

**Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Studie zu erblichen Einflüssen auf die Pharmakokinetik
von Midazolam und Koffein**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Jakob Strube
aus
Göttingen**

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Brockmüller

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. Heike Bickeböller

III. Berichterstatter: PD Dr. Frank Konietschke

IV. Berichterstatterin: Prof. Dr. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2015

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Bedeutung individueller Variabilität in der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik.....	2
1.1.1 Variabilität in der Wirksamkeit.....	2
1.1.2 Variabilität in unerwünschten Wirkungen.....	4
1.1.3 Variabilität in der Pharmakokinetik.....	5
1.1.3.1 Variabilität im Membrantransport.....	6
1.1.3.2 Variabilität im Arzneimittel-Metabolismus.....	7
1.1.3.3 Variabilität in Zielstrukturen.....	9
1.2 Ungeklärte Fragen der Pharmakogenetik und -genomik.....	9
1.3 CYP3A4, CYP3A5 und Midazolam als Testsubstanz.....	10
1.4 CYP1A2 und Koffein als Testsubstanz.....	13
1.5 Zwillingsstudien zur Pharmakokinetik.....	14
1.6 Aufgabenstellung.....	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Studiendesign.....	16
2.1.1 Überblick.....	16
2.1.2 Dokumentation und Datenschutz.....	16
2.1.3 Studienmedikation.....	17
2.1.4 Probanden.....	19
2.1.5 Ernährungsvorschriften und weitere Verhaltensregeln.....	20
2.1.6 Medizinische Voruntersuchungen.....	21
2.1.7 Studienablauf.....	22
2.2 Typisierung mono- und dizygoter Zwillinge.....	24
2.3 Konzentrationsanalysen.....	24
2.4 Pharmakokinetische Auswertung.....	24
2.4.1 Pharmakokinetische Begriffe und Parameter.....	24
2.4.2 Bestimmung pharmakokinetischer Parameter.....	27

2.4.2.1 Nichtparametrische Analyse.....	27
2.4.2.2 Modellanpassung.....	27
2.5 Statistische Auswertung.....	28
2.5.1 Fallzahl und Zielgröße.....	28
2.5.2 Deskriptive Statistik.....	29
2.5.3 Parametrische und nichtparametrische statistische Analyse.....	29
2.6 Erblichkeitsberechnung.....	30
2.6.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer.....	30
2.6.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell.....	30
2.6.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse.....	31
2.6.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow.....	32
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Untersuchte Probandinnen und Probanden.....	33
3.2 Midazolam als Indikator für CYP3A-Aktivität.....	34
3.2.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe.....	34
3.2.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse.....	37
3.2.3 PK-Parameter: Modellanpassung.....	41
3.2.4 Erblichkeitsberechnung.....	44
3.2.4.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer.....	44
3.2.4.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell.....	46
3.2.4.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse.....	46
3.2.4.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow.....	47
3.2.4.5 Einfluss der Verteilungsfunktion auf die Abschätzung der Erblichkeit.....	48
3.2.5 Hydroxymidazolam.....	50
3.2.5.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe.....	50
3.2.5.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse und Metabolitenquotient.....	52
3.2.5.3 Erblichkeitsberechnung.....	55
3.3 Koffein als Indikator für CYP1A2-Aktivität.....	58
3.3.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe.....	58
3.3.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse.....	60
3.3.3 PK-Parameter: Modellanpassung.....	63
3.3.4 Erblichkeitsberechnung.....	66

3.3.4.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer.....	66
3.3.4.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell.....	67
3.3.4.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse.....	67
3.3.4.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow.....	68
3.3.4.5 Einfluss der Verteilungsfunktion auf die Abschätzung der Erblichkeit.....	69
3.3.5 Paraxanthin.....	70
3.3.5.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe.....	70
3.3.5.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse und Metabolitenquotient.....	72
3.3.5.3 Erblichkeitsberechnung.....	75
4 Diskussion.....	78
4.1 Midazolam-PK als Indikator für CYP3A-Aktivität.....	78
4.1.1 Erblichkeit der CYP3A-Aktivität.....	80
4.2 Koffein-PK als Indikator für CYP1A2-Aktivität.....	86
4.2.1 Erblichkeit der CYP1A2-Aktivität.....	89
4.3 Grenzen dieser Arbeit und weitergehende Perspektiven.....	94
5 Zusammenfassung.....	96
6 Literaturverzeichnis.....	98

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ACE-Modell	Modell beinhaltet: additive genetics, common environment, unique environment
ADE-Modell	Modell beinhaltet: additive genetics, dominance, unique environment
AE-Modell	Modell beinhaltet: additive genetics, unique environment
AIC	Akaike information criterion
Appl.	Applikationsform
AST	Aspartataminotransferase
AUC	area under the curve / Fläche unter der Kurve
BMI	Body-Mass-Index
C	Cytidin
CE-Modell	Modell beinhaltet: common environment, unique environment
CL	Clearance
C _{max}	Maximalkonzentration
CYP	Cytochrom-P-450-Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
F	orale Bioverfügbarkeit
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
G	Guanosin
H/M	Hydroxymidazolam/Midazolam
h ²	Heritabilität
HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
k	Geschwindigkeitskonstante
k.E.	keine Erblichkeit
KG	Körpergewicht
KM	Michaeliskonstante
log	Logarithmus zur Basis 10
M.-Quotient	Metabolitenquotient
MDR	multi drug resistance
MRP	multidrug resistance-associated protein
MRT	mean residence time
n	Anzahl Probanden
n.b.	nicht bekannt
n.s.	nicht signifikant
NAT2	N-Acetyltransferase-II
nVd	normierte Varianzdifferenzen
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter

P/K	Paraxanthin/Koffein
Perz.	Perzentile
PK	Pharmakokinetik
r_{DZ}	Korrelationskoeffizienten dizygoter Zwillinge
r_{GC}	genetische Komponente
r_{MZ}	Korrelationskoeffizienten monozygoter Zwillinge
SD_b	Standardabweichungen der interindividuellen Variabilität
SD_w	Standardabweichungen der intraindividuellen Variabilität
SGM	Strukturgleichungsmodell-Analyse
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymidin
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
THC	Tetrahydrocannabinol
T_{max}	Zeitpunkt der Messung Maximalkonzentration
TP	Time Point/Zeitpunkt
V	Verteilungsvolumen
V_c	zentrales Verteilungsvolumen
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit
V_{ss}	Verteilungsvolumen im „steady state“
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Bei der Applikation derselben Dosis desselben Medikaments an verschiedene Personen sind interindividuell unterschiedlich starke gewünschte und unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu beobachten. Die individuell unterschiedliche Reaktion auf ein Medikament ist von vielfältigen genetischen und umweltbedingten Faktoren abhängig. Die Identifizierung der Ursachen und Mechanismen dieser pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Variabilität ist in fast allen medizinischen Bereichen von großem Interesse. Durch ein besseres Verständnis der Hintergründe und durch eine bessere Voraussage der individuellen Reaktionen wäre eine weitere Individualisierung der Pharmakotherapie möglich. Dies könnte zu einer Steigerung der Effizienz der Arzneitherapie führen und zu einer Senkung der Häufigkeit und Schwere unerwünschter Wirkungen.

Es ist bekannt, dass bei Pharmakotherapien abhängig vom Medikament und Indikationsbereich in sehr unterschiedlichem Maß die gewünschte Arzneimittelwirkung erzielt werden kann. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind ein häufiges und schwerwiegendes Phänomen. Wilkinson et al. (2005) geben an, dass die meisten Medikamente nur bei 25% bis 60% der Patienten tatsächlich effektiv sind. Einer britischen Studie zufolge erfolgen über 6% der stationären Krankenhausaufnahmen aufgrund unerwünschter Arzneimittelreaktionen und etwa jeder 300. unter stationären Bedingungen verstorbene Patient stirbt an einer schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelreaktion (Pirmohamed et al. 2004). Lazarou et al. (1998) ermittelten, dass in den USA innerhalb eines Jahres über 100.000 Patienten an unerwünschter Arzneimittelwirkungen verstarben.

Ein Ansatz zur Optimierung von Arzneimitteltherapien ist das Konzept der individualisierten Medizin. Dieses Konzept umfasst sehr viele individuelle Parameter wie Körpergewicht, Alter, Geschlecht, die Komedikation bis hin zu den individuellen Wünschen und Erwartungen der Patienten an die Therapie. Ein Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Berücksichtigung der individuellen genetischen Disposition. Diesem liegt die Bestimmung von Genotypen und die Kenntnis über ihre Auswirkungen auf die Enzymaktivität zugrunde. Optimalerweise könnte die Dosis des zu applizierenden Medikaments individuell auf die Eigenschaften des Patienten angepasst werden und eine Therapie mit geringen unerwünschten Arzneimittelwirkungen gefunden werden. Voraussetzung zur erfolgreichen Umsetzung ist ein starker genetischer Einfluss auf die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik. Zur Weiterentwicklung der individualisierten Medizin ist Kenntnis über Mechanismen

und Zusammenhänge der individuellen Reaktion auf Medikamente und eine Abschätzbarkeit der Anteile genetischen und umweltbedingten Einflusses unerlässlich.

In dieser Arbeit wird im Rahmen einer größeren und insgesamt fünf Testsubstanzen berücksichtigenden Zwillingsstudie die Aktivität der Enzyme CYP3A4, CYP3A5 und CYP1A2 mit Hilfe der Testsubstanzen Midazolam und Koffein auf Erbllichkeit untersucht. Die Bestimmung der erblichen und nicht erblichen bzw. umweltbedingten Komponente wird ausgehend von pharmakokinetischen Parametern anhand von vier Berechnungsmethoden vergleichend durchgeführt. Zwillingsstudien mit dem Vergleich mono- und dizygoter Zwillinge gelten als hervorragende Möglichkeit den genetischen und umweltbedingten Einfluss auf die interindividuelle Variabilität eines Merkmals abzuschätzen (Boomsma et al. 2002).

1.1 Bedeutung individueller Variabilität in der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

1.1.1 Variabilität in der Wirksamkeit

Es gibt viele mögliche Gründe, warum ein Medikament bei einigen Patienten stärker oder schwächer wirkt. Auf dem Weg von der Aufnahme bis zum Wirkort, der Entfaltung der Wirkung und Ausscheidung eines Medikaments gibt es eine Vielzahl möglicher Veränderungen, Interaktionen und Einflüsse, die alle auf verschiedene Art und Weise die Wirksamkeit eines Arzneimittels beeinflussen können.

Bereits die Einnahme oder Nicht-Einnahme eines Medikaments ist ein häufiger Grund für mangelnde Arzneimittelwirkung. Bei geringer Compliance und unregelmäßiger oder unterlassener Medikamenteneinnahme ist keine gewünschte Medikamentenwirkung zu erwarten. 2010 wurde in einer Studie gezeigt, dass in den USA etwa ein Viertel der ausgestellten Rezepte in keiner Apotheke eingelöst werden (Fischer et al. 2010). Zusammen mit den Patienten, die ihre Rezepte einlösen, aber die Medikamente nicht wie verordnet einnehmen, ergibt sich eine beträchtliche Anzahl von Patienten, bei denen aufgrund mangelnder Compliance die gewünschte Medikamentenwirkung nicht erzielt wird.

Allerdings gibt es auch bei korrekter Medikamenteneinnahme eine Vielzahl möglicher Gründe, die die gewünschte Arzneimittelreaktion beeinträchtigen. Beispielsweise kann die Nahrung einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung des Arzneimittels haben. Hierbei müssen zwei Hauptmechanismen unterschieden werden. Zum einen kann die Resorption

durch Magen- und Darminhalt beeinflusst werden, zum anderen kann der Arzneistoffmetabolismus durch Nahrungsmittel stark verändert werden. Tetracycline bilden beispielsweise zusammen mit polyvalenten Kationen (z.B. Ca^{2+}) schwer lösliche Komplexe. Bei zeitnaher Aufnahme eines Tetracyclins und Milch verringert sich dadurch die orale Bioverfügbarkeit des Antibiotikums erheblich (Eichelbaum und Schwab 2009). Ein Beispiel für den Einfluss von Nahrungsmitteln auf den Arzneistoffmetabolismus ist die Inhibition der CYP3A-Enzyme durch Grapefruitsaft. Es wurde gezeigt, dass die Wirkung des Calciumantagonisten Felodipin erheblich von der eigentlich zu erwartenden Wirkung abweicht, wenn zuvor Grapefruitsaft konsumiert wurde (Wilkinson 2005). Ähnlich den Nahrungsmittelinteraktionen können sich auch verschiedene Arzneimittel gegenseitig beeinflussen. Diese Arzneistoffinteraktionen haben häufig unerwünschte Wirkungen zur Folge (siehe Kapitel „1.1.2 Variabilität in unerwünschten Wirkungen“).

Genetische Polymorphismen haben an interindividuell unterschiedlichen Arzneimittelwirkungen ebenfalls einen bedeutenden Anteil. Am Medikamentenmetabolismus sind über 42 verschiedene Enzyme beteiligt, deren genetische Variabilität bekannt ist (Kalow 2006). In 20% bis 30% der Arzneimitteltherapien haben sie relevanten Einfluss auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik (Krämer und Testa 2008). Die Tabellen 1 und 2 zeigen mögliche Gründe für genetische Polymorphismen und mögliche Konsequenzen auf die Enzymaktivität.

Tab. 1 Arten genetischer Polymorphismen*

1.	Punktmutationen in kodierenden-, nicht-kodierenden- und Promotorregionen
2.	Mutationen, die das Splicen beeinflussen und zu Frameshifts oder Stopcodons führen
3.	Genkonversion mit verwandten Pseudogenen
4.	Gendeletionen
5.	Genmultiplikationen

* nach Krämer und Testa 2008

Tab. 2 Mögliche Konsequenzen genetischer Polymorphismen auf Enzyme*

1.	Enzyme mit veränderten enzymkinetischen Eigenschaften (V_{\max}^* und/ oder KM^*)
2.	Enzyme mit veränderter Substrat- oder Produktspezifität
3.	reduzierte Enzymexpression
4.	instabile Enzyme
5.	nicht vorhandene Enzymexpression (fehlende Transkription oder Translation)
6.	erhöhte Enzymexpression

* nach Krämer und Testa 2008; V_{\max} : maximale Umsatzgeschwindigkeit; KM : Michaeliskonstante

Aufgrund genetischer Polymorphismen kann es zu unterschiedlichen Einflüssen auf die Arzneimittelwirkung kommen. Betroffen sind überwiegend Proteine des Arzneimitteltransports und des Arzneimittelmetabolismus, die je nach Polymorphismus eine verstärkte oder verminderte Aktivität haben. Daraus kann sowohl eine verminderte als auch verstärkte Arzneimittelwirkung resultieren.

Ein bekanntes Beispiel für einen genetisch bedingten Stoffwechselformorphismus mit verminderter Enzymaktivität – und folglich verstärkter Wirkung – ist die individuell unterschiedliche Aktivität der Aldehyddehydrogenase-2. Dieses am Ethanolmetabolismus zentral beteiligte Enzym ist unter Asiaten meist minder ausgeprägt, wodurch es gegenüber Kaukasiern zu einer relativen Alkoholunverträglichkeit kommt. Die toxischen Metabolite des Ethanols können nur verlangsamt abgebaut werden und akkumulieren im Körper (Krämer und Testa 2008).

Neben den bereits aufgeführten Faktoren gibt es eine Reihe weiterer, die Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten haben. Gezeigt wurde ein deutlicher Unterschied in der Pharmakokinetik einiger Medikamente zwischen Frauen und Männern (Soldin und Mattison 2009), bei älteren Menschen – z.B. durch die Einschränkung der Leber- oder Nierenfunktion (Klotz 2009) – und Kindern (Anderson und Lynn 2009). Aber auch Sport (Persky et al. 2003), Schwangerschaft (Krämer und Testa 2009), Rauchen (Yousef et al. 2008) und Alkoholkonsum (Lennernäs 2009) können die Pharmakokinetik und die Wirkung von Arzneimitteln erheblich beeinflussen.

1.1.2 Variabilität in unerwünschten Wirkungen

Unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind ein häufiges und bedeutendes Phänomen bei der medikamentösen Behandlung von Patienten. Unter dem Begriff „unerwünschte Arzneimittelwirkung“ werden alle nicht gewünschten Reaktionen zusammengefasst, bei denen ein kausaler Zusammenhang mit der Medikamentenapplikation zumindest möglich erscheint. Sie führen zu einer Vielzahl von Krankenhauseinweisungen, erheblichen Kosten und Todesfällen (Pirmohamed et al. 2004). Bei über 18% der stationär verstorbenen Patienten konnte eine direkte oder indirekte Assoziation des Todes mit einem oder mehreren Medikamenten gezeigt werden (Ebbesen et al. 2001). Für die unerwünschten Arzneimittelwirkungen gelten dieselben Prinzipien wie für gewünschten Arzneimittelwirkungen. Daher können aus den im Kapitel „1.1.1 Variabilität in der Wirksamkeit“ genannten Mechanismen auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen entstehen. Auch unerwünschte Arzneimit-

telwirkungen entstehen teilweise durch Arzneimittelinteraktionen und genetische Polymorphismen (siehe Tabelle 1 und 2). Eine Veränderung der Enzymaktivität kann erheblichen Einfluss auf den Metabolismus und die Elimination von Arzneimitteln haben und zu einer unerwünscht langen und starken Wirkung im Körper führen.

Eine schwerwiegende, durch Arzneimittelinteraktionen bedingte unerwünschte Arzneimittelwirkung ist die Myotoxizität von HMG-CoA-Reduktase-Hemmern. Die bei Hypercholesterinämie angewendeten Statine können bei gleichzeitiger Gabe von Inhibitoren des Enzyms CYP3A4 eine lebensbedrohliche Rhabdomyolyse auslösen. Durch Arzneimittel, die – wie beispielsweise Erythromycin – CYP3A4 inhibieren, wird das Statin im First-Pass-Mechanismus nur noch vermindert abgebaut und die orale Bioverfügbarkeit steigt um den Faktor 15 (Stadapharm 2010; Keller 2009). Genetische Polymorphismen haben ebenfalls einen großen Einfluss auf die Therapie mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern. Link et al. (2008) zeigten, dass verschiedene Polymorphismen des Transportproteins OATP1B1 mit dem stark erhöhten Risiko einer Myopathie unter Statin-Therapie einhergehen. Durch beide Mechanismen resultiert letztendlich eine übermäßige Exposition der Körperzellen mit dem Medikament, was schwerwiegende Konsequenzen haben kann.

Weitere genetische Polymorphismen mit Einfluss auf die Pharmakokinetik und daraus resultierende erhebliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind beispielsweise der CYP2D6- (Sparteïn-/ Debrisoquin-) Polymorphismus, der CYP2C19- (Mephenytoin-) Polymorphismus und der N-Acetyltransferase-II-Polymorphismus. Diese drei Polymorphismen und ihre Auswirkungen werden in Kapitel „1.1.3.2 Variabilität im Arzneimittel-Metabolismus“ näher erläutert.

1.1.3 Variabilität in der Pharmakokinetik

Ein wesentlicher Teil der erheblichen Variabilität in der Reaktion auf Medikamente ist durch Variationen in der Pharmakokinetik bedingt. Die Pharmakokinetik beinhaltet die Freisetzung (Liberation), Aufnahme (Resorption), Verteilung (Distribution), Verstoffwechslung (Metabolismus) und Ausscheidung (Exkretion) eines Medikaments. In den folgenden Kapiteln werden die Ursachen und die Bedeutung pharmakokinetischer Variabilität in den Bereichen Membrantransport, Metabolismus und Zielstrukturen von Arzneimitteln näher erläutert.

1.1.3.1 Variabilität im Membrantransport

Der Übertritt von Stoffen durch biologische Membranen unterliegt verschiedenen Mechanismen. Biologische Membranen bestehen aus ein- oder mehrschichtigen Zellverbänden, deren Zellmembranen wiederum aus einem bimolekularen Lipidfilm bestehen. Lipophile Substanzen können diese Barrieren daher weitgehend frei passieren, hydrophile Substanzen hingegen nicht und benötigen zum Übertritt über eine Membran spezielle Transportmoleküle. Es gibt eine Reihe Transportmechanismen, die je nach Lokalisation im Körper spezifisch und unspezifisch Moleküle unterschiedlicher Größe transportieren. Für die Pharmakokinetik von Medikamenten von großer Bedeutung sind die Transporter MDR1 (**m**ulti **d**rug **r**esistance) und MRP2 (**m**ultidrug **r**esistance-associated **p**rotein) sowie die Carrier OATP1 (**o**rganic **a**nion **t**ransporting **p**olypeptide) und OCT1 (**o**rganic **c**ation **t**ransporter). Die Hauptfunktion des MDR1-Transporters ist der Schutz der Zelle und des Körpers, indem er potenziell toxische Stoffe aus der Zelle transportiert. Dieser Mechanismus erklärt einen Teil der niedrigen oralen Bioverfügbarkeit vieler Arzneimittel. Auch der für den Arzneistoffmetabolismus relevante MRP2-Transporter transportiert potenziell toxische Stoffe aus den Zellen. Physiologischerweise sind beide Transporter in Darm, Leber, Niere und Gehirn exprimiert. Entdeckt wurden sie allerdings zunächst in Tumoren und werden dort für einen Teil der Resistenzentwicklung gegen Chemotherapeutika verantwortlich gemacht. Dies führte auch zu ihrer Namensgebung. Im Gegensatz zu den MDR1 und MRP2-Transportproteinen katalysieren die Transportproteine OATP1B1 und OCT1 nicht den Efflux, sondern überwiegend den Influx von Medikamenten in Zellen. Dennoch sind die Transporter OATP1 und OCT1 an der Exkretion vieler Medikamente aus dem Körper beteiligt, da viele Eliminationsvorgänge durch Metabolismus in den Leberzellen oder durch biliäre Sekretion verlaufen (Eichelbaum und Schwab 2009).

An verschiedenen Mechanismen des Membrantransports können genetische Polymorphismen Auswirkungen haben und dadurch die Resorption, Verteilung und Exkretion von Arzneimitteln beeinflussen. Relevant sind dabei sowohl die Anzahl der vorhandenen Transporter als auch ihre Funktionalität. Hoffmeyer et al. (2000) zeigten den Einfluss verschiedener Genpolymorphismen auf die Expression von MDR1 und den Einfluss auf den Arzneistoffmetabolismus. Eine verringerte Anzahl MDR1 im Duodenum war mit einer Erhöhung der oralen Bioverfügbarkeit für Substrate von MDR1 (z.B. Digoxin) und dementsprechend erhöhten Plasmaspiegeln assoziiert. Weitergehend hat die Variabilität der MDR1-Expression als Teil der Blut-Hirn-Schranke ebenfalls Einfluss auf die ZNS-Gängigkeit und dortige Wirkung von Medikamenten (Hoffmeyer et al. 2000).

1.1.3.2 Variabilität im Arzneimittel-Metabolismus

Der Arzneistoffmetabolismus verändert endogene und exogene Stoffe, um diese in der Regel unwirksam zu machen und so zu modifizieren, dass eine Ausscheidung über die Galle oder Niere möglich ist. Dieser auch Biotransformation genannte Prozess findet überwiegend in der Leber statt und wird in eine Phase-1- und eine Phase-2-Reaktion unterteilt.

Während der Phase-1-Reaktion findet eine kovalente Modifikation der Ausgangssubstanz mittels einer Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse statt. Diese Modifikationen sind die Voraussetzung für die anschließende Phase-2-Reaktion. Die wichtigsten Phase-1-Enzyme sind die Monooxygenasen aus der Gruppe der Cytochrom-P-450-Enzyme (CYP). Sie metabolisieren sowohl endogene Stoffe – wie Steroide, Lipide und Vitamine – als auch exogene Stoffe aus Nahrung und Umwelt sowie Medikamente (Nebert und Russell 2002). Neben den CYP-Enzymen gibt es weitere Enzyme, die Reaktionen der Phase-1 katalysieren. Dazu gehören die Alkohol-Dehydrogenase, Aldehyd-Dehydrogenase, FAD-haltige Monooxygenasen und verschiedene Esterasen (Rassow 2006).

Etwa die Hälfte der ca. 60 bekannten menschlichen CYP-Enzyme haben eine relativ breite Spezifität und ermöglichen die Funktionalisierung einer großen Anzahl von Substraten. Über 90% dieser relativ unspezifischen CYP-Enzyme sind in der Leber lokalisiert. Die Enzymvariante CYP3A4 ist mit einem Anteil von etwa einem Drittel der in der Leber vorkommenden CYP-Enzyme der häufigste Vertreter und vermutlich am Metabolismus von 60% aller verwendeten Arzneistoffe beteiligt (Rassow 2006). Allerdings dient die CYP-katalysierte Reaktion nicht immer tatsächlich der Entgiftung und Ausscheidung von toxischen Substanzen. Durch Epoxidbildung wird das kanzerogene Potential von Benzpyren aus dem Tabakrauch und von Aflatoxin-B1 vom Schimmelpilz *Aspergillus flavus* erst durch die Phase-1-Reaktion geschaffen (Rassow 2006).

Die Funktionalisierungsreaktion der Phase-1 ermöglicht die anschließende Konjugationsreaktion der Phase-2. In diesem Schritt wird das Substrat mit einer hydrophilen Gruppe konjugiert und so wasserlöslich. Das Produkt wird überwiegend über die Galle ausgeschieden. Die quantitativ wichtigste Phase-2-Reaktion ist die Konjugation mit Glucuronsäure. Weitere Phase-2-Reaktionen sind die Konjugation mit Glutathion, Acetyl-, Sulfat- und Methylgruppen sowie mit Glycin oder Glutamin. Alle Konjugationsreaktionen werden von aktivierten Transferasen katalysiert (Rassow 2006).

Für über 42 Enzyme des Menschen, die an der Metabolisierung von Fremdstoffen beteiligt sind, ist genetische Variabilität gezeigt worden (Kalow 2006). Polymorphismen in CYP-Enzymen können verschiedene Auswirkungen auf die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneimitteln und damit auf die gewünschten und unerwünschten Arzneimittelwirkungen haben. Phänotypisch werden „poor metaboliser“, „intermediate metaboliser“, „extensive metaboliser“ und „ultrarapid metaboliser“ unterschieden. Genotypisch lässt sich diesen Phänotypen häufig eine unterschiedliche Anzahl von Allelen mit unterschiedlicher Funktion zuordnen: Kein funktionierendes Allel (poor metaboliser); nur ein funktionierendes oder zwei defizient funktionierende Allele (intermediate metaboliser); zwei funktionierende Allele (extensive metaboliser); oder mehr als zwei funktionierende Allele (ultrarapid metaboliser) (Krämer und Testa 2008). Im Phänotyp ist diesen wiederum eine unterschiedliche Arzneimittelwirksamkeit zuzuordnen. Eine Steigerung und damit die Gefahr der verstärkten Wirkung und Intoxikation besteht, wenn durch defekte oder nicht kodierte CYP-Enzyme die Phase-1-Reaktion nicht in ausreichendem Maße möglich ist und das Arzneimittel im Körper akkumuliert. Wenn allerdings ein Medikament als Prodrug gegeben wird und erst ein durch ein CYP-Enzym modifizierter Metabolit pharmazeutisch aktiv ist, verliert das Arzneimittel bei genetischer Defizienz des entsprechenden CYP-Enzyms seine Wirkung (Eichelbaum und Schwab 2009; Krämer und Testa 2008).

Es gibt eine Reihe genetischer Polymorphismen mit direkter Auswirkung auf die Enzymaktivität. Der CYP2D6- (Sparteïn-/ Debrisoquin-) Polymorphismus tritt bei 5% bis 10% der europäischen Bevölkerung auf. Bei den Betroffenen sind verschiedene angeborene Varianten verantwortlich dafür, dass das Enzym CYP2D6 nicht korrekt gebildet werden kann. Bei homozygoten Merkmalsträgern resultiert daraus ein defizienter Metabolisierer mit stark verringerter Enzymaktivität. Bei 2% bis 3% der Bevölkerung tritt ein die Enzymaktivität verstärkender Polymorphismus auf, aus dem phänotypisch ein „ultrarapid metaboliser“ resultiert. Durch die Amplifikation einiger Bereiche des CYP2D6-Gens werden Medikamente schneller abgebaut, was zu einer deutlich verringerten Wirksamkeit führen kann. CYP2D6 ist am Metabolismus von über 50 Arzneistoffen – darunter häufig eingesetzte Medikamente wie Klasse-1 Antiarrhythmika, Betablocker, Serotonin-Rezeptor-Antagonisten, Amphetamine, Opiate und Östrogen-Rezeptor-Modulatoren – beteiligt (Eichelbaum und Schwab 2009; Borges et al. 2010).

Der CYP2C19- (Mephenytoin-) Polymorphismus tritt nur bei bei 2% bis 5% der europäischen, aber bei 15% bis 23% der ostasiatischen Bevölkerung auf. Homozygote Träger verschiedener für diesen Enzymdefekt ausgemachter Allele sind defiziente Metabolisierer.

Pharmakologisch relevant ist der CYP2C19-Polymorphismus bei der Behandlung mit dem Protonenpumpenhemmer Omeprazol. Da dieser über CYP2C19 abgebaut wird, sprechen Patienten mit diesem Polymorphismus auf eine entsprechende Behandlung verstärkt an (Eichelbaum und Schwab 2009).

Aus dem N-Acetyltransferase-II-Polymorphismus (NAT2-Polymorphismus) resultieren erhebliche Unterschiede in der Acetylierung einiger Medikamente. Dabei existieren in der Bevölkerung langsame und schnelle Acetylierer. Das Verhältnis zueinander variiert je nach ethnischer Herkunft erheblich. So sind ca. 50% der Europäer und Afrikaner langsame Acetylierer, unter den Chinesen, Japanern und Inuit finden sich hingegen über 90% schnelle Acetylierer. Aufgrund der Beobachtung der unterschiedlich schnellen Acetylierung des Tuberkulostatikums Isoniazid konnte man – lange bevor der genetische Hintergrund des NAT2-Polymorphismus bekannt war – schnelle und langsame Acetylierer unterscheiden (Evans et al. 1960 a und b). Aus Familienanalysen schloss man, dass die langsamen Acetylierer homozygot für ein autosomal rezessives Merkmal und schnelle Acetylierer homo- oder heterozygot für ein dominantes Allel sein müssen. Erst Jahre später wurde der NAT2-Polymorphismus als Ursache dieser interindividuellen Variabilität in der Pharmakokinetik entdeckt (Krämer und Testa 2008; Eichelbaum und Schwab 2009).

1.1.3.3 Variabilität in Zielstrukturen

Die meisten Arzneimittel entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an bestimmte Zellstrukturen. Zielstrukturen, durch deren Polymorphismen häufiger variable Reaktionen auf Arzneimittel verursacht werden können, sind beispielsweise β -Adrenozeptoren, einige Dopaminrezeptoren, Rezeptoren für Serotonin, N-Methyl-D-Aspartat und Vitamin-D (Eichelbaum und Schwab 2009; Kalow 2006). Die mangelnde Wirkung eines Medikaments kann nicht nur durch eine Veränderung der Zielstruktur, sondern auch durch ihre Abwesenheit bedingt sein. Der selektive Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen ist bei estrogenrezeptornegativem Mammakarzinom wirkungslos (Eichelbaum und Schwab 2009).

1.2 Ungeklärte Fragen der Pharmakogenetik und -genomik

Die interindividuelle Variabilität in den Reaktionen auf verschiedene Medikamente ist oft nicht einem spezifischen Gen bzw. einem spezifischen Polymorphismus eines Gens unmittelbar zuzuordnen, sondern besteht aus verschiedenen Polymorphismen und interagierenden Umweltfaktoren (Kalow 2006). Eine genaue Vorhersage des Phänotyps aufgrund des Genotyps ist auch bei gut erforschten genetisch polymorphen Enzymen nur schwer mög-

lich. Obwohl die Phänotypen des Enzyms CYP2D6 *poor-*, *intermediate-* und *rapid-metabolizer* und diverse assoziierte Genotypen bekannt sind, lassen sich daraus nicht ohne weiteres direkte Schlüsse auf den Arzneimittelmetabolismus ziehen. Sachse et al. (1997) sehen den Nutzen einer CYP2D6-Genotypisierung und die Übertragbarkeit auf die Metabolisierung verschiedener Medikamente als nicht ausreichend erforscht an. Auch über zehn Jahre nach dieser Aussage ist eine Bestimmung des Phänotyps anhand von Genotypisierungen von CYP2D6 und eine Vorhersage der Auswirkungen auf den Metabolismus von Tamoxifen aus unbekanntem Gründen weiterhin nicht sicher möglich (Borges et al. 2010).

Neben umweltbedingten und genetischen Faktoren gibt es epigenetische Faktoren, die ebenfalls Einfluss auf den Phänotyp haben. Die Epigenetik ist beispielsweise für die unterschiedlichen zellulären Phänotypen verantwortlich. Alle Zellen eines Organismus haben mit wenigen Ausnahmen identische chromosomale DNA und dennoch vollkommen unterschiedliche Phänotypen. Nur so ist eine Zelldifferenzierung mit unterschiedlichen Aufgaben möglich. Auch eigentlich genetisch identische monozygote Zwillinge können sich in einzelnen Phänotypen durchaus unterscheiden. Diese Unterschiede sind nicht, wie lange angenommen, allein den Umweltfaktoren zuzuordnen, sondern werden auch durch epigenetische Einflüsse bedingt. Es wurde gezeigt, dass monozygote Zwillinge anfangs kaum epigenetische Unterschiede aufweisen, diese aber mit steigendem Alter zunehmen (Wong et al. 2005; Fraga et al. 2005). Der Einfluss der Epigenetik auf die Enzymexpression ist mit der vorliegenden Studie nicht genauer abschätzbar. Zur Untersuchung des Einflusses der Epigenetik sind aufwendige weiterführende molekulargenetische Analysen notwendig.

1.3 CYP3A4, CYP3A5 und Midazolam als Testsubstanz

Die Enzyme der CYP3A-Familie gehören zu den wichtigsten und einflussreichsten Enzymen des Stoffwechsels im menschlichen Körper. Allein diese Gruppe der CYP-Enzyme hat einen Anteil von über 30% an allen in der Leber vorkommenden CYP-Enzymen (Shimada et al. 1994). Ein Großteil gängiger Medikamente wird durch diese Enzymgruppe metabolisiert. Rassow (2006) spricht von ca. 60% aller verwendeten Arzneistoffe als Substrate von CYP3A4 und Özdemir et al. (2000) von über 60 verschiedenen Substanzen, die von CYP3A4 metabolisiert werden. Die verschiedenen Enzyme der CYP3A-Familie kommen allerdings nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Geweben vor. So ist ein Großteil des First-Pass-Mechanismus oral eingenommener Substanzen auch durch intestinal lokalisierte Vertreter dieser Enzymgruppe bedingt. Beim Erwachsenen sind die Varianten CYP3A4 und CYP3A5 die wichtigsten Vertreter, deren Aktivität aufgrund ihrer ähnlichen

Substratspezifität nur schwer unterschieden werden kann (Wilkinson et al. 2005). In Tabelle 3 ist eine Auswahl verschiedener endo- und exogener Substrate dieser beiden Enzyme aufgelistet.

