

Universitätsklinikum Ulm, Klinik für Anästhesiologie
Sektion experimentelle Anästhesie
Prof. Dr. rer. nat. E. Marion Schneider

Auswirkungen von NQO1*2-Polymorphismus und Dronabinol auf die postoperative Immunantwort

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Eva Barthelmann
aus Greifswald

Ulm 2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. E. M. Schneider

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Volkmer

Tag der Promotion: 18.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen als Teil der postoperativen Immunantwort	1
1.2 NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase-1 und NQO1*2-Polymorphismus.....	4
1.3 Dronabinol als Wirkstoff in der Schmerztherapie	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Patienten und Methodik	10
2.1 Studienbeschreibung.....	10
2.2 Kriterien der Patientenauswahl	11
2.3 Das Verfahren der radikalen Prostatektomie.....	12
2.4 Molekularbiologische Methoden	12
2.5 Statistische Methoden.....	17
3 Ergebnisse	20
3.1 NQO1*2-Polymorphismus bei Patienten mit Prostatakarzinom	20
3.2 Analyse der Zytokinkonzentrationen	21
3.2.1 Die Zytokinkinetiken der einzelnen Gruppen	21
3.2.2 Ohne Dronabinol unterscheiden sich Wildtypen und Mutationsträger präoperativ	22
3.2.3 Bei Wildtypen unterscheiden sich die Zytokinverläufe mit und ohne Dronabinol	24
3.2.4 Mit Dronabinol unterscheiden sich Wildtypen und Mutationsträger am zweiten postoperativen Tag.....	24
3.2.5 Bei Mutationsträgern unterscheiden sich die Zytokinverläufe mit und ohne Dronabinol.....	26
3.3 Analyse der Matrix-Metalloproteinasen	30
3.3.1 Die Kinetik der Matrix-Metalloproteinasen in den einzelnen Gruppen...	30
3.3.2 Ohne Dronabinol liegt die Konzentration von MMP-7 präoperativ bei Mutationsträgern deutlich unter Wildtypniveau	31
3.3.3 Wildtypen zeigen ohne Dronabinol höhere MMP-Konzentrationen als mit Dronabinol	32

3.3.4	Unter Dronabinol unterscheidet sich die postoperative Antwort von MMP-3 zwischen Mutationsträgern und Wildtypen.....	34
3.3.5	Mutationsträger weisen postoperativ ohne Dronabinol niedrigere MMP-3-Konzentrationen auf als mit Dronabinol	35
4	Diskussion.....	38
4.1	Hinweise auf eine Assoziation zwischen NQO1*2-Polymorphismus und Prostatakarzinom.....	38
4.2	Die Auswirkungen des NQO1*2-Polymorphismus auf die posttraumatische Immunantwort	40
4.3	Der Einfluss von Dronabinol auf die posttraumatische Immunantwort	43
4.4	Interaktionen zwischen Dronabinol und NQO1*2-Polymorphismus	46
4.5	Abschließende Bemerkung und Ausblick.....	49
5	Zusammenfassung.....	50
6	Literaturverzeichnis	52
	Anhang.....	58
A	Statistische Tabellen	58
B	Abbildungsverzeichnis.....	62
C	Tabellenverzeichnis	63
	Danksagung.....	64

Abkürzungsverzeichnis

A	Purinbase (<i>Adenin</i>)
APS	Adenosin-5'-Phosphosulfat
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Pyrimidinbase (<i>Cytosin</i>)
CARD	Proteindomäne (<i>caspase recruitment domain</i>)
CB1	endogener Cannabinoidrezeptor Subtyp 1
CB2	endogener Cannabinoidrezeptor Subtyp 2
CB3	endogener Cannabinoidrezeptor Subtyp 3
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CTP	Cytidintriphosphat
CYP	Cytochrom P450
d	desoxyribo
d+1	erster postoperativer Tag
d+2	zweiter postoperativer Tag
d-1	präoperativer Tag
Δ^9 -THC	Delta-9-Tetrahydrocannabinol
DNA	Desoxiribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTD	DT-Diaphorase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FIIND	Proteindomäne (<i>function to find</i>)
G	Purinbase (<i>Guanin</i>)
GM-CSF	Zytokin (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)

GTP	Guanosintriphosphat
H ₀	Nullhypothese
H ₁	Alternativhypothese
IFN	Interferon
IFN- γ	Zytokin (<i>interferon-gamma</i>)
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-10	Zytokin (<i>interleukin-10</i>)
IL-13	Zytokin (<i>interleukin-13</i>)
IL-1 α	Zytokin (<i>interleukin-1 alpha</i>)
IL-1 β	Zytokin (<i>interleukin-1 beta</i>)
IP-10	Chemokin (<i>interferon-inducible protein-10</i>)
LRR	Proteindomäne (<i>leucine-rich repeats</i>)
MgCl	Magnesiumchlorid
MIP-1 α	Chemokin (<i>macrophage inflammatory protein-1 alpha</i>)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODS	Multiorganversagen (<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>)
NOD	Proteindomäne (<i>nucleoside oligomerization domain</i>)
NQO1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
NQO1*2	Kurzbezeichnung für: NQO1-C609T-Polymorphismus
NQO1*3	Kurzbezeichnung für: NQO1-C465T-Polymorphismus
NYHA	New York Heart Association
OP	Operationstag
p53	Tumorsuppressorprotein (<i>protein 53</i>)
PCA	Prostatakarzinom (<i>prostatic cancer</i>)
PCR ID	Stichprobennummer

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PPi	Pyrophosphat
PYD	Proteindomäne (<i>pyrin domain</i>)
QR1	Chinonreduktase 1 (<i>quinone reductase 1</i>)
RPX	Radikale Prostatektomie
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Purinbase (<i>Thymin</i>)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF- α	Zytokin (<i>tumor necrosis factor-alpha</i>)
TTP	Thymidintriphosphat
U	Pyrimidinbase (<i>Uracil</i>)
UTP	Uridintriphosphat

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Beeinflussung postoperativer Entzündungsprozesse. Im Rahmen einer Studie zur analgetischen Wirksamkeit von Dronabinol in Kombination mit einem Opioidschmerzmittel sollen die Auswirkungen verschiedener Faktoren auf die chirurgisch induzierte Immunantwort bei Patienten nach radikaler Prostatektomie untersucht werden. Die Modulation immunologischer Marker durch den Cannabiswirkstoff Delta-9-Tetrahydrocannabinol ist hierbei ebenso Gegenstand der Beobachtungen wie der Einfluss des NQO1*2-Polymorphismus auf diese. Im Folgenden sollen die der Arbeit zu Grunde liegenden Faktoren vorgestellt sowie die Zielsetzung der Arbeit veranschaulicht werden.

1.1 Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen als Teil der postoperativen Immunantwort

Umfassende operative Eingriffe stellen für den menschlichen Körper eine außergewöhnliche Belastungssituation dar. Physiologische Reaktionen des Organismus auf solche Traumata sind Veränderungen in der Immunantwort. Diese werden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen und löslicher Faktoren vermittelt. Eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung dieser Immunantwort haben die Zytokine (Hildebrand et al. 2005).

Zytokine sind lösliche Mediatoren der Zellkooperation. Sie tragen wesentlich zur indirekten Interaktion zwischen Immunzellen bei. Hierfür werden sie vor allem von T-Helferzellen synthetisiert. Ihre Wirkung wird meist parakrin, seltener autokrin vermittelt. Das Wirkungsspektrum ist breit. Unter anderem vermitteln Zytokine Entzündungsreaktionen und regulieren die Aktivierung von Lymphozyten und Phagozyten. Sie tragen auch zur Balance zwischen zellvermittelter Immunantwort und Antikörperproduktion bei.

Nach operativem Stress werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt. Zu ihnen gehören TNF- α , IL-1 α und IL-1 β sowie die Entzündungsmediatoren Eotaxin, MIP-1 α und IP-10. Darüber hinaus werden auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und IL-13 produziert. Überwiegt die proinflammatorische Zytokinantwort, kann eine überschießende systemische Entzündungsreaktion („Systemic inflammatory response syndrome“, SIRS)

die Folge sein. Die kompensatorische Gegenregulation durch antiinflammatorische Zytokine kann ebenso problematisch werden. Sie bewirkt eine Immunsuppression, die den Organismus anfällig für Infektionen macht. Die Folgen dieser immunologischen Dysregulation sind schwerwiegend. Sie können zu potentiell lebensbedrohlichen Komplikationen wie Sepsis und der Entwicklung eines Multiorgandysfunktionssyndroms (MODS) führen. (Ni Choileain und Redmond 2006).

Ein scheinbar zentraler Bestandteil der Infektionsabwehr durch Zytokine, das Inflammasom, konnte aktuell beschrieben werden. Dieser Proteinkomplex ist Bestandteil des Zytoplasmas von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Es existieren wahrscheinlich mehrere Varianten. Eine davon ist das Cryoporin-Inflammasom, dem eine Schlüsselrolle bei der Erkennung bakterieller Antigene zukommt (Dinarello 2007). Bakterielle Bestandteile induzieren das Inflammasom und setzen eine Kaskade in Gang, die zur Aktivierung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β durch die Caspase-1 führt (Drenth und van der Meer 2006). Durch die Zelle sezerniert, initiiert IL-1 β schließlich eine Entzündungsreaktion (Abbildung 1).

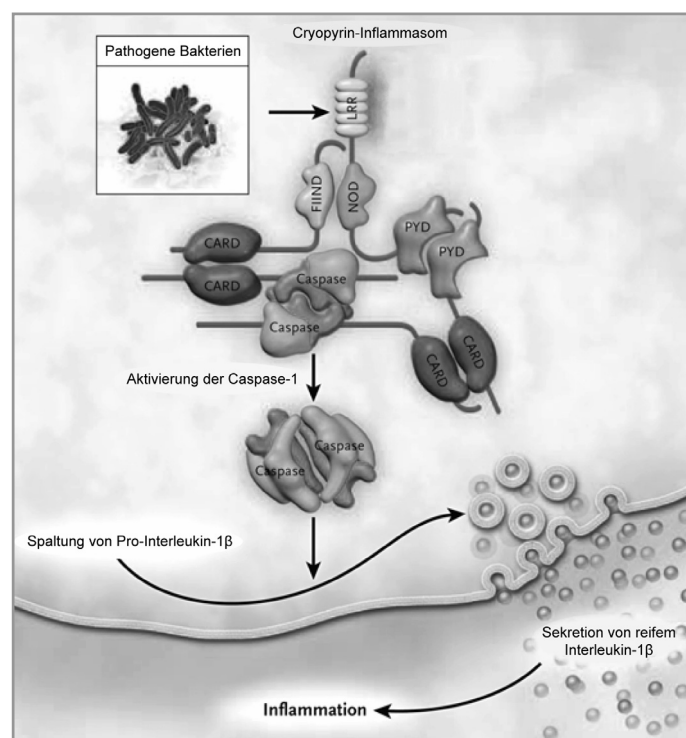


Abb. 1: Das Cryoporin-Inflammasom. Durch bakterielle Aktivierung wird eine inflammatorische Immunantwort induziert. LRR: leucine-rich repeats; NOD: nucleoside oligomerization domain; PYD: pyrin domain; CARD: caspase recruitment domain; FIIND: function to find (verändert nach Drenth und van der Meer 2006)

Eine weitere Komponente der Immunantwort wird durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) vermittelt. MMPs sind extrazelluläre, zinkhaltige Enzyme. Sie sind Voraussetzung zahlreicher physiologischer und pathologischer Prozesse (Malemud 2006). Zu ihren Substraten gehört eine große Anzahl von Proteinen, ihr Wirkungsspektrum ist dementsprechend breit. So sind MMPs unter anderem an der Regulation interzellulärer Signale beteiligt. Neben ihrer Beteiligung am Abbau der extrazellulären Matrix und am Gewebeumbau im Rahmen des Remodeling beeinflussen MMPs inflammatorische Prozesse und tragen zur Wundheilung bei. (Henle et al. 2005, Reif et al. 2005, Webster und Crowe 2006)

In den vergangenen Jahren konnten für Wirbeltiere eine Reihe von MMPs identifiziert werden. 23 von ihnen sind auch im menschlichen Organismus nachgewiesen (Somerville et al. 2003). Sie haben individuelle, zum Teil jedoch auch überlappende Substratspezifitäten, die in der Summe ihr breites Wirkspektrum ausmachen. Die einzelnen MMPs tragen neben ihrer numerischen Kennzeichnung auch alternative Bezeichnungen, Acht von ihnen sind für die vorliegenden Untersuchungen von Bedeutung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Nomenklatur der für die Arbeit relevanten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).
links: numerische Nomenklatur der MMPs bei Wirbeltieren, rechts: alternative Bezeichnungen

MMP	Eigenname
MMP-1	Kollagenase-1
MMP-2	Gelatinase A
MMP-3	Stromelysin-1
MMP-7	Matrilysin
MMP-8	Kollagenase-2
MMP-9	Gelatinase B
MMP-10	Stromelysin-2
MMP-13	Kollagenase-3

Adaptationsprozessen und Reaktionen auf zellulären Stress zu sein. Studien zeigen beispielsweise erhöhte NQO1-Konzentrationen in toxisch vorgeschädigtem Lebergewebe sowie bei primär biliärer Zirrhose (Aleksunes et al. 2006). Anhand menschlicher Neuroblastom-Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpressierung von NQO1 vor Dopamin-induzierter Toxizität schützt (Zafar et al. 2006).

Oxidativer Stress, DNA-Schädigung und andere onkogene Faktoren aktivieren das Tumorsuppressorgen p53. Dessen Funktion kann beispielsweise durch Mutationen oder Deletionen gestört werden. Eine klonale Expansion geschädigter Zellen wird dadurch möglich. Es kann zur Entstehung maligner Tumoren kommen. Studien haben gezeigt, dass NQO1, über seine katalytische Aktivität hinaus, im Rahmen von Protein-Protein-Interaktion zur Stabilisation von p53 beiträgt (Ross 2004).

Das für die Chinonreduktase kodierende Gen liegt im menschlichen Genom auf dem kurzen Arm von Chromosom 16. Für das Gen sind zwei Polymorphismen bekannt: der NQO1-C609T-Polymorphismus mit der Kurzbezeichnung NQO1*2 sowie der NQO1-C465T-Polymorphismus, kurz NQO1*3. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem NQO1*2-Polymorphismus. Diesem SNP (single nucleotide polymorphism) liegt eine Punktmutation im Exon sechs des NQO1-Gens zu Grunde. Dabei wird an Position 609 der cDNA Cytosin durch Thymin ersetzt. Bedingt dadurch kommt es an Position 187 der Aminosäuresequenz zu einem Austausch von Prolin durch Serin. Dies führt zu einer Änderung der dreidimensionalen Proteinstruktur. Die Folgen sind tiefgreifend. Der SNP führt zu einer Reduktion der katalytischen Aktivität und einem dramatisch beschleunigten Abbau über zelluläre Mechanismen (Ross und Siegel 2004). Hierbei haben heterozygote Individuen für NQO1 nur etwa 20-30 Prozent der Aktivität des Enzyms bei Wildtypen. Bei Patienten mit Nullallel fehlt die Aktivität vollständig. In der deutsch-kaukasischen Allgemeinbevölkerung beträgt die Frequenz der homozygoten Ausprägung von NQO1*2 1,6 Prozent (Zhang et al. 2003). In anderen ethnischen Gruppen kann sie über 20 Prozent ausmachen (Ross und Siegel 2004).

In einigen Studien wurden Hinweise für eine Assoziation des NQO1*2-Polymorphismus mit dem Vorliegen maligner Erkrankungen gefunden. Darunter sind unter anderem akute myeloische Leukämie (Escher et al. 2004), das Burkitt Lymphom (Kracht et al. 2004), kolorektale Adenokarzinome (Hou et al. 2005) und das Ösophaguskarzinom (Zhang et al. 2003). Für andere Erkrankungen, wie aplastische Anämie (Dufour et al. 2005) oder Morbus Alzheimer (Wang et al. 2006) konnten keine Zusammenhänge festgestellt werden.

1.3 Dronabinol als Wirkstoff in der Schmerztherapie

Delta-9-Tetrahydrocannabinol, kurz Δ^9 -THC, gehört zu den Cannabinoiden. Es ist der Hauptwirkstoff von *Cannabis sativa*, einer Hanfpflanze. Als isolierter Wirkstoff trägt es auch den Namen Dronabinol. In seiner Struktur ist Δ^9 -THC ein sauerstoffhaltiger Kohlenwasserstoff (Abbildung 3).

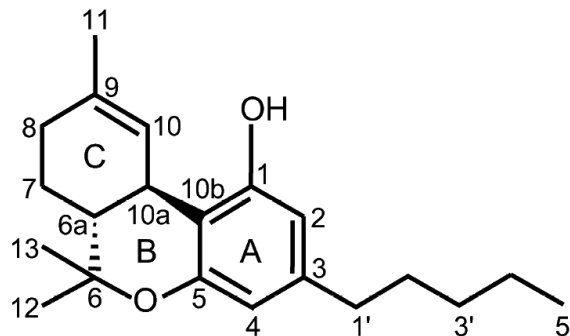


Abb. 3: Struktur von Delta-9-Tetrahydrocannabinol. Die dargestellte trans (6aR, 10aR)-Form entspricht dem Wirkstoff Dronabinol (verändert nach Pertwee 2006).

Als Heilmittel fanden Hanfpflanzen schon seit mehreren tausend Jahren Verwendung. In der indischen und chinesischen Medizin waren beispielsweise rheumatische Schmerzen Indikationen (Zuardi 2006). Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts entdeckte man die Cannabinoide als Wirkstoffe von *Cannabis sativa* und begann, diese zu isolieren. Seit Mitte des 20. Jahrhunderts werden pharmakologische Studien an einzelnen Wirkstoffen durchgeführt (Pertwee 2006).

1985 wurde das Medikament MarinolTM mit dem Wirkstoff Dronabinol in den USA zugelassen. Es wird dort bei chemotherapiebedingter Übelkeit und zur Therapie der Kachexie bei AIDS-Patienten eingesetzt. In der Bundesrepublik ist Dronabinol seit 1998 verschreibungsfähig. Es ist in der Anlage drei des Betäubungsmittelgesetzes gelistet und kann auf dessen Grundlage verschrieben werden. In Deutschland ist derzeit kein Medikament mit dem Wirkstoff Dronabinol zugelassen. Es ist jedoch möglich, Dronabinol als Rezeptursubstanz zu verschreiben. Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit des Imports von MarinolTM aus dem Ausland.

Dronabinol wirkt über Rezeptoren des endogenen Cannabinoidsystems. Es sind bisher drei Subtypen dieser Rezeptoren beschrieben worden (Khiabani und Morland 2007). Der CB1-Rezeptor kommt sowohl zentral als auch peripher vor. Er vermittelt analgetische,

psychogene und Appetit steigernde Effekte von Dronabinol (Fride et al. 2005, Witkin et al. 2005). Der Rezeptor CB2 wird hauptsächlich peripher auf Immunzellen exprimiert. In neuronalem Gewebe konnte er nicht nachgewiesen werden. Er kommt jedoch auf Gliazellen vor (Nunez et al. 2004). Die immunmodulatorischen Funktionen des CB2-Rezeptors sind Gegenstand aktueller Studien (Ueda et al. 2007, Ziring et al. 2006). Auch in fibrotisch verändertem Lebergewebe konnte CB2 nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass der Rezeptor potentiell antifibrotische Wirkungen aufweist (Julien et al. 2005, Mendez-Sanchez et al. 2007). Über die Funktionen des dritten Cannabinoidrezeptors ist bisher wenig bekannt. Möglicherweise hat er ebenfalls immunmodulatorische Relevanz (Cabral und Marciano-Cabral 2005).

Unerwünschte Wirkungen, die unter Dronabinol auftreten, sind orthostatische Dysregulation, Hypothermie und Blutdruckabfall, sowie zentral sympathomimetische Effekte wie Mundtrockenheit und Tachykardie. Zu den bekanntesten unerwünschten Wirkungen gehören die psychoaktiven Effekte von Dronabinol, die unter anderem Verwirrtheit, Euphorie und auch das Aufbrechen latenter Psychosen beinhalten können. Sie sind bis heute Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen (Linszen und van Amelsvoort 2007). Deutliche ZNS-Symptomatik wird nach oraler Gabe von 0,4mg/kg Körpergewicht beobachtet. Die klinisch eingesetzten Dosierungen liegen jedoch in der Regel unter diesem Wert. Das von Dronabinol ausgehende Abhängigkeitspotential ist bei Verwendung im medizinischen Bereich gering. Der Abusus von Cannabis sativa als Rauschmittel führte jedoch zu strengen Auflagen und daraus resultierenden Einschränkungen für Untersuchungen am Menschen.

Dennoch konnten die Funktionen von Dronabinol in Studien untersucht werden. Die antiemetischen und Appetit steigernden Eigenschaften des Wirkstoffes wurden analysiert (Carlini 2004, Haney et al. 2005) und können in der Klinik genutzt werden. Darüber hinaus konnten positive Effekte von Dronabinol, beispielsweise auf spastische Beschwerden, rheumatoide Arthritis und Schlafstörungen, nachgewiesen werden (Russo und Guy 2006). In zahlreichen Studien wurde die Wirkung von Dronabinol als Analgetikum untersucht. HIV-assoziierte neuropathischen Schmerzen (Abrams et al. 2007), neuropathische Schmerzen bei Multipler Sklerose (Iskedjian et al. 2007) oder schwere Schmerzzustände bei Krebserkrankungen (Russo und Guy 2006) wurden in Studien durch Dronabinol positiv beeinflusst.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Schwerwiegende postoperative Komplikationen können durch Dysregulation im Rahmen der Immunantwort entstehen. Der NQO1*2-Polymorphismus und Dronabinol sind zwei Faktoren, die einen möglichen Einfluss auf die Immunantwort bzw. auf die Therapie postoperativer Komplikationen haben. Anhand verschiedener Zytokine und Metalloproteinasen soll die postoperative Immunantwort nach radikaler Prostatektomie quantifiziert werden. In Abhängigkeit von NQO1*2-Status und der Einnahme von Dronabinol sollen dabei vier Fragestellungen untersucht werden:

I. Unabhängig von der Immunantwort hat NQO1 über p53 tumorprotektive Eigenschaften. Der Funktionsverlust des Enzyms durch den NQO1*2-Polymorphismus begünstigt möglicherweise die Entstehung von Tumoren. Hinweise auf Assoziationen von Tumorerkrankungen mit dem Polymorphismus liegen vor, Untersuchungen zum Prostatakarzinom fehlen jedoch bis jetzt. Die Analyse des Studienkollektivs von Patienten mit Prostatakarzinom soll dazu beitragen, Aufschluss über folgende Fragestellung zu geben: Ist das Prostatakarzinom mit NQO1*2-Polymorphismus assoziiert?

