Chemikalien, biologisches Material

HPLC und Säulen

HPLC	LC 1090, Hewlett Packard, Schweiz
Detektor	Diode-Array
Integrator	Integrator 3396A Hewlett Packard, Schweiz
Probendosierung	20 resp. 100 µL Loop
Probenfilter	0.45 µm derivatisierte Cellulose, Hewlett Packard, Schweiz

Säulen :

Spherisorb ODS -2 Korngrösse : 5µm Dimensionen : 250 mm x 4,6 mm	Merck AG, Basel
Superspher RP-18 endcapped Korngrösse : 4µm Dimensionen : 50 mm x 4 mm	Stagroma AG, Wallisellen

EMIT

Analysegerät :	aca® II mit Computer, Du Pont de Nemours
Testpack :	Syva, USA
Methode :	homogener EMIT
Messwellenlänge :	340 nm
Messzeit :	17.07 Sekunden
Kalibrierung :	mitgeliefertes chargenspezifisches Kalibrierungskit
Messbereich :	2.5 bis 30 mg/L

Übrige Geräte

Zentrifuge 5415 C	Eppendorff, Deutschland
Vortex Genie 2™ Rodel G-560 E	Bender und Hobein AG, Zürich
Trockenschrank Horro	A. Hoffmann, Deutschland
Analysenwaage AT 460	Mettler (Schweiz) AG, Nänikon-Uster
Autoklav	Getinge, Schweden
pH-Meter	Methrohm, Schweiz
einstellbare Pipetten 0-100 µL	Eppendorff, Deutschland
einstellbare Pipetten 100 - 1000 µL	Eppendorff, Deutschland
Reaktionsgefässe 1.5 mL Kunststoff	Eppendorff, Deutschland

Chemikalien

β-Cyclodextrin	Fluka Chemie, Buchs
β-Glucuronidase Typ VIIa	Serva-Chemie, Buchs
Acetonitril LiChrosolv®	Merck AG, Basel
Acetonitril zur Analyse	Merck AG, Basel
Acidum Citricum, Ph.Helv.VII	Merck AG, Basel
Aqua ad injectabilia Ph.Helv. VII	Kantonsspital Aarau
Hexobarbitalum Ph-Helv.VII	Siegfried, Zofingen
Methanol LiChrosolv®	Merck AG, Basel
Natriumhydroxid 0.1 N zur Analyse	Merck AG, Basel
Natriummonohydrogenphosphat, zur Analyse	Merck AG, Basel
ortho-Phosphorsäure 85% zur Analyse	Merck AG, Basel
Phenytoin-Na Ph.Helv.VII	Merck AG, Basel
Phenobarbital Ph.Helv. VII	Siegfried, Zofingen
R-/S-p-Hydroxyphenyl-phenylhydantoin	Sigma, Buchs
Tetramethylammoniumchlorid zur Analyse (TMACl)	Merck AG, Basel

biologisches Material

Urin	von unbehandelten Probanden
Plasma zur Fraktionierung	Blutspendezentrum SRK, Kantonsspital Aarau

5.2.2. Bestimmung von Phenyotin und p-HPPH in Serum und Urin

5.2.2.1. Eichlösungen

Herstellung

Die Eichsubstanzen (gemäss Tabelle 11) wurden zu 50.0 mL mit 0.1 N Natriumhydroxid-Lösung gelöst.

Von dieser Lösung wurde wiederum 0.50 mL entnommen und zu 25.0 mL mit dem entsprechenden Medium (Wasser, Serum, Plasma) verdünnt (= Stammlösungen).

Aus der jeweiligen Stammlösung wurde die gewünschten Anzahl Milliliter entnommen, auf 10.0 mL mit dem entsprechenden Medium verdünnt und davon jeweils 0.50 mL aufbereitet. Wasser- und Urinproben wurden mit 0.50 mL Internem Standard (Endkonzentration in der Probe 0.015 mM Hexobarbital) versetzt und auf dem Vortex-Rührer während einer Minute gemischt.

Im Serum wurde anstelle des reinen Acetonitrils ebenfalls 0.50 mL Interner Standard zugegeben.

Interner Standard : Hexobarbital 0.03 mM

14.56 mg gelöst in 500 mL Acetonitril

Stammlösungen

Tabelle 11

Zusammensetung der Stammlösungen; Einwaagen, Messmedium und Konzentration

Substanz	Einwaage [g]	Medium	Stammlösung	Konzentration [µM]	Konzentration [mg/L]
Phenytoin-Säure	0.26087	Wasser	**A**	413.59	104.35
p-HPPH	0.11897	Wasser	**A**	176.72	47.59
Phenytoin-Säure	0.27241	Wasser	**B**	431.87	108.96
p-HPPH	0.29610	Wasser	**B**	441.45	118.44
Phenytoin-Säure	0.26087	Serum	**C**	413.59	104.35
p-HPPH	0.11897	Serum	**C**	177.38	47.59
Phenytoin-Säure	0.27241	Serum	**D**	431.87	108.96
p-HPPH	0.29610	Serum	**D**	441.45	118.44
Phenytoin-Säure	0.26087	Urin	**E**	413.59	104.35
p-HPPH	0.11897	Urin	**E**	177.38	47.59
Phenytoin-Säure	0.27241	Urin	**F**	431.87	108.96
p-HPPH	0.29610	Urin	**F**	441.45	118.44
p-HPPH	0.11897	Laufmittel I [1)]	**G**	177.38	47.59
p-HPPH	0.29610	Laufmittel I [1)]	**H**	441.45	118.44
Phenytoin-Säure	0.26087	Serum	**I**	413.59	104.35
Phenytoin-Säure	0.27241	Serum	**J**	431.87	108.96
p-HPPH	0.11897	Serum	**K**	177.38	47.59
p-HPPH	0.29610	Serum	**L**	441.45	118.44
Phenobarbital	0.27830	Serum	**M**	481.49	111.32
Phenobarbital	0.27090	Serum	**N**	468.69	108.36

[1)] entspricht dem Laufmittel zur Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH mittels HPLC (siehe 5.2.2.3.)

5.2.2.2. Probenvorbereitung

Verwendete Lösungen :

β-Glucuronidase-Lösung 20'000 IE/mL

100'000 Einheiten des Enzyms wurden in 5 mL Wasser gelöst und in Portionen zu 200 µL in Reaktionsgefässen im Tiefkühlschrank aufbewahrt (-20°C; 1 bis 100 Tage).

Phosphat-Puffer pH 6,8 R nach Ph.Helv.VII[147]

Literansätze wurden nach der Vorschrift der Ph.Helv.VII hergestellt. Die Lösung wurde über ein Membranfilter 0,2µm (Gelman) filtriert, in eine mit heissem, destilliertem Wasser gespülte Infusionsflasche (DIN I, schwer) abgefüllt und anschliessend bei 120°C während 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert.

5.2.2.2.1. Aufbereitung der Serumproben

EMIT Bestimmung

Die EMIT-Phenytoin-Bestimmung konnte direkt aus dem Serum erfolgen. Die Proben wurden ohne Stabilisator-Zusatz entweder sofort oder nach Lagerung im Tiefkühler (-20° C; 1 bis 3 Tage) bestimmt. Zur Überprüfung der Methode, sowie zur Bestimmung einer allfälligen Cross-Reactivity mit strukturverwandten Substanzen wurden Urin- und Serumproben mit den verschiedenen Substanzen versetzt. Diese Proben wurden bis zu ihrer Bestimmung im Tiefkühler gelagert (-20°C; 1 bis 10 Tage).

HPLC-Bestimmung

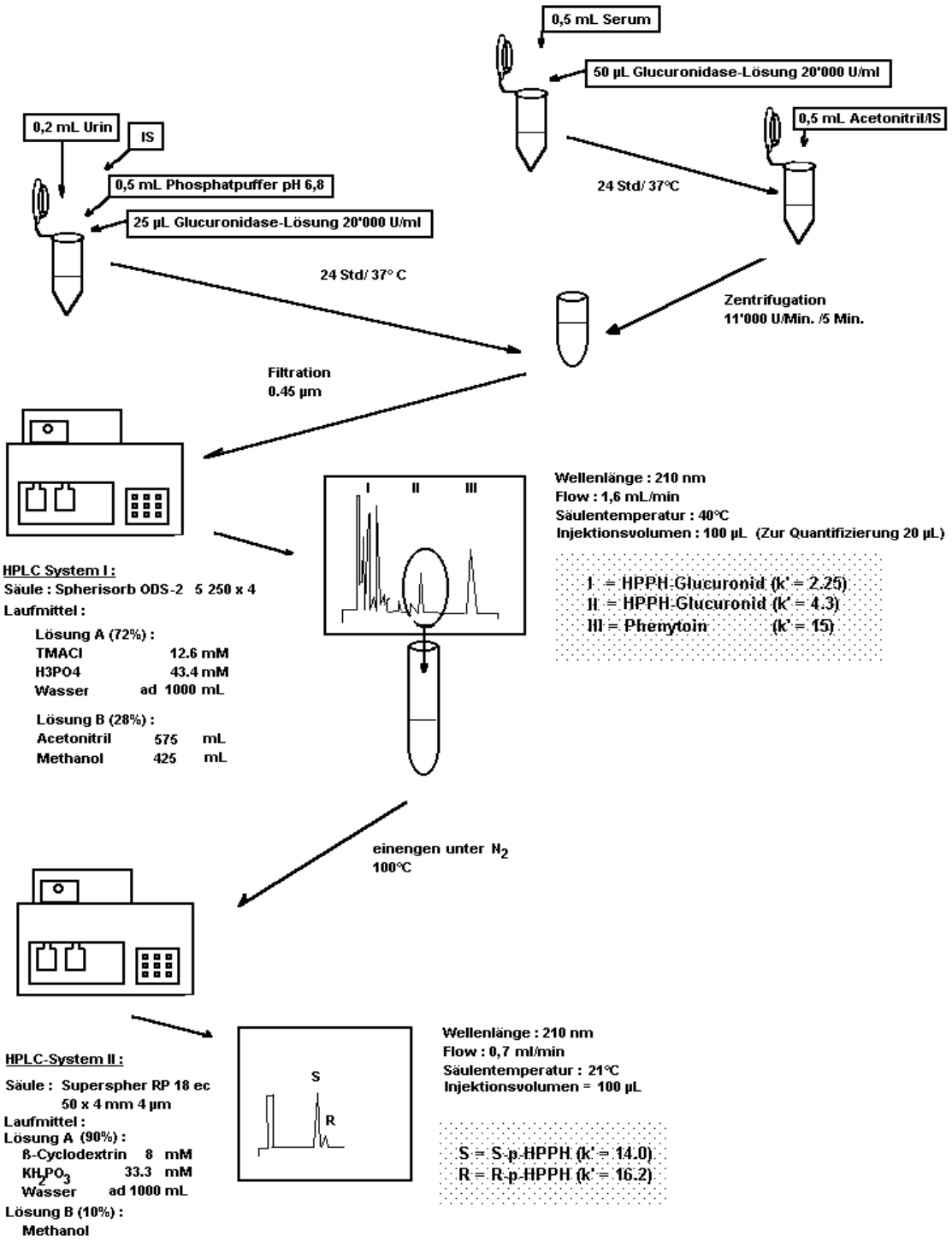
Für die HPLC-Bestimmung wurden Aliquots von Serumproben verwendet, die für das Phenytoin-TDM entnommen wurden (siehe 5.1.4. Blutentnahme und Serumspiegelmessungen). Diese Proben wurden ohne Stabilisator-Zusatz im Tiefkühler bis zu ihrer weiteren Verwendung aufbewahrt (2 Tage bis 1 Jahr). 0.50 mL Serum wurden mit 25 µL β-Glucuronidase-Lösung (20'000 U/mL) auf dem Vortexrührer während 2 Minuten gemischt (Eppendorff Reaktionsgefäss) und 24 Stunden bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Anschliessend wurde der Lösung 0.50 mL Acetonitril mit internem Standard zugegeben und während 5 Minuten bei 11'000 U/min zentrifugiert. Der Ueberstand wurde durch ein Membranfilter 0.45µm (Hewlett Packard) filtriert und am HPLC gemessen. In gleicher Weise wurden die Serum-Eichlösungen behandelt.

5.2.2.2.2. Aufbereitung der Urinproben

Urinproben von zirka 10 mL wurden in Einzelfällen parallel zu Serumspiegelbestimmungen abgenommen (ohne Urinbilanzierung). Die Proben wurden ohne Zusatz im Tiefkühler gelagert (- 20° C; 1 Tag bis 6 Monate). 0.20 mL Urin wurde mit 25 µL β-Glucuronidase-Lösung (20'000 U/mL), sowie 0.50 mL Phosphatpuffer pH 6.8 auf dem Vortexrührer während 2 Minuten gemischt (Eppendorff Reaktionsgefäss) und während 24 Stunden bei 37°C im Trockenschrank inkubiert. Die Probe wurde durch ein Membranfilter 0.45µm (Hewlett Packard) filtriert und am HPLC gemessen. In gleicher Weise wurden die Urin-Eichlösungen aufbereitet.

Abbildung 21

HPLC-Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH sowie des Quotienten von R- : S- p-HPPH in Serum und Urin



5.2.2.3. Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin, Isolierung von p-HPPH (HPLC-System I)

Säule :	Spherisorb®	ODS-2
Korngrösse :	5	µm
Länge :	250	mm
Innendurchmesser :	4	mm
Detektionswellenlänge :	210	nm (Dioden-Array)
Flussgeschwindigkeit :	1.6	mL/min
Säulentemperatur :	40	°C
Injektionsvolumen :		
zur Quantifizierung	20	µL
zur Isolierung von p-HPPH (semipräparative HPLC)	100	µL

Laufmittel (isokratisch):

Lösung A (72%) :

TMACl-Phosphorsäure-Puffer

Der Puffer wurde im Sterillabor der Spitalapotheke in einem 40 Liter Ansatz hergestellt. Die Lösung wurde über ein Membranfilter 0,2µm (Gelman) filtriert, in mit heissem, destilliertem Wasser gespülte 1 Liter Infusionsflaschen (DIN I, schwer) abgefüllt und anschliessend bei 120°C während 20 Minuten im Autoklaven sterilisiert.

Zusammensetzung :

Tetra-Methyl-Ammoniumchlorid (TMACl)	12.6	mM (1.38 g/L)
ortho-Phosphorsäure 85%	43.4	mM (5.0 g/L)
Aqua ad injectabilia	ad 1000	mL

Lösung B (28%) :

Acetonitril LiChrosolv®	575	mL
Methanol LiChrosolv®	425	mL

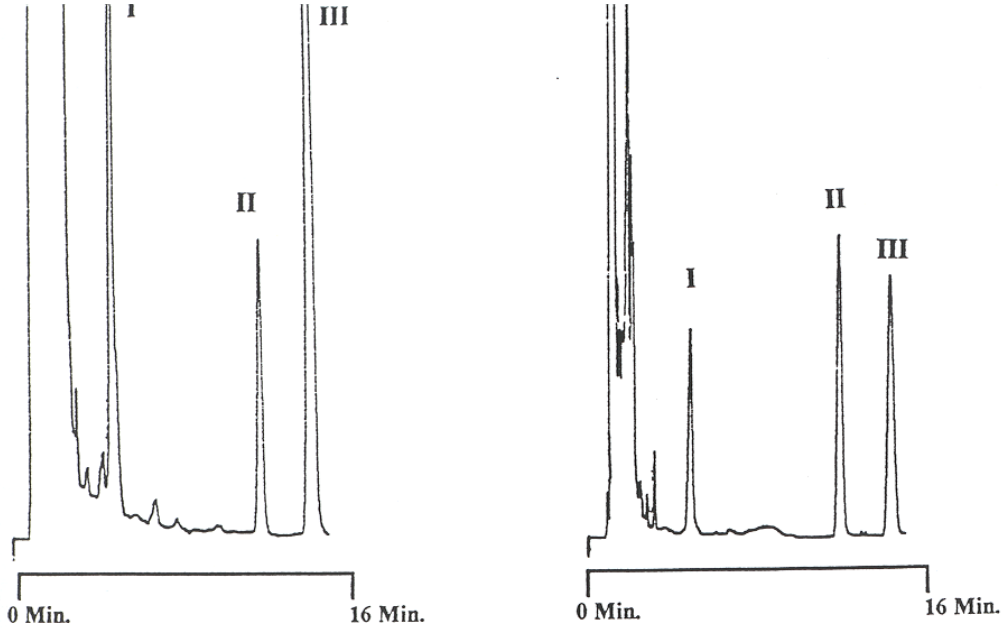
Es wurde jeweils die Fläche unter der Kurve (AUC) bestimmt.

In Abbildung 22 a und b sind typische Chromatogramme des HPLC-Systems 1 dargestellt.

Abbildung 22

Quantitative Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH mittels HPLC

a) Chromatogramm Urin **b) Chromatogramm Serum**

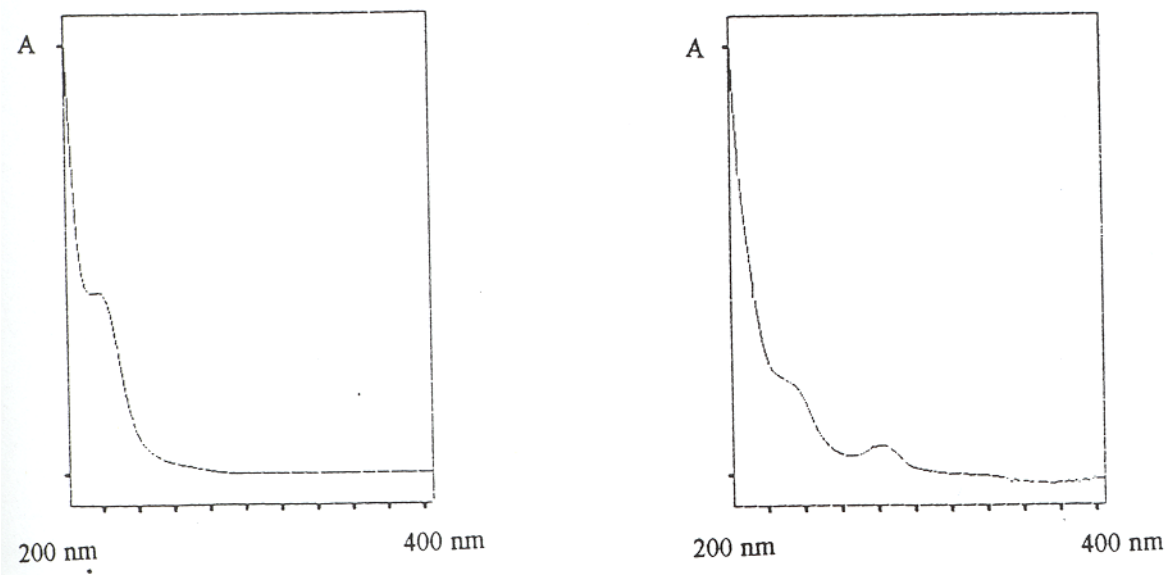


I : p-HPPH k' = 3.5, **II** : Hexobarbital (IS) k' = 9.6, **III** Phenytoin k' = 11.8

Abbildung 23

a) UV-Spektrum von Phenytoin **b) UV-Spektrum von p-HPPH**

gemessen mit Diode-Array gemessen mit Diode-Array



beide Spektren haben keine spezifischen Maxima (p-HPPH hat bei 285 nm ein relatives Maximum)

Linearität und Wiederfindungsrate der HPLC-Bestimmung

Phenytoin in Wasser

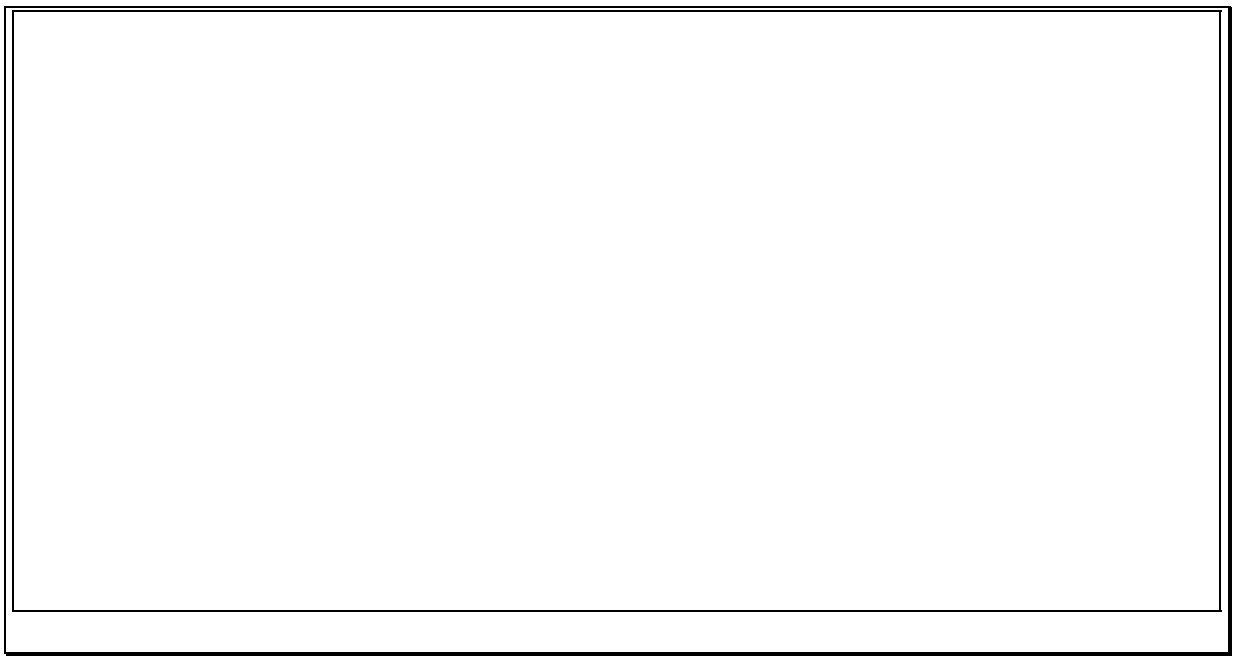
Tabelle 12

HPLC-Eichgerade für Phenytoin-Säure in Wasser
(fett : Therapeutischer Bereich; IS : Hexobarbital 15µM)

mL (Stammlösung nach Tabelle 11)	Konzentration [mg/L]	Konzentration [µM]	Mittelwert des Verhältnisses der AUC von Phenytoin : IS	Variations-koeffizient [%]	95% Vertauens-intervall [mg/L]
0.2 (B)	2.179	8.64	0.1531	9.24	1.95-2.41
0.5 (A)	5.217	20.68	0.3499	7.02	4.80-5.63
0.5 (B)	5.448	21.59	0.3771	8.23	4.94-5.96
1.0 (A)	**10.435**	**41.36**	**0.7329**	**0.62**	**10.36-10.51**
1.0 (B)	**10.896**	**43.19**	**0.8653**	**1.55**	**10.70-11.09**
1.5 (A)	**15.652**	**62.04**	**1.1256**	**0.32**	**15.60-15.71**
1.5 (B)	**16.345**	**64.78**	**1.2693**	**3.96**	**15.61-17.08**
2.0 (A)	20.870	82.72	1.4489	1.38	20.54-21.20
2.0 (B)	21.793	86.38	1.6728	1.88	21.33-22.26
3.0 (A)	31.305	124.08	2.1004	1.97	30.61-32.00
3.0 (B)	32.689	129.56	2.5222	0.35	32.56-32.82
6.0 (A)	62.610	248.16	4.4210	2.88	60.57-64-65

Abbildung 24

HPLC Eichgerade von Phenytoin-Säure im Wasser



Phenytoin im Serum

Tabelle 13

HPLC-Eichgerade für Phenytoin-Säure im Serum
(fett : Therapeutischer Bereich; IS : Hexobarbital 15µM)

mL (Stammlösung nach Tabelle 11)	Konzentration [mg/L]	Konzentration [µM]	Mittelwert des Verhältnisses der AUC von Phenytoin : IS	Variations-koeffizient [%]	95% Vertauens-intervall [mg/L]
0.1 (D)	1.090	4.32	0.206	14.69	0.91-1.27
0.2 (C)	2.087	8.27	0.179	10.52	1.84-2.34
0.5 (C)	5.217	20.68	0.431	2.52	5.07-5.37
0.5 (D)	5.448	21.59	0.453	6.77	5.03-5.87
1.0 (C)	**10.435**	**41.36**	**0.779**	**1.33**	**10.28-10.59**
1.0 (D)	**10.896**	**43.19**	**0.825**	**1.87**	**10.67-11.13**
1.5 (C)	**15.652**	**62.04**	**1.112**	**1.79**	**15.33-15.97**
1.5 (D)	**16.345**	**64.78**	**1.196**	**0.58**	**16.24-16.45**
2.0 (C)	20.870	82.72	1.429	1.78	20.45-21.29
2.0 (D)	21.793	86.38	1.498	0.61	21.64-21.94
2.5 (C)	26.088	103.40	1.858	0.92	25.82-26.36
3.0 (C)	31.305	124.08	2.243	0.64	31.08-31.53
3.0 (D)	32.689	129.56	2.414	1.01	32.32-33.06
6.0 (C)	62.610	248.16	4.437	0.70	62.11-63.11

Regressionsgerade (n = 14 Proben)

$y = ax + b$:

$a = 0.070$
$b = 0.054$

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.998

Tabelle 14

Wiederfindungsrate von Phenytoin im Serum mit HPLC
(IS : Hexobarbital 15µM)

Verhältnis AUC Phenytoin : IS gemessen im Serum	mg/L		Unterschied in %
	Gehalt berechnet[1)]	Tatsächliche Einwaage	berechnet[1)] = 100%
0.206	1.090	2.497	+ 129.2
0.179	2.087	2.126	+ 1.9
0.431	5.217	5.679	+ 8.9
0.453	5.448	5.986	+ 9.9
0.779	10.435	10.581	+ 1.4
0.825	10.896	11.232	+ 3.1
1.112	15.652	15.280	- 2.4
1.196	16.345	16.459	+ 0.7
1.429	20.870	19.748	- 5.4
1.498	21.793	20.730	- 4.9
1.858	26.088	25.798	- 1.1
2.243	31.305	31.235	- 0.2
2.414	32.689	33.635	+ 2.9
4.437	62.610	62.165	- 0.3

[1)]Berechnung mit der Regressionsgleichung der Eichkurve Phenytoin in Wasser (siehe Abbildung 24)

Die Wiederfindungsrate der Bestimmungsmethode von Phenytoin im Serum betrug 110.2 ± 34.5% (n= 14)

Der erste Datenpunkt liegt noch knapp innerhalb von 4 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt, und darf deshalb nicht als Ausreisser bezeichnet werden (4-Sigma Bereich[148]).