Tab. 3 Beispiele endogener und exogener Substrate der Enzyme CYP3A4 und CYP3A5*

Aflatoxin B1	Erythromycin	Nitrendipin
Alfentanil	Estradiol	Progesteron
Alprazolam	Ethinylestradiol	Rifampicin
Astemizol	Ethosuximid	Ritonavir
Buspiron	Felodipin	Saquinavir
Carbamazepin	Lidocain	Tacrolimus
Chinin	Loratidin	Tamoxifen
Cisaprid	Lovastatin	Terfenadin
Cortisol	Midazolam	Testosteron
Cyclosporin	Nefazodon	Triazolam
Dapson	Nicardipin	Troleandomycin
Dextromethorphan	Nifedipin	Verapamil
Diazepam	Niludipin	Vinblastin
Diltiazem	Nimodipin	Zolpidem
Doxorubicin	Nisoldipin	

* nach Özdemir et al. 2000

Midazolam wird größtenteils von den drei Isoenzymen CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 der CYP3A-Familie metabolisiert (Gorski et al. 1994; Kuehl et al. 2001). Da die Variante CYP3A7 allerdings hauptsächlich in fetalem Gewebe exprimiert wird, hat es beim Adulten kaum Bedeutung (Klieber et al. 2008; Wilkinson et al. 2005). In geringem Umfang ist CYP2C19 ebenfalls am Metabolismus von Midazolam beteiligt (Emoto und Iwasaki 2007). Die CYP3A-Enzyme katalysieren die 1'-Hydroxylierung und 4-Hydroxilierung des Midazolams zu 1'-OH-Midazolam und 4-OH-Midazolam, das daraufhin renal ausgeschieden werden kann. Midazolam gilt als weit verbreitete In-Vivo- und In-Vitro-Testsubstanz für die CYP3A-Enzyme (Klieber et al. 2008; Quintieri et al. 2008). Die Gründe für die interindividuell unterschiedlich ausgeprägte Expression und Aktivität der CYP3A-Enzyme wird in der Literatur unterschiedlich bewertet. Dem Einfluss der verschiedenen Genotypen wird dabei eher eine untergeordnete Rolle zugesprochen (He et al. 2005 und 2006). Als weitere Einflussgrößen werden Umwelteinflüsse (Miao et al. 2009), Enzyminduktion (Yu et al. 2004) und genetische Variabilität in Coenzymen (Agrawal et al. 2010) angeführt. Der direkte Effekt der verschiedenen identifizierten Genotypen von CYP3A4 und CYP3A5 ist sehr unterschiedlich. So wird den häufig untersuchten Genotypen CYP3A4*1A und

CYP3A4*1B kein oder nur ein zu vernachlässigender Einfluss auf die Pharmakokinetik von Midazolam zugesprochen (Miao et al. 2009). Für die Variante CYP3A4*22 dagegen konnte durchaus ein Einfluss auf die Pharmakokinetik von Midazolam in Form einer niedrigeren Metabolisierungsrate gegenüber dem Wildtyp gezeigt werden (Elens et al. 2013). Für die Varianten CYP3A5*1 und CYP3A5*3 allein konnte kein Einfluss auf die Pharmakokinetik von Midazolam nachgewiesen werden (Yu et al. 2004). Ein Einfluss auf die Pharmakokinetik von Midazolam in Form einer geringeren Metabolisierungsrate konnte allerdings für die Variante CYP3A5*3 gegenüber CYP3A5*1 in Verbindung mit dem Vorhandensein von CYP3A4*22 gezeigt werden (Elens et al. 2013).

Ein deutlicher Unterschied ist bei der Verteilung und Häufigkeit der Genotypen unter verschiedenen ethnischen Gruppen auszumachen. Unterschieden werden dabei vor allem die drei Gruppen Schwarze, Asiaten und Kaukasier. Ein signifikanter Unterschied in der Pharmakokinetik von Midazolam konnte diesbezüglich – zumindest zwischen Schwarzen und Kaukasier – nicht ausgemacht werden (Miao et al. 2009). Die Tabellen 4 und 5 listen eine Auswahl von Genotypen der Enzyme CYP3A4 und CYP3A5, die jeweilige Position und Art des „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) und ggf. den Effekt auf.

Tab. 4 Auswahl bekannter CYP3A4-Genotypen*

Name	Position	Effekt	Kommentar
CYP3A4*1A		Wildtyp	häufig bei Kaukasier
CYP3A4*1B	-392A>G		häufig bei Schwarzen
CYP3A4*22	15389C>T	verringerte Aktivität	

* nach Miao et al. 2009; Elens et al. 2013

Tab. 5 Auswahl bekannter CYP3A5-Genotypen*

Name	Position	Effekt	Kommentar
CYP3A5*1		Wildtyp	
CYP3A5*3	6986A>G	verringerte Aktivität	
CYP3A5*6	14690G>A	verringerte Aktivität	häufig bei Schwarzen
CYP3A5*7	27131_27132insT	verringerte Aktivität	häufig bei Schwarzen

* nach Yu et al. 2004

Zur Pharmakodynamik von Midazolam und weiterführenden Angaben zum in dieser Studie verwendeten Präparat siehe Kapitel „2.1.3 Studienmedikation“.

1.4 CYP1A2 und Koffein als Testsubstanz

CYP1A2 ist ein wichtiger Vertreter der Cytochrom-P-450-Enzyme und hat einen Anteil von ca. 13% an allen CYP-Enzymen der Leber (Rodenburg et al. 2012). Eine Reihe gängiger Medikamente und Genussstoffe, aber auch kanzerogene Giftstoffe – wie heterogene Amine – werden von CYP1A2 metabolisiert. Für die Aktivität von CYP1A2 konnte eine deutliche Induzierbarkeit durch einige Stoffe gezeigt werden. So führt beispielsweise Tabakrauch zu einer deutlichen Steigerung der Enzymaktivität (Rodenburg et al. 2012). CYP1A2 ist überwiegend in der Leber lokalisiert, kann aber auch in anderen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen werden (Perera et al. 2011). Tabelle 6 zeigt eine Auswahl an Substraten des Enzyms CYP1A2.

Tab. 6 Auswahl von Substraten des Enzyms CYP1A2*

Acetaminophen	Imipramin	Ropivacain
Amitriptylin	Koffein	Tacrin
Clomipramin	Mexiletin	Theophyllin
Clozapin	Naproxen	Tizanidin
Cyclobenzaprin	Olanzapin	Verapamil
Estradiol	Ondansetron	Warfarin
Fluvoxamin	Phenacetin	Zileuton
Haloperidol	Propranolol	Zolmitriptan
heterocyclische Amine	Riluzol	

* nach Flockhart DA 2007 und Perera et al. 2011

Koffein ist eine gut erprobte und die am weitesten verbreitete Substanz zur In-Vivo-Testung der CYP1A2-Aktivität (Thorn et al. 2012). Koffein wird zu über 95% in der Leber zu den Hauptmetaboliten Paraxanthin, Theobromin und Theophyllin metabolisiert. Dabei hat die Demethylierung von Koffein zu Paraxanthin den mit Abstand größten Anteil von über 70% bis 80%. Die Metabolisierung von Koffein zu Paraxanthin findet dabei ausschließlich durch CYP1A2 statt, wohingegen an der Metabolisierung zu den anderen Metaboliten auch andere CYP-Enzyme beteiligt sind. Der Hauptanteil der Metabolite wird letztendlich über den Urin ausgeschieden (Kot und Daniel 2008; Perera et al. 2011; Rodenburg et al. 2012).

Eine große die Pharmakokinetik von Koffein untersuchende Zwillingsstudie konnte sowohl einen umweltbedingten als auch einen genetischen Einfluss auf die Pharmakokinetik ausmachen, wobei den genetischen Faktoren der größere Anteil zugesprochen wurde (Rasmussen et al. 2002). Eine Betrachtung verschiedener Genotypen erfolgte in dieser Studie allerdings nicht. In anderen Studien wurden eine Reihe Genotypen identifiziert, die teilweise Einfluss auf die Pharmakokinetik von Koffein haben. Tabelle 7 listet eine Auswahl von

CYP1A2-Genotypen, die Position und Art des „Single Nucleotide Polymorphism“ (SNP) und den jeweiligen Effekt auf.

Tab. 7 Auswahl bekannter CYP1A2-Genotypen*

Name	Position	Effekt	Kommentar
CYP1A2*1A		Wildtyp	
CYP1A2*1C	-3860G>A	verringerte Aktivität	Asiaten > Schwarze > Kaukasier
CYP1A2*1F	-163C>A	erhöhte Induzierbarkeit	
CYP1A2*1K	-739T>G; -729C>T; -163C>A	verringerte Aktivität	

* nach Thorn et al. 2012

In anderen Studien konnte der Einfluss des CYP1A2-Genotyps auf den Koffeinstoffwechsel nicht eindeutig gezeigt werden (Sachse et al. 2003; Gervasini et al. 2013). Als umweltbedingter Einflussfaktor konnte hingegen eindeutig eine erhöhte Enzymaktivität bei Rauchern und eine verringerte Enzymaktivität unter der Einnahme oraler Kontrazeptiva festgestellt werden (Ghotbi et al. 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nicht nur Rauchen an sich zu einer Enzyminduktion führt, sondern auch dass bestimmte Genotypen (CYP1A2*1F) bei Rauchexposition mit einer gegenüber dem Wildtyp gesteigerten Induzierbarkeit einhergehen (Sachse et al. 1999). Hieran wird deutlich, dass die verschiedenen Einflussfaktoren der Enzymaktivität miteinander interagieren.

Zur Pharmakodynamik von Koffein und weiterführenden Angaben zum in dieser Studie verwendeten Präparat siehe Kapitel „2.1.3 Studienmedikation“.

1.5 Zwillingsstudien zur Pharmakokinetik

Zwillingsstudien gelten als das beste Studiendesign zur Unterscheidung des genetischen und umweltbedingten Einflusses auf die Variabilität eines individuell unterschiedlich ausgeprägten Merkmals (Rahmioglu et al. 2011). Bereits bevor die Gründe pharmakokinetischer Variabilität auf molekulargenetischer Ebene genauer untersucht werden konnten, wurden Zwillingsstudien zur Abschätzung der Erblichkeit pharmakokinetischer Parameter durchgeführt. „Die alten Zwillingsstudien von Vesell und Kollegen [...] haben die besten experimentellen Anzeichen eines starken genetischen Anteils an der Arzneielimination erbracht [...]; Vesell hat Erblichkeit errechnet.“ (Kalow 1997, S. 370). Durch die Etablierung neuer Untersuchungstechniken konnten die verursachenden Mechanismen zunehmend biochemisch und molekulargenetisch untersucht werden. Tabelle 8 zeigt eine Auswahl früherer, die Pharmakokinetik untersuchender Zwillingsstudien.

Tab. 8 Frühe pharmakokinetische Zwillingsstudien

Jahr	Autor	Titel
1968 a	Vesell und Page	Genetic Control of Dicumarol Levels in Man
1968 b	Vesell und Page	Genetic Control of Drug Levels in Man: Phenylbutazone
1968 c	Vesell und Page	Genetic Control of Drug Levels in Man: Antipyrine
1969	Vesell und Page	Genetic Control of the Phenobarbital-Induced Shortening of Plasma Antipyrine Half-Lives in Man
1976	Atlas et al.	Genetic Control of Interindividual Variations in the Inducibility of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in Cultured Human Lymphocytes
1981	Penno et al.	Genetic variation in rates of antipyrine metabolite formation: A study in uninduced twins
1991	Vesell	Genetic and environmental factors causing variation in drug response

1.6 Aufgabenstellung

Schon in früheren Zwillingsstudien wurde gezeigt, dass die Pharmakokinetik vieler Medikamente genetisch beeinflusst ist (vgl. Tabelle 8). Diese frühen Studien waren aufgrund ihrer niedrigen Probandenzahlen teilweise allerdings nur bedingt aussagekräftig. Außerdem fehlte die Möglichkeit den genetischen Hintergrund der intra- und interindividuellen Variabilität weitergehend zu analysieren. Im Rahmen der Studie, die dieser Arbeit zugrunde liegt, soll das Ausmaß des genetisch- und des umweltbedingten Einfluss auf die Funktion der wichtigsten am Arzneimittelmetabolismus und -transport beteiligten Enzyme und Transporter untersucht werden. Zunächst soll die Erbllichkeit der Variabilität der Enzym- und Transportaktivität von CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5, OATP1B1, MDR1 und MRP2 untersucht werden. Im weiteren Verlauf ist eine Genotypisierung geplant, um die Genotyp-Phänotyp-Korrelation und ggf. den Einfluss bestimmter Genotypen auf die Enzymaktivität näher bestimmen zu können.

In dieser Arbeit wird aus den erhobenen Daten für die Variabilität der Enzymaktivität von CYP1A2, -3A4 und -3A5 nach vier zwillingsabhängigen und nicht-zwillingsabhängigen Methoden die erbliche und nicht-erbliche bzw. umweltbedingte Komponente vergleichend untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Überblick

Die vorliegende Arbeit beruht auf der Zwillingstudie „Open Label Repeated Dose Study for the Evaluation of Heritability of and Genetic Influences on Drug Pharmacokinetics“. Bei dieser Studie handelt es sich um eine offene humanpharmakologische Probandenstudie. Ziel der Studie war die Untersuchung der erblichen Komponente der individuellen Variabilität der Enzym- und Transportaktivität einer Auswahl bedeutender CYP-Enzyme und Transporter. An dieser Studie nahmen gesunde männliche und weibliche mono- und dizygoten Probandenpaare teil, die durch Anzeigen in der Lokalpresse und Aushänge im Universitätsklinikum und der Universität Göttingen rekrutiert wurden. Nach einem ausführlichen Aufklärungsgespräch durch einen der Prüfarzte und nach erfolgter Einwilligung zur Studienteilnahme beider Zwillinge eines Probandenpaares, wurde eine ausführliche Screeninguntersuchung durchgeführt und geprüft, ob die potenziellen Probanden in die Studie eingeschlossen werden können. Im Idealfall haben die Probanden daraufhin an drei jeweils möglichst identisch ablaufenden Studientagen teilgenommen. An den Studientagen erfolgte die Applikation der verschiedenen Testsubstanzen und anschließend die Sammlung von Plasma- und Urinproben zur pharmakokinetischen Auswertung. Durchgeführt wurde die Studie auf der Probandenstation durch Mitarbeiter und Prüfarzte des Zentrums für klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universitätsmedizin Göttingen. Die Studie wurde nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die „Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen“ (GCP-V; Bundesgesetzblatt 2004 Teil 1 Nr. 42, S. 2081ff), die „Note for Guidance on good clinical Practice“ (CPMP/ICH/135/95 2002), die „Bekanntmachung der Neufassung des Arzneimittelgesetzes“ (AMG, Bundesgesetzblatt Drucksache 571/09 2009) sowie die Regeln des niedersächsischen Landesdatenschutzgesetzes wurden berücksichtigt.

2.1.2 Dokumentation und Datenschutz

Alle während der Studie erfassten Daten und Befunde wurden auf speziellen Dokumentationsbögen dokumentiert. Jedem Probanden ist ein individueller Ordner mit den entsprechenden studienspezifischen Dokumentationsbögen und eventuell weiteren Datenblättern

zugeordnet. Die Zuordnung erfolgt mittels eines individuellen fünfstelligen Codes, der sich aus den Anfangsbuchstaben des Vor- und Nachnamens, einer zweistelligen fortlaufenden Nummer für jedes Probandenpaar und dem Buchstaben A oder B zur Unterscheidung der Zwillinge eines Probandenpaares zusammensetzt. Die gesammelten Plasma- und Urinproben wurden ebenfalls mit dieser Codierung und dem zusätzlichen Vermerk des Zeitpunktes der Probenentnahme versehen. Sämtliche Ordner mit persönlichen Daten lagern für Unbefugte nicht zugänglich auf der Probandenstation der Klinischen Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen. Eine Weitergabe von persönlichen Daten an Dritte ohne die Zustimmung des entsprechenden Probanden ist ausdrücklich untersagt.

2.1.3 Studienmedikation

Die Studienmedikation – bestehend aus Midazolam, Torasemid, Metoprolol, Koffein und Talinolol – wurde nach möglichst spezifischen Transport- und Stoffwechselwegen ausgesucht. Es kann jedem verwendeten Medikament ein oder mehrere spezifische Enzyme des Transports oder des Arzneimittelmetabolismus zugeordnet und eine Interaktion nahezu ausgeschlossen werden. Bei den fünf Medikamenten handelt es sich um vielfach verwendete und im klinischen Alltag lang erprobte Arzneimittel. Die daraus resultierende Erfahrung im Umgang mit diesen Medikamenten und die Applikation einer meist unter der therapeutischen Dosis liegenden Wirkstoffmenge, minimiert das Risiko von unerwünschten Arzneimittelwirkungen innerhalb der Studie. Die jeweilige Dosis wurden bewusst so gewählt, dass eine pharmakokinetische Auswertung möglich ist, aber möglichst wenig pharmakodynamische Auswirkungen provoziert werden.

Für Midazolam wurde das Produkt Dormicum® der Firma „Roche Pharma“ mit einer Dosis von 0,2 mg verwendet. Diese Dosis wurde als i.v.-Bolus-Infusion gelöst in 5 ml 0,9% NaCl-Lösung appliziert. Midazolam gehört zur Gruppe der Benzodiazepine, die gebunden am GABA_A-Rezeptor die GABAerge Hemmung der Postsynapse verstärken. Midazolam wird aufgrund der amnestischen Wirkung u.a. als Premedikation bei der Narkoseeinleitung und aufgrund der sedierenden Wirkung in der Intensivmedizin eingesetzt. Die therapeutisch verwendete Dosis beträgt je nach therapeutischem Zweck 1,0 bis 7,5 mg (Roche 2008; Engelhard und Werner 2009).

Für Torasemid wurde das Produkt Torem® der Firma „Berlin Chemie“ mit einer Dosis von 2,5 mg verwendet. Diese Dosis wurde als i.v.-Infusion gelöst in 5 ml 0,9% NaCl-Lösung appliziert. Torasemid gehört zur Gruppe der Schleifendiuretika und hemmt reversibel den

Na⁺K⁺2Cl⁻-Cotransporter der Henleschleife. Dadurch verringert sich die Möglichkeit der Urinkonzentration der Niere und die ausgeschiedene Harnmenge steigt. Therapeutische Verwendung findet Torasemid beispielsweise bei stark verminderter Nierenfunktion mit einer Dosis von 50 bis 200 mg pro Tag (Berlin Chemie Menarini 2006; Turnheim 2009).

Für Metoprolol wurde das Produkt Beloc[®] der Firma „Astra Zeneca“ mit einer Dosis von 5,0 mg verwendet. Diese Dosis wurde als i.v.-Infusion gelöst in 20 ml 0,9% NaCl-Lösung appliziert. Metoprolol gehört zur Gruppe der β -Adrenozeptor-Antagonisten (Betablocker) und wirkt der durch Adrenalin und Noradrenalin vermittelten Wirkung des Sympatikus entgegen. Betablocker wirken am Herzen negativ chrono-, dromo-, ino- und lusitrop. Metoprolol wird in einer Dosis von 5 bis 190 mg zur Behandlung von tachykarden Herzrhythmusstörungen und zur Akutbehandlung bei Herzinfarkt eingesetzt (AstraZeneca GmbH 2009; Starke 2009).

Für Koffein wurde das Produkt Percoffedrinol[®] der Firma Lindopharm GmbH verwendet. Appliziert wurde Koffein per os als Tablette mit einer Dosis von 50 mg. Koffein gehört zur Gruppe der Methylxanthine und hat auf verschiedene Bereiche des Körpers Auswirkungen. Methylxanthine wirken im ZNS psychostimulierend, am Herzen positiv ino- und chronotrop, dilatieren – mit Ausnahme der Arterien des Gehirns – Gefäße, wirken bronchospasmolytisch, steigern die Diurese und die Magensäuresekretion. Therapeutisch wird Koffein einigen Analgetika zugesetzt und wird zur Vorbeugung von Apnoeanfällen bei Säuglingen verwendet. Als frei verkäufliches Präparat wird es wie häufig auch beim Konsum in Form von Kaffee zur kurzfristigen Beseitigung von Ermüdungserscheinungen verwendet. Die in der Studie verwendete Dosierung von 50 mg entspricht in etwa einer halben Tasse Kaffee (Lindopharm GmbH 2004; Starke 2009).

Für Talinolol wurde das Produkt Cordanum[®] der Firma AWD Pharma verwendet. Appliziert wurde Talinolol per os als Tablette mit einer Dosis von 50 mg. Talinolol gehört wie Metoprolol (s.o.) zur Gruppe der Betablocker. Die therapeutisch verwendete Dosis zur Behandlung von arterieller Hypertonie beträgt meist 100 mg pro Tag (AWD-Pharma 2008; Starke 2009).

2.1.4 Probanden

Bei den Probanden handelt es sich um gesunde mono- und dizygote Zwillingspaare. Sowohl männliche als auch weibliche Probanden konnten teilnehmen. Da das Geschlecht einen deutlichen Einfluss auf die Enzymaktivität haben kann (Soldin und Mattison 2009), wurden zur besseren Vergleichbarkeit nur gleichgeschlechtliche dizygote Zwillingspaare eingeschlossen. Außerdem war nur eine Teilnahme als Paar möglich. Die Studie ist auf die Teilnahme von 120 Probanden ausgelegt, die sich idealerweise auf zwei Gruppen von 30 mono- und 30 dizygoten Zwillingspaaren aufteilen.

Die im Studienprotokoll festgelegten Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 9 und 10 dargestellt.

Tab. 9 Einschlusskriterien

Für einen Studieneinschluss muss der Proband alle der folgenden Kriterien erfüllen.

1. Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung („informed consent“) sowohl zur Teilnahme an der Studie als auch zu molekulargenetischen Analysen.
 2. Gesunde Erwachsene zwischen 18 und 65 Jahren.
 3. Körpergewicht zwischen 50 - 100 kg bei einem BMI von 18 - 28 kg/m².
 4. Bereitschaft die Studienanweisungen zu befolgen und mit dem Studienpersonal zusammenzuarbeiten.
 5. Keine relevanten pathologischen Befunde bei der Screeninguntersuchung. Minimale Abweichungen der Laborwerte können eventuell akzeptiert werden, wenn sie von einem Studienarzt als nicht klinisch relevant eingestuft wurden.
 6. Weibliche Probanden dürfen nur nach einem negativen Schwangerschaftstest und bei vorhandener Bereitschaft, während der gesamten Studie geeignete kontrazeptive Maßnahmen zu ergreifen, in die Studie eingeschlossen werden.
 7. Bei dizygoten Zwillingen: Gleichgeschlechtlichkeit.
 8. Ähnliche Rauchgewohnheiten (+/- 10 Zigaretten pro Tag) zwischen den beiden Zwillingen eines Zwillingspaars.
-

Tab. 10 Ausschlusskriterien

Der Studienausschluss muss erfolgen, wenn der Proband eines der folgenden Kriterien erfüllt.

1. Mitarbeit an Planung und Durchführung der Studie.
2. Teilnahme an einer klinischen Studie während der letzten 30 Tage oder Einnahme eines Prüfungs- oder nicht registrierten Medikaments oder Impfung während der gesamten Studie oder im Zeitraum von 30 Tagen vor dem ersten Studientag.
3. Blut-, Plasma- oder Thrombozytenspende innerhalb von 30 Tagen vor der Gabe der Studienmedikation.
4. Alter unter 18 oder über 65 Jahre.
5. Aktuell Schwangerschaft oder Stillphase.
6. Pathologische Befunde während der Screeninguntersuchung oder bei den Laborbefunden; insbesondere bei den nieren- und leberassoziierten Parametern.
7. Krankheiten mit Einfluss auf die Leber- oder Nierenfunktion oder Beeinträchtigung der Leber- oder Nierenfunktion.

Der Studienausschluss muss erfolgen, wenn der Proband eines der folgenden Kriterien erfüllt.

8. Herzleiden bei dem die Einnahme von Betablockern oder Koffein kontraindiziert sein könnte.
 9. Asthma bronchiale, das eine konstante medikamentöse Behandlung erfordert (Asthma Stufe 2-4).
 10. Bekanntes Raynaud Syndrom
 11. Akute Erkrankung oder Körpertemperatur von über 37,5° C vor Gabe der Studienmedikation.
 12. Bedeutende gastrointestinale Erkrankung oder gastrointestinale Störung bei der ein Einfluss auf die Pharmakokinetik der Studienmedikation zu erwarten ist.
 13. Gastrointestinale Operationen bei denen Einfluss auf die Pharmakokinetik der Studienmedikation zu erwarten ist. Ausgenommen Appendektomien und Herniotomien.
 14. Medikamenteneinnahme sieben Tage vor oder während eines Studientages mit folgenden Ausnahmen: Einmalige Dosen von Analgetika (ASS, Paracetamol, Ibuprofen) können eingenommen werden; nicht aber sechs Stunden vor bis 24 Stunden nach der Einnahme der Studienmedikation. Die Einnahme orale Kontrazeptiva wird dokumentiert, ist aber kein Ausschlusskriterium.
 15. Alkohol- oder Medikamentenabhängigkeit oder missbräuchliche Einnahme oder positiver Drogentest.
 16. Befunde, die die Sicherheit der Probanden oder die Qualität der Studienergebnisse beeinträchtigen könnten.
 17. Bekannte ernste Überempfindlichkeits- oder anaphylaktische Reaktionen.
 18. Bekannte Überempfindlichkeit oder Allergie auf eines der Studienmedikamente.
 19. Vom Prüfarzt als klinisch relevant beurteilte Krankheiten.
 20. Bekannte HIV-, Hepatitis B- oder Hepatitis C-Infektion.
 21. Unfähigkeit oder Unwillen 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach der Gabe der Studienmedikation keinen Alkohol zu konsumieren.
 22. Unzuverlässige Kontrazeption bei Probandinnen im gebärfähigen Alter.
 23. Unfähigkeit oder Unwillen die Einverständniserklärung („informed consent“) zu erbringen oder die Studienvorgaben zu befolgen.
-

2.1.5 Ernährungsvorschriften und weitere Verhaltensregeln

Da Nahrungs-, Genuss- und Arzneimittel durch Induktion und Suppression Transporter und Stoffwechsellenzyme beeinflussen können, mussten die Probanden eine Reihe von Ernährungsvorschriften einhalten. Diese Ernährungsvorschriften sollen sowohl das Risiko für die Probanden als auch das Ausmaß der Enzymbeeinflussung minimieren. Ähnliches gilt für die den Sport betreffenden Einschränkungen. Die Ernährungsvorschriften sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11 Ernährungsvorschriften und weitere Verhaltensregeln

	Vorschrift	Dauer
1.	Kein Alkoholkonsum.	24 Stunden vor bis 72 Stunden nach Gabe der Studienmedikation. Außerdem 24 Stunden vor und nach studienbedingten medizinischen Untersuchungen.
2.	Keine Medikamenteneinnahmen: Explizit auch Johanniskrautpräparate, rezeptfreie Medikamente, Phytopharmaka, hoch dosierte Vitamine, über das	Während der gesamten Studie.

	Vorschrift	Dauer
	Internet bezogene Pharmaka. Paracetamol und abschwellendes Nasenspray können bei geringen Symptomen verwendet werden.	
3.	Kein Verzehr von Grapefruit oder Grapefruitsaft.	Eine Woche vor bis zum Ende der Studienteilnahme.
4.	Kein Konsum chininhaltiger Getränke.	Zwei Wochen vor bis zum Ende der Studienteilnahme.
5.	Keine Veränderung des Ausmaßes sportlicher Aktivitäten.	Während der gesamten Studie.
	Sportliche Aktivitäten mit erhöhtem Unfallrisiko sind nicht durchzuführen.	24 Stunden vor bis 48 Stunden nach Gabe der Studienmedikation. Außerdem 24 Stunden vor und nach studienbedingten medizinischen Untersuchungen.
6.	Eingeschränkte Nahrungszufuhr während der Studientage.	Erste Nahrungsaufnahme erfolgt zwei Stunden nach Erhalt der letzten Studienmedikation.

2.1.6 Medizinische Voruntersuchungen

Im Rahmen der Voruntersuchung wird neben der Erhebung einer ausführlichen medizinischen Anamnese eine körperliche Untersuchung durchgeführt. So wird sichergestellt, dass nur gesunde Probanden, die laut Ein- und Ausschlusskriterien an der Studie teilnehmen dürfen, eingeschlossen werden. Im Rahmen der klinischen körperlichen Untersuchung wurden u.a. Blutdruck, Puls und Körpertemperatur gemessen und ein EKG abgeleitet. Es erfolgte die Bestimmung des Atemalkoholgehalts zur Kontrolle der Einhaltung des Alkoholverbotes im Rahmen der Studie (Dräger Alcotest 6510, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland). Bei der Blutabnahme wurden verschiedene Laborparameter bestimmt. Die Blutabnahme zur Bestimmung der Parameter der klinischen Chemie (Natrium, Kalium, Kalzium, AST, konjugiertes Bilirubin, Kreatinin und Glukose) erfolgte mittels Lithium-Heparin-Monovetten. Die Bestimmung der hämatologischen Parameter (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenanzahl) erfolgte mittels EDTA-Monovette. Die Urinanalytik erfolgte mittels eines Urinteststreifens (Combur 10 Test, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Es wurde semiquantitativ der pH-Wert, die spezifische Dichte, Leukozyten-, Nitrit-, Protein-, Glukose-, Ketonkörper-, Urobilinogen-, Bilirubin- und Blut-/ Hämoglobingehalt bestimmt. Außerdem wurde ein Urindrogentest auf THC, (Met-)Amphetamine, Kokain, Benzodiazepine und Opiate durchgeführt (Multi-6/ 1-Drogentest, ökonomed H. Schoofs GmbH, Rödinghausen, Deutschland). Bei Probandinnen wurde außerdem ein Urinschwangerschaftstest durchgeführt, um eine Schwangerschaft ausschließen zu können (Hitado hcg Schwangerschaftsteststreifen Urin/Serum, gabmed GMBH, Köln, Deutschland).

2.1.7 Studienablauf

Zunächst führte einer der Prüfarzte mit den interessierten Probanden ein ausführliches Aufklärungsgespräch, in welchem Ablauf, Risiko und Nutzen sowie weitere Fragen zur Studie geklärt wurden. Wenn sich die potenziellen Probanden zu einer Teilnahme entschlossen und sie in den Studienablauf schriftlich eingewilligt hatten, wurde die Voruntersuchung durchgeführt. Zum Ablauf und Umfang der Voruntersuchung siehe Kapitel „2.1.6 Medizinische Voruntersuchungen“. Auf Basis der Untersuchungsbefunde und eventuell vorhandener Vorbefunde entschieden die Prüfarzte anhand der Ein- und Ausschlusskriterien, ob ein Proband in die Studie eingeschlossen werden konnte. Nach dem erfolgreichen Einschluss beider Zwillinge eines Zwillingspaars folgten idealerweise drei möglichst identisch ablaufende Studienphasen. Den Probanden ist es jederzeit möglich ohne Angabe von Gründen ihre Teilnahme an der Studie zu beenden. Eine Auswertung der erhobenen Daten ist auch dann möglich, wenn nicht alle Studientage absolviert wurden, vorausgesetzt beide Zwillinge eines Paares haben zumindest an einem Studientag teilgenommen. Um die Aktualität der in der Voruntersuchung erhobenen Daten zu gewährleisten, erfolgte der erste Studientag höchstens 42 Tage nach der Voruntersuchung. Die Abstände der einzelnen Studientage war mit mindestens sieben und möglichst nicht mehr als 30 Tagen festgelegt. Die einzelnen Handlungsabläufe eines Studientages sind in einem genauen Zeitplan mit vorgesehenem Zeitpunkt und möglichem Zeitfenster festgeschrieben. Eine Abweichung von diesem Zeitplan ist immer als Protokollabweichung zu notieren. Der einzelne Studientag beginnt mit der Abklärung eventuell neu hinzugekommener Ausschlusskriterien. War dies nicht der Fall wurden Nullwerte von Plasma- und Urinproben gewonnen und im Anschluss mit der ersten Medikamentengabe begonnen. Die Zeitpunkte der weiteren Medikamentenapplikation und Probenentnahmen orientierten sich am Zeitpunkt dieser ersten Medikamentengabe. Die Abstände zwischen den einzelnen Maßnahmen sollten bei allen Probanden möglichst identisch sein. Der Ablauf des Studientages erfolgte unter ständiger Kontrolle der Probanden und regelmäßiger Protokollierung der Vitalparameter. Zwischen Zeitpunkt 14 (acht Stunden nach erster Medikamentengabe) und Zeitpunkt 15 (24 Stunden nach erster Medikamentengabe) mussten die Probanden nicht auf der Probandenstation verbleiben. Der genaue Zeitplan einer Studienphase mit den vorgesehenen Zeitpunkten, Zeitfenstern, Interventionen, Untersuchungen und Probensammlungen ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

2.2 Typisierung mono- und dizygoter Zwillinge

Um festzustellen, ob es sich bei einem Zwillingenpaar um ein mono- oder dizygotes Zwillingenpaar handelt, wurde die auch aus anderen Gründen durchgeführte molekulargenetische Typisierung einer Vielzahl genetisch polymorpher Merkmale verwendet. Hierbei wurden die häufigen Polymorphismen der Arzneimittel-metabolisierenden Enzyme CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 sowie des Arzneimitteltransportproteins OATP1B1 verwendet. Sofern es zwischen den Zwillingen Diskrepanzen in den Genotypen gab, wurden die Zwillinge als dizygot klassifiziert. Bei vollständiger Übereinstimmung in allen getesteten Merkmalen kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf Homozygotie geschlossen werden. Die molekulargenetischen Typisierungen wurden durch Frau K. Jobst als technischer Assistentin unter Anleitung von Herrn PD Dr. Tzvetkov im Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

2.3 Konzentrationsanalysen

Alle Blutproben (mit Antikoagulation durch EDTA) wurden innerhalb von maximal 30 Minuten nach Blutentnahme zentrifugiert, das Plasma separiert und bei -20°C gefroren gelagert. Aus den gesammelten Blutproben wurde u.a. die Plasmakonzentration von Midazolam und Koffein sowie ihrer Metabolite Hydroxymidazolam und Paraxanthin mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und direkt damit gekoppelter tandem-massenspektrometrischer Detektion (HPLC-MS-MS) quantitativ analysiert. Die Konzentrationsanalysen erfolgten durch Mitarbeiter des Dr.-Margarete-Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie Stuttgart unter Leitung von Frau Dr. Hofmann.

2.4 Pharmakokinetische Auswertung

2.4.1 Pharmakokinetische Begriffe und Parameter

Die pharmakokinetischen Analysen der fünf verwendeten Studienmedikamente können vollkommen unabhängig voneinander betrachtet werden. In dieser Arbeit wurden die Midazolam und Koffein betreffenden Analysedaten ausgewertet. Neben der Erfassung von Nullwerten wurden im Anschluss an die Medikamentengabe zu 14 verschiedenen Zeitpunkten Plasmaproben gewonnen. Die Messwerte wurden zu pharmakokinetischen Kenngrößen zusammengefasst.

Zur Charakterisierung der Pharmakokinetik eines Medikaments ist die Fläche unter der Kurve („Area under the Curve“/AUC) von entscheidender Bedeutung. Erstellt man einen

Konzentrations-Zeit-Graphen, indem die Plasmakonzentration des Medikaments gegen die Zeit aufgetragen wird, entspricht die unter der Kurve gelegene Fläche der Gesamtexposition des Körpers gegenüber dem Medikament. Bei i.v.-Applikation entspricht diese Gesamtmenge per definitionem einer Bioverfügbarkeit von 100%. Die Angabe der AUC erfolgt in $\text{mg}\cdot\text{min}/\text{l}$. Mithilfe der AUC ist es bei bekannter applizierter Gesamtdosis möglich die Gesamtkörperclearance (CL) eines Medikaments zu berechnen. Die Clearance beschreibt das Volumen einer Körperflüssigkeit, meist Vollblut oder Plasma, das in einem definierten Zeitraum von einem bestimmten Stoff vollständig „gereinigt“ wird. Die Gesamtkörperclearance ist demnach ein Maß für die Ausscheidungsgeschwindigkeit und setzt sich aus den einzelnen Organclearances – beispielsweise der renalen oder der hepatischen Clearance – zusammen. Die Angabe der Clearance erfolgt in Liter/Minute. Bei bekannter Plasmakonzentration und Clearance kann die Eliminationsgeschwindigkeit eines Medikaments als Produkt von Plasmakonzentration und Clearance berechnet werden.