II. Das Wirkspektrum von NQO1 umfasst zellulären Schutz, Entgiftung und Chemoprotektion. Das Vorliegen von NQO1*2 führt zu einem Funktionsverlust des Enzyms und somit auch zum Verlust dieser Eigenschaften. Denkbar ist, dass dies Auswirkungen auf die Reaktion des Organismus nach operativ induziertem Trauma hat. Komplikationen durch Entzündungsprozesse sowie Auswirkungen auf Schmerz und Liegedauer wären möglich. Untersuchungen zu diesem Thema liegen bisher nicht vor. Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage: Zeigen Träger des NQO1*2-Polymorphismus im Vergleich zu Wildtypen unterschiedliche immunologische Reaktionen auf operativ induzierten Stress?

III. Eine Reihe der Funktionen von Dronabinol wird über den CB2-Rezeptor vermittelt. Dieser ist vor allem auf Immunzellen exprimiert. Hinweise auf eine immunmodulatorische Funktion des Rezeptors liegen vor. Dronabinol könnte unter diesen Voraussetzungen eine Option in der Therapie entzündungsbedingter Schmerzen darstellen. Um herauszufinden, ob diese Facette von Dronabinol in der perioperativen Schmerztherapie genutzt werden kann, soll geprüft werden: Beeinflusst Dronabinol die posttraumatische Immunantwort?

IV. Die medizinische Forschung befasst sich immer häufiger auch mit Aspekten der Pharmakogenetik. Dabei geht es um den Einfluss genetischer Varianten auf die Arzneimitteltherapie. Im konkreten Fall sind dies die Einflüsse des NQO1*2-Polymorphismus auf die Wirkung von Dronabinol nach Trauma. Hinweise auf eine solche Interaktion könnte die Bearbeitung der folgenden Fragestellung liefern: Unterscheidet sich die Immunantwort unter Dronabinol zwischen Trägern des NQO1*2-Polymorphismus und Wildtypen?

2 Patienten und Methodik

2.1 Studienbeschreibung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Rahmen einer Studie zur analgetischen Wirksamkeit von Dronabinol in Kombination mit einem Opioidschmerzmittel mit Patienten nach radikaler Prostatektomie. Alle Untersuchungen finden unter streng anonymisierten und randomisierten Bedingungen statt. Jedem der eingeschlossenen Patienten wird nach dem Randomisierungsplan eine Studiennummer zugeteilt. Zufallszahlen, die jeder Studiennummer zufällig zugewiesen werden, unterteilen die Studienteilnehmer in zwei Gruppen. Beide unterziehen sich im Anschluss dem Verfahren der radikalen Prostatektomie, wobei eine der Gruppen als Zusatzmedikation ein Placebo erhält, die andere ein Dronabinolpräparat. Die Entscheidung darüber fällt durch Münzwurf.

Das Prüfpräparat, das entweder fünf Milligramm Dronabinol enthält oder wirkstofffrei ist, wird den Patienten am Vorabend der Operation und präoperativ am Morgen des Eingriffs verabreicht. Nach der Operation erhalten die Patienten bis zum zweiten postoperativen Tag sowohl das Prüfpräparat als auch eine Schmerzmedikation mit Piritramid. Insgesamt erhalten die Patienten je 55mg Dronabinol oder Placebo, wobei die Summe der Einzeldosen pro Tag 20mg nicht übersteigt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Dosierungsschema des Prüfpräparates (Dronabinol oder Placebo). d-1: präoperativ, OP: Operationstag, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag

Tag der Einnahme	Geplante Dosis 7.00 Uhr	Geplante Dosis 15.00 Uhr	Geplante Dosis 23.00 Uhr	Maximale Tagesdosis
d-1	--	--	1x 5mg	5mg
OP	2x 5mg	1x 5mg	1x 5mg	20mg
d+1	2x 5mg	1x 5mg	1x 5mg	20mg
d+2	2x 5mg	--	--	10mg
Summe				55mg

Präoperativ (d-1), am ersten postoperativen Tag (d+1) und am zweiten postoperativen Tag (d+2) werden EDTA-Blutproben entnommen, die im Folgenden zur Bestimmung der Konzentrationen von Zytokinen und Matrix-Metalloproteinasen sowie zur Genotypisierung

herangezogen werden. Nach Abschluss der Genotypisierung werden beide Gruppen nochmals unterteilt, so dass vier Gruppen zur Auswertung der Kinetiken von Zytokinen und Matrix-Metalloproteinasen entstehen: Wildtyp ohne Dronabinol, Mutation ohne Dronabinol, Wildtyp mit Dronabinol und Mutation mit Dronabinol.

Der Prüfplan wird vor Beginn der Studie der Ethikkommission der Universitätsklinik Ulm vorgelegt. Benachrichtigungen und Berichte an Ethikkommissionen erfolgen durch den Leiter der klinischen Prüfung entsprechend den Vorgaben der ICH-GCP-Guideline im Rahmen der zu berücksichtigenden bundesdeutschen Vorschriften.

2.2 Kriterien der Patientenauswahl

Auf Grundlage der nachfolgend beschriebenen Kriterien werden in der vorliegenden Arbeit die Daten von 95 Patienten analysiert. In die Studie eingeschlossen sind volljährige Patienten mit Prostatakarzinom, bei denen aus diesem Grund der Eingriff der radikalen Prostatektomie unter standardisierter Intubationsnarkose geplant ist. Die obere Altersgrenze beträgt 70 Jahre. Eingeschlossene Patienten weisen nach der „American Society of Anesthesiologists“ (ASA) ein maximales perioperatives anästhesiologisches Risiko von ASA2, also leichter Allgemeinerkrankung ohne Leistungseinschränkung, auf. In Einzelfällen können Patienten mit ASA3 eingeschlossen werden, deren Leistungseinschränkungen nicht mit dem Nebenwirkungsprofil von Dronabinol interferieren. Ein weiteres Einschlusskriterium ist die rechtzeitige schriftliche Einverständniserklärung der Patienten zur Studienteilnahme. Patienten, die diese Kriterien nicht erfüllen, sind nicht in die Studie eingeschlossen.

Von der Studie ausgeschlossen sind darüber hinaus Patienten, bei denen schwere Organfunktionsstörungen vorliegen. Hierzu gehören Herzinsuffizienz im Stadium von mindestens NYHA II, instabile koronare Herzerkrankung, instabiles Blutdruckverhalten, Plasmawerte für Kreatinin, die 150µmol/l übersteigen, sowie eine Gamma-GT von mehr als 150U/l. Weitere Ausschlusskriterien sind ein deutlich erkennbares Suchtverhalten sowie mehr als gelegentlicher Cannabisgebrauch in der Anamnese des Patienten. Das Vorliegen einer ausgeprägten psychischen Störung im Sinne einer somatoformen, affektiven oder psychotischen Störung oder Persönlichkeitsstörung stellt ebenfalls ein Ausschlusskriterium der Studie dar.

2.3 Das Verfahren der radikalen Prostatektomie

Die radikalen Prostatektomie ist die Therapie der Wahl beim Vorliegen eines lokal begrenzten, nicht metastasierten Prostatakarzinoms. Sie wird als Unterbauchlaparotomie durchgeführt, bei der extraperitoneal ein retropubischer Zugang zur Prostata geschaffen wird. Der Eingriff umfasst die totale Entfernung der Prostata und der Samenblasen. Anschließend wird die Rekonstruktion des Blasenhalses und der Schließmuskelfunktion durchgeführt. Die Konstruktion einer Anastomose zwischen Blasen Hals und verbliebenem Harnröhrenstumpf wird dabei unter Anlage eines Blasenkatheters durchgeführt. Die Operationstechnik erfordert im Regelfall die Einlage einer Drainage ins kleine Becken sowie die Einlage einer subkutanen Drainage.

Intraoperativ können stärkere Blutungen die Übertragung von Erythrozytenkonzentraten oder Frischplasma erforderlich machen. Postoperative Komplikationen des Eingriffs sind Anastomoseninsuffizienz mit Extravasation, anhaltende Harninkontinenz und narbige Verengung im Bereich der Anastomose. Da bei der radikalen Operation im Gegensatz zur nervenerhaltenden Prostatektomie die neurovaskulären Bündel nicht explizit dargestellt und geschont werden, liegt postoperativ in über 90% der Fälle eine erektile Dysfunktion vor.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Vorbereitung der Genotypisierung: DNA-Isolierung aus Vollblut

Grundlage dieses Verfahrens ist die so genannte „Silica-based DNA purification“. In Anwesenheit eines chaotropen Salzes werden die Blutbestandteile lysiert und die freiwerdenden DNA-Fragmente an Silica-beschichtete Partikel gebunden. Chaotrope Reagenzien bewirken hierbei die Spaltung molekularer Strukturen durch Aufhebung von Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waals Kräften und des hydrophoben Effekts. Darüber hinaus bewirken sie eine positive Aufladung der Glaspartikel und schaffen so die Voraussetzung für die DNA-Bindung. Die Partikel werden im nächsten Schritt magnetisch vom Lysat getrennt und in zwei Durchgängen gewaschen. Abschließend wird die DNA durch einen Elutionspuffer eluiert.

Ziel der DNA-Isolierung ist es, aus den EDTA-Blutproben die für die später durchzuführende PCR erforderliche DNA zu isolieren. Der Prozess wird mit Hilfe der „BioRobot® EZ1 workstation“ (Quiagen) durchgeführt. Genutzt wird dazu das „EZ DNA

Blood 200 µl Kit“ (Katalognummer: 951034), sowie die „EZ1 DNA Blood Card“ (Katalognummer: 9015585), die das zugehörige Programm liefert. Für die Aufreinigung werden die Proben auf Raumtemperatur erwärmt, je 200µl Vollblut in Probenröhrchen pipettiert und mit fortlaufenden DNA-Nummern versehen. Die weiteren Schritte erfolgen nach dem festgelegten Protokoll des Herstellers (Quiagen: Protocol: Purification of Genomic DNA from Whole Blood. EZ1 DNA Handbook 02: 15-16 [2004]).

2.4.2 Vorbereitung der Genotypisierung: Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In Vorbereitung der DNA-Sequenzierung werden mittels PCR aus den DNA-Proben Fragmente mit einer Länge von 79 Basenpaaren generiert und amplifiziert. Diese enthalten den zu sequenzierenden Basenabschnitt im sechsten Exon des NQO1-Gens. Er liegt im fünften Segment des Gens.

Es werden Ansätze für 95 Proben vorbereitet. Für den Ansatz wird ein Reaktionsvolumen von je 50µl pipettiert, dass einfach konzentrierten Puffer, 2,5mM MgCl₂, je 50µM c(dATP), c(dCTP), c(dGTP) und c(dUTP), 1,4µM reverse Primer, 1,4µM forward Primer, 1,5U/µl AmpliTaq Gold, 1,0µl Proben-DNA sowie 36,3µl H₂O enthält. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die PCR wird mit Hilfe des Palm-Cycler™ (Corbett Research) durchgeführt. Nach initialem Erhitzen der Proben auf 95°C (5min) folgen 50 Zyklen eines festgelegten Temperaturprofils:

Bei 95°C (15s) wird die doppelsträngige DNA denaturiert und anschließend exaktes Primerannealing bei 57°C (30s) ermöglicht. Elongation des DNA-Stranges findet danach durch die Taq-Polymerase bei 72°C (15s) statt. Abschließend werden die Proben über fünf Minuten bei 72°C belassen und zur Lagerung auf 4°C abgekühlt.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten PCR-Primer. Die Primer binden an definierten Positionen im fünften Segment des NQO1-Gens.

Primer	Sequenz	Position Segment 5 NQO1-Gen	Länge (bp)	Amplikonlänge (bp)
Forward	5'-ATTCTGTGGCTTCCAAGTCTT-3'	165-186 (5'-3')	22	79
Reverse	5'-ATTGAATTCGGGCGTCTG-3'	243-225 (5'-3')	19	

2.4.3 Überprüfung der PCR mittels Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können durch elektrophoretische Verfahren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe und Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt werden. Dadurch ist eine Analyse und Überprüfung der in der PCR erstellten Nucleinsäurefragmente möglich.

Die Auftrennung der PCR-Proben erfolgt stichprobenartig mittels Trägerelektrophorese in einem Agarosegel. Der dazu benötigte TAE-Puffer setzt sich aus 0,377g EDTA, 4,85g Tris und 1l Aqua braun zusammen und wird mit Eisessig auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt. Für das Gel werden 2g Agarose in 100ml TAE-Puffer aufgenommen und mit 5µl Ethidiumbromidstammlösung versetzt. Die Lösung wird für 3,5min in der Mikrowelle bei 600W aufgekocht, anschließend unter rühren erkaltet und in den mit den entsprechenden Kämme vorbereiteten Gelträger eingebracht. Nach 30min wird der Gelträger in die mit TAE-Puffer befüllte Gelkammer eingestellt, die Kämme werden entfernt. Jeweils 5µl des PCR-Produkts werden nun in je 1µl Ladepuffer gelöst und in die Ladetaschen pipettiert. Ein DNA-Molekulargewichtsmarker (DNA Molecular Weight Marker VIII, 0,019-1,11kbp, Roche, Katalognummer 1336045) wird in einer Tasche neben den Proben mitgeführt. Nach Anschluss an ein Stromversorgungsgerät wird die Elektrophorese bei 75mV gestartet und über 45min durchgeführt. Das fertige Gel wird der Gelkammer entnommen und abschließend auf einem Transilluminator unter UV-Licht abfotografiert, wodurch die Banden der DNA-Fragmente dargestellt werden können(vgl. Abbildung 7, S. 20).

2.4.4 Genotypisierung durch Pyrosequenzierung

Pyrosequenzierung stellt ein Verfahren der DNA-Sequenzierung dar. Bei bekannter Position des Polymorphismus innerhalb des Genoms macht dieses Verfahren auch die Genotypisierung von SNPs möglich. Die Genotypisierung der DNA-Proben für den SNP C609T des NQO1-Gens kann mit dieser Methode nach vorangegangener PCR durchgeführt werden.

Das Prinzip der Pyrosequenzierung umfasst eine Reaktionskaskade, die mit Hilfe von vier Enzymen abläuft: DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase. Darüber hinaus werden die Substrate Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) und Luciferin sowie die DNA-Matrize mit hybridisiertem Sequencing Primer benötigt.

Die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) werden nacheinander dem oben

beschriebenen Ansatz zugeführt. Nach Zugabe eines dNTP baut die DNA-Polymerase dieses am 3'-Ende des Primers ein, wenn es komplementär zum dNTP des Matrizenstranges ist. Das bei dieser Reaktion frei werdende Pyrophosphat reagiert, katalysiert durch die ATP-Sulfurylase, mit APS zu ATP.

Angetrieben durch ATP wandelt die Luciferase nun Luciferin zu Oxyluciferin um. Diese Reaktion generiert ein Lichtsignal, das mit Hilfe einer Kamera detektiert wird. Es entsteht so ein Pyrogramm, dessen Peaks die entstandenen Lichtmengen pro dNTP-Zugabe darstellen. Hierbei ist die Höhe der Peaks proportional zur Menge der durch die DNA-Polymerase eingebauten Nukleotide.

Die im Ansatz verbliebenen, nicht eingebauten Nukleotide müssen vor dem nächsten Zyklus beseitigt werden. Dieser Schritt wird mit Hilfe der Apyrase durchgeführt. Auch das entstandene ATP wird durch die Apyrase abgebaut. Der beschriebene Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 4 dargestellt.

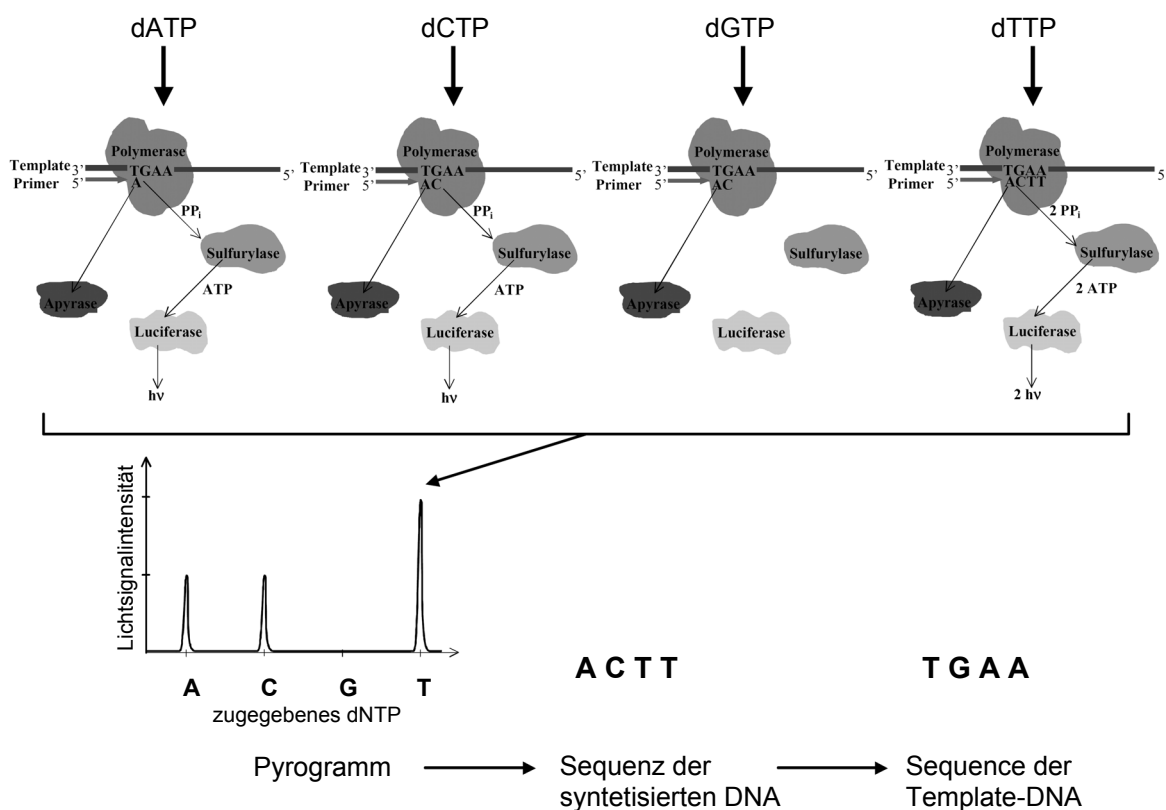


Abb. 4: Schematische Darstellung des Enzymsystems der Pyrosequenzierung.

A: Adenin, ATP: Adenosintriphosphat, C: Cytosin, CTP: Cytidintriphosphat, d: desoxyribo, G: Guanin, GTP: Guanosintriphosphat, hv: Photonenenergie, PP_i: Pyrophosphat, T: Thymin, TTP: Thymidintriphosphat (verändert nach Ahmadian et al. 2006)

Die Pyrosequenzierung wird mit Hilfe des „PSQ™ 96MA“ (Biotage) durchgeführt. Für die Durchführung der Sequenzierung wird das Set „Pyro Gold Reagents“ (Katalognummer: 40-0044) der Firma Biotage verwendet, das den Enzymmix, den Substratmix und die vier Nukleotide enthält. Die „PSQ 96 Reagent Cartridge“ (Biotage) wird mit 629µl Substratmix, 620µl Enzymmix und je 150µl dATPαS, dCTP, dGTP und dTTP bestückt und in das Gerät eingestellt. Für den Reaktionsansatz werden jeweils 37µl Binding Buffer, 3µl Strept-Avidin und 40µl PCR-Produkt in einer 96-Loch-Platte pipettiert. Eine Kontrolle, die nur den Puffer und Strept-Avidin enthält, wird mitgeführt. Die weiteren Schritte der Sequenzierung erfolgen anschließend nach vorgegebenem Protokoll des Herstellers (PSQ 96MA SNP Software, Biotage). Die Sequenz des benötigten Primers zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Informationen zum Sequencing-Primer. Der Primer bindet innerhalb des PCR-Amplikons.

Primer	Sequenz	Position Segment 5 NQO1-Gen	Länge (bp)	Amplikonlänge (bp)
Sequencing-Primer	5'-AATGCTATATGTCAGTTGAG-3'	211-192 (5'-3')	20	26

2.4.5 Quantifizierung der Entzündungsparameter durch „Multiplexed bead Technology“ (Luminex)

Postoperative Entzündungsprozesse sind durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Einflussfaktoren auf molekularer Ebene gekennzeichnet. Einige dieser Faktoren werden präoperativ, am ersten und am zweiten postoperativen Tag im Blut der Patienten bestimmt: Die Zytokine IL-1α, IL-1β, IL-10, IL-13, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IP-10, Eotaxin und MIP-1α sowie die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -10 und -13.

Die Quantifizierung der Marker mit dem Verfahren der „Multiplexed bead Technology“ (Luminex) wird durch das Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut an der Universität Tübingen durchgeführt.

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich innerhalb eines Experiments eine Vielzahl von Parametern in einem minimalen Probenvolumen bestimmen. Grundlage des Verfahrens sind Mikrosphären, die in ihrem Inneren mit einem roten und einem infraroten Farbstoff markiert sind. Es können bis zu 100 verschiedene Sets von Mikrosphären genutzt werden,

die sich durch das Verhältnis beider Farbstoffe eindeutig voneinander unterscheiden. Die Mikrosphären sind von einer Oberfläche bedeckt, an die verschiedenen Fängermoleküle, wie Rezeptoren oder Antikörper, gebunden werden können. Um nun in einer Probe verschiedene Marker zu quantifizieren, werden dieser mehrere Sets von Mikrosphären mit markerspezifischen Fängermolekülen zugefügt. Die Marker der Probe können an die für sie spezifischen Mikrosphären binden. Alle Mikrosphären der Probe werden anschließend, basierend auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie, in einer einzelnen Reihe organisiert. Sie passieren so eine Detektionskammer, in der ein roter Laser das Farbstoffgemisch (Rot/Infrarot) jeder einzelnen Mikrosphäre anregt und diese so exakt einem Set zuordnet. Ein grüner Laser regt Fluoreszenzen an, die mit der Bindung des Markers an das Fängermolekül assoziiert sind. Beide Messungen werden für jedes Partikel individuell durchgeführt. Die Ergebnisse der multiplexierten Probe können dadurch präzise voneinander getrennt und abgelesen werden.