Phenytoin im Urin

Tabelle 15

HPLC-Eichgerade für Phenytoin-Säure im Urin
(IS : Hexobarbital 15µM)

mL Stammlösung (nach Tabelle 11)	Konzentration [mg/L]	Konzentration [µM]	Mittelwert des Verhältnisses der AUC von Phenytoin : IS	Variations-koeffizient [%]	95% Vertauens-intervall [mg/L]
0.1 mL (E)	1.09	4.32	0.119	10.992	0.95-1.23
0.2 mL (F)	2.09	8.27	0.179	9.629	1.86-2.32
0.2 mL (E)	2.18	8.64	0.176	13.508	1.85-2.51
0.5 mL (F)	5.22	20.68	0.388	1.935	5.11-5.33
0.5 mL (F)	5.45	21.59	0.394	0.564	5.42-5.48
1.0 mL (E)	10.44	41.36	0.785	0.664	10.36-10.52
1.0 mL (F)	10.90	43.19	0.782	1.866	10.67-11.13
1.5 mL (E)	15.65	62.04	1.179	3.074	15.11-16.19
1.5 mL (F)	16.35	64.78	1.115	1.596	16.05-16.65
2.0 mL (E)	20.87	82.72	1.563	2.378	20.31-21.43
2.0 mL (F)	21.79	86.38	1.581	0.444	21.68-21.90
2.5 mL (E)	26.09	103.40	1.967	1.538	25.64-26.54
3.0 mL (F)	32.69	129.56	2.346	0.398	32.54-32.84
6.0 mL (E)	62.61	248.16	3.981	0.697	62.12-63.10

Regressionsgerade (n = 14 Proben)

$y = ax + b$:

$a = 0.065$
$b = 0.100$

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.992

Wiederfindungsrate

Tabelle 16

Wiederfindungsrate von Phenytoin im Urin mit HPLC
(IS : Hexobarbital 15µM)

Verhältnis AUC Phenytoin : IS gemessen im Urin	mg/L		Unterschied in %
	Gehalt berechnet[1)]	Tatsächliche Einwaage	berechnet[1)] = 100%)
0.119	1.28	1.09	+ 17.0
0.179	2.04	2.09	- 2.8
0.176	2.08	2.18	- 4.3
0.388	5.07	5.22	- 2.2
0.394	5.15	5.45	- 5.5
0.785	10.67	10.44	+ 2.2
0.782	10.62	10.90	- 2.5
1.179	16.22	15.65	+ 3.6
1.115	15.32	16.35	- 6.3
1.563	21.63	20.87	+ 3.7
1.581	21.90	21.79	+ 0.5
1.967	27.33	26.09	+ 4.8
2.346	32.68	32.69	- 0.0
3.981	55.74	62.61	- 10.0

[1)]Berechnung mit der Regressionsgleichung der Eichkurve Phenytoin in Wasser (siehe Abbildung 24)

Die Wiederfindungsrate der Bestimmungsmethode von Phenytoin im Urin betrug 99.8 ± 6.6 % (n = 14)

p-HPPH im Wasser

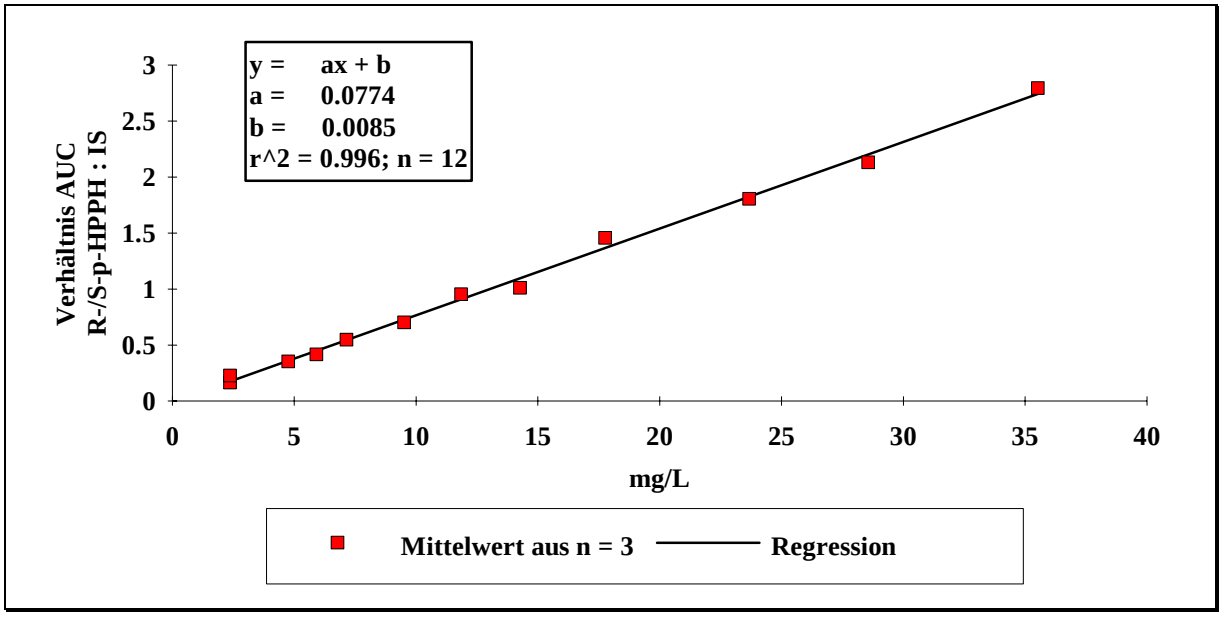
Tabelle 17

HPLC Eichgerade für p-HPPH in Wasser
(IS : Hexobarbital 15µM)

mL (Stammlösung nach Tabelle 11)	Konzentration [mg/L]	Konzentration [µM]	Mittelwert des Verhältnisses der AUC von Phenytoin : IS	Variations - koeffizient [%]	95% Vertauens-intervall [mg/L]
0.2 (B)	2.369	8.83	0.1662	4.88	2.24-2.50
0.5 (A)	2.379	8.87	0.2291	19.99	1.84-2.92
1.0 (A)	4.759	17.74	0.3540	6.49	4.41-5.11
0.5 (B)	5.922	22.07	0.4192	1.83	5.80-6.04
1.5 (A)	7.138	26.60	0.5481	1.85	6.99-7.29
2.0 (A)	9.518	35.48	0.7035	2.06	9.30-9.74
1.0 (B)	11.844	44.14	0.9527	1.35	11.66-12.02
3.0 (B)	14.276	53.21	1.0113	1.82	13.98-14.57
1.5 (A)	17.766	66.22	1.4574	0.20	17.73-17.81
2.0 (B)	23.688	88.29	1.8066	1.19	23.37-24.01
6.0 (A)	28.553	106.42	2.1322	2.19	27.85-29.26
3.0 (B)	35.532	132.43	2.7935	0.28	35.42-35.64

Abbildung 25

HPLC-Eichgerade von p-HPPH in Wasser



p-HPPH im Serum

Tabelle 18

HPLC Eichgerade für p-HPPH im Serum
(IS : Hexobarbital 15µM)

mL Stammlösung (nach Tabelle 11)	Konzentration [mg/L]	Konzentration [µM]	Mittelwert des Verhältnisses der AUC von Phenytoin : IS	Variations-koeffizient [%]	95% Vertauens-intervall [mg/L]
0.2 (C)	0.952	3.55	0.139	28.908	0.64-1.26
0.1 (D)	1.184	4.41	0.205	1.683	1.16-1.21
0.5 (C)	2.379	8.87	0.239	7.166	2.19-2.57
1.0 (C)	4.759	17.74	0.435	10.277	4.21-5.31
0.5 (D)	5.922	22.07	0.512	0.602	5.88-5.96
1.5 (C)	7.138	26.60	0.568	3.545	6.85-7.42
2.0 (C)	9.518	35.48	0.726	2.013	9.30-9.73
1.0 (D)	11.844	44.14	0.934	2.418	11.52-12.17
2.5 (C)	11.897	44.34	0.900	2.111	11.61-12.18
3.0 (C)	14.276	53.21	1.220	2.529	13.87-14.68
1.5 (D)	17.766	66.22	1.363	0.966	17.57-17.96
2.0 (D)	23.688	88.29	1.688	1.763	23.22-24.16
6.0 (C)	28.553	106.42	2.208	2.218	27.84-29.27
3.0 (D)	35.532	132.43	2.508	0.856	35.19-35.88

Regressionsgerade (n = 14 Proben)

$y = ax + b$:
$a = 0.070$
$b = 0.097$

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.994

Wiederfindungsrate

Tabelle 19

Wiederfindungsrate von p-HPPH im Serum mit HPLC
(IS : Hexobarbital 15µM)

Verhältnis AUC p-HPPH : IS gemessen im Serum	mg/L		Unterschied in %
	Gehalt berechnet[1)]	Tatsächliche Einwaage	berechnet[1)] = 100%)
0.139	1.904	0.952	+ 100.2
0.205	2.762	1.184	+ 133.3
0.239	3.203	2.379	+ 34.6
0.435	5.727	4.759	+ 20.4
0.512	6.721	5.922	+ 13.5
0.568	7.441	7.138	+ 4.3
0.726	9.482	9.518	- 0.4
0.934	12.172	11.844	+ 2.8
0.900	11.740	11.897	- 1.3
1.220	15.867	14.276	+ 11.1
1.363	17.722	17.766	- 0.3
1.688	21.917	23.688	- 7.5
2.208	28.629	28.553	+ 0.3
2.508	32.516	35.532	- 8.5

[1)] Berechnung mit der Regressionsgleichung der Eichkurve p-HPPH in Wasser
(siehe Abbildung 25)

Die Wiederfindungsrate der Bestimmungsmethode von Gesamt p-HPPH im Serum betrug 121.6 ± 42.3 % (n = 14)

Keiner der Datenpunkte liegt ausserhalb von 4 Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt, deshalb kann keiner der Punkte als Ausreisser bezeichnet werden.
(4-Sigma Bereich[148]).

p-HPPH im Urin

Tabelle 20

HPLC Eichgerade für p-HPPH im Urin
(IS : Hexobarbital 15µM)

mL Stammlösung (nach Tabelle 11)	Konzentration [mg/L]	Konzentration [µM]	Mittelwert des Verhältnisses der AUC von Phenytoin : IS	Variations-koeffizient [%]	95% Vertauens-intervall [mg/L]
0.1 mL (F)	1.04	3.9	0.087	22.55	0.77-1.31
0.2 mL (F)	2.09	7.8	0.077	7.56	1.91-2.27
0.5 mL (E)	2.38	8.9	0.171	16.67	1.93-2.83
1.0 mL (E)	4.76	17.7	0.342	23.21	3.51-6.01
0.5 mL (F)	5.22	19.4	0.389	6.89	4.81-5.63
1.5 mL (E)	7.14	26.6	0.635	1.34	7.03-7.25
2.0 mL (E)	9.52	35.5	0.724	24.44	6.89-12.15
1.0 mL (F)	10.44	38.9	0.833	1.35	10.28-10.60
2.5 mL (E)	11.90	44.3	0.922	23.81	8.69-15.11
1.5 mL (F)	15.65	58.3	1.189	4.31	15.89-16.41
2.0 mL (F)	20.87	77.8	1.710	0.68	20.71-21.03
6.0 mL (E)	28.55	106.4	2.489	0.90	28.26-28.84
3.0 mL (F)	31.31	116.6	2.580	0.93	30.98-31.64

Regressionsgerade (n = 13 Proben)

$y = ax + b$:
$a = 0.085$
$b = 0.996$

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.996

Wiederfindungsrate

Tabelle 21

Wiederfindungsrate von p-HPPH im Urin mit HPLC
(IS : Hexobarbital 15µM)

Verhältnis AUC p-HPPH : IS gemessen im Urin	mg/L		Unterschied in %
	Gehalt berechnet[1)]	Tatsächliche Einwaage	berechnet[1)] = 100%
0.087	1.24	1.04	+ 18.8
0.077	1.10	2.09	- 47.6
0.171	2.32	2.38	- 2.5
0.342	4.53	4.76	- 4.9
0.389	5.13	5.22	- 1.7
0.635	8.31	7.14	+ 16.5
0.724	9.46	9.52	- 0.5
0.833	10.87	10.44	+ 4.2
0.922	12.03	11.90	+ 1.1
1.189	15.47	15.65	- 1.1
1.710	22.21	20.87	+ 6.4
2.489	32.26	28.55	+ 13.0
2.580	33.44	31.31	+ 6.8

[1)] Berechnung mit der Regressionsgleichung der Eichkurve R-/S- p-HPPH in Wasser (siehe Abbildung 25)

Die Wiederfindungsrate der Bestimmungsmethode von p-HPPH im Urin betrug 100.7 ± 16.2% (n = 13)

5.2.2.4. Trennung und Quantifizierung der Enantiomere von p-HPPH (HPLC-System 2) mittels β-Cyclodectrin-HPLC

Probengewinnung

Das im HPLC-System 1 zwischen der Laufzeit von ca. 5 bis ca. 6.5 Minuten gewonnene Eluat wurde in ein Reagenzglas abgeleitet (ca. 2.5 mL) (siehe 5.2.2.3.), wurde unter Stickstoffbegasung im siedenden Wasserbad auf ein Volumen von 1 mL konzentriert und mit dem HPLC-System 2 quantifiziert (siehe Abbildung 21)

HPLC-System 2

Säule :	Supersher®	RP 18 ec
Korngrösse :	4	µm
Länge :	50	mm
Innendurchmesser :	4	mm
Messwellenlänge :	210	nm
Flussgeschwindigkeit :	0.7	mL/min
Säulentemperatur :	21	°C (Wasserkühlung)
Injektionsvolumen :	100	µL

Laufmittel (isokratisch)

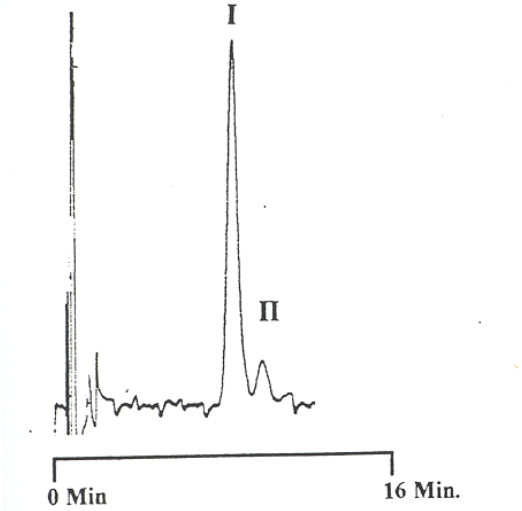
Lösung A (90%) :

β-Cycoldextrin	8.0	mM
Natriumdihydrogenphosphat	33.3	mM
Aqua ad injectabilia	ad 1000	mL

Lösung B (10%) :
Methanol LiChrosolv®

Abbildung 26

HPLC-Chromatogramm Patientenurin : Auftrennung der Enantiomere von p-HPPH



I : S p-HPPH : k' = 14; **II** : R p-HPPH : k' = 16

Eichgeraden für das Enantiomerenpaar R- und S-p-HPPH im Urin

Die Bestimmung der Eichgeraden wurde nur mit dem HPLC-System 2 durchgeführt.

Tabelle 22

HPLC-Eichgerade des Enantiomerenpaares R- und S-pHPPH im Urin

mL (Stammlösung nach Tabelle 11) (Racemat)	theoretische Menge des R- resp.S-Isomers [mg/L]	AUC-Mittelwert R-p-HPPH [counts]	Variations-koeffizient [%]	95% Vertrauens-intervall [mg/L]	AUC-Mittelwert S-p-HPPH [counts]	Variations-koeffizient [%]	95% Vertrauens-intervall [mg/L]
0.02 (G)	0.095	201289	23.0	0.07-0.12	299453	13.0	0.08-0.11
0.1 (H)	0.476	794218	4.6	0.45-0.50	952116	10.6	0.42-0.53
0.1 (H)	1.184	970177	18.0	0.94-1.43	1060624	19.7	0.92-1.45
0.5 (G)	2.379	2038555	3.4	2.29-2.47	2274781	4.2	2.27-2.49
1.0 (H)	4.759	4569440	2.9	4.60-4.92	4896827	4.7	4.51-5.01
0.5 (G)	5.922	4878184	1.1	5.85-6.00	5039158	1.1	5.85-6.00
1.0 (H)	11.884	8987918	0.4	11.83-11.94	9065886	0.6	11.80-11.96
3.0 (H)	14.276	11558690	0.3	14.23-14.32	11905317	0.6	14.18-14.37
5.0 (H)	23.794	19002314	1.3	23.44-24.14	19346784	1.6	23.36-24.22
7.0 (H)	33.312	25153472	5.4	31.28-35.35	25559307	4.5	31.62-35.01
5.0 (G)	59.220	41364149	0.8	58.68-59.76	41795573	0.4	58.95-59.49

Jede der Verdünnungen wurde jeweils 3 mal gemessen. Bestimmt wurde jeweils die Fläche unter der Kurve.

Abbildung 27

HPLC-Eichgerade R-p-HPPH (chirales Elutionsmittel)

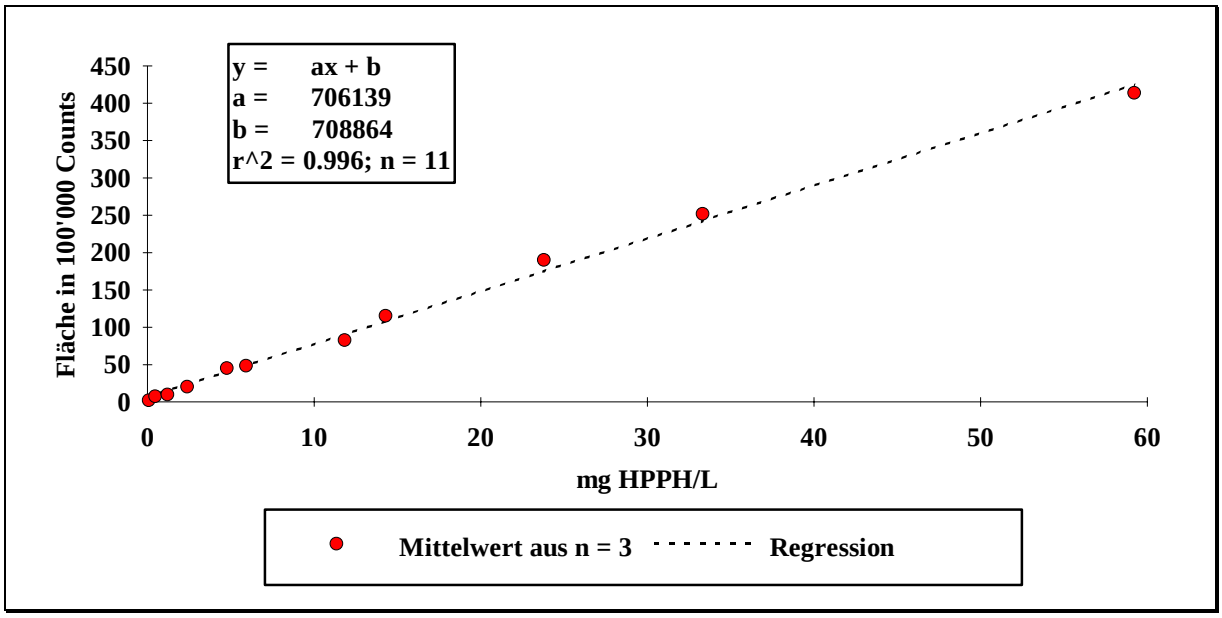
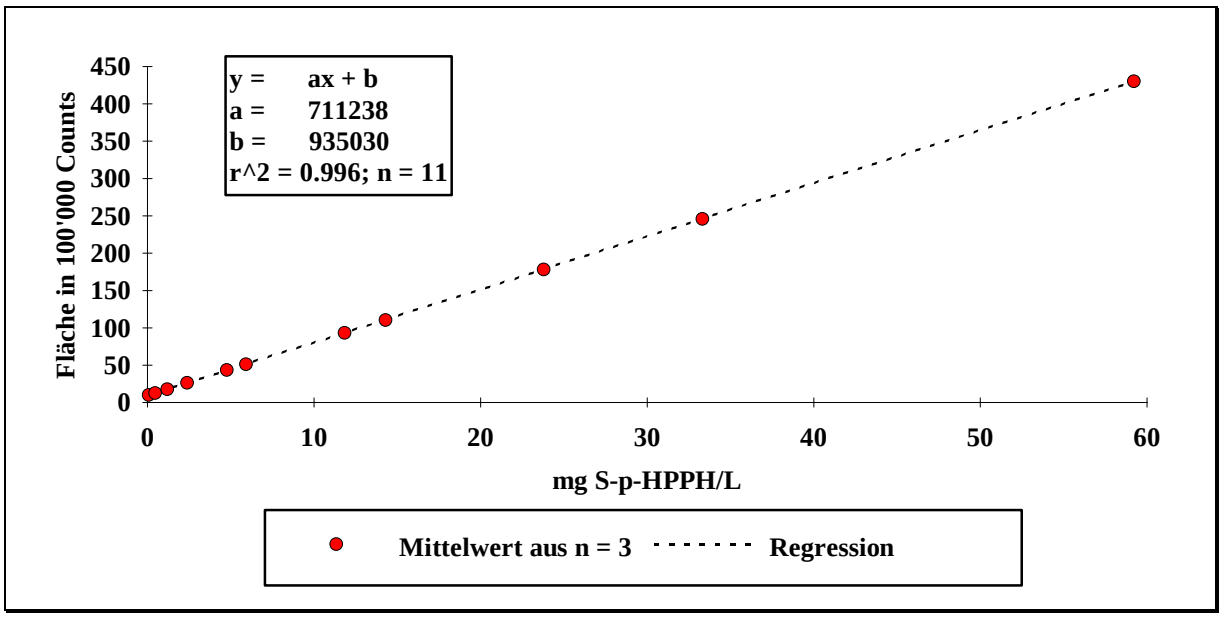


Abbildung 28

HPLC-Eichgerade S-p-HPPH (chirales Elutionsmittel)



5.2.2.5. Bestimmung der Cross-Reactivity bei der EMIT-Methode

Serumproben versetzt mit Phenytoin und möglichen kreuzreagierenden Substanzen wurden in vier Portionen unterteilt : 1 Aliqot wurde mittels HPLC (3-fach Werte), 3 mittels EMIT (Einzelwerte) gemessen. Der Quotient der beiden gemessenen Phenytoinkonzentrationen sollte in An- und Abwesenheit potentiell interferierender Substanzen konstant bleiben.

Tabelle 23

Proben für die Bestimmung der Interferenz des Phenytoin-EMIT mit p-HPPH
(mL Stammlösung Phenytoin + mL Stammlösung p-HPPH (siehe Tabelle 11) ergänzt mit Serum auf 10.0 mL)

a) 1. Serie

Proben	ha	hb	hc	hd	he	hf
Phenytoin : mL Stammlösung I	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
p-HPPH : mL Stammlösung K	0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
Phenytoin-Säure [mg/L]	10.435	10.435	10.435	10.435	10.435	10.435
p-HPPH/L [mg/L]	0	2.379	4.759	9.518	14.276	19.035

b) 2. Serie

Probe	hg	hi	hj	hk	hl
Phenytoin : mL Stammlösung J	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
p-HPPH : mL Stammlösung L	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
Phenytoin-Säure [mg/L]	10.896	10.896	10.896	10.896	10.896
p-HPPH/L [mg/L]	5.922	11.844	17.766	23.688	35.532

Tabelle 24

Proben für die Bestimmung der Interferenz des Phenyotin-EMIT mit Phenobarbital;
(mL Stammlösung Phenytoin + mL Stammlösung Phenobarbital (siehe Tabelle 11)
ergänzt mit Serum auf 10.0 mL)

a) 1. Serie

Probe	pa	pb	pc	pd	pe
Phenytoin : mL Stammlösung I	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Phenobarbital : mL Stammlösung M	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
Phenytoin-Säure [mg/L]	10.435	10.435	10.435	10.435	10.435
p-HPPH/L [mg/L]	5.566	11.132	16.698	22.264	33.960

b) 2. Serie

Probe	pf	pg	ph	pi	pk
Phenytoin : mL Stammlösung J	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Phenobarbital : mL Stammlösung N	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
Phenytoin-Säure [mg/L]	10.771	10.771	10.771	10.771	10.771
p-HPPH/L [mg/L]	5.418	10.836	16.254	21.672	32.508

5.2.2.6. Bestimmung von Phenytoin im Serum : Vergleich der EMIT- mit der HPLC-Methode

Zum direkten Vergleich der Phenytoinbestimmungsmethoden wurden verschiedene Aliquots derselben Serumproben mit beiden Methoden bestimmt. Gleichzeitig wurde die Linearität sowie die Wiederfindungsrate beider Methoden bestimmt.

Bestimmung der Wiederfindungsraten

Jede Probe wurde jeweils 3 mal gemessen. Das EMIT-Analysegerät berechnete die Konzentration automatisch aus der Extinktion der Probe.
Zur Berechnung der Wiederfindungsrate (Recovery) der EMIT-Methode wurde die Einwaage mit den gefundenen Werten verglichen (Einwaage = 100%)
Zur Berechnung der Wiederfindungsrate der HPLC-Methode (HPLC-System 1) wurde die Einwaage mit den gefundenen Werten (berechnet mit der Kurvengleichung der Serum-Eichgerade : Abbildung 24) verglichen (Einwaage = 100%).

5.3. Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus durch die Bestimmung der Konzentrationsverhältnisse von Phenytoin und seinen Metaboliten in Serum und Urin

Der Phänotyp des Phenytoinmetabolismus wird durch die individuelle Eliminationshalbwertszeit ausgedrückt *(siehe Formel 6 [88]; Seite 34)*
Die zur Berechnung der individuellen Eliminationshalbwertszeit verwendeten Parameter (v_{max} und K_m und Vd) sind durch das Bayesian Forecasting Programm (siehe 5.1.6. Individuelle Dosisanpassung) errechnete Schätzwerte.

Die Serum- und Urinproben sowie die berechneten individuellen Eliminationshalbwertszeiten stammen von Patienten, die in die Untersuchung zur schnellen Aufsättigung und Dosisindividualisierung aufgenommen wurden (siehe 5.1. Schnelle Aufsättigung und Dosisanpassung mittels Bayesian Forecasting).

Die Messresultate wurden in 2 Gruppen eingeteilt und mit den individuellen Eliminations-halbwertszeiten (berechnet zu verschiedenen Zeitpunkten) korreliert :

1. Resultate von Proben, die während der ersten 5 Tage abgenommen wurden.
   - Korrelation mit der zum Zeitpunkt der Probeentnahme geschätzten Halbwertszeit
   - Korrelation mit einer zu einem späteren Zeitpunkt geschätzten Halbwertszeit

2. Resultate von Proben, die in der anschliessenden individuell dosierten Phase abgenommen wurden.
   - Korrelation mit der zum Zeitpunkt der Probeentnahme geschätzten Halbwertszeit
   - Korrelation mit einer zu einem späteren Zeitpunkt geschätzten Halbwertszeit

Untersucht wurde eine mögliche Korrelation (r^2) zwischen der individuellen Eliminationshalbwertszeit und

- dem Ausmass der Metabolitenbildung (ausgedrückt als Konzentrationsverhältnis von Phenytoin zu p-HPPH) im Serum
- dem Verhältnis R-p-HPPH zu S-p-HPPH (ausgedrückt als Anteil von R-p-HPPH am Gesamtgehalt)

Bestimmungsmethoden siehe 5.2.2.3. Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin und 5.2.2.4. Trennung und Quantifizierung der Enantiomere von p-HPPH (HPLC-System 2) mittels β-Cyclodectrin-HPLC)

6. Resultate

6.1. Dosierungsstrategie zur schnellen i.v.-Aufsättigung mit Phenytoin

6.1.1. Standardschema für die schnelle i.v.-Aufsättigung

(ein Teil dieser Ergebnisse wurde in zwei Abstracts publiziert) [149,150]

Das schnelle und standardisierte i.v.-Aufsättigungsschema erbrachte nach 16 Stunden bei ca. 80% und nach 5 Tagen immer noch bei knapp 70% der Patienten Serumspiegel im geforderten Bereich
(siehe Tabelle 25 und 27).
Ohne eine Dosisindividualisierung nach 5 Therapietagen wäre theoretisch nur noch bei rund 30% der Patienten ein Serumspiegel zwischen 10 und 20 mg/L erreicht worden
(siehe Tabelle 26).