Das Verteilungsvolumen ist ein Proportionalitätsfaktor zwischen Plasmakonzentration und der gesamten applizierten Wirkstoffmenge und beschreibt letztendlich ein fiktives Volumen, das nötig wäre um die gesamten applizierten Wirkstoffmenge mit der gemessenen Plasmakonzentration zu verteilen. Das Verteilungsvolumen (V) ist kein physiologisches Volumen und kann das Gesamtvolumen des Körpers um ein Vielfaches überschreiten. Man spricht auch vom „apparent volume of distribution“. Die Angabe des Verteilungsvolumen erfolgt in Liter. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) eines Medikaments beschreibt die Zeitspanne, in der die Ausgangskonzentration des Medikaments auf die Hälfte abgefallen ist. Sie wird in Minuten angegeben. Im Rahmen einer Kinetik erster Ordnung ist die Halbwertszeit konstant und umgekehrt proportional zur Eliminationskonstanten (k). „ $t_{1/2} = \ln 2/k$ “. Die Halbwertszeit ist als sekundärer pharmakokinetischer Parameter von den beiden primären pharmakokinetischen Parametern Clearance und Verteilungsvolumen abhängig. Clearance und Verteilungsvolumen sind dabei voneinander unabhängige Parameter, die Halbwertszeit hingegen kann sich nur in Folge einer Veränderung zumindest eines der Primärparameter verändern. So nimmt beispielsweise die Halbwertszeit mit geringerer Clearance und größerem Verteilungsvolumen zu. Weitere betrachtete pharmakokinetische Parameter sind die Maximalkonzentration (C_{\max}) und T_{\max} . Letzteres beschreibt den Zeitpunkt zu dem C_{\max} gemessen wurde. C_{\max} entspricht der nach Applikation des Medikaments höchsten gemessenen Plasmakonzentration. C_{\max} ist sowohl vom Verteilungsvolumen als auch in geringerem Maße von der Clearance abhängig. T_{\max} wird in Minuten und C_{\max} in $\mu\text{g}/\text{l}$ angegeben.

Für die Modellanpassung im 1- und 2-Kompartiment-Modell gibt es weitere spezielle Parameter. Das 1-Kompartiment-Modell ist bei oraler Dosierung durch drei Parameter beschrieben. Zum einen durch die Absorptionshalbwertszeit (Absorptions- $t_{1/2}$), bzw. die Absorptionskonstante ($\ln 2/\text{Absorptionshalbwertszeit}$), die die Aufnahme des Stoffes ins Kompartiment beschreibt. Zweitens durch die Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$), bzw. die Eliminationskonstante ($\ln 2/\text{Eliminationshalbwertszeit}$), die die Elimination des Stoffes aus dem Kompartiment heraus beschreibt. Beide Halbwertszeiten werden in Minuten angegeben. Drittens ist das 1-Kompartiment Modell durch das Verteilungsvolumen (V) beschrieben. Die Angabe des Verteilungsvolumen erfolgt in Liter. Aus dem Verteilungsvolumen und der Eliminationskonstanten ist als Produkt von beiden die Clearance berechenbar. Die Angabe der Clearance erfolgt in Liter/Minute. Sowohl das Verteilungsvolumen als auch die Clearance sind bei oraler Dosierung nur in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit (F) zu betrachten und werden als V/F bzw. $\text{Clearance}/F$ angegeben.

Das 2-Kompartiment-Modell beinhaltet die beiden Halbwertszeiten der Zwei-Phasen-Kinetik $t_{1/2\alpha}$ und $t_{1/2\beta}$. Viele Medikamente unterliegen einer Zwei-Phasen-Kinetik, die sich in eine erste Phase mit schnellem Konzentrationsabfall und eine zweite Phase mit langsamerem Konzentrationsabfall unterteilt. Die schnelle Phase wird als α -Phase und die sich anschließende langsamere Phase als β -Phase bezeichnet. Für jede der beiden Phasen lässt sich jeweils eine eigene Halbwertszeit errechnen ($t_{1/2\alpha}$ bzw. $t_{1/2\beta}$). Als dominierende Halbwertszeit wird diejenige bezeichnet, deren Phase den größeren Anteil zur AUC beiträgt. Bei der Mehrzahl der Medikamente ist die Halbwertszeit der β -Phase, die auch als terminale Halbwertszeit bezeichnet wird, die dominierende. Die Halbwertszeiten werden in Minuten angegeben. Weiterhin wurde das zentrale Verteilungsvolumen (V_c) unmittelbar nach der i.v.-Applikation aus Dosis und extrapolierter Plasmakonzentration berechnet. Außerdem das Verteilungsvolumen im „steady state“ (V_{ss}), das dem Verteilungsvolumen nach Einstellung des Verteilungsgleichgewichts zwischen zentralem und peripherem Kompartiment entspricht. V_{ss} berechnet sich unter Berücksichtigung von V_c und den Geschwindigkeitskonstanten zwischen den beiden Kompartimenten (k_{12} und k_{21}). Die Angabe der Verteilungsvolumina erfolgt in Litern. Auch hier lässt sich die Clearance als Produkt von V_c und der Eliminationskonstanten (k_{10}) berechnen. Die Angabe der Clearance erfolgt in Liter/Minute (Derendorf et al. 2011; Byers und Sarver 2009).

2.4.2 Bestimmung pharmakokinetischer Parameter

2.4.2.1 Nichtparametrische Analyse

Die Berechnungen nichtparametrischer pharmakokinetischer Parameter aus den Plasmakonzentrationsmessungen erfolgte mit Hilfe der Software Winnonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, USA). Mittels Anwendung der Trapezregel „ $(C_1+C_2)/2 \cdot (t_2-t_1)$ “ wurde die Fläche unter der Kurve bis zur letzten Messung (AUC_{last}) bestimmt. Daraufhin wurde bei Midazolam und Hydroxymidazolam entsprechend der letzten zwei bis vier Messpunkte die Fläche unter der Kurve gegen unendlich extrapoliert ($AUC_{0-unendlich}$). Da im Rahmen des Nachbeobachtungszeitraums von ca. 24 Stunden bei vielen Probanden kein ausreichender Konzentrationsabfall der Koffein- und Paraxanthinplasmakonzentrationen beobachtet werden konnte war hier eine Extrapolation gegen unendlich nicht sinnvoll. Stattdessen wurde – um eine gute Vergleichbarkeit zu ermöglichen – für Koffein und Paraxanthin die Fläche unter der Kurve für die Zeitspanne 0 bis 1200 Minuten (AUC_{0-1200}) berechnet. Die Einheit der verschiedenen AUC war $\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{l}$. Zur Berechnung der Metabolitenquotienten wurde die AUC des Metaboliten durch die AUC der Muttersubstanz dividiert. Der Metabolitenquotient ist dimensionslos. Für die Größen C_{max} und T_{max} wurden ohne Extra- oder Interpolierung die tatsächlich gemessene Maximalkonzentration und der Zeitpunkt dieser Messung angegeben. C_{max} wurde in μg und T_{max} in Minuten angegeben. Die Berechnung der terminalen Halbwertszeit erfolgte für Midazolam und Hydroxymidazolam mittels einer Regressionsgeraden aus dem Verlauf der letzten zwei bis vier Messpunkte der Plasmakonzentration. Die (negative) Steigung der Regressionsgeraden entspricht der Eliminationskonstanten (k). Aus dieser lässt sich als Quotient von $\ln 2$ geteilt durch k die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) berechnen. Die Angabe der Halbwertszeit erfolgte in Minuten. Für Midazolam erfolgte außerdem die Bestimmung der mittleren Verweildauer (MRT/mean residence time) wiederum gegen unendlich extrapoliert aus den letzten zwei bis vier Messwerten ($MRT_{(0-unendlich)}$). Die Angabe der $MRT_{(0-unendlich)}$ erfolgte ebenfalls in Minuten.

2.4.2.2 Modellanpassung

Die Berechnungen pharmakokinetischer Parameter im Rahmen der Modellanpassung im 1- und 2-Kompartiment-Modell aus den Plasmakonzentrationsmessungen erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Software Winnonlin (Pharsight Corporation, Mountain View, USA). Die Modellanpassung wurde nur für die beiden Muttersubstanzen durchgeführt.

Für die Muttersubstanz Koffein wurde ein 1-Kompartiment Modell verwendet, da sich zeigte, dass die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Koffein dadurch in den meisten Fällen gut zu beschreiben waren. Die Parameter wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt, wobei für die Gewichtung der Differenzen zwischen Modellvoraussage und Messwert sich die Wichtungsfunktion $1/Y$ als die beste erwies. Dies wurde daran geprüft, dass bei der größten Zahl der Probanden die Parameter hinreichend präzise bestimmt werden konnten. Nicht hinreichend präzise bestimmte Parameter – definiert als Parameter mit einem Variationskoeffizienten $>100\%$ – wurden von der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Im 1-Kompartiment Modell bei oraler Dosierung wurden die Parameter Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$), das Verteilungsvolumen (V) und die Clearance bestimmt. Verteilungsvolumen und Clearance, da es sich um eine orale Dosierung handelte, in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit (F) als V/F bzw. $Clearance/F$.

Für die Muttersubstanz Midazolam wurde ein 2-Kompartiment-Modell angewendet, da sich die Konzentrations-Zeit-Verläufe bei der hier vorhandenen Zwei-Phasen-Kinetik dadurch am Besten darstellen ließen. Die Zwei-Phasen-Kinetik ließ sich bereits in der halb-logarithmischen Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe erkennen, da sich die Messpunkte in dieser Darstellung nicht auf einer Geraden darstellen ließen. Die Parameter wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt, wobei sich für die Gewichtung der Differenzen zwischen Modellvoraussage und Messwert ebenfalls die Wichtungsfunktion $1/Y$ als die Beste erwies. Dies wurde analog zur beschriebenen Vorgehensweise beim 1-Kompartiment-Modell daran geprüft, dass bei der größten Zahl der Probanden die Parameter hinreichend präzise bestimmt werden konnten. Nicht hinreichend präzise bestimmte Parameter – definiert als Parameter mit einem Variationskoeffizienten $>100\%$ – wurden ebenfalls von der weiteren Berechnung ausgeschlossen. Anhand des 2-Kompartiment-Modells wurden durch die modellabhängige Analyse die anfängliche kürzere Halbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ und die darauf folgende längere Halbwertszeit $t_{1/2\beta}$ bestimmt. Außerdem wurde die Clearance, das Verteilungsvolumen im „steady state“ (V_{ss}) sowie das Verteilungsvolumen des zentralen Kompartimentes (V_c) bestimmt.

2.5 Statistische Auswertung

2.5.1 Fallzahl und Zielgröße

Das primäre Ziel der Studie ist der Vergleich pharmakokinetischer Parameter, die nach wiederholter Medikamentengabe an mono- und dizygoten Zwillingen erhoben wurden, um

daraus Schlüsse über die Erbllichkeit des Medikamentenstoffwechsels ziehen zu können. Der Vergleich soll anhand der Clearance als primärem Zielparameter erfolgen. Da die AUC dem Kehrwert der Clearance bzw. der Dosis dividiert durch die Clearance entspricht, kann auch diese als primärer Zielparameter angesehen werden. Als sekundäre Zielparameter werden auch weitere pharmakokinetische Parameter mitbetrachtet. Im Studienprotokoll wurde eine Fallzahl von ca. 60 Probandenpaaren, bestehend aus 30 mono- und 30 dizygoten Paaren, festgelegt. Da diese Arbeit vor vollständigem Studienabschluss verfasst wurde, fanden hier nicht alle letztendlich an der Studie teilnehmenden Probandenpaare Berücksichtigung.

Da einige Probanden nur an zwei von drei geplanten Studientagen teilgenommen haben, erfolgten die meisten Berechnungen aus den über zwei bzw. drei Studientage erhobenen Mittelwerten der pharmakokinetischen Parameter. So wurde einer überproportionalen Gewichtung der Probanden mit nur zwei abgeschlossenen Studientagen entgegengewirkt.

2.5.2 Deskriptive Statistik

Die Präsentation der statistischen Analyse beinhaltete u.a. Darstellungen von Konzentrations-Zeit-Verläufen aller Probanden als Übersicht und auch exemplarische Konzentrations-Zeit-Verläufe einzelner Probanden. Diese Art der graphischen Präsentation dient der Demonstration inter- und intraindividuelle Variabilität in den Konzentrations-Zeit-Verläufen. Diese Darstellungen und auch die weitergehende Analyse erfolgten mit den Programmen S-Plus (S-Plus 6.2 Insightful Corp, Seattle, USA) und SPSS (SPSS 12.0 SPSS Inc., Chicago, USA).

2.5.3 Parametrische und nichtparametrische statistische Analyse

Um zu testen, ob Unterschiede und Korrelationen zwischen verschiedenen Parametern signifikant sind, gibt es zwei gängige Testverfahren. In der parametrischen statistischen Analyse wird von einer Normalverteilung der vorhandenen Werte ausgegangen. Daraus lassen sich der Mittelwert und die Standardabweichung ableiten, die formal auch nur unter der Voraussetzung der Normalverteilung Anwendung finden dürfen. Dies wurde in dieser Arbeit u.a. bei der Darstellung des Alters, Gewicht und Körpergröße der Probanden genutzt. Andererseits gibt es nichtparametrischen Tests, die auch angewendet werden dürfen, wenn keine Normalverteilung vorliegt. Als Kenngrößen der nichtparametrischen Tests wurden für die einzelnen pharmakokinetischen Parameter der Median, der Bereich der Verteilung - ausgedrückt durch Minimum und Maximum - und die 25. sowie 75. Perzentile angegeben.

Als Maß der Streuung der verschiedenen Parameter ist außerdem der Quotient aus Maximum und Minimum angegeben. Die Häufigkeitsverteilung der meisten Größen in der vorliegenden Studie wich nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test von der Normalverteilung ab, weshalb in der Präsentation und statistischen Testung meist nichtparametrische Verfahren verwendet wurden.

Um einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der mono- und dizygoten Zwillingspaare zu testen, wurde der nichtparametrische Man-Whitney-U-Test angewendet. Unter Anwendung der Regeln des multiplen Testens fand sich zwischen den Gruppen der mono- und dizygoten Zwillinge weder bei den pharmakokinetischen Parametern noch bei Alter, Größe und Gewicht ein signifikanter Unterschied.

2.6 Erblichkeitsberechnung

Ein phänotypisches Merkmal ist sowohl durch genetische als auch umweltbedingte Einflussfaktoren verursacht. Erbllichkeit beschreibt den Anteil phänotypischer Varianz, der auf genetische Merkmale zurückgeführt werden kann. Genauer gesagt ist Erbllichkeit definiert als Verhältnis der genetischen Varianz zur Varianz des Phänotyps. Weitergehend wird Erbllichkeit im engeren Sinne (*narrow sense heritability*) als Verhältnis der Varianz der additiven genetischen Effekte zur Varianz des Phänotyps – ohne den Anteil dominanter oder epistatischer genetischer Effekte – definiert (Visscher et al 2008). Zur Abschätzung des erblichen Anteils wurden verschiedene Methoden publiziert.

2.6.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer

DS Falconer führte eine relativ einfache Formel zur Berechnung von Erbllichkeit durch in Zwillingsstudien erhobene Parameter ein. Mittels der Falconer-Formel „ $h^2 = 2 \times (r_{MZ} - r_{DZ})$ “ lässt sich demnach bei bekannten Korrelationskoeffizienten für den entsprechenden Parameter in der mono- und dizygoten Gruppe die Heritabilität (h^2) eines Merkmals abschätzen (Boomsma et al. 2002). Dabei stehen r_{MZ} und r_{DZ} für die Korrelationskoeffizienten monozygoter bzw. dizygoter Zwillinge.

2.6.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell

Eine weitere, ebenfalls auf der Untersuchung mono- und dizygoter Zwillinge beruhende Formel zur Abschätzung der Erbllichkeit, hat ES Vesell 1973 publiziert. Seine Formel zur Schätzung des erblichen Anteils „ $h^2 = (r_{MZ} - r_{DZ}) / (1 - r_{DZ})$ “ ähnelt der von Falconer und beruht ebenfalls auf den Korrelationskoeffizienten mono- und dizygoter Zwillinge (Vesell 1991).

2.6.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse

Neben den Formeln von Falconer und Vesell gibt es weitere Modelle zur Erblichkeitsberechnung mit Hilfe derer verschiedene Einflussfaktoren genauer berücksichtigt werden können. Rijdsdijk und Sham (2002) publizierten die ebenfalls auf Zwillingsstudien basierende Strukturgleichungsmodell-Analyse (*structural equation modelling*). Dieses Modell beinhaltet vier Teilaspekte als Einflussfaktoren auf das zu untersuchende Merkmal. Es berücksichtigt genetische Faktoren (*A/additive genetics*), dominante genetische Effekte (*D/dominance*), gemeinsame Umweltfaktoren (*C/common environment*) und nicht gemeinsame Umweltfaktoren (*E/unique environment*). Basierend auf der Annahme, dass die Gruppen der mono- und dizygoten Zwillinge unterschiedlich große Anteile dieser Einflussfaktoren teilen, kann der jeweilige Anteil des Einflussfaktors errechnet werden. Monozygote Zwillinge teilen 100% der genetischen (A) und dominanten genetischen Effekte (D) sowie der gemeinsamen Umweltfaktoren (C). Dizygote Zwillinge teilen ebenfalls 100% der gemeinsamen Umweltfaktoren (C), allerdings nur 50% der genetischen (A) und 25% der dominanten genetischen Effekte (D). Nicht gemeinsame Umweltfaktoren (E) werden in beiden Gruppen gar nicht geteilt. Da die gemeinsamen Umweltfaktoren (C) und dominante genetische Effekte (D) bei einer klassischen Zwillingsstudie als Einflussfaktoren nicht klar getrennt werden können, können sie nicht in einem gemeinsamen Modell auftreten und es können mit dieser Technik sinnvollerweise nur das ACE-, ADE-, AE- und CE-Modell untersucht werden. Zur Beurteilung der Testgüte können verschiedene Parameter herangezogen werden. Beispielsweise der X^2 - und P-Wert des jeweiligen Modells im Vergleich zum gesättigten Modell. Dabei bedeutet ein nicht-signifikanter P-Wert, dass das Modell gut zu den erhobenen Werten passt und ein signifikanter Wert, dass das Modell schlecht zu den erhobenen Werten passt. Ein weiteres Kriterium zur Betrachtung der Güte der jeweiligen Modelle ist das *Akaike information criterion*. Dabei findet sowohl die Anpassungsgüte des Modells als auch die Anzahl der nötigen Parameter Berücksichtigung. Ein komplexeres Modell wirkt sich dabei negativ aus und im direkten Vergleich sind Modelle mit niedrigeren AIC-Werten zu bevorzugen.

Die Durchführung der Strukturgleichungsmodell-Analyse mit der Berechnung der verschiedenen Modelle und die Ermittlung der Testgüte erfolgte mit der Software „R“ (The R Foundation for Statistical Computing, 2013) und dem R-Paket „mets“ (Holst und Scheike, 2013).

2.6.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow

Kalow et al. (1998 und 1999) beschreiben eine von Zwillingsstudien unabhängige Methode zur Abschätzung von Heritabilität für pharmakologische Fragestellungen. Ihre Methode der „Wiederholten Medikamentenapplikation“ (*repeated drug administration*) beruht auf einer mindestens zweimaligen Applikation einer Testsubstanz an die Probanden zu unterschiedlichen Zeiten. Aus den daraus gewonnen pharmakokinetischen Parametern kann die inter- und intraindividuelle Variabilität dieser Parameter bestimmt werden. Mit der Formel „ $r_{GC} = (SD_b^2 - SD_w^2)/SD_b^2$ “ kann daraus die Heritabilität abgeleitet werden. „ r_{GC} “ steht dabei für „genetische Komponente“ (=Heritabilität), SD_b für die Standardabweichungen der interindividuellen Variabilität und SD_w für die Standardabweichungen der intraindividuellen Variabilität. Die Untersuchte Gruppe sollte für diese Art der Testung aus mindestens 50 Probanden bestehen (Kalow et al. 1999). Diese Methode basiert auf der Annahme, dass die gemessenen Unterschiede zwischen Individuen einerseits auf umweltbedingten Faktoren und Messfehlern und andererseits auf genetischen Faktoren beruhen. Im Gegensatz dazu beruhen die Unterschiede innerhalb eines Individuums nur auf Umwelteinflüssen und Messfehlern.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchte Probandinnen und Probanden

In der vorliegenden Arbeit wurde an gesunden monozygoten und dizygoten Zwillingspaaren die Pharmakokinetik verschiedener Medikamente untersucht, um daraus Rückschlüsse über den Anteil erblicher und umweltbedingter Einflussfaktoren ziehen zu können. Diese Arbeit basiert auf den Daten von 58 Probanden kaukasischer Herkunft. Von den 29 Probandenpaaren waren 20 (69%) monozygot und 9 (31%) dizygot. In der Bevölkerung gibt es ähnlich viele monozygote wie dizygoten Zwillinge. In unserer Studie wurden aber in Hinblick auf die bessere Auswertbarkeit nicht gleichgeschlechtliche dizygoten Zwillingspaare ausgeschlossen, was das Verhältnis mono- zu dizygoten Zwillingen von 2,22 zu 1 in dieser Studie erklärt. Insgesamt nahmen 16 (55,2%) weibliche und 13 (44,8%) männliche Zwillingspaare teil. Davon waren 11 (69%) Zwillingspaare weiblich monozygot und 5 (31%) Zwillingspaare weiblich dizygot; sowie 9 (69%) Zwillingspaare männlich monozygot und 4 (31%) Zwillingspaare männlich dizygot.

Das mittlere Alter betrug $24,3 \pm 8$ Jahre (Mittelwert \pm Standardabweichung). Aus der mittleren Größe von $1,74 \pm 0,09$ m und dem mittleren Gewicht von $68,28 \pm 10,55$ kg ergab sich ein mittlerer BMI von $22,59 \pm 2,63$ kg/m².

Tabellen 13 und 14 zeigen den Median, Bereich der Verteilung und die 25. sowie 75. Perzentile der Verteilung der Körpergröße, Gewicht und des Alters getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen. Als Maß der Streuung der verschiedenen Parameter ist außerdem der Quotient aus Maximum und Minimum angegeben. Die Angabe „3“ bedeutet dementsprechend, dass der maximale gemessene Wert drei Mal so hoch war wie der niedrigste gemessene Wert.

Tab. 13 Größe, Gewicht, Alter monozygoter Zwillinge

monozygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung*
Größe [cm]	40	174	157	193	167	180	1,2
Gewicht [kg]	40	67,4	53,5	94,4	59,3	78,9	1,8
Alter [Jahre]	40	22	18	56	20	28	3,1

* Streuung: Maximum/Minimum

Tab. 14 Größe, Gewicht, Alter dizygoter Zwillinge

dizygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
Größe [cm]	18	171	162	195	164	180	1,2
Gewicht [kg]	18	65,8	55,5	81,0	57,4	73,1	1,5
Alter [Jahre]	18	22	18	36	18	27	2,0

Die Studienmedikation wurde insgesamt sehr gut vertragen und kein Proband musste nach Einschluss in die Studie aufgrund von Nichteinhalten der Studienregeln von der Studie ausgeschlossen werden.

3.2 Midazolam als Indikator für CYP3A-Aktivität

3.2.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe

Den Probanden wurde, wie in Kapitel „2.1.7 Studienablauf“ beschrieben, zu fest definierten Zeitpunkten im Anschluss an die Applikation der Studienmedikation Blut entnommen. Aus diesen Blutproben wurde u.a. die Plasmakonzentration von Midazolam und des Metaboliten Hydroxymidazolam mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und tandem-massenspektrometrischer Analyse bestimmt.

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Midazolam sind in Abbildung 1 linear und in Abbildung 2 halblogarithmisch dargestellt. In der halblogarithmischen Darstellung ist ein anfänglich schnellerer und anschließend langsamerer Konzentrationsabfall sichtbar. Dieser Konzentrationsabfall entspricht einem mit zwei Exponentialfunktionen beschreibbaren Verlauf eines 2-Kompartiment-Modells.

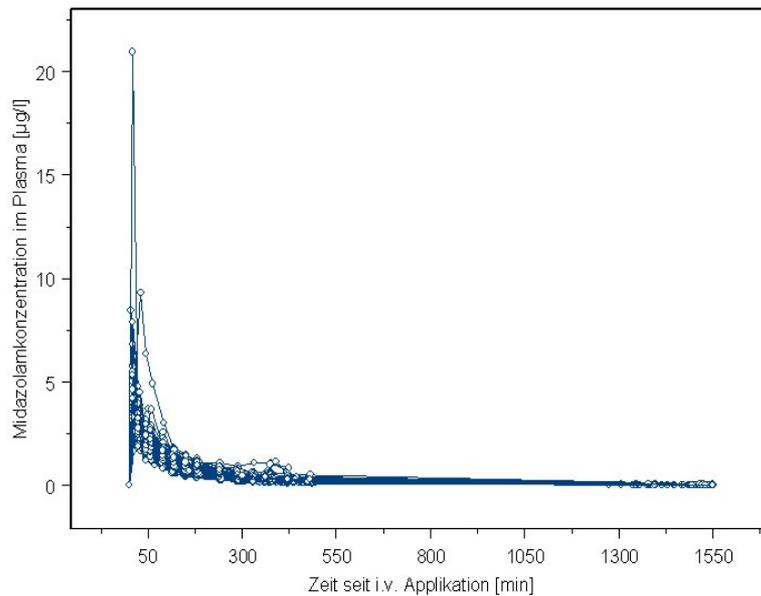


Abb. 1: Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Midazolam

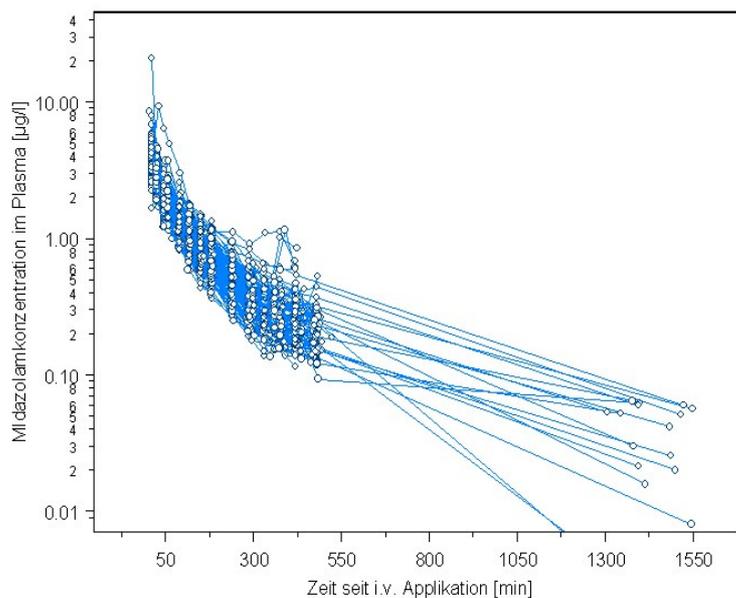


Abb. 2: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Midazolam

Zur Veranschaulichung sind in der Abbildung 3 und 4 die Konzentrations-Zeit-Verläufe einzelner Probanden linear über jeweils drei Studientage exemplarisch an drei monozygoten und drei dizygoten Probandenpaaren dargestellt. Wie man sieht, variierten die Konzentrationen von Midazolam zwischen den drei Studientagen nur relativ wenig und die Unterschiede zwischen dizygoten Zwillingen waren nicht wesentlich größer als zwischen monozygoten Zwillingen.

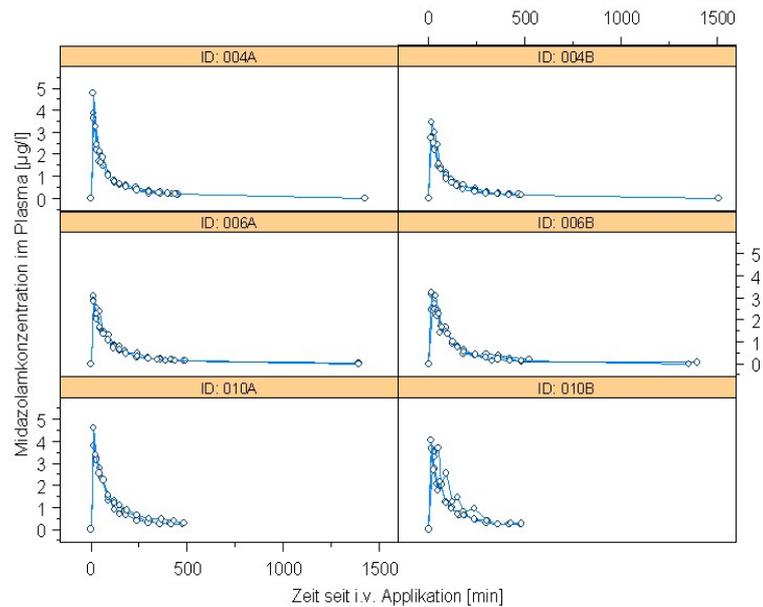


Abb. 3: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf monozygoter Zwillingspaare für Midazolam

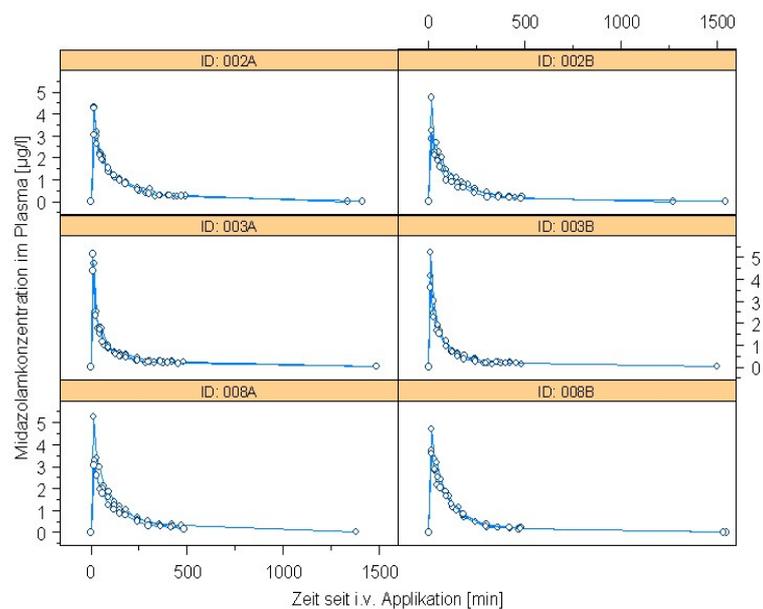


Abb. 4: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf dizygoter Zwillingspaare für Midazolam

Zur Veranschaulichung der intraindividuellen Variabilität zwischen den drei Studientagen ist in Abbildung 5 die Höhe des primären Zielparameters Clearance aus der nichtparametrischen Analyse dargestellt. Die Messpunkte jeweils eines Probanden sind verbunden. Bei einigen Probanden fällt eine deutliche intraindividuelle Variabilität in der Höhe der Clearances zwischen den Studientagen auf.

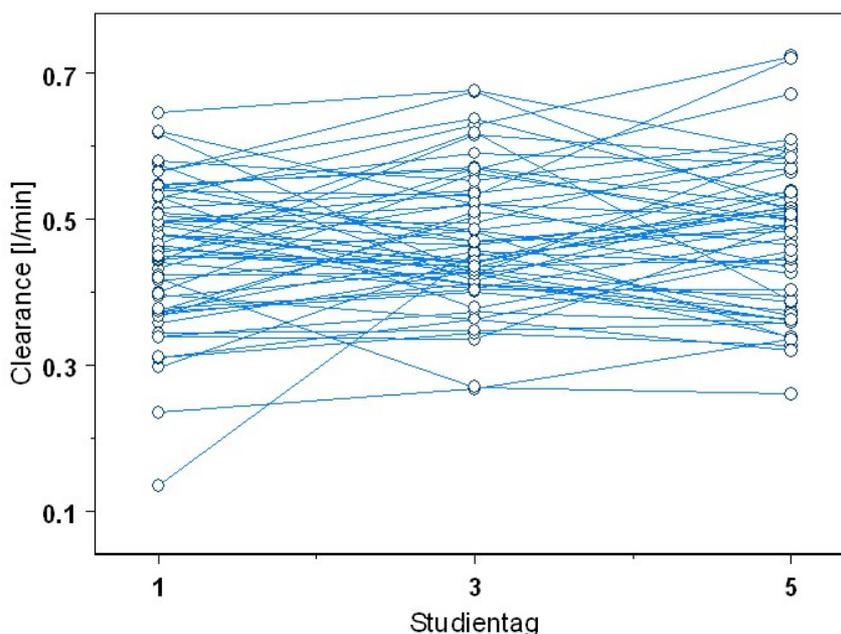


Abb. 5: Vergleich der Clearances zwischen den Studientagen für Midazolam

3.2.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse

Um die individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe zusammenfassend darzustellen, wurden die pharmakokinetischen Parameter zunächst mittels nicht parametrischer Verfahren berechnet (siehe „2.4 Pharmakokinetische Auswertung“).

Die Tabellen 15 und 16 zeigen den Median, den Bereich der Verteilung und die 25. sowie 75. Perzentile der Verteilung der pharmakokinetischen Parameter getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen. Als Maß der Streuung der verschiedenen Parameter ist außerdem der Quotient von Maximum und Minimum angegeben. Für diese Auswertung wurden die individuellen pharmakokinetischen Parameter verwendet, die sich aus der Analyse der zwei oder drei Studientage ergaben. Die Streuung der pharmakokinetischen Parameter liegt hierbei zwischen 1,8 und 3,3 und unterscheidet sich zwischen den zwei Gruppen nicht wesentlich.