2.5 Statistische Methoden

Ein Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Auswertung der perioperativen Kinetiken von Zytokinen und Metalloproteinasen. Für die drei Zeitpunkte d-1, d+1 und d+2 werden hierfür in den vier Gruppen die Konzentrationen der Marker im Vollblut ermittelt. Es handelt sich hierbei um quantitative, stetige Merkmale. Die erhaltenen Daten sind reelle Zahlen und verhältnisskalierbar. Sie sind tabellarisch zusammengefasst und in Form von Diagrammen dargestellt (Abbildung 10, S. 27 ff; Abbildung 14, S. 36 ff). Die Abbildungen enthalten für alle Zeitpunkte die Maßzahlen Median, 25%-Quantil, 75%-Quantil, sowie Minimum und Maximum der Merkmale in den einzelnen Gruppen. Um von der Stichprobe auf die Grundgesamtheit schließen zu können werden Methoden der induktiven Statistik angewandt. Im einzelnen sind dies der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben und der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben (Tabellen 6-9, S. 58 ff). Alle Berechnungen zur Statistik wurden mit dem Programm GraphPad Prism 3.0 der Firma GraphPad Software erstellt.

2.5.1 Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben

Innerhalb der vier Gruppen werden für jeden Marker die Zeitpunkte d-1 und d+1, d+1 und d+2 sowie d-1 und d+2 miteinander verglichen, um Aussagen über die Kinetik der Marker

in einer Gruppe treffen zu können. Diese Analyse wird mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben durchgeführt (Abbildung 5, Anhang: Tabellen 6a-d, 7a-d).

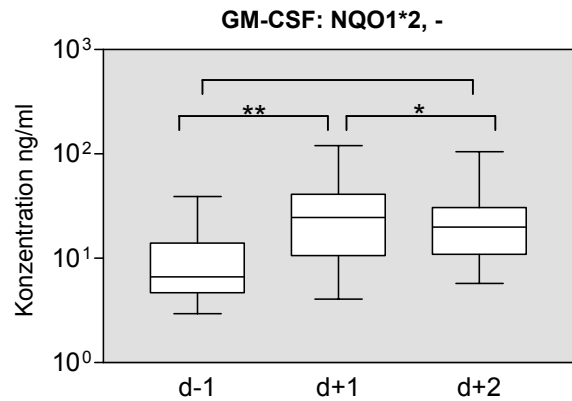


Abb. 5: Beispiel für die Datenanalyse mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.

Für GM-CSF werden in der Gruppe Mutationsträger ohne Dronabinol (NQO1*2, -) die medianen Konzentrationen der einzelnen Zeitpunkte miteinander verglichen.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, *: signifikant, **: hoch signifikant

Der Test nach Wilcoxon ist ein Rangsummentest, der die Mediane der vorliegenden verbundenen Stichproben miteinander vergleicht. Voraussetzung hierfür ist eine annähernd symmetrische, jedoch nicht zwingend normalverteilte, Verteilungsform der beiden Stichproben. Ein solches Verteilungsmuster wird auch für die zu analysierenden Daten erwartet. Die Fragestellung ist zweiseitig gewählt, um sowohl Konzentrationsanstiege als auch -abfälle in Betracht zu ziehen. Null- und Alternativhypothese lauten daher wie folgt:

H_0 : Die medianen Konzentrationen beider Zeitpunkte unterscheiden sich nicht.

H_1 : Die medianen Konzentrationen beider Zeitpunkte unterscheiden sich.

Das Signifikanzniveau des Tests (α -Fehler-Niveau) ist auf 5% festgelegt. P-Werte, die kleiner als 0,05 sind, gelten dabei als statistisch signifikant und führen zur Annahme der Alternativhypothese.

2.5.2 Mann-Whitney-U Test für unverbundene Stichproben

Die Frage nach den Unterschieden zwischen Mutationspatienten und Wildtypen sowie nach ihrem Verhalten mit und ohne Zusatzmedikation kann durch Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen geklärt werden. Hierzu wird der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt. Zunächst werden für jeden der drei Zeitpunkte die

Gruppen „Wildtyp ohne Dronabinol“ und „Mutation ohne Dronabinol“ verglichen. Das gleiche Verfahren wird für die Paarungen „Wildtyp mit Dronabinol“ und „Wildtyp ohne Dronabinol“, „Wildtyp mit Dronabinol“ und „Mutation mit Dronabinol“ sowie „Mutation mit Dronabinol“ und „Mutation ohne Dronabinol“ durchgeführt (Abbildung 6, Anhang: Tabellen 8a-d, 9a-d).

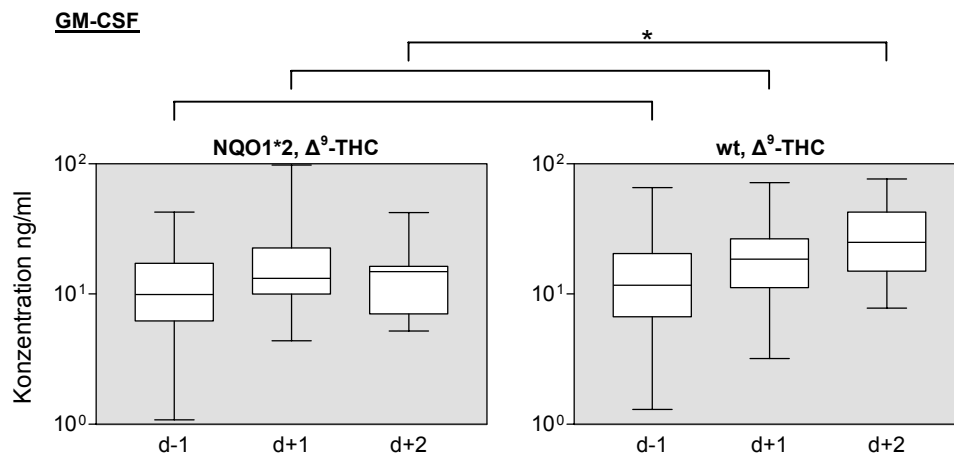


Abb. 6: Beispiel für die Datenanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben. Für GM-CSF werden hier die Gruppen „Mutationsträger mit Dronabinol“ (NQO1*2, Δ⁹-THC) und „Wildtypen mit Dronabinol“ (wt, Δ⁹-THC) miteinander verglichen. d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, *: signifikant

Auch der U-Test ist ein Rangsummentest. Er vergleicht die Mediane zweier unverbundener Stichproben miteinander. Da für die Daten einer einzelnen Gruppe nicht zwingend Normalverteilung angenommen werden kann, ist auch hier der Rangsummentest dem T-Test vorzuziehen. Der Mann-Whitney-U-Test benötigt kein spezielles Verteilungsmuster als Voraussetzung, darüber hinaus ist er auch bei unterschiedlich großen Stichproben und beim Auftreten eventueller Ausreißer aussagekräftig.

Die Fragestellung ist zweiseitig gewählt, um sowohl positive als auch negative Konzentrationsunterschiede zu erfassen:

H₀: Die medianen Konzentrationen beider Gruppen unterscheiden sich nicht.

H₁: Die medianen Konzentrationen beider Gruppen unterscheiden sich.

Für den Test wird ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 gilt dabei als statistisch signifikant und führt zur Annahme der Alternativhypothese H₁.

3 Ergebnisse

3.1 NQO1*2-Polymorphismus bei Patienten mit Prostatakarzinom

Der NQO1*2-Polymorphismus befindet sich im Exon sechs des NQO1-Gens an Position 191. Für diese Position wurde eine Frequenzanalyse des Polymorphismus durchgeführt: Hierfür wurde zunächst DNA aus den Vollblutproben isoliert und mittels PCR Fragmente des zu untersuchenden Basenabschnittes generiert. Gelelektrophorese diente der Überprüfung der PCR-Produkte (Abbildung 7), die anschließend mit dem Verfahren der Pyrosequenzierung sequenziert wurden.

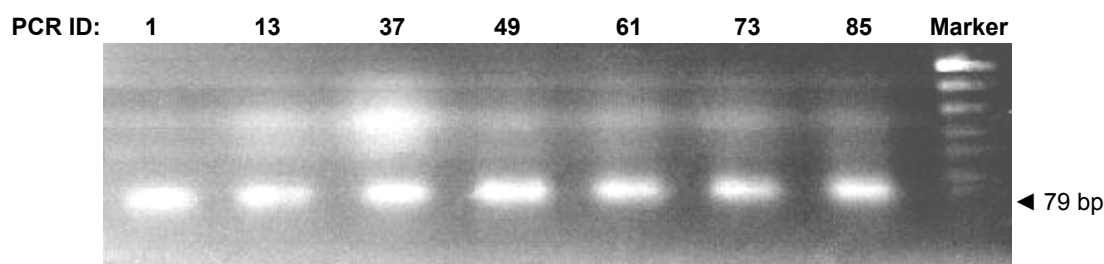


Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte mehrerer Stichproben. Die in der PCR erstellten Fragmente enthalten den Locus von NQO1*2 und haben eine Länge von je 79 Basenpaaren (bp). PCR ID: Stichprobennummer

Die Frequenzanalyse zeigt, dass sich die Population in 69,5% Wildtypen, 25,3% heterozygote Mutationsträger und 5,2% homozygote Mutationsträger unterteilt.

Bei 66 der 95 Proben liegt an Position 191 des untersuchten Exons auf beiden Allelen Cytosin vor (Wildtypkonfiguration des Polymorphismus), 24 Proben zeigen mit Cytosin auf einem und Thymin auf dem zweiten Allel eine heterozygote Konfiguration. Fünf Proben weisen Thymin auf beiden Allelen auf (homozygote Nullvariante). Insgesamt liegt bei 29 der 95 untersuchten Proben der NQO1*2 Polymorphismus vor. In der untersuchten Stichprobe entspricht dies einer Frequenz von 30,5%.

Im Vergleich der untersuchten Prostatakarzinompatienten zu in der Literatur beschriebenen kaukasischen gesunden Kontrollen wird in dieser Studie ein abweichendes Verteilungsmuster der Genotypen beobachtet. In der untersuchten Stichprobe gibt es eine Verschiebung des Wildtypanteils zugunsten der homozygoten Nullvariante (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verteilung der NQO1*2-Genotypen bei untersuchten Prostatakarzinompatienten und Kontrollen. Der Anteil der homozygoten Variante von NQO1*2 liegt bei den untersuchten Prostatakarzinompatienten deutlich über dem der Kontrollen.

n: absolute Anzahl, PCA: Prostatakarzinom, *Quelle: Zhang et al. 2003

	Status	Homozygot Wildtyp % (n)	Heterozygot Variante % (n)	Homozygot Variante % (n)
Stichprobe	PCA-Patienten n=95	69,5 (66)	25,3 (24)	5,2 (5)
Kontrollen*	Normalbevölkerung* n=252	73,4 (185)*	25,0 (63)*	1,6 (4)*

3.2 Analyse der Zytokinkonzentrationen

Ziel der Analyse ist die Untersuchung der Zytokinspiegel nach operativ induziertem Stress in Abhängigkeit von Dronabinoleinnahme und Mutationsstatus. Für die Beurteilung der Zytokinspiegel wurden die Marker TNF- α , IL-1 β , Eotaxin, IL-13, MIP-1 α , IL-10, IL-1 α , IP-10, GM-CSF und IFN- γ herangezogen. Sowohl präoperativ (nachfolgend als d-1 bezeichnet) als auch am ersten und zweiten postoperativen Tag (nachfolgend als d+1 und d+2 bezeichnet) wurde die Konzentration der Zytokine im Blut bestimmt und zur weiteren Auswertung den Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol, Mutation ohne Dronabinol, Wildtyp mit Dronabinol und Mutation mit Dronabinol zugeordnet. Die statistische Analyse der Zytokinkinetik der einzelnen Gruppen wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt. Für die Vergleiche zweier Gruppen an den einzelnen Tagen wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt. Die genauen Daten der statistischen Analyse sind in den Tabellen 6a-d und 8a-d im Anhang dargestellt. Die in diesem Abschnitt analysierten Zytokinkinetiken zeigt Abbildung 10 (S. 27 ff).

3.2.1 Die Zytokinkinetiken der einzelnen Gruppen

Gruppe 1: Wildtyp ohne Dronabinol. In dieser Gruppe steigen die Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β , Eotaxin, IL-13, MIP-1 α , IL-10, GM-CSF und IFN- γ von d-1 zu d+1 signifikant an ($p < 0,041$), die Werte für IL-1 α ($p = 0,402$) und IP-10 ($p < 0,001$) sinken. Von d+1 zu d+2 zeigen nur IL-1 α ($p = 0,033$) und IP-10 ($p = 0,008$) signifikante Anstiege. Alle

anderen Marker erhöhen sich nicht signifikant, die Werte für IL-10 und IFN- γ weisen fallende Tendenzen auf.

Gruppe 2: Mutation ohne Dronabinol. Signifikante Konzentrationsanstiege von d-1 zu d+1 können für TNF- α , IL-1 β , Eotaxin, IL-13, MIP-1 α , IL-10, GM-CSF und IFN- γ registriert werden ($p < 0,008$). Die mediane Konzentration von IL-1 α weist ansteigende Tendenz auf. IP-10 zeigt von d-1 bis d+1 unterhalb des Signifikanzniveaus einen fallenden Verlauf, wird aber postoperativ im Zeitraum von d+1 bis d+2 signifikant erhöht detektiert ($p = 0,017$). Alle übrigen Marker werden postoperativ nicht signifikant verändert, weisen jedoch fallende Tendenz auf.

Gruppe 3: Wildtyp mit Dronabinol. TNF- α , IL-1 β , Eotaxin, IL-13, IL-10 und GM-CSF zeigen im Zeitraum von d-1 bis d+1 signifikante Konzentrationssteigerungen ($p < 0,049$), während MIP-1 α und IFN- γ unterhalb des Konfidenzintervalls erhöht werden. Der IP-10-Gehalt sinkt signifikant ($p = 0,002$), IL-1 α tendenziell. Die Zytokinkonzentrationen steigen von d+1 zu d+2 signifikant ($p < 0,029$), lediglich IL-10 stagniert in seinem Verlauf.

Gruppe 4: Mutation mit Dronabinol. Von d-1 zu d+1 ist für Eotaxin ($p = 0,035$), IL-10 ($p = 0,003$) und GM-CSF ($p = 0,027$) eine signifikante Erhöhung der Zytokinspiegel sichtbar. Mit Ausnahme von IP-10, dessen Konzentration in diesem Zeitraum tendenziell sinkt, weisen die übrigen Marker lediglich mediane Konzentrationsanstiege unterhalb des Signifikanzniveaus auf. Der Vergleich von d+1 und d+2 ergibt dagegen ein anderes Bild: IP-10 zeigt hier einen signifikant ansteigenden Verlauf ($p = 0,049$), tendenzielle Anstiege der Mediane für IL-1 α , GM-CSF, MIP-1 α und IFN- γ sind sichtbar. Die mediane Konzentration von IL-10 fällt in diesem Zeitraum signifikant ($p = 0,03$), die von Eotaxin und IL-13 tendenziell. TNF- α und IL-1 β stagnieren in ihrem Verlauf.

3.2.2 Ohne Dronabinol unterscheiden sich Wildtypen und Mutationsträger präoperativ

Der Vergleich der Gruppen 1 und 2 spiegelt die rein mutationsbedingten Auswirkungen des NQO1*2-Polymorphismus auf die Zytokinantwort wider. Bei vorhandenem SNP treten vor allem präoperativ Unterschiede zu Wildtypen auf. Der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben (vgl. Tab. 8a, S. 60) ergibt zum Zeitpunkt d-1 signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutationsträgern für die antiinflammatorisch wirkenden Zytokine IL-10 ($p = 0,041$) und IL-13 ($p = 0,031$). Für beide Marker liegen zu diesem Zeitpunkt die medianen Konzentrationen der Mutationsträger deutlich unter denen

der Wildtypen (Abbildung 8). Dieses Bild zeigt sich weniger ausgeprägt auch für alle anderen untersuchten Zytokine. Die Zeitpunkte d+1 und d+2 weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutationsträgern und Wildtypen auf. Jedoch bleiben auch hier die Mediane von Eotaxin, MIP-1 α , IL-10, IL-1 α und GM-CSF bei Mutationsträgern hinter denen der Wildtypen zurück. TNF-1 α , IL-1 β , IL-13, IP-10 und IFN- γ zeigen für Mutationsträger höhere Mediane als für Wildtypen.

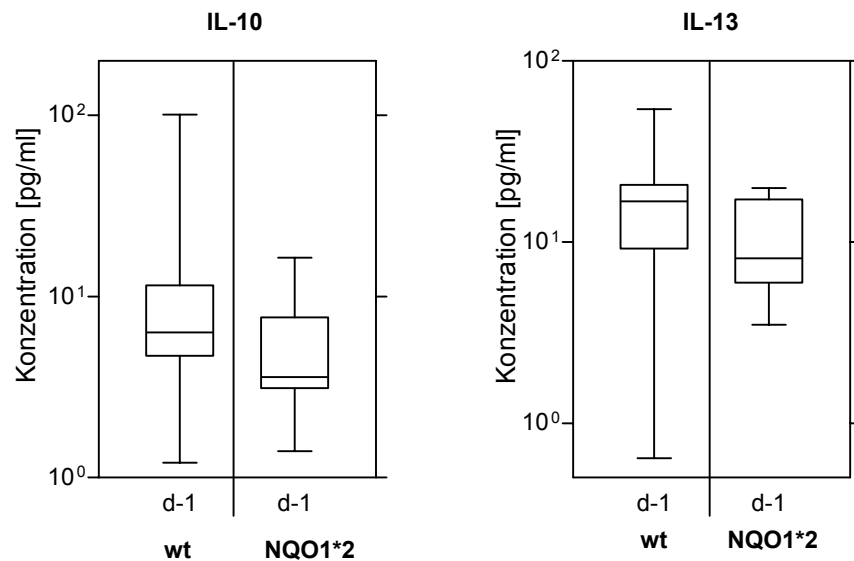


Abb. 8: Signifikante Konzentrationsunterschiede ohne Dronabinol sind präoperativ (d-1) ausschließlich für antiinflammatorische Zytokine sichtbar.
wt: Wildtyp; NQO1*2: Mutationsträger; IL: Interleukin

Obwohl sich die absoluten Werte von Mutationsträgern und Wildtypen an d-1 wie zuvor beschrieben signifikant unterscheiden, ähneln sich die Zytokinverläufe beider Gruppen von d-1 zu d+1. Auffällig ist hierbei jedoch, dass alle Zytokine mit Ausnahme von IP-10 in der Mutationsgruppe stärker erhöht werden als in der Wildtypgruppe. Die Kinetik im Zeitraum von d+1 zu d+2 unterscheidet sich in beiden Gruppen: Die medianen Zytokinkonzentrationen der Mutationsträger zeigen fallende Tendenzen, während sie bei den Wildtypen weiterhin ansteigen. Die Ausnahme bildet auch hier IP-10, dessen Konzentration in beiden Gruppen tendenziell steigt. Der Gehalt von IL-10 und IFN- γ sinkt in beiden Gruppen.

3.2.3 Bei Wildtypen unterscheiden sich die Zytokinverläufe mit und ohne Dronabinol

Um die Auswirkungen von Dronabinol auf die traumainduzierte Zytokinantwort zu beobachten, werden die Proben mit Wildtypform des NQO1-Gens unter Dronabinolgabe (Gruppe 3) mit denen der Wildtypform ohne Dronabinolgabe (Gruppe 1) verglichen. Zum Zeitpunkt d-1 treten für kein Zytokin signifikante Unterschiede zwischen den absoluten Zytokinwerten beider Gruppen auf. Gleiches gilt für d+1 und d+2.

In der Kinetik über mehrere Zeitpunkte hinweg zeigen sich jedoch Unterschiede. Die Mediane der Zytokine steigen von d-1 zu d+1: Signifikante Konzentrationssteigerungen lassen sich in beiden Gruppen für TNF- α , IL-1 β , Eotaxin, IL-10, IL-13, IP-10 und GM-CSF nachweisen. Für MIP-1 α erhöhen sich die Mediane von d-1 zu d+1 in Gruppe 1 signifikant, steigen dagegen in Gruppe 3 nur unterhalb des Signifikanzniveaus an. IL-1 α weist in beiden Gruppen fallende Tendenzen auf. Im Zeitraum d+1 bis d+2 sind deutliche Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 3 zu erkennen: Wildtypen ohne Dronabinol zeigen nur für IP-10 und IL-1 α signifikante Steigerungen der medianen Zytokinspiegel, wogegen bei Wildtypen mit Dronabinol (Ausnahme IL-10) durchgehend signifikante Anstiege detektierbar sind. IL-10 verändert sich nicht signifikant.

3.2.4 Mit Dronabinol unterscheiden sich Wildtypen und Mutationsträger am zweiten postoperativen Tag

Die Gegenüberstellung der Gruppen 3 und 4 dient dazu herauszufinden, wie das Vorliegen des NQO1*2-Polymorphismus die traumainduzierte Zytokinantwort unter Cannabis verändert. Während d-1 und d+1 keine relevanten Unterschiede zwischen den Medianen beider Gruppen aufweisen, sind postoperativ zum Zeitpunkt d+2 deutliche Unterschiede sichtbar. Für Wildtypen zeigen sich hier signifikant höhere Zytokinspiegel für die proinflammatorischen Zytokine TNF- α ($p=0,006$), IL-1 β ($p=0,01$) und GM-CSF ($p=0,004$) als für Mutationsträger (Abbildung 9). Gleiches gilt für die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 ($p=0,006$) und IL-13 ($p=0,021$). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von dem Vergleich der Wildtypen und Mutationsträger ohne Dronabinol, wo signifikante Unterschiede der Zytokinspiegel postoperativ nicht auftreten (vgl. 3.2.2).