Tabelle 25

Phenytoin : Serumspiegelverlauf bei schneller i.v. Aufsättigung von Patienten; Therapietag 1 bis 5

n = 68 Patienten
Initialdosis : 15 mg Phenytoin-Säure/kg Körpergewicht i.v. über 4 Stunden
Erhaltungsdosis (alle 12 Stunden) : 175 mg (≤ 70 kg); 200 mg (> 70 kg) Phenytoin-Säure i.v. über 15 Minuten

a) Einzelresultate

Gewicht	Initialdosis	Spiegel 1		Erhaltungsdosis	Spiegel 2		Spiegel 3	
[kg]	[mg/kg KG]	Zeit [h]	[mg/L]	[mg/kg KG/Tag]	[h]	[mg/L]	[h]	[mg/L]
53	15.6	16	9.8	6.6	64	9.5	88	8.9
55	15.1	16	14.6	6.4	64	20.9	88	21.4
56	14.8	16	15.6	6.2	76	14.3	100	11.3
57	14.5	16	8.1	6.1	76	10.8	100	10.8
58	15.9	16	14.9	6.0	64	14.6	88	14.8
59	15.6	16	16.7	5.9	64	19.3	88	21.2
60	15.3	16	17.4	5.8	64	20.4	88	19.9
60	15.3	16	13.3	5.8	64	12.3	88	14.4
60	15.3	16	15.1	5.8	64	15.3	88	16
60	15.3	16	22.4	5.8	64	20.8	88	20.2
60	15.3	16	13.4	5.8	64	17.5	88	12.4
60	15.3	16	20.1	5.8	76	22.4	100	24.8
60	15.3	16	13.4	5.8	64	13.6	88	12.6
60	15.3	16	9.3	5.8	64	12.6	88	12.3
63	15.3	16	7.8	5.5	64	5.7	88	5.5
65	14.9	16	18.6	5.4	64	15.6	88	16.1
65	14.9	16	13.6	5.4	76	12.6	100	13.1
70	15.1	16	6.3	5.8	64	7.1	88	8.8
70	15.1	16	11.8	5.0	64	7.1	88	5
70	15.1	16	9.9	5.0	64	11.4	88	13
70	15.1	16	16.5	5.0	64	14.1	88	12
70	15.1	16	18.1	5.0	64	18.4	88	18.5
70	15.1	16	15	5.0	64	15	88	16
70	16.4	16	12.3	5.0	64	2.6	88	2.5

Gewicht	Initialdosis	Spiegel 1		Erhaltungsdosis	Spiegel 2		Spiegel 3	
[kg]	[mg/kg KG]	Zeit [h]	[mg/L]	[mg/kg KG/Tag]	[h]	[mg/L]	[h]	[mg/L]
70	15.1	16	17.5	5.0	64	15.4	88	15.6
70	15.1	16	19.8	5.0	64	19.5	88	17.5
70	15.1	16	15.6	5.0	76	15.8	100	15.8
70	15.1	16	20	5.0	76	13.5	100	13.5
70	15.1	16	15	5.0	88	13.6	100	12.6
70	15.1	16	14.8	5.0	76	14.3	100	13
71	14.9	16	19.3	5.7	64	23.2	88	23.6
74	15.5	16	20.9	5.5	64	24.4	88	22.9
75	14.1	14	16.3	5.4	62	13.8	86	12.1
75	15.3	16	11.1	5.4	76	8.3	100	6.8
75	15.3	16	15.8	5.4	64	16.3	88	14.3
75	15.3	16	15.1	5.4	76	11.8	100	10.8
75	15.3	16	16.5	5.4	64	14.2	88	13
75	15.3	16	21.2	5.4	64	18.5	88	17.8
75	15.3	16	11.7	5.4	64	11.7	88	15.9
75	15.3	16	20.5	5.4	64	16.2	88	13.6
75	15.3	16	17	5.4	64	17.4	88	16.7
76	15.1	16	14	5.3	64	15.6	88	16.2
77	14.9	16	11.4	5.3	64	14.4	88	13.1
80	15.0	16	8.1	5.1	76	9.3	100	10.6
80	15.0	16	14.3	5.1	64	10.8	88	8.3
80	15.0	40	13.8	5.1	100	15.1	124	12.6
80	15.0	16	15.3	5.1	76	21.7	100	26.5
80	15.0	16	12.3	5.1	64	19.9	88	21.9
80	15.0	16	6.6	5.1	64	6.6	88	4
80	15.0	16	14.6	5.1	64	12.3	88	10
80	15.0	16	11.3	5.1	64	13.3	88	14.1
80	15.0	16	12.2	5.1	76	12.3	100	12.4
80	15.0	16	15.9	5.1	76	14.8	100	14.3
80	15.0	16	13.6	5.1	64	15.5	88	20.3
82	14.6	16	11.2	4.9	64	10.8	88	13.7
85	15.2	16	14.6	4.8	64	17.1	88	15.3
85	15.2	16	12.1	4.8	64	9	88	5.3
85	15.2	16	13	4.8	76	14.2	124	19.6
85	15.2	16	16.5	4.8	64	11.7	88	9
85	15.2	16	14.8	4.8	64	16.7	88	13.8
85	14.1	16	10.1	4.8	70	16.1	94	18.9
90	14.8	16	16.3	4.5	76	15.2	100	12.6
90	14.8	16	11.3	4.5	64	7.1	88	7
90	14.8	16	6.6	4.5	64	7.6	88	7.5
93	15.3	16	17.8	4.4	81	15.3	105	13.7
95	15.0	16	13.4	4.3	64	14.2	88	12.5
100	11.5	16	14.4	4.0	64	21.8	88	19.1
120	15.3	16	12.6	3.4	76	10.6	100	10.3

b) Statistik

Initialdosis [mg/kg KG]	Mittelwert ± SD	15.1 ± 0.6
	Median	15.1
	Minimum	11.5
	Maximum	16.4
Serumspiegel 1 [mg/L]	Mittelwert ± SD	14.3 ± 3.7
	Median	14.6
	Minimum	6.3
	Maximum	22.4
Erhaltungsdosis [mg/kg KG/Tag]	Mittelwert ± SD	5.2 ± 0.6
	Median	5.1
	Minimum	3.4
	Maximum	6.6
Serumspiegel 2 [mg/L]	Mittelwert ± SD	14.3 ± 4.5
	Median	14.3
	Minimum	2.6
	Maximum	24.4
Serumspiegel 3 [mg/L]	Mittelwert ± SD	14.0 ± 5.0
	Median	13.6
	Minimum	2.5
	Maximum	26.5

Tabelle 26

Phenytoin-Serumspiegel in- und ausserhalb des therapeutischen Bereichs nach schneller, standardisierter i.v. Aufsättigung (n = 68 Patienten)

Stunden nach Therapiebeginn	**Serum konzentrationen [mg/L]**			
	10 bis 20	**< 10**	**> 20**	**Mittelwert± SD**
16	79.5 %	13.2 % (6.3-9.9)	7.3 % (20.1-24.4)	14.3 ± 3.9
64 - 76	72.0 %	16.2 % (2.6-9.5)	11.8 % (20.9-24.4)	14.3 ± 4.6
88 - 100	69.2 %	17.6 % (2.5-9.9)	13.2 % (20.2-26.5)	14.0 ± 4.8
Steady-State*	29.4 %	20.6 %	50.0 %	

* theoretisch, berechnet bei gleichbleibender, standardisierter Erhaltungsdosis

6.1.2. Güte des Voraussageprogramms für die individuelle Dosisanpassung

6.1.2.1. Phenytoin-Serumspiegel 4 (n = 46)

Serumspiegel 4 war der erste Serumspiegel, der ca. 4 - 5 Tage anschliessend an die individuelle Dosisanpassung (212 ± 38 Stunden nach Therapiebeginn) gemessen wurde.

Bei 25 von 46 Patienten fand dabei eine Umstellung der i.v.- auf orale Dosierung statt.
In jedem Fall war eine Dosisanpassung notwendig, gleich oft eine Dosiserhöhung respektive -reduktion (siehe Tabelle 27)

Tabelle 27

Dosisindividualisierung nach der schnellen, standardisierten i.v. Phenytoinaufsättigung; Ausmass der Anpassung der Erhaltungsdosis in %

Mittelwert ± SD :	+4.8 ± 29.5 %
Median	-1.4%
Maximale Reduktion	-57.5%
Maximale Erhöhung	+78.9%
Anzahl Anpassungen nach oben :	23 (50%)
Anzahl Anpassungen nach unten :	23 (50%)
Keine Anpassung notwendig :	0

In der Analyse der Notwendigkeit und des Einflusses der 3 Blutspiegelbestimmungen zur Optimierung des Bayesian Forecasting für Spiegel 4 zeigte sich sowohl im Voraussagefehler (PE) wie auch im sensitiveren rmse die Überlegenheit einer Berechnung mit 3 Serumspiegelmessungen (siehe Tabelle 28).

Tabelle 28

Voraussagefehler (PE) für den ersten Serumspiegel nach der Phenytoindosis-individualisierung (212 ± 38 Stunden nach Therapiebeginn) in Abhängigkeit vorangegangener Serumspiegelbestimmungen

Ziel-Talspiegel 11 mg/L (Steady State); n= 46 Patienten
Serumspiegel der standardisierten Phase : L1 nach 16 Std., L2 nach 64-76 Std., L3 nach 88-100 Std.

zur Berechnung benutzte Spiegelwerte	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens-Intervall
L1,L2,L3	4.31 ± 3.43	6.35	67%
L3	5.21 ± 5.34	7.42	70%
L1,L3	4.78 ± 6.43	7.95	61%
L1,L2	6.30 ± 5.54	8.17	50%
L2, L3	5.45 ± 6.21	8.21	59%
L2	7.16 ± 6.48	9.61	50%
L1	9.52 ± 7.84	11.61	48%
Ohne Serumspiegel	9.13 ± 9.83	12.35	

Die Bestimmung des Voraussagefehlers für den einzelnen Serumspiegel (Soll-Ist-Abweichung) erlaubte auch eine Beurteilung der Güte der initialen Populationsdaten (v_{max} und K_m und Vd) oder die Richtigkeit der individuell berechneten Parameter (siehe Tabelle 29 a, b und c)

Tabelle 29

Voraussagefehler für Phenytoinserumspiegel 1 bis 4 (n=46 Patienten)

Serumspiegel der standardisierten Phase : L1 nach 16 Std., L2 nach 64-76 Std., L3 nach 88-100 Std.
erster Serumspiegel nach Dosisindividualisierung : L4 212 ± 38 Stunden nach Therapiebeginn

a) Berechnung nur mit Populationsdaten

Serumspiegel	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]
L 1	- 1.80 ± 4.5	4.17
L 2	0.75 ± 6.61	4.55
L 3	2.02 ± 6.72	5.45
L 4	9.13 ± 9.83	12.35

b) Berechnung unter Einbezug von Serumspiegel 1 (L1)

alle Serumspiegel berechnet mit Serumspiegel 1	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens- Intervall
L 2	1.0 ± 3.55	4.92	71%
L 3	3.31 ± 4.46	4.70	70%
L 4	9.52 ± 7.84	11.61	48%

c) Berechnung unter Einbezug von Serumspiegel 1 und 2 (L1, L2)

alle Serumspiegel berechnet mit Serumspiegel 2	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens- Intervall
L 3	1.51 ± 1.94	2.38	96%
L 4	6.30 ± 5.54	8.17	50%

6.1.2.2. Serumspiegel 5 (n = 27)

Serumspiegel 5 wurde ca. 1 Woche nach einer zweiten Anpassung der individuellen Dosierung (352 ± 51 Stunden nach Therapiebeginn) bestimmt.

Nach Serumspiegel 4 wurden 3 weitere Patienten von i.v.- auf eine orale Phenytoindosierung umgestellt, so dass insgesamt 17 von 27 ausgewerteten Patienten Phenytoin per os verabreicht erhielten.

Mit dem Einbezug von 4 gemessenen Serumspiegeln war die Voraussage des Bayesian Forecasting Programms (rmse) von Serumspiegel 5 am besten (siehe Tabelle 30).

Tabelle 30

Voraussagefehler (PE) für den zweiten Serumspiegel nach Phenytoindosis-individualisierung (352 ± 51 Stunden nach Therapiebeginn) in Abhängigkeit vorangegangener Serumspiegelbestimmungen

Ziel-Talspiegel 11 mg/L (Steady State); n= 27 Patienten

zur Berechnung benutzte Spiegelwerte	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel L5 im vorausgesagten 68% Vertrauens-Intervall
L1,L2,L3,L4	2.30 ± 2.26	5.40	71%
L2,L3,L4	2.41 ± 5.61	6.0	69%
L3;L4	2.38 ± 5.88	6.24	65%
L1,L3,L4	2.57 ± 6.73	7.08	65%
L1,L3	5.89 ± 5.74	8.16	60%
L3	6.1 ± 5.60	8.20	61%
L1,L2,L3	7.33 ± 5.85	10.70	45%
L1,L2	11.32 ± 8.58	14.37	55%
L2,L3	9.57 ± 11.34	14.68	44%
L2	12.67 ± 11.39	16.89	48%
L1	16.49 ± 13.69	19.64	55%
Ohne Serumspiegel	15.57 ± 15.94	19.25	

Analog zu Serumspiegel 4 konnte die Güte der initialen Populationsdaten (v_{max} und K_m und Vd) oder die Richtigkeit der individuell berechneten Parameter beurteilt werden (Tabelle 31 a, b, c und d)

Tabelle 31

Voraussagefehler für Serumspiegel 1 bis 5 (n= 27 Patienten)

Serumspiegel der standardisierten Phase : L1 nach 16 Std., L2 nach 64-76 Std., L3 nach 88-100 Std.
Serumspiegel nach Dosisindividualisierung : L4 212 ± 38 Std., L5 352 ± 51 Std nach Therapiebeginn

a) Berechnung nur mit Populationsdaten

Serumspiegel	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]
L 1	-2.26 ± 4.12	4.14
L 2	0.64 ± 6.86	4.22
L 3	2.50 ± 7.42	5.43
L 4	9.42 ± 10.53	11.88
L 5	15.57 ± 15.94	19.25

b) Berechnung unter Einbezug von Serumspiegel 1 (L 1)

alle Serumspiegel berechnet mit Serumspiegel 1	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens- Intervall
L 2	0.45 ±4.09	5.84	71%
L 3	4.09 ±5.06	5.27	63%
L 4	10.54 ±8.62	12.57	37%
L 5	16.49 ±13.69	19.64	54%

b) Berechnung unter Einbezug von Serumspiegel 1 und 2 (L1, L2)

alle Serumspiegel berechnet mit Serumspiegel 2	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens- Intervall
L 3	2.09 ±1.98	2.68	96%
L 4	7.18 ±5.00	9.25	41%
L 5	11.32 ±8.58	14.37	55%

b) Berechnung unter Einbezug von Serumspiegel 1, 2 und 3 (L1, L2, L3)

alle Serumspiegel berechnet mit Serumspiegel 3	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens- Intervall
4	4.64 ±2.98	7.07	63%
5	7.33 ±5.85	10.70	45%

6.1.2.3. Serumspiegel 6 (n = 9)

Serumspiegel 6 wurde wiederum ca. 1 Woche nach einer dritten Anpassung der individuellen Dosierung (597 ± 214 Stunden nach Therapiebeginn) bestimmt.

Alle Patienten erhielten nun Phenytoin per os. Die Serumkonzentrationsvoraussage war unter Einbezug aller 5 bisherigen Spiegelwerte am besten (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32

Voraussagefehler (PE) für den zweiten Serumspiegel nach der Dosisindividualisierung (597 ± 214 Stunden nach Therapiebeginn) in Abhängigkeit vorangegangener Serumspiegelbestimmungen

Ziel-Talspiegel 11 mg/L (Steady State); n= 9 Patienten

zur Berechnung benutzte Spiegelwerte	Mittlerer PE ± SD [mg/L]	RMSE [mg/L]	Anteil Serumspiegel im vorausgesagten 68% Vertrauens- Intervall
L1,L2,L3,L4,L5	-3.8 ± 5.9	6.7	67%
L1,L2,L3,L4	-3.7 ± 8.5	8.8	56%
L1,L2,L3	0.0 ± 7.6	7.2	89%
L1,L2	5.6 ± 9.45	10.5	67%
L1	11.9 ± 11.4	16.1	78%
Ohne Serumspiegel	13.6 ± 9.8	16.48	

6.2. Phenytoin und seine Laborbestimmung

6.2.1. Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH im Serum und im Urin mittels HPLC mit internem Standard

Unter der Verwendung von Serum und Urin von unbehandelten Patienten, die mit entsprechenden Stammlösungen von Phenytoin und p-HPPH versetzt wurden, zeigte die gewählte HPLC-Methode eine gute Präzision und Richtigkeit, die insbesondere im klinisch relevanten Konzentrationsbereich sehr zuverlässig war (Tabelle 33).

Tabelle 33

Präzision und Richtigkeit der HPLC-Methode zur Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin

a) Serum

(siehe Tabellen 13, 14, 18, und 19)

	Phenytoin	p-HPPH
Linearität [mg/L]	1 - 63	1 - 36
Präzision (Variationskoeffizienten) [%]	0.6 - 14.7	0.9 - 28.9
Richtigkeit (Wiederfindungsrate) [%]	110 ± 34.5	121.6 ± 42.3

b) Urin

(siehe Tabellen 15, 16, 20 und 21)

	Phenytoin	p-HPPH
Linearität [mg/L]	1 - 63	1 - 31
Präzision (Variationskoeffizienten) [%]	0.4 - 13.5	0.7 - 22.6
Richtigkeit (Wiederfindungsrate) [%]	99.8 ± 6.6	100.7 ± 16.2

6.2.2. Beurteilung der EMIT-Methode für das Phenytoin-TDM

6.2.2.1. Vergleich der EMIT-Methode mit der HPLC-Methode
Im Konzentrationsbereich von 5 bis 30 mg/L

Tabelle 34

Phenytoin-Wiederfindungsraten im Serum : Vergleich zwischen EMIT und HPLC

a) EMIT

mL Stammlösung I (siehe Tabelle 11)	entspricht mg/L	Mittelwert EMIT (n = 3)	Variations-koeffizient [%]	95% Vertrauens-intervall [mg/L]	Recovery [%]
0.5	5.2	4.8	2.4	4.7 - 4.9	92.6
1.0	10.4	9.8	4.1	9.4 - 10.3	94.2
1.5	15.7	14.9	3.4	14.3 - 15.5	95.6
2	20.9	20.2	5.5	18.9 - 21.5	96.6
3	31.3	28.3	1.8	27.7 - 28.9	90.6

Der Mittelwert der Recovery betrug 93.9 ± 2.5 %

b) HPLC

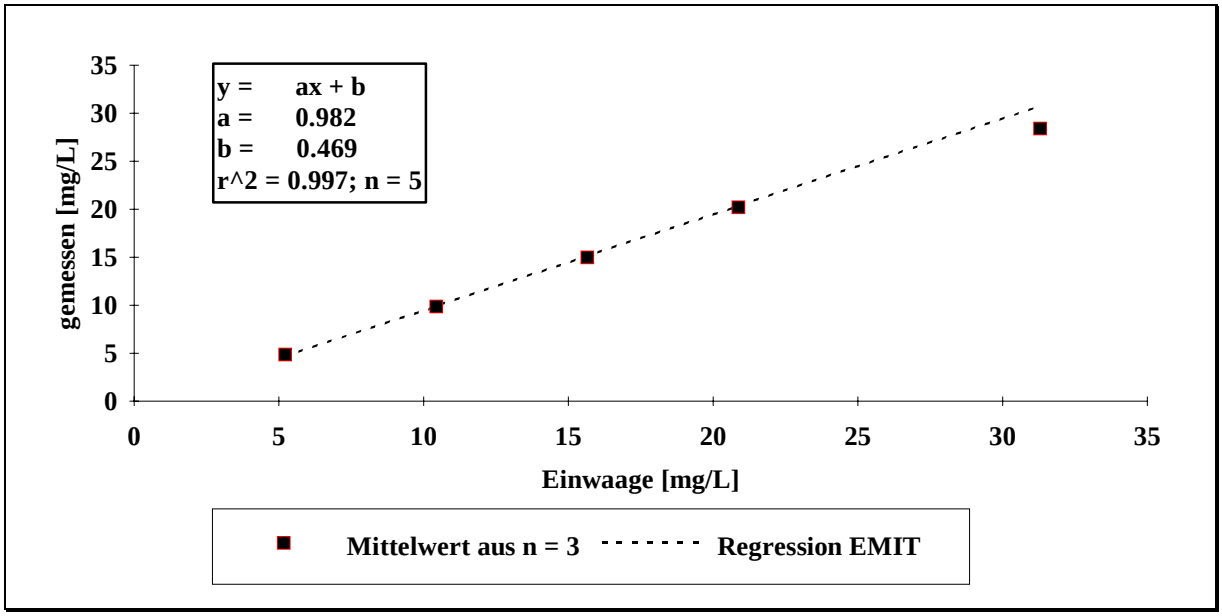
mL Stammlösung I (siehe Tabelle 11)	entspricht mg/L	Mittelwert des Verhältnisses Phenytoin/IS	Variations-koeffizient [%]	Berechnet nach der Serum-Eichgerade	95% Vertrauens-intervall [mg/L]	Recovery [%]
0.5	5.2	0.4	2.6	5.1	5.0-5.3	98.2
1.0	10.4	0.8	1.7	10.8	10.6-11.0	103.4
1.5	15.7	1.2	3.8	16.5	15.8-17.2	105.5
2	20.9	1.6	0.7	22.9	22.7-23.1	109.6
3	31.3	2.4	0.7	33.3	33.0-33.6	106.4

[1)]Berechnung mit der Regressionsgleichung der Eichkurve Phenytoin im Serum (siehe Tabelle 13)

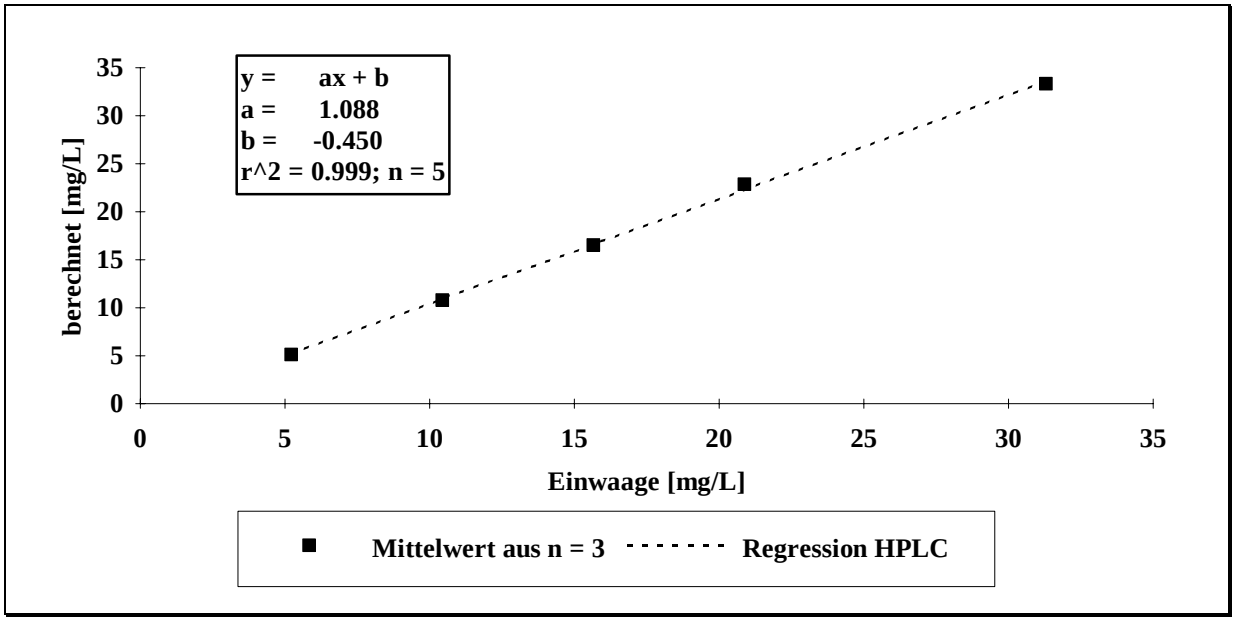
Der Mittelwert der Widerfindungsrate betrug 104.6 ± 4.0 % (n = 5)

Abbildung 29

a) Richtigkeit der EMIT-Methode



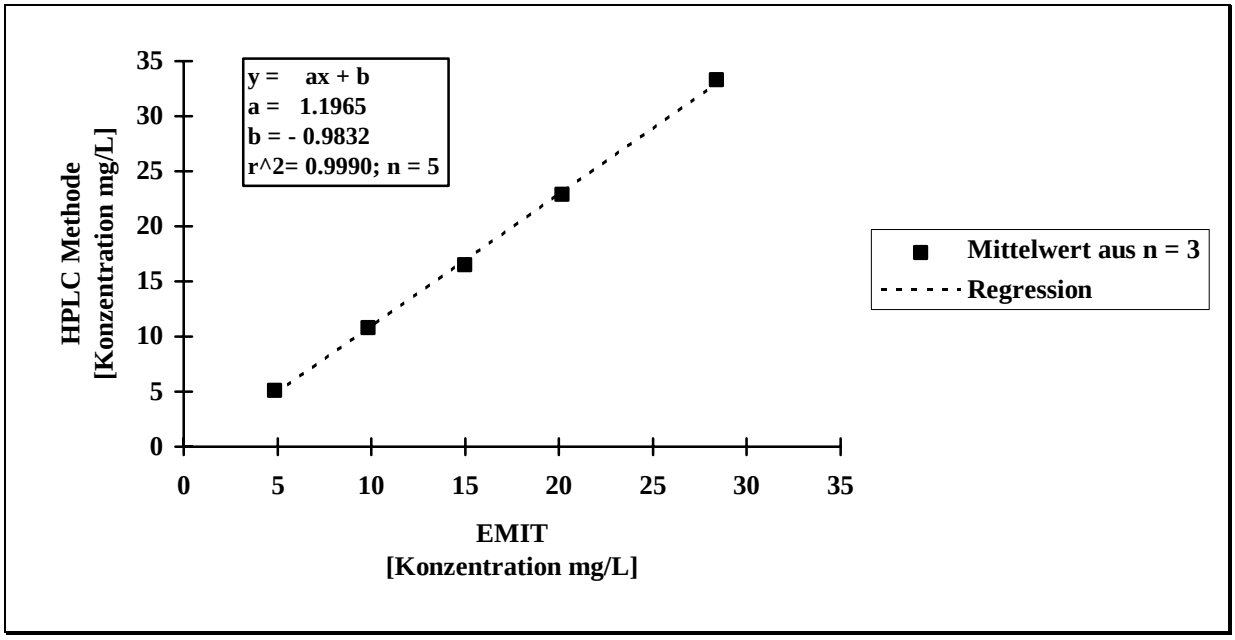
b) Richtigkeit der HPLC-Methode zur Ueberprüfung des EMIT



Der Vergleich der Methoden bei identischen Proben ergab :

Abbildung 30

Vergleich der EMIT-Methode mit der HPLC-Methode



Die Resultate beider Methoden korrelierten in einem hohen Mass
Die Linearität und Steilheit der Regressionsgeraden sowie die analytische Ausbeute der beiden Phenytoin-Bestimmungsmethoden (HPLC und EMIT) war vergleichbar.

6.2.2.2. EMIT : Beinflussung der Phenytoin-Messresultate durch strukturverwandte Substanzen (Cross-Reactivity)

Die Spezifität der EMIT Phenytoin-Antikörper im Syva-Kit war hoch und zeigte im therapeutischen Bereich weder eine durch Phenytoinmetaboliten (p-HPPH) noch durch chemisch verwandte Antiepileptika (Phenobarbital) messbare Analysenbeeinflussung (Tabelle 35).

