
Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Bedeutung erblicher Faktoren für die
Variabilität der Pharmakokinetik von
Arzneimitteln im Vergleich zwischen oraler
und intravenöser Dosierung anhand einer
Zwillingsstudie**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Stefanie Becker (geb. Brunke)

aus

Bremervörde

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in Prof. Dr. med. J. Brockmüller
Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. H. Bickeböller
Drittreferent/in: Prof. Dr. med. D. Degner

Datum der mündlichen Prüfung: 29.09.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Bedeutung erblicher Faktoren für die Variabilität der Pharmakokinetik von Arzneimitteln im Vergleich zwischen oraler und intravenöser Dosierung anhand einer Zwillingsstudie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Pharmakogenetik und -genomik	2
1.1.1 Individuelle Unterschiede in Arzneimittelwirkungen	2
1.1.2 Ursachen der Unterschiede in Arzneimittelwirkungen	4
1.1.3 Medizinische Bedeutung der Pharmakogenetik und Anwendung in der Praxis	6
1.2 Pharmakokinetik	7
1.2.1 Unterschiede in der intravenösen und oralen Dosierung	7
1.2.2 Arzneistofftransport	9
1.2.3 Arzneistoffmetabolismus	10
1.2.4 Cytochrom-P450-Enzyme.....	11
1.3 Variationen von OATP1B1, CYP2C9 und CYP3A4.....	13
1.3.1 Das Transportprotein OATP1B1.....	13
1.3.2 Das Enzym CYP2C9.....	14
1.3.3 Das Enzym CYP3A4	16
1.4 Die <i>In-vivo</i> -Indikatorsubstanzen Torasemid und Midazolam.....	19
1.4.1 OATP1B1 und CYP2C9: Testsubstanz Torasemid	19
1.4.2 CYP3A4: Testsubstanz Midazolam	20
1.5 Die Rolle der Zwillingsstudie	21
1.6 Aufgabenstellung	25
1.6.1 Fragestellungen und Ziele der Arbeit.....	25
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Klinische Studie	27
2.1.1 Konzept.....	27
2.1.2 Studienübersicht.....	27
2.1.3 Prüfmedikation.....	31
2.1.4 Probandenauswahl	32
2.1.5 Allgemeine Vorschriften und Regelungen zur Studie.....	34
2.2 Arzneimittel-analytische Methoden.....	36
2.3 Molekulargenetische Methoden	37
2.4 Pharmakokinetische Analysen	38
2.4.1 Pharmakokinetische Parameter und deren Berechnung	38
2.4.2 Pharmakokinetische Modelle.....	41

2.5	Statistische Methoden	41
2.5.1	Berechnung der Erblichkeit.....	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Die untersuchte Stichprobe	44
3.2	Häufigkeit der Genvarianten OATP1B1, CYP2C9 und CYP3A4	46
3.3	Variabilität von OATP1B1 und CYP2C9 gemessen mit Torasemid als <i>In-vivo</i> -Indikatorsubstanz	48
3.3.1	Pharmakokinetik von Torasemid nach oraler Applikation	48
3.3.2	Pharmakokinetik von Torasemid nach intravenöser Applikation	51
3.3.3	Erblichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Torasemid.....	52
3.4	Absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid	57
3.4.1	Erblichkeitsberechnung von F nach Falconer und Vesell	60
3.4.2	Erblichkeitsberechnung von F mittels Strukturgleichungsmodellanalyse	61
3.5	Berücksichtigung der bekannten Genvarianten von OATP1B1 und CYP2C9	62
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse zu Torasemid	64
3.7	Variabilität der Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid	66
3.7.1	Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid nach oraler Applikation.....	66
3.7.2	Erblichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid	67
3.8	Variabilität von CYP3A4 gemessen mit Midazolam als <i>In-vivo</i> -Indikatorsubstanz	69
3.8.1	Pharmakokinetik von Midazolam nach oraler Applikation	69
3.8.2	Pharmakokinetik von Midazolam nach intravenöser Applikation	71
3.8.3	Erblichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Midazolam.....	72
3.9	Absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Midazolam	78
3.9.1	Erblichkeitsberechnung von F nach Falconer und Vesell	81
3.9.2	Erblichkeitsberechnung von F mittels Strukturgleichungsmodellanalyse	82
3.10	Berücksichtigung der bekannten Genvarianten von CYP3A4.....	83
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse zu Midazolam	84
3.12	Variabilität der Pharmakokinetik von Hydroxymidazolam	86
3.12.1	Pharmakokinetik von Hydroxymidazolam nach oraler Applikation.....	86
3.12.2	Erblichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Hydroxymidazolam	87
4	Diskussion	89
4.1	Die OATP1B1- und CYP2C9-Aktivität.....	90
4.1.1	Pharmakokinetik von Torasemid	90
4.1.2	Erblichkeit der Pharmakokinetik von Torasemid.....	92
4.1.3	Erblichkeit der absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid	97
4.2	Die CYP3A4-Aktivität.....	99
4.2.1	Pharmakokinetik von Midazolam	99
4.2.2	Erblichkeit der Pharmakokinetik von Midazolam	101
4.2.3	Erblichkeit der absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) von Midazolam	104
4.3	Diskussion der Methoden der Erblichkeitsberechnung.....	107

4.4	Ausblick	110
5	Zusammenfassung.....	112
6	Literaturverzeichnis.....	114

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Weg eines oral verabreichten Medikaments	8
Abbildung 2 Erblichkeitsberechnungen nach Vesell	23
Abbildung 3 Grundlagen der Strukturgleichungsmodellierung	24
Abbildung 4 Konzentrations-Zeit-Kurven nach oraler und intravenöser Arzneimittelapplikation.....	40
Abbildung 5 Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid nach oraler Applikation.....	49
Abbildung 6 Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid nach oraler Applikation.....	49
Abbildung 7 Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid intravenös.....	51
Abbildung 8 Korrelationsgraphen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach oraler Torasemidapplikation.....	52
Abbildung 9 Häufigkeitsverteilungen von F nach Torasemidapplikation.....	59
Abbildung 10 Korrelationsgraphen von F für Torasemid	61
Abbildung 11 Zusammenfassende Darstellung der Erblichkeit der Aktivität von OATP1B1 und CYP2C9	65
Abbildung 12 Einflüsse auf F von Torasemid.....	66
Abbildung 13 Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam nach oraler Applikation.....	69
Abbildung 14 Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam nach oraler Applikation.....	70
Abbildung 15 Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam intravenös.....	72
Abbildung 16 Korrelationsgraphen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach oraler Midazolamapplikation.....	73
Abbildung 17 Häufigkeitsverteilungen von F nach Midazolamapplikation	80
Abbildung 18 Korrelationsgraphen von F für Midazolam	81
Abbildung 19 Zusammenfassende Darstellung der Erblichkeit der Aktivität von CYP3A4	85
Abbildung 20 Einflüsse auf F von Midazolam	85
Abbildung 21 Erblichkeit der OATP1B1- und CYP2C9-Aktivität im Vergleich oral und intravenös	96
Abbildung 22 F von Torasemid, unterteilt nach bekannten Genvarianten.....	97
Abbildung 23 F von Midazolam, unterteilt nach bekannten Genvarianten.....	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Individuelle Unterschiede in der Arzneimittelwirkung	4
Tabelle 2 Umweltfaktoren mit Einfluss auf Arzneimittel-Pharmakokinetik	5
Tabelle 3 Faktoren mit Einfluss auf die enterale Resorption.....	9
Tabelle 4 Vorkommen und Eigenschaften vier beispielhafter Transportproteine	10
Tabelle 5 Vorkommen und Eigenschaften ausgewählter CYP-Enzyme	12
Tabelle 6 Anteil der CYP2C9-Genotypen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen.....	15
Tabelle 7 Allelvarianten im CYP2C9-Polymorphismus	16
Tabelle 8 Substrate des Enzyms CYP3A4.....	17
Tabelle 9 Inhibitoren und Induktoren des Enzyms CYP3A4	18
Tabelle 10 Anforderung an die klassische Zwillingstudie	24
Tabelle 11 Studienübersicht.....	28
Tabelle 12 Studienablauf der TWINS-II-Studie	29
Tabelle 13 Zeitplan beider Studienperioden.....	30
Tabelle 14 Prüfmedikation der Studienperiode I und II	32
Tabelle 15 Demographische Daten der betrachteten Studienpopulation	44
Tabelle 16 SAE der gesamten TWINS-II-Studie	45
Tabelle 17 Häufigkeiten bekannter Varianten im OATP1B1-Polymorphismus	46
Tabelle 18 Häufigkeiten bekannter OATP1B1-Genotypen.....	47
Tabelle 19 Häufigkeiten bekannter CYP2C9-Genotypen.....	47
Tabelle 20 Häufigkeiten bekannter CYP3A4-Genotypen	48
Tabelle 21 Analyse der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Torasemidapplikation	50
Tabelle 22 Korrelationen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach Torasemidapplikation	55
Tabelle 23 Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell nach Torasemidapplikation...	56
Tabelle 24 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erblichkeit der AUC_{inf} nach oraler Torasemiddosierung	57
Tabelle 25 Analyse von F für Torasemid	58
Tabelle 26 F von Torasemid, unterteilt nach Genvarianten.....	60
Tabelle 27 Korrelationen von F für Torasemid	61
Tabelle 28 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erblichkeit von F für Torasemid	62
Tabelle 29 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf die AUC_{inf} nach oralen Torasemidgabe	63
Tabelle 30 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf F von Torasemid.....	64
Tabelle 31 Analyse der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxytorasemid nach oraler Applikation.....	67
Tabelle 32 Korrelationen des Metaboliten Hydroxytorasemid nach Torasemidapplikation	68
Tabelle 33 Analyse der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Midazolamapplikation ...	71
Tabelle 34 Korrelationen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach Midazolamapplikation.....	76
Tabelle 35 Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell nach Midazolamapplikation .	77