Tab. 15 Midazolam-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei monozygoten Zwillingen

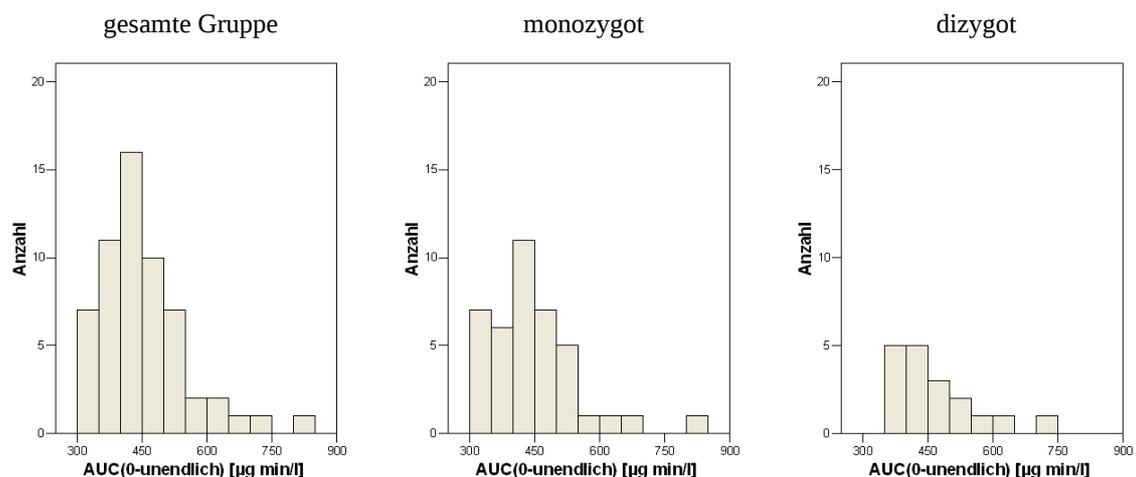
monozygot	Anzahl	Median	Mini- mum	Maxi- mum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{\max}^* [$\mu\text{g/l}$]	40	4,05	2,71	9,00	3,26	4,38	3,3
AUC_{last}^* [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	40	389	287	611	353	438	2,1
$AUC_{(0-\text{unendlich})}^*$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	40	428	314	822	374	499	2,6
$t_{1/2}^*$ [min]	40	178	120	304	152	202	2,5
Clearance [l/min]	40	0,470	0,317	0,638	0,406	0,544	2,0
$MRT_{(0-\text{unendlich})}^*$ [min]	40	185	118	318	153	210	2,7

* C_{\max} : maximale Plasmakonzentration; AUC: area under the curve; $t_{1/2}$: Halbwertszeit; MRT: mean residence time

Tab. 16 Midazolam-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei dizygoten Zwillingen

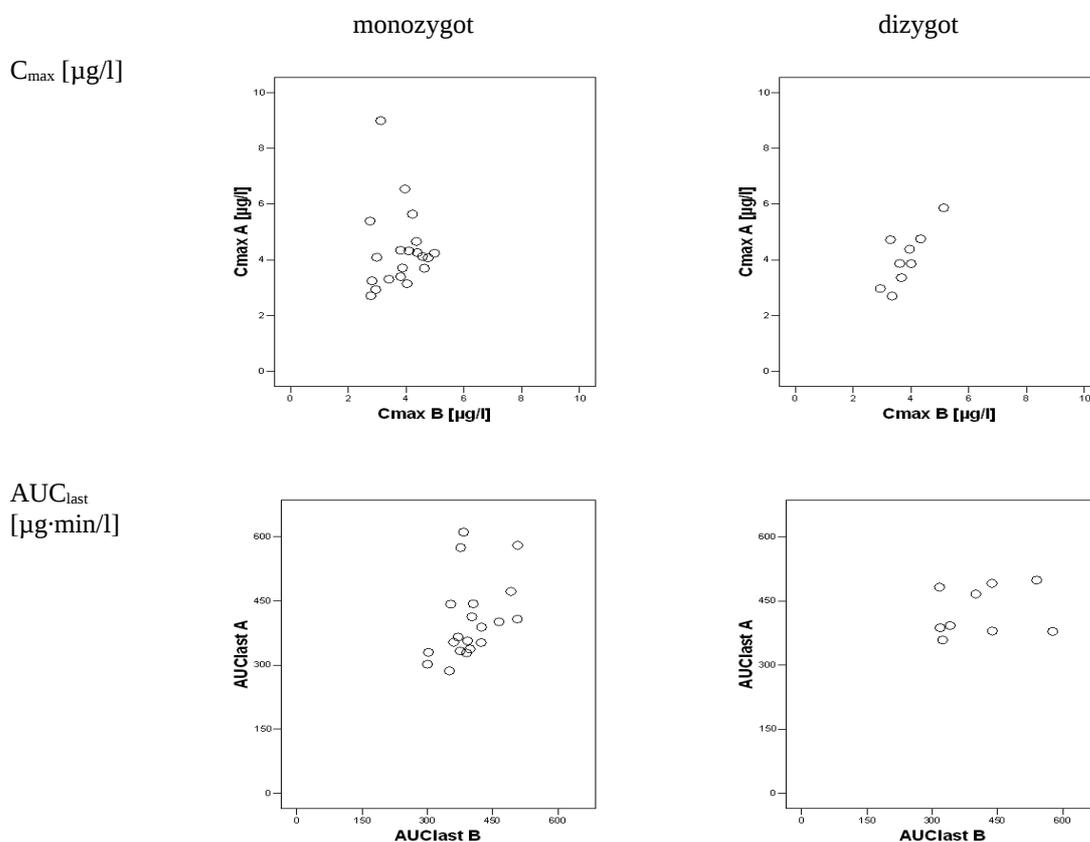
dizygot	Anzahl	Median	Mini- mum	Maxi- mum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	18	3,86	2,70	5,87	3,34	4,47	2,2
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	18	396	317	577	354	485	1,8
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	18	436	368	732	392	527	2,0
$t_{1/2}$ [min]	18	193	104	325	158	253	3,1
Clearance [l/min]	18	0,459	0,279	0,548	0,388	0,513	2,0
$MRT_{(0-\text{unendlich})}$ [min]	18	202	116	372	165	263	3,2

Die Häufigkeitsverteilungen der $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ in der Gesamtgruppe und in den Untergruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge sind exemplarisch in den folgenden Histogrammen dargestellt (Abbildung 6).

Abb. 6: Histogramme der Verteilung der $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ von Midazolam

Die Häufigkeitsverteilung der meisten Größen in der vorliegenden Studie wich nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test von der Normalverteilung ab, weshalb in der Präsentation und statistischen Testung meist nichtparametrische Verfahren verwendet wurden.

Die Abbildung 7 zeigt die Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Midazolam unterschieden nach mono- und dizygoten Zwillingen. Die Auftragung des A-Probanden auf der Ordinate und des B-Probanden auf der Abszisse lassen einen ersten Eindruck für das Ausmaß der Korrelation bei mono- und dizygoten Zwillingen für die verschiedenen pharmakokinetischen Parameter zu. Eine näherungsweise Anordnung auf einer Diagonalen (Ursprungsgeraden) entspräche einer hohen Korrelation, wohingegen eine Gleichverteilung im Raum oder eine symmetrische Häufung in der Mitte gegen eine hohe Korrelation spräche. Eine hohe Korrelation findet sich augenscheinlich für den Parameter C_{\max} für dizygoten Zwillinge, wohingegen die Korrelation für den Parameter C_{\max} für monozygote Zwillinge gering scheint. Bezüglich der anderen Parameter ist mittels dieser grafischen Darstellung kein deutlicher Unterschied der Korrelationskoeffizienten auszumachen. Das Ausmaß der linearen Korrelation wurde mittels des Pearson-Korrelationskoeffizienten berechnet und weiter unten im Zusammenhang mit der Erblichkeitsberechnung dargestellt (Tabelle 19).



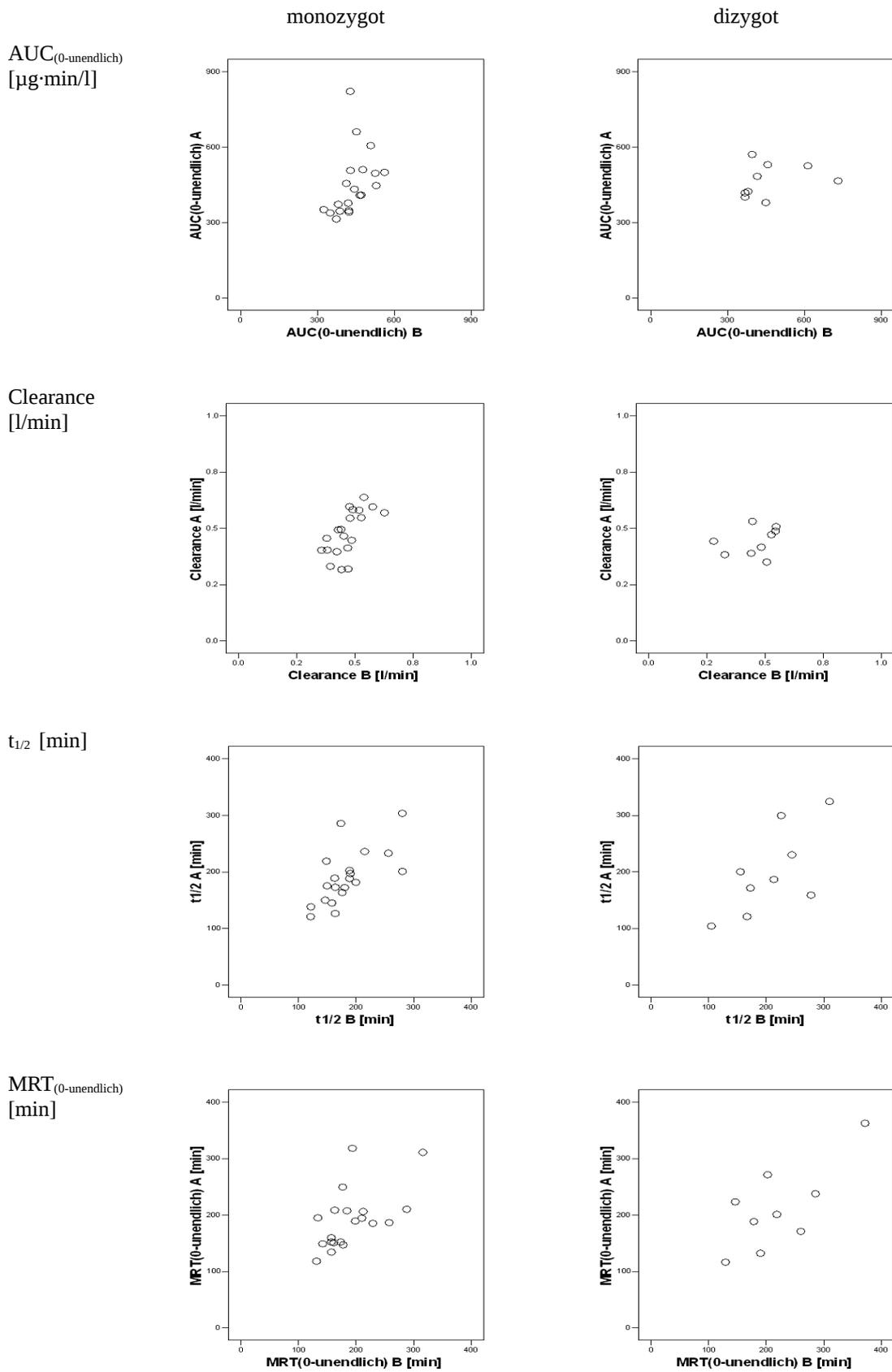


Abb. 7: Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Midazolam zwischen mono- und dizygoten Zwillingen. Die Korrelationskoeffizienten sind weiter unten in Tabelle 19 zusammengefasst.

3.2.3 PK-Parameter: Modellanpassung

Um typische bekannte pharmakokinetische Parameter zu bestimmen, wurde eine Modellanpassung der Messwerte an unterschiedliche Funktionen durchgeführt. Hierbei und auch schon durch den zunächst schnelleren und anschließend langsameren Abfall der Plasmakonzentrationen in der halblogarithmischen Darstellung (siehe Abb. 2) zeigte sich, dass die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Midazolam durch ein 2-Kompartiment Modell am Besten beschrieben werden können. Die Parameter wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt, wobei für die Gewichtung der Differenzen zwischen Modellvoraussage und Messwert sich die Wichtungsfunktion in Form von „1/Konzentration“ als die Beste erwies. Dies wurde daran gemessen, dass damit bei der größten Zahl der Probanden die Parameter hinreichend präzise bestimmt werden konnten. Ein typisches Bild einer Kurvenanpassung – auf Basis derer die Modellanalyse erfolgt ist – ist exemplarisch für einen Probanden in Abb. 8 dargestellt.

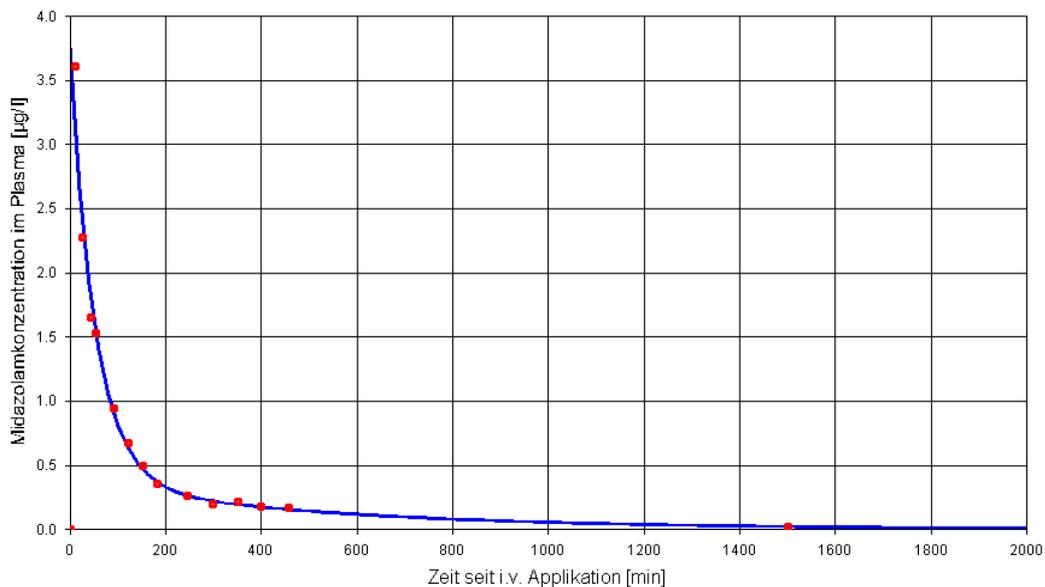


Abb. 8: Exemplarische Kurvenanpassung für Midazolam. Die Punkte zeigen die Messwerte, die Kurve stellt die als optimal für die Anpassung des Konzentrationsabfalles ermittelte Funktion dar.

Die Beschreibung der Konzentrations-Zeit-Verläufe mittels des 2-Kompartiment-Modells ergab eine Reihe pharmakokinetischer Parameter. Hier werden insbesondere diejenigen dargestellt, die sich nicht aus der nichtparametrischen (Modell-unabhängigen) Analyse ergeben. Dies sind die kürzere Halbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ und die längere Halbwertszeit $t_{1/2\beta}$, die Clearance (diese wurde auch in der nichtparametrischen Analyse berücksichtigt), das Verteilungsvolumen im „steady state“ (V_{ss}) sowie das Verteilungsvolumen des zentralen Kom-

partiments (V) (siehe auch Kapitel „2.4.2.2 Modellanpassung“). Die beiden Verteilungsvolumina wurden auch jeweils im Verhältnis zum Körpergewicht untersucht (V_{ss}/KG bzw. V/KG).

Die Tabellen 17 und 18 zeigen den Median, den Bereich der Verteilung, die 25. sowie 75. Perzentile und die Streuung der pharmakokinetischen Parameter getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen. Hierbei zeigt sich eine Streuung im Bereich von 2,2 bis 5,8, die im Vergleich für die Gruppe der dizygoten Zwillinge in einem etwas höheren Bereich liegt.

Tab. 17 Midazolam-PK-Modellanpassung: Deskriptive Statistik bei monozygoten Zwillingen

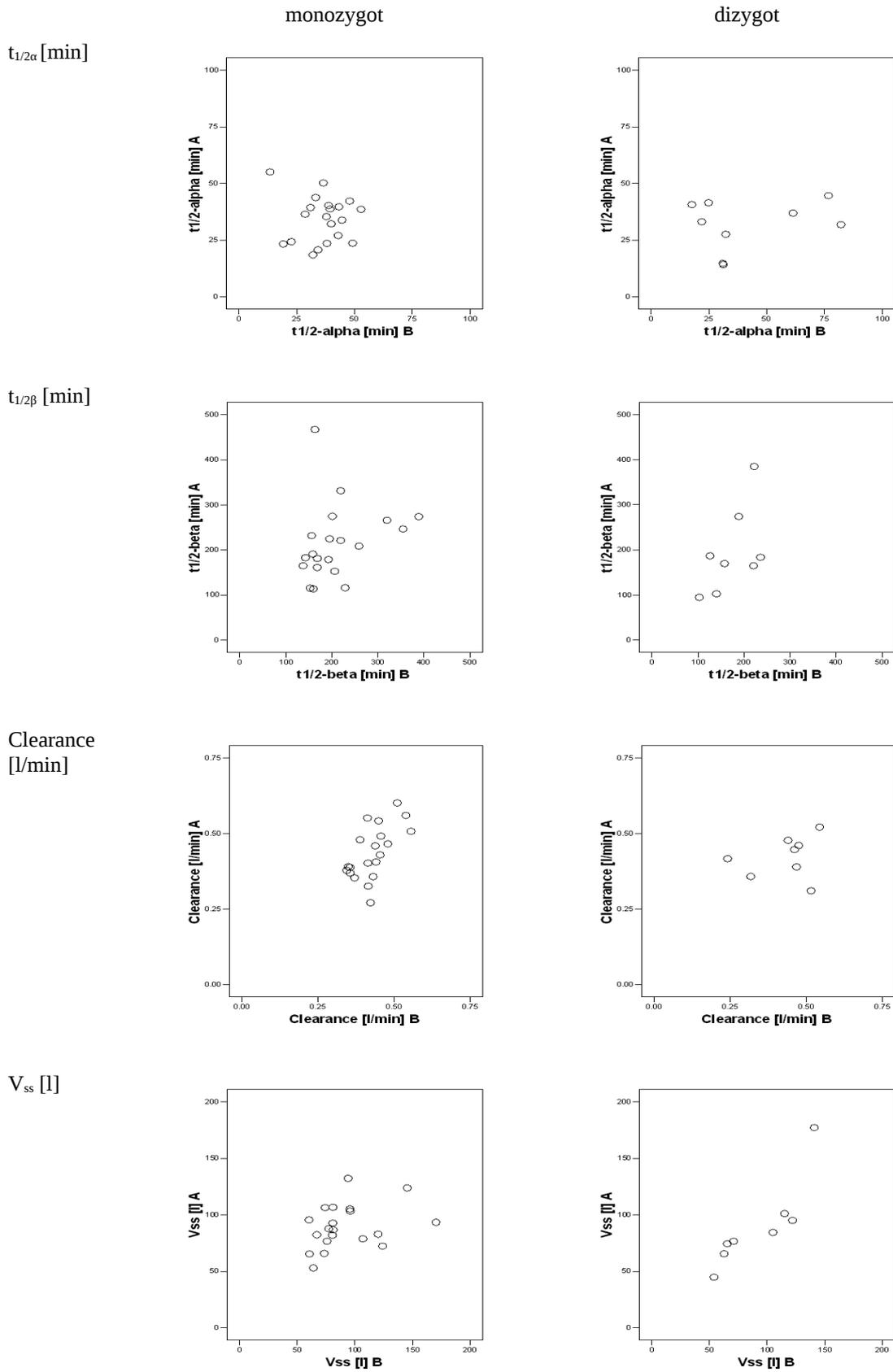
monozygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
$t_{1/2\alpha}$ [min]	40	37,2	13,5	55,1	27,4	41,7	4,1
$t_{1/2\beta}$ [min]	40	194	114	468	160	243	4,1
Clearance [l/min]	40	0,426	0,271	0,601	0,372	0,480	2,2
V^*_{ss} [l]	40	82,6	52,9	170	74,7	105	3,2
V_{ss}/KG^* [l/kg]	40	1,27	0,76	2,53	1,14	1,42	3,3
V [l]	40	43,2	30,4	68,4	38,0	51,5	2,3
V/KG [l/kg]	40	0,64	0,41	0,98	0,56	0,73	2,4

* V: Verteilungsvolumen; ss: steady state; KG: Körpergewicht

Tab. 18 Midazolam-PK-Modellanpassung: Deskriptive Statistik bei dizygoten Zwillingen

dizygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
$t_{1/2\alpha}$ [min]	18	32,0	14,2	82,2	24,1	42,3	5,8
$t_{1/2\beta}$ [min]	18	184	94,9	385	133	221	4,1
Clearance [l/min]	18	0,447	0,242	0,544	0,372	0,476	2,2
V_{ss} [l]	18	78,3	44,8	177	65,6	110	4,0
V_{ss}/KG [l/kg]	18	1,14	0,80	2,24	0,98	1,80	2,8
V [l]	18	45,3	25,2	63,7	37,6	54,7	2,5
V/KG [l/kg]	18	0,68	0,37	0,99	0,57	0,80	2,7

Die Abbildung 9 veranschaulicht die Korrelation der mittels Modellanpassung erhaltenen pharmakokinetischen Parameter von Midazolam unterschieden nach mono- und dizygoten Zwillingen. Wie man sieht, findet sich für keinen der Parameter eine außerordentlich hohe Korrelation bei den monozygoten Zwillingen, überraschenderweise aber eine recht hohe Korrelation für die Verteilungsvolumina bei dizygoten Zwillingen. Siehe hierzu auch die Korrelationskoeffizienten aus Tabelle 21.



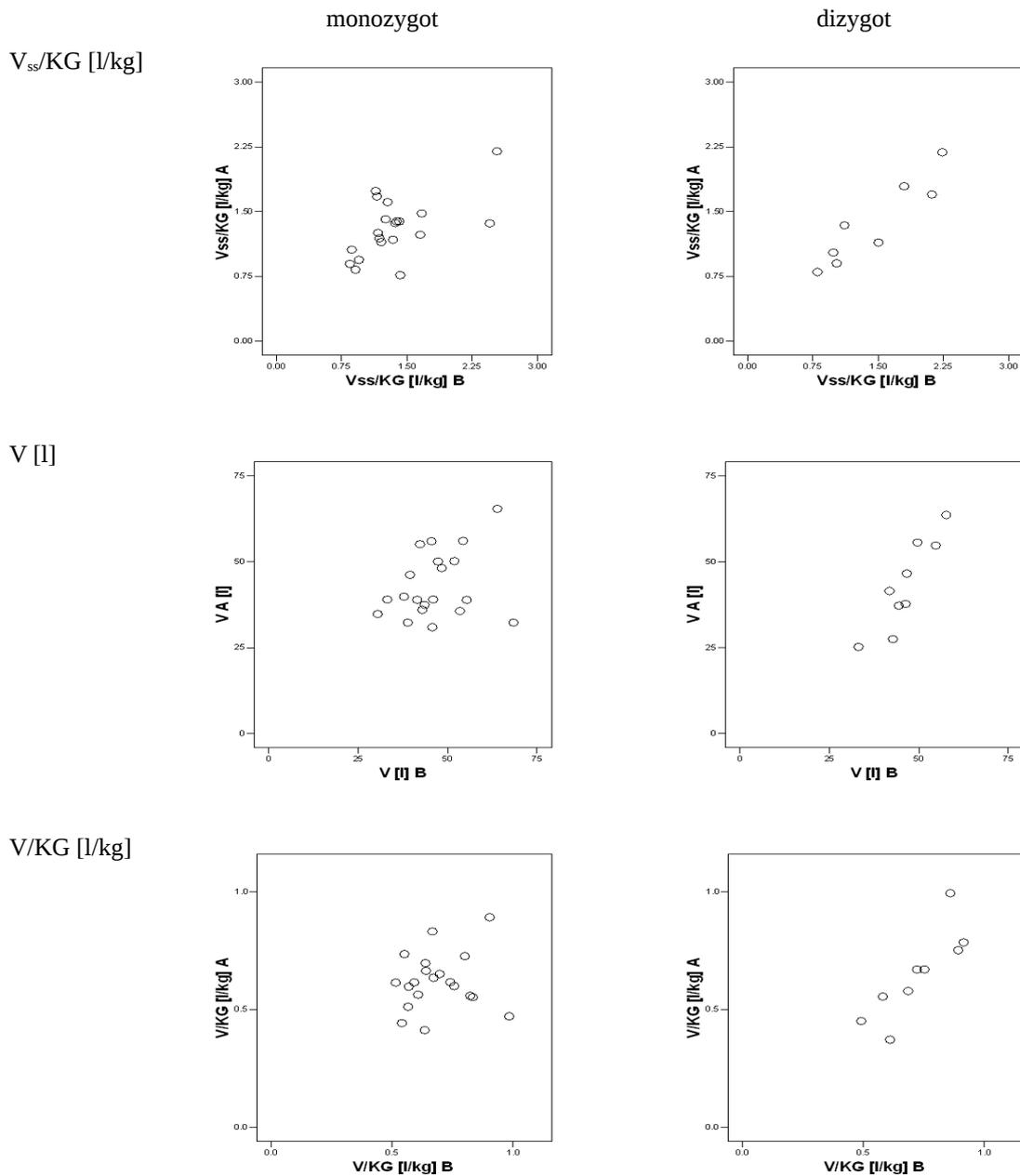


Abb. 9: Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Midazolam zwischen mono- und dizygoten Zwillingen

3.2.4 Erblichkeitsberechnung

3.2.4.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer

Mittels der von Falconer beschriebenen Formel lässt sich bei bekannten Korrelationskoeffizienten die Heritabilität (h^2) eines Merkmals abschätzen (siehe Kapitel „2.6 Erblichkeitsberechnung“).

3.2.4.1.1 Nichtparametrische PK-Analyse

Tabelle 22 zeigt die jeweiligen Pearson-Korrelationskoeffizienten nichtparametrischer Parameter, den P-Wert und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Eine gewisse Erblichkeit lässt sich hier für die AUC_{last} , $AUC_{(0-unendlich)}$ und am höchsten für die Clearance abschätzen. Bekanntlich waren im Studienprotokoll die Clearance und damit auch ihr Kehrwert ($AUC = \text{Dosis}/\text{Clearance}$) als Hauptzielgrößen der Studie definiert worden. Eine Heritabilität „< 0“ bedeutet, dass sich kein Hinweis auf eine Erblichkeit dieses Parameters aus den Daten ergibt.

Tab. 19 Midazolam - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Nichtparametrische PK-Analyse

	r_{MZ}^*	P-Wert	r_{DZ}^*	P-Wert	Heritabilität
C_{max} [min]	-0,004	n.s.	0,801	0,01	< 0
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	0,427	0,060	0,182	n.s.*	0,49
$AUC_{(0-unendlich)}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	0,424	0,063	0,243	n.s.	0,362
$t_{1/2}$ [min]	0,658	0,002	0,697	0,037	< 0
Clearance [l/min]	0,662	0,001	0,3	n.s.	0,724
$MRT_{(0-unendlich)}$ [min]	0,572	0,008	0,732	0,025	< 0

* r_{MZ} : Korrelationskoeffizienten monozygoter Zwillinge; r_{DZ} : Korrelationskoeffizienten dizygoter Zwillinge; n.s.: nicht signifikant

Neben der Abschätzung der Heritabilität nach Falconer auf Basis der Pearson-Korrelationskoeffizienten wurde außerdem für die Hauptzielgrößen eine Berechnung auf Basis der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Tabelle 20 zeigt die jeweiligen Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten, den P-Wert und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Es fällt zum einen im Vergleich zur Berechnung auf Basis der Pearson-Korrelationskoeffizienten eine deutlich größere Übereinstimmung der ermittelten Heritabilitäten der beiden gegen unendlich extrapolierten Parameter $AUC_{(0-unendlich)}$ und Clearance auf. Zum anderen ergibt diese Berechnung für die AUC_{last} einen Schätzwert der Heritabilität von über 99%.

Tab. 20 Midazolam - Rangkorrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Nichtparametrische PK-Analyse

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	0,529	0,016	0,033	n.s.	0,991
$AUC_{(0-unendlich)}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	0,674	0,001	0,383	n.s.	0,581
Clearance [l/min]	0,704	< 0,001	0,417	n.s.	0,574

3.2.4.1.2 PK-Analyse mit Modellanpassung

Tabelle 21 zeigt die jeweiligen Pearson-Korrelationskoeffizienten der Parameter der Modellanalyse und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Hier zeigt sich die höchste Heritabilität ebenfalls für die Hauptzielgröße Clearance.

Tab. 21 Midazolam - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Modellanpassung

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
$t_{1/2\alpha}$ [min]	-0,058	n.s.	0,254	n.s.	< 0
$t_{1/2\beta}$ [min]	0,255	n.s.	0,584	n.s.	< 0
Clearance [l/min]	0,618	0,004	0,242	n.s.	0,753
V_{ss} [l]	0,320	n.s.	0,86	0,006	< 0
V_{ss}/KG [l/kg]	0,571	0,009	0,923	0,001	< 0
V [l]	0,292	n.s.	0,905	< 0,001	< 0
V/KG [l/kg]	0,135	n.s.	0,839	0,005	< 0

3.2.4.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell

Tabelle 22 zeigt die jeweiligen Pearson-Korrelationskoeffizienten der primären Parameter Clearance und AUC der nichtparametrischen Analyse und die daraus mit der Formel nach Vesell errechnete Heritabilität. Hier zeigt sich die höchste Heritabilität wie bereits bei der Berechnung nach Falconer für die Hauptzielgröße Clearance.

Tab. 22 Midazolam - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Vesell

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	0,427	0,060	0,182	n.s.	0,299
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	0,424	0,063	0,243	n.s.	0,239
Clearance [l/min]	0,662	0,001	0,3	n.s.	0,517

3.2.4.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse

Mittels der Strukturgleichungsmodell-Analyse kann neben den genetischen Faktoren auch der Einfluss weiterer Faktoren auf den Phänotyp berücksichtigt werden (siehe Kapitel „2.6 Erblchkeitsberechnung“). Das ADCE-Modell berücksichtigt genetische Faktoren (*A/additive genetics*), gemeinsame Umweltfaktoren (*C/common environment*) und nicht gemeinsame Umweltfaktoren (*E/unique environment*). Außerdem können dominante genetische Effekte (*D/dominance*) berücksichtigt werden. Die Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde für den Parameter $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ durchgeführt.

Tabelle 23 zeigt den X^2 - und den P-Wert der verschiedenen Modelle im jeweiligen Vergleich mit dem Gesättigten- (*Saturated*-) Modell sowie den jeweiligen AIC-Wert (*Akaike information criterion*).

Tab. 23 Midazolam- $AUC_{(0-\infty)}$ - Vergleich jeweils mit Saturated-Modell und AIC

Modell	X^2	P-Wert	AIC
Saturated	-	-	702,317
ACE	182,2	< 0,001	854,561
ADE	26,3	0,035	698,626
AE	26,3	0,05	696,644
CE	26,4	0,048	696,765

Tabelle 24 zeigt die jeweilige Verteilung der Variation der vier prüfbar Modellen ACE, ADE, AE und CE. Das hier zu favorisierende Modell ist das AE-Modell. Es gibt additiven genetischen Faktoren einen Anteil von 20% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 80%. Das AE-Modell ist hier dem *Akaike information criterion* zufolge das beste Modell und als einziges Modell im Vergleich zum gesättigten Modell knapp nicht signifikant (siehe Tabelle 23). Das ADE- und CE-Modell haben im Vergleich zum AE-Modell ähnliche AIC- und P-Werte.

Tab. 24 Midazolam – Verteilung der Variation der $AUC_{(0-\infty)}$ bei vier prüfbar Modellen

Modell	A*	D*	C*	E*
ACE	0,196	-	< 0,001	0,804
ADE	0,006	0,198	-	0,796
AE	0,196	-	-	0,804
CE	-	-	0,162	0,839

* A: additive genetics; D: dominance; C: common environment; E: unique environment

3.2.4.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow

Nach dem von Kalow et al. (1998 und 1999) eingeführten Verfahren lässt sich nach wiederholter Medikamentenapplikation die genetische Komponente ermitteln. Diese basiert auf Berechnung der Standardabweichungen inter- und intraindividuelle Unterschiede pharmakokinetischer Parametern (siehe Kapitel „2.6 Erblchkeitsberechnung“).

Tabelle 25 zeigt für die beiden primären Parameter AUC und Clearance die interindividuellen (SD_b) und intraindividuellen (SD_w) Standardabweichungen und die daraus nach Kalow errechnete genetische Komponente (r_{GC}). Für beide Parameter konnte hier eine erbliche Komponente von 77% bzw. 71% gezeigt werden.

Tab. 25: Midazolam - Standardabweichungen und Heritabilität nach Kalow

	SD_b^*	SD_w^*	r_{GC}^*
$AUC_{(0-\infty)}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{l}$]	120,98	58,02	0,77
Clearance [l/min]	0,1	0,05	0,71

* SD_b : interindividuelle Standardabweichungen; SD_w : intraindividuelle Standardabweichungen; r_{GC} : genetische Komponente

3.2.4.5 Einfluss der Verteilungsfunktion auf die Abschätzung der Erbllichkeit

Da entgegen unserer Erwartung ein deutlicher Unterschied in der berechneten Heritabilität von AUC und Clearance aufgefallen ist, wurden diesbezüglich weitere Berechnungen vorgenommen. Durch die Logarithmierung der Mittelwerte der primären Zielparameter AUC und Clearance und die anschließende Berechnung der Erbllichkeit nach Falconer, Vesell, Kalow und der Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde der Einfluss von extrem hohen und extrem niedrigen Parametern verringert. Tabelle 26 zeigt die Korrelationskoeffizienten bzw. die Standardabweichungen der logarithmierten PK-Parameter sowie die daraus berechnete Heritabilität nach Falconer, Vesell, Kalow und der Strukturgleichungsmodell-Analyse. Für letztere wurde für das zu favorisierende Modell der AIC-, X^2 - und P-Wert sowie die Verteilung auf erbliche und umweltbedingte Einflussfaktoren angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die entsprechenden Angaben der nicht logarithmierten Parameter erneut aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen der Berechnung aus den logarithmierten und nicht logarithmierten Parametern sehr gering sind und die Unterschiede zwischen der Heritabilität der AUC und der Clearance so nicht erklärt werden können. Lediglich bei der Berechnung nach Kalow nähern sich die ohnehin nicht weit auseinanderliegenden Ergebnisse für die Clearance und AUC deutlich an. Daher sind diese Berechnungen nur exemplarisch für die Muttersubstanz und die beiden primären Parameter aufgeführt.

Tab. 26 Midazolam – Abschätzung der Heritabilität auf Basis logarithmierter PK-Parameter

nach Falconer					
	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
$\log AUC_{(0-\text{unendlich})}^*$ [log(mg·min/l)]	0,526	0,017	0,291	0,448	0,471
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [mg·min/l]	0,424	0,063	0,243	0,523	0,362
logClearance* [log(l/min)]	0,624	0,003	0,258	0,503	0,733
Clearance [l/min]	0,662	0,001	0,3	0,433	0,724
nach Vesell					
	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
$\log AUC_{(0-\text{unendlich})}^*$ [log(mg·min/l)]	0,526	0,017	0,291	0,448	0,332
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [mg·min/l]	0,424	0,063	0,243	0,523	0,239
logClearance* [log(l/min)]	0,624	0,003	0,258	0,503	0,494
Clearance [l/min]	0,662	0,001	0,3	0,433	0,517
nach Kalow					
	SD_b		SD_w		r_{GC}
$\log AUC_{(0-\text{unendlich})}^*$ [log(mg·min/l)]	0,1		0,05		0,73
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [mg·min/l]	120,98		58,02		0,77
logClearance* [log(l/min)]	0,1		0,05		0,73
Clearance [l/min]	0,1		0,05		0,71
Strukturgleichungsmodell-Analyse					
	AIC-Wert	X ² -Wert	P-Wert	A	E
$\log AUC_{(0-\text{unendlich})}^*$ [log(mg·min/l)]	-123,7	23,66	0,1	0,307	0,693
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [mg·min/l]	696,6	26,3	0,05	0,196	0,804

* log: Logarithmus zur Basis 10

3.2.5 Hydroxymidazolam

3.2.5.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Hydroxymidazolam sind in Abbildung 10 linear und in Abbildung 11 halblogarithmisch dargestellt. Die Zeitangabe der Abszisse bezieht sich jeweils auf die Zeit seit der Applikation der Muttersubstanz Midazolam.

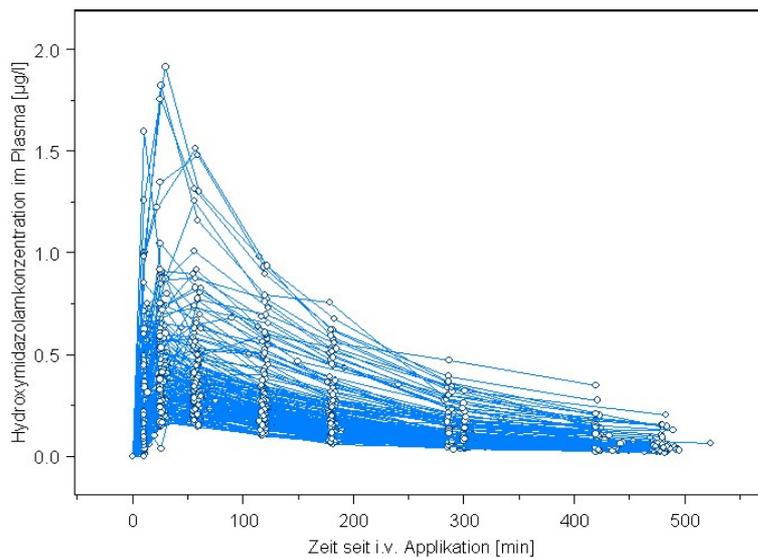


Abb. 10: Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Hydroxymidazolam

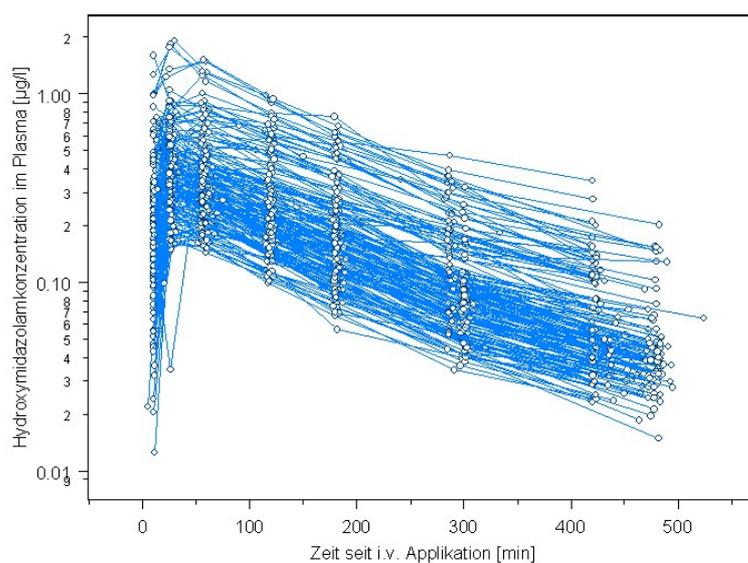


Abb. 11: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Hydroxymidazolam

Zur Veranschaulichung sind in der Abbildung 12 und 13 die Konzentrations-Zeit-Verläufe einzelner Probanden linear über jeweils drei Studientage exemplarisch an drei monozygoten und drei dizygoten Probandenpaaren dargestellt. Wie man sieht, variierten die Konzentrationen von Hydroxymidazolam zwischen den drei Studientagen insgesamt wenig, aber stärker als die entsprechenden Konzentrationen bei Midazolam. Soweit man unmittelbar aus diesen Grafiken erkennen kann, waren die Unterschiede zwischen dizygoten Zwillingen nicht wesentlich größer als zwischen monozygoten Zwillingen.