Tabelle 35

Phenytoin : Cross-Reactivity der EMIT Bestimmung mit strukturverwandten Substanzen im Serum (Vergleich mit HPLC)

a) p-HPPH

	Phenytoin						p-HPPH		HPLC : EMIT	HPLC : EMIT
Probe (siehe Tabelle 23)	Einwaage [mg/L]	gemessen mit EMIT [% der Einwaage]	Variations-koeffizient [%]	berechnet nach der Eichkurve [% der Einwaage]	gemessen am HPLC [% der Einwaage]	Variations-koeffizient [%]	gemessen am HPLC [mg/L]	Variations-koeffizient [%]	Verhältnis % der Einwaage	Verhältnis % der Einwaage (korrigiert nach Eichkurve)
ha	10.44	84.58	0.65	88.22	89.46	0.31			1.06	1.01
hb	10.44	87.84	0.63	91.76	90.90	0.86	nd	nd	1.03	0.99
hc	10.44	84.58	0.65	88.22	91.76	3.96	3.7	8.76	1.08	1.04
hg	10.9	84.13	0.63	87.89	89.91	0.49	4.37	2.36	1.07	1.02
hd	10.44	87.45	0.63	91.38	88.41	0.56	8.45	1.77	1.01	0.97
hi	10.9	81.01	0.65	84.50	94.04	2.01	9.94	2.82	1.16	1.11
he	10.44	86.49	0.64	90.33	86.11	0.63	13.15	0.69	1.00	0.95
hj	10.9	83.76	0.63	87.52	94.13	2.16	14.59	0.31	1.12	1.08
hf	10.44	89.37	1.64	93.49	84.10	1.28	17.5	0.99	0.94	0.90
hk	10.9	82.84	0.64	86.51	91.28	3.7	19.44	1.37	1.10	1.06
hl	10.9	85.60	1.64	89.54	93.94	1.19	28.73	1.36	1.10	1.05
Mittel ± SD		85.24 ± 2.4	0.8 ± 0.4	89.03 ± 2.6	90.36 ± 3.2	1.56 ± 1.2				

siehe dazu auch Abbildung 31

b) Phenobarbital

	Phenytoin						Phenobarbital		HPLC : EMIT	HPLC : EMIT
Probe (siehe Tabelle 23)	Einwaage [mg/L]	gemessen mit EMIT [% der Einwaage]	Variations-koeffizient [%]	berechnet nach der Eichkurve [% der Einwaage]	gemessen am HPLC [% der Einwaage]	Variations-koeffizient [%]	gemessen am HPLC [mg/L]	Variations-koeffizient [%]	Verhältnis % der Einwaage	Verhältnis % der Einwaage (korrigiert nach Eichkurve)
pf	10.77	81.99	5.23	85.52	88.21	0.51	6.48	2.28	1.08	1.03
pa	10.44	93.20	1.19	97.70	98.08	2.57	6.63	5.90	1.05	1.00
pg	10.77	85.14	4.41	88.95	89.14	2.23	9.98	0.66	1.05	1.00
pb	10.44	90.33	11.68	94.54	94.06	3.48	10.90	6.94	1.04	0.99
ph	10.77	81.99	6.23	85.52	96.84	3.83	14.97	1.11	1.18	1.13
pc	10.44	97.41	1.5	102.30	87.74	2.90	14.29	2.49	0.90	0.86
pi	10.77	81.06	5.29	84.49	90.62	1.59	18.30	4.47	1.12	1.07
pd	10.44	93.58	0.59	98.08	97.41	0.16	28.75	2.32	1.04	0.99
pk	10.77	86.35	3.88	90.25	91.46	1.62	26.50	2.16	1.06	1.01
pe	10.44	95.11	1.16	99.81	99.43	1.93	38.94	1.91	1.05	1.00
Mittel ± SD		88.62 ± 6.1	4.11 ± 3.4	92.72 ± 6.6	93.30 ± 4.4	2.1 ± 1.1				

siehe dazu auch Abbildung 32

Abbildung 31

EMIT : Beeinflussung der Messresultate von Phenytoin bei Zugabe von p-HPPH

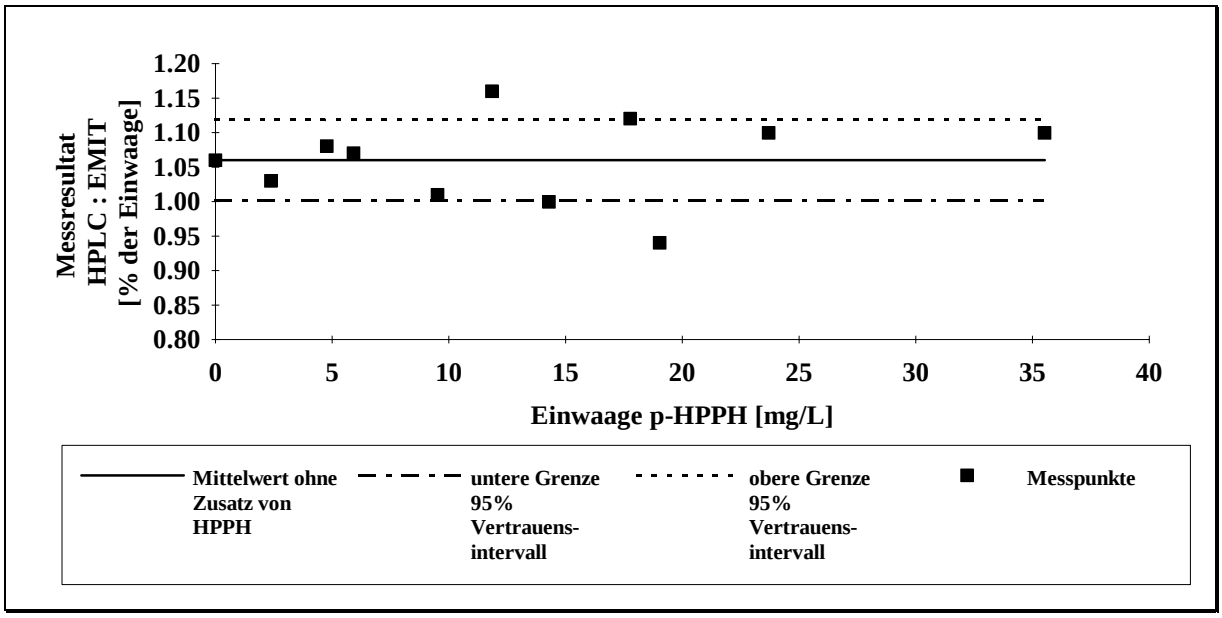
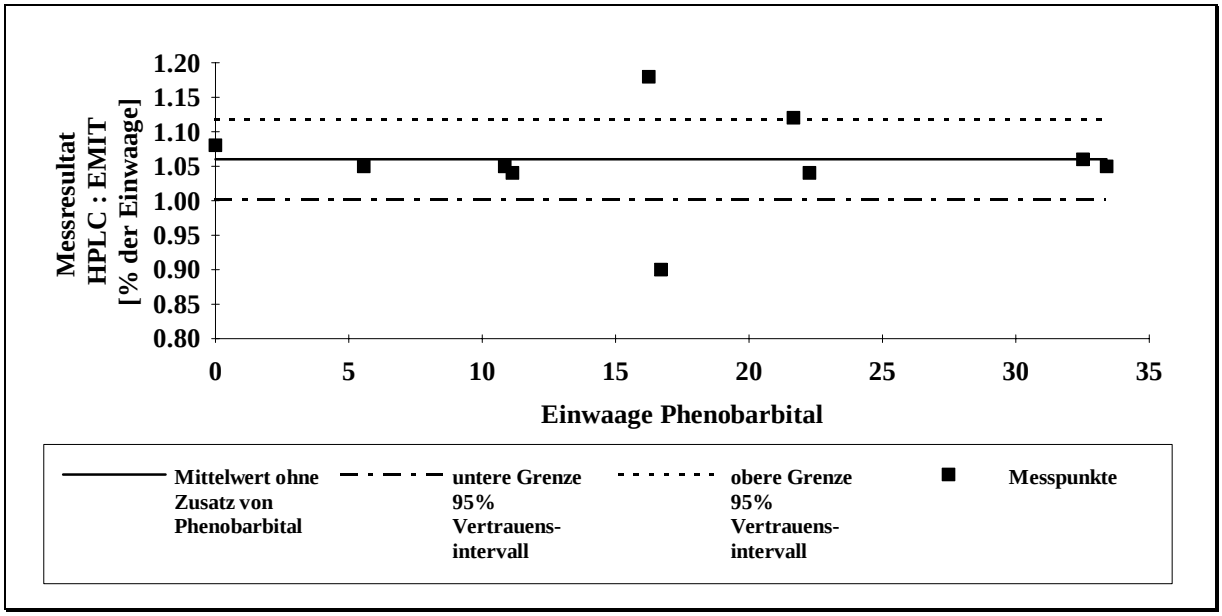


Abbildung 32

EMIT : Beeinflussung der Messresultate von Phenytoin bei Zugabe von Phenobarbital



Da die Resultate der EMIT-Methode mit denen der HPLC-Methode korrelierten, konnte die Interferenz mit strukturverwandten Substanzen durch einen Vergleich der Messresultate identischer Proben gemessen mit EMIT und HPLC untersucht werden :

Der Quotient der mit EMIT und HPLC gemessenen Phenytoinkonzentrationen blieb in An- und Abwesenheit von p-HPPH respektive Phenobarbital konstant. Somit konnte eine Interferenz mit diesen Substanzen ausgeschlossen werden.

6.2.3. Quantifizierung von R- und S-p-HPPH im Urin mittels β-Cyclodextrin-HPLC (chirales Laufmittel)

Tabelle 36

Präzision und Richtigkeit der HPLC-Methode zur Quantifizierung von R- und S-p-HPPH

siehe Tabelle 22

	R-p-HPPH	S-p-HPPH
Linearität [mg/L]	0.1 - 59	0.1 - 59
Präzision (Variationskoeffizienten) [%]	0.3 - 23.0	0.4 - 13.0

Die HPLC-Methode zur Enantiomeren-Trennung und Quantifizierung von R- und S-p-HPPH erlaubten eine schnelle, präzise und richtige Analyse von biologischen Flüssigkeiten zur Beurteilung der relativen Metabolitenanteile.

6.3. Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus : Korrelation der individuellen Eliminationshalbwertszeit (berechnet im Nicht-Steady-State) mit dem Metabolitenmuster in Urin und Serum

6.3.1. Korrelation mit dem Quotienten Phenytoin zu p-HPPH im Serum

6.3.1.1. Tag 1 bis 5 der Therapie (schnelle i.v.-Aufsättigung)

In Tabelle 37 sind in einer Übersicht die gemessenen Konzentrationsverhältnisse von Phenytoin- und p-HPPH im Serum dargestellt. Der resultierende Quotient zeigte weder mit der Phenytoin-Konzentration noch mit dem Zeitpunkt der Probeentnahme eine Korrelation.

Tabelle 37

Phenytoin : p-HPPH-Quotient während der i.v. Sättigung

Therapietag 1 bis 5 (n = 20 Patienten)
Die Mittelwerte wurden aus jeweils 3 Messungen ermittelt, nd = nicht detektierbar

Zeit nach Start [h]	Serum-Phenytoin Mittelwert [mg/L]	Variations-koeffizient [%]	Serum-p-HPPH Mittelwert [mg/L]	Variations-koeffizient [%]	Quotient Mittelwert Phenytoin : p-HPPH
64	5.27	2.09	13.72	11.44	0.39
88	9.11	2.15	7.67	5.09	1.19
88	12.17	4.94	nd		
100	12.96	1.15	nd		
64	13.47	0.49	0.22	6.39	7.85
86	14.09	1.43	0.32	2.50	4.50
76	14.29	2.16	0.16	24.62	21.99
100	14.87	4.22	1.98	1.19	0.55
88	16.09	1.94	0.49	40.10	37.87
64	16.25	1.08	nd		
100	17.27	6.45	nd		
16	17.29	1.00	4.89	9.93	3.56
16	17.29	1.00	4.89	9.93	3.56
64	17.73	2.48	0.38	3.73	4.41
16	18.10	1.74	nd		
88	21.69	4.28	0.25	8.20	10.32
88	22.29	1.63	0.81	12.04	27.88
64	23.19	4.08	0.50	8.41	4.04
64	24.20	3.70	0.94	28.53	26.91
88	27.73	1.03	2.94	12.70	9.53

Tabelle 38

Korrelation zwischen individueller Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit und dem Konzentrationsquotienten Serumphenytoin : Serum-p-HPPH während der schnellen, standardisierten Sättigung mit Phenytoin (Therapietag 1 bis 5; Nicht-Steady-State)

a) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten zum Zeitpunkt der Spiegelbestimmung

(76 ± 22 h nach Therapiebeginn (n = 12 Proben)

Zeit nach Start [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Konzentrations-Quotient Phenytoin : p-HPPH
88	21.7	1.19
64	25.1	5.27
86	27.7	4.50
88	29.3	10.32
64	31.6	13.47
100	35.4	14.87
64	37.4	4.04
88	40.9	22.29
16	48.3	17.29
88	52.2	16.09
76	55.1	14.29
88	55.3	9.53

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.336; Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

b) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten der der Probe nachfolgenden Spiegelbestimmung

(137 ± 36 h nach der Probeentnahme (n = 11 Proben)

Probeentnahme nach Therapiestart [h]	Schätzung der Eliminations-halbwertszeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Konzentrations-quotient Phenytoin : p-HPPH
64	232	12.4	13.47
88	208	15.7	1.19
88	184	23.8	10.32
16	163	25.4	17.29
64	256	30	4.04
88	234	34.8	9.53
88	256	36.6	22.29
88	184	37.7	16.09
100	275	42.3	14.87
86	187	42.3	4.5
64	160	45.9	5.27

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.006 ; Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

6.3.1.2. nach Therapietag 5 (individuelle Dosierung im Nicht-Steady-State)

In Tabelle 39 sind in einer Übersicht die gemessenen Konzentrationsquotienten Phenytoin : p-HPPH im Serum dargestellt.

Tabelle 39

Konzentrationsquotient von Phenytoin und p-HPPH nach Abschluss der i.v. Sättigung (n = 13 Patienten)
(nach Therapietag 5; individuelle Dosierung mittels Bayesian Forecasting)

Die Mittelwerte wurden aus jeweils 3 Messungen ermittelt, nd = nicht detektierbar

Zeit nach Therapie-start [h]	Serum-Phenytoin Mittelwert [mg/L]	Variations-koeffizient [%]	Serum-p-HPPH Mittelwert [mg/L]	Variations-koeffizient [%]	Quotient Phenytoin : p-HPPH
208	3.89	6.77	0.88	31.80	4.81
283	4.75	3.25	0.58	3.19	0.68
275	5.11	2.23	nd		
256	8.46	16.24	0.38	8.74	2.09
589	12.02	4.98	0.31	4.50	3.90
208	12.02	4.98	0.31	4.50	3.90
1276	13.99	0.14	nd		
1501	15.79	4.56	0.16	5.60	16.49
172	16.26	0.79	0.21	2.56	10.29
973	19.78	5.48	0.32	18.17	6.66
256	22.04	2.41	0.24	25.73	12.45
208	22.77	1.20	0.54	3.03	3.64
148	37.65	1.92	1.69	15.47	22.55

Tabelle 40

Korrelation zwischen individueller Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit und dem Konzentrationsquotienten Serumphenytoin : Serum-p-HPPH bei individueller Dosierung mittels Bayesian Forecasting

a) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten zum Zeitpunkt der Spiegelbestimmung

(440 ± 473 h nach Therapiebeginn (n = 9 Proben)

Zeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Konzentrations-Quotient Phenytoin : p-HPPH
1501	55.0	16.49
973	46.9	6.66
208	46.2	22.77
208	35.0	12.02
172	29.1	16.26
256	21.7	2.09
148	16.5	22.55
208	13.2	4.81
283	9.7	0.68

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.192
Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

b) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten der der Probe nachfolgenden Spiegelbestimmung

(148 ± 31 h nach der Probeentnahme (n = 5 Proben)

Probeentnahme nach Therapiestart [h]	Schätzung der Eliminations-halbwertszeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Konzentrations-Quotient Phenytoin : p-HPPH
1501	1645	61.7	16.49
973	1141	51.1	6.66
256	424	28.7	2.09
172	340	22.4	16.26
148	244	9.2	22.55

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.001
Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

6.3.2. Korrelation mit dem Konzentrationsquotienten von R- zu S-p-HPPH im Urin

6.3.2.1. Tag 1 bis 5 der Therapie (schnelle, standardisierte i.v. Aufsättigung)

Tabelle 41

Korrelation zwischen individueller Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit und dem Konzentrationsquotienten R- : S- p-HPPH im Urin während der schnellen, standardisierten Sättigung mit Phenytoin (Therapietag 1 bis 5; Nicht-Steady-State)

a) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten zum Zeitpunkt der Spiegelbestimmung

(89 ± 8 h nach Therapiebeginn (n = 16 Proben)

Zeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Anteil R-p-HPPH [%]	Variations-koeffizient [%]
88	7.3	5.69	27.42
88	15	1.02	18.14
88	21.7	3.78	6.11
76	26.8	11.44	7.28
88	29.3	5.15	6.17
100	31.4	14.41	6.16
100	37.9	4.13	14.2
88	38.5	11.28	3.7
88	38.6	3.85	13.82
88	47.3	4.87	11.19
88	47.8	6.7	5.26
100	48.6	7.59	5.46
70	50	13.49	14.64
88	50.3	7.22	9.39
88	55.3	1.1	8.48
92	74.8	6.98	2.75

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.012
Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

b) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten der der Probe nachfolgenden Spiegelbestimmung

(121 ± 29 h nach der Probeentnahme (n = 8 Proben)

Probe-entnahme nach Therapiestart [h]	Berechnung der Eliminations-halbwertszeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Anteil R-p-HPPH [%]	Variations-koeffizient [%]
88	208	18.5	4.87	11.19
88	184	23.8	5.15	6.17
100	244	24.7	14.41	6.16
100	196	37.9	4.13	14.2
88	256	41.4	7.22	9.39
100	202	48.6	7.59	5.46
88	180	50.6	6.7	5.26
88	234	55.3	1.1	8.48

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.124

Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

6.3.2.2. nach Therapietag 5 (individuelle Dosierung im Nicht-Steady-State)

Tabelle 42

Korrelation zwischen individueller Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit und dem Konzentrationsquotienten R- : S-p-HPPH bei individueller Dosierung mittels Bayesian Forecasting

a) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten zum Zeitpunkt der Spiegelbestimmung

(470 ± 262 h nach Therapiebeginn (n = 7 Proben)

Zeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Anteil R-p-HPPH [%]	Variations-koeffizient [%]
208	5.4	6.08	10.79
400	9.1	6.67	10.98
277	15.7	3.58	19.93
755	30.5	5.31	3.26
611	30.5	4.39	5.89
832	31.1	12.95	10.7
208	35	6.94	13.16

Korrelationskoeffizient (r^2) : 0.012
Die Konzentrationsquotienten korrelierten nicht mit der individuellen Phenytoin-Eliminationshalbwertszeit.

b) Berechnung der Eliminationshalbwertszeit mit den Daten der der Probe nachfolgenden Spiegelbestimmung

(120 ± 34 h nach der Probeentnahme (n = 2 Proben)

Probe-entnahme nach Therapiestart [h]	Schätzung der Eliminations-halbwertszeit nach Therapiestart [h]	Eliminations-halbwertszeit [h]	Anteil R-p-HPPH [%]	Variations-koeffizient [%]
611	755	30.6	4.39	5.89
208	304	5.5	6.08	10.79

Wegen der geringen Anzahl Proben (n = 2) wurde der Korrelationskoeffizient nicht bestimmt.

7. Diskussion

7.1. Effektivität des Phenytoindosierungsschemas : Bayesian Forecasting im klinischen Patientengut

7.1.1. Beurteilung der Zielkonzentrationsstrategie bei der Initialtherapie und im Langzeitverlauf

7.1.1.1. Phase I : Schnelle, standardisierte i.v.-Aufsättigung (Therapietag 1 bis 5)

Die primäre Fragestellung dieser Untersuchung war die Überprüfung eines einfachen und schnellen i.v. Phenytoin-Sättigungsschemas im klinischen Patientengut (erwachsene Patienten), mit den Kriterien, den Patienten möglichst rasch und mindestens über die ersten 5 standardisierten Therapietage in den Zielkonzentrationsbereich zwischen 10 und 20 mg/L zu versetzen.

Konzentrationsverlauf :

Initialdosis

Die Grundlagen zur Phenytoin-Initialdosis bei schneller i.v.-Aufsättigung in dieser Untersuchung lieferte die Computersimulation von Vozeh et al.[76] (siehe Abbildung 9; Seite 51), die von Blaser et al.[111] mit einer Dosis von 15 mg Phenytoin-Säure pro kg Körpergewicht verabreicht in drei gleich grossen Teildosen (Injektionsgeschwindigkeit < 15 mg/Minute) verteilt über 4 Stunden in einem ausgewählten kleinen Patientengut klinisch überprüft worden war.

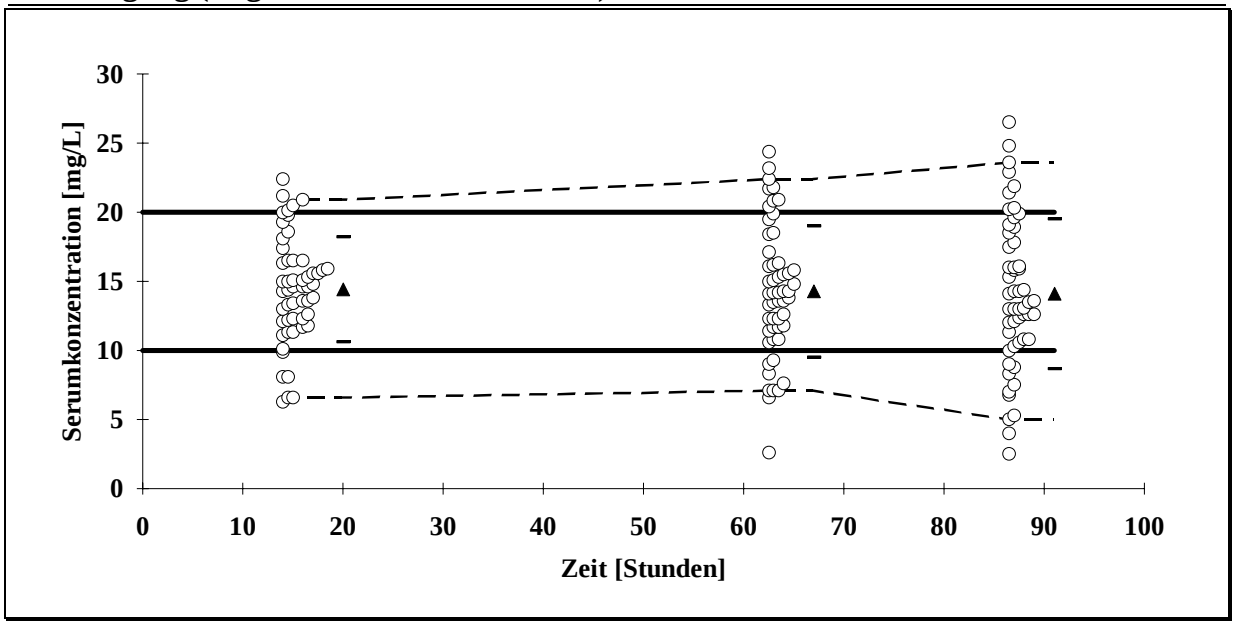
Die vorliegende Untersuchung bestätigte und erweiterte diese Resultate in einem grösseren, klinisch repräsentativen Kollektiv ohne Ausschluss einer anderen Begleittherapie : nach 16 Stunden lagen 79.5% der 68 Patienten (Alter 50 ± 15 Jahre, Gewicht 74 ± 10 kg; 45 Männer, 23 Frauen; siehe Tabelle 26; Seite 110) im Zielkonzentrationsbereich. Im Gegensatz zur Studie von Blaser et al. [111] waren nicht ausschliesslich Epilepsieprophylaxe-Indikationen berücksichtigt worden (siehe Tabelle 8; Seite 67).
Anstelle der 3 Teildosen wurde in unserer Untersuchung die Initialdosis kontinuierlich als verdünnte Infusion über 4 Stunden verabreicht. Dadurch konnte die Venenverträglichkeit der Injektionslösung (pH 11) verbessert und das Risiko einer ausgeprägten Blutdrucksenkung infolge einer zu schnellen Zufuhr verbessert werden (Infusionsgeschwindigkeit bei einem 75-kg Patienten ca. 4.5 mg Phenytoin pro Minute). Die aber doch relativ hohe Initialdosis macht eine Serumspiegelüberprüfung nach 16 Stunden sinnvoll und dient dem TDM.

Standard-Erhaltungsdosis (adaptiert bei Patienten > 70 kg Körpergewicht)

Der mit einer vereinfachten, gewichtsadaptierten Erhaltungsdosis gefundene Verlauf der Phenytoinserumkonzentrationen während der ersten 5 Therapietage in der Klinik, bestätigte die Computersimulation von Vozeh et al.[88] ebenfalls im Spitalkrankengut (siehe Tabelle 26, Seite 110). Aus der Abbildung 33 wird klar, dass nach einer Initialdosis von 15 mg/kg KG Standarddosen von 350 mg Phenytoin-Säure täglich für erwachsene Patienten ≤ 70 kg Körpergewicht und von 400 mg Phenytoin-Säure täglich für Patienten > 70 kg Körpergewicht über 5 Tage für die grosse Mehrheit der Patienten (72 % nach 4 Tagen, 69.2 % nach 5 Tagen; siehe Tabelle 26; Seite 110) der erwünschte Serumspiegelbereich eingehalten wird. Vozeh postulierte, dass die Dosis nach 5 Tagen individuell angepasst werden müsse, um nicht Gefahr zu laufen, bei vielen Patienten unerwünschte Arzneimittelwirkungen vorzufinden : Die Serumspiegelverteilungen nach 16 Stunden sowie nach 5 Tagen bestätigen diese Forderung deutlich (siehe Abbildung 33).
Die notwendige individuelle Dosisanpassung wird auch deutlich, wenn die theoretischen Steady-State-Serumspiegel aufgrund der mit den 3 Serumspiegeln geschätzten individuellen Patientendaten (Bayesian Forecasting) berechnet werden (siehe Tabelle 26; Seite 110) : Rund 80 % der Patienten würden ausserhalb des therapeutischen Bereichs von 10 bis 20 mg/L liegen (50% über 20 mg/L).

Abbildung 33

Phenytoin : Serumspiegelverlauf in der Phase der schnellen, standardisierten Aufsättigung (Tag 1 bis 5; n = 68 Patienten)



Initialdosis : 15mg Phenytoin/kg KG i.v. über 4 Stunden;
Erhaltungsdosen : alle 12 Stunden (≤ 70 kg 175 mg; > 70 kg 200 mg Phenytoin) i.v. über 15 Minuten;
Serumspiegelmessungen : nach 16 Stunden, am Morgen des 4. und des 5. Tages jeweils unmittelbar vor der Dosisverabreichung.

Grenzen des gewünschten therapeutischen Bereichs
90% Intervall der Resultate
▲ Mittelwerte;
- ± Standardabweichungen von Mittelwert.

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)

Aus (Tabelle 9; Seite 68) ist ersichtlich, dass bei ca. 5% (5 von 96 Patienten) der in die Studie aufgenommenen Patienten die Phenytointherapie wegen aufgetretener UAW abgebrochen werden musste.
2% (2 Patienten) wurden wegen allergischer Reaktionen auf Phenytoin ausgeschlossen, die nach dem Absetzen des Medikamentes wieder verschwanden. Eine Reexposition wurde nicht durchgeführt.
1% (Eine Patientin) wurde wegen Veränderungen im Blutbild ausgeschlossen (tiefes Hämoglobin). Der kausale Zusammenhang zwischen Phenytoin und dieser Veränderung konnte jedoch nicht genau gezeigt werden. Nach dem Absetzen von Phenytoin besserte sich der Zustand der Patientin.
Bei zwei Patienten (2%) war der Blutdruckabfall während der initialen Phenytoinverabreichung (Initialdosis) so stark, dass die Infusion abgebrochen werden musste. Bei einer Patientin konnte dabei ein direkter Zusammenhang zwischen der Gabe von Phenytoin und der hypotensiven Krise ausgemacht werden. Der Allgemeinzustand der anderen Patientin war so schlecht, dass nach Meinung der behandelnden Aerzte der Blutdruck schon vor der Therapie mit Phenytoin nicht gut kontrolliert war.
In der Studie von Blaser et al. [111] (Klinische Überprüfung der Initialdosis von 15 mg/kg KG in 4 Stunden, verteilt über 3 Teildosen) sank der Blutdruck in 4 von 21 Patienten um mehr als 20% des Initialwertes. Kein Patient musste wegen der Hypotension spezifisch behandelt werden.
Kardiovaskuläre UAW sind vor allem dort bekannt, wo Phenytoin in einer grösseren Dosierungsgeschwindigkeit als 50 mg/Minute appliziert wird[96]. Diese waren jeweils mit einer Verlangsamung der Phenytoin-Zufuhrrate zu korrigieren[97]. In der vorliegenden Untersuchung lag die Infusionsgeschwindigkeit mit höchstens 8 mg/Minute wesentlich tiefer.
Gemäss Protokoll musste der Blutdruck vor und nach jeder Applikation kontrolliert werden. Ausser bei den zwei beschriebenen Patienten, gab es keine Hinweise auf eine, wegen der Phenytoinverabreichung behandlungsbedrüftige Hypotension. Trotzdem sollte aus Sicherheitsgründen auf eine Messung des Blutdruckes nicht verzichtet werden.