Tabelle 36 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erbllichkeit der AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation.....	78
Tabelle 37 Analyse von F für Midazolam	79
Tabelle 38 F von Midazolam, unterteilt nach Genvarianten.....	81
Tabelle 39 Korrelationen von F für Midazolam	82
Tabelle 40 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erbllichkeit von F für Midazolam	82
Tabelle 41 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf die AUC_{inf} nach oraler Midazolamgabe.....	83
Tabelle 42 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf F von Midazolam	84
Tabelle 43 Analyse der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxymidazolam nach oraler Applikation.....	86
Tabelle 44 Korrelationen des Metaboliten Hydroxymidazolam nach Midazolamapplikation ...	87
Tabelle 45 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten zur Pharmakokinetik nach oraler Torasemidapplikation.....	91
Tabelle 46 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten der oralen Bioverfügbarkeit von Torasemid.....	92
Tabelle 47 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten zur Pharmakokinetik nach oraler Midazolamapplikation.....	100
Tabelle 48 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten der oralen Bioverfügbarkeit von Midazolam.....	101

Abkürzungsverzeichnis

AE	unerwünschtes Ereignis (<i>adverse event</i>)
AIC	Akaike-Informationskriterium (<i>akaike information criterion</i>)
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>area under the curve</i>)
BMI	Body-Mass-Index
Cl	Clearance
C _{max}	Maximalkonzentration einer Substanz im Blut
CRF	Dokumentationsbogen (<i>case report form</i>)
CYP	Cytochrom-P-450-Enzym
CYP2C9	Cytochrom-P-450-Enzym 2C9
CYP3A4	Cytochrom-P-450-Enzym 3A4
D	Dosis
DZ	dizygot
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F	absolute orale Bioverfügbarkeit
GCP	Gute Klinische Praxis (<i>good clinical practice</i>)
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>good manufacturing practice</i>)
h ²	Erblichkeit (<i>heritability</i>)
H ^{2(F)}	Erblichkeit nach Falconer
H ^{2(V)}	Erblichkeit nach Vesell
i. v.	intravenös
MDMA	3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin
MRT	mittlere Residenzzeit (<i>mean residence time</i>)
MZ	monozygot
NSAR	nichtsteroidale Antiphlogistika (<i>Antirheumatika</i>)
OATP1B1	Organisches Anionen Transport Polypeptid 1B1
SAE	schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (<i>serious adverse event</i>), ohne Klärung der Kausalität
Sd	Studientag (<i>studyday</i>)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
t _{½ Lambda z}	terminale Halbwertszeit
t _{½ α}	initiale Halbwertszeit
t _{½ β}	terminale Halbwertszeit beim 2-Kompartiment-Modell
THC	Tetrahydrocannabinol
t _{max}	Zeit zwischen Arzneimittelapplikation und Erreichen der maximalen Plasmakonzentration C _{max}
V _c	zentrales Verteilungsvolumen
V _g	genetische Variation
V _{iE}	Variation durch individuelle Umwelteinflüsse (<i>environmental</i>)
V _P	phänotypische Variation
V _{sE}	Variation durch gemeinsame Umwelteinflüsse (<i>shared environmental</i>)
V _{ss}	Verteilungsvolumen im <i>steady state</i>

1 Einleitung

„Ein Arzneimittel, von dem behauptet wird, dass es keine Nebenwirkungen habe, steht im dringenden Verdacht, auch keine Hauptwirkung zu besitzen“ (Kuschinsky 2016, S. 23). Der Mainzer Pharmakologe Prof. Gustav Kuschinsky machte mit diesem Zitat deutlich, dass in der Therapie mit Arzneimitteln neben der gewünschten Wirkung eines Medikaments häufig mit Nebenwirkungen gerechnet werden muss. Die Erforschung der Ursachen von Wirkung und Nebenwirkungen von Arzneimitteln sind demnach zentrale Aufgaben der pharmakologischen Forschung.

Dabei ist allgemein bekannt, dass die Wirkung von Medikamenten bei Menschen ganz unterschiedlich ausfallen kann und somit eine sehr große interindividuelle Variabilität in der erwarteten Wirkung von Medikamenten besteht. Über die Benzodiazepine weiß man beispielsweise, dass sie in ihrer Wirkstärke interindividuell stark variieren können (Olkola und Ahonen 2008). Aber auch für andere Medikamente ist dies in der klinischen Praxis eine alltägliche Problematik. So erzielt eine medikamentöse Therapie oft nur bei 30 bis 60 Prozent der Patienten die gewünschte Wirkung (Spear et al. 2001).

Ebenso verhält es sich mit den unerwünschten Wirkungen von Arzneimitteln. Eine im *Journal of the American Medical Association* publizierte Studie zeigte hierzu, dass in den USA jährlich ca. 100.000 Patienten an den Folgen unerwünschter Nebenwirkungen von Medikamenten sterben; die Zahl der schweren Nebenwirkungen ohne Todesfolge wurde dabei auf 2,2 Millionen Patienten geschätzt (Lazarou et al. 1998). In einer prospektiven englischen Studie wurde dargelegt, dass von 18.820 Krankenhauseinweisungen 1.225 aufgrund unerwünschter Arzneimittelwirkungen erfolgen. Dies entspricht einem Anteil von 6,5 Prozent. Dadurch entstehe zudem eine zusätzliche finanzielle Belastung von bis zu 466 Millionen Pfund (entspricht 706 Millionen Euro) pro Jahr (Pirmohamed et al. 2004). Auch in Deutschland lassen sich vergleichbare Daten finden. In einer aktuellen deutschen Studie wurden 10.174 Patienten untersucht, die sich in einer Notaufnahme in vier verschiedenen deutschen Städten vorstellten. Davon wurden 665 Patienten (was einen Anteil von 6,5 Prozent ausmacht) detektiert, die aufgrund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen vorstellig waren. Häufig führten diese Vorstellungen dann auch zur stationären Aufnahme (Schurig et al. 2018). Dies wiederum kann zu einer körperlichen sowie psychischen Belastung für den Patienten aber auch zu einer finanziellen Belastung des Gesundheitssystems führen (Rottenkolber et al. 2011).

Eines der zentralen Ziele der *individualisierten* oder *personalisierten* Medizin ist die exakte Anpassung von Arzneimitteldosierungen an den individuellen Bedarf eines Patienten, um so insbesondere Über- oder Unterdosierungen zu vermeiden und Kosten, die sonst aufgrund unerwarteter Nebenwirkungen anfallen würden, zu sparen (Meyer et al. 2013). Dabei spielen neben Umwelteinflüssen ebenso erblich bedingte Faktoren auf den Metabolismus und somit auf die Wirkung eines Arzneimittels eine wichtige Rolle. Im klinischen Alltag werden die meisten Medikamente bekanntlich oral verabreicht, sodass ein großes Interesse an einem guten Verständnis der Wirkungen und Nebenwirkungen nach oraler Verabreichung besteht.

Mittels molekulargenetischer Methoden ist es zunehmend möglich, die genetischen Varianten in den Arzneimittel-metabolisierenden Transportern und Enzymen zu entschlüsseln, um so die interindividuellen Unterschiede in der Aktivität, Funktion und Expression dieser Transporter und Enzyme erklären zu können. Lässt sich in klinischen Studien ein signifikanter Hinweis auf den Einfluss genetischer Varianten auf die Medikamentenwirkung nachweisen, so könnten in der klinischen Praxis genetische Analysen vor Therapiebeginn etabliert werden, um so dem Ziel einer *individualisierten* Medizin etwas näherzukommen.

1.1 Pharmakogenetik und -genomik

1.1.1 Individuelle Unterschiede in Arzneimittelwirkungen

Eine Arzneimitteltherapie kann in der gleichen Dosierung bei einigen Menschen unwirksam sein, bei anderen zu gravierenden Nebenwirkungen führen und wiederum bei anderen den gewünschten therapeutischen Effekt erbringen (Vesell 1989). Aus den zuvor genannten Studien und Metaanalysen wird ersichtlich, dass unerwünschte Wirkungen von Arzneimitteln oft schwer vorhersehbar und einzuschätzen sind. Faktoren wie Geschlecht, Alter, Körpergewicht oder Nierenerkrankungen können dabei zu individuell unterschiedlichen Arzneimittelwirkungen führen. Ebenso können erbliche Variationen, die einen Einfluss auf den Arzneimittelmetabolismus ausüben, individuell unterschiedliche Arzneimittelwirkungen hervorrufen. Dies wird jedoch in der täglichen medizinischen Praxis noch zu wenig berücksichtigt (Schwab et al. 2011).

Das Gebiet der Pharmakogenetik und -genomik stellt die genetische Variabilität in den Mittelpunkt, die sowohl die pharmakokinetischen als auch die pharmakodynamischen Eigenschaften eines Arzneistoffes beeinflussen (Evans und McLeod 2003). Hinsichtlich der Pharmakokinetik bedeutet dies, dass eine Vielzahl von Enzymen und Transportern im Arzneimittelmetabolismus durch sogenannte genetische Polymorphismen in ihrer Aktivität beeinflusst ist (Evans und Relling 1999).