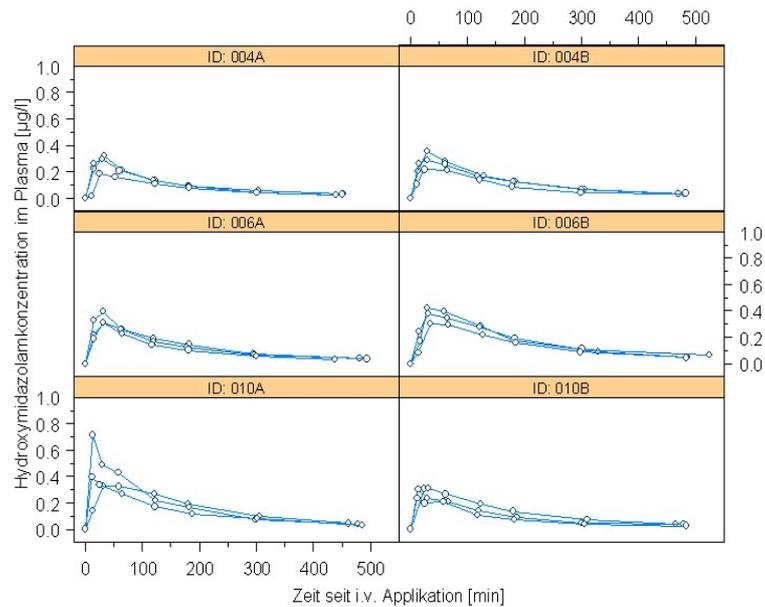


Abb. 12: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf monozygoter Zwillingspaare für Hydroxymidazolam

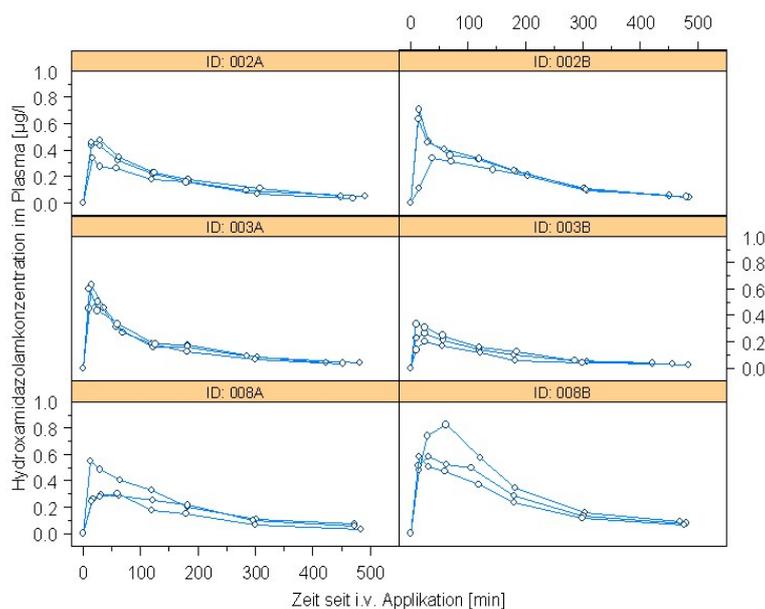


Abb. 13: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf dizygoter Zwillingspaare für Hydroxymidazolam

3.2.5.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse und Metabolitenquotient

Um die individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe zusammenfassend darzustellen, wurden die pharmakokinetischen Parameter zunächst mittels nichtparametrischer Verfahren berechnet.

Die Tabellen 27 und 28 zeigen den Median, den Bereich der Verteilung, die 25. sowie 75. Perzentile sowie die Streuung der pharmakokinetischen Parameter und des Quotienten der $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ von Hydroxymidazolam und Midazolam getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen. Die Streuung der verschiedenen Parameter variiert zwischen 1,9 und 9,2. Es fällt auf, dass die Streuung insgesamt höher ist als bei den entsprechenden Parametern der Muttersubstanz Midazolam.

Tab. 27 Hydroxymidazolam-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei monozygoten Zwillingen

monozygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	40	0,351	0,171	0,842	0,282	0,475	4,9
T_{\max} [min]	40	30,7	14,5	57,0	25,0	37,3	3,9
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	40	66,1	33,9	172	49,9	80,1	5,1
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	40	76,5	41,0	194	58,8	91,8	4,8
Quotient $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ H/M*	40	0,160	0,090	0,620	0,140	0,211	6,9
$t_{1/2}$ [min]	40	159	120	233	145	173	1,9

* H/M: Hydroxymidazolam/Midazolam

Tab. 28 Hydroxymidazolam-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei dizygoten Zwillingen

dizygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	18	0,535	0,180	1,66	0,365	0,837	9,2
T_{\max} [min]	18	35,5	17,0	78,7	20,3	46,7	4,6
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	18	88,7	38,1	287	60,1	184	7,5
$AUC_{(0-\text{unendlich})}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	18	114	45,8	330	68,4	226	7,2
Quotient $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ H/M	18	0,264	0,124	0,541	0,167	0,457	4,4
$t_{1/2}$ [min]	18	165	107	287	133	200	2,7

Die Häufigkeitsverteilungen der $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ in der Gesamtgruppe und in den Untergruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge sind exemplarisch in den folgenden Histogrammen dargestellt (Abbildung 14).

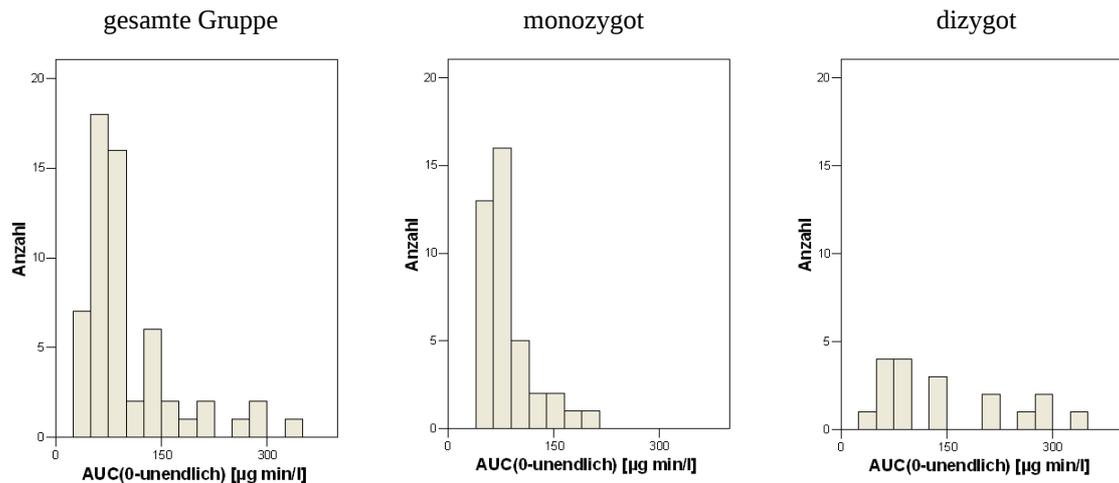


Abb. 14: Histogramme der Verteilung der $AUC_{(0-unendlich)}$ von Hydroxymidazolam

Die Häufigkeitsverteilung der meisten Größen in der vorliegenden Studie wich nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test von der Normalverteilung ab, weshalb in der Präsentation und statistischen Testung meist nichtparametrische Verfahren verwendet wurden.

Die Abbildung 15 veranschaulicht die Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxymidazolam unterschieden nach mono- und dizygoten Zwillingen. Eine hohe Korrelation ist für C_{max} , AUC_{last} , $AUC_{(0-unendlich)}$ sowie den Quotienten aus $AUC_{(0-unendlich)}$ monozygoter Zwillinge sichtbar. Eine niedrige Korrelation findet sich u.a. für die Parameter T_{max} und $t_{1/2}$ monozygoter Zwillinge. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 29 dargestellt.



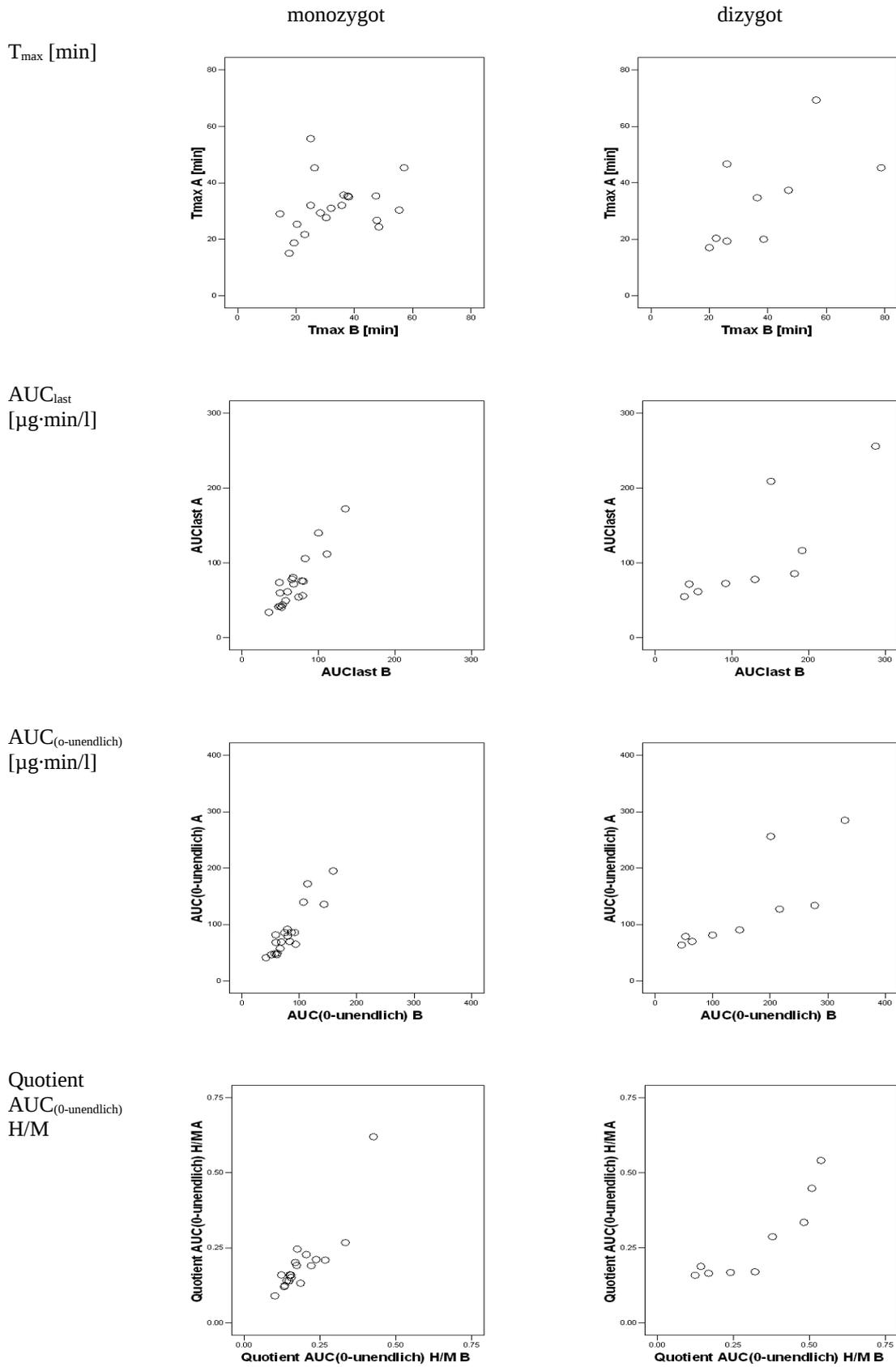




Abb. 15: Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxymidazolam zwischen mono- und dizygoten Zwillingen. Die Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

3.2.5.3 Erblichkeitsberechnung

3.2.5.3.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer

Mittels der Falconer-Formel lässt sich bei bekannten Korrelationskoeffizienten die Heritabilität (h^2) eines Merkmals abschätzen. Tabelle 29 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Es fallen insgesamt höhere Korrelationskoeffizienten als bei den entsprechenden Parametern für Midazolam auf. Eine Erblichkeit wird für die Parameter AUC_{last} und $AUC_{(0-unendlich)}$ geschätzt.

Tab. 29 Hydroxymidazolam - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Nichtparametrische Analyse

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
C_{max} [$\mu\text{g/l}$]	0,871	< 0,001	0,874	0,070	< 0
T_{max} [min]	0,270	n.s.	0,628	0,002	< 0
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	0,900	< 0,001	0,795	0,010	0,211
$AUC_{(0-unendlich)}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	0,901	< 0,001	0,795	0,010	0,213
Quotient $AUC_{(0-unendlich)} H/M$	0,882	< 0,001	0,892	0,001	< 0
$t_{1/2}$ [min]	0,320	n.s.	0,743	0,022	< 0

3.2.5.3.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell

Tabelle 30 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten der AUC und des Quotienten der AUC von Hydroxymidazolam und Midazolam und die daraus mit der Formel nach Vesell errechnete Heritabilität. Hier zeigt sich sowohl für die AUC_{last} als auch die $AUC_{(0-unendlich)}$ eine mehr als doppelt so hohe Heritabilität für die Berechnung nach Vesell im Vergleich

zur Berechnung nach Falconer. Für den Quotienten der AUC hingegen wurde auch nach der Methode von Vesell keine Erblichkeit bestimmt.

Tab. 30 Hydroxymidazolam - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Vesell

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
AUC_{last} [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	0,900	< 0,001	0,795	0,010	0,515
$AUC_{(0\text{-unendlich})}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	0,901	< 0,001	0,795	0,010	0,52
Quotient $AUC_{(0\text{-unendlich})} H/M$	0,882	< 0,001	0,892	0,001	< 0

3.2.5.3.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse

Mittels der Strukturgleichungsmodell-Analyse kann neben den genetischen Faktoren auch der Einfluss weiterer Faktoren auf den Phänotyp berücksichtigt werden (siehe Kapitel „2.6 Erblichkeitsberechnung“). Die Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde für den Parameter $AUC_{(0\text{-unendlich})}$ durchgeführt. Tabelle 31 zeigt den X^2 - und den P-Wert verschiedener Modelle im Vergleich mit dem Gesättigten- (*Saturated*-) Modell sowie den jeweiligen AIC-Wert.

Tab. 31 Hydroxymidazolam – $AUC_{(0\text{-unendlich})}$ - Vergleich jeweils mit Saturated-Modell und AIC

Modell	Chi2	P-Wert	AIC
Saturated	-	-	589,3
ACE	52,5	< 0,001	611,8
ADE	53,2	< 0,001	612,4
AE	53,2	< 0,001	610,4
CE	68,3	< 0,001	625,5

Tabelle 32 zeigt die jeweilige Verteilung der Variation der vier prüfbareren Modellen ACE, ADE, AE und CE. Das zu favorisierende Modell ist das AE-Modell. Es gibt additiven genetischen Faktoren einen Anteil von 95% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 5%. Das AE-Modell ist dem *Akaike information criterion* zufolge das beste Modell, wobei auch das ACE- und ADE-Modell nur geringfügig höhere AIC-Werte aufweisen. Allerdings unterscheiden sich alle Modelle im Vergleich zum gesättigten Modell signifikant von diesem, was hier die Aussagekraft der Strukturgleichungsmodell-Analyse einschränkt.

Tab. 32 Hydroxymidazolam – Verteilung der Variation der $AUC_{(0-\infty)}$ bei vier prüfbar Modellen

Modell	A*	D*	C*	E*
ACE	0,682	-	0,269	0,049
ADE	0,950	< 0,001	-	0,05
AE	0,950	-	-	0,05
CE	-	-	0,785	0,215

* A: additive genetics; D: dominance; C: common environment; E: unique environment

3.2.5.3.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow

Nach dem von Kalow et al. (1998 und 1999) eingeführten Verfahren lässt sich nach wiederholter Medikamentenapplikation auf Basis der Standardabweichungen inter- und intraindividuelle Unterschiede die genetische Komponente ermitteln.

Tabelle 33 zeigt für die AUC und den Quotienten der AUC von Hydroxymidazolam und Midazolam die interindividuellen (SD_b) und intraindividuellen (SD_w) Standardabweichungen und die daraus nach Kalow errechnete genetische Komponente (r_{GC}). Sowohl für die $AUC_{(0-\infty)}$ als auch den Quotienten der $AUC_{(0-\infty)}$ konnte hier eine hohe erbliche Komponente zwischen 93% und 96% gezeigt werden.

Tab. 33: Hydroxymidazolam - Standardabweichungen und Heritabilität nach Kalow

	SD_b^*	SD_w^*	r_{GC}^*
$AUC_{(0-\infty)}$ [$\mu\text{g}\cdot\text{min/l}$]	67,05	13,05	0,96
Quotient $AUC_{(0-\infty)}$ H/M	0,13	0,03	0,93

* SD_b : interindividuelle Standardabweichungen; SD_w : intraindividuelle Standardabweichungen; r_{GC} : genetische Komponente

3.3 Koffein als Indikator für CYP1A2-Aktivität

3.3.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe

Den Probanden wurde wie in Kapitel „2.1.7 Studienablauf“ beschrieben zu fest definierten Zeitpunkten im Anschluss an die Applikation der Studienmedikation Blut entnommen. Aus diesen Blutproben wurde u.a. die Plasmakonzentration von Koffein und des Metaboliten Paraxanthin mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und tandemmassenspektrometrischer Analyse bestimmt. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Koffein sind in Abbildung 16 linear und in Abbildung 17 halblogarithmisch dargestellt.

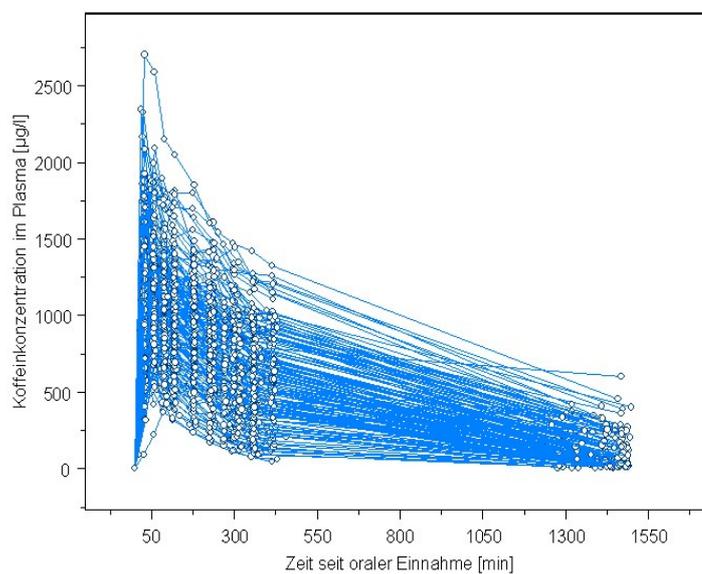


Abb. 16: Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Koffein

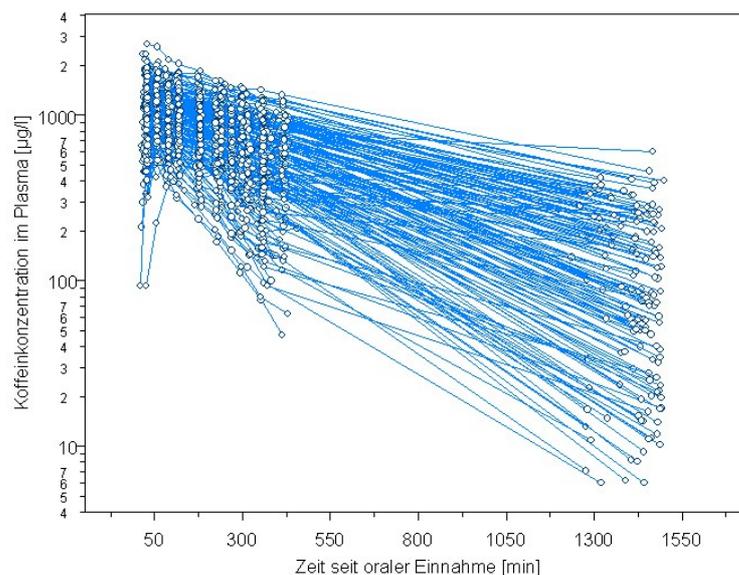


Abb. 17: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Koffein

Zur Veranschaulichung sind in der Abbildung 18 und 19 die Konzentrations-Zeit-Verläufe einzelner Probanden linear über jeweils drei Studientage exemplarisch an drei monozygoten und drei dizygoten Probandenpaaren dargestellt. Es fällt zunächst eine deutliche intraindividuelle Variabilität zwischen den Studientagen, aber auch eine interindividuelle Variabilität auf. Allerdings lassen diese Grafiken unmittelbar keinen wesentlich größeren Unterschied zwischen dizygoten Zwillingen als zwischen monozygoten Zwillingen erkennen.

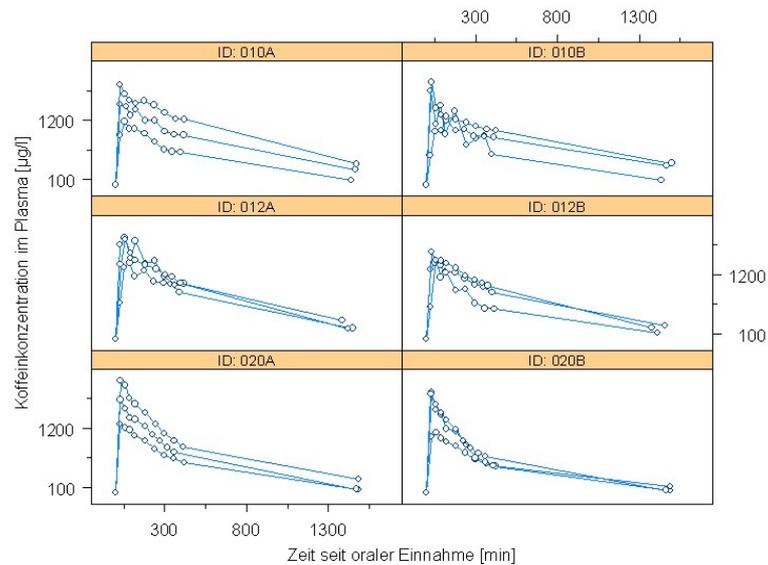


Abb. 18: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf monozygoter Zwillingspaare für Koffein

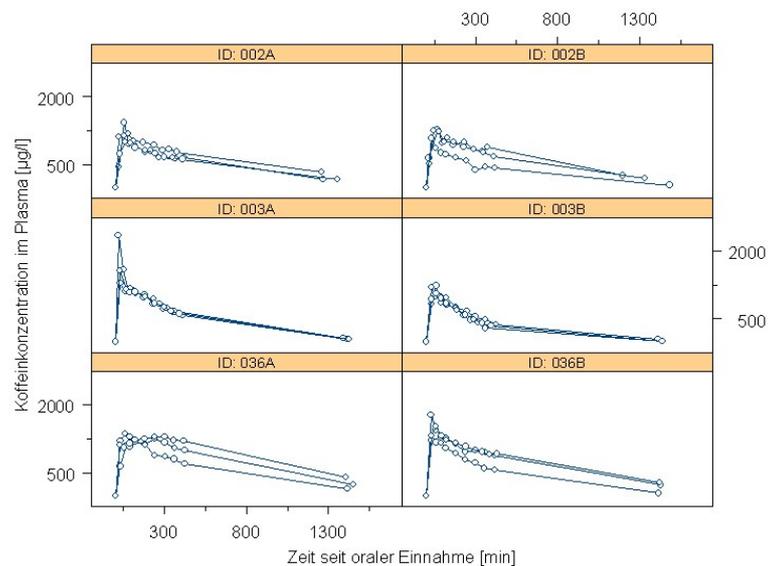


Abb. 19: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf dizygoter Zwillingspaare für Koffein

Zur Veranschaulichung der intraindividuellen Variabilität zwischen den drei Studientagen ist in Abbildung 20 die Höhe des primären Zielparameters Clearance/F aus der Modellanpassung dargestellt. Bei einigen Probanden konnten durch die Modellanpassung nicht für alle Studientage hinreichend präzise die Clearance/F bestimmt werden. Konnte diese für zwei oder drei Studientage bestimmt werden, sind die Messpunkte jeweils eines Probanden verbunden. Bei einigen Probanden fällt eine deutliche intraindividuelle Variabilität in der Höhe der Clearance zwischen den Studientagen auf.

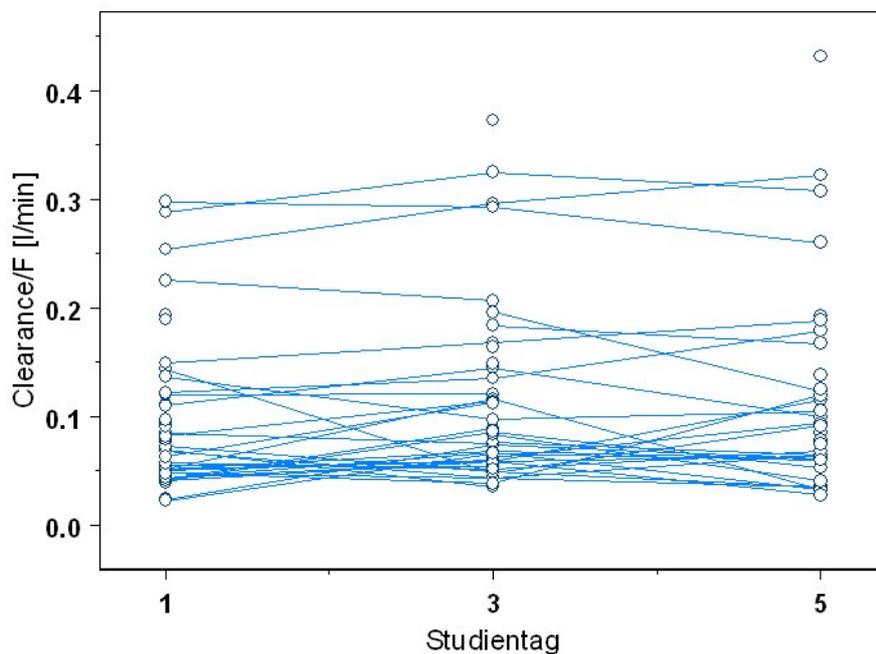


Abb. 20: Vergleich der Clearance zwischen den Studientagen für Koffein

3.3.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse

Um die individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe zusammenfassend darzustellen, wurden die pharmakokinetischen Parameter zunächst mittels nichtparametrischer Verfahren berechnet. Im Gegensatz zu Midazolam und Hydroxymidazolam konnten für Koffein und dessen Metaboliten Paraxanthin weniger pharmakokinetische Parameter berechnet werden. Dies ist einerseits durch die orale Gabe des Koffeins und andererseits durch die Nachbeobachtungszeit von 24 Stunden bedingt, während der meist kein Abfall der Koffein- bzw. Paraxanthinplasmakonzentration unter die Nachweisgrenze beobachtet werden konnte. Letzteres verhindert eine sinnvolle Berechnung der terminalen Halbwertszeit.

Die Tabellen 34 und 35 zeigen den Median, den Bereich der Verteilung, die 25. sowie 75. Perzentile und die Streuung der für Koffein bestimmten nichtparametrischen pharmakoki-

netischen Parameter. Die Darstellung erfolgt auch hier getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen. Die Streuung liegt insgesamt zwischen 2,4 und 7,8 und befindet sich bei beiden Gruppen in einem ähnlichen Bereich, wobei die etwas stärkere Streuung von 7,6 bzw. 7,8 in den beiden Gruppen bei jeweils unterschiedlichen Parametern auffällt. Die Werte der monozygoten Zwillinge streuen relativ stark bei der $AUC_{(1-1200)}$, wohingegen die dizygoten Zwillinge stärker bei T_{max} streuen.

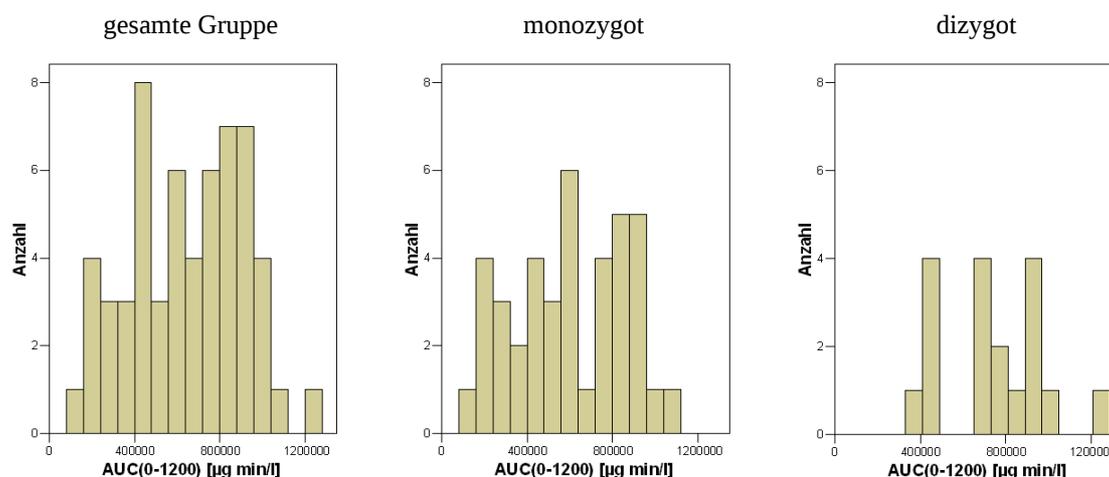
Tab. 34 Koffein-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei monozygoten Zwillingen

monozygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{max} [$\mu\text{g/l}$]	40	1216	668	1984	909	1407	3,0
T_{max} [min]	40	46,0	28,7	117,0	37,2	64,3	4,1
$AUC_{(1-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	40	607	137	1047	398	815	7,6

Tab. 35 Koffein-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei dizygoten Zwillingen

dizygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{max} [$\mu\text{g/l}$]	18	1372	822	1958	1151	1663	2,4
T_{max} [min]	18	50,5	25,7	200,3	40,5	62,3	7,8
$AUC_{(1-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	18	758	386	1218	438	936	3,2

Die Häufigkeitsverteilungen der $AUC_{(0-1200)}$ in der Gesamtgruppe und in den Untergruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge sind exemplarisch in den folgenden Histogrammen dargestellt (Abbildung 21).

Abb. 21: Histogramme der Verteilung der $AUC_{(0-1200)}$ von Koffein

Die Häufigkeitsverteilung der meisten Größen in der vorliegenden Studie wich nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test von der Normalverteilung ab, weshalb in der Präsentation und statistischen Testung meist nichtparametrische Verfahren verwendet wurden.

Die Abbildung 22 zeigt die Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Koffein unterschieden nach mono- und dizygoten Zwillingen. Hier ist sichtbar, dass sowohl bei den mono- als auch dizygoten Zwillingen die Korrelation bei C_{\max} und $AUC_{(0-1200)}$ relativ hoch ist. Für den Parameter T_{\max} hingegen ist sie für beide Gruppe relativ niedrig. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 38 dargestellt.

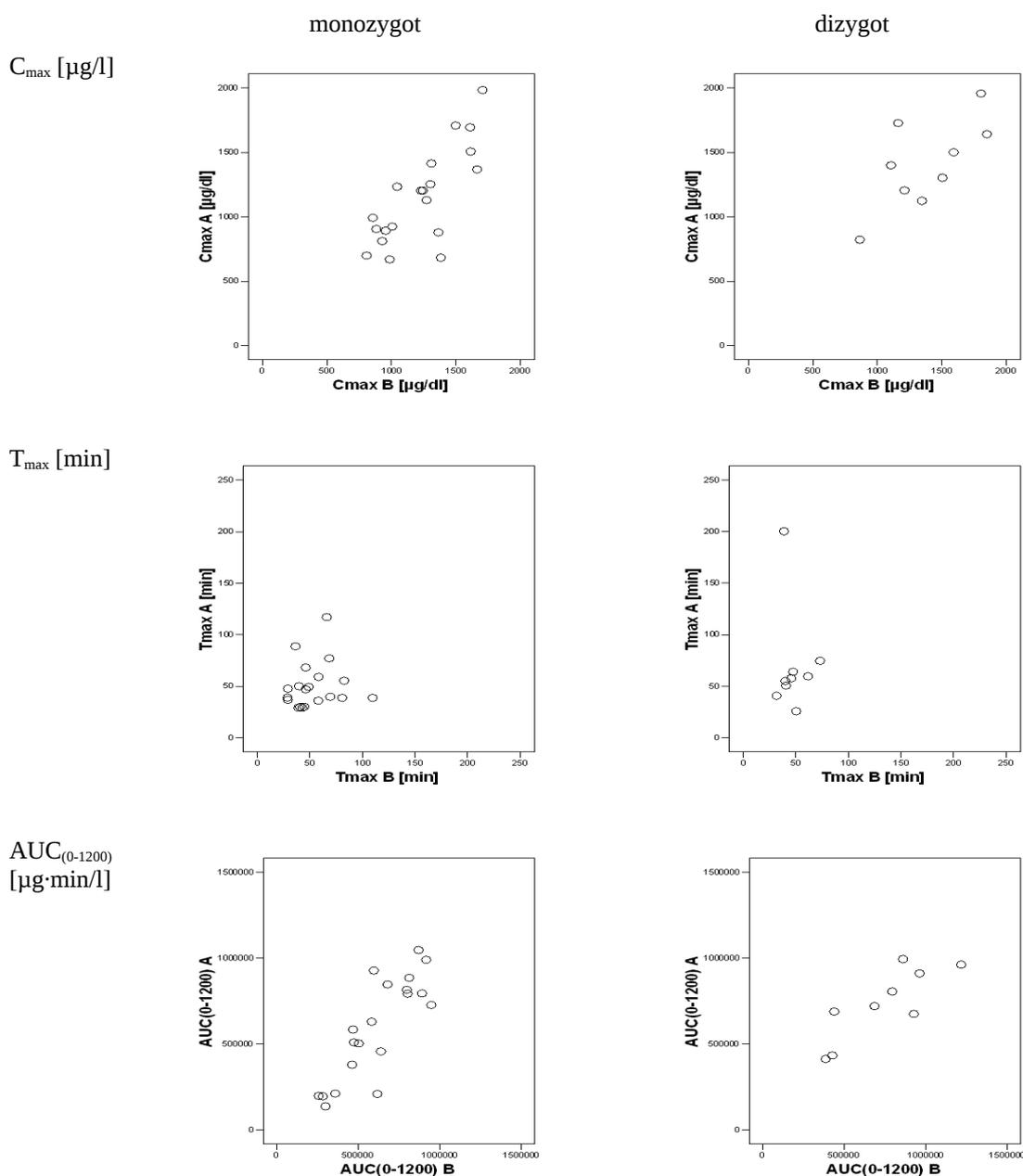


Abb. 22: Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Koffein zwischen mono- und dizygoten Zwillingen

3.3.3 PK-Parameter: Modellanpassung

Um typische bekannte pharmakokinetische Parameter zu bestimmen, wurde eine Modellanpassung der Messwerte an unterschiedliche Funktionen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Koffein durch ein 1-Kompartiment Modell in den meisten Fällen gut zu beschreiben waren. Die Parameter wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse bestimmt. Dabei erwies sich für die Gewichtung der Differenzen zwischen Modellvoraussage und Messwert die Wichtungsfunktion in Form von „1/Konzentration“ als die Beste. Dies wurde daran gemessen, dass damit bei der größten Zahl der Probanden die Parameter hinreichend präzise bestimmt werden konnten. Ein typisches Bild einer Kurvenanpassung – auf Basis derer die Modellanalyse erfolgt ist – ist exemplarisch für einen Probanden in Abb. 23 dargestellt.