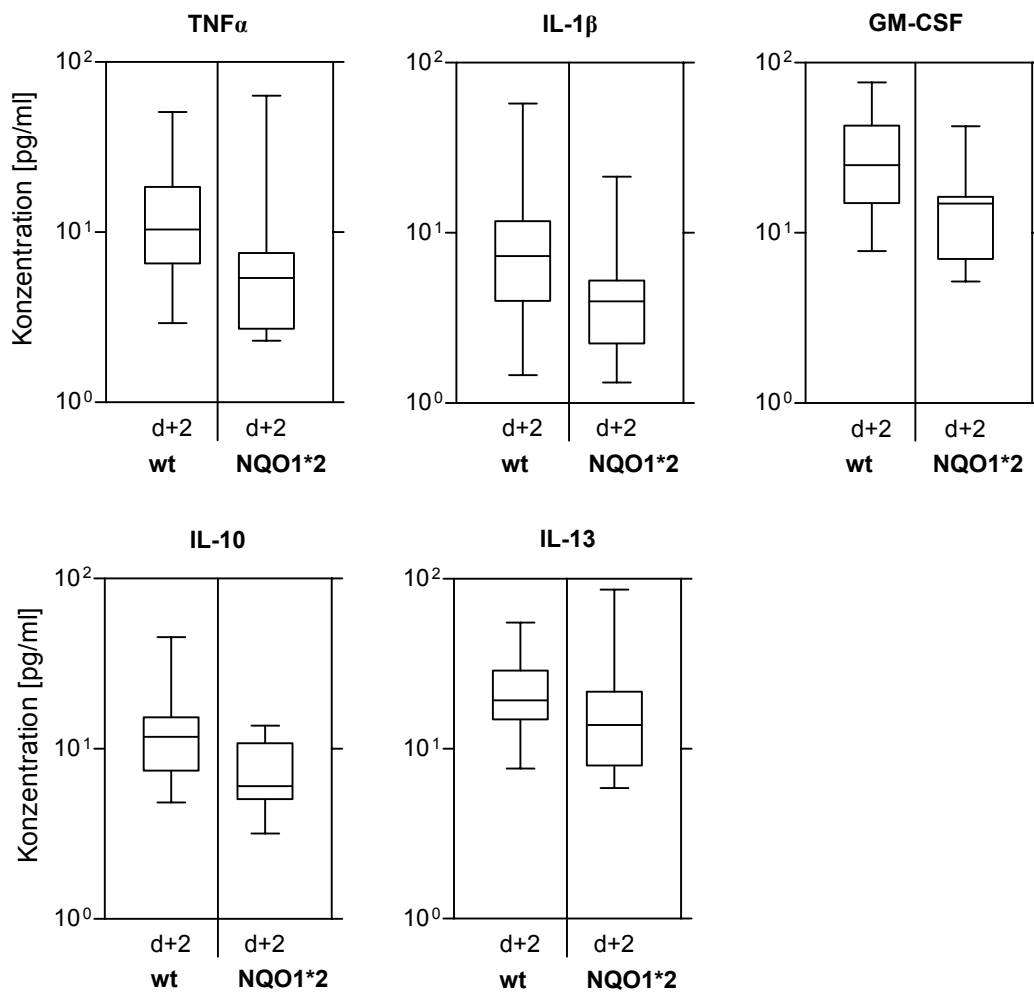


Abb. 9: Signifikante Konzentrationsunterschiede unter Dronabinol sind am zweiten postoperativen Tag (d+2) für pro- und antiinflammatorische Zytokine sichtbar. wt: Wildtyp; NQO1*2: Mutationsträger; GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor; IL: Interleukin; TNF- α : Tumor necrosis factor- α

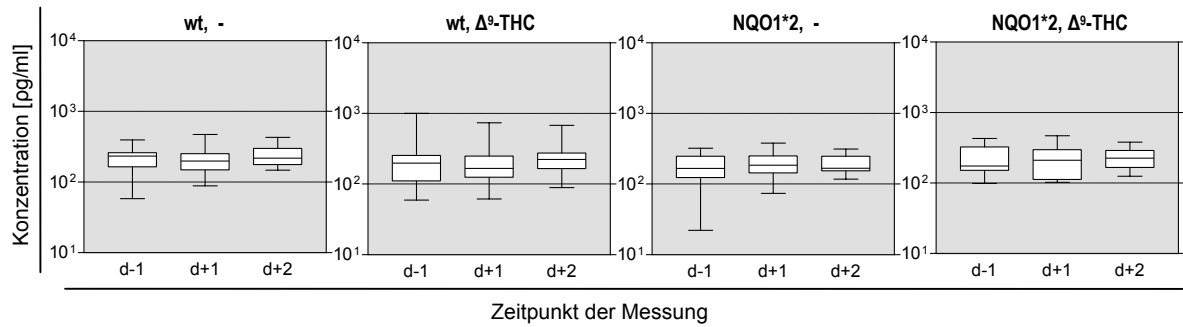
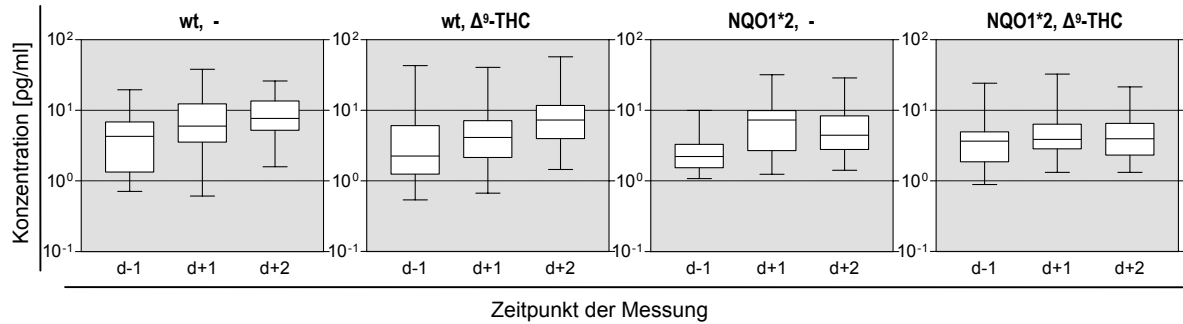
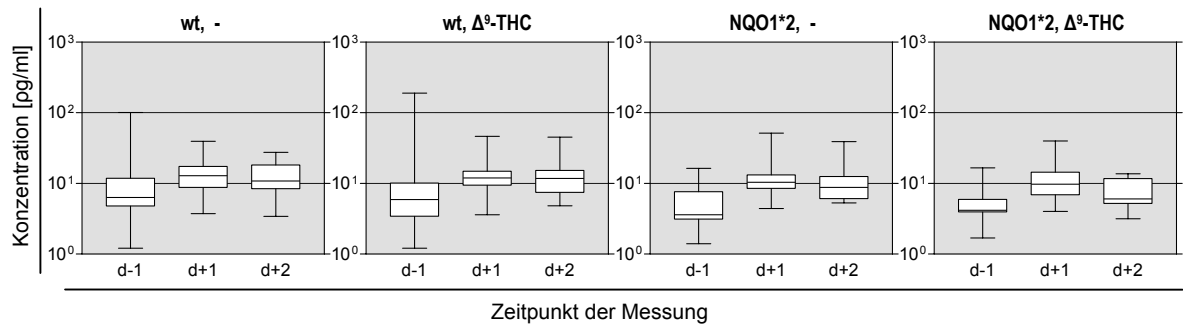
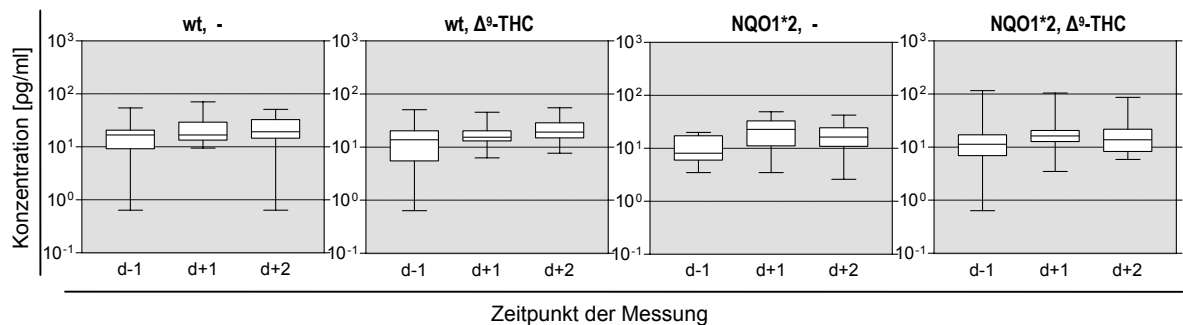
In ihrem Verlauf differieren beide Gruppen ebenfalls deutlich. Im Gegensatz zu Gruppe 4, die nur wenige signifikante Änderungen aufweist, treten in Gruppe 3 Veränderungen der Zytokinspiegel auf. Von d-1 zu d+1 steigen die medianen Zytokinkonzentrationen von TNF- α , IL-1 β , Eotaxin, IL-10, IL-13 und GM-CSF bei Wildtypen mit Dronabinol signifikant an. Bei Mutationsträgern ist dies nur für Eotaxin, IL-10 und GM-CSF der Fall. Im gleichen Zeitraum sinkt der Spiegel von IP-10 bei Wildtypen signifikant, bei Mutationsträgern lediglich tendentiell. Stagnierende Zytokinkonzentrationen in beiden Gruppen zeigen die Marker MIP-1 α , IL-1 α und IFN- γ . Postoperativ erhöhen sich von d+1 zu d+2, mit Ausnahme von IL-10, bei Wildtypen die Konzentrationen aller Zytokine weiterhin, wohingegen sie sich in Mutationsträgern größtenteils nicht deutlich verändern.

IL-10 steigt in Gruppe 3 nicht signifikant, weist aber in Gruppe 4 einen signifikanten Abfall auf. Für IP-10 sind in diesem Zeitraum in beiden Gruppen signifikante Anstiege zu verzeichnen.

3.2.5 Bei Mutationsträgern unterscheiden sich die Zytokinverläufe mit und ohne Dronabinol

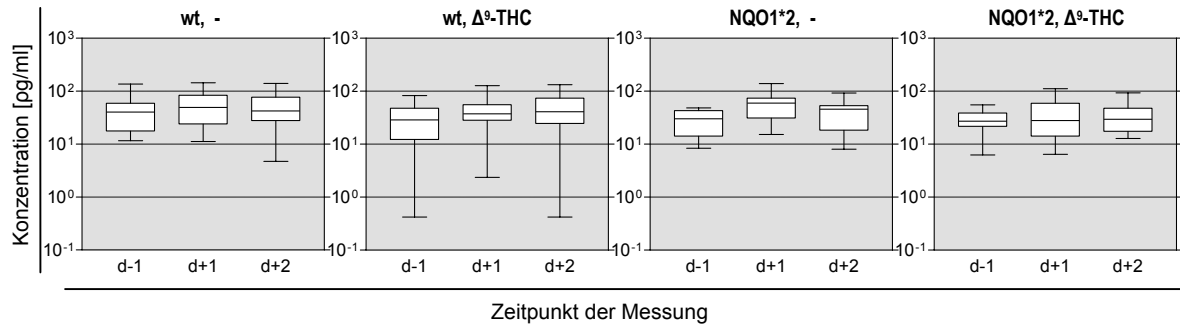
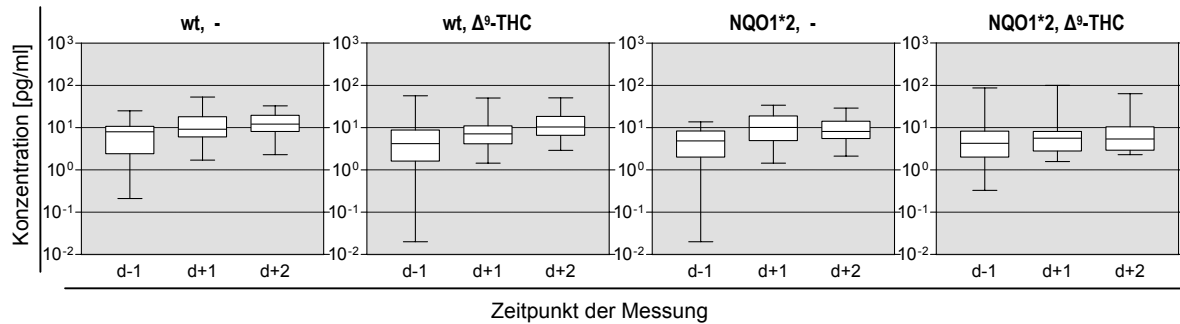
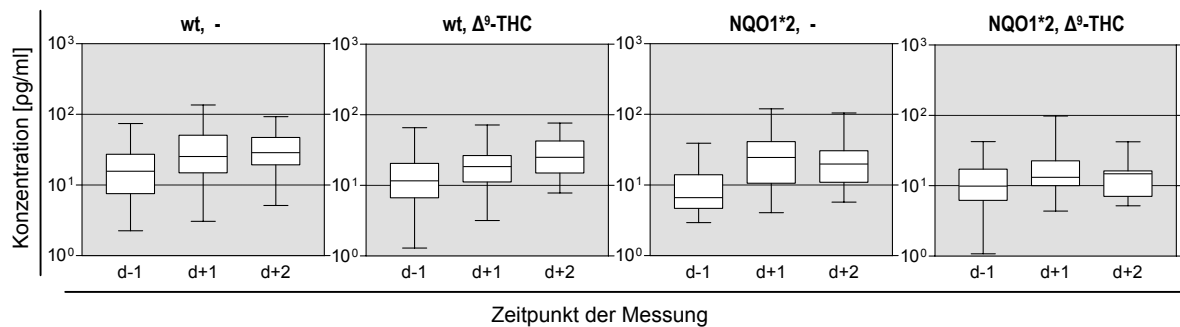
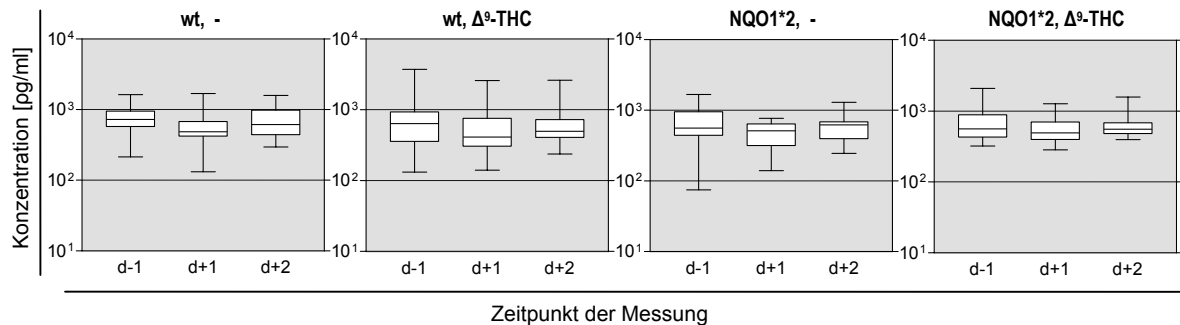
Der Vergleich der Gruppen 2 und 4 soll Aufschluss darüber geben, wie die Einnahme von Dronabinol die traumainduzierte Zytokinantwort bei Mutationsträgern beeinflusst. Die Gegenüberstellung der Mediane beider Gruppen zu den Zeitpunkten d-1, d+1 und d+2 ergibt nach Mann-Whitney-U für keines der Zytokine signifikante Konzentrationsunterschiede. Mit Ausnahme der Werte für TNF- α und IFN- γ , die für Gruppe 2 höhere Werte als für Gruppe 4 aufweisen, liegen jedoch alle absoluten Medianwerte der Gruppe ohne Dronabinol bei d-1 unter denen der Gruppe mit Dronabinol. Dagegen werden zum Zeitpunkt d+2 für alle Zytokine der Gruppe 2 (Ausnahme MIP-1 α und IL-1 α) höhere Medianwerte festgestellt als für Gruppe 4.

Im Verlauf beider Gruppen lassen sich deutlichere Unterschiede feststellen. Mutationsträger ohne Zusatzmedikation weisen bis auf IL-1 α und IP-10 im Zeitraum von d-1 zu d+1 signifikante Anstiege der medianen Zytokinkonzentrationen auf. Diese lassen sich in der Gruppe mit Dronabinol nur für Eotaxin, IL-10 und GM-CSF nachweisen, bleiben jedoch unter den Werten aus Gruppe 2. Die übrigen Marker der Gruppe ohne Dronabinol stagnieren dagegen zunächst auf ihrem Ausgangsniveau oder zeigen leicht fallende mediane Konzentrationen. Von d+1 zu d+2 treten in beiden Gruppen nur wenige signifikante Änderungen der Zytokinkonzentrationen auf: Bei Mutationsträgern mit Dronabinol fällt der Median von IL-10 signifikant, bei Wildtypen nur tendenziell. IP-10 zeigt in diesem Zeitraum in beiden Gruppen signifikante Anstiege.

IL-1 α **IL-1 β** **IL-10****IL-13****Abb. 10a:** Perioperative Zytokinkinetik von Interleukin-1 α , -1 β , -10 und -13.

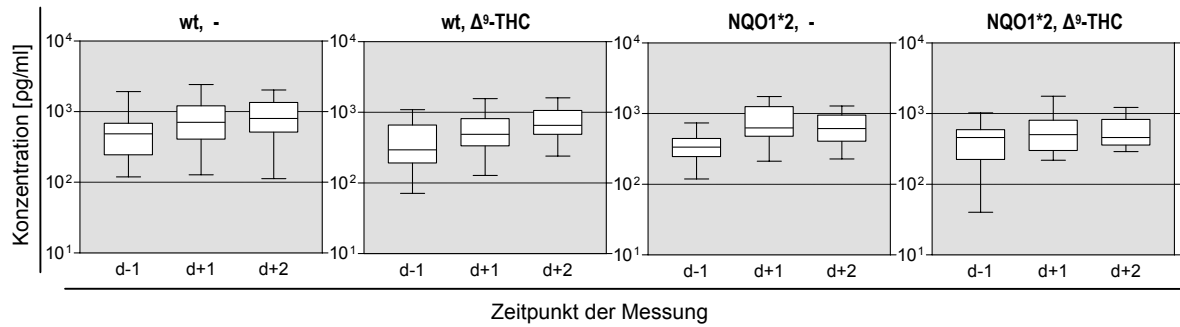
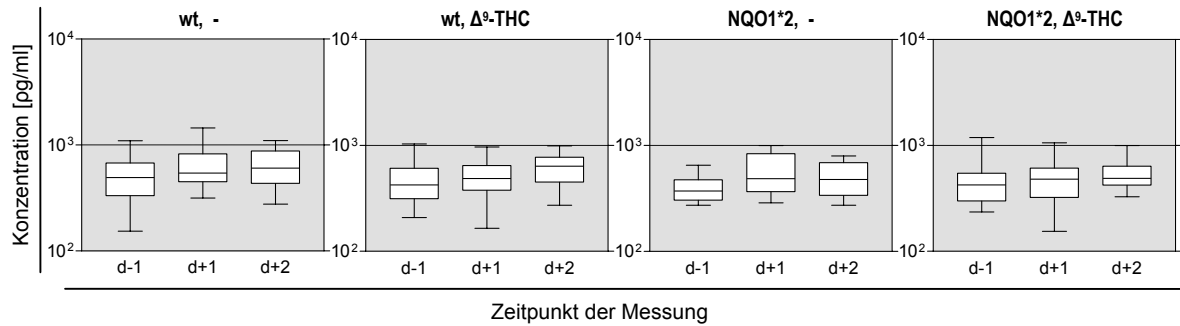
Im Zeitverlauf dargestellt sind die Konzentrationen der Zytokine im Vollblut in den vier Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol (wt, -), Wildtyp mit Dronabinol (wt, Δ^9 -THC), Mutation ohne Dronabinol (NQO1*2, -) und Mutation mit Dronabinol (NQO1*2, Δ^9 -THC). Die Konzentrationen sind für jeden Zeitpunkt als Boxplot mit Median, 25%-Quantil, 75%-Quantil, Minimum und Maximum dargestellt.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, IL: Interleukin

IFN- γ **TNF- α** **GM-CSF****IP-10****Abb. 10b:** Perioperative Zytokinkinetik von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und IP-10.

Im Zeitverlauf dargestellt sind die Konzentrationen der Zytokine im Vollblut in den vier Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol (wt, -), Wildtyp mit Dronabinol (wt, Δ^9 -THC), Mutation ohne Dronabinol (NQO1*2, -) und Mutation mit Dronabinol (NQO1*2, Δ^9 -THC). Die Konzentrationen sind für jeden Zeitpunkt als Boxplot mit Median, 25%-Quantil, 75%-Quantil, Minimum und Maximum dargestellt.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, IL: Interleukin

Eotaxin**MIP-1α****Abb. 10c: Perioperative Zytokinkinetik von Eotaxin und MIP-1α.**

Im Zeitverlauf dargestellt sind die Konzentrationen der Zytokine im Vollblut in den vier Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol (wt, -), Wildtyp mit Dronabinol (wt, Δ⁹-THC), Mutation ohne Dronabinol (NQO1*2, -) und Mutation mit Dronabinol (NQO1*2, Δ⁹-THC). Die Konzentrationen sind für jeden Zeitpunkt als Boxplot mit Median, 25 %-Quantil, 75 %-Quantil, Minimum und Maximum dargestellt.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, IL: Interleukin

3.3 Analyse der Matrix-Metalloproteinasen

Auch die Matrix-Metalloproteinasen MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10 und MMP-13 wurden präoperativ (d-1), am ersten postoperativen Tag (d+1), sowie am zweiten postoperativen Tag (d+2) im Blut bestimmt. Zur weiteren Auswertung wurden sie den entsprechenden Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol, Mutation ohne Dronabinol, Wildtyp mit Dronabinol und Mutation mit Dronabinol zugeordnet. Die statistische Analyse erfolgte analog zur Analyse der Zytokinkonzentrationen (vgl. 3.2). Die genauen Daten der statistischen Analyse sind in den Tabellen 7a-d und 9a-d im Anhang dargestellt. Die in diesem Abschnitt analysierten Kinetiken der einzelnen Metalloproteinasen zeigt Abbildung 14 (S. 36 ff).

3.3.1 Die Kinetik der Matrix-Metalloproteinasen in den einzelnen Gruppen

Gruppe 1: Wildtyp ohne Dronabinol. Für alle Metalloproteinasen sind von d-1 zu d+1 ansteigende Werte zu verzeichnen. Diese sind für MMP-1 ($p=0,003$), MMP-2 ($p=0,002$), MMP-9 ($p=0,026$), MMP-10 ($p=0,002$) und MMP-13 ($p=0,002$) statistisch signifikant. In der postoperativen Phase (von d+1 zu d+2) liegt ein signifikanter Anstieg nur bei MMP-3 vor ($p<0,001$). MMP-1, MMP-2, MMP-8 und MMP-10 weisen Anstiege unterhalb des Signifikanzniveaus auf. Sinkende Tendenzen zeigen sich bei MMP-7, MMP-9 und MMP-13. Vergleicht man den präoperativen Zeitpunkt d-1 mit dem 2. postoperativen Tag d+2, sind für MMP-1 ($p=0,006$), MMP-2 ($p=0,005$), MMP-3 ($p=0,002$), MMP-10 ($p=0,002$) und MMP-13 ($p=0,004$) signifikante Anstiege erkennbar.