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich vor allem mit der Erforschung bestimmter Varianten eines einzelnen Gens, wohingegen der Bereich der Pharmakogenomik die gesamten Gene eines Organismus untersucht. Gelegentlich werden die beiden Begriffe auch synonym benutzt (Evans und McLeod 2003).

Der Begriff der Pharmakogenetik wurde 1959 von dem Heidelberger Humangenetiker Vogel geprägt. Einige Jahre davor diskutierte schon Motulsky in einem ersten Review zu diesem Themengebiet, dass die interindividuellen Unterschiede in der Arzneimittelwirkung genetischen Ursprungs sein könnten (Motulsky 1957). Vesell führte erste Studien mit mono- und dizygoten Zwillingen durch, um diese vermuteten genetischen Zusammenhänge nachweisen zu können (Vesell und Page 1968a, Vesell und Page 1968b, Vesell und Page 1968c). Damals waren jedoch die spezifischen Transportproteine und Enzyme noch nicht entdeckt. Untersuchungen zu den Medikamenten Spartein (Eichelbaum et al. 1979) sowie Debrisoquin (Mahgoub et al. 1977) führten zu der Entdeckung des zunächst als Spartein/Debrisoquin bezeichneten Polymorphismus, der später als CYP2D6-Polymorphismus bezeichnet wurde. Dabei fand sich Mitte der 1970er Jahre, dass es zwei klar differenzierbare Untergruppen in der Bevölkerung gab; zum einen die schnellen Metabolisierer (*extensive metabolizer*) und zum anderen die langsamen Metabolisierer (*poor metabolizer*) (Mahgoub et al. 1977; Eichelbaum et al. 1979; Eichelbaum und Burk 2001). Dies bildete den Grundstein dafür, dass etwa 15 Jahre später die molekulargenetischen Ursachen der Variabilität vieler erblich variabler Cytochrom-P450-Enzyme entschlüsselt werden konnten. Ein weiterer Durchbruch war die Erkenntnis, dass sich Arzneimittelwirkungen nicht nur interindividuell unterscheiden können, sondern auch zwischen einzelnen Populationen erhebliche Unterschiede bestehen können (Kalow 1982). Ende der 1980er Jahre wurden im Weiteren die ersten molekulargenetischen Nachweise des CYP2D6-Polymorphismus etabliert (Gonzalez et al. 1988). Dies war ein weiterer Meilenstein in der pharmakogenetischen Forschung. Konnten zuvor nur ausgehend vom Phänotyp (z. B. der Blutkonzentration oder der Halbwertszeit) Rückschlüsse auf die genetischen Zusammenhänge gezogen werden, so gab es nun erste Methoden die zugrundeliegenden Genotypen zu bestimmen. So konnten über die folgenden Jahre weitere CYP-Polymorphismen entschlüsselt werden.

Um die klinische Relevanz der Pharmakogenetik zu verdeutlichen, skizziert die Tabelle 1 einige unerwünschte Wirkungen, von denen entweder nur manche Patienten betroffen sind oder die bei manchen Patienten eine sehr starke Ausprägung haben, sowie die dazugehörigen und ursächlichen Genvarianten.

Tabelle 1 Individuelle Unterschiede in der Arzneimittelwirkung

Arzneimittel	Unerwünschte Wirkung	Ursächlicher Polymorphismus
Primaquin	Gravierende Hämolyse	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel
Succinylcholin	Gefährlich lange Muskellähmung	Varianten im Gen der Cholinesterase
Cumarine wie beispielsweise Warfarin oder Phenprocoumon	Schwere Blutungskomplikationen	Verminderte Vitamin-K-Epoxid-Reduktase-Aktivität
6-Mercaptopurin, Azathioprin	Stark ausgeprägte Myelosuppression	Thiopurin-Methyltransferasemangel

Tabelle nach Brockmüller und Tzvetkov 2008

1.1.2 Ursachen der Unterschiede in Arzneimittelwirkungen

Erbliche Faktoren können individuelle Unterschiede in der Arzneimittelwirkung bedingen. Die genetischen Ursachen liegen jedoch nicht immer in einem einzelnen Gen begründet. Es besteht vielmehr ein multifaktoriell bedingtes Zusammenspiel aus mehreren Genen und Gen-Gen-Interaktionen. Dabei stehen sogenannte genetische Polymorphismen im Vordergrund (Evans und McLeod 2003).

Als Polymorphismus definiert ist ein in mindestens zwei Ausprägungen (Phäno- bzw. Genotypen) in der Bevölkerung vorkommendes vererbtes Merkmal, welches mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent auftritt. Seltene genetische Variationen treten mit einem Vorkommen von weniger als einem Prozent auf (Eichelbaum et al. 2002). Genetische Polymorphismen lassen sich vor allem in den Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen, aber auch in Transportern und Rezeptoren von Arzneimitteln finden (Evans und Relling 1999) und bilden die Grundlage für die inter- und intraindividuellen Unterschiede in den Reaktionen auf Arzneimittel. Durch die Anfang der 2000er Jahre erfolgte Entschlüsselung des gesamten menschlichen Genoms (International Human Genome Sequencing Consortium 2004) und dem sich anschließenden „1000-Genome-Projekt“ (Sudmant et al. 2015) konnte mithilfe genomweiter Analysen sehr viel effektiver nach den Ursachen individueller

Nebenwirkungsrisiken gesucht werden. Durch diese Analysen wurden bis zu 80 Millionen unterschiedlicher sogenannter *Single-Nucleotide-Polymorphismen* (SNP) entdeckt, die zum Teil auch in kodierenden Regionen der Gene des Arzneimetabolismus liegen (Sachidanandam et al. 2001; Abecasis et al. 2010; Auton et al. 2015). Dabei umfasst diese extrem große Zahl aber auch seltene oder nur einmalig auftretende Varianten im menschlichen Genom.

Neben erblichen Faktoren können Umweltfaktoren die individuelle Variabilität in der Wirkweise und Wirkung von Medikamenten beeinflussen. In Tabelle 2 sind einige davon kurz erläutert.

Tabelle 2 Umweltfaktoren mit Einfluss auf Arzneimittel-Pharmakokinetik

Umweltfaktor	Beispiel	Auswirkung
Ernährung	Grapefruit	Ausgeprägte Interaktionen (Hemmung des Stoffwechsels) einer Vielzahl von Medikamenten wie Midazolam. Besonders betroffen ist das Enzym CYP3A4 (Kupferschmidt et al. 1995).
	Johanniskraut	Vermehrte Expression Arzneimittel-metabolisierender Enzyme und Membrantransporter (Wang et al. 2001)
Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten	NSAR und Glukokortikoide	Stark erhöhtes Risiko gastrointestinaler Blutungen (Piper et al. 1991)
	Acetylsalicylsäure und Ibuprofen	Steigerung der Rate gastrointestinaler Blutungen, vor allem bei älteren Menschen (Garcia Rodríguez und Hernández-Díaz 2001; Lapane et al. 2001)
Noxen	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe im Tabakrauch	Beeinflussung und Veränderung des Arzneimetabolismus, z. B. Induktion von CYP1A2 (Zevin und Benowitz 1999)
	Alkohol	Veränderung des Arzneimetabolismus, z. B. Induktion von CYP2E1 und der Alkoholdehydrogenase (Fraser 1997)

CYP=Cytochrom-P-450-Enzym, NSAR=nichtsteroidale Antiphlogistika (Antirheumatika)

Als weitere Ursachen der Unterschiede in Arzneimittelwirkungen sollten die individuellen Körper- und Organfunktionen berücksichtigt werden. So spielt beispielsweise das Alter und die damit

verbundenen verminderten oder veränderten Funktionen von Nieren und Leber eine Rolle. Das Körpergewicht sowie die Fettverteilung im Körper können Einfluss auf das Verteilungsvolumen und den Stoffwechsel von beispielsweise lipophilen Medikamenten nehmen. Zudem existiert zwischen Frauen und Männern sowie bei Schwangeren ein unterschiedliches Ansprechen auf einige Arten von Arzneimitteln (Soldin und Mattison 2009).

Natürlich muss der Patient das ihm verschriebene Arzneimittel auch einnehmen. Aus diesem Grunde ist die Compliance des Patienten ein nicht zu vernachlässigender Faktor, der für die Wirkung eines Medikamentes verantwortlich ist. Aus einer deutschen Studie im Jahr 2012 geht hervor, dass bis zu 33 Prozent der untersuchten Patienten ihre vom Arzt verordneten Medikamente nicht oder nicht richtig einnehmen (Glombiewski et al. 2012).

1.1.3 Medizinische Bedeutung der Pharmakogenetik und Anwendung in der Praxis

Eines der zentralen Ziele der Pharmakogenetik und -genomik ist die exakte Anpassung von Arzneimitteldosierungen an den individuellen Bedarf eines Patienten bzw. eine Stratifizierung von Patienten in unterschiedliche Gruppen mit daran angepasster Arzneimitteltherapie (Evans und McLeod 2003). Dadurch sollen insbesondere Über- oder Unterdosierungen vermieden und die Kosten, die sonst aufgrund unerwarteter Nebenwirkungen anfallen würden, gespart werden. Zunehmend werden auch Genvarianten identifiziert, mit denen sich zum Beispiel allergisch bedingte Nebenwirkungen voraussagen lassen. Auch dies kann zu einem besseren Nutzen-/Risiko-Verhältnis von Arzneimitteln beitragen, indem Risikogruppen entsprechend angepasst behandelt werden (Hughes et al. 2004).