In der Phenytoin-Aufsättigungsphase konnten bei der üblichen klinischen Patientenbeurteilung keine dosisabhängigen UAW festgestellt werden. Die Erfassung dieser dosisabhängigen UAW von Phenytoin (Nystagmus, Ataxie, Diplopie) ist jedoch, je nach Bewusstseinszustand des Patienten, schwierig. Aufgrund der gemessenen Serumspiegel und der Korrelation zwischen Serumspiegel und toxischen Nebenwirkungen[79] darf angenommen werden, dass kaum Symptome einer Überdosierung zu erwarten gewesen wären.

Co-Medikation; Interaktionen

Die Patienten erhielten je nach Grundkrankheit und Therapiebedarf neben Phenytoin zwischen 0 und 15 Medikamente. Auf eine individuelle Auswertung der Einflüsse einzelner Co-Medikationen wurde verzichtet. Patienten mit einer potentiell interagierenden Co-Medikation wurden nicht aus der Bewertung ausgeschlossen.
Die Beurteilung darüber, ob ein Medikament potentiell mit Phenytoin interagiert oder nicht, ist oftmals schwierig und es fehlen relevante Messparameter, aufgrund derer eine Dosierung entsprechend der zu erwartenden Interaktion angepasst werden könnte. Die Aufgabe des Therapeutic Drug Monitoring ist es, mögliche Interaktionen frühzeitig festzustellen (siehe 3.2.3.1.4. Interaktionen) und zum Beispiel das Überwachen der Serumspiegelkontrollen (nach rationalen Gesichtspunkten) zu adaptieren.

7.1.1.2. Beurteilung des verwendeten i.v.-Aufsättigungsverfahrens gegenüber dem bisher in der Klinik verwendeten Schema

Obwohl keine vergleichende Untersuchung der beiden Phenytoin-Dosierungsschemata Ziel dieser Studie war, lassen sich trotzdem Folgerungen anstellen :

Das bisherige Schema

Zur schnellen i.v. Aufsättigung von erwachsenen Patienten mit Phenytoin wurde an der untersuchten Klinik (Zentrumsspital mit neurochirurgischer und neurologischer Abteilung) vor Beginn der Studie meist folgende Dosierungsrichtlinie angewandt :

Initialdosis : 4 ∗ 250 mg Phenytoin-Natrium (= 920 mg Phenytoin-Säure) i.v. über 24 Stunden, Teildosen verabreicht jeweils alle 6 Stunden als Kurzinfusion (100 mL NaCl 0.9%) über 15 Minuten.

Erhaltungsdosis : 3 mal täglich 100 mg Phenytoin-Natrium (= 92 mg Phenytoin-Säure) als i.v. Bolus oder per os (ohne Anpassung der Bioverfügbarkeit von ca. 85%)

Serumspiegel wurden nur sporadisch und ohne einsichtige Vorgaben für einen rational gewählten Zeitpunkt gemessen. Eine Individualisierung der Dosis fand nur bei auftretenden Schwierigkeiten statt (epileptische Anfälle, UAW). Für die Dosisanpassung wurden keine mathematischen Hilfsmittel verwendet und die Problematik nicht-lineare Kinetik, „Steady-State“ oder veränderte perorale Bioverfügbarkeit wurde nicht nachvollziehbar berücksichtigt.

Zum Hintergrund dieses Dosierungsschemas liessen sich keine Literaturangaben finden, so dass eine empirische Genese angenommen werden muss. Eine auf 24 Stunden verlängerte Applikationsdauer dieser Initialdosis ist jedoch sicher kaum geeignet schnell therapeutische Spiegel zu erreichen. und Salem et al.[109] haben die Probleme angesprochen, die mit einem ähnlichen Dosierungsschema entstehen (Wilder et al.[151] mit einer Initialdosis von 400, 300 und 300 mg in 2-Stunden Intervallen) :

1. Therapeutische Konzentrationen werden erst nach 8 Stunden erreicht
2. Fixe Dosen bei Patienten mit unterschiedlichem Körpergewicht führen oft zu subtherapeutischen oder toxischen Spiegeln.

In der gleichen Arbeit[109] wurde gezeigt, dass mit einer Initialdosis von 15 mg/kg Körpergewicht, verabreicht mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 30 bis 50 mg/Minute, therapeutische Serumspiegel bereits nach 5 bis 30 Minuten erreicht werden können. Der durchschnittliche Konzentrationspeak erreichte jedoch mit 31.1 ± 10 mg/L toxische Werte.

Vergleich mit dem Studienschema

Beachtet man die in der vorliegenden Studie verwendete mittlere Initialdosis (Mittelwert ± SD: 1213 ± 173 mg Phenytoin-Natrium; Median : 1250 mg; Bereich von 900 bis 2000 mg) und die bereits nach 16 Stunden anschliessende erste Erhaltungsdosis von täglich 350 mg (≤ 70 kg Körpergewicht) respektive 400 mg Phenytoin-Säure (> 70 kg Körpergewicht), muss angenommen werden, dass beim bisherigen Schema der Anteil jener Patienten, die initial und über die ersten 5 Tage einen Serumspiegel unter 10 mg/L hatten, gross gewesen sein musste.
Für die Studienpatienten ergäbe die Erhaltungsdosis von 300 mg/Tag im Steady-State, berechnet mit den individuellen pharmakokinetischen Parametern ermittelt nach 5 Tagen, durch Bayesian Forecasting folgende Verteilung der Serumspiegel :

Tabelle 43

Theoretische Verteilung der Steady-State Spiegel mit 300 mg (i.v. oder p.o.) Phenytoin-Natrium als Erhaltungsdosis (n = 68 Patienten)

Applikationsart	10 - 20 mg/L	< 10 mg/L	> 20 mg/L
i.v.	23.5 %	73.5 %	2.9 %
p.o.*	5.9 %	94.1 %	0.0%

* ohne Anpassung der Dosis entsprechend der Bioverfügbarkeit

Das vor dieser Studie verwendete Schema war also zum Erreichen des Ziels, die Patienten schnell in einen Konzentrationsbereich von 10 bis 20 mg/L zu bringen und dort zu belassen, kaum brauchbar, da die Dosis zu tief gewählt wurde, das standardisierte Vorgehen nicht validiert war und keine rationalen Überprüfungen vorgenommen wurden. Dies im Gegensatz zum präsentierten Aufsättigungsschema.

7.1.1.3. Phase II : Individuelle, spiegelorientierte Dosierung
(Zielkonzentrationsstrategie unter Verwendung individueller Patientendaten)

Nutzen des verwendeten Computerprogrammes

Durch verschiedene, im Verlauf der Studie druchgeführte, meist anwendungsbezogene Anpassungen konnte das von Vozeh ursprünglich zur Verfügung gestellte Programm[145] für den Klinikbetrieb und für die mit der Berechnung beschäftigten fünf Spitalapotheker bedienerfreundlicher gestaltet werden :

- Einführung einer Speichermöglichkeit für die Patientendaten und Berechnungen (Langzeit-TDM, Patienten-Statistik).
- Praxisbezogene Berechnung der i.v. Erhaltungsdosis auf das vorhandene Injektionspräparat.
- Umrechnung der Dosen von Phenytoin-Natrium (Salz der Arzneiformulierungen) auf Phenytoin-Säure (Wirkstoff).
- Voraussage auch von Nicht-Steady-State-Spiegeln für Kontrollmessungen (unabhängig von der Therapiephase) und zur Berechnung des Voraussagefehlers auch unter Nicht-Steady-State Bedingungen.

Die wesentliche und für das TDM von Phenytoin gegenüber bisher beschriebenen Dosierungshilfen neue Eigenschaft dieses Computerprogrammes ist die Möglichkeit, Dosierungsanpassungen aufgrund von Nicht-Steady-State Messungen zu berechnen.
Die Verknüpfung mit dem Bayes Theorem und den damit bereits im System vorhandenen kinetischen Populationsdaten ist deshalb interessant, weil bereits mit einem einzigen Dosis-Serumspiegel-Datenpaar eine Voraussage respektive eine Dosisempfehlung, gemacht werden kann, die sich einerseits auf populationskinetische Daten stützt und andererseits bereits die individuellen Daten des Patienten in die Berechnung einfliessen lässt.

Ein zentraler Punkt für die Brauchbarkeit einer Berechnung mittels Bayesian Forecasting (siehe 3.1.6.1. Die Bayes-Statistik) sind die verwendeten Populationsdaten. Bei Phenytoin ist dies speziell schwierig, weil grosse interindividuelle Unterschiede bestehen, die Parameter abhängig vom Alter und der Herkunft der Patienten sind und die Kinetik nicht-linear, das heisst konzentrationsabhängig ist (siehe 3.2.3.1.3. Metabolismus).
Die verwendeten Populationsdaten (siehe 5.1.6.2. Programm zur Dosisanpassung) stimmen während der ersten 5 Therapietage (standardisierte Phase) mit den gefundenen Patientenparametern gut überein :
Der mit den Populationsdaten allein berechnete Voraussagefehler (PE; Definition siehe später) der Serumspiegel betrug nach

- 16 Stunden : -1.8 ± 4.17 mg/L
- 4 Tagen 0.75 ± 6.61 mg/L
- 5 Tagen 2.02 ± 6.72 mg/L

Der Voraussagefehler war zu allen drei Zeitpunkten klein, die gefundenen Populationsdaten entsprachen also etwa den Vorgaben (siehe auch Tabelle 29 a). Bei der Berechnung des PE des 4. Spiegels, dem ersten Serumspiegel nach der ersten individuellen Dosisanpassung, zeigte sich ein sprunghafter Anstieg auf 9.13 ± 9.83 mg/L. Spiegel 4 wird also aufgrund der Berechnung mit den Populationsdaten allein, viel zu hoch eingeschätzt (vergleiche Tabelle 29 a; für Serumspiegel 5 siehe Tabelle 31 a)

Ein weiterer Vorteil dieses Computerprogramms liegt in der Möglichkeit, eigene Grundlagen für eine Berechnung von Populationsdaten zu erhalten. Der Vergleich zwischen den eingesetzten, im Steady-State bei 105 Nordeuropäern erhobenen[66], sowie den gefundenen (Nicht-Steady-State-) Populationsdaten zeigt, dass durch eine Anpassung der Parameter an die untersuchte Population durch ein zur Berechnung von Populationsdurchschnitten geeignetes Computerprogramm[152] (z.B. NONMEM) geringere Voraussagefehler gefunden werden könnten :

Tabelle 44

Phenytoin-TDM mittels Bayesian Forecasting :
Vergleich zwischen vorgegebenen[66] Steady-State- (n= 109 Patienten) und berechneten Nicht-Steady-State- (n=68 Patienten) Populationsdaten

	vorgegebenen[66] (Steady-State)	berechnet Nicht-Steady-State) nach 16 h	nach 4 Tagen	nach 5 Tagen
Vd [L/kg KG] ± SD [%]	1.0 ± 23	0.9 ± 28	0.9 ± 28	0.9 ± 28
v_{max} [mg/kg KG/Tag] ± SD [%]	32.4 ± 20	32.0 ± 11	34.8 ± 16	36.5 ± 19
K_m [mg/L] ± SD [%]	5.7 ± 51	5.7 ± 5	5.2 ± 14.4	5.0 ± 19

Dieser direkte Vergleich ist nur bedingt aussagekräftig, da Steady-State- und Nicht-Steady-State-Daten verglichen werden. Zusätzlich sind die berechneten Populationswerte durch die

im Bayesian Forecasting-Programm vorgegebenen Daten beeinflusst. Sie wiederspiegeln also die tatsächlichen Werte ungenügend.

Brauchbarkeit des verwendeten Dosierungsprogramms in der Klinik

Der ermittelte Voraussagefehler

Neuere Studien, welche Programme für die Dosisanpassung von Phenytoin untersuchten, sind dank der Arbeit von Sheiner und Beal[146] alle nach dem gleichen Muster ausgewertet : Als Voraussagefehler (PE=Prediction Error) wird der Mittelwert der Differenz zwischen berechneten und gemessenen Spiegeln definiert (siehe Formel 14, Seite 85). Dieser Prediction error täuscht über den tatsächlichen Fehler hinweg, weil sich bei einem einfachen Mittelwert positive und negative Werte gegenseitig aufheben. Er ist aber ein Mass für den "Bias", also den systematischen Fehler des Programms. Er macht eine Aussage darüber, ob die Schätzungen eher zu hoch (positive PE) oder zu tief (negative PE) lagen.
Der tatsächliche Voraussagefehler kann durch das Mittel der absoluten Fehler (mae = mean of absolute errors) oder durch die Quadratwurzel des Mittelwertes der Fehlerquadrate (rmse= root mean squared errors; siehe Formel 15, Seite 85) ermittelt werden.

Der PE für Serumspiegel 4 (212 ± 38 Stunden nach Therapiebeginn; erster Spiegel nach individueller Dosisanpassung), berechnet mit allen vorhandenen Nicht-Steady-State Serumspiegeln war 4.31 ± 3.43 mg/L. Das heisst, dass die Serumspiegel eher zu hoch geschätzt wurden. Der rmse lag bei 6.35 mg/L (siehe Tabelle 28; Seite 112). Für Serumspiegel 5 (PE 2.3 ± 2.26 und rmse 5.4; siehe Tabelle 30, Seite 114) lag der Voraussagefehler bereits etwas tiefer, da mehr Serumspiegelmessungen zur Verfügung standen und dadurch mehr patientenspezifische Daten in die Berechnung einflossen.
Die Auswertung von Serumspiegel 6 (siehe Tabelle 32, Seite 116) ist wegen der geringen statistischen Aussagekraft (n = 9 Patienten) nicht relevant.

Für die verwendete Methodik des Phenytoin-TDM (schnelle Sättigung mit anschliessender individueller Dosisanpassung mittels Bayesian Forecasting aufgrund von Nicht-Steady-State Spiegeln) gibt es keine vergleichbaren Studien. Zwei Arbeiten wurden gefunden, welche eine Dosisanpassung aufgrund von Nicht-Steady-State-Serumspiegel berechneten. Diese Studien waren retrospektiv[10] mit sehr wenig Patientendaten[17] gemacht worden, und der Voraussagefehler wurde im Steady-State bestimmt. Bei keiner dieser Studien wurde mit Patienten gearbeitet, die neu mit Phenytoin eingestellt wurden. Diese Arbeiten verwendeten einen ähnlichen Algorithmus mit Bayesian Forecasting zur Schätzung von individuellen Parametern mit Nicht-Steady-State-Serumspiegeln (siehe Formel 12, Seite 55)[10, 17].

Retrospektiv, aus Krankengeschichten von hospitalisierten Patienten im Steady-State erhobene Daten[10] zeigten einen rmse von 4.38 mg/L (mit 4 Serumkonzentrationen als Feedback). Die Serumkonzentrationsmessungen lagen durchschnittlich 10 Tage auseinander. Patienten, die während der Beobachtungsphase Medikamente neu oder nicht mehr erhielten, die potentiell mit dem Abbau von Phenytoin interagierten, wurden ausgeschlossen.
Da der Voraussagefehler im Steady-State berechnet wurde, die Zeitabstände zwischen den einzelnen Messungen grösser waren und deutlich weniger Patienten untersucht wurden (29 Patienten für 4 Serumspiegel), ist ein direkter Vergleich mit unserer Studie nicht zulässig.

In einer anderen Arbeit[17] wurden insgesamt 7 Patienten mit Nicht-Steady-State Spiegeln in die Studie aufgenommen und in zwei Gruppen eingeteilt (randomisiert). In der ersten Gruppe verordneten Ärzte mit Erfahrung im Einsatz von Phenytoin die Dosisanpassung zum Erreichen eines Zielspiegels, in der zweiten Gruppe wurde die Dosisanpassung mit Hilfe

eines Bayesian Forecasting Programms gemacht. In beiden Gruppen wurde nach einem Monat ein Serumspiegel (Steady-State) gemessen und der Voraussgefehler bestimmt :

Tabelle 45

Voraussagefehler für Phenytoinserumspiegeln im Steady-State :
Vergleich einer computergestützten Bayesian-Voraussage mit ärztlichen Verordnungen

	Anzahl Patienten	PE (Mittel ± SEM)	Absoluter Fehler (Mittel ± SEM)
Ärzte	3	2.93 ± 6.88	10.13 ± 0.57
Computer	4	2.15 ± 1.29	2.60 ± 0.98

SEM = Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwerts)

Trotz der wenigen Daten kann ein deutlicher Unterschied zwischen der Dosierung mit und ohne Programm festgestellt werden : Die Voraussage der Aerzte war um rund 80% (absoluter Fehler) ungenauer als jene des Forecasting Programms.

Mit Bayesian Forecasting verbessert sich die individuelle Voraussage mit jedem zusätzlichen Serumspiegelwert.

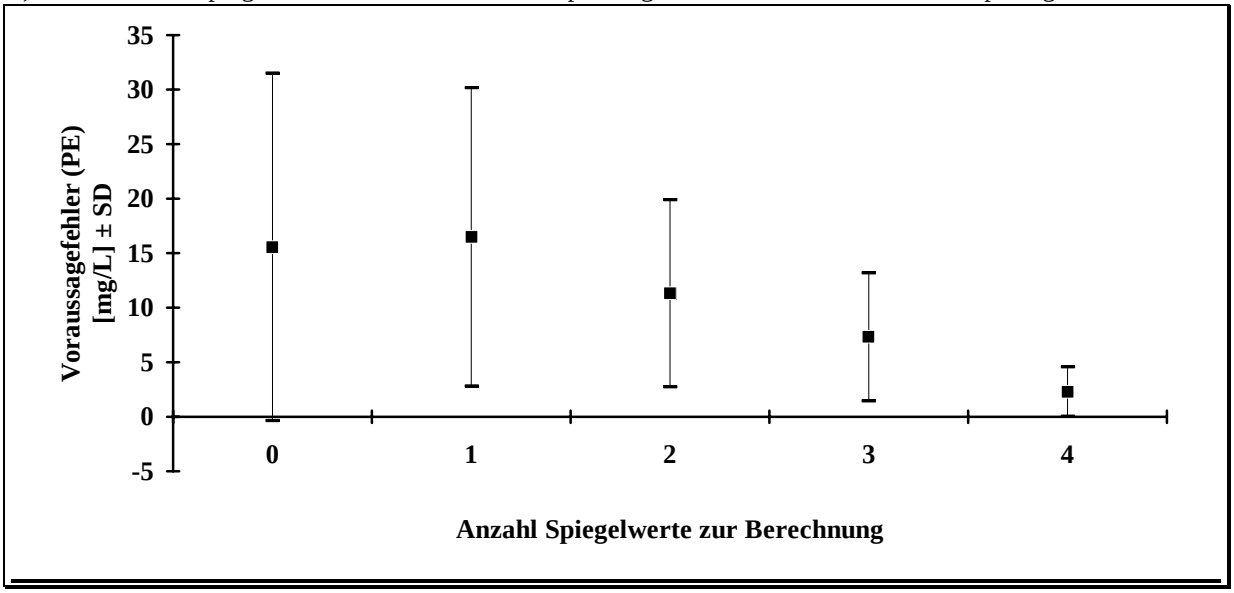
Wieviele Serumspiegelmessungen sind zur Berechnung der individuellen Dosis notwendig ?

Der Voraussagefehler für Spiegel 4 (erster Serumspiegel nach individueller Dosisanpassung) wurde bei den gleichen Patienten unter Weglassen einzelner Serummesswerte berechnet und nach den gleichen Kriterien (PE; rmse) ausgewertet (siehe Tabelle 28, Seite 112, Tabelle 29 a, b und c). Es zeigte sich, dass die Voraussage unter Zuhilfenahme aller 3 Serumspiegel in der ersten Phase (Tag 1 bis 5) am besten ist. Das gleiche Bild zeigt sich für die Voraussage von Spiegel 5 (siehe Tabelle 30, Seite 114, Tabelle 31 a, b und c). Je besser die im Programm eingesetzten Populationsdaten mit den tatsächlich eingetretenen Verhältnissen übereinstimmen, desto weniger Serumspiegel sind nötig, um die Dosis individuell anzupassen.
Aus diesen Resultaten geht hervor, dass die Voraussage besser wird, je mehr Serumspiegelmessungen in klinisch relevanten Zeitabständen (ca. 1 Woche) für die Berechnung zur Verfügung stehen; entsprechend grössere Anteile der Patientenpopulation liegen mit ihren Phenytoinserumkonzentrationen innerhalb des definierten Vertrauensintervalls.

Abbildung 34

Bayesian Forecasting eines Phenytoinserumspiegels ca. 2 Wochen nach Therapiebeginn[a]: Abhängigkeit des Voraussagefehles von der Anzahl der verwendeten Serumspiegelmessungen

a) Zweiter Serumspiegel nach individueller Dosisanpassung; 351 ± 51 Stunden nach Therapiebeginn; n = 27



0 : Populationsdaten
1 : Populationsdaten und Spiegel 1*
2 : Populationsdaten und Spiegel 1, 2*
3 : Populationsdaten und Spiegel 1, 2, 3*
4 : Populationsdaten und Spiegel 1, 2, 3, 4*
*Serumspiegel 1 bis 3 stammen aus der standardisierten schnellen Aufsättigungsphase.

Durch das Weglassen verschiedener Serumspiegelbestimmungen zu verschieden Zeitpunkten zeigte sich, dass die Varianten ohne die frühen Serumspiegel, namentlich L1 und L2 zur Berechnung der ersten individuellen Dosierung (Spiegel 4; rmse : 7.42 mg/L; siehe Tabelle 28) und ohne Spiegel 1 zur Berechnung der zweiten individuellen Dosierung (Spiegel 5; rmse : 6.0 mg/L; siehe Tabelle 30) die besten waren. Dies ist von der Berechnung her einleuchtend :
Die später nach Therapiebeginn gemessenen Serumkonzentrationen wiederspiegeln die individuelle Abweichung vom Populationsdurchschnitt besser (grössere Streuung der Werte : siehe Abbildung 33, Seite 133) und erhalten für die nach ca. 5 Tagen notwendige Dosisindividualisierung ein grösseres Gewicht.
Falls eine Serumspiegelbestimmung aus praktischen oder oekonomischen Gründen wegfällt, so kann auf die Bestimmung von Serumspiegel 1 (nach 16 Stunden) am besten verzichtet werden. Grundsätzlich ist aber im vorgeschlagenen Aufsättigungsschema bereits ein sinnvolles Minimum von Serumkonzentrationsbestimmungen gewählt, um eine optimale Arzneimittelsicherheit bei der Phenytointherapie zu erhalten. Zudem ist der Spiegel 1 vom Aspekt des Therapieziels, schnell den erwünschten Serumspiegelbereich von 10 bis 20 mg/L zu erreichen, eine wichtige Kontrollgrösse für den behandelnden Arzt.

7.1.2. Altersabhängigkeit der Pharmakokinetik von Phenytoin

(Ein Teil dieser Ergebnisse wurde als Abstract publiziert[153])

Die in der Computersimulation von Vozeh et al.[76] und im Bayesian Forecasting-Computerprogramm verwendeten Populationsdaten stammen von nordeuropäischen Patienten mit einem Durchschnittsalter von ca. 30 Jahren[66]. In jener Studie wurden altersabhängige Veränderungen zwischen Patienten unter 6 Jahren und Patienten über 6 Jahren ausgemacht.
Obwohl das Untersuchungsprotokoll nicht speziell auf diese Fragestellung ausgelegt war, interessierte, ob eine Altersabhängigkeit der Ergebnisse auch zwischen der untersuchten Population mit einem Durchschnittsalter von ca. 50 Jahren und den Studien-Patienten über 65 Jahren bestand.
Obwohl diese Subpopulation zahlenmässig nur schlecht mit der Restgruppe vergleichbar war (n=15 während der ersten 5 Therapietage und n=9 bis zu Serumspiegel 4), war die Konsistenz der Daten offensichtlich :

Phase I : Schnelle, standardisierte Aufsättigung (Therapietag 1 bis 5)

Patientencharakteristik :

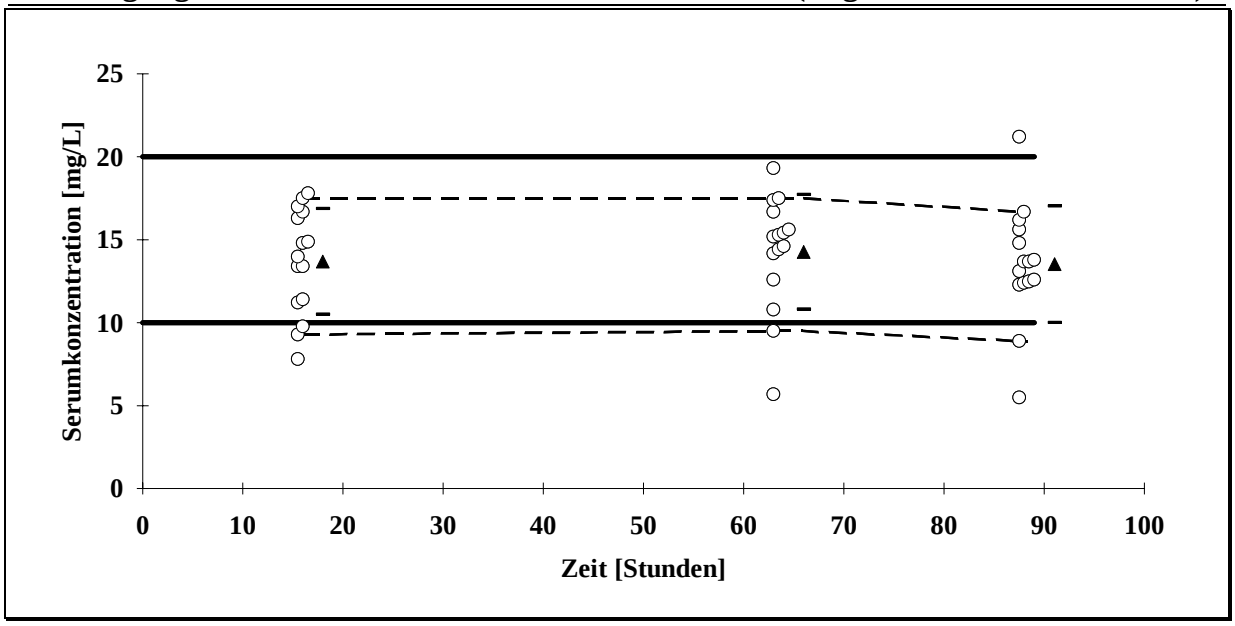
Tabelle 46

Patientengruppen und Durchschnittsalter

auswertbare Patienten	Patienten ≥ 65 Jahre (Mittel ± SD) [Jahre]	n	Studien-Total (Mittel ± SD) [Jahre]	n
nach 5 Tagen	72 ± 4.2	15	50 ± 15.2	68
nach > 5 Tagen	73 ± 3.8	9	51 ± 15.7	37

Abbildung 35

Phenytoin : Serumspiegelverlauf in der Phase der schnellen, standardisierten Aufsättigung bei Patienten, die 65 Jahre und älter waren (Tag 1 bis 5; n = 15 Patienten)



Initialdosis : 15mg Phenytoin/kg KG i.v. über 4 Stunden;
Erhaltungsdosen : alle 12 Stunden (≤ 70 kg 175 mg; > 70 kg 200 mg Phenytoin) i.v. über 15 Minuten;
Serumspiegelmessungen : nach 16 Stunden, am Morgen des 4. und des 5. Tages jeweils unmittelbar vor der Dosisverabreichung.

Grenzen des gewünschten therapeutischen Bereichs
90% Intervall der Resultate
▲ Mittelwerte;
- ± Standardabweichungen von Mittelwert.

Tabelle 47

Phenytoin-Serumspiegel nach schneller, standardisierter i.v. Aufsättigung bei Patienten ≥ 65 Jahre (n = 15 Patienten)

Stunden nach Therapiebeginn	Serum konzentrationen [mg/L] 10 bis 20	< 10	> 20	Mittelwert± SD
16	80.0 %	20.0 % (7.8-9.8)	0.0 %	13.7 ± 3.2
64 - 76	86.7 %	13.3 % (5.7-9.5)	0.0 %	14.3 ± 3.5
88 - 100	79.9 %	13.3 % (5.5-8.9)	6.7% (21.2)	13.5 ± 3.5
Steady-State*	33.3 %	20.0 %	46.7 %	

* theoretisch, berechnet bei gleichbleibender, standardisierter Erhaltungsdosis

Trotz der wenigen Daten lässt sich vermuten, dass Patienten ≥ 65 Jahre, gemessen an der Gesamt-Serumkonzentration (frei und proteingebunden), gegenüber jüngeren Patienten (ca. 50 Jahre) zumindest während der Initialphase der Therpie keine veränderte Phenytoin-Pharmakokinetik zeigen (vergleiche Tabelle 26).

Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde ein zweiseitiger F-Test (Signifikantsschranke p = 0.1; Wahrscheinlichkeit der Gleichheit der Varianzen > 90%) durchgeführt (Excel 5.0, Microsoft Corporation, Redmont Washington USA), da dieser Test nicht die Mittelwerte (die in diesem Fall unerheblich sind), sondern die Varianz der beiden Stichproben vergleicht[154]: Die Varianzen der beiden Grundgesamtheiten sind initial (nach 16 Stunden) signifikant verschieden (p = 0.23). Nach 4 (p = 0.09) und nach 5 Tagen (p = 0.03) sind die Unterschiede nicht mehr signifikant.
Für eine genauere Analyse müsste jedoch die Beurteilung mit zwei vergleichbaren Patientengruppen (ähnlich grosse Zahl von Patienten) beider Altersklassen wiederholt werden.

Phase II : Individuelle, spiegelorientierte Dosierung
(Voraussagefehler des Dosierungsprogramms)

Bei der Auswertung des Voraussagefehlers für Serumspiegel 4 (erster Serumspiegel nach individueller Dosisanpassung) zeigte sich, dass sich auch hier die älteren Patienten nicht von den jüngeren unterscheiden (Patientenstruktur siehe Tabelle 47)

Tabelle 48

Phenytoindosierung mittels Bayesian Forecasting mit 3 Serumspiegelmessungen bei erwachsenen jüngeren und älteren Patienten : Voraussagefehler nach individueller Dosisanpassung (Serumspiegel 4; 212 ± 38 Stunden nach Therapiebeginn)

Altersgruppe (Alter ± SD)	**Mittlerer PE ± SD [mg/L]**	**RMSE [mg/L]**	**Anteil Serumspiegel 4 im vorausgesagten 68% Vertrauens-Intervall**
< 65 Jahre n=37 (49 ± 12)	4.28 ± 3.43	6.35	67%
≥ 65 Jahre n= 9 (73 ± 3)	4.43 ± 4.8	6.34	67%

Serumspiegel 1 bis 3 stammen aus der standardisierten schnellen Aufsättigungsphase.

Auch die Unterschiede der Voraussagefehler unter Verwendung nur der vorgegebenen kinetischen Populationsdaten einer Gruppe von jüngeren Patienten[66] (durchschnittlich 30 Jahre), ergaben für beide Gruppen die gleichen Werte.

Zumindest über den beobachteten Zeitraum (Phase I : Therapietag 1 bis 5; Phase II : bis Serumspiegel 4) sind im untersuchten Patientengut keine altersabhängigen pharmakokinetischen Veränderungen zu beobachten. Das Schema zur schnellen, standardiserten i.v. Sättigung mit individueller Dosisanpassung nach Ablauf von 5 Tagen kann also auch für diese Patientengruppe verwendet werden.
Besondere Aufmerksamkeit ist bei der Interpretation der Serumkonzentrationsverläufe dieser älteren Patienten den speziellen Altersgegebenheiten (z.B. veränderte Serumalbuminkonzentration oder Urämie) und der Co-Medikation zu schenken, da diese Altersgruppe in der Klinik durch komplexe und Mehrfach-Morbidität mit einer überdurchschnittlichen Zahl von Medikamenten belastet ist.

7.1.3. TDM mit Bayesian Forecasting in der Klinik

7.1.3.1. „Therapeutische“ Phenytoin-Serumspiegel

Das Ziel dieser Untersuchung war es, ein standardisiertes Sättigungsschema mit anschliessender individueller Dosisanpassung zu überprüfen, und die daraus ableitbaren Forderungen aus dem TDM abzuleiten.

Der „therapeutische Bereich“ von 10 bis 20 mg/L hat einen rationalen Hintergrund und lässt sich aus bisher veröffentlichter Literatur untermauern :
Zur akuten Therapie des Status Epilepticus kann nicht zum vornherein beurteilt werden, welcher Spiegel für einen Patienten effektiv ist. Der Konzentrationsbereich von 10 bis 20 mg/L ist zumindest für die Anfangsphase weitgehend als therapeutischer Bereich belegt und akzeptiert [siehe 3.2.3.2.4. Dosis-Wirkungs (UAW)-Beziehungen (therapeutischer Bereich)].
Die Epilepsieprophylaxe mit unkontrollierten Spiegeln ist nicht erfolgreich[104,105,106]. Mit Spiegeln zwischen 10 und 20 mg/L ist zumindest für einen Zeitraum von 7 Tagen in einer randomisierten doppelblinden Studie belegt worden, dass Phenytoin das Auftreten von Epilepsien nach Schädel-Hirn-Trauma signifikant vermindern kann[107]. Diese Studie ist jedoch nicht schlüssig für die Beurteilung einer längerfristigen Prophylaxe, da Patienten, die einen epileptischen Anfall hatten, jeweils aus der Studie ausgeschlossen wurden. Da fast die Hälfte aller beobachteten Anfälle in der ersten Woche nach der Kraniotomie auftraten, kann abgeleitet werden, dass eine Gabe von Phenytoin dann am effektivsten ist, wenn dieser „therapeutische“ Serumspiegelkonzentrationsbereich möglichst rasch erreicht wird. Dies setzt initial höhere Dosierungen voraus, die aber auch ein entsprechendes Monitoring verlangen.
Zumindest in der Anfangsphase der Phenytointherapie zeigen Serumspiegel zwischen 10 und 20 mg/L als Zielkonzentrationsstrategie eine günsige Nutzen-Risiko-Relation und sind rational begründbar und einfach zu überprüfen.

7.1.3.2. Akzeptanz des TDM-Service für Phenytoin in der Klinik

Eine wichtige Voraussetzung für eine gute Akzeptanz eines Schemas, welches standardmässig eingeführt werden soll, ist dessen Einfachheit.
Der berechtigte Anspruch einfache Schemen verfügbar zu haben, die personenunabhängig, auch in Notfallsituationen und ohne grossen Zusatzaufwand einheitlich für alle Patienten angewendet werden können, ist eine Voraussetzung für eine konstante und hohe Therapiequalität. Dies ist insbesondere in Ausbildungskliniken von grosser Bedeutung.
Die Schemen nach Cranford et al.[97] (Initialdosis von 18 mg/kg KG in 30 Minuten) wegen dem Risiko der möglichen toxischen Spiegel, und Koup et al.[112] (Abschätzung der Clearance aufgrund von Serumspiegelmessungen nach 2 und 24 Stunden), wegen der komplizierten Anwendung, genügen diesem Anspruch nicht. Andere erfüllen die gestellten Anforderungen nicht, z.B. rasch in einen Bereich von 10 bis 20 mg/L zu kommen[9, 66, 69, 115, 116, 117]. Insbesondere fehlen aber allen Schemen mathematisch korrekte Grundlagen zur Dosisindividualisierung aufgrund von Nicht-Steady-State-Spiegeln.
Das vorgestellte Schema erfordert für die standardisierte Aufsättigungsphase nur die Kenntnis des Körpergewichtes, damit die Initialdosis nach Gewicht dosiert werden kann. Vor allem dank der computergestützten Ausgabe der Verordnungsblätter, die für jeden Patienten individuell erstellt wurden (siehe 5.1.5.3.1. Erfassungsblätter und Protokolle), konnten die zu Beginn der Studie gehäuft aufgetretenen Applikationsfehler weitgehend verhindert werden.
Die exakte Angabe der Medikamentenapplikation für den Pflegedienst ist ein häufig missachtetes Verordnungsprinzip.

Der Nutzen des Phenytoin-Monitoring und der Untersuchung musste immer wieder durch gezielte Gespräche und Weiterbildungen den einzelnen Kliniken „verkauft“ werden. Dies hatte verschiedene Gründe :

1. Die eingesetzte, gewichtsadaptierte Initialdosis des neuen Schemas lag in den meisten Fällen höher als „übliche“ Initialdosen und wurde im Gegensatz zum bisherigen Schema über 4 Stunden, statt wie bisher verteilt über 24 Stunden verabreicht. Die Verträglichkeit der Verabreichung (Blutdruckabfall etc.) erfordert eine standisierte Infusionsdauer.

2. Das Drug Monitoring muss, zumindest in der Anfangsphase der Therapie, von regelmässigen Serumspiegelbestimmungen unterstützt werden. Die Zeiten der Serumentnahmen mussten genau eingehalten werden. Die spezielle Problematik der Phenytointherapie erfordert ein starres Vorgehen, das durch das informierte Pflegepersonal mitgetragen werden muss.

3. Die Studie machte keine Aussage darüber, ob die Epilepsieprophylaxe mit Phenytoin für den einzelnen Patienten vorteilhaft war oder nicht (Therapieziele).

4. Das Verständnis für die spezielle Problematik der Phenytoindosierung war meistens nicht vorhanden; für viele behandelnden Ärzte war die Therapieüberprüfung mittels Serumkonzentrationsmessungen kein routinemässig durchgeführtes Verfahren und die Dosisanpassung erfolgte meistens nach einer „trial-and-error“-Methode.

7.1.3.3. Rolle des Spitalapothekers beim Therapeutic Drug Monitoring

Aus der Klinik war die Meinung zu vernehmen, dass das Monitoring vereinfacht würde, wenn die Berechnung der individuellen Parameter direkt von den Ärzten oder dem Pflegepersonal auf der Station übernommen werden könnte.
Das hier verwendete Programm wurde mit einigen Anpassungen anwenderfreundlicher gestaltet, trotzdem verlangt das Eingeben der Daten Zeit und Übung und ist nicht in einem Schnellkurs zu erlernen, wie das auch bei anderen Dosierungsprogrammen, wie zum Beispiel dem TDx®-Programm von Abbott, der Fall ist. Auch bei Programmen mit höherem Eingabekomfort ist eine richtige Interpretation der Daten wesentlich.
Die richtige Interpretation der Daten und die Anpassung der Phenytoindosierung erfordert spezielles Fachwissen und Erfahrung, von der Applikation verschiedener Arzneiformen, zu speziellen Aspekten der Kinetik, inklusive möglicher Interaktionen, bis hin zu den Problemen der analytischen Serumspiegelbestimmung. Der Apotheker (oder der klinische Pharmakologe), der mit der Aufgabe eines zentralen Drug Monitoring, etwa von Phenytoin betraut ist, kommt, wegen der grösseren Anzahl Fälle, schneller zu Routine und Erfahrung und kann die Interpretation der Daten, insbesondere in kritischen Fällen, effizienter und unabhängiger durchführen. Die Aufrechterhaltung eines Standards für die Klinik ist für einen zentralen Dienst einfacher und oekonomischer.
Der Apotheker hat eine naturwissenschaftliche und medikamentenbezogene Ausbildung. Duch diese Grundlagen hat er sich Kenntnisse sowohl über analytische Messmethoden und deren Resultate, Aussagekraft, Limiten und Fehlermöglichkeiten (im Labor oder bei der Blutentnahme), als auch über die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik und über die Eigenschaften der galenischen Formen des Arzneistoffs erworben. Als eigenständige unabhängige Fachperson, aber auch als Verantwortlicher der Arzneimittel-Logistik bringt er eine zusätzliche Betrachtungsweise in ein TDM ein (Interpretation der Daten), die er in Zusammenarbeit mit den diagnose- und therapieverantwortlichen Ärzten und dem analytischen Labor interdisziplinär und patientenorientiert nutzbar machen kann.

7.1.3.4. Kosten-Nutzen Ueberlegungen zum TDM von Phenytoin

1993 wurden im Zentrallabor der untersuchten Klinik 874 Phenytoinserumspiegel bestimmt, davon standen ca. 150 Messungen (17 %) im Zusammenhang mit unserer Untersuchung. Der Gesamtverbrauch von Phenytoin-Natrium (in Form von Ampullen, Kapseln oder Suspension) betrug 3.6 kg oder ca. 1700 mg pro 100 Patiententage im untersuchten Spital, das heisst, falls die durchschnittliche Tagesdosis 400 mg betrug, jeder 25. Patient mit Phenytoin behandelt wurde. Rund 300 g (8.3%) wurden in der Studie verwendet.
Aus diesen Zahlen kann interpretiert werden, dass die Phenytointherapie im Spital relativ häufig ist, und dass die schnelle i.v. Aufsättigung nur einen kleinen Anteil des Phenytoin-Patientengutes betrifft, dafür aber doppelt soviele Serumspiegelmessungen gemacht werden. Aus eigenen Beobachtungen in der Klinik muss geschlossen werden, dass Serumspiegelmessungen üblicherweise nur dann gemacht werden, wenn sichtbare Probleme auftreten (Epilepsie, UAW). Über die Rationalität solcher Laborbestimmungen, respektive deren Nutzen ausserhalb des untersuchten Dosierungsschemas, können keine Aussagen gemacht werden.
Aufgrund unserer Studie konnte der Apotheker-Arbeitsaufwand berechnet und daraus indirekte Schlüsse auf Kosten-Nutzen gezogen werden.

Zeitaufwand

Es wurden verteilt auf rund 2 Jahre 96 Patienten in die Studie aufgenommen, bei welchen durchschnittlich 4 Serumspiegelbestimmungen gemacht wurden.

Der Zeitaufwand für das TDM, exklusiv der Laborbestimmung betrug pro Serumspiegel zirka 30 Minuten (Gesamt-Zeitaufwand : 192 Stunden) und beinhaltete folgendes :

- Kontaktaufnahme mit dem Labor mit häufig aktiver Beschaffung der Resultate der Serumspiegelmessung.
- Eingabe der Daten (PC) für die Berechnung der individuellen pharmakokinetischen Parameter und Interpretation der Daten
- Dokumentation und statistische Erfassung der Daten und unerwarteter Ereignisse,
- Kontakt mit und Beratung von Pflegepersonal und Aerzten.
- Abklärung der Komedikation sowie der Laborparameter auf der Station
- Verlaufskontrolle im Kardex (Patientenkontrollblatt auf der Station) und der Krankengeschichte

Die Einhaltung des TDM für Phenytoin war wesentlich von der aktiven Intervention des Apothekers abhängig.
Bei Annahme eines durchschnittlicher Stundenlohn eines Apotheker-Assistenten im Spital von ca. 55 Franken (inkl. Sozialleistungen, Ferien und Krankheit) beliefen sich die Kosten für den TDM-Service auf ca. 110 Franken pro Fall (oder pro Serumspiegelmessung auf ca. 28 Franken). Zusätzlich wurde durch das Zentrallabor pro Serumspiegelbestimmung ca. 40 Franken verrechnet. Die direkten Kosten für ein solches TDM belaufen sich also pro Prophylaxefall auf ca. 270 Franken. Diese Kosten müssen in Relation zum Therapie- und Patienten-Nutzen sowie zur Arzneimittelsicherheit mit diesem in der Handhabung schwierigen Medikament gesehen werden.

Einsparungen und Nutzen Analyse

Einsparungen können durch ein verbessertes Verständnis für die spezielle Problematik der Phenytointherapie bei den Ärzten und dem Pflegepersonal und der dadurch besseren Akzeptanz und Effizienz des Phenytoin-TDM in der Klinik erzielt werden (kleinerer Apothekeraufwand). Direkte Einsparungen können auch durch bessere Standardisierung der Serumspiegelkontrollen (Häufigkeit und Zeitpunkt) gemacht werden.
Aus einer in den USA durchgeführten Kosten-Nutzen-Analyse bei Phenytoin wurden durch die Einführung eines TDM-Service Kosten gespart, weil dadurch viele unnötige Laborbestimmungen und viele unnötige oder falsche Dosisanpassungen verhindert werden können[155]. Mit der zusätzlichen Anstellung eines Apothekers, der das Monitoring von 4 Arzneistoffen betreute, konnte so bereits im ersten Jahr 100 US$ eingespart werden. In dieser Studie wurden die indirekt eingesparten Kosten (Folgekosten der nicht optimierten Therpie) nicht in Betracht gezogen.

Die Kosten-Nutzen-Relation ist abhängig davon, welches Ziel mit dem Einsatz von Phenytoin verfolgt werden soll :
Wenn das Ziel des TDM lautet, den Patienten, bei gegebener Indikation, bei der schnellen i.v. Phenytoin-Aufsättigung nur labormässig und ohne Intervention zu dokumentieren, so entstehen mit dem Therapeutic Drug Monitoring vor allem hohe direkte Kosten mit einem geringen direkten Nutzen.
Demgegenüber steht das eigentliche Therapieziel, jeden Patienten mit entsprechender Indikation pharmakologisch wirksam, aber nicht-toxisch zu behandeln : Zielkonzentrations-strategie mit dem Grundsatz : „dem richtigen Patienten, die richtige Dosis, zur richtigen Zeit“.

Die in der Studie von Temkin et al. [107] gefundene Zahl einer 73% igen Abnahme der Inzidenz von epileptischen Anfällen bei einer adäquaten Behandlung mit Phenytoin zur Epilepsieprophylaxe (3.6 % epileptische Anfälle mit Phenytoin n=208; 14.2 % mit Placebo n=196) zeigt, dass mit einer richtigen Dosierung auch indirekte und Langzeitkosten (Verhinderung von zum Teil lebenslänglicher Epilepsiebehandlung) gespart werden können (Medikamente, Blutspiegelkontrollen, Behandlung, soziale und volkswirtschafliche Folgen aus der Krankheit etc.). Die so anfallenden Kosten werden jedoch nicht dem Budget des Spitals, sondern den allgemeinen (Gesundheits-) Kosten gutgeschrieben oder belastet und sind deshalb nur schwierig detailliert zu erfassen.

7.2. Phenytoin und seine Laborbestimmung

Ziel dieses Teils der Untersuchung war die Überprüfung des in der Routinebestimmung benutzten EMIT-Tests mittels einer geeigneten, einfachen HPLC-Methode. Neben der Richtigkeit und Präzision interessierte auch die mögliche klinische Relevanz einer Beeinflussung der EMIT-Methode durch strukturverwandte Substanzen (p-HPPH und Phenobarbital). Weiter war es das Ziel, eine einfache Bestimmungsmethode zu etablieren, die die getrennte Bestimmung der Enantiomere R- und S-p-HPPH (Phenytoin-Hauptmetaboliten) im biologischen Material mittels HPLC erlaubte.

7.2.1. Gleichzeitige Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH mittels HPLC

Die in Anlehnung an die Methode von Vree et al.[132] verwendete HPLC-Bestimmung erlaubte die direkte Quantifizierung von Phenytoin und p-HPPH ohne aufwendige Probenvorbereitung (vergleiche 5.2.2.3.). Im Gegensatz zu den bisher publizierten Methoden[133, 133, 135] war diese für die Bestimmung einer grösseren Anzahl Serum- und Urinproben und gleichzeitig als Abtrennungsmethodik für die Bestimmung von R- und S- p-HPPH geeignet.

Probenaufbereitung

Zur Bestimmung der gesamten p-HPPH-Konzentration im Serum und im Urin wurde den Proben β-Glucuronidase (Typ VIIa, validiert durch Vree et al. [132]) zur Abtrennung der Glucuronsäure zugegeben. Beim Serum-pH (7.4) konnte die Reaktion ungehindert ablaufen. Da der Urin-pH von Probe zu Probe unterschiedlich ist, wurde den Urinproben Phosphatpuffer pH 6.8 zugegeben, um die Deglucuronidierungsreaktion unter optimalen, standardisierten Bedingungen ablaufen zu lassen.
Die Urinproben bedurften keiner weiteren Aufbereitung und konnten anschliessend direkt quantifiziert werden.
Da die Serumproben Proteine enthalten, die bei der HPLC-Analytik hinderlich sind (Proteinbindung von Phenytoin), wurden diese mittels Acetonitril ausgefällt und abzentrifugiert. Es wurden nur geringe Probevolumen von 0.2 respektive 0.5 mL benötigt.

Wahl des internen Standards

Als interner Standard wurde Hexobarbital gewählt. Diese Substanz ist mit Phenytoin und p-HPPH strukturverwandt und zeigt ein vergleichbares chromatographisches Retentionsverhalten. Zudem wird Hexobarbital therapeutisch kaum mehr verwendet, so dass eine mögliche Interferenz über diesen Weg ausgeschlossen werden kann.
Die HPLC-Peaks einer 0.015 mM Hexobarbital-Lösung zeigen eine ähnliche AUC wie die HPLC-Peaks einer Lösung von 15 mg Phenytoin/L, entspricht also ca. einer therapeutischen Phenytoinkonzentration.

Serum-Messungen

Im Serum dominiert die Konzentration von Phenytoin gegenüber von p-HPPH, welches meistens in der glucuronidierten Form, in einer sehr geringen Menge vorliegt (1 - 2 mg/L).

Linearität

Die verwendete HPLC-Methode erlaubte die gleichzeitige und parallele Bestimmung sowohl von Phenytoin als auch seines Hauptmetaboliten (p-HPPH) in einem linearen Bereich von 1 bis mindestens 60 mg/L für Phenytoin und von 1 bis mindestens 35 mg/L für p-HPPH (in vitro versetzte Proben), also deutlich über den üblichen, in Patienten vorgefundenen Konzentrationen.

Präzision

Die gemessenen Proben zeigten für gegebene Phenytoinkonzentrationen kleine Unterschiede in den Variationskoeffizienten. Die Resultate (Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen) bei tiefen Konzentrationen (1 - 2 mg/L) zeigten grössere Variationskoeffizienten (zwischen 10.5 und 14.7 %; Tabelle 13, Seite 94) als höheren Konzentrationen (0.6 bis 7%). Diese Unterschiede sind darauf zurückzuführen, dass das „Rauschen“ der Basislinie bei abnehmender Konzentration an Bedeutung gewinnt und so das Resultat beeinflusst. Doch zeigten die Messungen eine gute Reproduzierbarkeit (Präzision).

Die Bestimmung von p-HPPH im Serum (1 bis 35 mg/L; Tabelle 18) zeigte, ausser beim tiefsten Messwert (1 mg/L; Verteilungskoeffizient = 28%), kleine Variationskoeffizienten (0.6 bis 10.3%). Im tiefen Konzentrationsbereich (1 bis 5 mg/L) hat das "Rauschen" der Basislinie ebenfalls einen Einfluss auf die Messresultate (Variationskoeffizienten von 1.6 bis 10%).
Trotzdem ist auffällig, dass die Variationskoeffizienten fast über den gesamten Konzentrationsbereich in etwa konstant sind. Die Resultate sind also besonders im Vergleich zu den Bestimmungen im Urin, besser reproduzierbar (Tabelle 20).

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Messungen von Phenytoin im Serum wurde „in vitro“ überprüft.
Die Wiederfindungsrate lag mit 110.2 % ± 34.5 (n = 14; Tabelle 14) hoch. Bei einem Ausschluss des ersten Datenpunktes, was gemäss 4-Sigma Test[148] nicht erlaubt ist, würde die Wiederfindungsrate bei 101.2 ± 4.2 (n=13) liegen. Durch das Vorliegen eines einzelnen zusätzlichen Messpunktes im Bereich einer Wiederfindungsrate von 100% hätte die Standardabweichung reduziert und der erste Datenpunkt somit eindeutig als Ausreisser identifiziert werden können. Darum kann gefolgert werden, dass durch die HPLC-Methode zur Bestimmung von Phenytoin im Serum richtige Resultate erzielt wurden.

Die Richtigkeit der Messungen von p-HPPH im Serum wurde ebenfalls „in vitro“ bestimmt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate war mit 121.6 % ± 42.3 (Tabelle 19) hoch, was auch mit den durchschnittlich grossen Variationskoeffizienten zusammenhängt.

Urin-Messungen

Im Urin dominiert, im Gegensatz zum Serum, die Konzentration von p-HPPH gegenüber dem lipophileren Phenytoin (siehe 3.2.3.1.3. Metabolismus). p-HPPH liegt vorallem als p-HPPH-Glucuronid, der Hauptexkretionsform von Phenytoin vor.

Linearität

Die verwendete HPLC-Methode erlaubt die Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH im Urin ebenfalls linear von 1 bis mindestens 60 mg/L für Phenytoin und von 1 bis mindestens 35 mg/L für p-HPPH (in vitro versetzte Proben).

Präzision

Analog der Serumbestimmung zeigten die gemessenen Urinproben für Phenytoin bei gegebenen Konzentrationsverhältnissen kleine Unterschiede der Variationskoeffizienten. Die Resultate (Mittelwerte aus jeweils 3 Messungen) zeigten bei tiefen Konzentrationen (1 - 2 mg/L) grössere Variationskoeffizienten (zwischen 9.6 und 13.6 %; Tabelle 15) als bei höheren (3 - 35 mg/L; 0.3 bis 3%). Die Messungen konnten gut reproduzierbar durchgeführt werden.
Bei der Bestimmung von p-HPPH im Urin (Tabelle 20) war auffällig, dass die Werte der Stammlösung E (siehe Tabelle 11), im Vergleich zur Stammlösung F, über den ganzen Konzentrationsbereich sehr stark schwankten. Eine Möglichkeit der Erklärung konnte in der Lage des Urin-p-HPPH Peaks gefunden werden (Abbildung 22 a, Seite 92). Der gesuchte Peak kann bei dieser einfachen Probenaufbereitung vom hydrophilen „Ballast“ im Urin beeinflusst werden. Die Quantifizierung von p-HPPH nach dieser Methode hängt also in einem grossen Mass von der Zusammensetzung des Urins ab.

Richtigkeit

Die Richtigkeit der Messungen für Phenytoin im Urin (Wiederfindungsrate „in vitro“) betrug 99.8 % ± 6.6 (Mittelwert ± SD). Die Richtigkeit der Messungen von p-HPPH im Urin wurde ebenfalls „in vitro“ bestimmt. Die Wiederfindungsrate war mit 100.7 % ausgezeichnet, zeigte aber einen grossen Variationskoeffizienten (16.2 %; Tabelle 21).

Zeit- und Materialaufwand

Die Methode zur Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin erfordert, bei richtiger Anwendung, einen relativ geringen Zeit- und Materialaufwand. Sie ist jedoch nur für die Messung einer grossen Serie von Proben sinnvoll einsetzbar, da weniger die Probenvorbereitung als vielmehr die Vorbereitung des Messgerätes (Vorbereitung der Laufmittel, Äquilibrierung der HPLC-Säule, Aufwärmen des Dioden-Array-Detektors) viel Zeit in Anspruch nimmt.

Die Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH in Serum und Urin nach der Aufbereitung mit β-Glucuronidase ist mit der beschriebenen isokratischen HPLC-Methode (Phosphatpuffer-Acetonitril-Methanol-C18 HPLC mit Internem Standard und Dioden-Array-Detektion) reproduzierbar, richtig und spezifisch. Die Werte von p-HPPH sind im tiefen Konzentrationsbereich mit Vorsicht zu interpretieren und sind insbesondere im Urin auch abhängig von der Zusammensetzung des biologischen Materials. Für die Abtrennung der chiralen Metaboliten (p-HPPH) ist die Methode geeignet, da der p-HPPH Peak getrennt von den übrigen Substanzen isoliert werden kann (Abbildung 22 a und b).

7.2.2. Überprüfung der EMIT-Bestimmungsmethode für Phenytoin mittels HPLC

Die Genauigkeit von EMIT® (Enzyme multiplied immunoassay technique) Tests wird üblicherweise durch einen Vergleich mit nicht immunologischen Methoden gemessen, da die Qualität eines Enzymimmunotests sehr stark von der Reinheit des für die Immunisierung, die Kalibrierung und die Konjugation verwendeten Antigens sowie der Spezifität des entsprechenden Antikörpers abhängt.
Eine wichtige Voraussetzung für eine Qualitätskontrolle einer Methode ist die Korrelierbarkeit der Resultate. Die Kontroll-Methoden sollten in Bezug auf Präzision, Richtigkeit und Spezifität vergleichbar sein.

Linearität

Mit der EMIT-Methode können Serumspiegelbestimmungen in einem Bereich zwischen 2.5 und 30 mg/L direkt durchgeführt werden[130]. Proben mit einer höheren Serumkonzentration müssen zur Bestimmung verdünnt werden. Tabelle 13 (Seite 94) zeigt, dass die HPLC-Methode eine Messung im linearen Bereich von 1 bis mindestens 62 mg/L zulässt und deshalb wegen der grösseren Linearität als Überprüfungsmethode für den EMIT-Test geeignet ist.