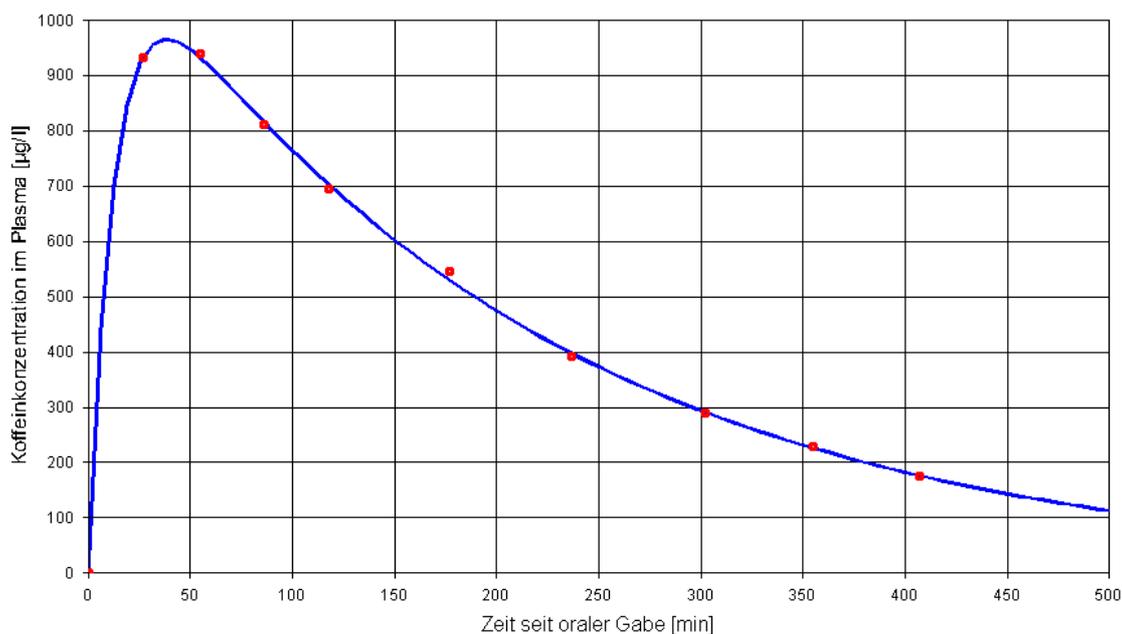


Abb. 23: Exemplarische Kurvenanpassung für Koffein. Die Punkte zeigen die Messwerte, die Kurve stellt die als optimal für die Anpassung des Konzentrationsabfalles ermittelte Funktion dar.

Das 1-Kompartiment Modell ist bei oraler Dosierung durch die drei Parameter Absorptionshalbwertszeit (Absorptions- $t_{1/2}$), Eliminationshalbwertszeit ($t_{1/2}$) und das Verteilungsvolumen (V) beschrieben. Das Verteilungsvolumen wird zusätzlich bezogen auf das Körpergewicht (KG) angegeben. Außerdem ist die Clearance berechenbar. Sowohl Verteilungsvolumen als auch Clearance sind bei oraler Dosierung nur in Abhängigkeit von der Bioverfügbarkeit (F) bestimmbar und werden als V/F bzw. $\text{Clearance}/F$ angegeben. Die Bioverfügbarkeit ist nur durch den Vergleich sowohl oraler als auch intravenöser Applikation be-

stimmbar. Dies ist im Rahmen dieser Studie nicht erfolgt und es wird daher auf Literaturangaben zurückgegriffen. Da die Bioverfügbarkeit von Koffein nahezu 100% beträgt (Kot und Daniel 2008), ist V/F eine gute Abschätzung des Verteilungsvolumens bzw. $Clearance/F$ eine gute Abschätzung der Clearance.

Tabellen 36 und 37 zeigen den Median, den Bereich der Verteilung, die 25. sowie 75. Perzentile und die Streuung der pharmakokinetischen Parameter der Modellanpassung getrennt nach mono- und dizygoten Zwillingen. Es fällt auf, dass die Werte der pharmakokinetischen Parameter in der Gruppe der monozygoten Zwillinge stärker streut (zwischen 2,1 und 10,3) als in der Gruppe der dizygoten Zwillinge (zwischen 1,8 und 4,9). Die stärkste Streuung findet sich bei den Parametern $t_{1/2}$ (7,5) und $Clearance/F$ (10,3) in der Gruppe der monozygoten Zwillinge.

Tab. 36 Koffein-PK-Modellanpassung: Deskriptive Statistik bei monozygoten Zwillingen

monozygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
$t_{1/2}$ [min]	40	321	97,6	735	226	457	7,5
Clearance/F [l/min]	40	0,086	0,042	0,431	0,061	0,157	10,3
V/F^* [l]	40	39,7	25,5	68,7	33,3	50,9	2,7
$V/F \cdot KG^{-1}$ [l/kg]	40	0,62	0,38	0,81	0,54	0,67	2,1

* F: orale Bioverfügbarkeit; KG: Körpergewicht

Tab. 37 Koffein-PK-Modellanpassung: Deskriptive Statistik bei dizygoten Zwillingen

dizygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
$t_{1/2}$ [min]	18	377	167	621	215	505	3,7
Clearance/F [l/min]	18	0,064	0,040	0,168	0,054	0,121	4,2
V/F [l]	18	34,8	22,9	52,1	30,0	41,1	2,3
$V/F \cdot KG^{-1}$ [l/kg]	18	0,55	0,41	0,75	0,48	0,61	1,8

Die Abbildung 24 zeigt die Korrelation der pharmakokinetischen Parameter der Modellanpassung von Koffein unterschieden nach mono- und dizygoten Zwillingen. Eine deutliche Korrelation fällt bei der Clearance/F monozygoter Zwillinge und V/F dizygoter Zwillinge im Vergleich zur jeweils anderen Gruppe auf. Die entsprechenden Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 39 dargestellt.

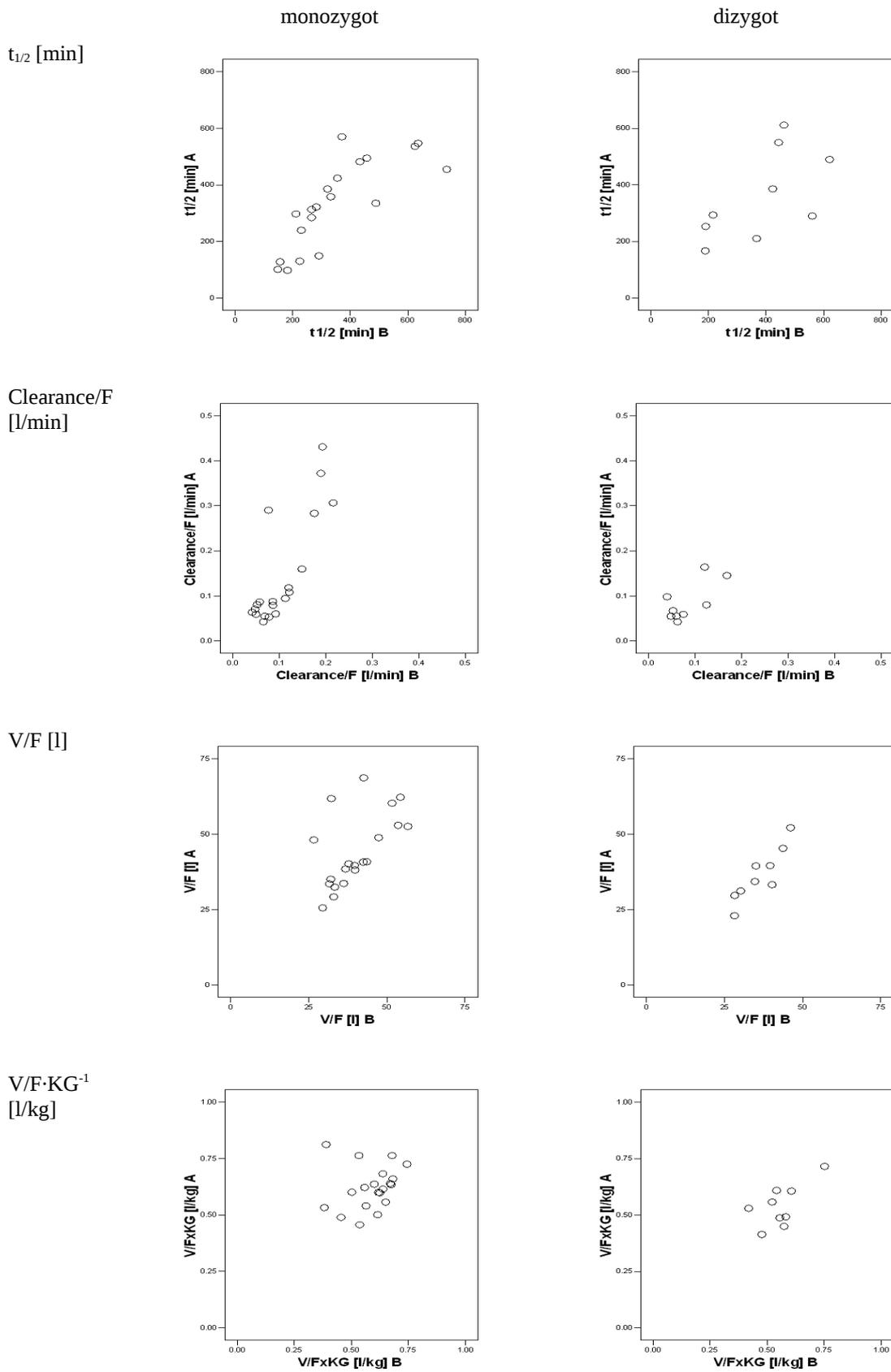


Abb. 24: Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Koffein zwischen mono- und dizygoten Zwillingen

3.3.4 Erblchkeitsberechnung

3.3.4.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer

Mittels der Falconer-Formel lässt sich bei bekannten Korrelationskoeffizienten die Heritabilität eines Merkmals abschätzen (siehe Kapitel „2.6 Erblchkeitsberechnung“).

3.3.4.1.1 Nichtparametrische PK-Analyse

Tabelle 38 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten der nichtparametrischen PK-Analyse und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Der höchste Wert wird dabei für den Parameter T_{\max} geschätzt (0,468), der allerdings auf nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten beruht. Für die Parameter C_{\max} und $AUC_{(0-1200)}$ wird eine geringe (0,16) bzw. sehr geringe (0,027) Heritabilität geschätzt.

Tab. 38 Koffein - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Nichtparametrische PK-Analyse

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	0,769	< 0,001	0,689	0,04	0,16
T_{\max} [min]	0,124	n.s.	-0,110	n.s.	0,468
$AUC_{(0-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	0,837	< 0,001	0,824	0,006	0,027

3.3.4.1.2 PK-Analyse mit Modellanpassung

Tabelle 39 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten der PK-Analyse mit Modellanpassung und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Eine gewisse Erblchkeit lässt sich für die Clearance/F (0,215) und die Halbwertszeit (0,339) abschätzen.

Tab. 39 Koffein - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Modellanpassung

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
$t_{1/2}$ [min]	0,782	< 0,001	0,613	0,08	0,339
Clearance/F [l/min]	0,819	< 0,001	0,711	0,032	0,215
V/F [l]	0,587	0,007	0,892	0,001	< 0
V/F·KG ⁻¹ [l/kg]	0,180	n.s.	0,648	0,06	< 0

3.3.4.1.3 Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Neben der Abschätzung der Heritabilität nach Falconer auf Basis der Pearson-Korrelationskoeffizienten wurde außerdem für die Hauptzielgrößen AUC und Clearance eine Berechnung auf Basis der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Tabelle 40 zeigt die jeweiligen Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten, den P-Wert und die daraus

mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Die für die $AUC_{(0-1200)}$ geschätzte Heritabilität beträgt lediglich 8,5% und ist damit wie die auf Basis der Pearson-Korrelationskoeffizienten geschätzten Heritabilität ebenfalls sehr niedrig. Für die Clearance/F hingegen ergab sich hier eine deutlich höhere Heritabilität von 65%. Die für die AUC und für die Clearance errechnete Heritabilität unterscheidet sich damit erheblich.

Tab. 40 Koffein - Rangkorrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Nichtparametrische PK-Analyse

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
$AUC_{(0-1200)}$ [mg·min/l]	0,792	< 0,001	0,75	0,02	0,085
Clearance/F [l/min]	0,741	< 0,001	0,417	0,265	0,649

3.3.4.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell

Tabelle 41 zeigt die jeweiligen Pearson-Korrelationskoeffizienten des primären Parameters Clearance/F und der AUC und die daraus mit der Formel nach Vesell errechnete Heritabilität. Hier zeigt sich ähnlich wie bereits bei der Berechnung nach Falconer ein deutlicher Unterschied in der Höhe der berechneten Heritabilität zwischen der AUC und der Clearance/F. Für beide Größen konnte nach Vesell eine etwas höhere Heritabilität als nach der Methode von Falconer berechnet werden.

Tab. 41 Koffein - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Vesell

	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
$AUC_{(0-1200)}$ [mg·min/l]	0,837	< 0,001	0,824	0,006	0,076
Clearance/F [l/min]	0,819	< 0,001	0,711	0,032	0,372

3.3.4.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse

Mittels der Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde neben den genetischen Faktoren auch der Einfluss weiterer Faktoren auf den Phänotyp geschätzt (siehe Kapitel „2.6 Erblichkeitsberechnung“). Das ADCE-Modell berücksichtigt additive genetische Faktoren (A), gemeinsame Umweltfaktoren (C), nicht gemeinsame Umweltfaktoren (E) und nicht additive dominante genetische Effekte (D). Die Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde für den Parameter $AUC_{(0-1200)}$ durchgeführt.

Tabelle 42 zeigt den X^2 - und den P-Wert verschiedener Modelle im Vergleich mit dem Gesättigten- (*Saturated*-) Modell sowie den jeweiligen AIC-Wert.

Tab. 42 Koffein - $AUC_{(0-1200)}$ - Vergleich jeweils mit Saturated-Modell und AIC

Modell	Chi2	P-Wert	AIC
Saturated	-	-	1581,87
ACE	25,4	0,044	1577,31
ADE	29,9	0,012	1581,76
AE	29,9	0,019	1579,76
CE	25,4	0,062	1575,31

Tabelle 43 zeigt die jeweilige Verteilung der Variation der vier prüfbar Modellen ACE, ADE, AE und CE. Das hier zu favorisierende Modell ist das CE-Modell, das keine erblichen sondern nur umweltbedingte Einflussfaktoren beinhaltet. Es gibt gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 70% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 30%. Das CE-Modell ist dem *Akaike information criterion* zufolge das beste Modell und ist außerdem im Vergleich zum gesättigten Modell als einziges knapp nicht signifikant.

Tab. 43 Koffein – Verteilung der Variation der $AUC_{(0-1200)}$ bei vier prüfbar Modellen

Modell	A*	D*	C*	E*
ACE	< 0,001	-	0,693	0,307
ADE	0,702	< 0,001	-	0,298
AE	0,702	-	-	0,298
CE	-	-	0,698	0,302

* A: additive genetics; D: dominance; C: common environment; E: unique environment

3.3.4.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow

Nach dem von Kalow et al. (1998 und 1999) eingeführten Verfahren lässt sich nach wiederholter Medikamentenapplikation eine genetische Komponente ermitteln. Diese basiert auf Berechnung der Standardabweichungen inter- und intraindividuelle Unterschiede pharmakokinetischer Parametern (siehe Kapitel „2.6 Erblichkeitsberechnung“). Tabelle 44 zeigt für den primären Parameter AUC die interindividuelle (SD_b) und intraindividuelle (SD_w) Standardabweichung und die daraus nach Kalow errechnete genetische Komponente (r_{GC}). Für die $AUC_{(0-1200)}$ konnte hier eine erbliche Komponente von 81% und für die Clearance von 93% gezeigt werden.

Tab. 44: Koffein - Standardabweichungen und Heritabilität nach Kalow

	SD_b^*	SD_w^*	r_{GC}^*
$AUC_{(0-1200)}$ [mg·min/l]	285	123	0,81
Clearance/F [l/min]	0,08	0,02	0,93

* SD_b : interindividuelle Standardabweichungen; SD_w : intraindividuelle Standardabweichungen; r_{GC} : genetische Komponente

3.3.4.5 Einfluss der Verteilungsfunktion auf die Abschätzung der Erbllichkeit

Da entgegen unserer Erwartung ein deutlicher Unterschied in der berechneten Heritabilität der Clearance und der AUC aufgefallen ist, wurden diesbezüglich weitere Berechnungen vorgenommen. Durch die Logarithmierung der Mittelwerte der primären Zielparameter AUC und Clearance und die anschließende Berechnung der Erbllichkeit nach Falconer, Vesell und Kalow wurde der Einfluss von extrem hohen und extrem niedrigen Parametern verringert. Tabelle 45 zeigt die Korrelationskoeffizienten bzw. die Standardabweichungen der logarithmierten PK-Parameter sowie die daraus berechnete Heritabilität nach Falconer, Vesell und Kalow. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die entsprechenden Angaben der nicht logarithmierten Parameter erneut aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Unterschiede zwischen der Berechnung aus den logarithmierten und den nicht logarithmierten Parametern sehr gering sind und die Unterschiede zwischen der Heritabilität der AUC und der Clearance so nicht erklärt werden können. Daher sind diese Berechnungen nur exemplarisch für die Muttersubstanz Koffein und die beiden primären Parameter aufgeführt.

Tab. 45 Koffein – Abschätzung der Heritabilität auf Basis logarithmierter PK-Parameter

nach Falconer					
	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
logAUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ * [log(mg·min/l)]	0,853	< 0,001	0,849	0,004	0,008
AUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ [mg·min/l]	0,834	< 0,001	0,824	0,006	0,027
logClearance/F [log(l/min)]	0,784	< 0,001	0,616	0,077	0,335
Clearance/F [l/min]	0,819	< 0,001	0,711	0,032	0,215
nach Vesell					
	r_{MZ}	P-Wert	r_{DZ}	P-Wert	Heritabilität
logAUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ * [log(mg·min/l)]	0,853	< 0,001	0,849	0,004	0,026
AUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ [mg·min/l]	0,834	< 0,001	0,824	0,006	0,076
logClearance/F [log(l/min)]	0,784	< 0,001	0,616	0,077	0,436
Clearance/F [l/min]	0,819	< 0,001	0,711	0,032	0,372
nach Kalow					
	SD_b		SD_w		r_{GC}
logAUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ [log(mg·min/l)]	0,23		0,08		0,88
AUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ [mg·min/l]	285		123		0,81
logClearance/F [log(l/min)]	0,28		0,12		0,83
Clearance/F [l/min]	0,08		0,02		0,93

* log: Logarithmus zur Basis 10

3.3.5 Paraxanthin

3.3.5.1 Konzentrations-Zeit-Verläufe

Die Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Paraxanthin sind in Abbildung 25 linear und in Abbildung 26 halblogarithmisch dargestellt. Die Zeitangabe der Abszisse bezieht sich jeweils auf die Zeit seit der oralen Einnahme der Muttersubstanz Koffein.

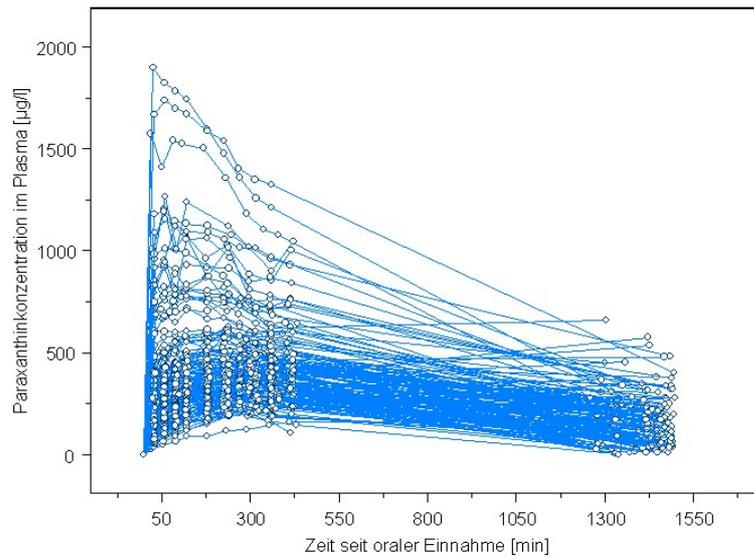


Abb. 25: Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Paraxanthin

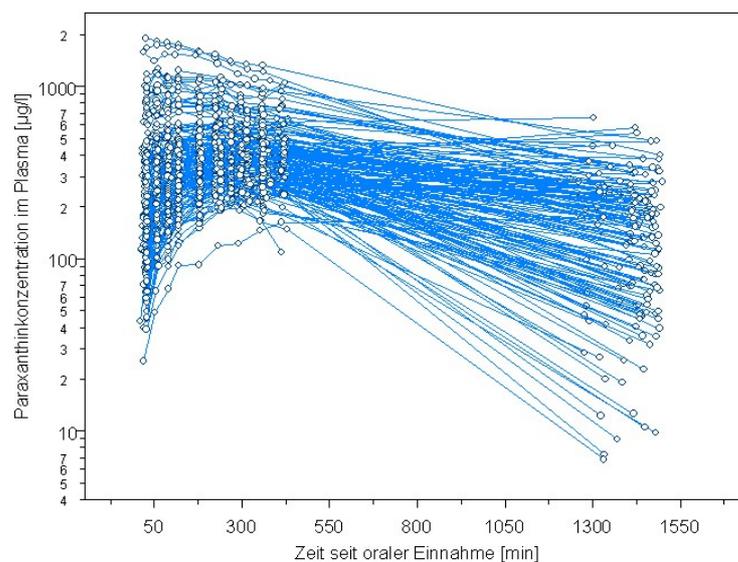


Abb. 26: Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Verläufe aller Probanden für Paraxanthin

Zur Veranschaulichung sind in der Abbildung 27 und 28 die Konzentrations-Zeit-Verläufe einzelner Probanden linear über jeweils drei Studientage exemplarisch an drei monozygoten und drei dizygoten Probandenpaaren dargestellt. Wie bereits bei den entsprechenden Grafiken der Muttersubstanz Koffein fällt auch hier eine relativ hohe intraindividuelle Variabilität zwischen den einzelnen Studientagen auf. Auch zwischen den Geschwistern sowohl der monozygoten als auch dizygoten Zwillinge gibt es teilweise deutliche Unterschiede im Konzentrationsverlauf.

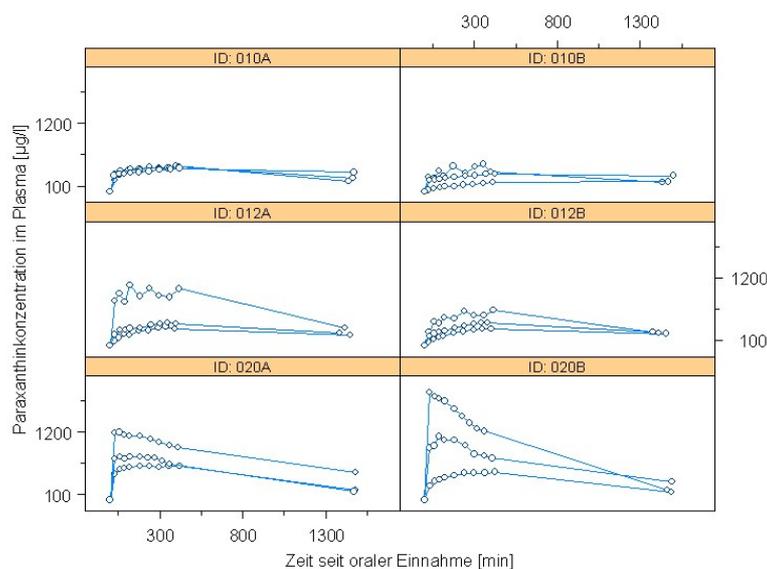


Abb. 27: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf monozygoter Zwillingspaare für Paraxanthin

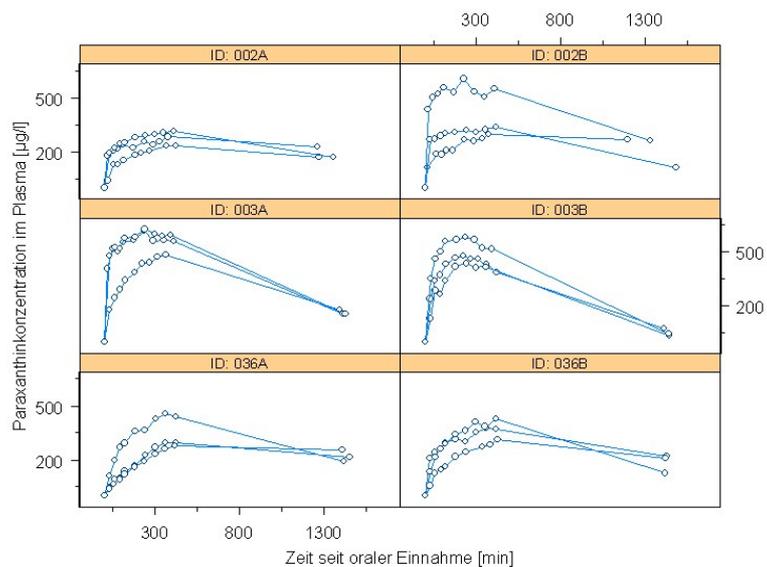


Abb. 28: Exemplarischer Konzentrations-Zeit-Verlauf dizygoter Zwillingspaare für Paraxanthin

3.3.5.2 PK-Parameter: Nichtparametrische Analyse und Metabolitenquotient

Um die individuellen Konzentrations-Zeit-Verläufe zusammenfassend darzustellen, wurden die pharmakokinetischen Parameter zunächst mittels nichtparametrischer Verfahren berechnet. Wie bereits im entsprechenden Kapitel zur Muttersubstanz Koffein beschrieben, konnten für Koffein und Paraxanthin im Gegensatz zu Midazolam und Hydroxymidazolam weniger pharmakokinetische Parameter bestimmt werden.

Die Tabellen 46 und 47 zeigen den Median, den Bereich der Verteilung, die 25. sowie 75. Perzentile und die Streuung der für Paraxanthin bestimmten nichtparametrischen pharmakokinetischen Parameter sowie des Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein. Die Darstellung erfolgt getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen. Die Streuung unterscheidet sich zwischen den beiden Gruppen teilweise erheblich. Die Streuung in der Gruppe der dizygoten Zwillinge liegt zwischen 3,3 und 3,8. Die Streuung in der Gruppe der monozygoten Zwillinge ist deutlich höher. Drei Parameter streuen im Bereich 5,0 bis 5,7 und ein Parameter (T_{max}) mit 27,5 deutlich höher.

Tab. 46 Paraxanthin-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei monozygoten Zwillingen

monozygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{max} [$\mu\text{g/l}$]	40	403	246	1390	330	451	5,7
T_{max} [min]	40	278	38,0	1045	198	400	27,5
$AUC_{(0-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	40	376	175	946	277	417	5,4
Quotient $AUC_{(0-1200)}$ P/K*	40	0,721	0,308	1,53	0,445	0,966	5,0

* P/K: Paraxanthin/Koffein

Tab. 47 Paraxanthin-PK nichtparametrisch: Deskriptive Statistik bei dizygoten Zwillingen

dizygot	Anzahl	Median	Minimum	Maximum	25. Perz.	75. Perz.	Streuung
C_{max} [$\mu\text{g/l}$]	18	536	276	1023	368	711	3,7
T_{max} [min]	18	263	121	404	172	352	3,3
$AUC_{(0-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	18	486	254	876	342	591	3,4
Quotient $AUC_{(0-1200)}$ P/K	18	0,706	0,327	1,23	0,450	0,915	3,8

Die Häufigkeitsverteilungen der $AUC_{(0-1200)}$ in der Gesamtgruppe und in den Untergruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge sind exemplarisch in den folgenden Histogrammen dargestellt (Abbildung 29).

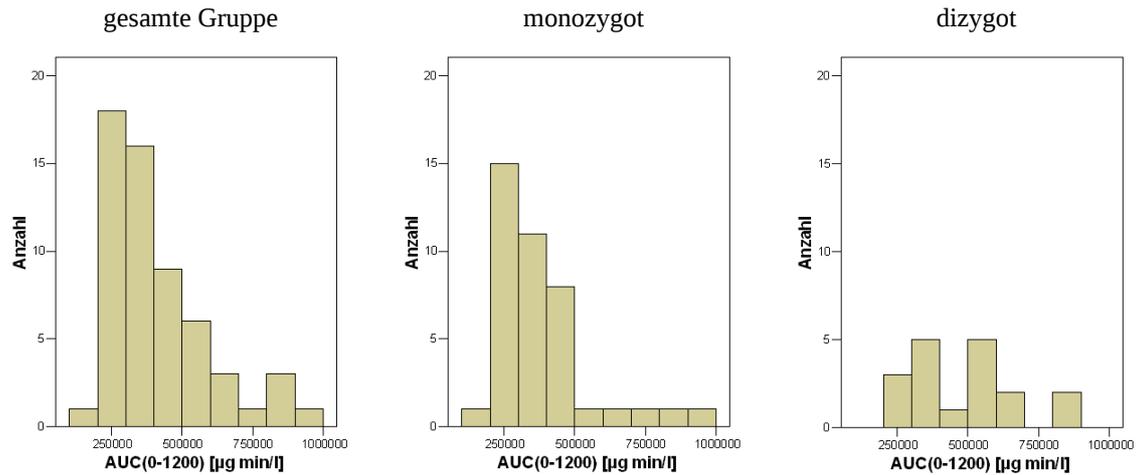


Abb. 29: Histogramme der Verteilung der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin

Die Häufigkeitsverteilung der meisten Größen in der vorliegenden Studie wich nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test von der Normalverteilung ab, weshalb in der Präsentation und statistischen Testung meist nichtparametrische Verfahren verwendet wurden.

Die Abbildung 30 zeigt die Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Paraxanthin unterschieden nach mono- und dizygoten Zwillingen. Eine Korrelation fällt v.a. für die Parameter T_{max} und den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ sowohl für mono- als auch dizygoten Zwillinge auf. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist anhand dieser Grafiken nicht auszumachen. Vergleiche hierzu auch die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 48.

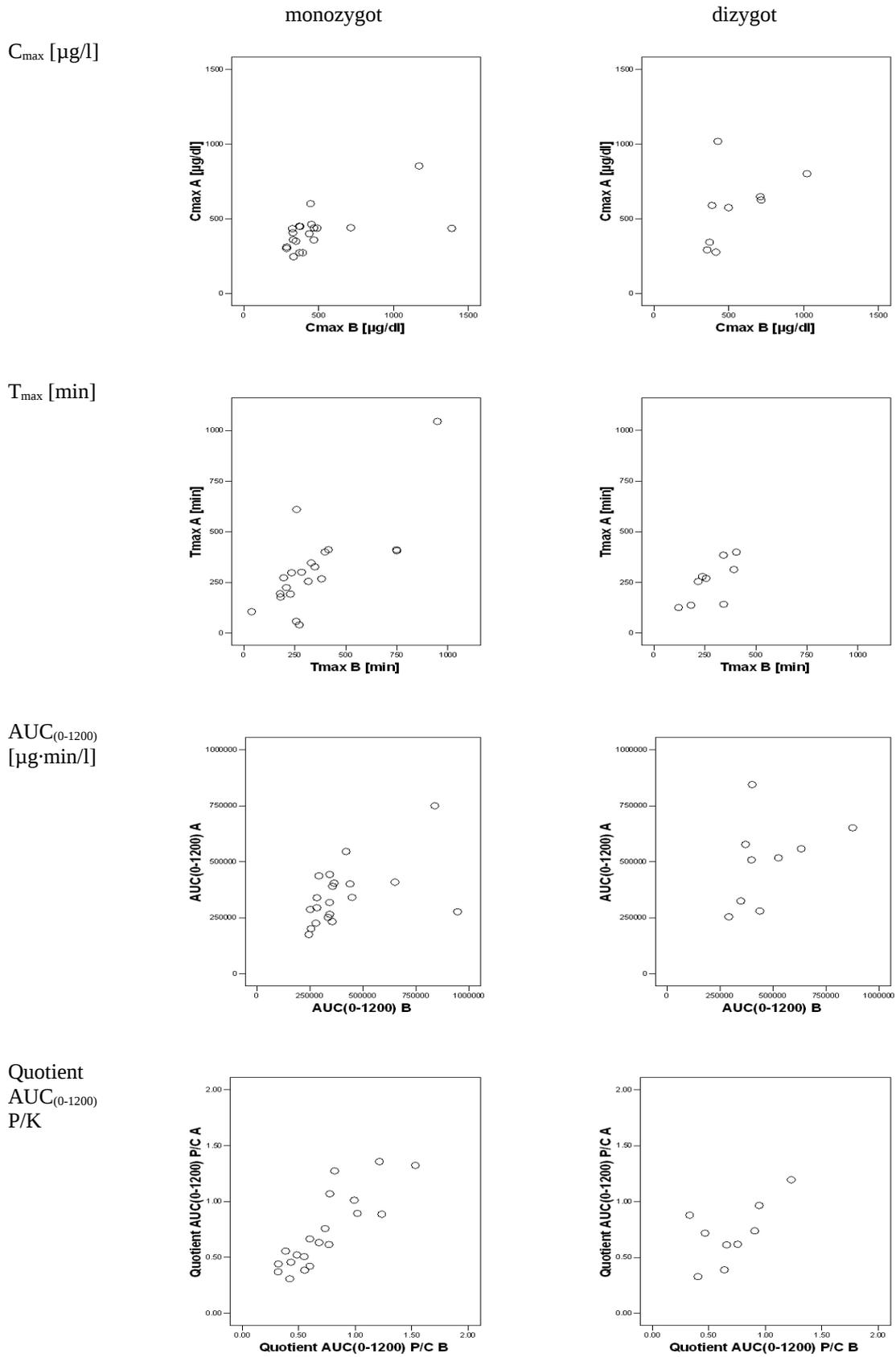


Abb. 30: Korrelation der pharmakokinetischen Parameter von Paraxanthin zwischen mono- und dizygoten Zwillingen

3.3.5.3 Erblchkeitsberechnung

3.3.5.3.1 Abschätzung der Heritabilität nach Falconer

Mittels der Falconer-Formel lässt sich bei bekannten Korrelationskoeffizienten die Heritabilität (h^2) eines Merkmals abschätzen. Tabelle 48 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten und die daraus mit der Falconer-Formel errechnete Heritabilität. Für alle Parameter kann hier eine gewisse Heritabilität geschätzt werden.