Die Idee dabei ist, dass mittels spezieller Gentests aus einer Blutprobe oder einem Mundschleimhautabstrich des Patienten durch Bestimmung von Biomarkern dem Patienten eine angepasste Pharmakotherapie verschrieben werden kann. Begriffe wie *individualisierte* oder *personalisierte* Medizin werden hier oft in diesem Zusammenhang benutzt. Dabei ist es jedoch wichtig, von einer ganzheitlichen Betrachtung des Patienten auszugehen. Dies bedeutet, nicht nur die genetischen Anlagen des Patienten zu beachten, sondern weitere Einflüsse wie beispielsweise das Lebensalter, Geschlecht, Gewicht und die individuelle Lebensweise mit einzubeziehen (Schwab et al. 2011).

Eine klinische Anwendung pharmakogenomischer Forschung ist zum Beispiel die Zulassung des Medikaments Ivacaftor im Jahre 2012. Ivacaftor, dessen Handelsname Kalydeco lautet, wird zur Behandlung der zystischen Fibrose angewendet (Fachinformation Ivacaftor 2017). Das Medikament wirkt jedoch nur bei Patienten, die eine bestimmte Mutation im *cystic fibrosis transmembrane*

regulator (*CFTR*)- Gen aufweisen. Dazu zählen die Mutationen *G551D*, *G1244E*, *G1349D*, *G178R*, *G551S*, *S1251N*, *S1255P*, *S549N* und *S549R*. Das *CFTR*-Gen kodiert einen Chloridkanal, welcher für die Regulation von Chlorid- und Wassertransport in der Plasmamembran und Epithelzellen zuständig ist und welcher bei dieser Erkrankung defekt ist. Ivacaftor kann nun beispielsweise bei einer *G551D* Mutation direkt am *CFTR*-Gen eingreifen, seine Aktivität ändern und dadurch die Funktion verbessern (Eckford et al. 2012). Daraus resultiert bei den betroffenen Patienten eine signifikante Verbesserung der Lungenfunktion. Zudem konnte ein Rückgang von Schwere und Häufigkeit der typischerweise krankheitsbedingt auftretenden exazerbierten Bronchitis dokumentiert werden. Vor Behandlungsbeginn können durch validierte Genotypisierungsmethoden Patienten mit den passenden Mutationen herausgefiltert werden (Clancy et al. 2014).

1.2 Pharmakokinetik

1.2.1 Unterschiede in der intravenösen und oralen Dosierung

In der Regel gelangt ein Arzneimittel nach Zufuhr über die Blutgefäße zum Zielorgan, was auch als systemische Therapie bezeichnet wird. Dabei gibt es viele Möglichkeiten der Medikamentenapplikation. In dieser Arbeit wird die Pharmakokinetik nach intravenöser und oraler Applikation näher analysiert. Bei der intravenösen Injektion gelangt der Arzneistoff direkt in die Blutbahn und ist dem Organismus definitionsgemäß zu 100 Prozent bioverfügbar. Bei der oralen Applikation hingegen muss der Wirkstoff in der Regel zunächst die Dünndarmschleimhaut überwinden. Danach folgt die erste Passage über das Pfortadersystem durch die Leber. Viele Medikamente werden bereits beim Durchtritt durch die Darmschleimhaut und noch mehr dann bei der ersten Passage durch die Leber verstoffwechselt. Dieser sogenannte First-Pass-Metabolismus (auch First-Pass-Effekt) in Darm und Leber kann zur Folge haben, dass ein Pharmakon schon vor gewünschtem Wirkungseintritt weitgehend aus dem Blut entfernt wird (Gugeler und Klotz 2000; Mutschler et al. 2013). Im Vergleich zu einer intravenös applizierten Dosis ist die Bioverfügbarkeit bei oraler Applikation häufig vermindert, was sich durch den Parameter der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC) zeigen und quantitativ messen lässt (Gibaldi et al. 1971). Daraus erklärt sich, warum die orale Dosierung im Vergleich zur intravenösen Dosierung oft um ein Vielfaches höher sein muss, um die gleiche Wirkung zu erreichen. Es bestehen jedoch Schwierigkeiten bei einem Medikament nach oraler Dosierung zu zeigen, wie viel des First-Pass-Metabolismus im Darm und wie viel in der Leber stattfindet, da es in der Regel in der entsprechenden Forschung für Menschen nur schwer zumutbar ist, eine Konzentrationsanalyse im Pfortaderblut durchzuführen.

In der Abbildung 1 wird der zuvor beschriebene Weg eines oral verabreichten Medikaments mit seiner präsystemischen Elimination und der daraus resultierenden Bioverfügbarkeit veranschaulicht.

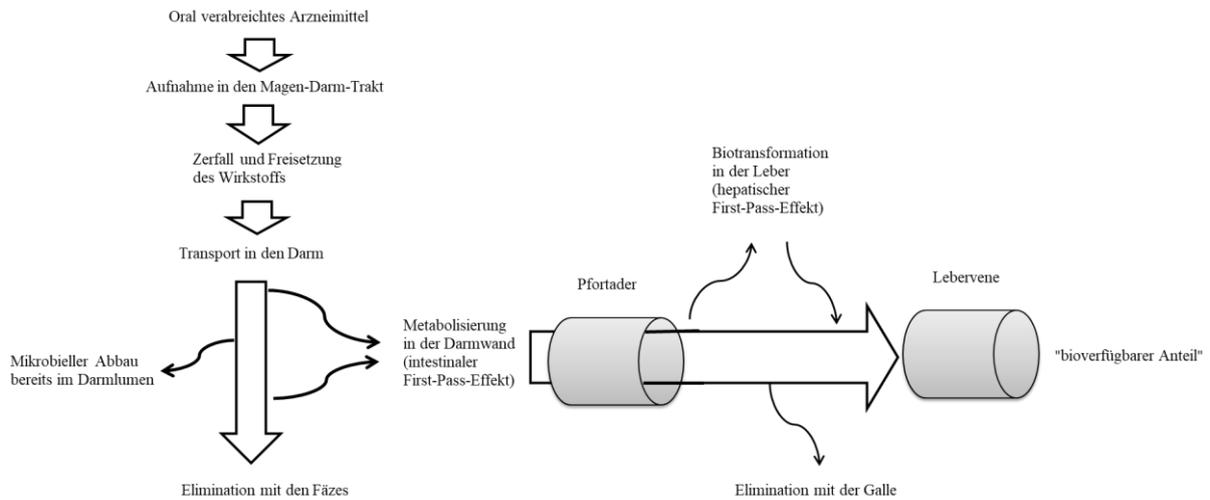


Abbildung 1 Weg eines oral verabreichten Medikaments

Im Gegensatz zur intravenösen Applikation wird die orale Arzneimittelresorption und damit die orale Bioverfügbarkeit eines Pharmakons durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Die Mucosa des Dünndarms stellt ein erstes Hindernis dar. In der Darmschleimhaut lassen sich Membrantransporter wie MDR1 und MRP2 sowie Phase I- und Phase II-Enzyme der Biotransformation detektieren, die für eine verminderte Absorption von Substanzen verantwortlich sein können (Chan et al. 2004). So konnte zum Beispiel ein Zusammenhang zwischen einer hohen intestinalen Expression von P-Glycoprotein-mRNA und einer verminderten oralen Bioverfügbarkeit von Cyclosporin nachgewiesen werden (Fricker et al. 1996). Zudem ist bekannt, dass die erste Cytochrom-P450-basierte Metabolisierung in den Enterozyten des Darms stattfindet, wobei das Enzym CYP3A4 eine große Rolle spielt (de Waziers et al. 1990).

Weitere wichtige Faktoren, die die enterale Resorption von oral eingenommenen Arzneimitteln beeinflussen, werden zusammenfassend in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Faktoren mit Einfluss auf die enterale Resorption

Beeinflussender Faktor	Beispiel
Substanzeigenschaft	Molekülgröße, Ladungszustände und Wasserlöslichkeit oder Lipophilie des Arzneimittels
Galenik	Löslichkeit, Lösungsgeschwindigkeit bzw. Zerfallsgeschwindigkeit des verabreichten pharmazeutischen Präparates
Anatomie	Oberfläche, Durchblutung und pH-Verhältnisse des Magen-Darm-Trakts
Beschleunigte oder verlangsamte Magenentleerungszeit und Darmpassage	Durch fettreiche, feste oder sehr warme Kost sowie durch Opiate verlangsamt; durch große Flüssigkeitsmengen oder Parasympathomimetika beschleunigt

Tabelle nach Schwab und Eichelbaum 2017, S. 35

1.2.2 Arzneistofftransport

Bei der Resorption eines Medikamentes über die Darmwand muss dieses sowohl die luminale (dem Darm zugewandte) Membran der Darmepithelzellen als auch anschließend die apikale (dem Körper zugewandte) Membran überwinden. Ebenso muss für die Biotransformation in der Leber das Arzneimittel zunächst über die Membran in die Leber transportiert werden und anschließend gegebenenfalls in die Galle ausgeschieden werden. Bei all diesen Membranpassagen spielen Transportproteine eine große Rolle. In der Literatur wird der Transport der Fremdstoffe häufig auch als Phase III der Biotransformation bezeichnet (Xu et al. 2005).