Gruppe 2: Mutation ohne Dronabinol. Von d-1 zu d+1 steigen die medianen Konzentrationen aller Metalloproteinasen signifikant an ($p<0,04$). Der Vergleich der beiden postoperativen Zeitpunkte d+1 und d+2 zeigt keine signifikanten Veränderungen mehr: MMP-3 und MMP-8 steigen tendenziell, alle übrigen Metalloproteinasen fallen ab. Vergleicht man d-1 und d+2, zeigen sich signifikante Anstiege für MMP-1 ($p<0,001$), MMP-2 ($p<0,001$), MMP-3 ($p=0,016$), MMP-7 ($p=0,016$), MMP-10 ($p<0,001$) und MMP-13 ($p<0,001$). MMP-8 und MMP-9 weisen ebenfalls einen medianen Konzentrationsanstieg auf, der jedoch nicht signifikant ist.

Gruppe 3: Wildtyp mit Dronabinol. Mit Ausnahme von MMP-8 zeigt sich von d-1 zu d+1 bei allen Metalloproteinasen ein Anstieg der medianen Konzentrationen. Diese sind für MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10 und MMP-13 signifikant. Der Median

von MMP-8 fällt tendenziell. Von d+1 zu d+2 zeigt nur MMP-3 einen signifikanten postoperativen Anstieg ($p < 0,001$). Nicht signifikante postoperative Anstiege sind für MMP-2, MMP-8 und MMP-10 zu beobachten. Die medianen Konzentrationen von MMP-1, MMP-7, MMP-9 und MMP-13 fallen. Mit Ausnahme von MMP-3 stagniert in diesem Zeitraum der Gehalt aller Metalloproteinasen im Blut. Im Vergleich von d-1 und d+2 steigt der Gehalt aller Metalloproteinasen mit Ausnahme von MMP-8. Dieser Anstieg ist signifikant für MMP-1 ($p < 0,001$), MMP-2 ($p < 0,001$), MMP-3 ($p < 0,001$), MMP-7 ($p = 0,002$), MMP-10 ($p < 0,001$) und MMP-13 ($p < 0,001$). MMP-8 verändert sich nicht.

Gruppe 4: Mutation mit Dronabinol. In dieser Gruppe steigen die medianen Konzentrationen aller Metalloproteinasen von d-1 zu d+1. Dieser Anstieg ist jedoch nur bei MMP-8 signifikant ($p = 0,024$). In der postoperativen Phase (d+1 bis d+2) liegen keine signifikanten Veränderungen vor. MMP-8 und MMP-9 fallen in diesem Abschnitt wieder leicht ab, die anderen Metalloproteinasen zeigen ansteigende Tendenz. Vergleicht man d-1 und d+2, liegen die Mediane aller Metalloproteinasen (Ausnahme MMP-9) postoperativ über den präoperativen Werten, jedoch nur für MMP-3 ($p < 0,001$) und MMP-10 ($p = 0,01$) signifikant darüber. MMP-9 zeigt dagegen fallende Tendenz.

3.3.2 Ohne Dronabinol liegt die Konzentration von MMP-7 präoperativ bei Mutationsträgern deutlich unter Wildtypniveau

Um den Einfluss des NQO1*2-Polymorphismus auf den traumainduzierten Verlauf der Metalloproteinasen zu untersuchen, werden die Gruppen 1 und 2 gegenübergestellt. Präoperativ zeigt sich für MMP-7 ein signifikanter Unterschied ($p = 0,047$) zwischen beiden Gruppen: Die mediane Konzentration der Mutationsträger liegt hierbei deutlich unter derjenigen der Wildtypen (Abbildung 11). Alle anderen untersuchten Metalloproteinasen weisen präoperativ keine signifikanten Unterschiede auf. Mit Ausnahme von MMP-10, dessen mediane Konzentration diejenige der Wildtypen übersteigt, liegen jedoch alle Konzentrationsmediane der Mutationsträger immer unter denen der Wildtypen. D+1 weist keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutationsträgern und Wildtypen auf. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Konzentrationsmediane der Mutationsträger bei MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9 und MMP-13 unter, bei MMP-1, MMP-2 und MMP-10 über denen der Wildtypen. Bei d+2 liegen die medianen Konzentrationen der Mutationsträger unter denen der Wildtypen. Lediglich für MMP-10 gleichen sie sich.

Der Vergleich der Kinetiken zeigt ähnliche Verläufe beider Gruppen von d-1 zu d+1,

jedoch eine unterschiedliche Entwicklung beider Gruppen von d+1 zu d+2: Während bei Wildtypen der Median für MMP-3 signifikant ansteigt und für MMP-8 und MMP-10 steigende Tendenzen aufweist, zeigen sich bei Mutationsträgern keine signifikanten Veränderungen mehr, lediglich steigende Tendenzen sind für MMP-3 und MMP-8 sichtbar.

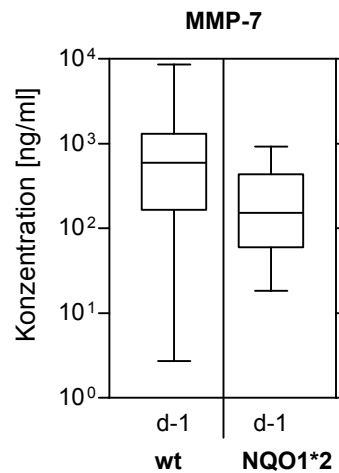


Abb. 11: Signifikante Konzentrationsunterschiede ohne Dronabinol sind präoperativ (d-1) für MMP-7 sichtbar. wt: Wildtyp; NQO1*2: Mutationsträger; MMP: Matrix-Metalloproteinase

3.3.3 Wildtypen zeigen ohne Dronabinol höhere MMP-Konzentrationen als mit Dronabinol

Der Vergleich von Gruppe 1 und Gruppe 3 spiegelt die Auswirkungen der Zusatzmedikation mit Dronabinol auf traumainduzierte Veränderungen der Metalloproteinasen wider. Zum Zeitpunkt d-1 ist ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen für MMP-3 sichtbar ($p=0,038$): Wildtypen ohne Dronabinol liegen hier deutlich über Wildtypen mit Dronabinol (Abbildung 12). Die Konzentrationsmediane aller weiteren Metalloproteinasen, mit Ausnahme von MMP-8, sind in der Gruppe ohne Dronabinol tendenziell höher als die der Gruppe mit Dronabinol. Der Median von MMP-8 liegt in der Gruppe ohne Zusatzmedikation unter dem der Gruppe mit Zusatzmedikation. Bei d+1 sind die medianen Konzentrationen von MMP-8 ($p=0,047$) und MMP-9 ($p=0,018$) ohne Dronabinol signifikant höher als mit Dronabinol (Abbildung 12). Dies gilt unterhalb des Signifikanzniveaus auch für alle anderen Metalloproteinasen. Zum Zeitpunkt d+2 liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen vor. Tendenziell ist hier

ebenfalls zu erkennen, dass alle Mediane der Gruppe ohne Zusatzmedikation über denen der Gruppe mit Zusatzmedikation liegen

Im Zeitraum von d-1 zu d+1 sind die medianen Verlaufstendenzen mit Ausnahme von MMP-8 in beiden Gruppen gleichsinnig. Betrachtet man den weiteren Verlauf von d+1 zu d+2 setzt sich diese Tendenz fort. Hier sind lediglich für MMP-1 Unterschiede sichtbar: Dieser Marker steigt bei Wildtypen ohne Zusatzmedikation noch leicht an, während er in der Gruppe ohne Zusatzmedikation leicht abfällt. Diese Verlaufsdifferenz ist statistisch jedoch nicht signifikant. In beiden Gruppen liegen an d+2 die Mediane von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10 und MMP-13 signifikant über dem Ausgangsniveau. Bei MMP-7 ist dies nur in Gruppe 3 der Fall. MMP-8 und MMP-9 unterscheiden sich nicht grundlegend vom Ausgangsniveau.

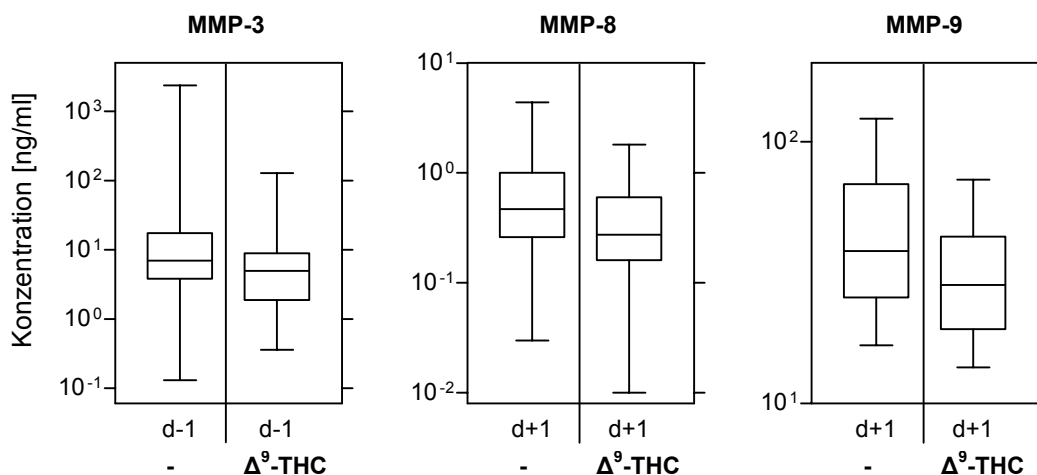


Abb. 12: Signifikante Konzentrationsunterschiede bei Wildtypen liegen in Abhängigkeit von Dronabinol (Δ^9 -THC) für MMP-3, MMP-8 und MMP-9 vor. d-1: präoperativ; d+1: erster postoperativer Tag; - : keine Dronabinoleinnahme; MMP: Matrix-Metalloproteinase

3.3.4 Unter Dronabinol unterscheidet sich die postoperative Antwort von MMP-3 zwischen Mutationsträgern und Wildtypen

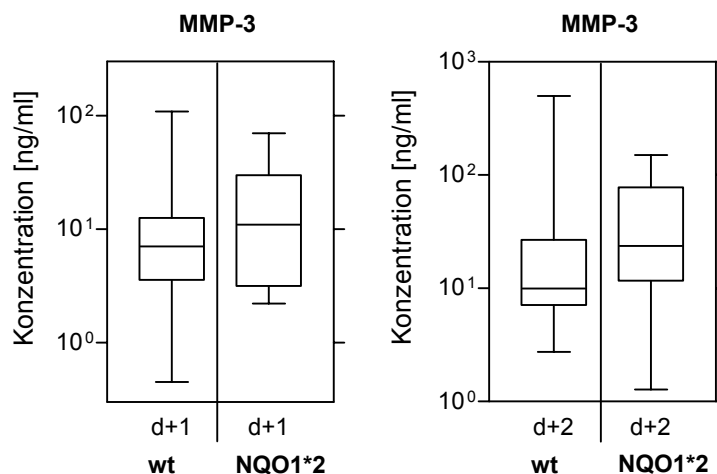


Abb. 13: Signifikante Konzentrationsunterschiede von MMP-3 unter Dronabinol zeigen sich postoperativ. d+1: erster postoperativer Tag; d+2: zweiter postoperativer Tag, wt: Wildtyp NQO1*2: Mutationsträger; MMP: Matrix-Metalloproteinase

In diesem Abschnitt werden die Auswirkungen des SNP auf die Entwicklung der Metalloproteinasen unter Dronabinol analysiert. Präoperativ (d-1) lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutationsträgern und Wildtypen feststellen. Die Mediane der Wildtypen liegen zu diesem Zeitpunkt für MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-10 und MMP-13 unter, für MMP-7, MMP-8 und MMP-9 über denen der Mutationsträger. Zum Zeitpunkt d+1 zeigt sich für MMP-3 ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ($p=0,038$). Die mediane MMP-3-Konzentration der Wildtypen liegt signifikant unter derjenigen der Mutationsträger. Auch die Mediane von MMP-2, MMP-8 und MMP-9 sind in Gruppe 3 niedriger als in Gruppe 4. Die übrigen Metalloproteinasen zeigen für Wildtypen höhere Mediane als für Mutationsträger. Zum Zeitpunkt d+2 liegt der Konzentrationsmedian vom MMP-3 bei Wildtypen erneut signifikant unter dem der Mutationsträger ($p=0,028$), (Abbildung 13). Wildtypen weisen darüber hinaus für MMP-2, MMP-7 und MMP-10 niedrigere Konzentrationsmediane auf als Mutationsträger. Die Mediane der anderen Metalloproteinasen liegen in Gruppe 3 über denen der Gruppe 4.

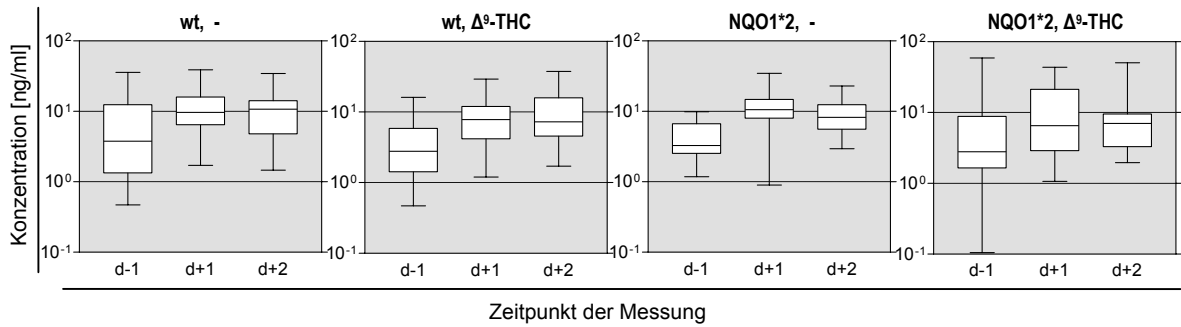
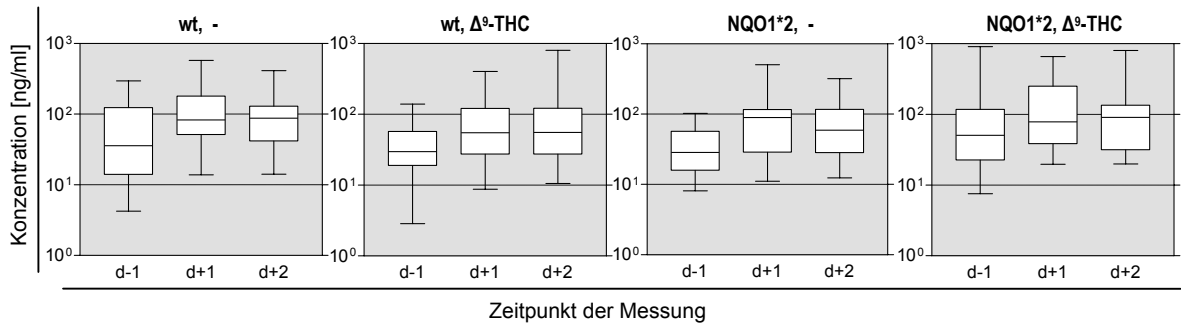
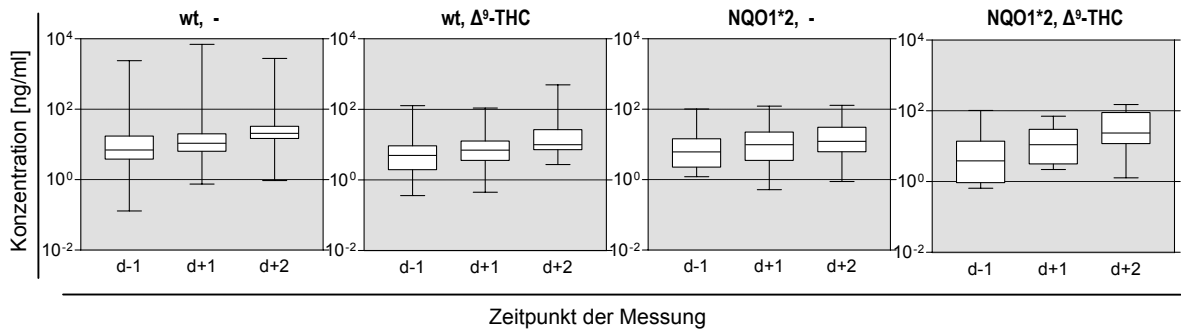
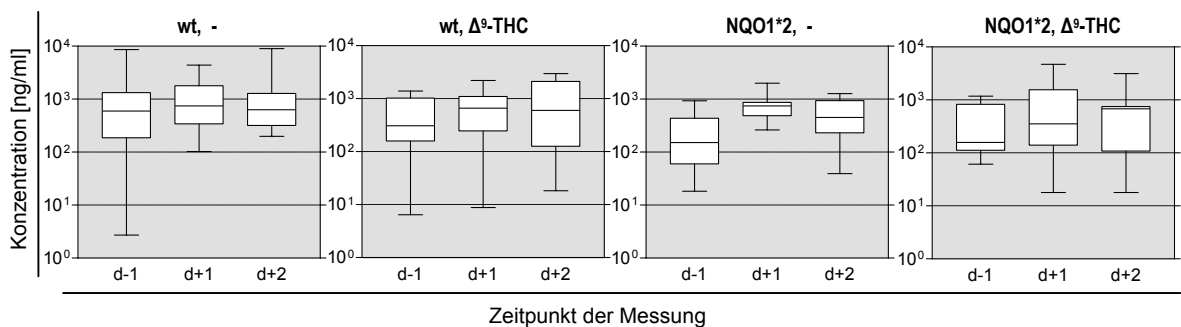
Der Verlauf beider Gruppen zeigt von d-1 zu d+1 unterschiedlich signifikante Veränderungen. Während in der Gruppe der Wildtypen für alle Metalloproteinasen außer MMP-8 und MMP-9 signifikante Konzentrationserhöhungen zu verzeichnen sind, ist dies

in der Gruppe der Mutationsträger nicht der Fall. Hier ist lediglich für MMP-8 ein deutlicher Konzentrationsanstieg zu beobachten. Postoperativ (von d+1 zu d+2) tritt in Gruppe 3 nur noch bei MMP-3 eine deutliche Erhöhung der medianen Konzentration auf. In Gruppe 4 zeigen sich keine signifikanten Veränderungen mehr. Im Vergleich d-1 zu d+2 weisen in Gruppe 3 alle Metalloproteinasen mit Ausnahme von MMP-8 und MMP-9 signifikante Konzentrationserhöhungen auf, in Gruppe 4 ist dies nur bei MMP-3 und MMP-10 der Fall. MMP-3 weist insgesamt bei Mutationsträgern einen steileren Anstieg auf als bei Wildtypen.