Präzision

Die Reproduzierbarkeit war bei beiden Methoden vergleichbar, tendenzmässig bei der HPLC-Methode leicht besser (HPLC : Variationskoeffizienten von 0.7 bis 3.4 % ; EMIT : Variationskoeffizienten von 1.8 bis 5.5%, Tabelle 34).

Richtigkeit

Die Wiederfindungsrate (HPLC 104.6 % ± 4.04 %; EMIT : 93.9 % ±.2.5; Tabelle 34) fiel beim EMIT etwas tiefer aus. Dieser tiefe Wert wäre durch eine Neukalibrierung oder durch die Einführung eines Korrekturfaktors nach oben zu korrigieren (parallele Verschiebung der Eichgerade nach oben).

Die beiden Methoden korrelierten in der Phenytoin-Quantifizierung sehr gut miteinander :
$r^2 = 0.999$; n= 5 (siehe Abbildung 30)

Spezifität (Cross-Reactivity)

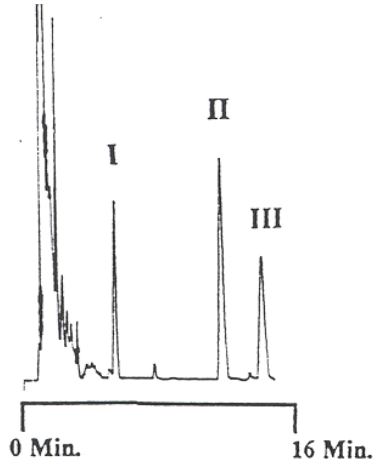
Wie in der Arbeit von Oellerich et al.[131] beschrieben, ist es möglich, dass strukturell verwandte Substanzen die Resultate des EMIT beeinflussen können. Hier wurde untersucht, ob durch den Einfluss von p-HPPH und Phenobarbital klinisch relevante Abweichungen zu finden sind.

Die Konzentrationen von p-HPPH sind im Serum meistens viel niedriger als diejenigen von Phenytoin. Die der Lösung von Phenytoin zugegebenen Mengen von p-HPPH (siehe Tabelle 23) sind also eher hoch gewählt. Die oberste gemessene Konzentration (in vitro) entspricht auch etwa der höchsten gemessenen Konzentration von p-HPPH in vivo (siehe Tabelle 37).
Phenobarbital führt bei einer Serumkonzentration von 40 mg/L zu toxischen Reaktionen[156]. Therapeutische Konzentrationen sind zwischen 10 und 30 mg/L zu finden. Die Einwaagen zwischen 6 und 39 mg/L entsprechen also etwa denjenigen Konzentrationen, die therapeutisch üblicherweise zu finden sind.

Phenobarbital konnte mit unserer HPLC-Methode (siehe 5.2.2.3.) parallel zu Phenytoin bestimmt werden (siehe Abbildung 36).

Abbildung 36

HPLC-Chromatogramm von Phenytoin und Phenobarbital im Serum



I : Phenobarbital k' = 5.2, **II** : Hexobarbital (IS) k' = 9.6, **III** Phenytoin k' = 11.8

Da die Phenytoin-Serumkonzentration gemessen mit EMIT und HPLC gut korrelieren (r^2 = 0.999), sollte der Quotient der mit beiden Methoden bestimmten, identischen Proben konstant und eine allfällige Interferenz (Cross-Reactivity) von Phenobarbital oder p-HPPH einfach eruierbar sein, da die entsprechende Spezifität der HPLC-Methode gross ist.
Sowohl bei der Zugabe von p-HPPH, wie auch von Phenobarbital, liegen die Quotienten der HPLC- zu den EMIT-Resultaten fast vollständig innerhalb des 95% Vertrauensintervalls (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).
Sowohl Phenobarbital, als auch p-HPPH haben also auch bei der EMIT-Bestimmung keinen klinisch relevanten Einfluss auf die Phenytoin-Bestimmung im Serum. Die EMIT-Methode ist deshalb für die Bestimmung von Phenytoin im Serum spezifisch.

In der Arbeit von Oellerich et al.[131] wurde gezeigt, dass p-HPPH, in einer allerdings für Serumbestimmungen unrealistischen Konzentration von 50 mg/L, das Resultat der EMIT-Bestimmung von Phenytoin um 5 mg/L nach oben versetzt. Der Einfluss von Phenobarbital wurde ebenfalls als nicht relevant bezeichnet.

Aufwand der Probenbestimmung

Der Aufwand zur Probenbestimmung ist bei der EMIT-Methode deutlich kleiner als bei der HPLC-Methode :

- Die Blutprobe kann nach der Aufarbeitung zum Serum beim vollautomatischen EMIT-Test direkt, bei der HPLC-Methode erst nach Aufbereitung (Versetzen mit Acetonitril und internem Standard), zur Bestimmung der Phenytoinkonzentration verwendet werden.

- Gerätebedingt bedarf die Messung bei der EMIT-Bestimmung (Aufwärmen der Messlampe) einer wesentlich kürzeren Vorbereitungszeit als die HPLC-Bestimmung (Filtration und Entgasung der Laufmittel, Äquilibrierung der HPLC-Säule, Aufwärmen der Messlampe).

Unsere Untersuchung zeigt sehr gute und damit deutlich bessere Ergebnisse beim geprüften EMIT-Test in Bezug auf die Cross-Reactivity mit p-HPPH gegenüber dem von Oellerich et al. [131] benutzten. Es war auch in der Tendenz kein relevanter Einfluss des Hauptmetaboliten auf die Quantifizierung von Phenytoin festzustellen. In Bezug auf Phenobarbital konnten die Resultate der Literatur[131] bestätigt werden.

7.2.3. Chirale HPLC-Analytik zur Bestimmung von R- und S-p-HPPH im Urin

(Verwendung zur Charakterisierung des Phenytoin-Eliminationstyps)

Die Bestimmungsmethode wurde aus zwei vorher publizierten Methoden zusammengestellt : Die Deglucuronidierung und die Isolierung des p-HPPH Peaks erfolgte nach der leicht geänderten Methode von Vree et al. [132] (siehe 5.2.2.3.), die eigentliche Bestimmung der Konzentrationsverhältnisse nach der ebenfalls leicht geänderten Methode von Eto et al.[138] (siehe 5.2.2.4.).

Die Charakterisierung der Linearität, Spezifität, Präzision und Richtigkeit der Methode zur Probenaufbereitung mittels präparativer HPLC wurde bereits vorher beschrieben (7.2.1. Gleichzeitige Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH mittels HPLC).
Die Methode von Eto et al.[138] verwendete β-Cyclodextrin als Laufmittelzusatz und ist dadurch weniger störanfällig auf Verunreinigungen und deshalb auch billiger als die Methoden, die an die stationäre Phase gebundenes β-Cyclodextrin verwendeten (z.B. Vree et al. [132]).

Linearität

Dieses Vorgehen erlaubte die Bestimmung von R-p-HPPH und S-p-HPPH in einem linearen Bereich von 0.1 bis mindestens 60 mg/L (in vitro versetzte Proben).

Präzision

Die Variationskoeffizienten lagen für R-p-HPPH bei Konzentrationen unter 1.2 mg/L zwischen 4.6 und 28% (siehe Tabelle 22, Seite 104); bei Konzentrationen über diesem Wert lagen sie zwischen 0.3 und 5.4%. Für S-HPPH zeigte sich das gleiche Bild : Proben unter einer Konzentration von 1.2 mg/L hatten Variationskoeffizienten zwischen 10.6 und 19.7 %. Bei höheren Konzentrationen (>1.2 mg/L) lagen sie zwischen 0.3 und 4.7 %. Die Messungen in Konzentrationen über 1.2 mg/L konnten also für R- und für S-p-HPPH gut reproduzierbar durchgeführt werden.

Wegen der Viskositätsunterschiede der beiden HPLC-Elutionslösungen (β-Cyclodextrin-Lösung in Wasser und Methanol), entstand eine regelmässige Auf- und Abbewegung der Basislinie. Vor allem bei sehr geringen Konzentrationen von R-p-HPPH fielen diese ins Gewicht und führten zu grossen Variationskoeffizienten.
Dieses Problem könnte umgangen werden, wenn statt zweier Elutionslösungen ein Gemisch der Beiden gebraucht würde. Damit stellte sich aber das Problem der schnelleren Verdunstung von Methanol gegenüber Wasser und somit einer dauernden Veränderung der Mischverhältnisse im Laufmittel. Da bereits eine kleine Änderung in der Zusammensetzung des Elutionsmittels einen Einfluss auf die Auflösung der R- und S- Peaks hat, wurde auf dieses Vorgehen verzichtet und der Fehler der schwankenden Basislinie in Kauf genommen (siehe Abbildung 26, Seite 103).

Wegen der grossen Konzentrationsunterschiede im Bezug auf R- und S-p-HPPH in vivo, musste darauf geachtet werden, dass die Säule mit S-p-HPPH nicht überladen und der R-p-HPPH-Peak somit nicht mehr sichtbar war; umgekehrt durfte die Konzentration nicht zu tief sein, damit der R-p-HPPH-Peak noch messbar blieb.

Die beschriebene chirale HPLC-Methode (β-Cyclodextrin-Phosphatpuffer-Methanol; C_{18} - Methode mit Dioden-Array-Detektion) ist nach vorgängiger Isolierung von p-HPPH mittels präparativer HPLC (Phosphatpuffer-Acetonitril-Methanol; C18 HPLC) reproduzierbare und spezifisch. Die Messungen der R- und S-p-HPPH Peaks sind im tiefen Konzentrationsbereich (<1.2 mg/L) wegen der auftretenden Datenvarianz mit Vorsicht zu interpretieren

7.3. Phänotypisierung des Phenytoinmetabolismus durch die Korrelation der individuellen Eliminationshalbwertszeit (berechnet im Nicht-Steady-State) mit dem Metabolitenmuster in Urin und Serum

Ziel dieses Teils der Studie war, die retrospektive Untersuchung einer möglichen Korrelation der individuellen Eliminationshalbwertszeiten mit den Konzentrationsverhältnissen von Phenytoin : p-HPPH im Serum oder von R- : S- p-HPPH im Urin.
Im Falle einer Korrelation könnte durch das einfache Messen dieser Metabolitenquotienten im Urin das TDM bereits in der Phase der schnellen Aufsättigung (Therapietag 1 bis 5) verbessert werden, weil dadurch eine Dosianpassung eventuell bereits vor Ablauf der ersten fünf Therapietage realisierbar wäre.

Die individuelle Eliminationshalbwertszeit wurde zu verschiedenen Zeiten aufgrund der mit Bayesian Forecasting geschätzten Parameter (v_{max}, K_m, Vd) und der aktuellen Serumspiegel im Nicht-Steady-State berechnet :

1. Mit den Parametern geschätzt zum Zeitpunkt der Probeentnahme
2. Mit später geschätzten Parametern.

Die erste Berechnung sollte Auskunft darüber geben, ob der aktuelle Eliminationszustand (IST-Zustand) durch das Metabolitenverhältnis (Phenytoin : p-HPPH oder R- zu S-p-HPPH) wiederspiegelt wird. Die zweite Korrelation sollte darüber Auskunft geben, ob aufgrund von später geschätzten Parametern, das heisst solchen, die näher beim Steady-State lagen, der zukünftige Eliminationszustand durch das momentane Metabolitenverhältnis besser erklärbar wurde.

7.3.1. Phenytoin : p-HPPH-Quotient im Serum

Das Konzentrationsverhältnis Phenytoin : p-HPPH korreliert weder mit aktuellen (zum Zeitpunkt der Probeentnahme) noch mit den später im Verlauf der Therapie berechneten Eliminationshalbwertszeiten. Dies gilt sowohl für die ersten 5 standardisierten Therapietage (Tabelle 38 a und b, Seite 126) als auch für Proben, die nach dem 5. Therapietag abgenommen wurden (Tabelle 40 a und b, Seite 128) :
Die Korrelationskoeffizienten (r^2) lagen zwischen 0.001 und 0.336

Die im Gegensatz zu uns von Bourgeois und Wad[88] gefundene Phänotypenkorrelation gilt nur für strikte Steady-State-Bedingungen, das heisst, nur dort wo Phenytoin und p-HPPH gleichzeitig im Steady-State sind. Das Verhältnis von Phenytoin zu p-HPPH verändert sich bis zum Erreichen des Steady-State beider Substanzen laufend :
Die Zeit zum Erreichen des Steady-State von unkonjugiertem p-HPPH ist abhängig von seiner Bildungs- und Eliminationsrate. Die Bildungsrate ist gleich der Abbaugeschwindigkeit von Phenytoin (serumspiegelabhängig) multipliziert mit dem Anteil, der über die Parahydroxylierung metabolisiert wird.
Die Eliminationsrate von unkonjugiertem p-HPPH wiederum ist abhängig von der Glucuronidierungsrate und der renalen Clearance, da auch die Nierenfunktion die Konzentration von p-HPPH im Serum und damit die Zeit zum Erreichen des Steady-State beider Substanzen beeinflusst.

Falls diese Theorie stimmt, wäre zu erwarten, dass, zumindest in Konzentrationen unterhalb des K_m-Wertes für die Glucuronidierung, zwischen der Phenytoindosis und der Gesamtkonzentration von p-HPPH im Steady-State eine lineare Beziehung bestünde. Dies gilt aber nur, wenn die Parahydroxylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, alle anschliessenden Prozesse erster Ordnung und ohne interindividuelle Variabilität sind und der Anteil von Phenytoin, der über die Parahydroxylierung metabolisiert wird, nicht interindividuell verschieden und dosisabhängig ist. Alle diese Voraussetzungen treffen jedoch nur im Steady-State beider Substanzen zu. Deshalb kann dort auch eine gute Korrelation zwischen individueller Eliminationshalbwertszeit und dem Quotienten Phenytoin zu p-HPPH gefunden werden[88].
Da die Kinetik von Phenytoin und p-HPPH nicht identisch ist, sind auch die Zeiten bis zum Erreichen des Steady-State beider Substanzen unterschiedlich, das heisst, dass strikte Steady-State-Bedingungen erst nach Ablauf einer gewissen Zeit möglich sind.

Die Bestimmung des Konzentrationsverhältnisses von Phenytoin zu p-HPPH kann also vor Erreichen des Steady-State beider Substanzen nicht für eine Unterstützung des TDM verwendet werden, was durch die Resultate der Patienten bestätigt wurde.

Somit bleibt die Frage, ob allfällig das Konzentrationsverhältnis der Enantiomere von p-HPPH zusätzliche Hinweise zum Metabolisierungstyp eventuell bereits im Nicht-Steady-State liefern könnte.

7.3.2. Konzentrationsverhältnis R- : S- p-HPPH in Serum und Urin

Die beiden Enantiomere werden gemäss Fritz, Küpfer et al.[54] in gleichem Masse glucuronidiert und haben die gleiche Eliminationshalbwertszeit. Die Bildungsrate ist geschwindigkeits-bestimmend für die p-HPPH-Kinetik. Daraus lässt sich auch ableiten, dass die Eliminationskinetik und somit auch die Zeit zum Erreichen des Steady-State für beide Enantiomere gleich ist. Auf eine Bestimmung des Urinvolumens kann deshalb verzichtet und der Zeitpunkt bis zum Erreichen des Steady-State muss nicht abgewartet werden.

Eine Messung des Quotienten im Serum ist schwierig, weil nur eine sehr kleine p-HPPH-Konzentration vorhanden ist (siehe 6.3.1.). Auf eine Bestimmung des Enantiomerenverhältnisses im Serum wurde auch deshalb verzichtet, weil wegen der gleichartigen Eliminationskinetik der p-HPPH-Enantiomere erwartet werden durfte, dass sich die Verhältnisse in Serum und Urin entsprechen.
Die Isolierung von p-HPPH aus dem Urin ist einfacher, weil die Konzentration wesentlich höher ist.

Das Verhältnis von R- zu S-p-HPPH korreliert weder mit den zum Zeitpunkt der Probeentnahme noch mit den später berechneten Eliminationshalbwertszeiten. Dies gilt ebenfalls sowohl für die ersten 5 Therapietage (Tabelle 41 a und b, Seite 129) als auch für die Proben, die nach dem 5. Therpietag abgenommen wurden (Tabelle 42 a und b, Seite 131) :
Die Korrelationskoeffizienten (r^2) lagen zwischen 0.012 und 0.124

Bei Phenytoin kann nicht von einem eigentlichen genetischen Polymorphismus nach der Definition von Meyer[78] (siehe 3.2.3.1.6. Pharmakogenetische Polymorphismen) gesprochen werden. Dies vor allem deshalb nicht, weil die Inzidenz eines eigentlichen Hydroxylierungsdefekts wie ihn De Wolff et al.[81] gefunden haben, kleiner als 1% ist (1 : 500[82]). Trotzdem gibt es Hinweise, dass der Hydroxylierungsdefekt von Phenytoin vererbbar sein könnte[83].

Beim Debrisoquin- oder S-Mephenytoin-Hydroxylierungsdefekt kann eine strikte phänotypische Gruppeneinteilung aufgrund der Metabolitenverhältnisse im Urin gemacht werden, da sich diese Defekte wegen des praktisch vollständigen Fehlens eines Abbauweges eruieren lassen (ein verantwortliches Allel). Im Gegensatz dazu ist bei Phenytoin diese klare Trennung von schnellen und langsamen Metabolisierern nicht möglich, insbesondere wegen dem Fehlen eines für die Hydroxylierung alleinverantwortlichen Cytochroms.

Gemäss unserer Untersuchung kann der R- : S-p-HPPH-Quotient nicht als Hilfsmittel zur Phänotypisierung des Phenytoin-Hydroxylatortyps herangezogen werden. Die Unterschiede belegen, dass am Metabolismus nicht nur ein einzelnes Enzym beteiligt sein kann, sondern, dass es sich dabei um mindestens zwei, unterschiedlich induzierbare Isoenzyme handeln muss.

8. Schlussfolgerungen

- Ein Phenytoin-Dosierungsschema für eine rasche und gut verträgliche i.v.-Aufsättigung konnte validiert werden. Mit einer Initialdosierung von 15mg/kg über 4 Stunden, unabhängig von der verabreichten Co-Medikation, waren nach 16 Stunden 80% der 68 auswertbaren Klinik-Patienten im Serumkonzentrationsbereich von 10 bis 20 mg/L.

- Die unter einer standardisierten Erhaltungstherapie mit Computersimulation erwartete grosse Variabilität der Phenytoinserumspiegel konnte an Patienten bestätigt werden. Die Streuung nahm im Verlauf der Zeit zu. Rund 1/3 der Patienten lagen nach 5 Tagen unterhalb oder oberhalb des gewünschten Bereichs, so dass spätestens nach dieser Zeit eine individuelle Dosierung notwendig war.

- Durch die Verwendung von Nicht-Steady-State-Serumspiegeln und dem Bayesian-Forecasting Programm mit den von Grasela et al.[66] eruierten Populationsdaten wird die Voraussage der individuellen Pharmakokinetik wesentlich verbessert. Dies gilt auch unter Klinikbedingungen, das heisst, auch für Patienten mit potentiell interagierender Co-Medikation.

- Je mehr Spiegelbestimmungen zur Berechnung der kinetischen Parameter zur Verfügung stehen, desto kleiner wird der Voraussagefehler des getesteten Programms. Bereits drei Spiegelmessungen (nach 16 Stunden sowie am Morgen des 4. und des 5. Behandlungstages) erlauben unter Klinikbedingungen eine sinnvolle, individuelle Dosisanpassung im Anschluss an eine Standarddosierung über 5 Tage.

- Das computergestütze Voraussageprogramm erlaubt eine rationale Planung und Überprüfung der Serumspiegel und Dosierung. Längerfristig erlaubt das Programm den Aufbau eines eigenen, spitalspezifischen Populationsdatensatzes.

- Die Pharmakokinetik von Phenytoin zeigte bei den untersuchten Patienten keine altersabhängigen Unterschiede.

- Der Spitalapotheker kann aufgrund seiner Ausbildung und entsprechender Einarbeitung eine sinnvolle Aufgabe im TDM und der Dateninterpretation übernehmen und so zu einem rationalen und oekonomischen Einsatz der Medikamente im Spital beitragen.

- Eine einfache gleichzeitige Bestimmung von Phenytoin und p-HPPH im Serum und im Urin ist unter Verwendung von β-Glucuronidase zur Deglucuronidierung von p-HPPH mit HPLC einfach durchzuführen. Eine isokratischen Elution mit Phosphatpuffer-Acetonitril-Methanol auf einer C_{18}-Säule und Dioden-Array-Detektion zeigte reproduzierbare und richtige Werte. Die Bestimmung von p-HPPH ist im tiefen Konzentrationsbereich mit grossen Variationskoeffizienten behaftet und deshalb mit Vorsicht zu interpretieren. Die Messungen im Urin sind zudem abhängig von der Zusammensetzung des biologischen Materials.

- Die EMIT- und HPLC-Methode zur Bestimmung von Phenytoin liefern vergleichbar reproduzierbare und richtige Resultate. Weder p-HPPH noch Phenobarbital zeigen unter klinisch relevanten Konzentrationen eine Beeinflussung der Resultate der Phenytoin-bestimmung mittels EMIT (Cross-Reactivity).

- Eine HPLC-Methode zur Bestimmung von R- und S- p-HPPH, im Anschluss an eine Probenabtrennung mittels präparativer HPLC (Phosphatpuffer-Acetonitril-Methanol; C_{18}) unter Verwendung einer C_{18}-HPLC-Methode mit Dioden-Array-Detektion und einem chiralen Elutionsmittel (β-Cyclodextrin-Wasser-Methanol) liefert reproduzierbare Resultate. Die Messungen der R- und S-p-HPPH Peaks sind im tiefen Konzentrationsbereich (<1.2 mg/L) wegen der Nachweisgrenze stärker streuend, aber für die Bestimmung der Konzentrationsverhältnisse von R- : S-p-HPPH noch genügend.

- Die Bestimmung des Quotienten von Phenytoin zu p-HPPH kann vor Erreichen des Steady-State beider Substanzen nicht für eine Unterstützung des TDM verwendet werden, was durch die gefundenen Resultate bestätigt wurde.

- Der R- : S-p-HPPH-Quotient kann ebenfalls nicht als Hilfsmittel zur Phänotypisierung des „Phenytoin-Hydroxylatortyps“ herangezogen werden. Die Unterschiede belegen, dass am Metabolismus nicht nur ein einzelnes Enzym beteiligt ist, sondern, dass mindestens zwei, unterschiedlich induzierbare Isoenzyme verantwortlich sind.

9. Literaturverzeichnis

[1] Mutschler E.:
Beeinflussung von Plasmaspiegel-Zeit-Funktionen
In : Mutschler E. (Hrsg.) : Arzneimittelwirkungen, 6. Auflage, 45 - 46 (1991)
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

[2] Oellerich M.:
Therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic dose prediction methods
Wien. Klin. Wschr. 191 (Suppl.), 12-15 (1992)

[3] Bode-Böger S.M., Böger R.H., Frölich J.C.:
Therapeutisches Drug Monitoring in der Praxis - Indikation und Interpretation
Z. Az. Fortb. 87, 201-210 (1993)

[4] Sheiner L.B., Tozer T.N.:
Clinical pharmacokinetics : The use of plasma concentrations of drugs
In : Melmon K., Morelli F., Hoffman B.B., Niernberg D.W. (Hrsg.) :
Clinical Pharmacology, 2. Ausgabe, 71-109 (1978)
McMillan Publishing, New York

[5] Pindur G., Pindur U.:
Klinisch-chemische Laboratoriumsdiagnostik und Patient
In : Pindur G., Pindur U. (Hrsg.) : Klinische Chemie und serologische Laboratoriumsdiagnostik für Pharmazeuten und Mediziner, 2. Auflage, 23-30 (1991)
Wissenschaftlicher Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

[6] Peheim E.:
Urinsammlung
In : Richterich R., Colombo J.P. (Hrsg.) : Klinische Chemie, 4. Auflage,
91 - 92 (1978), Karger Verlag, Basel

[7] Thomas L.:
Pharmaka (Drug Monitoring)
In : Thomas L. (Hrsg.) : Labor und Diagnose 4. Auflage, 1444-1465 (1992)
Medizinischer Verlagsgesellschaft, Marburg

[8] Holford N. :
Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : The quantitative basis for therapeutics
In : Melmon K., Morelli F., Hoffman B.B., Niernberg D.W. (Hrsg.) :
Clinical Pharmacology, 3. Ausgabe, 309-338 (1992)
McGraw-Hill Inc., New York

[9] Vozeh S., Muir K.T., Sheiner L.B., Follath F.:
Predicting individual phenytoin dosage
J. Pharmacokinet. Biopharm. 9, 131 - 146 (1981)

[10] Killilea T., Coleman R., Ludden T., Peck C.C., Rose D.:
Bayesian regression analysis of non-steady-state phenytoin concentrations : Evaluation of predictive performance
Ther. Drug Monit. 11, 455-462 (1989)

[11] Sheiner L.B., Beal S., Rosenberg B., Marathe V.V.:
Forecasting individual pharmacokinetics
Clin. Pharmacol. Ther. 26, 294 - 305 (1979)

[12] Lenert L., Peck C.C., Vozeh S., Follath F.:
Lidocaine forecastor: A two-compartment bayesian patient pharmacokinetic computer program
Clin. Pharmacol. Ther. 31, 2 (1982)

[13] Burton M.E., Brater D.C., Chen P.S., et al.:
A bayesian feedback method of aminoglycoside dosing
Clin. Pharmacol. Ther. 37, 349-357 (1985)

[14] Martz W., Oellerich M., Schnabel D., Sybrecht G.W.:
Individualization of theophylline dosage : A bayesian method evaluated in patients with once-daily dosing,
Ther. Drug Monit. 13, 420-424, (1991)

[15] Bayes T.:
An essay towards solving a problem in the doctrine of chances.
Philosophical transactions, giving some account of the present undertakings, studies, and labours of the ingenious in many considerable parts of the world
Royal Society London, Vol LIII, (1763)

[16] Oellerich M., Schneider B.:
Single-point method and bayesian approach for individualizing theophyllin dosage
In : Keller H., Trendelenberg Ch. (Hrsg.)
Clinical biochemestry, principles, methods, applications, 2. Auflage, 403-423 (1989)
Walter de Gruyter Verlag, Berlin

[17] Privitera M.D., Homann R.W., Ludden T.M., Peck C.C., Vasko M.R.:
Clinical utility of a bayesian dosing program for phenytoin
Ther. Drug Monit. 11, 285-294 (1989)

[18] Horowitz D.L., Homer L.D.:
Analysis of biomedical data by time-sharing computers.
I. Non-linear regression analysis,
Project No. MR 005:20-0287, Report No. 25
Naval Medical Research Institute, National Naval Medical Centre, Bethesda, Md. 20014

[19] Peck C.C., Barrett B.B.:
Non-linear least squares regression for microcomputers
J. Pharmacokinet. Biopharm. 7, 537-541 (1979)

[20] Albers G.W., Peroutka S.J. :

Neurologic disorders
In : Melmon K., Morelli F., Hoffman B.B., Niernberg D.W. (Hrsg.) :
Clinical Pharmacology, 3. Ausgabe, 309-338 (1992)
McGraw-Hill Inc., New York.