Da stets eine wachsende Zahl an Arzneimitteln identifiziert wird, die als Substrat oder sogar als Inhibitor von Transportern fungieren, wird der Forschung im Bereich der Transportproteine stetig mehr Wert zugeschrieben (Ho und Kim 2005). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Bewertung jedes einzelnen Transporters eine Herausforderung darstellt, da beispielsweise Substrate von OATP1B1 von anderen Transportproteinen oder von CYP-Enzymen beeinflusst werden können (Kivistö und Niemi 2007).

In Tabelle 4 sind vier beispielhafte Transportproteine mit deren Substrateigenschaft und Vorkommen genannt.

Tabelle 4 Vorkommen und Eigenschaften vier beispielhafter Transportproteine

Codierendes Gen	Transportprotein		Substrateigenschaft	Vorkommen	Beispiel für transportiertes Medikament
	Alternative Bezeichnung	Vollständiger Name			
<i>SLCO1B1</i>	OATP1B1 (Influx)	organic anion transporting polypeptides 1B1	Transport bei „physiologischem“ pH-Wert von ca. 7,4 negativ geladener organischer Anionen	Leber	Torasemid Pravastatin Valsartan Repaglinid
<i>SLC22A1</i>	OCT1 (Influx)	organic cation transporter 1	Transport positiv geladener organischer Kationen	Leber	Metformin Aciclovir Amantadin Sumatriptan
<i>ABCB1</i>	MDR1 (Efflux)	multi drug resistance 1	Transport apolarer (lipophiler) Substanzen	Darm, Leber, Niere, Gehirn, Plazenta	Talinolol Digoxin Dabigatran
<i>ABCC2</i>	MRP2 (Efflux)	multidrug resistance-associated protein 2	Transport organischer Anionen sowie Glucuronide	Darm, Leber, Niere, Gehirn	Cisplatin Indinavir

Tabelle nach Ho und Kim 2005 und nach US Food and Drug Administration 2018

Als Influx-Transportproteine sind Transporter bezeichnet, die ein Substrat in die Zelle hineintransportieren; als Efflux-Transportproteine werden die Transporter definiert, die ein Substrat aus der Zelle hinausbefördern.

1.2.3 Arzneistoffmetabolismus

Nach der Resorption und den ersten Transportvorgängen folgt bei der Mehrzahl aller Medikamente die Elimination durch metabolische Umwandlungen im Rahmen der Biotransformation. Die Ausscheidung der dann gebildeten Stoffwechselprodukte (Metaboliten) erfolgt im Anschluss entweder über die Leber in das biliäre System oder über die Niere in den Urin (Gugeler und Klotz 2000).

Im Wesentlichen lässt sich die Biotransformation in zwei Phasen einteilen. Während der Phase I (Funktionalisierungsreaktion) werden funktionelle Gruppen mittels Reaktionen wie Oxidation, Reduktion, Hydrolyse oder Hydratisierung in ein unpolares Molekül eingefügt. Zu den Phase-I-Enzymen zählen die Cytochrom-P450-Monooxygenasen, die bei der oxidativen Metabolisierung eine zentrale Rolle spielen. Während der Phase II (Konjugationsreaktion) werden die funktionellen Gruppen mit wasserlöslichen Molekülen gekoppelt. Die Phase II kann aber auch ohne Phase I

erfolgen. Bei einigen Medikamenten sind erst die Phase-I-Metaboliten pharmakologisch wirksam. Die Ausgangssubstanz wird dann als Pro-Drug bezeichnet (Mutschler et al. 2013).

1.2.4 Cytochrom-P450-Enzyme

Beim Abbau von endogenen Substanzen sowie körperfremden Stoffen wie Arzneimitteln, Karzinogenen und Umweltgiften, die als sogenannte Xenobiotika zusammengefasst werden, spielt das Cytochrom-P450-Enzymsystem eine wichtige Rolle (Martignoni et al. 2004). Cytochrom-P450-Enzyme kommen ubiquitär in fast allen Formen des Lebens auf der Erde vor und werden in einer Genfamilie zusammengefasst. Dabei erfolgt die Abgrenzung unter den einzelnen Enzymen über Strukturhomologien, die mit Ähnlichkeiten im Substratspektrum einhergehen. Dazu entwickelten Nebert und Gonzales Ende der 1980er Jahre eine Nomenklatur, in der hinter die Abkürzung CYP, die Familiennummer (z. B. CYP3), die Subfamilienbeschreibung (z. B. CYP3A) und die Nummer des einzelnen Isoenzym einer jeden Familie (z. B. CYP3A4) hinzugefügt werden. Mitglieder einer Familie weisen eine gemeinsame Strukturhomologie von über 40 Prozent, Mitglieder der Subfamilie eine gemeinsame Aminosäuresequenz von über 55 Prozent auf (Nebert und Gonzalez 1987; Nebert et al. 1991). Laut Nelson sind beim Menschen bisher 18 Subtypen mit 57 funktionell unterschiedlichen Enzymen detektiert worden (Nelson 2009). Davon besitzen die höchste Aktivität für den Medikamentenabbau in der menschlichen Leber die CYP-Enzyme CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A, die dadurch hauptverantwortlich für den hepatischen First-Pass-Metabolismus gemacht werden können (Shimada et al. 1994). Anzahl und Aktivität der CYP-Enzyme können individuell sehr variabel sein. Durch genetische Polymorphismen kann es zu einer verstärkten oder reduzierten Aktivität dieser Enzyme kommen. Daraus entstehen wiederum individuelle Unterschiede in der Wirkung von Medikamenten, die zum Beispiel zu Symptomen wie bei einer Über- oder Unterdosierung führen können (Eichelbaum et al. 2002). So konnten beispielsweise für CYP2D6 genetische Polymorphismen nachgewiesen werden, die zu einem völligen Fehlen des Enzyms führen (Sachse et al. 1997). Für die interindividuelle Aktivität von CYP3A4 hingegen spielen neben einigen bekannten Genpolymorphismen ebenso nicht-genetische Faktoren wie beispielsweise die Induktion und Inhibition von CYP-Enzymen durch andere Substanzen eine wesentliche Rolle (Liu et al. 2007). In der Tabelle 5 sind einige wichtige CYP-Enzyme sowie deren Substrate und Variationen benannt.

Tabelle 5 Vorkommen und Eigenschaften ausgewählter CYP-Enzyme

Abkürzung	Substrate	Erworbene Ursachen der Variation durch		Angeborene Ursachen der Variation
		Induktion	Inhibition	
CYP1A2	Coffein Theophyllin	Rauchen	Fluvoxamin	Kontrovers
CYP2C9	Torasemid Ibuprofen Warfarin Tolbutamid	Rifampicin Phenobarbital	Fluconazol Amiodaron	Zwei weltweit häufige Aminosäurevarianten und eine Vielzahl von Varianten, die nur in einzelnen ethnischen Gruppen gefunden wurde
CYP2C19	Omeprazol Clopidogrel Diazepam	Rifampicin	Omeprazol Moclobemid Fluvoxamin	Homozygote Genvariante ohne Enzymaktivität bei ca. 3 Prozent der europäischen Bevölkerung (bis zu 30 Prozent in anderen ethnischen Gruppen)
CYP2D6	Metoprolol Codein Amitriptylin	Bisher nicht bekannt	Paroxetin Fluoxetin	Über 100 verschiedene angeborene Varianten, die zu unterschiedlichster Enzymaktivität führen können
CYP3A4	Midazolam Cyclosporin Felodipin Simvastatin	Rifampicin Carbamazepin Phenytoin	Clarithromycin Indinavir Ketoconazol Ritonavir	Mehrere genetische Varianten

Tabelle nach Flockhart 2007 und nach US Food and Drug Administration 2018

Es besteht eine breite Substratspezifität vieler der Arzneimittel-metabolisierenden CYP-Enzyme. Dabei kann jedes der hier im Zusammenhang mit dem Arzneimittelstoffwechsel genannten CYP-Enzyme viele in der chemischen Struktur unterschiedliche Arzneimittel verstoffwechseln. Auf der anderen Seite werden viele Arzneimittel von mehreren unterschiedlichen CYP-Enzymen verstoffwechselt. Dabei katalysieren die unterschiedlichen Enzyme in der Regel die Bildung unterschiedlicher Stoffwechselprodukte (Metaboliten) (Shimada et al. 1994).

Die meisten CYP-Enzyme, die für den Arzneimetabolismus verantwortlich sind, werden im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten exprimiert (Shimada et al. 1994). Doch auch extrahepatisch konnte ein Vorkommen von CYP-Enzymen nachgewiesen werden. So befinden sich CYP-Enzyme in der obersten Schicht der Enterozyten im Dünndarm, die bei oraler Arzneiapplikation den intestinalen First-Pass-Effekt bedingen (de Waziers et al. 1990).

1.3 Variationen von OATP1B1, CYP2C9 und CYP3A4

In der vorliegenden Studie sollen erblich und nicht-erblich bedingte Unterschiede in der Aktivität des Transporters OATP1B1 sowie der CYP-Enzyme CYP2C9 und CYP3A4 untersucht werden. Daher wird für deren Gene im Folgenden dargestellt, was zu den molekularen Hintergründen der Variationen bereits bekannt ist.