Tab. 48 Paraxanthin - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Falconer: Nichtparametrische PK-Analyse

	r_{Mz}	P-Wert	r_{Dz}	P-Wert	Heritabilität
C_{max} [$\mu\text{g/l}$]	0,579	0,007	0,468	n.s.	0,223
T_{max} [min]	0,745	< 0,001	0,696	0,037	0,096
$AUC_{(0-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	0,487	0,029	0,406	n.s.	0,162
Quotient $AUC_{(0-1200)}$ P/K	0,846	< 0,001	0,622	0,074	0,448

3.3.5.3.2 Abschätzung der Heritabilität nach Vesell

Tabelle 49 zeigt die jeweiligen Korrelationskoeffizienten der AUC und des Quotienten der AUC von Paraxanthin und Koffein und die daraus mit der Formel nach Vesell errechnete Heritabilität. Hier konnte eine ähnlich hohe Heritabilität wie bei der Berechnung nach Falconer bestimmt werden, wobei die Heritabilität der AUC etwas niedriger und die des Quotienten der AUC etwas höher als nach Falconer bestimmt wurde.

Tab. 49 Paraxanthin - Korrelationskoeffizienten und Heritabilität nach Vesell

	r_{Mz}	P-Wert	r_{Dz}	P-Wert	Heritabilität
$AUC_{(0-1200)}$ [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]	0,487	0,029	0,406	n.s.	0,136
Quotient $AUC_{(0-1200)}$ P/K	0,846	< 0,001	0,622	0,074	0,592

3.3.5.3.3 Strukturgleichungsmodell-Analyse

Mittels der Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde neben den genetischen Faktoren auch der Einfluss weiterer Faktoren auf den Phänotyp geschätzt (siehe Kapitel „2.6 Erblchkeitsberechnung“). Die Strukturgleichungsmodell-Analyse wurde sowohl für den Parameter $AUC_{(0-1200)}$ als auch für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein durchgeführt. Tabelle 50 zeigt für den Parameter $AUC_{(0-1200)}$ den X^2 - und den P-Wert der verschiedenen Modelle im Vergleich mit dem Gesättigten- (*Saturated*-) Modell sowie den jeweiligen AIC-Wert.

Tab. 50 Paraxanthin - $AUC_{(0-1200)}$ - Vergleich jeweils mit Saturated-Modell und AIC

Modell	Chi2	P-Wert	AIC
Saturated	-	-	1557,642
ACE	42,8	< 0,001	1570,412
ADE	43,5	< 0,001	1571,171
AE	43,5	< 0,001	1569,171
CE	42,8	< 0,001	1568,412

Tabelle 51 zeigt für den Parameter $AUC_{(0-1200)}$ die jeweilige Verteilung der Variation der vier prüfbar Modellen ACE, ADE, AE und CE. Das hier zu favorisierende Modell ist das CE-Modell, das keine erblichen sondern nur umweltbedingte Einflussfaktoren beinhaltet. Es gibt gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 45% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 55%. Das CE-Modell ist dem *Akaike information criterion* zufolge das beste Modell. Da die Modelle ACE, ADE und AE nur geringfügig höhere AIC-Werte mit einer Differenz zwischen 0,76 (0,048%) und 2,76 (0,13%) im Vergleich zum CE-Modell aufweisen und sich alle vier Modelle im Vergleich zum gesättigten Modell gleichermaßen signifikant von diesem unterscheiden, kann für den Parameter $AUC_{(0-1200)}$ das CE-Modell nicht uneingeschränkt favorisiert werden.

Tab. 51 Paraxanthin – Verteilung der $AUC_{(0-1200)}$ Variation bei vier prüfbar Modellen

Modell	A*	D*	C*	E*
ACE	< 0,001	-	0,449	0,551
ADE	0,489	< 0,001	-	0,511
AE	0,489	-	-	0,511
CE	-	-	0,449	0,551

* A: additive genetics; D: dominance; C: common environment; E: unique environment

Tabelle 52 zeigt für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein den X^2 - und den P-Wert verschiedener Modelle im Vergleich mit dem Gesättigten- (*Saturated*-) Modell sowie den jeweiligen AIC-Wert.

Tab. 52 Paraxanthin – Quotient $AUC_{(0-1200)}$ P/K- Vergleich jeweils mit Saturated-Modell und AIC

Modell	Chi2	P-Wert	AIC
Saturated	-	-	23,21
ACE	8,74	0,89	1,94
ADE	10,21	0,81	3,41
AE	10,21	0,86	1,41
CE	9,28	0,90	0,48

Es fällt auf, dass sich bei der Strukturgleichungsmodell-Analyse für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein alle Modelle im Vergleich zum Gesättigten-Modell von diesem nicht signifikant unterscheiden. Tabelle 53 zeigt für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein die jeweilige Verteilung der Variation der vier prüfbareren Modellen ACE, ADE, AE und CE. Das hier zu favorisierende Modell ist das CE-Modell, das keine erblichen sondern nur umweltbedingte Einflussfaktoren beinhaltet. Es gibt gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 73% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 27%.

Tab. 53 Paraxanthin – Verteilung der Variation des Quotienten $AUC_{(0-1200)}$ P/K bei vier prüfbareren Modellen

Modell	A*	D*	C*	E*
ACE	0,228	-	0,537	0,234
ADE	0,771	< 0,001	-	0,239
AE	0,771			0,229
CE			0,727	0,273

* A: additive genetics; D: dominance; C: common environment; E: unique environment

3.3.5.3.4 Abschätzung der Heritabilität nach Kalow

Nach dem von Kalow et al. (1998 und 1999) eingeführten Verfahren lässt sich nach wiederholter Medikamentenapplikation eine genetische Komponente ermitteln. Tabelle 54 zeigt für den primären Parameter AUC und den Quotienten der AUC von Paraxanthin und Koffein die interindividuellen (SD_b) und intraindividuellen (SD_w) Standardabweichungen und die daraus nach Kalow errechnete genetische Komponente (r_{GC}). Sowohl für die $AUC_{(0-1200)}$ als auch für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ konnte hier eine erbliche Komponente von 79% bzw. 84% gezeigt werden.

Tab. 54: Paraxanthin - Standardabweichungen und Heritabilität nach Kalow

	SD_b^*	SD_w^*	r_{GC}^*
$AUC_{(0-1200)}$ [mg·min/l]	203	92	0,79
Quotient $AUC_{(0-1200)}$ P/C	0,34	0,14	0,84

* SD_b : interindividuelle Standardabweichungen; SD_w : intraindividuelle Standardabweichungen; r_{GC} : genetische Komponente

4 Diskussion

Die Intention dieser Studie war zu untersuchen, ob individuelle Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus von Midazolam und Koffein erblich bedingt sind und wie groß der erbliche Anteil an der Variation zwischen den Menschen ist. Das Medikament Midazolam fungiert dabei als Testsubstanz für die Enzyme CYP3A4 und -3A5 und das Medikament Koffein für das Enzym CYP1A2. Verglichen wurden mono- und dizygote Zwillinge anhand verschiedener pharmakokinetischer Parameter. Der erbliche Anteil an der Variabilität wurde zum einen aus den Korrelationskoeffizienten mono- und dizygoter Zwillinge berechnet (Formeln nach Falconer und Vesell) und zum anderen wurde der erbliche Anteil mittels einer Strukturgleichungsmodell-Analyse ermittelt. Schließlich wurde entsprechend dem Vorschlag von W. Kalow (Kalow et al. 1998 und 1999) die Erbllichkeit auch ohne Bezug auf den Zwillingsstatus aus den intra- und interindividuellen Standardabweichungen abgeschätzt. Es zeigte sich, dass die Höhe der bestimmaren erblichen Komponente stark methoden- und parameterabhängig war. Sowohl für die CYP3A4/3A5- als auch CYP1A2-In-Vivo-Aktivität galt nach Studienprotokoll die Clearance der Muttersubstanzen als primärer Zielparameter. Da die AUC den Kehrwert der Clearance darstellt, wurde auch die AUC als primärer Zielparameter betrachtet. Bezüglich CYP3A4/3A5 konnten für diese primären Zielparameter je nach Methode Erbllichkeit mit einer breiten Spanne zwischen 20% und 96% ermittelt werden. Bezüglich CYP1A2 konnten für die primären Zielparameter eine Erbllichkeit von bis zu 93% ermittelt werden. Nach anderer Methode konnte allerdings keine erbliche Komponente für die CYP1A2-Aktivität gezeigt werden. Auch hier zeigte sich methoden- und parameterabhängig eine breite Spanne in der berechneten Erbllichkeit. Inwiefern sich die Ergebnisse der unterschiedlichen Berechnungsverfahren unterscheiden, wird in der weiteren Diskussion dargestellt.

4.1 Midazolam-PK als Indikator für CYP3A-Aktivität

Midazolam ist eine weit verbreitete und vielfach erprobte Testsubstanz zur Untersuchung der Aktivität der Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 (Klieber et al. 2008; Quintieri et al. 2008). Als Alternative zu Midazolam als Testsubstanz zur In-Vivo-Testung der Enzymaktivität von CYP3A4 und CYP3A5 werden unter anderem auch Triazolam, Alfentanil, Testosteron, Cortisol, der Erythromycin-Atemtest und Nifedepin vorgeschlagen (Liu et al. 2007; Özdemir et al. 2000; Ge et al. 2013). Alprazolam, Tacrolimus und Vincristin werden als selektive Testsubstanzen für CYP3A5 genannt (Liu et al. 2007). Neben Chinidin und Erythromycin (Liu et al. 2007) wurde als Neuheit vor kurzem Bufalin als spezifischere Test-

substanz für CYP3A4 zur Testung möglichst ohne Beteiligung von CYP3A5 oder CYP3A7 vorgestellt (Ge et al. 2013). Es finden sich also CYP3A4- und CYP3A5-unselektive Substanzen, solche mit zumindest präferentieller Metabolisierung und möglicherweise sogar ein neueres mit selektiver Metabolisierung über CYP3A4.

Midazolam gehört dabei zu den am häufigsten verwendeten Testsubstanzen. Ziel der vorliegenden Studie war nicht, die bereits bekannte Pharmakokinetik von Midazolam zu charakterisieren. Dennoch soll gewissermaßen als Überprüfung der Korrektheit unseres Vorgehens zunächst dargestellt werden, ob unsere Messwerte bzw. Pharmakokinetik-Parameter dem Bekannten entsprechen. In Tabelle 55 werden die eigenen Pharmakokinetik-Parameter Werten aus der Literatur gegenübergestellt.

Tab. 55: PK-Parameter Midazolam und Hydroxymidazolam

Parameter [Einheit]	Wert	Quelle
Midazolam		
Clearance [ml/min]	279 - 638	eigene Messung
	530±34	Greenblatt et al. 1984
	300 - 500	Roche 2008
Clearance/KG [ml/min·kg ⁻¹]	2,4 – 11,9	eigene Messung
	7,7±7,53	Bolon et al. 2003
	6,6±1,8	Thummel et al. 2005
AUC _{last} [µg·min/l]	287 - 611	eigene Messung
AUC _(0-unendlich) [µg·min/l]	314 - 822	eigene Messung
t _{1/2} [min]	104 - 325	eigene Messung
	90 - 150	Roche 2008
	114±36	Thummel et al. 2005
C _{max} [µg/l]	2,7 - 9,0	eigene Messung
	4,52±0,64 (normiert auf 0,2 mg-Dosis)	Thummel et al. 2005
t _{1/2α} [min]	13,5 - 82,2	eigene Messung
	13,09	Zomorodi et al. 1998
t _{1/2β} [min]	94,9 - 468	eigene Messung
	319,8	Zomorodi et al. 1998
V [l]	25,2 - 68,4	eigene Messung
	38±3	Greenblatt et al. 1984
V _{ss} [l]	44,8 bis 177	eigene Messung
	114±7	Greenblatt et al. 1984
V/KG [l/kg]	0,37 - 0,99	eigene Messung
	0,402±0,324	Bolon et al. 2003
	0,58±0,05	Greenblatt et al. 1984

Parameter [Einheit]	Wert	Quelle
V _{ss} /KG [l/kg]	0,76 - 2,53	eigene Messung
	1,1±0,6	Thummel et al. 2005
	1,74±0,11	Greenblatt et al. 1984
	0,7 - 1,2	Roche 2008
Hydroxymidazolam		
t _{1/2} [min]	107 - 287	eigene Messung
	< 60	Roche 2008

Der Vergleich ergibt, dass die meisten Parameter unserer Studie mit denen verschiedener Literaturquellen übereinstimmen. Für einige Parameter fanden sich allerdings keine vergleichbaren Angaben in der Literatur und bei anderen Parametern fanden sich geringe Unterschiede zu den von uns gemessenen Werten. So lag die von uns ermittelte Halbwertszeit über der in den Literaturquellen angegebenen Halbwertszeiten. Die von uns erhobenen, auf das Körpergewicht bezogenen Verteilungsvolumina sind, verglichen mit einigen der Literaturangaben, ebenfalls etwas höher als die Angaben der jeweiligen Autoren. Vergleichsdaten für die pharmakokinetischen Parameter des Metaboliten Hydroxymidazolam sind insgesamt wenige dokumentiert.

Die Unterschiede in der Höhe der pharmakokinetischen Parameter sind am ehesten durch unterschiedliche Analytik, Berechnungsverfahren und z.T. kleine Gruppengrößen erklärbar. Gerade die terminale Halbwertszeit unterliegt bei unterschiedlichen Berechnungen deutlichen Schwankungen

4.1.1 Erbllichkeit der CYP3A-Aktivität

In mehreren Studien konnte für die Aktivität der CYP3A-Enzymfamilie mit verschiedenen Testsubstanzen, Studiendesigns und unterschiedlichen Ansätzen zur Berechnung von Erbllichkeit unterschiedlich hohe Heritabilität gezeigt werden.

Özdemir et al. (2000) haben in einer Metaanalyse 16 Studien, in denen wiederholt Substrate von CYP3A4 gegeben wurden, mithilfe der von Kalow publizierten Methode der „repeated drug administration“ (Kalow et al. 1998 und 1999) auf Erbllichkeit untersucht. Die Vorgabe dieser Metaanalyse war, dass die Substanz mindestens zwei Mal bei der gleichen Person verabreicht worden sein musste. Die Untersuchung umfasste insgesamt 161 Personen und 10 verschiedene Substrate für CYP3A4. Die hierbei errechnete Erbllichkeit (r_{GC}) lag je nach Substanz und Studie zwischen 14% und 99%. Als Erklärung für diese offen-

sichtlich wenig klare Einschätzung wurden unterschiedliche Gründe genannt. Zum einen wird die Vielzahl verschiedener Testsubstanzen angeführt, die außerdem über unterschiedliche Applikationswege – i.v.-Injektionen, p.o. oder inhalativ – zugeführt wurden. Zum anderen wurden die pharmakokinetischen Parameter und die der Metabolite mit uneinheitlichen Methoden und in unterschiedlichen Medien bestimmt. Auch die in einigen der untersuchten Studien nicht vereinheitlichten Umweltfaktoren, die Untersuchung sowohl von erkrankten Patienten als auch gesunden Probanden und die bei einigen Untersuchungen sehr geringe Anzahl der untersuchten Personen wurde für die weite Spanne der geschätzten genetischen Komponente verantwortlich gemacht. Für eine – wie auch bei uns in der vorliegenden Studie – auf i.v.-Applikation von Midazolam bei gesunden Probanden basierende Studie wurde eine hohe Erblichkeit von 96% ($r_{GC} = 0,96$) ermittelt. Ähnlich hoch (89%) war die Schätzung der Erblichkeit für eine Studie, die auf dem Erythromycin-Atemtest beruhte.

In einer älteren Zwillingsstudie zeigten Penno et al. (1981) eine hohe Erblichkeit für die Verstoffwechslung von Phenazon (Antipyrin). Klein und Zanger (2013) sehen in Phenazon ebenfalls eine Testsubstanz der CYP3A4-Aktivität und sprechen die ermittelte Erblichkeit von 85% dem Enzym CYP3A4 zu. Die Erblichkeit (H^2) wurden in diesem Fall auf Basis normierter Varianzdifferenzen zwischen mono- und dizygoten Zwillingen nach der Formel „ $H^2 = (V_{DZ} - V_{MZ}) / V_{DZ}$ “ ermittelt.

In einer neueren Zwillingsstudie zeigten Rahmioglu et al. (2011) eine Erblichkeit von 66% bzw. 74% für die Aktivität von induziertem CYP3A4. Hierbei wurde im Design einer Zwillingsstudie die Metabolisierungsrate von Chinin als Testparameter der CYP3A4-Aktivität genutzt und zusätzlich zur CYP3A4-Induzierung ein Johanniskrautpräparat verabreicht. Um gezielt möglichst nur die CYP3A4-Aktivität betrachten zu können und eine Überlappung mit CYP3A5-Aktivität zu minimieren, wurden in der Studie von Rahmioglu et al. (2011) nur Probanden mit dem ineffizienten Genotyp CYP3A5*3/*3 berücksichtigt und Probanden mit anderen CYP3A5-Genotypen ausgeschlossen. Die Heritabilität wurde sowohl nach Falconer als auch mittels Strukturgleichungsmodell-Analyse ermittelt. Die nach Falconer ermittelte Erblichkeit für die induzierte CYP3A4-Aktivität betrug 74%. In der Strukturgleichungsmodell-Analyse wurden das AE-Modell favorisiert, das additiven genetischen Faktoren (A) einen Anteil von 66% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren (E) einen Anteil von 34% zusprach. Rahmioglu et al. (2011) machen in ihrer Veröffentlichung nur Angaben zur induziertem CYP3A4-Aktivität. Zur Heritabilität der Enzymaktivität in nicht-induziertem Zustand werden leider keine Angaben gemacht, was bereits Klein und Zanger (2013) kritisierten.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Parameter der Midazolam-Pharmakokinetik und des Metaboliten Hydroxymidazolam zur Beurteilung der Aktivität der Enzyme CYP3A4 und CYP3A5 genutzt. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Hauptzielgröße Clearance und der AUC. Von diesen pharmakokinetischen Parametern ausgehend, wurde die Erbllichkeit interindividueller Unterschiede in der Enzymaktivität nach Falconer, Vesell und Kalow und für die AUC auch mittels Strukturgleichungsmodell-Analyse ermittelt. Für die Muttersubstanz Midazolam konnten wir nach Falconer für die AUC_{last} eine Heritabilität von 49%, für die $AUC_{(0-unendlich)}$ von 36% und für die Clearance eine Heritabilität von 72% ermitteln. Es irritiert dabei zunächst, dass sich die Schätzwerte für AUC und Clearance deutlich unterscheiden, obwohl die Clearance im Wesentlichen der Kehrwert der AUC ist ($Clearance = Dosis/AUC$). Um diesen Unterschied weiter zu untersuchen, wurde eine erneute Erbllichkeitsberechnung auf Basis logarithmierter pharmakokinetischer Parameter und auf Basis der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten durchgeführt. Eine Logarithmierung der pharmakokinetischen Parameter vor Berechnung der Erbllichkeit erbrachte nur eine geringe Veränderung und erklärt die Unterschiede zwischen der Heritabilität der AUC und der Clearance nicht. Die Berechnung auf Basis der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten erbrachte hingegen eine deutliche Annäherung der geschätzten Erbllichkeit der beiden gegen unendlich extrapolierten Parameter. Sowohl für die $AUC_{(0-unendlich)}$ als auch die Clearance ergab sich nach Falconer eine fast identische Erbllichkeit von 57% bzw. 58%. Für die AUC_{last} allerdings konnte ausgehend von den Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten eine höhere Heritabilität von über 99% geschätzt werden.

Nach der Berechnungsmethode von Vesell konnten wir ebenfalls einen deutlichen Unterschied in der berechneten Heritabilität zwischen der AUC und der Clearance beobachten. Für die AUC_{last} haben wir eine Heritabilität von 30%, für die $AUC_{(0-unendlich)}$ von 24% und für die Clearance eine Heritabilität von 52% bestimmt. Sowohl die Höhe der Heritabilität der drei Parameter als auch der Unterschied der Heritabilität zwischen AUC und Clearance war nach der Schätzung nach Vesell geringer als nach der Methode von Falconer.

In der Strukturgleichungsmodell-Analyse war das AE-Modell zu favorisieren. Es schreibt additiven genetischen Faktoren (A) einen Anteil von 20% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren (E) einen Anteil von 80% zu. Aufgrund ähnlicher AIC- und P-Werte müssen an dieser Stelle allerdings auch das ADE- und das CE-Modell erwähnt werden, die dem AE-Modell nur knapp unterlegen waren. Das ADE-Modell gibt neben additiven genetischen Faktoren (< 1%) und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren (80%) auch dominanten genetischen Faktoren einen Anteil von 20%. Das CE-Modell beinhaltet hingegen gar keine

erbliche Komponente und schreibt gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 16% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren einen Anteil von 84% zu.

Nach der von Kalow vorgestellten Methode konnte für die $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ eine erbliche Komponente von 77% und für die Clearance eine erbliche Komponente von 71% festgestellt werden.

In unserer Studie konnten wir Erbllichkeit für den Midazolamstoffwechsel bzw. die Aktivität der CYP3A-Enzymfamilie nachweisen, allerdings in etwas geringerem Umfang als nach verschiedene Literaturangaben zu erwarten war. In zum Vergleich herangezogenen Studien wurde diese mit Werten zwischen 66% und 96% angegeben. In der vorliegenden Studie konnte nach der Methode von Kalow und für die Clearance auch mit der Formel nach Falconer tatsächlich eine ähnlich hohe Heritabilität zwischen 71% und 77% für die Enzymaktivität gezeigt werden. Die mittels der Formel nach Falconer für die AUC ermittelte Heritabilität (49% bzw. 36%) und die mittels der Formel nach Vesell für die AUC (30% bzw. 24%) und Clearance (52%) ermittelte Heritabilität ist allerdings niedriger. Auch in der Strukturgleichungsmodell-Analyse konnte im AE-, ADE- und CE-Modell keine hohe Erbllichkeit gezeigt werden. In allen drei Strukturgleichungsmodellen wurde umweltbedingten Einflussfaktoren ein Anteil von mindestens 80% eingeräumt und genetischen Faktoren (additiv bzw. dominant) maximal ein Anteil von 20%.

Unter Berücksichtigung der pharmakokinetischen Daten, die für den Metaboliten Hydroxymidazolam erhoben wurden, konnte für einige Parameter eine deutlich höhere Heritabilität gezeigt werden. Für die Hauptzielwerte $AUC_{(\text{last})}$ und $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ ergab sich nach Falconer eine geringere Erbllichkeit (21%) im Vergleich zur AUC von Midazolam und nach Vesell eine höhere (52%). Für den Quotienten der $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ von Hydroxymidazolam und Midazolam konnte weder nach Falconer noch nach Vesell Erbllichkeit gezeigt werden.

Die Strukturgleichungsmodell-Analyse der $AUC_{(0-\text{unendlich})}$ für Hydroxymidazolam zeigte als zu favorisierendes Modell das AE-Modell. Dieses Modell sprach additiven genetischen Komponenten (A) einen Anteil von 95% und Umweltfaktoren (E) einen Anteil von 5% zu. Da auch das ACE- und ADE-Modell nur geringfügig höhere und damit schlechtere AIC-Werte als das AE-Modell aufwiesen, müssen an dieser Stelle auch die Ergebnisse dieser Modelle erwähnt werden. Das ADE-Modell zeigte im Vergleich zum AE-Modell im Prinzip ein identisches Ergebnis. Additiver genetischer Einfluss (A) wurde mit 95%, Umwelteinfluss (E) ebenfalls mit 5% und dominanter genetischer Einfluss (D) mit unter 0,001%

beziffert. Auch im ACE-Modell hatte mit 68% der genetische Einflussfaktor (A) den größten Anteil und Umweltfaktoren einen Anteil von nur 32% (C plus E). So konnte in der Strukturgleichungsmodell-Analyse von Hydroxymidazolam eine hohe Erblichkeit zwischen 68% und 95% gezeigt werden. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass alle Modelle nur eine geringe Verbesserung zum gesättigten Modell darstellten, was am ehesten mit der relativ niedrigen Fallzahl zusammenhängt.

Nach der Methode von Kalow konnte für die Hydroxymidazolam betreffenden pharmakokinetischen Parameter eine hohe Heritabilität gezeigt werden. Für die $AUC_{(0-\infty)}$ und den Quotienten der $AUC_{(0-\infty)}$ von Hydroxymidazolam und Midazolam konnten wir eine genetische Komponente zwischen 93% und 96% ermitteln.

Wir konnten auf Basis der für Midazolam und Hydroxymidazolam gemessenen pharmakokinetischen Parameter eine erbliche Komponente für die Aktivität von CYP3A4 und CYP3A5 zeigen. Diese unterschied sich zwischen Midazolam und Hydroxymidazolam und auch zwischen den verschiedenen Berechnungsweisen der Erblichkeit zeigte sich bei einigen Berechnungen ein deutlicher Unterschied. Ausgehend von den pharmakokinetischen Parametern von Midazolam, konnten wir eine erbliche Komponente von bis zu 77% und von Hydroxymidazolam von bis zu 96% ausmachen. Die höchste Heritabilität wurde für beide Substanzen mit der Methode nach Kalow bestimmt. Tabelle 56 gibt zusammenfassend einen Überblick über die Ergebnisse der zitierten Studien zur Erblichkeitsberechnung im Vergleich zu den von uns erhobenen Ergebnissen.

Tab. 56 CYP3A4/ -3A5 – Überblick verschiedener Studien zur Erbllichkeit

Method	n*	Testsubstanz	Appl.*	Erbllichkeit [%]	PK-Parameter	Quelle
Kalow	4	Adriamycin	i.v.	91	M.-Quotient*	
Kalow	11	Adriamycin	i.v.	55	M.-Quotient*	
Kalow	11	Cortisol	n.b.*	14	M.-Quotient*	
Kalow	7	Cyclosporin	p.o.	72 83	AUC $t_{1/2}$	
Kalow	10	Ethinylestra- diol	p.o.	20 68	$t_{1/2}$ (Tag) $t_{1/2}$ (Nacht)	
Kalow	8	Erythromycin	i.v.	89	Atemtest	
Kalow	11	Ethinylestra- diol	p.o.	79	AUC	
Kalow	18	Ethinylestra- diol	p.o.	94	AUC	
Kalow	10	Ethinylestra- diol	p.o.	86	AUC	Özdemir et al. 2000
Kalow	6	Ethylmorphin	p.o.	98	M.-Quotient*	
Kalow	20	Midazolam	i.v.	96	Clearance	
Kalow	20	Nifedipin	p.o.	82	AUC	
Kalow	20	Nifedipin	p.o.	98	AUC	
Kalow	8	Nifedipin	p.o.	74	AUC (mit Nahrung)	
Kalow	8	Nifedipin	p.o.	89	AUC (ohne Nahrung)	
Kalow	8	Nitrendipin	p.o.	66	AUC	
Kalow	5	Verapamil	p.o.	57 62	Clearance $t_{1/2}$	
nVd*	40	Phenazon	p.o.	85	M.-Quotient*	Penno et al. 1981 und Klein und Zanger 2013
Falconer	367	Chinin	p.o.	74	M.-Quotient*	
SGM*	367	Chinin	p.o.	66	M.-Quotient*	Rahmioglu et al. 2011
Falconer	58	Midazolam	i.v.	36 bzw. 49 75	AUC Clearance	
Vesell	58	Midazolam	i.v.	30 bzw. 24 52	AUC Clearance	eigene Berechnung für Midazolam
Kalow	58	Midazolam	i.v.	71 77	AUC Clearance	
SGM*	58	Midazolam	i.v.	20	AUC	
Falconer	58	Midazolam	i.v.	20	AUC	
Vesell	58	Midazolam	i.v.	52	AUC	eigene Berechnung für Hydroxymidazo- lam
Kalow	58	Midazolam	i.v.	96	AUC	
SGM*	58	Midazolam	i.v.	95	AUC	

* n: Anzahl Probanden; Appl.: Applikationsform; n.b.: nicht bekannt; SGM: Strukturgleichungsmodell-Analyse; nVd: normierte Varianzdifferenzen; M.-Quotient: Metabolitenquotient

Ein möglicher Grund für die unterschiedlich hoch bestimmte Heritabilität in den Literaturangaben und in unserer Studie ist der Vergleich von pharmakokinetischen Parametern, die nach i.v.-Applikation und Verabreichung per os erhoben wurden. Ein direkter Vergleich ist dadurch erschwert, dass nach Verabreichung per os bereits in der Darmwand CYP3A4 enzymatisch aktiv ist und dieser Mechanismus nach i.v.-Applikation nicht am Metabolismus beteiligt ist. Dadurch bekommt das Enzym CYP3A4 bei Verabreichung per os eine größere Bedeutung. Erbliche Komponenten des im Darm lokalisierten CYP3A4 konnten in unserer Studie nicht berücksichtigt werden. Des Weiteren haben wir Studien verglichen, bei denen Testsubstanzen mit unterschiedlicher CYP3A4 und -3A5 Selektivität verwendet wurden. Auch dies kann durch unterschiedlich großen Anteil von CYP3A4 oder CYP3A5 an der Metabolisierung der Testsubstanz zu uneinheitlichen Ergebnissen geführt haben.

An der Methode der Erblichkeitsberechnung nach W. Kalow ist zu kritisieren, dass mit dieser Methode gemeinsame Umweltfaktoren nicht von erblichen Faktoren zu trennen sind. Dies könnte einen Teil der im Vergleich zu den zwillingsabhängigen Methoden höher ermittelten erblichen Komponente erklären (siehe Kapitel „4.3 Grenzen dieser Arbeit und weitergehende Perspektiven“).

4.2 Koffein-PK als Indikator für CYP1A2-Aktivität

Am Koffeinmetabolismus sind neben CYP1A2 auch andere CYP-Enzyme, die Xanthinoxidase und das Enzym Arylamin-N-Acetyltransferase-2 in untergeordneter Rolle beteiligt (Perera et al. 2011; Kot und Daniel 2008). Koffein ist eine weit verbreitete und vielfach erprobte In-Vivo-Testsubstanz zur Untersuchung der Aktivität des Enzyms CYP1A2 (Thorn et al. 2012), wobei das durch CYP1A2 gebildete Paraxanthin der spezifische Koffeinmetabolit ist. Es wurden neben Koffein - deutlich seltener - auch Theophyllin und Tizanidin als Testsubstanzen für die Enzymaktivität von CYP1A2 herangezogen (Zadayan und Fuhr 2012). Filimonova et al. (2011) diskutieren weitergehend ein mathematisches Modell, das pharmakokinetische Parameter von Koffein und des Metaboliten Paraxanthin berücksichtigt, um eine spezifischere Testung von CYP1A2 zu erreichen. In unserer Studie wurde Koffein als Testsubstanz benutzt und sowohl pharmakokinetische Koffein- als auch Paraxanthin-Parameter zur Beurteilung der CYP1A2-Aktivität betrachtet. Ziel der vorliegenden Studie war nicht, die bereits vielfach untersuchte Pharmakokinetik von Koffein zu charakterisieren. Dennoch soll gewissermaßen als Überprüfung der Korrektheit unseres Vorgehens zunächst dargestellt werden, ob unsere Messwerte bzw. Pharmakokinetik-Parameter

dem Bekannten entsprechen. In Tabelle 57 werden die eigenen Pharmakokinetik-Parameter denen aus der Literatur gegenübergestellt.

Tab. 57: PK-Parameter Koffein und Paraxanthin

Parameter [Einheit]	Wert	Quelle
Koffein		
Clearance/F* [ml/min]	40 - 431	eigene Messung
Clearance/F·KG ⁻¹ * [ml/min·kg ⁻¹]	0,35 – 5,08	eigene Messung
	1,12±0,3	Newton et al. 1981
	2,20±1,02	Lelo et al 1986 a
	2,07±0,96	Lelo et al 1986 b
	2,2±1,67	Kamimori et al. 2002
	1,58±0,54	Perera et al 2011
AUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ [mg·min/l]	137 bis 1218	eigene Messung
AUC ₍₀₋₁₄₄₀₎ [mg·min/l]	423±150	Perera et al. 2011
	(normiert auf 50 mg-Dosis)	
t _{1/2} [Minuten]	97,6 - 735	eigene Messung
	meist 246 - 342; bis zu 600	Lindopharm GmbH 2004
	162 - 744	Newton et al. 1981
	246±78	Lelo et al. 1986 b
	240 - 300	Kot und Daniel 2008
	330±114	Perera et al. 2011
C _{max} [µg/l]	668 - 1984	eigene Messung
	1170±980	Kamimori et al. 2002
	750±250 (normiert auf 50 mg-Dosis)	Perera et al. 2011
T _{max} [Minuten]	26 - 200	eigene Messung
	30 - 40	Lindopharm GmbH 2004
	30 - 90	Newton et al. 1981
	60	Perera et al. 2011
	85,2±54	Kamimori et al. 2002
V/F [l]	22,9 - 68,7	eigene Messung
V/F·KG [l/kg]	0,38 - 0,81	eigene Messung
	0,52 - 1,06	Lindopharm GmbH 2004
	0,5 - 0,75	Kot und Daniel 2008
	0,781±0,208	Kamimori et al. 2002
Paraxanthin		
C _{max} [µg/l]	246 - 1390	eigene Messung
	250±50 (normiert auf 50 mg-Dosis)	Perera et al. 2011

Parameter [Einheit]	Wert	Quelle
T _{max} [Minuten]	38 - 1045	eigene Messung
	360±0 (nach 100 mg Koffein p.o.)	Perera et al. 2011
AUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ [mg·min/l]	175 - 946	eigene Messung
AUC ₍₀₋₁₄₄₀₎ [mg·min/l]	291±72 (normiert auf-50 mg-Dosis)	Perera et al. 2011
Quotient AUC ₍₀₋₁₂₀₀₎ P/K*	0,308 - 1,53	eigene Messung
Quotient AUC ₍₀₋₁₄₄₀₎ P/K	0,79± 0,19	Perera et al. 2011

* F: orale Bioverfügbarkeit; KG: Körpergewicht; P/K: Paraxanthin/Koffein

Der Vergleich ergibt, dass die meisten Parameter unserer Studie mit denen verschiedener Literaturquellen übereinstimmen. Für einige Parameter fanden sich allerdings keine vergleichbaren Angaben in der Literatur und bei anderen Parameter fanden sich Unterschiede zu den von uns gemessenen Werten. Der Zeitpunkt der Messung der Maximalkonzentration T_{max} lag in der vorliegenden Untersuchung etwas über den Angaben anderer Autoren und hatte insgesamt eine höhere Spanne. Die direkte Vergleichbarkeit der AUC₍₀₋₁₂₀₀₎ mit Literaturangaben ist durch den berücksichtigten Zeitraum bei Erhebung der AUC erschwert. Bei oraler Applikation des Medikaments muss die Betrachtung der Clearance unter Berücksichtigung der oralen Bioverfügbarkeit (F) erfolgen. Da diese bei Koffein nahezu 100% beträgt (Kot und Daniel 2008) kann die Clearance/F mit der Clearance gleichgesetzt werden. Die von uns ermittelte Clearance/F·KG⁻¹ befindet sich, verglichen mit verschiedenen Literaturangaben, in einem ähnlichen Bereich – unterliegt allerdings einem größeren Schwankungsbereich. Im Vergleich mit verschiedenen anderen Studien wird deutlich, dass sowohl dort als auch in unserer Erhebung die Halbwertszeit von Koffein ebenfalls deutlichen Schwankungen unterliegt. Einige Autoren geben eine etwas geringere als die von uns gemessene Spanne bei der Halbwertszeit an, andere Autoren haben sehr ähnliche Werte publiziert. Das für Koffein erhobene Verteilungsvolumen muss ebenfalls bezogen auf die orale Bioverfügbarkeit betrachtet werden. Analog zu den Betrachtungen zur Clearance kann V/F hier allerdings ebenfalls mit V gleichgesetzt werden. Das auf das Körpergewicht bezogene Verteilungsvolumen lag verglichen mit anderen Untersuchungen ebenfalls in einem ähnlichen Bereich.