[21] Biltz H.,
Ueber die Konstitution der Einwirkungsprodukte von substituierten Harnstoffen auf Benzil und über einige neue Methoden zur Darstellung der 5,5-Diphenyl-Hydantoine
Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 41, 1379 - 1393 (1908)

[22] Merritt H.H., Putnam T.J., Schwab D.H.:
A new series of anticonvoulsant drugs tested by experiments on animals
Arch. Neurol. Psychiatry 39, 1003 (1938)

[23] Merritt H.H., Putnam T.J.:
Sodium diphenyl hydantoinate in the treatment of convulsive disorders
J. Am. Med. Ass. 111 , 1068 - 1073 (1938)

[24] Rang H.P., Dale M.M. :
Drugs used in treating motor disorders : Epilepsy, parkinsonism and spasticity
In : Rang H.P., Dale M.M. (Hrsg.) : Pharmacology 2nd edition, 684 - 705 (1991)
Churchill Livingstone, Edinburgh

[25] Auterhoff H., Knabe J. :
Hydantoine
In : Auterfoff H., Knabe J. (Hrsg.) :
Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, 11. Auflage
423 - 424 (1983) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

[26] Schwartz P.A., Rhodes C.T., Cooper J.W. :
Solubility and ionization characteristics of phenytoin.
J Pharm. Sci. 66, 994-997 (1977)

[27] Dollery C. :
Phenytoin
In : Dollery C. (Hrsg.) : Therapeutic drugs, volume 2, 93-98 (1991)
Churchill Livingstone, Edinburgh

[28] H. van de Waterbeemd
Vorlesungsskript Pharmazeutische Chemie 1989
Pharmazeutisches Institut der Universität Bern

[29] Auterhoff H., Kovar K.A. :
Phenytoin
In : Auterhoff H., Kovar K.A. (Hrsg.) : Identifizierung von Arzneistoffen, 5. Auflage
261 (1985) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

[30] Reynolds J.E.F.:
Phenytoin-Sodium
In : Reynolds J.E.F. (Hrsg.) : Martindale, 30th edition, 304 - 309 (1993)

The Pharmaceutical Press, London

[31] Glatzko A.J. :
Diphenylhydantoin : Chemistry and methods of determination
In : Woodbury D.M., Penry J.K., Schmidt R.P. (Hrsg.)
Antiepileptic Drugs, 103 -112 (1972), Raven Press, New York

[32] Mikati M., Bassett N., Schachter S.:
Double-blind randomized study comparing brand-name and generic phenytoin monotherapy
Epilepsia, 33, 359-365 (1992)

[33] Soryal I., Richens A.:
Bioavailability and dissolution of proprietary and generic formulations of phenytoin
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 55, 688-691 (1992)

[34] Glatzko A.J., Chang T. :
1,2-Diphenylhydantoin : Absorption, distribution and excretion.
In : Woodbury D.M., Penry J.K, Schmidt R.P. (Hrsg.) :
Antiepileptic Drugs, 127-136 (1972)
Raven Press, New York

[35] Tyrer J.H., Eadie M.J., Sutherland J.M, Hooper W.D. :
Outbreak of anticonvoulsant intoxication in an Australian city
Br. Med. J. 4, 271-273 (1970)

[36] Bauer L.A.:
Interference of oral phenytoin absorption by continous nasogastric feeding.
Neurology 32, 570 - 572 (1982)

[37] Hayes A.G., Chesney T.M. :
Necrosis of the hand after extravasation of intravenously administered phenytoin
J. Am. Acad. Dermatol. 28, 360-363 (1993)

[38] Informationsdienst Warner-Lambert AG, Baar, Schweiz.

[39] C. Schmutz, M. Stump
Mikroskopische Untersuchung der Löslichkeit von Epanutin (Parenteral) in Infusionslösungen
Kantonsspital Aarau, Spitalapotheke, nicht publiziert (1989)

[40] Pfeifle C.E., Adler D.S., Gannaway W.L. :
Phenytoin sodium solubility in three intravenous solutions
Am. J. Hosp. Pharm. 38, 358-362 (1981)

[41] Warner-Lambert (Schweiz) AG
Epanutin
In : Morant J., Ruppaner H. (Hrsg.) : Arzneimittelkompendium der Schweiz 1993
469 (1992) Documed Verlag Basel

[42] Zink C. :
Chorea Sydenham
In : Zink C. (Hrsg.) Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, 256. Auflage
285 (1990) Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York

[43] Dill W., Kazenko A., Wolff L.M., Glazko A.J.:
Studies on 5,5 diphenylhydantoin in animals and man.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 118, 270-279 (1956)

[44] Woodbury D.M. :
Phenytoin : Absorption, distribution and excretion
In : Woodbury D.M., Pentry J.M, Pippenger C.E. (Hrsg.) :
Antiepileptic Drugs, 191-207, 1982, Raven Press New York

[45] Hooper W.D., Bochner F., Eadie M.J., Tyrer J.H.:
Plasma protein binding of diphenylhydantoin. Effects of sex hormones, renal and hepatic disease.
Clin. Pharmacol. Ther. 15, 276-282 (1973)

[46] Rall T.W., Schleifer L.S. :
Drugs effective in the therapy of the epilepsies
In : Goodman Gilman A., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. (Hrsg.) :
The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edition 425 - 462 (1990)
Pergamon Press, New York

[47] Zysset T., Rüdeberg A., Vassella F., Küpfer A., Bircher J. :
Phenytoin therapy for epileptic children :
Evaluation of salviary and plasma concentrations and methods of assessing compliance
Develop. Med. Child. Neurol. 23, 66-75 (1981)

[48] Maguire J.H., McClanahan J.S. :
Evidence for stereoselective production of phenytoin (5,5-diphenylhydantoin) arene oxides in man
Adv. Exp. Med. Biol. 197, 897-902 (1986)

[49] Butler T.C.:
The metabolic conversion of 5,5-diphenylhydantoin to 5-(p-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin
J. Pharmacol. Exp. Ther. 119, 1-11 (1957)

[50] Maguire J.H., Butler T.C., Dudley K.H.:
Absolute configurations of the dihydrodiol metabolites of 5,5-diphenylhydantoin (phenytoin) from rat, dog and human urine
Drug Metab. Dispos. 8, 325-331 (1980)

[51] Thompson R.M., Beghin J., Fife W.K., Gerber N.:
Hydantoin ring glucuronidation: Characterization of a new metabolite of diphenylhydantoin (Dilantin) in the rat and human
Drug Metab. Dispos. 4, 349-356 (1976)

[52] Billings R.E.:
Sex differences in rats in the metabolism of phenytoin to

5-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin
J. Pharmacol. Exp. Ther. 225, 630-636 (1983)

[53] Smith R.G., Daves Jr. G.D., Lynn R.K., Gerber N.:
Hydantoin ring glucuronidation : Characterization of a new metabolite of 5,5-diphenylhydantoin in man and in the rat
Biomed. Mass Spectrom. 4, 275-279 (1977)

[54] Fritz S., Lindner W., Roots I., Frey B.M., Küpfer A.:
Stereochemestry of aromatic phenyotin hydroxylation in various drug hydroxylation phenotypes in humans
J. Chromatogr. Exp. Ther. 241, 615-622 (1987)

[55] Kurz H., Neumann H.G., Wollenberg P., Forth W., Henschler D., Rummel W. :
Allgemeine Pharmakologie
In : Forth W., Henschler D., Rummel W. (Hrsg.) :
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage 1 - 97 (1987), Wissenschaftsverlag, Mannheim

[56] Cholerton S., Daly A.K., Idle J.R.:
The role of individual human cytochromes P450 in drug metabolism and clinical response
Trends Pharmacol. Sci. 13, 434-439 (1992)

[57] Gonzalez F.J.:
Human cytochromes P450 : problems and prospects
Trends in Pharmacol. Sci. 13, 346-352 (1992)

[58] Relling M.V., Aoyama T., Gonzalez F.J., Meyer U.A.:
Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P-450s in the CYP2C subfamily
J. Pharmacol. Exp. Ther. 152, 442-447 (1990)

[59] Veronese M.E., Mackenzie P.I., Doecke C.J., McManus M.E., Miners J.O., Birkett D.J.:
Tolbutamide and phenytoin hydroxylations by cDNA-expressed human liver cytochrome P4502C9
Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 1112-1118 (1991)

[60] Doecke C.J., Veronese M.E., Pond S.M., Miners J.O., Birkett D.J., Sansom L.N., McManus M.E.:
Relationship between phenytoin and tolbutamide hydroxylations in human liver microsomes
Br. J. Clin. Pharmacol. 31, 125-130 (1991)

[61] Jin H.S., Won S.M., Lee M.G., Park S.S., Gelboin H.V., Kim N.D.:
Phenotyping of phenytoin treated rat liver cytochrome P-450 with monoclonal antibodies
Korean J. Toxicol. 7, 1-12 (1991)

[62] Kim N.D., Yoo J.K., Won S.M., Park S.S., Gelboin H.V.:
Phenytoin induction of cytochrome P4502B in mice: effects on hexobarbital hydroxylase activity

Xenobiotica, 23, 217-225 (1993)

[63] Michaelis L., Menten M.L.:
Die Kinetik der Inertwirkung
Biochem. Z. 49, 333-369, (1913)

[64] Raaflaub J. :
Physikochemische und enzymkinetische Elemente der Pharmakokinetik
In : Raaflaub J. (Hrsg.) : Pharmkokinetik, Ein Leitfaden für Autodidakten,
1. Auflage 13 - 28 (1985), Editiones Roche, Basel

[65] Gerber N., Wagner J.G.:
Explanation of dose dependent decline of diphenylhydantoin plasma levels by fitting to the integrated form of the Michaelis-Menten equation
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 3, 455-466 (1972)

[66] Grasela T.H., Sheiner L.B., Rambeck B., Boenigk H.E., Dunlop A., et al. :
Steady-state pharmacokinetics of phenytoin from routinely collected patient data
Clin. Pharmacokinet. 8, 355-364 (1983)

[67] Richens A.
Clinical pharmacokinetics of phenytoin
Clin. Pharmacokinet. 4, 153-169 (1979)

[68] Wagner J.G.:
Time to reach steady state and prediction of steady-state concentrations for drugs obeying Michaelis-Menten elimination kinetics
J. Pharmacokinet. Biopharm. 6, 209-225 (1978)

[69] Ludden T.M., Allen J.P., Schneider L.W., Stavchansky S.A.:
Rate of phenytoin accumulation in man: a simulation study
J. Pharmacokinet. Biopharm. 6, 399-415 (1978)

[70] Vozeh S., Follath F.:
Nomographic estimation of time to reach steady-state serum concentration during phenytoin therapy
Eur. J. Clin. Pharmacol. 17, 33-35 (1980)

[71] Theodore W.H., Qu Z.-P., Tsay J.-Y., Pitlick W., Porter R.J.:
Phenytoin : The pseudosteady-state phenomenon
Clin. Pharmacol. Ther. 35, 822-825 (1984)

[72] Taylor J.W., Murphy M.J., Berg M.J., Perry P.J., Lyon L.W., Ludden T.M.:
Phenytoin dosage requirements and pharmacokinetic variables
Clin. Pharm. 2, 253-257 (1983)

[73] Koch-Weser J.:
The serum level approach to individualization of drug dosage
Eur. J. Clin. Pharmacol. 9, 1-8 (1975)

[74] Hansten P.D., Horn J.R., Koda-Kimble M.A., Young L.Y.:
Phenytoin

In : Hansten P.D., Horn J.R., Koda-Kimble M.A., Young L.Y. (Hrsg.) :
Drug Interactions and Updates Quarterly 346-368 (1993)
Applied Therapeutics Inc., Vancouver

[75] Kutt H. :
Phenytoin : Interactions with other drugs
In : Woodbury D.M., Pentry J.M, Pippenger C.E. (Hrsg.) :
Antiepileptic Drugs, 227-240 (1982) Raven Press New York

[76] Vozeh S., Uematsu T., Aarons L., Maitre P., Landolt H., Gratzl O.:
Intravenous phenytoin loading in patients after neurosurgery and in status epilepticus
Clin. Pharmacokinet. 14, 122-128 (1988)

[77] Spatz R., Kugler J.:
Klinische Pharmakologie der Antiepileptika
In : Kümmerle H-P., Hitzenberger G., Spitzy K.H. (Hrsg.) : Klinische Pharmakologie 1-3, 4. Auflage, 9. Ergänzungslieferung ecomed Verlagsgesellschaft mbH 1984

[78] Meyer U.A. :
Genotype of phenotype: the definition of a pharmacogenetic polymorphism
Pharmacogenetics 1, 66 (1992)

[79] Kutt H., Wolk M., Scherman R., McDowell F. :
Insufficient parahydroxylation as a cause of diphenylhydantoin toxicity
Neurology, 14, 542-548 (1964)

[80] Vasko M.R., Bell R.D., Daily D.D., Pippenger C.E.:
Inheritance of phenytoin hypometabolism : a kinetic study of one family
Clin. Pharmacol. Ther. 27, 96-103 (1980)

[81] De Wolff F.A., Vermeij P., Ferrari M.D., Buruma O.J.S., Breimer D.D.:
Impairment of phenytoin parahydroxylation as a cause of severe intoxication.
Ther. Drug Monit. 5, 213-215 (1983)

[82] Inaba T :
Phenytoin : Pharmacogenetic polymorphism of 4'-hydroxylation
Pharmacol. Ther. 46, 341-347 (1990)

[83] Vermeji P, Ferrari D., Buruma O.J.S., Veenema H., De Wolff F.A. :
Inheritance of poor phenytoin parahydraxylation capacity in a dutch family
Clin. Pharmacol. Ther. 44, 588 - 593 (1988)

[84] Steiner E., Alvan G., Garle M., Maguire J.H., Lind M., Nilson S.O., Tomson T., McClanahan J.S., Sjöqvist F.:
The debrisoquin hydroxylation phenotype does not predict the metabolism of phenytoin
Clin. Pharmacol. Ther. 42, 326-333 (1987)

[85] Sloan T.P., Idle J.R., Smith R.:

Influence of D^H/D^L alleles regulating debrisoquine oxidation on phenytoin hydroxylation
Clin. Pharmacol. Ther. 29, 493-497 (1981)

86 Hall S.D., Guengerich F.P, Branch R.A., Wilkinson G.R.:
Characterization and inhibition of mephenytoin 4-hydroxylase activity in human liver microsomes
J. Pharmacol. Exp. Ther. 240, 216-222 (1987)

87 Albani M., Gabriel M., Toseland P.A. :
The HPPH/phenytoin ratio in urine (phenytoinindex) as a parameter for phenytoin requirement prediction in childhood
In : Johannessen S.I., Morselli P.L., Pippenger C.E., Richens A., Schmidt D., Meinardi H. (Hrsg.) : Antiepileptic Therapy : Advances in Drug Monitoring, 41-46 (1980) Raven Press, New York

88 Bourgeois B.F.D., Wad N. :
Michaelis-menten kinetics and the steady-state serum phenytoin/hydroxyphenytoin ratio
Ther. Drug Monit. 7, 405-410 (1985)

89 Albert K.S., Hallmark M.R., Sakmar E., Weidler D.J. :
Plasma concentrations of diphenylhydantoin, its para-hydroxylated metabolite, and corresponding glucuronide in man.
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 9, 463-469 (1974)

90 Wilson T.J., Höjer B., Rane A. :
Loading and conventional dose therapy with phenytoin in children : kinetic profile of parent drug and main metabolite in plasma
Clin. Pharmacol. Ther. 20, 48-48 (1976)

91 Hoppel C., Garle M., Rane A., Sjöqvist F. :
Plasma concentrations of 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in phenytoin-treated patients
Clin. Pharmacol. Ther. 21, 294-300 (1977)

92 Glazko A.J., Peterson F.E., Chang T., Dill W.A., Smith T.C., Buchanan R.A. :
Phenytoin metabolism in subjects with long and short plasma half-lives
Ther. Drug Monit. 4, 281-292 (1982)

93 Mutschler E. :
Hydantoine
In : Mutschler E. (Hrsg.) : Arzneimittelwirkungen, 6. Auflage, 227-228 (1991) Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

94 Kuschinsky G., Lüllmann H. :
Antiarrhythmika
In : Kuschinsky G., Lüllmann H. : Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
12. Auflage, 160 (1989), Georg Thieme Verlag, Stuttgart

95 Kraupp O. :

Pharmakodynamische Beeinflussung der Rhythmik, Dynamik und Durchblutung des Herzens
In : Forth W., Henschler D., Rummel W. (Hrsg.) :
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 5. Auflage 216- 284 (1987), Wissenschaftsverlag, Mannheim

[96] Louis S., Kutt H., McDowell F. :
The cardio-circulatory changes caused by intravenous dilantin and its solvent
Am. Heart J. 74, 523-529 (1967)

[97] Cranford R.E., Leppik I.E:, Patrick B., Anderson C.B., Kostick B. :
Intravenous phenytoin : Clinical and pharmacokinetic aspects
Neurology 28, 874-880 (1978)

[98] Buchtal F., Svensmark O, Schiller P.J. :
Clinical and electroencephalic correlations with serum levels of diphenylhydantoin
Arch. Neurol. 17, 624-630 (1960)

[99] Lund L. :
Anticonvoulsant effect of diphenylhydantoin relative to plasma levels
Arch. Neurol. 31, 289-294 (1974)

[100] Levine M., Chang T. :
Therapeutic drug monitoring of phenyotin : Rational and current status
Clin. Pharmacokinet. 19, 341-358 (1990)

[101] Reynolds E.H., Shorvon S.D., Galbaraith A.W., Chadwick D., Dellaportas C.I. et al.:
Phenytoin monotherapy for epilepsy: A longterm prospective study, assisted by serum level monitoring, in previously untreated patients.
Epilepsia 22, 475-488 (1981)

[102] Callaghan N., Kenny R.A., O'Neill B., Crowley M., Goggin T. :
A prospective study between carbamazepine, phenytoin and sodium valproate as monotherapy in previously untreated and recently diagnosed patients with epilepsy
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 48, 639-644 (1985)

[103] Woo E., Chan Y.M., Yu Y.L., Chan Y.W., Huang C.Y. :
If a well-stabilized epileptic patient has a subtherapeutic antiepileptic drug level, should the dose be increased ? A randomized prospective study.
Epilepsia 29, 129-139 (1988)

[104] Young B, Rapp R.P., Norton J.A., Haack D., Tibbs P.A., Bean J.R. :
Failure of prophylactically administered phenytoin of posttraumatic epilepsy
J. Neurosurg. 58, 236-41 (1983)

[105] McQueen J.K., Blackwood D.H., Harris P., Kalbag R.M., Johnson A.L. :
Low risk of late post-traumatic seizures following severe head injury: Implications for clinical trials of prophylaxis
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 46, 899-904, (1983)

[106] Foy P.M., Chadwick D.W., Rajgopalan N., Johnson A.L., Shaw M.D.M :
Do prophylactic anticonvoulsant drugs alter the pattern of seizures after craniotomy?
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 55, 753-757 (1992)

[107] Temkin N.R., Dimken S.S., Wilensky A.J., Keihm J., Chabal S., Winn H.R.:
A ranzomized, double blind study of phenytoin for the prevention of post-traumatic seizures.
N. Engl. J. Med. 323, 497-502 (1990)

[108] Cobos J.E. :
High-dose phenytoin in the treatment of refractory epilepsy
Epilepsia, 28, 111-114 (1987)

[109] Salem R.B., Wilder B.J., Yost R.L., Doering P.L., Lee C.:
Rapid infusion of phenytoin sodium loading doses
Am. J. Hosp. Pharm. 38, 354-357 (1981)

[110] Abernethy D.R., Greenblatt D.J.:
Phenytoin disposition in obesity : determination of loading dose
Arch. Neurol. 42, 468-471 (1985)

[111] Blaser K.U., Vozeh S., Landolt H., Kaufmann G., Romppainen J., Gratzl O.:
Intravenous phenytoin : A loading scheme for desired concentrations
Ann. Intern. Med. 110, 1029-1031 (1989)

[112] Koup J.R., Gibaldi M., Godolphin W.:
Single point estimation of phenytoin dosing : a reapparisal
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 34, 231-239 (1981)

[113] Sawckuck R.J., Zaske D.E.:
Pharmacokinetics of dosing regimens wihich utilize multiple intravenous infusions : Gentamycin in burn patients.
J. Pharmacokinet. Biopharm. 4, 183-195 (1976)

[114] Crowley C.C., Koup J.R., Cusack B.J., Ludden T.M., Vestal R.E.:
Evaluation of a proposed method for phenytoin maintenance dose prediction following an intravenous loading dose
Eur. J. Clin. Pharmacol. 32, 141-148, 1987

[115] Ludden T.M., Allen J.P., Valutzky W.A., Vicuna A.V., Nappi J.M., et al.:
Individualization of phenytoin dosage regimens
Clin. Pharmacol. Ther. 21, 287-293 (1977)

[116] Martin E., Tozer T.N., Sheiner L.B., Riegelmann S.:
The clinical pharmacokinetics of phenytoin
J. Pharmacokin. Biopharm. 5, 579-595 (1977)

[117] Richens A., Dunlop A.:

Serum-phenytoin levels in the management of epilepsy
Lancet II, 247-248, 1975

118 Rambeck B., Boenigk H.E., Dunlop A., Mullen P.W., Wadsworth J.:
Predicting phenytoin dose - A revised nomogram
Ther. Drug Monit. 1, 325 - 333 (1979)

119 Chiba K., Ishizaki T., Miura H., Mingawa K.:
Michaelis-Menten pharmacokinetics of diphenylhydantoin and application in the pediatric age patient
J Pediatr. 96, 479 - 484 (1980)

120 Vozeh S., Koelz A., Martin E., Magun H., Scollo-Lavizzari G., Follath F.:
Predictability of phenytoin serum levels by nomograms and clinicians
Eur. Neurol. 19, 345-352 (1980)

121 Sheiner L.B., Rosenberg B., Melmon K.L.:
Modelling individual pharmacokinetics for computer-aided drug-dosage
Comp. Biomed. Res. 5, 441 - 459 (1972)

122 Beal S.L.:
Computation to the explicit solution to the Michaelis-Menten equation
J. Pharmacokinet. Biopharm. 11, 641 - 658 (1983)

123 Godley P.J., Ludden T.M., Clementi W.A., Godley S.E., Ramsey R.R.:
Evaluation of a bayesian regression-analysis computer program using non-steady-state phenytoin concentrations
Clin. Pharm. 6, 634-639 (1987)

124 Wallace J.E., Hamilton H.E.:
Diphenylhydantoin microdetermination in serum and plasma by UV spectrophotometry
J. Pharm. Sci. 63, 1795-1798 (1974)

125 Malkus H., Jatlow P.I., Castro A.:
A practical routine gas chromatographic determination of phenobarbital, primidone and diphenylhydantoin
Clin. Chim. Acta, 83, 113-117 (1978)

126 Kabra P.M., Gotelli G., Stanfil R., Marton L.J.:
Simultaneous measurment of phenobarbital, diphenylhydantoin and primidone in blood by high-performance liquid chromatography
Clin. Chem. 22, 824-827 (1978)

127 Oellerich M.:
Enzyme Immunoassays in clinical chemistry : Present status and trends.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 197-208 (1980)

128 Rubenstein K.E., Schneider R.S., Ullmann E.F.:

"Homogenous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 846-851 (1972)

129 Glatzko A.J. :
Phenytoin : Chemistry and methods of determination.
In : Woodbury D.M., Penry J.K, Schmidt R.P. (Hrsg.) :
Antiepileptic Drugs, 177-189 (1982)
Raven Press, New York

130 Gerätebeschreibung für den aca® II der Firma DuPont de Nemours

131 Oellerich M., Külpmann W.R., Haeckel R., Heyer R.:
Determination of phenobarbital and phenytoin in serum by a mechanized enzyme immunoassay (EMIT) in comparison with a gas-liquid chromatographic method
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 353-357 (1977)

132 Vree T.B., Steegers-Theunissen R.P.M, Baars A.M., Hekster Y.A.:
Direct high-performance liquid chromatographic analysis of p-hydroxyphenyl-phenylhydantoin glucuronide, the final metabolite of phenytoin in human serum and urine
J Chromatogr. 526, 581-589 (1990)

133 Hermansson J., Iversen T., Lindquist U.:
Isolation and determination of the diastereomers of the glucuronidated 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in human urine using HPLC
Acta Pharm. Suec. 19, 199-210 (1982)

134 McClanahan J.S., Maguire J.H.:
High performance liquid chromatographic determination of the enantiomeric composition of the urinary phenolic metabolites of phenytoin
J Chromatogr. 381, 438-446 (1986)

135 Roy D., Snodgrass W.R :
Isocratic separation of phenytoin metabolites by high-performance liquid chromatography from human and animal microsomes and urine
Ther. Drug Monit. 11, 57-62 (1989)

136 Butler T.C., Dudley K.H., Johnson D., Roberts S.B.:
Studies of the metabolism of 5,5-diphenylhydantoin relating principally to the stereoselectivity of the hydroxylation reactions in man and in the dog
J. Pharmacol. Exp. Ther. 199, 82-92 (1976)

137 Cavalier R., Toussaint A.:
Study in vivo of the stereoselective aromatic hydroxylation of diphenylhydantoin by man, rat and dog by the use of a specifically deuterated substrate
Arch. Int. Physiol. Biochim. 86, 409-411 (1978)

138 Eto S., Noda H.:

Chiral separation of barbiturates and hydantoins by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a 25 or 50 mm short ODS cartridge column via β-cyclodextrin inclusion complexes
J. Chromatogr. 579, 253-258 (1992)

[139] Cyclobond™ Handbook
A guide using cyclodextrin bonded phases
Astec (Advances Separation Technologies Inc.), Whippany, NJ, USA

[140] Duchêne D., Debruères B., Brétillon A.:
Les cyclodextrines, nature, origine et intétêt en pharmacie galénique
Labo-Pharma - Problèmes Techniques, 348, 842-850 (1984)

[141] Szejtli J.:
Enhancment of drug bioavailabiliy by cyclodextrins
Stärke, 33, 387-390 (1981)

[142] Szejtli J., Bolla-Pusztale E., Szabo T., Ferenczty T.:
Enhancment of stability and biological effect of cholecalciferol by β-cyclodextrin complexation
Pharmazie, 35, 779-787 (1980)

[143] Maguire J.H.:
Some structural requirements for resolution of hydantoin enantiomers with a β-cyclodextrin liquid chromatography column
J. Chromatogr. 387, 453-458 (1987)

[144] Tönnis W. :
Pathophysiologie und Klinik der intrakraniellen Drucksteigerung.
In : Handbuch der Neurochirurgie, Band I/1, 304-445 (1959)
Springer-Verlag, Berlin

[145] Vozeh S.
Bayesian Forecasting-Computerprogramm für Phenytoin
nicht publiziert

[146] Sheiner L.B., Beal S.L.:
Scientific commentary : Some suggestions for measuring predictive performance
J. Pharmacokinet. Biopharm. 9, 503-512 (1981)

[147] Pharmacopoea Helvetica editio VII
VII.1.3. Pufferlösungen
Eidgenössische Drucksachen und Materialzentrale, Bern

[148] Sachs L. :
Ausreisserproblem und Toleranzgrenze
In : Sachs L. (Hrsg.) : Angewandte Statistik, 7. Auflage, 363 - 372 (1992)
Springer Verlag, Berlin

[149] Martinelli E., Mühlebach S. :

Effectiveness of a phenytoin dosing regimen using bayesian forecasting for dosage individualization in hospitalized patients
Experientia, 49, 90 (1993)

150 Martinelli E., Mühlebach S., Vozeh S.:
Schnelle intravenöse Aufsättigung mit Phenytoin und individuelle Anpassung der Dosis
Schweiz. Med. Wschr. 123 Suppl. 50/II, 38, (1993)

151 Wilder B.J., Serrano E.E., Ramsay R.E.:
Plasma diphenylhydantoin levels after loading and maintenance dosage
Clin. Pharmacol. Ther. 14, 797-801 (1973)

152 Sheiner L.B., Beal S.L.:
Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetic parameters I. Michaelis-Menten model : Routine clinical pharmacokinetic data
J. Pharmakokin. Biopharm. 8, 553-571 (1980)

153 Martinelli E., Mühlebach S., Vozeh S. :
Phenytoin kinetics in the elderly : Hospitalized patients treated with an i.v. loading regimen followed by individual dosage based on bayesian forecasting calculations.
Pharm. W. Sci., 16, B10 (1994)

154 Harms V. :
Vergleich mehrerer Stichproben
In : Harms V. (Hrsg.) : Biomathematik, Statistk und Dokumentation
5. Auflage 176 - 178 (1988), Harms Verlag, Kiel

155 Wing D.S., Duff H.J.,
The Impact of a therapeutic drug monitoring program for phenytoin
Ther. Drug Monit. 11, 32-37 (1989)

156 Büch H.P., Büch U. :
Pharmakotherapie bei Schlafstörungen und Erregungszuständen
In : Forth W., Henschler D., Rummel W. (Hrsg.) :
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 5. Auflage, 497 - 506 (1987) Wissenschaftsverlag, Mannheim