1.3.1 Das Transportprotein OATP1B1

Im menschlichen Körper sind derzeit elf verschiedene OATP-Transporter bekannt, welche zu den Influx-Transportern zählen (Kalliokoski und Niemi 2009). Das Transportprotein OATP1B1, welches in der Literatur auch als OATP2, OATP-C oder LST-1 zu finden ist, wird an der basolateralen sinusoidalen Membran der menschlichen Hepatozyten exprimiert (Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999). Endogene Substrate, die OATP1B1 transportiert, sind konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin, Gallensäuren, Steroide, Eikosanoide und Schilddrüsenhormone (Abe et al. 1999; Hsiang et al. 1999). Exogene Substanzen sind unter anderem Torasemid, Pravastatin, Valsartan und Rifampicin (Vormfelde et al. 2008; Kalliokoski und Niemi 2009). Bei einer verminderten Aktivität des Transporters kann es in der Folge zu einer verminderten Elimination der OATP1B1-Substrate kommen. Dies kann sowohl durch genetische Variationen als auch durch Arzneimittelinteraktionen bedingt sein (Niemi et al. 2011). OATP1B1 wird durch das *SLCO1B1*-Gen kodiert, welches sich auf Chromosom 12 befindet (Kalliokoski und Niemi 2009). Für das *SLCO1B1*-Gen sind diverse Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) bekannt, die für eine große Variation der Aktivität von OATP1B1 ursächlich sind und so für einen interindividuell unterschiedlichen Transport von Arzneimitteln eine wichtige Rolle spielen (Tirona et al. 2001; Niemi 2007). Insbesondere gibt es zwei häufig vorkommende und gut erforschte SNP im *SLCO1B1*-Gen. Zum einen gibt es die Variante, bei der der Austausch der Aminosäure Valin durch Alanin (Val174Ala) zu einer verminderten Aktivität des OATP1B1 führt (Kameyama et al. 2005). Damit gekoppelt ist zum anderen häufig die Mutation, die einen Austausch der Aminosäure Asparagin durch Asparaginsäure (Asn130Asp) bedingt. Der Val174Ala-Polymorphismus und der Asn130Asp-Polymorphismus treten häufig als kombinierte Mutationen auf. Daraus resultieren die vier Haplotypen *OATP1B1*1a*=Asn130/Val174,

*OATP1B1*1b*=Asp130/Val174, *OATP1B1*5*=Asn130/Ala174 sowie *OATP1B1*15*=Asp130/Ala174. Hinzukommend zeigte sich in einer global umfassenden Analyse, dass genetische Variationen bezüglich der Allelfrequenzen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen existieren. Der Haplotyp *OATP1B1*1b* ist beispielsweise in allen Populationen weit verbreitet, jedoch bei Kaukasiern weniger als bei Afrikanern südlich des Äquators oder bei Ost-Asiaten. Dagegen existiert bei Kaukasiern und Asiaten der **15*-Haplotyp viel häufiger als bei der afrikanischen Bevölkerung (Pasanen et al. 2008).

HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine) sind die in klinischen Studien an Probanden und Patienten wohl am häufigsten untersuchten Arzneimittel in Bezug auf den *SLCO1B1*-Polymorphismus. Hierbei konnte vor allem eine Assoziation zwischen einer erhöhten Konzentration des Statins im Plasma mit dem Vorliegen des homozygoten Trägers von Alanin des Val174Ala-Polymorphismus gezeigt werden. Aus der verminderten Transportfunktion resultiert eine Akkumulation von Statinen im Plasma, was wiederum bei den Mutationsträgern das Risiko einer Statin-induzierten Myopathie erhöhen kann (Link et al. 2008; Mwinyi et al. 2004; Ho et al. 2007). In Studien mit dem Antidiabetikum Repaglinid konnte ebenfalls bei Probanden, die homozygote Träger des Alanins im Val174Ala-Polymorphismus waren, eine vielfach erhöhte Konzentration des Repaglinids gegenüber Trägern des Wildtyps des Val174Ala-Polymorphismus nachgewiesen werden. Dadurch kann sich bei den Mutationsträgern das Risiko Repaglinid-induzierter Hypoglykämien erhöhen (Niemi et al. 2005; Kalliokoski et al. 2008).

Neben dem genetischen Einfluss spielen auch Arzneimittelinteraktionen eine nicht zu unterschätzende Rolle auf den *SLCO1B1*-Polymorphismus. So konkurrieren beispielsweise Statine bei gleichzeitiger Gabe von anderen Substraten des *OATP1B1*-Transporters miteinander um die Aufnahme in die Leber und können so auch unabhängig vom Genotyp zu einer Medikamentenkumulation führen (Niemi et al. 2011). Es existieren des Weiteren Substanzen, die einen direkt hemmenden Effekt auf *OATP1B1* besitzen. Hierzu zählen unter anderem das Immunsuppressivum Cyclosporin (Neuvonen et al. 2006) oder auch Rifampicin (Vavricka et al. 2002).

1.3.2 Das Enzym CYP2C9

Das Enzym *CYP2C9* ist verantwortlich für den Abbau von ca. 10 bis 20 Prozent der im klinischen Alltag häufig verschriebenen Medikamente (Kirchheiner und Brockmöller 2005). Dazu zählen unter anderem das Schleifendiuretikum Torasemid, die Angiotensinrezeptorblocker Losartan und Irbesartan, orale Antidiabetika wie Glipizid oder Tolbutamid, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) wie Celecoxib oder Ibuprofen, der Gerinnungshemmer Warfarin sowie das Antikonvulsivum Phenytoin (Miners und Birkett 1998; Flockhart 2007). Induzierend auf *CYP2C9* wirken vor allem

Rifampicin und Carbamazepin; inhibierend wirken unter anderem Fluconazol und Amiodaron (Miners und Birkett 1998).

CYP2C9 wird in der menschlichen Leber exprimiert und ist an einer Vielzahl von Reaktionen im Arzneimittelstoffwechsel beteiligt (Goldstein und de Morais 1994). Zudem wurde es in geringer Konzentration im Darm detektiert (de Waziers et al. 1990). Mit den drei Isoenzymen CYP2C8, CYP2C18 und CYP2C19 bildet das Enzym CYP2C9 die CYP2C-Subfamilie. Die Gene befinden sich in einem Gencluster auf Chromosom 10 (Meehan et al. 1988). Für jedes Enzym sind genetische Polymorphismen bekannt (Goldstein 2001). Für die kodierenden Regionen des *CYP2C9*-Gens sind derzeit über 55 Einzelnukleotid-Polymorphismen mit stets wachsender Zahl beschrieben (Pharmacogene Variation Consortium 2002). Dabei existieren Allele mit funktioneller Auswirkung auf das CYP-Enzym (Lee et al. 2002). Bei der Häufigkeit dieser Varianten sind ethnische Unterschiede bekannt (Kirchheiner und Brockmüller 2005). So wurden die Allele *CYP2C9**2 und *CYP2C9**3 vor allem in der kaukasischen und nur mit geringerem Anteil in der afrikanischen Bevölkerung gefunden. Die Varianten *CYP2C9**4, *CYP2C9**5, *CYP2C9**6 und *CYP2C9**11 existieren dagegen vor allem bei Afrikanern (Allabi et al. 2004).

Tabelle 6 zeigt den prozentualen Anteil der CYP2C9-Genotypen zwischen den einzelnen ethnischen Populationen sowie die Auswirkung auf die Enzymaktivität.

Tabelle 6 Anteil der CYP2C9-Genotypen in unterschiedlichen ethnischen Gruppen

Ethnische Gruppe	<i>CYP2C9</i> *1/*1	<i>CYP2C9</i> *1/*2	<i>CYP2C9</i> *1/*3	<i>CYP2C9</i> *2/*2	<i>CYP2C9</i> *2/*3	<i>CYP2C9</i> *3/*3
Anteil bei Kaukasiern	65,3 %	20,4 %	11,6 %	0,9 %	1,4 %	0,4 %
Anteil bei Asiaten	96,5 %	0 %	3,5 %	0 %	0 %	0 %
Anteil bei Afrikanern	87,0%	8,7 %	4,3 %	0 %	0 %	0 %
Enzymaktivität	Normal	Minimal erniedrigt	Niedrig	Niedrig	Niedrig	Sehr niedrig

Tabelle nach Kirchheiner und Brockmüller 2005

Aus der Tabelle 6 ist ersichtlich, dass die Allele *2 und *3 zu einer niedrigen Enzymaktivität führen. Bei homozygoten Trägern von Allel *3 führt dies zu einer bis zu 75 Prozent reduzierten Clearance zahlreicher relevanter Medikamente im Vergleich zum Wildtyp. Bei heterozygoten Trägern liegt die Clearance zwischen 40 und 75 Prozent (Kirchheiner und Brockmüller 2005). Ursächlich hierfür ist ein

Austausch von Aminosäuren an für die Variation relevanter Lokalisation, wodurch neben den oben erwähnten ethnischen Unterschieden im CYP2C9-Polymorphismus zudem interindividuelle Variabilitäten innerhalb einer Population erklärbar sind (Stubbins et al. 1996). Die Tabelle 7 fasst dies zusammen.