3.3.5 Mutationsträger weisen postoperativ ohne Dronabinol niedrigere MMP-3-Konzentrationen auf als mit Dronabinol

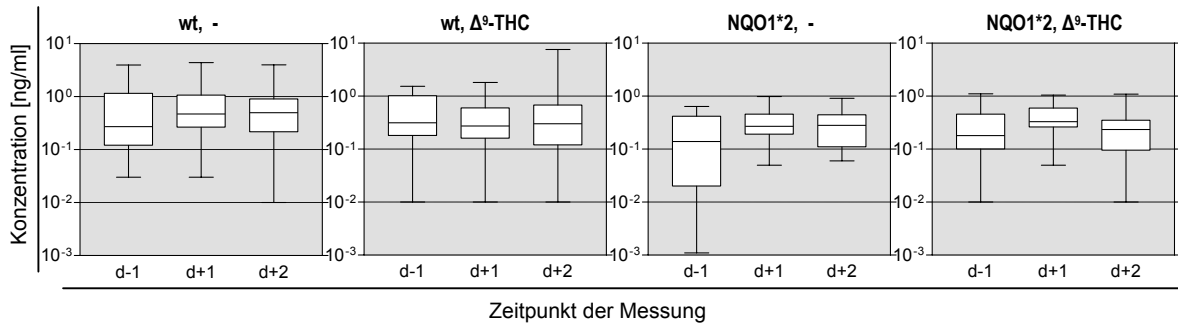
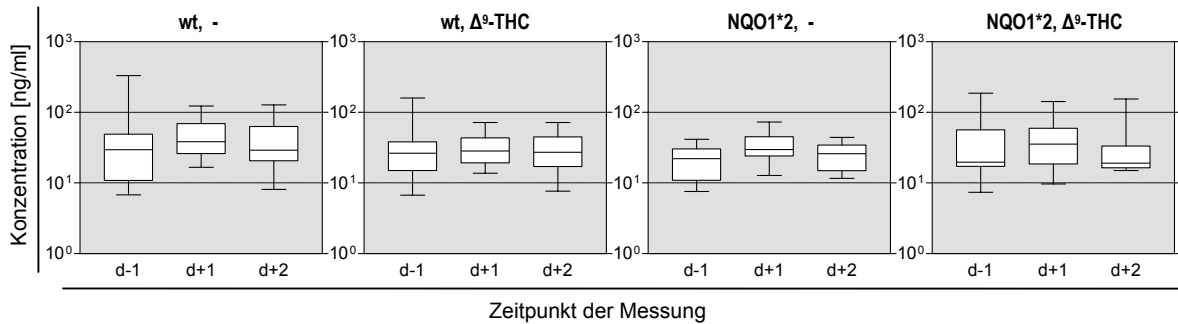
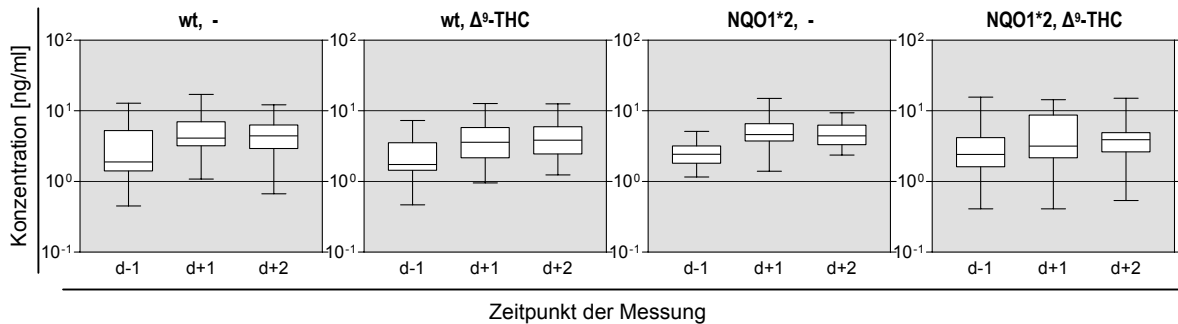
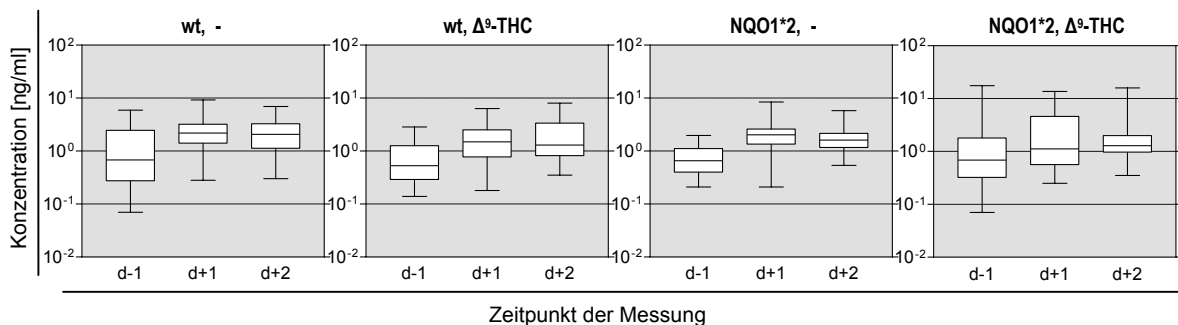
In Abhängigkeit von Dronabinol soll der traumainduzierte Verlauf der Metalloproteinasen bei Mutationsträgern untersucht werden. Dazu dient die Gegenüberstellung der Gruppen 2 und 4. Zu den Zeitpunkten d-1 und d+1 ergeben sich dabei keine signifikanten Unterschiede der medianen Konzentrationen. Präoperativ (d-1) zeigen sich für MMP-1, MMP-9 und MMP-10 tendenziell höhere mediane Konzentrationen bei Mutationsträgern ohne Dronabinol, die Mediane aller anderen Metalloproteinasen liegen bei Mutationsträgern ohne Dronabinol unter denen der Gruppe mit Dronabinol. Zum Zeitpunkt d+1 sind die Konzentrationsmediane für MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-10 und MMP-13 im Vergleich zu Gruppe 2 erhöht, für MMP-3, MMP-8 und MMP-9 im Vergleich zu Gruppe 4 verringert. Zum Zeitpunkt d+2 liegt für MMP-3 in Gruppe 2 ein signifikant niedrigerer Konzentrationsmedian vor als in Gruppe 4 ($p=0,034$). Dies gilt unterhalb des Signifikanzniveaus auch für MMP-2 und MMP-7. In der Gruppe ohne Dronabinol liegen die Mediane der anderen Metalloproteinasen tendenziell über denen der Gruppe mit Dronabinol.

In den Verläufen der Metalloproteinasen beider Gruppen zeigen sich von d-1 zu d+1 Unterschiede: Mutationsträger ohne Dronabinol weisen in diesem Zeitraum ausnahmslos signifikante Anstiege der medianen Konzentrationen auf. Diese sind unter Dronabinol nur bei MMP-8 vorhanden. Von d+1 zu d+2 treten weder mit noch ohne Dronabinol signifikante Veränderungen der medianen Konzentrationen auf.

MMP-1**MMP-2****MMP-3****MMP-7****Abb. 14a: Perioperative Kinetik der Matrix-Metalloproteinasen 1, 2, 3 und 7.**

Im Zeitverlauf dargestellt sind die Konzentrationen der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) im Vollblut in den vier Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol (wt, -), Wildtyp mit Dronabinol (wt, Δ⁹-THC), Mutation ohne Dronabinol (NQO1*2, -) und Mutation mit Dronabinol (NQO1*2, Δ⁹-THC). Die Konzentrationen sind für jeden Zeitpunkt als Boxplot mit Median, 25%-Quantil, 75%-Quantil, Minimum und Maximum dargestellt.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag

MMP-8**MMP-9****MMP-10****MMP-13****Abb. 14b:** Perioperative Kinetik der Matrix-Metalloproteinasen 8, 9, 10 und 13.

Im Zeitverlauf dargestellt sind die Konzentrationen der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) im Vollblut in den vier Gruppen Wildtyp ohne Dronabinol (wt, -), Wildtyp mit Dronabinol (wt, Δ⁹-THC), Mutation ohne Dronabinol (NQO1*2, -) und Mutation mit Dronabinol (NQO1*2, Δ⁹-THC). Die Konzentrationen sind für jeden Zeitpunkt als Boxplot mit Median, 25%-Quantil, 75%-Quantil, Minimum und Maximum dargestellt.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag

4 Diskussion

4.1 Hinweise auf eine Assoziation zwischen NQO1*2-Polymorphismus und Prostatakarzinom

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle des NQO1*2-Polymorphismus bei der Entstehung des Prostatakarzinoms. Es ist beschrieben, dass der NQO1*2-Polymorphismus zu einem Funktionsverlust des Enzyms NQO1 führt (vgl. 1.2) und so möglicherweise zur Entstehung von Tumoren beiträgt. Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Polymorphismus und der Entwicklung eines Prostatakarzinoms besteht, sind 95 Fälle mit Prostatakarzinom für den Polymorphismus des NQO1-Gens typisiert worden.

Die Ergebnisse, die in dieser Arbeit bezüglich Prostatakarzinompatienten dargelegt werden, unterscheiden sich von denjenigen gesunder Kontrollen aus der Literatur (Zhang et al. 2003), (vgl. Tabelle 5). In der untersuchten Stichprobe der Prostatakarzinompatienten liegt dabei mit 5,2% ein deutlich höherer Prozentsatz von Patienten mit Nullallel vor als für gesunde Kontrollen, bei denen der homozygote Polymorphismus mit einer Frequenz von 1,6% auftritt. Der Anteil heterozygoter Konfigurationen ähnelt sich in beiden Populationen. Er liegt bei 25,3% für die untersuchten Karzinompatienten und bei 25% für die Kontrollen. Mit einem Wildtypanteil von 69,5% unterscheidet sich die untersuchte Stichprobe vom Wildtypanteil der Kontrollen (73,4%).

Insgesamt wird deutlich, dass gegenüber den Kontrollen in der untersuchten Stichprobe eine Verschiebung des Wildtypanteils zugunsten der homozygoten Nullvariante vorliegt.

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass das Prostatakarzinom mit dem NQO1*2-Polymorphismus assoziiert ist, wobei insbesondere die homozygote Ausprägung des Polymorphismus vermehrt auftritt. Für diesen speziellen Sachverhalt liegen für Patienten mit Prostatakarzinom jedoch bisher keine Untersuchungen vor.

Andere Studien, die ebenfalls die Ausprägungen des NQO1*2-Polymorphismus in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen untersuchten, untermauern dennoch eine mögliche Rolle von NQO1*2 in der Tumorentstehung. So konnte für das sporadisch auftretende kolorektale Adenokarzinom eine Assoziation mit NQO1*2 festgestellt werden: In einer Fall-Kontroll-Studie aus Großbritannien wurde gezeigt, dass die Hochrisikoform des Tumors unter der C/T-Ausprägung des Polymorphismus vermehrt auftritt (Mitrou et al.

2007). Ein weiteres Beispiel für eine Assoziation des NQO1*2-Polymorphismus mit der Tumorentstehung ist das sporadisch auftretende Burkitt-Lymphom bei jungen Patienten (Kracht et al. 2004). Wie schon in der vorliegenden Arbeit gezeigt, trat auch bei Fällen mit Burkitt-Lymphom die homozygote T/T-Variante häufiger auf als in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus war auch die C/T-Variante erhöht.

Welcher molekulare Mechanismus könnte beim Vorhandensein des Polymorphismus für eine vermehrte Tumorentstehung verantwortlich sein? Anwar et al. (2003) zeigten, dass NQO1 mit p53 durch Protein-Protein-Interaktion in Verbindung steht (Anwar et al. 2003). Die daraus resultierende Vermutung, dass NQO1 durch die Wechselwirkung mit p53 zu dessen Stabilität beiträgt (Ross 2004), steht in logischem Zusammenhang zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen. Das gehäufte Auftreten der funktionslosen Nullvariante des NQO1-Gens bei Patienten mit Prostatakarzinom unterstützt die Vermutung, dass NQO1 tumorprotektive Eigenschaften besitzt, die durch das Vorliegen des Polymorphismus verloren gehen.

Einschränkungen der vorliegenden Studie ergeben sich aus der zum Vergleich herangezogenen Kontrollgruppe. Diese entstammt der deutschen Bevölkerung und umfasst 252 Personen, von denen 76,6% männlich und 23,4% weiblich sind. Es liegen keine verwandtschaftlichen Verhältnisse vor (Zhang et al. 2003). Da aufgrund der Untersuchung des Prostatakarzinoms nur männliche Patienten in die vorliegende Studie eingeschlossen sind, decken sich die Eigenschaften von Studien- und Kontrollgruppe für diesen Faktor nicht. Es liegen jedoch keine Hinweise dafür vor, dass Männer und Frauen ein unterschiedliches Verteilungsmuster des NQO1*2-Polymorphismus aufweisen.

Weiterhin liegt das Durchschnittsalter der Kontrollgruppe mit 39 Jahren unter dem der untersuchten Prostatakarzinompatienten. Da das Prostatakarzinom ein Tumor ist, der oft erst im höheren Alter auftritt, erscheint ein Vergleich mit einer nach dem Alter adjustierten Kontrollgruppe sinnvoll, um den Faktor als Störgröße auszuschließen und einen exakteren Vergleich beider Gruppen zu ermöglichen.

Bei Rückschlüssen auf die Grundgesamtheit muss darüber hinaus beachtet werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv monozentrisch im Einzugsgebiet des Universitätsklinikums Ulm erhoben wurde. Auch kann aus einem Stichprobenumfang von 95 Fällen keine definitive und allgemeingültige Aussage abgeleitet werden. Die Untersuchungen bieten vielmehr orientierende Hinweise, die als mögliche Grundlage weiterführender Untersuchungen dienen sollen.

Im Rahmen dieser Einschränkungen zeigt die vorliegende Studie auf, dass eine Assoziation des NQO1*2-Polymorphismus mit dem Prostatakarzinom wahrscheinlich ist (Schneider et al. 2007). Darüber hinaus können Hinweise auf die tumorprotektive Funktion von NQO1 bestätigt werden. Es erscheint daher lohnenswert, die vorliegenden Ergebnisse in weiteren Untersuchungen zu bestätigen. Darüber hinaus wäre ein nächster Schritt, die Mechanismen genauer aufzuklären, die bei vorliegendem NQO1*2-Polymorphismus zur Entstehung des Prostatakarzinoms und möglicherweise auch anderer Tumoren beitragen.

4.2 Die Auswirkungen des NQO1*2-Polymorphismus auf die posttraumatische Immunantwort

Neben der Assoziation des NQO1*2-Polymorphismus mit der Prostatakarzinomentstehung soll diese Arbeit weiterhin die Auswirkungen des NQO1*2-Polymorphismus auf die Immunantwort im Rahmen einer Operation analysieren. Dazu wurden die perioperativen Zytokin- und MMP-Kinetiken der Wildtypen denen der Träger des Polymorphismus gegenübergestellt.

Es wird dabei deutlich, dass sich die präoperativen Zytokinmuster beider Gruppen unterscheiden. Signifikant niedrigere Konzentrationen der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 finden sich in der Gruppe der heterozygoten und homozygoten SNP-Träger (vgl. 3.2.2). Die untersuchten proinflammatorischen Zytokine beider Gruppen unterscheiden sich dagegen kaum. Die hier beobachteten Unterschiede sind gering und könnten durch methodische Schwankungen bedingt sein.

Unter dem NQO1*2-Genotyp liegt diesen Ergebnissen zufolge schon präoperativ ein Defizit antiinflammatorischer Marker vor, das möglicherweise durch den Polymorphismus bedingt ist. Diese Vermutung wirft die Frage auf, wie effizient die Immunantwort dieser Patienten bei Entzündungsprozessen ist. Werden postoperative Entzündungsprozesse bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus begünstigt?

Das Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Einflüsse kann durch eine Fehlregulation der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 empfindlich gestört werden: Lowe et al. (2003) fanden Hinweise darauf, dass die Verminderung der IL-10 Konzentration im Blut mit einer erhöhten Mortalitätsrate bei Sepsispatienten oder schwerkranken Patienten ohne Sepsis assoziiert ist. Ursache der niedrigen IL-10-Konzentrationen war hierbei der C592A-Polymorphismus im Gen von IL-10 (Lowe et al. 2003). Ebenso konnte in Mausmodellen mit Hilfe von Anti-IL-10-Antikörpern eine höhere

Aktivität natürlicher Killerzellen nachgewiesen werden, die mit einer Verminderung der Überlebensrate nach Peritonitis korrelierten (Scott et al. 2006). Für IL-13 konnte Ähnliches gezeigt werden. So sind niedrige Konzentrationen des Zytokins in der Anfangsphase einer Sepsis nach Blanco-Quiros et al. (2005) in einer pädiatrischen Studie mit einer Verschlechterung der Prognose assoziiert (Blanco-Quiros et al. 2005).

Bedingt durch die niedrigen Spiegel der antiinflammatorischen Zytokine kann also eine überschießende Entzündungsreaktion stattfinden, die möglicherweise postoperative Entzündungskomplikationen begünstigt. Aber auch erhöhte IL-10-Konzentrationen können zu ähnlichen Komplikationen führen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass erhöhte IL-10-Konzentrationen mit einem prognostisch ungünstigeren Verlauf bei Sepsis assoziiert sind (Heper et al. 2006, Wunder et al. 2004). In diesen Fällen wird die durch proinflammatorische Zytokine vermittelte entzündliche Immunantwort gehemmt, woraus infektiologische Komplikationen resultieren (Hildebrand et al. 2005).

Innerhalb der durchgeführten Studie gleichen sich die IL-10- und IL-13-Konzentrationen der SNP-Träger postoperativ dem Niveau der Wildtypen an. Im Rahmen eines operativen Traumas kann demnach auch unter Einfluss des Polymorphismus eine der gesunden Antwort angenäherte Immunantwort induziert werden. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür ist die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α im Rahmen des operativen Traumas, die auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden kann. Sie induziert die Produktion antiinflammatorischer Zytokine (Scumpia und Moldawer 2005). Dieser endogene Gegenregulationsmechanismus auf die Erhöhung proinflammatorischer Zytokine ist demnach bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus intakt. Inwiefern das präoperative Defizit antiinflammatorischer Zytokine postoperativ dennoch Entzündungsprozesse fördert, sollte durch Nachuntersuchungen der Patienten mit Analysen zu Spätwirkungen der Operation weiter aufgeklärt werden.

Im Rahmen der Untersuchung der Immunantwort wurden auch die Serumkonzentrationen der MMPs bei Mutationsträgern und Wildtypen ohne Zusatzmedikation präoperativ, am ersten und zweiten postoperativen Tag ausgewertet.

Präoperativ ähneln sich die Werte beider Gruppen mit Ausnahme der Werte für MMP-7, das bei SNP-Trägern signifikant niedrigere Werte zeigt (vgl. 3.3.2). Postoperativ sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den MMP-Konzentrationen beider Gruppen festzustellen.

Dass MMP-7 für Träger des NQO1*2-Polymorphismus präoperativ signifikant niedrigere Werte aufweist, könnte zu einer fehlerhaften Immunantwort bei diesen Patienten führen. MMP-7, das auch als Matrilysin bezeichnet wird, spaltet eine Reihe von Bestandteilen der extrazellulären Matrix. Neben verschiedenen Typen von Kollagen und strukturellen Matrixproteinen gehören auch nicht strukturelle Proteine wie E-Cadherin und Pro-TNF- α zu seinen Substraten (Somerville et al. 2003).

Da E-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül zur Verbindung von Zellen im Zell-Zell-Kontakt beiträgt, wird durch die MMP-7-vermittelte Spaltung des Proteins die Migration verschiedener Zelltypen durch Epithelien ermöglicht. Fehlt die Metalloproteinase, wird diese transepitheliale Migration eingeschränkt. Dies betrifft, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte, auch neutrophile Granulozyten (Nagase et al. 1999), deren chemotaktische gesteuerte Auswanderung ins Gewebe erschwert wird. Die Phagozytose von Fremdmaterial und Zelltrümmern im Gewebe könnte so beeinträchtigt werden. Erwiesen wurde die Migrationseinschränkung allerdings nur bei vollständiger Abwesenheit von MMP-7. Ein Mangel der Metalloproteinase könnte möglicherweise ebenfalls eine verminderte Spaltung von E-Cadherin zur Folge haben, was bei NQO1*2-Patienten mit verminderten MMP-7-Spiegeln zu schlechteren Ausgangsbedingungen bei operativen Eingriffen führen könnte.

Weiterhin aktiviert MMP-7 auch Pro-TNF- α . Ein Mangel der Metalloproteinase könnte sich demnach auch auf diese Funktion auswirken. Pro-TNF- α ist jedoch ebenfalls Substrat von MMP-3 und MMP-9 (Somerville et al. 2003). Beide Metalloproteinasen weisen bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus keine reduzierten Konzentrationen auf. Es ist denkbar, dass sie den MMP-7-Mangel ausgleichen können, so dass eine ausreichende lokale Aktivierung von Pro-TNF- α gewährleistet ist. Darüber hinaus weichen die gemessenen Serumkonzentrationen von TNF- α in der Gruppe der Mutationsträger nicht von denen der Wildtypen ab. Der Einfluss eines Mangels von MMP-7 auf die systemische Konzentration von TNF- α ist damit unwahrscheinlich.

Geringere Konzentrationen von MMP-7 bei Mutationsträgern treten nur präoperativ auf. Im postoperativen Verlauf können keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Möglicherweise findet also im perioperativen Verlauf ein ausreichender Anstieg von MMP-7 bei Mutationsträgern und damit ein Angleichen an das Niveau der Wildtypen statt.

Werden alle untersuchten Metalloproteinasen betrachtet, scheint der NQO1*2-

Polymorphismus wenig Einfluss auf ihr Verhalten im Rahmen operativ induzierten Stresses zu haben. Die beobachteten präoperativen Unterschiede bei MMP-7 verlieren sich postoperativ und können wie besprochen auch präoperativ möglicherweise kompensiert werden. Da alle anderen MMPs keine Auffälligkeiten aufweisen, ist davon auszugehen, dass die durch sie regulierten Prozesse nicht eingeschränkt sind. Die Regulation interzellulärer Signale, Gewebeumbau im Rahmen des Remodeling und weitere Funktionen sind demnach im Rahmen von operativen Eingriffen auch bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus intakt.

4.3 Der Einfluss von Dronabinol auf die posttraumatische Immunantwort

Hinweise auf immunmodulatorische Funktionen von Dronabinol (Ueda et al. 2007, Ziring et al. 2006) und seine potentiellen Wirkungen in der Schmerztherapie (Abrams et al. 2007, Iskedjian et al. 2007, Russo und Guy 2006) sind Anlass, dessen Einsatzmöglichkeiten im Rahmen der Therapie perioperativ auftretender, entzündungsbedingter Schmerzen zu untersuchen. Ein erster Schritt dabei ist, zu überprüfen, inwiefern Dronabinol die posttraumatische Immunantwort beeinflusst. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden innerhalb der Wildtypgruppen für den NQO1*2-Polymorphismus durchgeführt, um eventuelle Auswirkungen des Polymorphismus auf die Ergebnisse auszuschalten. Hierbei wurden zwischen den Gruppen „Wildtyp mit Dronabinol“ und „Wildtyp ohne Dronabinol“ Zytokine und MMPs verglichen.

Für Zytokine ergeben sich dabei keine signifikanten Konzentrationsunterschiede mit und ohne Dronabinoleinnahme. Dagegen treten für MMP-3 präoperativ signifikante Unterschiede auf, MMP-8 und MMP-9 zeigen diese am ersten postoperativen Tag.

Dass Cannabinoide die Immunantwort herabsetzen können, ist schon seit längerem bekannt und diskutiert (Klein et al. 1998, McKallip et al. 2002). Über die genauen Mechanismen ist man sich bis heute jedoch nicht im Klaren. Ein möglicher Mechanismus ist die Apoptoseinduktion von Immunzellen wie dendritischen Zellen über den Cannabinoidrezeptor CB2 (Do et al. 2004). Dies könnte unter anderem zu einer verminderten Aktivierung von T-Zellen und damit zu einer reduzierten Freisetzung von Zytokinen wie IFN- γ , IL-1 α oder Eotaxin führen. Im Fall der vorliegenden Daten lässt sich dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigen, da für kein Zytokin unter Dronabinol veränderte Konzentrationen nachzuweisen sind.

Trotz dieser fehlenden Signifikanz im direkten Vergleich unterscheiden sich die Zytokinverläufe der Wildtypen mit und ohne Dronabinol (vgl. 3.2.3). Die Anstiege, die vom ersten zum zweiten postoperativen Tag unter Dronabinol auftreten, sprechen für einen Einfluss der Zusatzmedikation auf die Immunantwort. Dieser stellt sich jedoch anders dar als zunächst vermutet. Die postoperative Immunantwort scheint unter Dronabinol stärker ausgeprägt zu sein als ohne Dronabinol.