Für den Vergleich der pharmakokinetischen Parameter des Metaboliten Paraxanthin fanden sich deutlich weniger Literaturangaben als für die Muttersubstanz Koffein. Hier zeigten sich zudem einige Unterschiede zu den von uns erhobenen Daten. Für T_{max} fällt die deutlich höhere Spanne der gemessenen Werte verglichen mit der Literaturangabe auf. Allerdings haben wir nur bei wenigen Probanden T_{max} bei über 1000 Minuten gemessen, so dass von

wenigen Ausreißern ausgegeben werden kann. Eine mögliche Erklärung für die Späte Maximalkonzentration ist eine verzögerte Magenentleerung die beispielsweise durch Übelkeit verursacht sein kann. Es fiel weiterhin auf, dass Perera et al. (2011) verglichen mit unseren Daten bei doppelt so hoher Dosis teilweise niedrigere Maximalkonzentrationen gemessen haben. Zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Angaben zur AUC gelten hier die gleichen Einschränkungen wie bereits für die AUC von Koffein erläutert. Die Quotienten der AUC von Paraxanthin und Koffein sind besser vergleichbar und befinden sich bei Perera et al. (2011) und in unserer Untersuchung in einem ähnlichen Bereich.

4.2.1 Erbllichkeit der CYP1A2-Aktivität

In mehreren Studien wurde mit unterschiedlichen Methoden Erbllichkeit für die interindividuell unterschiedliche Verstoffwechslung von Koffein bzw. für die Aktivität des Enzyms CYP1A2 gezeigt.

In einer großen dänischen Zwillingsstudie mit über 370 Probanden haben Rasmussen et al. (2002) eine deutliche Heritabilität von 73% für die Verstoffwechslung von Koffein gezeigt. In ihrer Studie haben sie nach p.o.-Applikation von 200 mg Koffein durch Urinproben die Metabolisierungsrate von Koffein bestimmt und daraus mittels Strukturgleichungsmodell-Analyse die Heritabilität errechnet. Im zu favorisierenden AE-Modell zeigten sie für additiven-genetischen Einfluss einen Anteil von 72,5% und für nicht-gemeinsame Umweltfaktoren einen Anteil von 27,5%. Rasmussen et al. haben selbst nicht die Heritabilität nach Falconer bestimmt, aber Korrelationskoeffizienten für die Gruppen der mono- und dizygoten Gruppen publiziert. Daraus lässt sich nach Falconer eine Heritabilität in Höhe von 81% abschätzen.

In einer Metaanalyse von 12 zwischen 1990 und 2009 durchgeführten Zwillingsstudien untersuchten Yang et al. (2010) nicht direkt die Enzymaktivität von CYP1A2 oder Pharmakokinetische Parameter des Koffeinstoffwechsels, sondern ermittelten aus Koffein-assoziierten Merkmalen deren Erbllichkeit. In den ausgewerteten Studien wurde u.a. der Konsum koffeinhaltiger Getränke, Koffein zuzuordnende Schlaflosigkeit und Toleranzentwicklung untersucht. Für die untersuchten Merkmale konnte eine Erbllichkeit zwischen 36% und 58% festgestellt werden. Da Koffein hauptsächlich durch das Enzym CYP1A2 verstoffwechselt wird, kann davon ausgegangen werden, dass die Erbllichkeit für die Koffein-assoziierten Merkmale zumindest teilweise auf die Aktivität von CYP1A2 übertragen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene pharmakokinetische Parameter des Koffeinstoffwechsels und des Metaboliten Paraxanthin zur Beurteilung der Aktivität des Enzyms CYP1A2 genutzt. Hauptaugenmerk lag dabei auf der Hauptzielgröße Clearance und der AUC sowie auf dem Quotienten der AUC zwischen Paraxanthin und Koffein. Ausgehend von diesen pharmakokinetischen Parametern wurde die Erblichkeit interindividueller Unterschiede in der Enzymaktivität nach Falconer, Vesell, Kalow und mittels Strukturgleichungsmodell-Analyse ermittelt. In dieser Studie konnte nur mit der Methode der wiederholten Medikamentenapplikation nach Kalow eine deutliche erbliche Komponente für den Koffeinstoffwechsel bzw. die Aktivität von CYP1A2 ermittelt werden. Auf Basis der Zwillingsuntersuchungen konnten wir sowohl nach Falconer und Vesell als auch mittels Strukturgleichungsmodell-Analyse kaum bzw. keine Erblichkeit zeigen. Dies überrascht v.a. im Vergleich zu der deutlichen Heritabilität die Rasmussen et al. (2002) für den Koffeinstoffwechsel ermittelten.

Für die Muttersubstanz Koffein konnten wir nach Falconer für die $AUC_{(0-1200)}$ im Prinzip keine Heritabilität zeigen (2,7%). Auch für die Clearance zeigte sich nur eine geringe Heritabilität von 22%. Lediglich bei anderen pharmakokinetischen Parametern konnte nach Falconer eine höhere Erblichkeit von 34% und 47% ($t_{1/2}$, T_{max}) gezeigt werden, wobei die Heritabilität für T_{max} auf einem nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten für monozygote Zwillinge beruht. Eine weitergehende Untersuchung der sich wieder Erwarteten deutlich unterscheidenden Heritabilität der AUC und der Clearance konnte diesen Unterschied nicht verringern. Sowohl eine Logarithmierung der pharmakokinetischen Parameter vor der Erblichkeitsberechnung als auch eine Berechnung auf Basis der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten vergrößerte den Unterschied sogar. Mit der Berechnungsmethode nach Vesell zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen der Heritabilität der AUC (8%) und Clearance (37%).

In der Strukturgleichungsmodell-Analyse für die $AUC_{(0-1200)}$ von Koffein konnte keine erbliche Komponente festgestellt werden. Das zu favorisierende Modell ist das nur umweltbedingte Einflussfaktoren berücksichtigende CE-Modell. Auch das in der Güte darauf folgende ACE-Modell gibt additiven genetischen Faktoren (A) einen Anteil von lediglich unter 0,001% und sieht – wie bereits das CE-Modell – 70% des Einflussanteils bei gemeinsamen (C) und 30% bei nicht-gemeinsamen Umweltfaktoren (E).

Mit der Untersuchung der Erblichkeit mit der Methode der wiederholten Medikamentenapplikation nach Kalow ergibt sich allerdings eine deutliche erbliche Komponente für die

Variabilität des Koffeinstoffwechsels. Für die $AUC_{(0-1200)}$ konnten wir einen erblichen Anteil von 81% und für die Clearance von 93% ermitteln.

Unter Berücksichtigung der Analyse der Paraxanthin betreffenden Parameter zeigt sich ein etwas anderes Bild. Die nach Falconer ermittelte Heritabilität ist bei allen ermittelten Parametern gering. Für die $AUC_{(0-1200)}$ wurden 16%, für C_{\max} 22% und T_{\max} 10% ermittelt. Für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein konnten wir nach Falconer eine etwas höhere Heritabilität von 45% zeigen.

Für die $AUC_{(0-1200)}$ konnten wir mit der Berechnungsmethode nach Vesell ebenfalls nur eine geringe Heritabilität von 14% bestimmen. Für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein konnten wir nach Vesell – ähnlich wie nach Falconer – eine höhere Heritabilität von hier 59% zeigen.

Die Strukturgleichungsmodell-Analyse für die $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin zeigt kein eindeutiges Bild. Zu favorisieren ist hier das CE-Modell, das keine erblichen sondern nur umweltbedingte Einflussfaktoren beinhaltet. Es gibt gemeinsamen Umweltfaktoren (C) einen Anteil von 45% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren (E) einen Anteil von 55%. Das CE-Modell ist dem *Akaike information criterion* zufolge zwar das beste Modell, kann für den Parameter $AUC_{(0-1200)}$ aber nicht uneingeschränkt favorisiert werden. Die Modelle ACE, ADE, AE und CE haben alle sehr ähnlich hohe AIC-Werten zwischen 1568 und 1571. Damit unterscheiden sich die Alternativmodelle nur zwischen 0,05% und 0,13% in der Höhe des AIC-Werts vom CE-Modell. In den Alternativmodellen wird genetischen Faktoren ein Anteil von bis zu 49% eingeräumt. Dadurch, dass sich außerdem alle vier Modelle im Vergleich zum gesättigten Modell gleichermaßen signifikant von diesem unterscheiden, muss die Güte und damit die Aussagekraft der Strukturgleichungsmodell-Analyse für die $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin eingeschränkt werden.

Anders verhält es sich für die Strukturgleichungsmodell-Analyse des Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein. Hier ist die Güte der Modellanalyse deutlich besser, da sich die verschiedenen Modelle nicht signifikant vom gesättigten Modell unterscheiden. Allerdings ist auch hier das zu favorisierende Modell das CE-Modell, das gemeinsamen Umweltfaktoren (C) einen Anteil von 73% und nicht gemeinsamen Umweltfaktoren (E) einen Anteil von 27% zuspricht. Auch hier konnte in der vorliegenden Studie keine Erblichkeit für die Enzymaktivität von CYP1A2 oder den Koffeinstoffwechsel festgestellt werden.

Wiederum anders verhält es sich bei einer Ermittlung der erblichen Komponente nach Kalow. Mit dieser Methode konnte sowohl für die $AUC_{(0-1200)}$ als auch für den Quotienten der $AUC_{(0-1200)}$ von Paraxanthin und Koffein eine deutliche erbliche Komponente von 79% bzw. 84% ermittelt werden.

Wir konnten auf Basis der für Koffein und Paraxanthin gemessenen pharmakokinetischen Parameter nur teilweise eine erbliche Komponente für die Aktivität von CYP1A2 zeigen. Es gab geringe Unterschiede zwischen den Berechnungen von Koffein und Paraxanthin, v.a. aber deutliche Unterschiede zwischen den vier verschiedenen Methoden der Erblichkeitsbestimmung. Nach Falconer und Vesell konnten wir wenig und mittels der Strukturgleichungsmodell-Analyse keine Erblichkeit in der Variabilität der CYP1A2-Aktivität zeigen. Mit der Methode nach Kalow ergab sich allerdings eine deutliche erbliche Komponente zwischen 79% und 93%. Tabelle 58 gibt zusammenfassend einen Überblick über die zitierten Studien zur Erblichkeitsberechnung im Vergleich zu den von uns erhobenen Ergebnissen.

Tab. 58 CYP1A2 – Überblick verschiedener Studien zur Erbllichkeit

Methoden	n*	Testsubstanz bzw. Untersuchtes Merkmal	Appl.*	Erbllichkeit [%]	PK-Parameter	Quelle
SGM*	378	Koffein	p.o.	72,5	M.-Quotient*	Rasmussen et al. 2002
Falconer	378	Koffein	p.o.	80,8	M.-Quotient*	eigene Berechnung nach Rasmussen et al. 2002
SGM*	9920	Koffeinkonsum		36		
SGM*	7728	Koffeinkonsum		67 (Männer) 72 (Frauen)		
SGM*	1934	starker Koffeinkonsum		77		
SGM*	4865	Koffeinwirkungen		34		
SGM*	1796	Koffeinkonsum		30 – 45 (altersabhängig)		
SGM*	10716	Koffeinkonsum		45 bzw. 56 (unterschiedliche Jahre)		Yang et al. 2010
SGM*	8167	Koffeinkonsum		48		
SGM*	7616	koffeinabhängige Schlaflosigkeit		40		
SGM*	712	Koffeinkonsum		72		
SGM*	4593	starker Koffeinkonsum		59		
SGM*	3262	Koffeinkonsum		41		
SGM*	4495	Koffeinkonsum		39		
Falconer	58	Koffein	p.o.	3 22	AUC Clearance/F	
Vesell	58	Koffein	p.o.	8 37	AUC Clearance/F	eigene Berechnung für Koffein
Kalow	58	Koffein	p.o.	81 93	AUC Clearance/F	
SGM*	58	Koffein	p.o.	k.E.*	AUC	
Falconer	58	Koffein	p.o.	16	AUC	
Vesell	58	Koffein	p.o.	14	AUC	eigene Berechnung für Paraxanthin
Kalow	58	Koffein	p.o.	79	AUC	
SGM*	58	Koffein	p.o.	k.E.*	AUC	

* n: Anzahl Probanden; Appl.: Applikationsform; SGM: Strukturgleichungsmodell-Analyse; M.-Quotient: Metabolitenquotient; k.E.: keine Erbllichkeit

Als ein bedeutender Grund für die Unterschiede unserer Berechnungen zu Literaturangaben ist die geringe Fallzahl in unserer Studie anzunehmen. Die Gruppe der dizygoten Zwillinge war mit neun Paaren relativ klein, was Zufälligkeiten bei der Berechnung der Korrelationskoeffizienten begünstigt. Da für die Bestimmung der Erbllichkeit nach Kalow keine Trennung in mono- und dizygoten Zwillinge nötig ist, war hier die Gruppengröße deutlich größer. Die von uns nach Kalow bestimmte erbliche Komponente lag sogar über der von

Rasmussen et al. (2002). Allerdings ist auch hier an der Methode der Erblichkeitsberechnung nach Kalow zu kritisieren, dass mit dieser Methode gemeinsame Umweltfaktoren nicht von erblichen Faktoren zu trennen sind. Dies könnte zu einer zu hoch geschätzten erblichen Komponente geführt haben (siehe Kapitel „4.3 Grenzen dieser Arbeit und weitergehende Perspektiven“).

4.3 Grenzen dieser Arbeit und weitergehende Perspektiven

Eine größere Anzahl untersuchter Probanden und ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den Gruppen der mono- und dizygoten Zwillingspaare wäre wünschenswert gewesen. Gerade die Gruppe der dizygoten Zwillinge war mit nur neun Probandenpaaren relativ klein und begünstigte so die Auswirkung von Zufälligkeiten auf die Korrelationskoeffizienten bei der Berechnung nach Falconer, Vesell und der Strukturgleichungsmodell-Analyse. Hier ist eine Reevaluierung der Ergebnisse dieser Arbeit nach Abschluss der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie mit allen Probandenpaaren von Interesse. Eine größere Anzahl Zwillingspaare erhöht die Aussagekraft der zwillingsabhängigen Erblichkeitsschätzungen erheblich.

Da für die Bestimmung der Erblichkeit nach Kalow keine Trennung in mono- und dizygoten Zwillinge nötig ist, war bei diesem Berechnungsverfahren die Gruppengröße deutlich größer und hat die als nötig angesehene Zahl von mindestens 50 Probanden überschritten (Kalow et al. 1999). An der Methode der Erblichkeitsberechnung nach W. Kalow ist allerdings zu kritisieren, dass mit dieser Methode gemeinsame Umweltfaktoren nicht von erblichen Faktoren zu trennen sind. Ein großer Einfluss gemeinsamer Umweltfaktoren und eine dadurch ggf. geringe interindividuelle Variabilität wird fälschlicherweise als genetische Komponente gewertet. Dies könnte einen Teil der im Vergleich zu den zwillingsabhängigen Methoden höher ermittelten erblichen Komponente nach Kalow erklären.

Mit der Methode der Strukturgleichungsmodell-Analyse können jeweils nur drei von vier möglichen Einflussfaktoren gleichzeitig betrachtet werden. Dies ist durch die mangelnde Möglichkeit bedingt, gemeinsame Umweltfaktoren (C) und dominante genetische Effekte (D) bei einer klassischen Zwillingsstudie als Einflussfaktoren klar zu trennen. Um ein alle vier Faktoren berücksichtigendes ADCE-Modell berechnen zu können, müsste das Design der Zwillingsstudie um eine Adoptionsstudie erweitert werden (Rijsdijk und Sham 2002). Dies wäre in der praktischen Umsetzung allerdings sehr aufwendig.

Der wider Erwarten deutliche Unterschied in der für die AUC und die Clearance bestimmten Heritabilität konnte nicht abschließend geklärt werden. Da es sich bei AUC und Clea-

rance nach der Formel „ $AUC = \text{Dosis} / \text{Clearance}$ “ im Prinzip um den Kehrwert handelt, waren wir zunächst von einer ähnlich hoch bestimmbaren Erblichkeit beider Parameter ausgegangen. Der Versuch, mittels Logarithmierung und damit einer Veränderung des Verteilungsmusters, eine Annäherung der bestimmbaren Erblichkeit zu erreichen, erbrachte weder bei der Berechnung für Midazolam noch Koffein regelhaft eine deutliche Annäherung der Schätzwerte von AUC und Clearance. Darüber hinaus haben wir versucht, durch eine Berechnung nach Falconer auf Basis der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten – anstatt der Pearson-Korrelationskoeffizienten – den Einfluss extrem hoher und niedriger Messwerte zu verringern. Dies ergab für Midazolam eine erhebliche Annäherung der Ergebnisse der $AUC_{(0-\infty)}$ und der Clearance. Für Koffein konnte damit allerdings keine Annäherung der $AUC_{(0-1200)}$ und der Clearance/F erreicht werden.

5 Zusammenfassung

Die erwünschten und unerwünschten Wirkungen von Medikamenten unterliegen großen interindividuellen Schwankungen. Aus einem genaueren Verständnis der Ursachen dieser Schwankungen erhofft man sich, durch eine Individualisierung von Pharmakotherapien eine bessere Wirkung und Verträglichkeit zu erreichen. Ein großer Teil der interindividuellen Variabilität in der Pharmakokinetik ist durch die unterschiedliche Aktivität von CYP-Enzymen bedingt. Wichtige Vertreter dieser Stoffwechsellzyme, die zusammen über 40% der CYP-Enzyme in der Leber ausmachen, sind die Enzyme CYP1A2 und CYP3A4.

In dieser Arbeit wurde – als Teil einer größeren und insgesamt fünf Testsubstanzen berücksichtigenden Zwillingsstudie – die Aktivität der Enzyme CYP3A4, CYP3A5 und CYP1A2 mit Hilfe der Testsubstanzen Midazolam und Koffein auf Erbllichkeit untersucht. Anhand der Korrelationen und der Variabilität pharmakokinetischer Parameter der Testsubstanzen und ihrer primären Metabolite Hydroxymidazolam und Paraxanthin wurde mittels mehrerer Berechnungsmethoden die erbliche Komponente geschätzt. Es wurde anhand der Korrelationskoeffizienten durch den Vergleich der mono- und dizygoten Zwillingsgruppen jeweils nach der von Falconer und der von Vesell eingeführten Formel die Heritabilität abgeschätzt. Weiterhin wurde eine Strukturgleichungsmodell-Analyse durchgeführt und anhand der inter- und intraindividuellen Variabilität nach der von Kalow publizierten Methode unabhängig vom Zwillingsstatus die erbliche Komponente bestimmt. Mit den vier unterschiedlichen Methoden kamen wir zu sich teilweise deutlich unterscheidenden Ergebnissen, was größtenteils auf die relativ geringe Fallzahl zurückgeführt wurde.

Die In-Vivo-Aktivität von CYP3A4 und auch von CYP3A5 wurde mittels der Clearance und AUC von Midazolam bestimmt. Die pharmakokinetischen Parameter von Midazolam lagen in unserer Studie im Bereich dessen, was in zum Vergleich herangezogenen Studien bestimmt wurde. Die Korrelationen der Clearance bei monozygoten Zwillingen erschienen in der explorativen Datenanalyse höher, aber keinesfalls erheblich höher als bei dizygoten Zwillingen, was auf eine nur moderate Erbllichkeit hinwies. Ausgehend von der Clearance ergab sich in der Berechnung nach Falconer für die Enzymaktivität von CYP3A4 und -3A5 eine Erbllichkeit von maximal 75% und nach Vesell von 52%. Nach der Strukturgleichungsmodell-Analyse auf Basis der AUC ergab sich eine Erbllichkeit von 20%. Der Vergleich der intraindividuellen Variabilität zwischen den drei Studientagen mit der interindividuellen Variabilität zeigte eine recht hohe intraindividuelle Konstanz. Nach dem Berech-

nungsvorschlag von Kalow ergab sich daraus eine Erbllichkeit von 77%. Im Vergleich zur Literatur war die Erbllichkeit hier teilweise geringer, was auf eine geringe Fallzahl und den Vergleich von Studien mit – im Gegensatz zu unserer Studie – oraler Applikation der Testsubstanz und damit Beteiligung von CYP3A4 der Darmmukosa zurückgeführt werden kann.

Die In-Vivo-Aktivität von CYP1A2 wurde als Koffein-Clearance und mittels der AUC bestimmt. Die von uns bestimmten Pharmakokinetik-Parameter von Koffein waren ähnlich den aus der Literatur bekannten. Die Korrelationen der Koffein-Clearance von mono- und dizygoten Zwillingen ähnelten sich in der exploratorischen Datenanalyse, was eine niedrige erbliche Komponente vermuten lässt. Für die Enzymaktivität von CYP1A2 konnten wir auf Basis der Clearance nach der Formel von Falconer eine Erbllichkeit von 22% und nach Vesell von 37% ermitteln. Die Strukturgleichungsmodell-Analyse der AUC ergab gar keine erbliche Komponente. Die exploratorische Analyse ergab sowohl eine deutliche intra- als auch interindividuelle Variabilität der Koffein-Clearance. Mittels der Methode von Kalow ergab sich aus dieser Variabilität eine Erbllichkeit von 93%.

Wir konnten beobachten, dass bei fast allen Berechnungen die höchste erbliche Komponente nach der Methode von Kalow ermittelt wurde. Einen ähnlichen empirischen Vergleich der unterschiedlichen Schätzparameter für Erbllichkeit, wie hier vorgenommen, haben wir in der Literatur nicht gefunden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Formeln von Falconer, Vesell und Kalow nur erste grobe Näherungswerte für Erbllichkeit liefern. Ein weitergehender Vergleich der vier in dieser Arbeit genutzten Ansätze zur Bestimmung von Erbllichkeit und Untersuchung der Gründe für die sich teilweise deutlich unterscheidenden Ergebnisse anhand einer größeren Zwillingstudie wäre von großem Interesse.

Im Ausblick auf eine individualisierte Medizin sind weitergehende Schritte erforderlich. Zum einen sind – wie auch in Teilen bereits erfolgt – eine mögliche Korrelation verschiedener Genotypen und der Enzymaktivität zu untersuchen. Zum anderen ist ein genaueres Verständnis der Umweltfaktoren, die, wie wir gezeigt haben, einen erheblichen Einfluss auf die Enzymaktivität haben können, nötig.

6 Literaturverzeichnis

- Agrawal V, Choi JH, Giacomini KM, Miller WL (2010): Substrate-specific modulation of CYP3A4 activity by genetic variants of cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenet Genomics* 20, 611-8
- Anderson GD, Lynn AM (2009): Optimizing pediatric dosing: a developmental pharmacologic approach. *Pharmacotherapy* 29, 680-90
- AstraZeneca GmbH (2009): Fachinformation Beloc® i.v.
- Atlas SA, Vesell ES, Nebert DW (1976): Genetic Control of Interindividual Variations in the Inducibility of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase in Cultured Human Lymphocytes. *Cancer Res* 36, 4619-30
- AWD-Pharma (2008): Fachinformation Cordanum® 50mg/ 100mg Filmtabletten
- Berlin Chemie MENARINI (2006): Fachinformation Torem® 200/200 Infusionslösung
- Bolon M, Bastien O, Flamens C, Paulus S, Salord F, Boulieu R (2003): Evaluation of the estimation of midazolam concentrations and pharmacokinetic parameters in intensive care patients using a bayesian pharmacokinetic software (PKS) according to sparse sampling approach. *J Pharm Pharmacol* 55, 765-71
- Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L (2002): Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet* 3, 872-82
- Borges S, Desta Z, Jin Y, Faouzi A, Robarge JD, Philip S, Nguyen A, Stearns V, Hayes D, Rae JM (2010): Composite functional genetic and comedication CYP2D6 activity score in predicting tamoxifen drug exposure among breast cancer patients. *J Clin Pharmacol* 50, 450-8
- Byers JP, JG Sarver: Pharmacokinetic Modeling; in: *Pharmacology Principles and Practice*; 1. Auflage; hrsg. v. Hacker M, Bachmann K, Messer W; Academic Press Inc, Burlington 2009, 201-77

- Derendorf H, Gramatté T, Schäfer HG, Staab A: Pharmakokinetik kompakt Grundlagen und Praxisrelevanz. 3. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 2011
- Ebbesen J, Buajordet I, Erikssen J, Brørs O, Hilberg T, Svaar H, Sandvik L (2001): Drug-related deaths in a department of internal medicine. *Arch Intern Med* 161, 2317-23
- Eichelbaum M, Schwab M: Wirkung des Organismus auf Pharmaka: allgemeine Pharmakokinetik; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 10. Auflage; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Elsevier, München 2009, 36-64
- Elens L, Nieuweboer A, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, Mathijssen RH, van Schaik RH (2013): CYP3A4 intron 6 C>T SNP (CYP3A4*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenomics* 14, 137-49
- Emoto C, Iwasaki K (2007): Relative roles of CYP2C19 and CYP3A4/5 in midazolam 1'-hydroxylation. *Xenobiotica* 37, 592-603
- Engelhard K, Werner C: Narkose – Inhalations- und Injektionsanästhetika; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 10. Auflage; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Elsevier, München 2009, 254-74
- Evans DA, Manley KA, McKusick VA (1960 a): Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 2, 485-91
- Evans DA, Storey PB, Wittstadt FB, Manley KA (1960 b): The determination of the isoniazid inactivator phenotype. *Am Rev Respir Dis* 82, 853-61
- Filimonova AA, Ziganshina LE, Ziganshin AU, Chichirov AA (2011): New specific marker of cytochrome P450 1A2 activity. *Bull Exp Biol Med* 150, 762-4
- Fischer MA, Stedman MR, Lii J, Vogeli C, Shrank WH, Brookhart MA, Weissman JS (2010): Primary medication non-adherence: analysis of 195,930 electronic prescriptions. *J Gen Intern Med* 25, 284-90

- Flockhart DA (2007): Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine; online url: http://static.medicine.iupui.edu/divisions/clinpharm/content/p450_Table_Oct_11_2009.pdf [Stand 01.11.2013]
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J (2005): Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10604-9
- Ge GB, Ning J, Hu LH, Dai ZR, Hou J, Cao YF, Yu ZW, Ai CZ, Gu JK, Ma XC, Yang L (2013): A highly selective probe for human cytochrome P450 3A4: isoform selectivity, kinetic characterization and its applications. *Chem Commun* 49, 9779-81
- Gervasini G, Ghotbi R, Aklillu E, San Jose C, Cabanillas A, Kishikawa J, Benitez J, Carrillo JA (2013): Haplotypes in the 5'-untranslated region of the CYP1A2 gene are inversely associated with lung cancer risk but do not correlate with caffeine metabolism. *Environ Mol Mutagen* 54, 124-32
- Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L (2007): Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 63, 537-46
- Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA (1994): Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 47, 1643-53
- Greenblatt DJ, Abernethy DR, Lozniskar A, Harmatz JS, Limjuco RA, Shader RI (1984): Effect of age, gender, and obesity on midazolam kinetics. *Anesthesiology* 61, 27-35
- He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL (2005): Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 77, 373-87
- He P, Court MH, Greenblatt DJ, von Moltke LL (2006): Factors influencing midazolam hydroxylation activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 34, 1198-207

- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, (2000): Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3473-8
- Kalow W (1997): Pharmacogenetics in biological perspective. *Pharmacol Rev* 49, 369-79
- Kalow W (2006): Pharmacogenetics and pharmacogenomics: origin, status, and the hope for personalized medicine. *Pharmacogenomics J* 6, 162-5
- Kalow W, Tang BK, Endrenyi L (1998): Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 8, 283-9
- Kalow W, Endrenyi L, Tang B (1999): Repeat administration of drugs as a means to assess the genetic component in pharmacological variability. *Pharmacology* 58, 281-4
- Kamimori GH, Karyekar CS, Otterstetter R, Cox DS, Balkin TJ, Belenky GL, Edgington ND (2002): The rate of absorption and relative bioavailability of caffeine administered in chewing gum versus capsules to normal healthy volunteers. *Int J Pharm* 234, 159-67
- Keller C: Fettstoffwechsel; Lipidsenker – Pharmakotherapie bei Fettstoffwechselstörungen; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 10. Auflage; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Elsevier, München 2009, 601-14
- Klein K, Zanger UM (2013): Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Front Genet* 4, 1-15
- Klieber S, Hugla S, Ngo R, Arabeyre-Fabre C, Meunier V, Sadoun F, Fedeli O, Rival M, Bourrie M, Guillou F, (2008): Contribution of the N-glucuronidation pathway to the overall in vitro metabolic clearance of midazolam in humans. *Drug Metab Dispos* 36, 851-62

- Klotz U (2009): Pharmacokinetics and drug metabolism in the elderly. *Drug Metab Rev* 41, 67-76
- Kot M, Daniel WA (2008): Caffeine as a marker substrate for testing cytochrome P450 activity in human and rat. *Pharmacol Rep* 60, 789-97
- Krämer SD, Testa B (2008): The biochemistry of drug metabolism-an introduction: part 6. Inter-individual factors affecting drug metabolism. *Chem Biodivers.* 5, 2465-578
- Krämer SD, Testa B (2009): The biochemistry of drug metabolism-an introduction: part 7. Intra-individual factors affecting drug metabolism. *Chem Biodivers.* 6, 1477-660
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD (2001): Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27, 383-91
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN (1998): Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 279, 1200-5
- Lelo A, Birkett DJ, Robson RA, Miners JO (1986 a): Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *Br J Clin Pharmacol* 22, 177-82
- Lelo A, Miners JO, Robson RA, Birkett DJ (1986 b): Quantitative assessment of caffeine partial clearances in man. *Br J Clin Pharmacol* 22, 183-6
- Lennernäs H (2009): Ethanol-drug absorption interaction: potential for a significant effect on the plasma pharmacokinetics of ethanol vulnerable formulations. *Mol Pharm* 6, 1429-40
- Lindopharm GmbH (2004); Fachinformation Percoffedrinol® N

- Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, Gut I, Lathrop M, Collins R (2008): SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med* 359, 789-99
- Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ, Xie HG (2007): Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 39, 699-721
- Miao J, Jin Y, Marunde RL, Gorski CJ, Kim S, Quinney S, Radovich M, Li L, Hall SD (2009): Association of genotypes of the CYP3A cluster with midazolam disposition in vivo. *Pharmacogenomics J* 9, 319-26
- Nebert DW, Russell DW (2002): Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155-62.
- Newton R, Broughton LJ, Lind MJ, Morrison PJ, Rogers HJ, Bradbrook ID (1981): Plasma and salivary pharmacokinetics of caffeine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 21, 45-52
- Özdemir V, Kalow W, Tang BK, Paterson AD, Walker SE, Endrenyi L, Kashuba AD (2000): Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* 10, 373-88
- Penno MB, Dvorchik BH, Vesell ES (1981): Genetic variation in rates of antipyrine metabolite formation: A study in uninduced twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 5193-6
- Perera V, Gross AS, Xu H, McLachlan AJ (2011): Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva, and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics. *J Pharm Pharmacol* 63, 1161-8
- Persky AM, Eddington ND, Derendorf H (2003): A review of the effects of chronic exercise and physical fitness level on resting pharmacokinetics. *Int J Clin Pharmacol Ther* 41, 504-16
- Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, Farrar K, Park BK, Breckenridge AM (2004): Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ* 329, 15-9

- Quintieri L, Palatini P, Nassi A, Ruzza P, Floreani M (2008): Flavonoids diosmetin and luteolin inhibit midazolam metabolism by human liver microsomes and recombinant CYP 3A4 and CYP3A5 enzymes. *Biochem Pharmacol* 75, 1426-37
- Rahmioglu N, Heaton J, Clement G, Gill R, Surdulescu G, Zlobecka K, Hodgkiss D, Ma Y, Hider RC, Smith NW, (2011): Genetic epidemiology of induced CYP3A4 activity. *Pharmacogenet Genomics* 21, 642-51
- Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, Brøsen K (2002): The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. *Pharmacogenetics* 12, 473-8
- Rassow J: Reaktion auf Fremdstoffe: Entgiftung; in: *Biochemie*. 1. Auflage; hrsg. v. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006, 756-62
- Rijdsdijk FV, Sham PC (2002): Analytic approaches to twin data using structural equation models. *Brief Bioinform* 3, 119-33
- Roche (2008): Fachinformation Dormicum® Injektionslösung
- Rodenburg EM, Eijgelsheim M, Geleijnse JM, Amin N, van Duijn CM, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH, Visser LE (2012): CYP1A2 and coffee intake and the modifying effect of sex, age, and smoking. *Am J Clin Nutr* 96, 182-7
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I (1997): Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60, 284-95
- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I (1999): Functional significance of a C → A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *Br J Clin Pharmacol* 47, 445-9
- Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J, Garner RC, Boobis AR, Wolf CR, Gooderham NJ (2003): Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele

- frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 55, 68-76
- Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP (1994): Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270, 414-23
 - Soldin OP, Mattison DR (2009): Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 48, 143-57
 - STADApharm (2010): Fachinformation Simvastatin STADA® 5 mg/ 10 mg/ 20 mg/ 40 mg Filmtabletten
 - Starke K: Pharmakologie noradrenerger und adrenerger Systeme – Pharmakotherapie des Asthma bronchiale - Doping; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 10. Auflage; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Elsevier, München 2009, 161-99
 - Thorn CF, Aklillu E, Klein TE, Altman RB (2012): PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP1A2. *Pharmacogenet Genomics* 22, 73-7
 - Thummel KE, Shen DD, Isoherran N, Smith HE: Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetic data; in: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics; 11. Auflage; hrsg. v. Brunton LL, Lazo JS, Parker K; McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York 2005, 1787-888
 - Turnheim K: Diuretika; in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 10. Auflage; hrsg. v. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K; Elsevier, München 2009, 509-23
 - Vesell ES (1991): Genetic and environmental factors causing variation in drug response. *Mutat Res* 247, 241-57
 - Vesell ES, Page JG (1968 a): Genetic Control of Dicumarol Levels in Man. *J Clin Invest* 47, 2657-63

- Vesell ES, Page JG (1968 b): Genetic Control of Drug Levels in Man: Phenylbutazone. *Science* 159, 1479-80
- Vesell ES, Page JG (1968 c): Genetic Control of Drug Levels in Man: Antipyrine. *Science* 161, 72-3
- Vesell ES, Page JG (1969): Genetic Control of the Phenobarbital-Induced Shortening of Plasma Antipyrine Half-Lives in Man. *J Clin Invest* 48, 2202-9
- Visscher PM, Hill WG, Wray NR (2008): Heritability in the genomics era - concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet* 9, 255-66
- Wilkinson GR (2005): Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 352, 2211-21
- Wong AH, Gottesman II, Petronis A (2005): Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet* 14, 11-8
- Yang A, Palmer AA, de Wit H (2010): Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology* 211, 245-57
- Yousef AM, Arafat T, Bulatova NR, Al-Zumyly R (2008): Smoking behaviour modulates pharmacokinetics of orally administered clopidogrel. *J Clin Pharm Ther* 33, 439-49
- Yu KS, Cho JY, Jang IJ, Hong KS, Chung JY, Kim JR, Lim HS, Oh DS, Yi SY, Liu KH, (2004): Effect of the CYP3A5 genotype on the pharmacokinetics of intravenous midazolam during inhibited and induced metabolic states. *Clin Pharmacol Ther* 76, 104-12
- Zadoyan G, Fuhr U (2012): Phenotyping studies to assess the effects of phytopharmaceuticals on in vivo activity of main human cytochrome p450 enzymes. *Planta Med* 78, 1428-57
- Zomorodi K, Donner A, Somma J, Barr J, Sladen R, Ramsay J, Geller E, Shafer SL (1998): Population pharmacokinetics of midazolam administered by target controlled infusion for sedation following coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology* 89, 1418-29

Danksagung

Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. J. Brockmüller für das freundliche Überlassen des Dissertationsthemas und die kontinuierliche Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. C. Sachse-Seeboth und Herrn D. Sehrt für die kollegiale Zusammenarbeit auf der Probandenstation und Herrn J. Matthaei für die dortige Einarbeitung und die konstruktive Zusammenarbeit darüber hinaus. Weiterhin danke ich den Labormitarbeiterinnen und -mitarbeitern der Klinischen Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen – insbesondere Frau K. Jobst und Herrn PD Dr. Tzvetkov – und des Dr.-Margarete-Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie Stuttgart – insbesondere Frau Dr. Hofmann.