Tabelle 7 Allelvarianten im CYP2C9-Polymorphismus

Allelvariante	Tausch der Aminosäure an relevanter Lokalisation	Allelfrequenz (bezogen auf kaukasische Population)
<i>CYP2C9*1 (Wildtyp)</i>	Arginin144/Isoleucin 359	79 %
<i>CYP2C9*2</i>	Cystein 144/Isoleucin 359	12,5 %
<i>CYP2C9*3</i>	Arginin 144/Leucin 359	8,5 %

Tabelle nach Stubbins et al. 1996

Unter normaler Dosierung von CYP2C9-Substraten kann es bei Vorliegen der beschriebenen Mutationen zu erheblichen unerwünschten Wirkungen kommen. Daher sollte vor allem bei Arzneimitteln mit einer geringen therapeutischen Breite eine Anpassung bzw. Reduktion der Dosis je nach Enzymaktivität erfolgen (Takanashi et al. 2000; Goldstein 2001). In klinischen Studien mit dem in Nordamerika und Asien häufig verwendeten Vitamin-K-Antagonisten Warfarin konnte der Zusammenhang zwischen homozygoten Defektallelträgern, erhöhten Warfarin-Plasmakonzentrationen und daraus resultierenden, zum Teil schweren Hämorrhagien gezeigt werden. Für heterozygote Genotypen liegt ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen vor (Taube et al. 2000; Redman 2001; Quteineh et al. 2005).

1.3.3 Das Enzym CYP3A4

Von allen heute typischerweise verordneten Medikamenten werden ca. 70 Prozent über die Leber ausgeschieden und von diesen 70 Prozent werden etwa 50 Prozent überwiegend oder teilweise von dem Enzym CYP3A4 verstoffwechselt (Ozdemir et al. 2000). Das Enzym CYP3A4 spielt zudem eine wesentliche Rolle beim Metabolismus endogener Steroide wie z. B. Östrogene (Waxman et al. 1988). Eine weitere Auswahl der CYP3A4-Substanzen ist in Tabelle 8 genannt.

Tabelle 8 Substrate des Enzyms CYP3A4

Substanzklasse	Vertreter	Substanzklasse	Vertreter
Immunsuppressiva (Calcineurininhibitor)	Tacrolimus	Chemotherapeutika	Doxorubicin
	Cyclosporin A		Vinblastin
Anxiolytika	Buspiron	Opioide	Alfentanil
			Codein
Benzodiazepine	Midazolam	Kalziumkanalblocker	Nifedipin
	Diazepam		Verapamil
Virostatika	Indinavir	Antibiotika	Clarithromycin
	Ritonavir		Erythromycin
PDE-5-Hemmer	Sildenafil	HMG-CoA-Reduktase-Hemmer	Atorvastatin
			Simvastatin

Tabelle nach Ozdemir et al. 2000 und nach Flockhart 2007

Das Enzym CYP3A4 ordnet sich mit weiteren Isoenzymen (CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43) in die CYP3A-Superfamilie ein (Eichelbaum und Burk 2001). Dabei weisen CYP3A4 und CYP3A5 eine große strukturelle Verwandtschaft und ein ähnliches Substratspektrum auf (Gorski et al. 1994). Die kodierenden Gene dieser Enzyme befinden sich auf Chromosom 7 (Inoue et al. 1992). Die Enzyme der CYP3A-Familie werden vorwiegend in der Leber exprimiert (Shimada et al. 1994). Zudem werden CYP3A4 sowie CYP3A5 auch im Interstitium exprimiert, wodurch sie mitverantwortlich für den intestinalen First-Pass-Effekt gemacht werden können (de Waziers et al. 1990; Kolars et al. 1994; Lown et al. 1994). Klinische Studien konnten zeigen, dass unterschiedliche CYP3A4-Aktivitäten eine bis zu 20-fache unterschiedliche Medikamenten-Clearance innerhalb einer Population hervorrufen können. Zudem bestehe für die CYP3A4-Expression in der Leber eine bis zu 50-fache Variabilität (Shimada et al. 1994; Wilkinson 1996). Dass genetische Ursachen hierbei eine Rolle spielen, konnte in ersten Zwillingsstudien Anfang der 1980er Jahre mit dem von CYP3A4 metabolisierten Phenazon bereits gezeigt werden (Penno et al. 1981). Phenazon ist in der entsprechenden Literatur auch weithin unter dem Warennamen Antipyrin bekannt. Allerdings war in der damaligen Zeit das verantwortliche Enzym noch nicht als CYP3A4 detektiert und auch in der heutigen Zeit ist nicht ohne jeden Zweifel klar, ob Phenazon ausschließlich über CYP3A4 verstoffwechselt wird. Jedoch kann diese offenbar erbliche Variabilität zu einem geringen Teil durch definierte Polymorphismen im Gen von CYP3A4 erklärt werden (Liu et al. 2007). Nicht-erbliche Faktoren wie Alter und Geschlecht (Hunt et al. 1992), Infektionen (Fukuda et al. 1992), Ernährung, wie zum Beispiel sehr stark CYP3A4 inhibierende

Inhaltsstoffe der Grapefruit (Arayne et al. 2005) und ethnische Herkunft (Miao et al. 2009) beeinflussen ebenso die Aktivität der CYP3A4-Enzyme. Zudem existiert eine Vielzahl von Substanzen, die als Induktoren oder Inhibitoren auf CYP3A4 wirken und in Tabelle 9 genannt sind.

Tabelle 9 Inhibitoren und Induktoren des Enzyms CYP3A4

Inhibitoren		Induktoren	
Substanzklasse	Vertreter	Substanzklasse	Vertreter
HIV-Virostatika	Indinavir Ritonavir	HIV-Virostatika	Efavirenz
Antibiotika	Clarithromycin Erythromycin	Antikonvulsiva	Carbamazepin
Antimykotika	Ketoconazol Fluconazol	Antibiotika	Rifampicin
Kalziumkanalblocker	Diltiazem Verapamil	Hormone	Glucocortikoide

Tabelle nach Flockhart 2007

Bei Erwachsenen weisen CYP3A4 und CYP3A5 mit mehr als 85 Prozent eine große strukturelle Verwandtschaft und zum Teil auch eine ähnliche Substratspezifität auf. CYP3A7 wird hingegen vor allem in der fetalen Leber exprimiert (Williams et al. 2002). Interessant ist, dass CYP3A4 häufig mit dem ABC-Transportprotein ABCB1, welches auch bekannt als *multiple drug resistance factor 1* (MDR1) oder P-Glykoprotein (P-gp) ist, in denselben Zellen vorkommt und beide Proteine viele gemeinsame Substrate, Induktoren und Inhibitoren vorweisen (Wacher et al. 1995).

Für CYP3A4 existieren diverse Allele, wobei in der Literatur für viele der Varianten kontrovers diskutiert wird, inwieweit die Funktion, Aktivität und Expression des Enzyms durch diese beeinflusst wird. In den häufig untersuchten Genvarianten *CYP3A4*1a* („Wildtyp“) und *CYP3A4*1b* (Austausch der Aminosäure Adenin zu Guanin an für Variation relevanter Lokalisation im Gen) konnte in Bezug auf das in dieser Arbeit untersuchte Medikament Midazolam keine wesentliche Änderung der Enzymaktivität gesehen werden (Miao et al. 2009). Eine bezüglich der funktionellen Auswirkungen weniger kontroverse Variante ist der *CYP3A4*22*-Polymorphismus, in dem die Aminosäure Cytosin durch Thymin an einer bestimmten Lokalisation im Gen ersetzt wird und der, wie in einigen Studien gezeigt werden konnte, mit einer erniedrigten Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp einhergeht

(Wang et al. 2011; Elens et al. 2011a; Elens et al. 2011b). In Bezug auf Midazolam konnte hier ebenfalls eine niedrige Aktivität gezeigt werden (Elens et al. 2013).

Zwischen dem Enzym CYP3A4 und CYP3A5 gibt es nur wenige strukturelle Unterschiede; zudem besteht eine benachbarte Lokalisation auf dem gleichen Chromosom (Gorski et al. 1994). Der Metabolismus vieler Medikamente wird zum großen Teil wohl über beide Enzyme katalysiert. In diesem Zusammenhang existiert ein weiterer klinisch wichtiger Polymorphismus in der europäischen Bevölkerung. Dabei handelt es sich um die Variante *CYP3A5*3*, die bei homozygotem Auftreten mit einer komplett fehlenden Aktivität des Enzyms CYP3A5 verbunden ist (Kuehl et al. 2001). In Kombination mit einer *CYP3A4*22*-Mutation muss mit einer stark verminderten Metabolisierungsrate von Midazolam gerechnet werden (Elens et al. 2013).

1.4 Die *In-vivo*-Indikatorsubstanzen Torasemid und Midazolam

1.4.1 OATP1B1 und CYP2C9: Testsubstanz Torasemid

Die Prüfsubstanz Torasemid gehört in die Gruppe der Schleifendiuretika. Torasemid entfaltet seine saluretische Wirkung durch Hemmung der renalen Natrium- und Chloridrückresorption im aufsteigenden Schenkel der Henle'schen Schleife. Torasemid kann zur Therapie der arteriellen Hypertonie sowie zur Prophylaxe und Behandlung von Herzinsuffizienz-bedingten Symptomen wie Ödemen oder Pleuraergüssen angewendet werden (Fachinformation Torasemid 2013). Vor allem im Hinblick auf die Herzinsuffizienztherapie ist Torasemid ein bedeutsames Arzneimittel. In der TORIC-Studie aus dem Jahr 2002 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Torasemid bei Patienten im NYHA-Stadium II-III im Vergleich zu dem Diuretikum Furosemid eine Reduktion der Gesamtmortalität aufwies (Cosín und Díez 2002). Zu den unerwünschten Wirkungen von Torasemid zählen unter anderem Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt wie Hypokaliämie, Hyperurikämie, Hyponatriämie und Hypovolämie. Außerdem können gastrointestinale Beschwerden mit Magenschmerzen, Inappetenz und Übelkeit sowie Allgemeinsymptome wie Kopfschmerzen und Schwindel auftreten (Fachinformation Torasemid 2013).