Die Metalloproteinasen MMP-3, MMP-8 und MMP-9 zeigen deutlichere Unterschiede in Abhängigkeit von der Dronabinoleinnahme als die Zytokine. Die Konzentrationen von MMP-8 und MMP-9 liegen postoperativ bei Wildtypen mit Dronabinol signifikant unter der Gruppe ohne Dronabinol. Die Metalloproteinase MMP-9 hat immunmodulatorisch relevante Funktionen: Erhöhte MMP-9-Konzentrationen wurden bei Patienten mit schwerer Sepsis nachgewiesen (Hoffmann et al. 2006). Der Marker ist an der Aktivierung proinflammatorischer Mediatoren wie Pro-TNF- α beteiligt. Seine Produktion durch Monozyten kann durch verschiedene Marker, darunter GM-CSF und auch TNF- α selbst, verstärkt werden (Webster und Crowe 2006). Dass MMP-9-Konzentrationen unter Dronabinol vermindert sind, könnte unter diesen Gesichtspunkten für ein verbessertes postoperatives Outcome dieser Patienten sprechen, da die Förderung inflammatorischer Prozesse durch MMP-9 vermindert würde. MMP-8 degradiert Fibrinogen und den Faktor VII der Gerinnungskaskade (Hiller et al. 2000, Webster und Crowe 2006). Dadurch ist die Metalloproteinase an der Unterdrückung der plasmatischen Gerinnung beteiligt. Eine Absenkung der Plasmakonzentration wie sie unter Dronabinol sichtbar ist, könnte zur Hemmung dieser Prozesse und so zu einer Unterstützung der Gerinnungsvorgänge führen. Inwieweit sich darüber hinaus eine verminderte Konzentration der Metalloproteinase auf die Immunantwort auswirkt, ist nicht geklärt.

Der am ersten postoperativen Tag auftretende Unterschied für MMP-8 und MMP-9 ist am zweiten postoperativen Tag nicht mehr zu sehen. Eine mögliche Ursache hierfür liegt im Dosierungsschema von Dronabinol: Die primäre Halbwertszeit von Dronabinol liegt bei etwa vier Stunden. Anschließend beginnt die Umverteilung vor allem ins Fettgewebe. Die terminale Halbwertszeit beträgt dadurch bis zu 36 Stunden, über mehrere Wochen können geringe Dosen der Substanz in Urin und Stuhl nachgewiesen werden (Huestis 2005, McGilveray 2005). Am zweiten postoperativen Tag sieht das Dosierungsschema eine Einnahmereduktion der Testsubstanz auf lediglich 2x 5mg als morgendliche Gabe vor (vgl. Tabelle 2). Da diese Dosis wesentlich geringer ist als die des Vortages und die Spiegel der

Substanz im Blut in relativ kurzer Zeit halbiert und in andere Körpergewebe verteilt werden, könnten auch mögliche Effekte von Dronabinol auf die Induktion der Metalloproteinasen nachlassen.

Wie beschrieben können Metalloproteinasen über verschiedene Prozesse immunmodulatorisch wirken. Dass sich der Marker MMP-3 in den Gruppen mit und ohne Dronabinol präoperativ unterscheidet, wird damit jedoch nicht erklärt. Beide Gruppen setzten sich ausschließlich aus Wildtypen für den NQO1*2-Polymorphismus zusammen. Die präoperativen Messwerte liefern einen Überblick über die Ausgangswerte vor der ersten Dronabineinnahme. Es wird zu diesem Zeitpunkt demnach kein Unterschied zwischen beiden Gruppen erwartet. Interindividuelle Schwankungen des Markers sind eine mögliche Ursache der Abweichungen und könnten durch Faktoren wie Begleiterkrankungen der Patienten oder Störungen in der Regulation des Markers bedingt sein. Letztlich besteht die Möglichkeit, dass im Fall von MMP-3 ein falsch positives Ergebnis im Sinne eines α -Fehlers vorliegt. Diese Irrtumswahrscheinlichkeit des statistischen Tests wurde im Vorhinein auf 5% festgelegt (vgl. 2.5.2). In diesem Fall wäre der Unterschied zwischen beiden Gruppen real nicht vorhanden und man würde zu der Hypothese zurückkehren, dass sich die Mediane beider Gruppen nicht unterscheiden.

Die Frage, ob Dronabinol die posttraumatische Immunantwort beeinflusst, muss nach den vorliegenden Ergebnissen differenziert betrachtet werden. Die immunmodulatorische Wirkung des CB2-Rezeptors, dessen Ligand Dronabinol ist (Pertwee 2005), deutet auf eine solche Interaktion hin. In der vorliegenden Studie zeigt Dronabinol für Zytokine bei Wildtypen des NQO1*2-Polymorphismus jedoch eine geringere immunmodulatorische Wirkung als zunächst erwartet. Die deutlichen posttraumatischen Unterschiede lassen sich im wesentlichen auf MMP-8 und MMP-9 zusammenfassen. Um kleinere relevante Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen zu können, ist möglicherweise eine größere Trennschärfe der durchgeführten Tests nötig. Diese Wahrscheinlichkeit, einen Unterschied nachzuweisen, der tatsächlich vorhanden ist, hängt sowohl von der Größe der Stichprobe als auch von der Größe des untersuchten Effekts ab. Die Erhöhung der Trennschärfe ließe sich im vorliegenden Fall durch die Untersuchung größerer Patientengruppen erreichen. Anlass zu diesen Überlegungen geben auch die beobachteten deutlichen postoperativen Unterschiede von Wildtypen und Mutationsträgern unter Dronabinol (vgl. 4.4), die ohne die Zusatzmedikation nicht bzw. präoperativ auftreten (vgl. 4.2).

4.4 Interaktionen zwischen Dronabinol und NQO1*2-Polymorphismus

Interaktionen zwischen Dronabinol und dem NQO1*2-Polymorphismus zu untersuchen, soll dazu beitragen, die Wirkmechanismen von Dronabinol besser zu verstehen und einen gezielteren Einsatz des Wirkstoffes zu ermöglichen. Ziel der Untersuchungen ist es daher, mögliche Unterschiede in der Wirksamkeit von Dronabinol in Abhängigkeit vom NQO1*2-Polymorphismus herauszufinden.

Zwei Fragestellungen sind dabei relevant: Grundsätzlich ist zu ermitteln, ob sich durch Dronabinol die posttraumatische Immunantwort von NQO1*2-Trägern beeinflussen lässt. Außerdem ist zu untersuchen, ob sich die Immunantwort unter Dronabinol zwischen Trägern des Polymorphismus und Wildtypen unterscheidet.

Um die erste Fragestellung aufzuklären, wurden die beiden Gruppen der NQO1*2-Träger gegenübergestellt (vgl. 3.2.5 und 3.3.5). Dabei sind Unterschiede im Zytokinverlauf beider Gruppen sichtbar. Bei Dronabineinnahme kommt es zu einem verminderten Zytokinanstieg, was sich deutlich vom präoperativen zum ersten postoperativen Tag zeigt. Auffallend hierbei ist, dass dies nicht für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 gilt. Es steigt in beiden Gruppen gleichermaßen an. Damit scheinen ausreichende Konzentrationen von IL-10 im Blut beider Patientengruppen vorzuliegen, was von Bedeutung bei postoperativen Sepsisproblematiken zu sein scheint (Lowe et al. 2003), (vgl. 4.2).

Die Zytokinantwort von Patienten mit NQO1*2-Polymorphismus ist wie besprochen unter Dronabinol vermindert. Dies gilt vor allem für die proinflammatorische Reaktion. Es ist denkbar, dass antiinflammatorische Prozesse im postoperativen Verlauf stattfinden können, während ein großer Teil der proinflammatorischen Reaktion unterdrückt wird. Ein Mechanismus der hierbei eine Rolle spielen könnte, ist die verminderte Aktivierung des Inflammasoms. Das Inflammasom ist ein Proteinkomplex, der zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine aus Immunzellen führt und damit Entzündungsreaktionen triggert (Ogura et al. 2006). Die Betrachtung der vorliegenden Daten lässt die Vermutung zu, dass Dronabinol bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus zu einer verminderten Aktivierung des Inflammasoms führt und dadurch die proinflammatorische Zytokinantwort dieser Patienten hemmt.

Dieses Zytokinprofil von Dronabinol bei Trägern des Polymorphismus unterscheidet sich grundlegend vom Profil des Wirkstoffes, das für Wildtypen ermittelt wurde (vgl. 4.3). Dort ist postoperativ auch unter Dronabinol ein Anstieg der Zytokine zu verzeichnen. Die

Ergebnisse zeigen, dass die Effekte von Dronabinol höchstwahrscheinlich vom NQO1-Genotyp abhängen (Barthelmann et al. 2006). Aufgrund der Beobachtungen erscheint es möglich, Dronabinol als gezielte Entzündungsprophylaxe bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus einzusetzen. Auch die vorliegenden Hinweise, dass NQO1*2-Patienten ein Defizit für antiinflammatorische Zytokine aufweisen (vgl. 4.2), würden einen solchen Einsatz von Dronabinol unterstützen. Dadurch könnte eine Reduktion postoperativer Entzündungsprozesse erreicht werden.

Die gleichen Auswirkungen wie für Zytokine lassen sich auch für die MMPs beobachten. Ohne Dronabinol sind nach dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben für alle MMPs signifikante Anstiege vom präoperativen zum ersten postoperativen Tag sichtbar. Unter Dronabinol ist, wie bei Zytokinen, auch der Konzentrationsverlauf der MMPs deprimiert. Mit Ausnahme von MMP-3 werden jedoch auch diese Unterschiede im direkten Vergleich beider Gruppen an den einzelnen Tagen nicht signifikant. Dass MMP-3 unter Dronabinol am zweiten postoperativen Tag höhere Plasmaspiegel erreicht als ohne Dronabinol, kann Konsequenzen für die Immunreaktion haben. Ähnlich wie MMP-7 ist auch MMP-3 an der Spaltung von E-Cadherin beteiligt und ermöglicht so die Migration von Zellen wie neutrophilen Granulozyten in verschiedene Gewebe (Somerville et al. 2003). Die Phagozytose von Zelltrümmern und Fremdmaterial wird dadurch erleichtert. Darüber hinaus beugt MMP-3 der Aktivierung des Komplementsystems vor und baut IgG in entzündeten oder geschädigten Geweben ab (Gearing et al. 2002). Die höheren MMP-3-Konzentrationen unter Dronabinol könnten, in Zusammenhang mit einer verminderten Konzentration entzündungsfördernder Metalloproteinasen wie MMP-9, günstig auf den postoperativen Verlauf wirken.

Das Identifizieren genetischer Variationen mit pharmakologisch relevanten Konsequenzen kann für die klinische Pharmakotherapie von Bedeutung sein. Im vorliegenden Fall interessiert, ob sich die Wirkungen von Dronabinol zwischen Wildtypen und Mutationsträgern für den NQO1*2-Polymorphismus unterscheiden. Dies kann durch eine direkte Gegenüberstellung der Gruppen „Mutationsträger mit Dronabinol“ und „Wildtyp mit Dronabinol“ geklärt werden. Hierbei wird deutlich, dass die Effekte von Dronabinol sich sowohl bei proinflammatorischen als auch bei antiinflammatorischen Zytokinen unterscheiden (vgl. 3.2.4). Gegenüber Wildtypen weisen Träger des NQO1*2-Polymorphismus postoperativ signifikant niedrigere Zytokinkonzentrationen unter Dronabinol auf. Patienten mit Polymorphismus zeigen einen geringeren Anstieg der

Zytokine als Wildtypen, was zu signifikanten Unterschieden am zweiten postoperativen Tag führt. Auch MMP-3 weist zwischen Wildtypen und NQO1*2-Trägern unter Dronabinol postoperative Unterschiede auf (vgl. 3.3.4). Träger des Polymorphismus zeigen sowohl am ersten als auch am zweiten postoperativen Tag höhere Konzentrationen der Metalloproteinase.

Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass Dronabinol speziell Einfluss auf Träger des NQO1*2-Polymorphismus zeigt. Hinweise hierfür gibt auch die vorangestellte Gegenüberstellung der NQO1*2-Träger mit und ohne Dronabinol. Am zweiten postoperativen Tag treten dort unter Dronabinol höhere Konzentrationen von MMP-3 auf, bei Wildtypen dagegen sind unter Zusatzmedikation mit Dronabinol keine Veränderungen der MMP-3-Konzentrationen sichtbar (vgl. 4.3).

Die Dronabinolwirkung scheint demnach vom NQO1*2-Genotyp abhängig zu sein. Die gefundenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Dronabinol eine höhere Wirksamkeit bei Patienten mit NQO1*2-Polymorphismus besitzt. Dies könnte Konsequenzen für die perioperative Therapie mit diesem Wirkstoff nach sich ziehen. So erscheint es sinnvoll, Dronabinol gezielt bei Trägern des NQO1*2-Polymorphismus einzusetzen. Es könnte damit perioperativen Entzündungsprozessen vorgebeugt werden, um so postoperative Komplikationen zu minimieren.

Grundlage für diese Überlegungen sind Ergebnisse aus Studien anderer genetischer Varianten, beispielsweise der des β -2-adrenergen Rezeptor-Gens. Dessen Ausprägungen führen zu einem unterschiedlichen Ansprechen bei der Therapie mit β -2-Rezeptorblockern (Lanfear et al. 2005). Polymorphismen können die genetische Basis für Variationen in der Antwort des Körpers auf Arzneimittel darstellen. In diesem Zusammenhang haben sie Einfluss auf verschiedene Bereiche der Pharmakotherapie, die in unterschiedlichen Forschungsbereichen von Interesse sind (Davis und Long 2004). Sie können Veränderungen der Pharmakokinetik wie Aufnahme, Metabolisierung und Verteilung eines Pharmakons bewirken sowie die Antwort des Organismus auf das Pharmakon und dessen Pharmakodynamik beeinflussen. Ein anderes aktuelles Beispiel dafür liefert das Enzym CYP 2C8. Ein Polymorphismus im Gen des Enzyms führt zu gestörter Metabolisation des Malariamittels Amodiaquin, einem Pharmakon, das zur Therapie der Malaria in vielen afrikanischen Ländern eingesetzt wird. Der Polymorphismus hat Auswirkungen auf Toxizität und Wirkung des Arzneimittels (Parikh et al. 2007).

Der NQO1*2-Polymorphismus zeigt in den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls

pharmakogenetisch relevante Eigenschaften. Welche Mechanismen und Stoffwechselwege im Detail durch den Polymorphismus beeinflusst werden und so zu einer veränderten Immunantwort unter Dronabinol führen, könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

4.5 Abschließende Bemerkung und Ausblick

Entzündungskomplikationen nach operativem Trauma sind ein Zusammenspiel vieler Faktoren. Septische Problematiken können polygenetische Ursachen haben (Arcaroli et al. 2005). Ein möglicher Faktor der hier beteiligt ist, ist der NQO1*2-Polymorphismus. Defizite, die durch den Polymorphismus hervorgerufen werden, können bei alleinigem Vorliegen des Faktors eventuell ausgeglichen werden. Möglicherweise treten sie jedoch bei Vorliegen weiterer prädisponierender Faktoren in Erscheinung. Es ist daher sinnvoll, zukünftige Studien unter Berücksichtigung mehrerer Parameter der Entstehung von SIRS und Sepsis durchzuführen, um die Rolle des NQO1*2-Polymorphismus im Rahmen dieser polygenetischen Syndrome gezielt untersuchen zu können.

Der Einsatz von Dronabinol, beispielsweise in der palliativen Schmerztherapie, stellt schon heute eine anerkannte Therapieoption dar. Die Verwendung des Wirkstoffes im Rahmen der Beeinflussung der postoperativen Immunantwort könnte das Anwendungsgebiet von Dronabinol erweitern. Hierbei scheinen individuell zugeschnittene Therapiekonzepte von besonderer Bedeutung zu sein. Die präzise Unterteilung von Patienten durch Genotypisierung würde eine solche individualisierte Therapie, angepasst an die veränderten Stoffwechselwege des Patienten, erlauben (Arcaroli et al. 2005). Unter anderem zeigen ökonomische Diskussionen über die Durchführbarkeit solcher Untersuchungen (Flowers und Veenstra 2004), dass ein Einsatz derzeit schwierig ist. Entwicklungen zur Methodik (Gunderson et al. 2005) und Diskussionen zur Umsetzung (Need et al. 2005) arbeiten jedoch darauf hin, dass pharmakogenetische Ansätze zukünftig angewandt werden können.

5 Zusammenfassung

Schwerwiegende postoperative Komplikationen wie das „Systemic inflammatory response Syndrome“ (SIRS) und Sepsis können durch Dysregulation im Rahmen der Immunantwort entstehen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse von NQO1*2, einem Polymorphismus der NAD(P)H: Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1), sowie von Dronabinol auf die operativ induzierte Immunantwort bei Patienten nach radikaler Prostatektomie untersucht. Dabei sollte zunächst die Frage geprüft werden, ob eine Assoziation zwischen Prostatakarzinom und NQO1*2-Polymorphismus vorliegt. Es wurde anschließend untersucht, welche Auswirkungen der NQO1*2-Polymorphismus auf die immunologische Reaktion nach Trauma hat. Gleiches wurde für die perioperative Einnahme von Dronabinol überprüft. Schließlich sollte geklärt werden, ob sich die Immunantwort unter Dronabinol zwischen Trägern des Polymorphismus und Wildtypen unterscheidet und somit Hinweise für eine Interaktion beider Faktoren vorliegen.

In einer placebokontrollierten, randomisierten und streng anonymisierten Studie wurden dazu die Daten von 95 Prostatakarzinompatienten analysiert, die sich dem Verfahren der radikalen Prostatektomie unterzogen haben. Perioperativ erhielt ein Teil der Patienten Dronabinol als Zusatzmedikation, der andere ein Placebo. Mittels Multiplexed Bead Technology wurden präoperativ, am ersten sowie auch am zweiten postoperativen Tag die Konzentrationen zehn verschiedener pro- und antiinflammatorisch wirkender Zytokine sowie die Konzentrationen von acht Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aus EDTA-Blutproben bestimmt. Die Genotypisierung für den NQO1*2-Polymorphismus wurde mittels Pyrosequenzierung durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden als Boxplots mit Median, 25%-Quantil, 75%-Quantil sowie Minimum und Maximum dargestellt und mittels induktiver Statistik analysiert.

Für den NQO1*2-Polymorphismus zeigen sich bei den untersuchten Patienten mit Prostatakarzinom folgende Frequenzen: 69,5% sind Wildtypen (C/C) für den Polymorphismus, 25,3% heterozygot (C/T) und 5,2% weisen die homozygote Allelkonfiguration (T/T) auf. Im Vergleich zur Normalbevölkerung (73,4% C/C; 25,0% C/T; 1,6% T/T) liegt hier eine Verschiebung des Wildtypanteils zugunsten der homozygoten Nullvariante vor.

Hierbei ergeben sich für Patienten mit einem oder zwei mutierten NQO1*2-Allelen präoperativ signifikant niedrigere Konzentrationen der antiinflammatorischen Zytokine IL-

10 ($p=0,041$) und IL-13 ($p=0,031$). Proinflammatorische Zytokine sind dagegen nicht verändert. Die präoperative Konzentration von MMP-7 liegt bei vorliegendem Polymorphismus ebenfalls unter der von Wildtypen ($p=0,047$).

Die Untersuchung der Marker in Abhängigkeit von Dronabinol zeigt bei NQO1*2-Trägern ohne Dronabinol postoperativ signifikant niedrigere MMP-3-Konzentrationen als mit Dronabinol ($p<0,034$). Wildtypen dagegen weisen am ersten postoperativen Tag signifikant niedrigere Konzentrationen von MMP-8 ($p=0,047$) und MMP-9 ($p=0,018$) auf.

Im direkten Vergleich von Wildtypen und NQO1*2-Trägern unter Dronabinol liegen am zweiten postoperativen Tag sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine bei NQO1*2-Trägern signifikant unter Wildtypen ($p<0,021$) und die Konzentration von MMP-3 postoperativ über Wildtypen ($p=0,038$).

Die vorliegenden Daten liefern Hinweise auf eine Assoziation des Prostatakarzinoms mit dem NQO1*2-Polymorphismus, wobei insbesondere die homozygote Ausprägung des Polymorphismus erhöht zu sein scheint. Tumorpatienten mit NQO1*2-Polymorphismus zeigen dabei präoperativ einen Trend zu einem verminderten antiinflammatorischen Zytokinstatus. Vergleiche der perioperativen Zytokin- und MMP-Konzentrationen in Abhängigkeit von NQO1*2-Polymorphismus und Dronabinol deuten darauf hin, dass die Effekte von Dronabinol auf die operativ induzierte Immunantwort vom NQO1*2-Genotyp abhängig sind. Weitere Untersuchungen erscheinen notwendig und sinnvoll, um die gewonnenen Daten zu überprüfen und damit die Rolle der untersuchten Parameter im Rahmen perioperativer Entzündungsprozesse aufzuklären.

6 Literaturverzeichnis

1. Abrams DI, Jay CA, Shade SB, Vizoso H, Reda H, Press S, Kelly ME, Rowbotham MC, Petersen KL: Cannabis in painful HIV-associated sensory neuropathy: a randomized placebo-controlled trial. *Neurology* 68: 515-521 (2007)
2. Ahmadian A, Ehn M, Hober S: Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 363: 83-94 (2006)
3. Aleksunes LM, Goedken M, Manautou JE: Up-regulation of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 during human liver injury. *World J Gastroenterol* 12: 1937-1940 (2006)
4. Anwar A, Dehn D, Siegel D, Kepa JK, Tang LJ, Pietenpol JA, Ross D: Interaction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) with the tumor suppressor protein p53 in cells and cell-free systems. *J Biol Chem* 278: 10368-10373 (2003)
5. Arcaroli J, Fessler MB, Abraham E: Genetic polymorphisms and sepsis. *Shock* 24: 300-312 (2005)
6. Barthelmann E, Seeling WD, Gschwend J, Weiss M, Hsu HY, Du W, Joos TO, Schneider EM, Brückner UB: Trauma-dependent influence of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism and tetrahydrocannabinol on the cytokine response (Abstract). *European Surgery* 38 Suppl 212: 6 (2006)
7. Blanco-Quiros A, Casado-Flores J, Garrote Adrados JA, Moro MN, Anton JA, Sanz EA: Interleukin-13 is involved in the survival of children with sepsis. *Acta Paediatr* 94: 1828-1831 (2005)
8. Cabral GA, Marciano-Cabral F: Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol* 78: 1192-1197 (2005)
9. Carlini EA: The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) on humans. *Toxicon* 44: 461-467 (2004)
10. Davis AF, Long RM: Pharmacogenetics research network and knowledge base fourth scientific meeting. *Pharmacogenomics J* 4: 359-361 (2004)
11. Dinarello CA: A signal for the caspase-1 inflammasome free of TLR. *Immunity* 26: 383-385 (2007)
12. Do Y, McKallip RJ, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Activation through cannabinoid receptors 1 and 2 on dendritic cells triggers NF-kappaB-dependent apoptosis: novel

- role for endogenous and exogenous cannabinoids in immunoregulation. *J Immunol* 173: 2373-2382 (2004)
13. Drenth JP, van der Meer JW: The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med* 355: 730-732 (2006)
 14. Dufour C, Svahn J, Bacigalupo A, Longoni D, Varotto S, Iori AP, Bagnasco F, Locasciulli A, Menna G, Ramenghi U, Lanciotti M: Genetic polymorphisms of CYP3A4, GSTT1, GSTM1, GSTP1 and NQO1 and the risk of acquired idiopathic aplastic anemia in Caucasian patients. *Haematologica* 90: 1027-1031 (2005)
 15. Escher R, Jones A, Hagos F, Carmichael C, Horwitz M, Olopade OI, Scott HS: Chromosome band 16q22-linked familial AML: exclusion of candidate genes, and possible disease risk modification by NQO1 polymorphisms. *Genes Chromosomes Cancer* 41: 278-282 (2004)
 16. Flowers CR, Veenstra D: The role of cost-effectiveness analysis in the era of pharmacogenomics. *Pharmacoeconomics* 22: 481-493 (2004)
 17. Fride E, Bregman T, Kirkham TC: Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood. *Exp Biol Med (Maywood)* 230: 225-234 (2005)
 18. Gearing AJ, Thorpe SJ, Miller K, Mangan M, Varley PG, Dudgeon T, Ward G, Turner C, Thorpe R: Selective cleavage of human IgG by the matrix metalloproteinases, matrilysin and stromelysin. *Immunol Lett* 81: 41-48 (2002)
 19. Haney M, Rabkin J, Gunderson E, Foltin RW: Dronabinol and marijuana in HIV(+) marijuana smokers: acute effects on caloric intake and mood. *Psychopharmacology (Berl)* 181: 170-178 (2005)
 20. Henle P, Zimmermann G, Weiss S: Matrix metalloproteinases and failed fracture healing. *Bone* 37: 791-798 (2005)
 21. Heper Y, Akalin EH, Mistik R, Akgoz S, Tore O, Goral G, Oral B, Budak F, Helvacı S: Evaluation of serum C-reactive protein, procalcitonin, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 levels as diagnostic and prognostic parameters in patients with community-acquired sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 481-491 (2006)
 22. Hildebrand F, Pape HC, Krettek C: Die Bedeutung der Zytokine in der posttraumatischen Entzündungsreaktion. *Unfallchirurg* 108: 793-794, 796-803 (2005)
 23. Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H: Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and

- membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. *J Biol Chem* 275: 33008-33013 (2000)
24. Hoffmann U, Bertsch T, Dvortsak E, Liebetrau C, Lang S, Liebe V, Huhle G, Borggreffe M, Brueckmann M: Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand J Infect Dis* 38: 867-872 (2006)
 25. Hou L, Chatterjee N, Huang WY, Baccarelli A, Yadavalli S, Yeager M, Bresalier RS, Chanock SJ, Caporaso NE, Ji BT, Weissfeld JL, Hayes RB: CYP1A1 Val462 and NQO1 Ser187 polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma. *Carcinogenesis* 26: 1122-1128 (2005)
 26. Huestis MA: Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Handb Exp Pharmacol* 657-690 (2005)
 27. Iskedjian M, Bereza B, Gordon A, Piwko C, Einarson TR: Meta-analysis of cannabis based treatments for neuropathic and multiple sclerosis-related pain. *Curr Med Res Opin* 23: 17-24 (2007)
 28. Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S: Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology* 128: 742-755 (2005)
 29. Khiabani HZ, Morland J: Cannabis og cannabinoider som legemidler. *Tidsskr Nor Laegeforen* 127: 579-582 (2007)
 30. Klein TW, Newton C, Friedman H: Cannabinoid receptors and immunity. *Immunol Today* 19: 373-381 (1998)
 31. Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reiter A, Elsner HA, Trka J, Cario G, Viehmann S, Harbott J, Borkhardt A, Metzler M, Langer T, Repp R, Marschalek R, Welte K, Haas OA, Stanulla M: NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. *Haematologica* 89: 1492-1497 (2004)
 32. Lanfear DE, Jones PG, Marsh S, Cresci S, McLeod HL, Spertus JA: Beta2-adrenergic receptor genotype and survival among patients receiving beta-blocker therapy after an acute coronary syndrome. *Jama* 294: 1526-1533 (2005)
 33. Linszen D, van Amelsvoort T: Cannabis and psychosis: an update on course and biological plausible mechanisms. *Curr Opin Psychiatry* 20: 116-120 (2007)
 34. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, Webster NR: Influence of interleukin-10 polymorphisms on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Crit Care Med* 31: 34-38 (2003)

35. Malemud CJ: Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci* 11: 1696-1701 (2006)
36. McGilveray IJ: Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Res Manag* 10: 15A-22A (2005)
37. McKallip RJ, Lombard C, Martin BR, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Delta(9)-tetrahydrocannabinol-induced apoptosis in the thymus and spleen as a mechanism of immunosuppression in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 451-465 (2002)
38. Mendez-Sanchez N, Zamora-Valdes D, Pichardo-Bahena R, Barredo-Prieto B, Ponciano-Rodriguez G, Bermejo-Martinez L, Chavez-Tapia NC, Baptista-Gonzalez HA, Uribe M: Endocannabinoid receptor CB2 in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 27: 215-219 (2007)
39. Mitrou PN, Watson MA, Loktionov AS, Cardwell C, Gunter MJ, Atkin WS, Macklin CP, Cecil T, Bishop DT, Primrose J, Bingham SA: Role of NQO1C609T and EPHX1 gene polymorphisms in the association of smoking and alcohol with sporadic distal colorectal adenomas: results from the UKFSS Study. *Carcinogenesis* 28: 875-882 (2007)
40. Nagase H, Meng Q, Malinovskii V, Huang W, Chung L, Bode W, Maskos K, Brew K: Engineering of selective TIMPs. *Ann N Y Acad Sci* 878: 1-11 (1999)
41. Need AC, Motulsky AG, Goldstein DB: Priorities and standards in pharmacogenetic research. *Nat Genet* 37: 671-681 (2005)
42. Ni Choileain N, Redmond HP: Cell response to surgery. *Arch Surg* 141: 1132-1140 (2006)
43. Nunez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, Gonzalez S, Tolon RM, Romero J: Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53: 208-213 (2004)
44. Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA: The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* 126: 659-662 (2006)
45. Parikh S, Ouedraogo JB, Goldstein JA, Rosenthal PJ, Kroetz DL: Amodiaquine metabolism is impaired by common polymorphisms in CYP2C8: implications for malaria treatment in Africa. *Clin Pharmacol Ther* 82: 197-203 (2007)
46. Pertwee RG: Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 1-51 (2005)

47. Pertwee RG: Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S163-171 (2006)
48. Reif S, Somech R, Brazovski E, Reich R, Belson A, Konikoff FM, Kessler A: Matrix metalloproteinases 2 and 9 are markers of inflammation but not of the degree of fibrosis in chronic hepatitis C. *Digestion* 71: 124-130 (2005)
49. Ross D: Quinone reductases multitasking in the metabolic world. *Drug Metab Rev* 36: 639-654 (2004)
50. Ross D, Siegel D: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT-diaphorase), functions and pharmacogenetics. *Methods Enzymol* 382: 115-144 (2004)
51. Russo E, Guy GW: A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses* 66: 234-246 (2006)
52. Schneider EM, Du W, Barthelmann E, Volkmer B, Koenig W, Seeling WD: Functional polymorphism of the anti-oxidant enzyme NQO1*2 is more frequent in prostate carcinoma and leads to lower levels of anti-oxidant IL-10 and IL-13 (Abstract). *Inflamm Res* 56 Suppl 2: 283 (2007)
53. Scott MJ, Hoth JJ, Turina M, Woods DR, Cheadle WG: Interleukin-10 suppresses natural killer cell but not natural killer T cell activation during bacterial infection. *Cytokine* 33: 79-86 (2006)
54. Scumpia PO, Moldawer LL: Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med* 33: S468-471 (2005)
55. Siegel D, Gustafson DL, Dehn DL, Han JY, Boonchoong P, Berliner LJ, Ross D: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Mol Pharmacol* 65: 1238-1247 (2004)
56. Somerville RP, Oblander SA, Apte SS: Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 4: 216 (2003)
57. Ueda Y, Miyagawa N, Wakitani K: Involvement of cannabinoid CB2 receptors in the IgE-mediated triphasic cutaneous reaction in mice. *Life Sci* 80: 414-419 (2007)
58. Vasiliou V, Ross D, Nebert DW: Update of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO) gene family. *Hum Genomics* 2: 329-335 (2006)
59. Wang B, Jin F, Xie Y, Tang Y, Kan R, Zheng C, Yang Z, Wang L: Association analysis of NAD(P)H:quinone oxidoreductase gene 609 C/T polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 409: 179-181 (2006)

60. Webster NL, Crowe SM: Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages, and their potential role in HIV-related diseases. *J Leukoc Biol* (2006)
61. Witkin JM, Tzavara ET, Nomikos GG: A role for cannabinoid CB1 receptors in mood and anxiety disorders. *Behav Pharmacol* 16: 315-331 (2005)
62. Wunder C, Eichelbronner O, Roewer N: Are IL-6, IL-10 and PCT plasma concentrations reliable for outcome prediction in severe sepsis? A comparison with APACHE III and SAPS II. *Inflamm Res* 53: 158-163 (2004)
63. Zafar KS, Inayat-Hussain SH, Siegel D, Bao A, Shieh B, Ross D: Overexpression of NQO1 protects human SK-N-MC neuroblastoma cells against dopamine-induced cell death. *Toxicol Lett* 166: 261-267 (2006)
64. Zhang J, Schulz WA, Li Y, Wang R, Zotz R, Wen D, Siegel D, Ross D, Gabbert HE, Sarbia M: Association of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism with esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *Carcinogenesis* 24: 905-909 (2003)
65. Ziring D, Wei B, Velazquez P, Schrage M, Buckley NE, Braun J: Formation of B and T cell subsets require the cannabinoid receptor CB2. *Immunogenetics* 58: 714-725 (2006)
66. Zuardi AW: History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr* 28: 153-157 (2006)

Anhang

A Statistische Tabellen

Tabelle 6a-d: Zytokinauswertung: Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben. Dargestellt sind die P-Werte des durchgeführten Tests. $p < 0,05$: statistisch signifikant. d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IFN- γ : Interferon- γ , IL: Interleukin, IP-10: Interferon-inducible protein-10, MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 α , TNF- α : Tumor necrosis factor- α

a) Wildtyp ohne Dronabinol

Zytokin	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
TNF- α	0,005	0,605	0,005
IL-1 β	0,005	0,914	0,007
Eotaxin	0,002	0,527	0,004
IL-13	0,025	0,565	0,053
MIP-1 α	0,011	0,996	0,006
IL-10	0,012	0,433	0,072
IL-1 α	0,402	0,033	0,159
IP-10	0,000	0,008	0,268
GM-CSF	0,003	0,978	0,004
IFN- γ	0,041	0,815	0,116

b) Mutation ohne Dronabinol

Zytokin	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
TNF- α	0,005	0,380	0,005
IL-1 β	0,001	0,110	0,010
Eotaxin	0,001	0,127	0,002
IL-13	0,002	0,266	0,067
MIP-1 α	0,008	0,168	0,057
IL-10	0,003	0,216	0,013
IL-1 α	0,414	0,839	0,305
IP-10	0,057	0,017	0,340
GM-CSF	0,000	0,244	0,002
IFN- γ	0,002	0,067	0,078

c) Wildtyp mit Dronabinol

Zytokin	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
TNF- α	0,036	0,001	$P < 0,0001$
IL-1 β	0,049	0,002	$P < 0,0001$
Eotaxin	0,001	0,007	$P < 0,0001$
IL-13	0,032	0,007	0,007
MIP-1 α	0,159	0,006	0,004
IL-10	0,001	0,565	0,001
IL-1 α	0,137	0,004	0,303
IP-10	0,002	0,029	0,087
GM-CSF	0,002	0,025	0,000
IFN- γ	0,059	0,020	0,033

d) Mutation mit Dronabinol

Zytokin	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
TNF- α	0,127	0,391	0,305
IL-1 β	0,064	0,268	0,326
Eotaxin	0,035	0,903	0,003
IL-13	0,233	0,175	0,296
MIP-1 α	0,305	1,000	0,079
IL-10	0,003	0,030	0,030
IL-1 α	0,808	0,715	1,022
IP-10	0,296	0,049	0,978
GM-CSF	0,027	0,241	0,048
IFN- γ	0,129	1,000	0,365

Tabelle 7a-d: Auswertung der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs): Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben. Dargestellt sind die P-Werte des durchgeführten Tests. $p < 0,05$: statistisch signifikant. d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag

a) Wildtyp ohne Dronabinol

MMP	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
MMP-1	0,003	0,808	0,006
MMP-2	0,002	0,961	0,005
MMP-3	0,088	$P < 0,0001$	0,002
MMP-7	0,236	0,654	0,333
MMP-8	0,131	0,181	0,464
MMP-9	0,026	0,287	0,216
MMP-10	0,002	0,373	0,002
MMP-13	0,002	0,621	0,004

b) Mutation ohne Dronabinol

MMP	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
MMP-1	0,001	0,068	0,001
MMP-2	0,001	0,273	0,001
MMP-3	0,008	0,052	0,016
MMP-7	0,016	0,577	0,016
MMP-8	0,040	0,216	0,414
MMP-9	0,027	0,110	0,376
MMP-10	0,001	0,273	0,000
MMP-13	0,001	0,110	0,000

c) Wildtyp mit Dronabinol

MMP	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
MMP-1	$P < 0,0001$	0,517	$P < 0,0001$
MMP-2	$P < 0,0001$	0,670	$P < 0,0001$
MMP-3	0,032	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$
MMP-7	0,002	0,394	0,002
MMP-8	0,928	0,500	0,621
MMP-9	0,492	0,768	0,929
MMP-10	$P < 0,0001$	0,284	$P < 0,0001$
MMP-13	$P < 0,0001$	0,415	$P < 0,0001$

d) Mutation mit Dronabinol

MMP	d-1/d+1	d+1/d+2	d-1/d+2
MMP-1	0,194	0,903	0,107
MMP-2	0,685	0,761	0,389
MMP-3	0,240	0,033	0,000
MMP-7	0,313	0,945	0,206
MMP-8	0,024	0,148	1,030
MMP-9	0,135	0,079	0,561
MMP-10	0,080	0,808	0,010
MMP-13	0,305	0,903	0,135

Tabelle 8a-d: Zytokinauswertung: Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben.

Dargestellt sind die P-Werte des durchgeführten Tests. $p < 0,05$: statistisch signifikant.

d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag, GM-CSF: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, IFN- γ : Interferon- γ , IL: Interleukin, IP-10: Interferon-inducible protein-10, MIP-1 α : Macrophage inflammatory protein-1 α , TNF- α : Tumor necrosis factor- α

**a) Mutation ohne Dronabinol / Wildtyp
ohne Dronabinol**

Zytokin	d-1	d+1	d+2
TNF- α	0,182	0,898	0,188
IL-1 β	0,150	0,807	0,082
Eotaxin	0,239	0,787	0,341
IL-13	0,031	0,864	0,253
MIP-1 α	0,101	0,496	0,192
IL-10	0,041	0,389	0,131
IL-1 α	0,208	0,817	0,061
IP-10	0,190	0,758	0,514
GM-CSF	0,100	0,653	0,109
IFN- γ	0,073	0,776	0,626

**b) Wildtyp mit Dronabinol / Wildtyp
ohne Dronabinol**

Zytokin	d-1	d+1	d+2
TNF- α	0,079	0,109	0,475
IL-1 β	0,209	0,073	0,838
Eotaxin	0,612	0,159	0,369
IL-13	0,128	0,191	0,995
MIP-1 α	0,349	0,071	0,649
IL-10	0,438	0,763	0,486
IL-1 α	0,290	0,205	0,615
IP-10	0,225	0,309	0,174
GM-CSF	0,412	0,115	0,478
IFN- γ	0,089	0,240	0,954

**c) Mutation mit Dronabinol / Wildtyp
mit Dronabinol**

Zytokin	d-1	d+1	d+2
TNF- α	0,926	0,324	0,006
IL-1 β	0,434	0,928	0,010
Eotaxin	0,536	0,892	0,186
IL-13	0,677	0,942	0,021
MIP-1 α	0,867	0,937	0,132
IL-10	0,246	0,216	0,006
IL-1 α	0,753	0,525	0,837
IP-10	0,974	0,208	0,220
GM-CSF	0,410	0,196	0,004
IFN- γ	0,838	0,556	0,176

**d) Mutation mit Dronabinol / Mutation
ohne Dronabinol**

Zytokin	d-1	d+1	d+2
TNF- α	0,884	0,235	0,189
IL-1 β	0,182	0,423	0,357
Eotaxin	0,090	0,121	0,381
IL-13	0,738	0,644	0,534
MIP-1 α	0,512	0,753	0,982
IL-10	0,461	0,512	0,141
IL-1 α	0,447	0,645	0,407
IP-10	0,890	0,512	0,890
GM-CSF	0,420	0,244	0,269
IFN- γ	0,977	0,076	0,568

Tabelle 9a-d: Auswertung der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs): Mann-Whithney-U-Test für unverbundene Stichproben. Dargestellt sind die P-Werte des durchgeführten Tests. $p < 0,05$: statistisch signifikant. d-1: präoperativ, d+1: erster postoperativer Tag, d+2: zweiter postoperativer Tag

**a) Mutation ohne Dronabinol / Wildtyp
ohne Dronabinol**

MMP	d-1	d+1	d+2
MMP-1	0,843	0,837	0,523
MMP-2	0,504	0,396	0,430
MMP-3	0,700	0,695	0,175
MMP-7	0,047	0,727	0,277
MMP-8	0,106	0,085	0,157
MMP-9	0,227	0,153	0,115
MMP-10	0,719	0,286	0,935
MMP-13	0,787	0,857	0,407

**b) Wildtyp mit Dronabinol / Wildtyp
ohne Dronabinol**

MMP	d-1	d+1	d+2
MMP-1	0,404	0,111	0,252
MMP-2	0,674	0,118	0,258
MMP-3	0,038	0,066	0,130
MMP-7	0,387	0,296	0,438
MMP-8	0,762	0,047	0,302
MMP-9	0,859	0,018	0,170
MMP-10	0,670	0,423	0,345
MMP-13	0,495	0,056	0,197

**c) Mutation mit Dronabinol / Wildtyp
mit Dronabinol**

MMP	d-1	d+1	d+2
MMP-1	0,845	0,578	0,595
MMP-2	0,269	0,370	0,474
MMP-3	0,164	0,038	0,028
MMP-7	0,445	0,482	0,705
MMP-8	0,114	0,626	0,225
MMP-9	0,871	0,313	0,357
MMP-10	0,704	0,838	0,896
MMP-13	0,540	0,786	0,879

**d) Mutation mit Dronabinol / Mutation
ohne Dronabinol**

MMP	d-1	d+1	d+2
MMP-1	0,662	0,235	0,311
MMP-2	0,214	0,808	0,800
MMP-3	0,759	0,247	0,034
MMP-7	0,483	0,210	0,957
MMP-8	0,555	0,489	0,512
MMP-9	0,475	0,482	0,580
MMP-10	0,800	0,109	0,333
MMP-13	0,734	0,254	0,381

B Abbildungsverzeichnis

1	Das Cryoporininflammasom.....	2
2	Reaktionsmechanismus in Anwesenheit von NQO1	4
3	Struktur von Delta-9-Tetrahydrocannabinol.....	6
4	Schematische Darstellung des Enzymsystems der Pyrosequenzierung.....	15
5	Beispiel für die Datenanalyse mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben	18
6	Beispiel für die Datenanalyse mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben	19
7	Gelelektrophorese der PCR-Produkte mehrerer Stichproben.....	20
8	Signifikante Konzentrationsunterschiede ohne Dronabinol	23
9	Signifikante Konzentrationsunterschiede unter Dronabinol.....	25
10a	Perioperative Zytokinkinetik von Interleukin-1 α , -1 β , -10 und -13.....	27
10b	Perioperative Zytokinkinetik von IFN- γ , TNF- α , GM-CSF und IP-10	28
10c	Perioperative Zytokinkinetik von Eotaxin und MIP-1 α	29
11	Signifikante Konzentrationsunterschiede ohne Dronabinol	32
12	Signifikante Konzentrationsunterschiede bei Wildtypen.....	33
13	Signifikante Konzentrationsunterschiede von MMP-3 unter Dronabinol	34
14a	Perioperative Kinetik der Matrix-Metalloproteinasen 1, 2, 3 und 7	36
14b	Perioperative Kinetik der Matrix-Metalloproteinasen 8, 9, 10 und 13	37

C Tabellenverzeichnis

1	Nomenklatur der für die Arbeit relevanten MMPs	3
2	Dosierungsschema des Prüfpräparates (Dronabinol oder Placebo)	10
3	Übersicht über die verwendeten PCR-Primer	13
4	Informationen zum Sequencing-Primer	16
5	Verteilung der NQO1*2-Genotypen bei untersuchten Prostatakarzinom- patienten und Kontrollen.....	21
6a-d	Zytokinauswertung: Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.....	58
7a-d	MMP-Auswertung: Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben.....	59
8a-d	Zytokinauswertung: Mann-Whithney-U-Test für unverbundene Stichproben.....	60
9a-d	MMP-Auswertung: Mann-Whithney-U-Test für unverbundene Stichproben.....	61

Danksagung

Das Anfertigen einer Dissertation erfordert persönliches Engagement und selbständiges Arbeiten. Einen ebenso großen Stellenwert haben jedoch kompetente Betreuung und Unterstützung durch viele beteiligte Personen.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Marion Schneider bedanken. Die Überlassung dieses Themas und die darüber hinaus fortwährende Gesprächsbereitschaft und Unterstützung haben mir einen umfassenden Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht.

Ebenfalls bedanke ich bei den Mitarbeitern der Abteilung Experimentelle Anästhesie, insbesondere bei Dr. Weidong Du, dessen intensive und zielgerichtete Betreuung im Labor einen raschen Fortschritt der Arbeit ermöglichte.

Meiner Familie danke ich für viele Stunden der Aufmunterung, Unterstützung und Motivation, die mich mein ganzes Studium lang begleitet haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Schwester Julia Barthelmann, die durch umfassende, konstruktive Kritik und hilfreiche Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.