Torasemid wird bei einer oralen Bioverfügbarkeit von ungefähr 80 bis 90 Prozent fast vollständig resorbiert. Zu 99 Prozent liegt Torasemid bei einem Verteilungsvolumen von 0,2 l/kg an Plasmaprotein gebunden vor. Der First-Pass-Effekt beträgt 10 bis 20 Prozent (Knauf und Mutschler 1998). Torasemid wird über das Transportprotein OATP1B1 in die Leber aufgenommen und ist ein Substrat des Enzyms CYP2C9. Bei einem ausgeprägten hepatischen Stoffwechsel wird es zu den drei unterschiedlichen Metaboliten M1, M3 und M5 abgebaut (Miners et al. 1995; Miners et al. 2000). Die

terminale Halbwertszeit beträgt drei bis vier Stunden. Proportional zur Dosis nehmen die Serumkonzentration sowie die AUC zu, sodass Torasemid und seine Metaboliten eine dosislineare Kinetik aufweisen. Die Metabolite M1 und M5 entstehen schrittweise durch Oxidation der Methylgruppe am Phenylring bis zur Carbonsäure. Der Metabolit M3 entsteht durch Ringhydroxylierung (Miners et al. 1995). Dabei sind vor allem Torasemid selbst sowie der Metabolit M3 diuretisch wirksam; die Metaboliten M1 und M5 leisten zur diuretischen Wirkung einen zu vernachlässigenden Beitrag. Im Urin findet man ca. 80 Prozent der verabreichten Dosis wieder. Torasemid wird zu 24 Prozent unverändert über die Nieren ausgeschieden. Der Metabolit M1 wird dagegen zu ungefähr 12 Prozent, der Metabolit M3 zu ungefähr 3 Prozent und der Metabolit M5 zu ungefähr 41 Prozent über die Nieren eliminiert. Die totale Clearance beträgt 40 ml/min; die renale Clearance ungefähr 10 ml/min (Fachinformation Torasemid 2013).

1.4.2 CYP3A4: Testsubstanz Midazolam

Midazolam ist ein kurzwirksames hochpotentes Benzodiazepin. Durch Bindung an GABA_A-Rezeptoren verstärkt es postsynaptisch die hemmende GABAerge Wirkung. Dadurch wirkt Midazolam schlaffördernd und sedierend sowie angstlösend, antikonvulsiv und muskelrelaxierend. Zudem verursacht es eine kurzdauernde anterograde Amnesie. Midazolam wird häufig in der Intensivmedizin, zur Narkoseeinleitung und als Prämedikation genutzt. Zu den unerwünschten Wirkungen zählen Benommenheit und verlängerte Sedierungsdauer, Kopfschmerzen, Müdigkeit und in seltenen Fällen Halluzinationen. In hoher Dosis kann es zur Atemdepression führen (Fachinformation Midazolam 2015).

Midazolam hat aufgrund einer raschen Metabolisierung eine kurze Wirkdauer. Bei einem Verteilungsvolumen von 0,7-1,2 l/kg liegt es zu 96-98 Prozent an Plasmaproteine, vor allem Albumin, gebunden vor (Fachinformation Midazolam 2015). Midazolam wird zum größten Teil durch CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 hydroxyliert (Gorski et al. 1994), wobei ein Metabolismus über CYP3A7 nur pränatal stattfinden würde, da CYP3A7 nur in der fetalen Leber exprimiert wird (Williams et al. 2002). Midazolam wird zu 1'-Hydroxy-Midazolam und 4-Hydroxy-Midazolam metabolisiert und zum größten Teil renal ausgeschieden. Dabei wird weniger als 1 Prozent der verabreichten Dosis als unverändertes Medikament im Urin gefunden. Die terminale Halbwertszeit beträgt 1,5 bis 2,5 Stunden. Die Plasmaclearance liegt bei 300-500 ml/min (Fachinformation Midazolam 2015).

1.5 Die Rolle der Zwillingsstudie

Genetische Faktoren sowie Umweltfaktoren prägen die interindividuelle Variabilität in der Wirkung und Nebenwirkung eines Arzneimittels. Als anerkannte Methode hat sich das Konzept der Zwillingsstudien bewährt, die erblichen Unterschiede in der Wirkungsweise von Arzneimitteln zu untersuchen. Die Zwillingsstudien bilden damit ein grundlegendes Instrument der pharmakogenetischen Forschung (Boomsma et al. 2002).

Die Anfänge der modernen Zwillingsforschung lassen sich auf den britischen Wissenschaftler Francis Galton Ende des 19. Jahrhunderts zurückführen. Damals konnte jedoch noch nicht zwischen mono- und dizygoten Zwillingen differenziert werden. Erst in den 1920er Jahren kam man zu der Erkenntnis, dass es zwei Arten von Zwillingen gibt (Rende et al. 1990). Die erste systematische Analyse zur Differenzierung von monozygoten und dizygoten Zwillingen wurde 1924 von dem deutschen Dermatologen Hermann Siemens veröffentlicht. Er verglich die Anzahl von Pigmentnävi zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen. Dabei zeigte sich bei den monozygoten Zwillingen eine höhere Konkordanz der Hautveränderungen als bei den dizygoten Zwillingen (Rende et al. 1990).

In der *klassischen* Zwillingsstudie werden monozygote und dizygoter Zwillinge vergleichend untersucht. Monozygote Zwillinge entstehen aus einer einzelnen befruchteten Eizelle und weisen somit komplett identisches Erbgut (DNA) auf. Sie wachsen gemeinsam auf und werden durch fast identische Umweltfaktoren geprägt. Dizygoter Zwillinge hingegen sind sich wie Geschwister in 50 Prozent des Erbgutes (der variablen DNA-Sequenzen) ähnlich, erleben jedoch wie monozygote Zwillinge und im Gegensatz zu normalen Geschwistern während der gemeinsamen Kindheit die meisten Umweltfaktoren gemeinsam. Grundsätzlich ist die Variation bestimmter Merkmale bei Zwillingen durch genetische Einflüsse (V_g), durch gemeinsam erlebte Umwelteinflüsse (V_{sE}) sowie durch getrennt erlebte Umwelteinflüsse (V_{iE}) bedingt (Boomsma et al. 2002). Es lassen sich von daher die Korrelationen der monozygoten und dizygoten Zwillinge wie folgt festhalten:

$$\text{Korrelation}_{\text{monozygote Zwillinge}} (r_{MZ}) = V_g + V_{sE}$$

$$\text{Korrelation}_{\text{dizygoter Zwillinge}} (r_{DZ}) = \frac{1}{2} V_g + V_{sE}$$

Wenn sich monozygote Zwillinge in einem Merkmal stärker ähneln als dizygoter Zwillinge, sich also eine höhere Korrelation bei den monozygoten Zwillingen im Vergleich zu den dizygoten Zwillingen zeigt, so kann dies als Hinweis gelten, dass dieses Merkmal in besonderem Maße genetisch beeinflusst ist. Zeigen monozygote und dizygoter Zwillingen hinsichtlich eines Merkmals keine großen

Unterschiede, so kann dies als Hinweis eines erhöhten Einflusses durch Umweltfaktoren gewertet werden (Boomsma et al. 2002; Vesell 1989, Vesell 1991). Dabei werden in der Regel Zwillinge untersucht, die gemeinsam aufgewachsen sind, sodass es darüber vermittelt zu vielen Gemeinsamkeiten im Erlernen und in den Umwelteinflüssen kommt.

Erblichkeit (h^2 , *Heritabilität*) ist definiert als das Maß der Vererbung von variablen Eigenschaften, die von genetischem Charakter geprägt sind. Anders ausgedrückt beschreibt Erblichkeit den Anteil von Variationen eines Phänotyps (V_p), der durch genetische Variationen (V_g) innerhalb einer untersuchten Gruppe oder innerhalb einer Population bedingt ist ($h^2 = \frac{V_g}{V_p}$). Grundsätzlich lässt sich auf die klassische Zwillingsstudie übertragen:

$$\text{Erblichkeit } (h^2) = \frac{\text{Variationen der dizygoten Zwillinge} - \text{Variationen der monozygoten Zwillinge}}{\text{Variationen der dizygoten Zwillinge}}$$

Nähert sich das Ergebnis der 1, so besteht ein großer erblicher Einfluss; nähert sich das Ergebnis der 0, so ist von einem geringen erblichen Einfluss auszugehen.

Die Variation der mono- und dizygoten Zwillinge wird folgendermaßen berechnet:

$$\text{Variation} = \frac{\sum(\text{Unterschiede der Zwillinge})^2}{2n}$$

Wobei n die Anzahl der Zwillingspaare der innerhalb der Studie untersuchten Zwillinge angibt (Penno et al. 1981).

Diese Überlegungen konnten bereits als Grundlage vieler pharmakokinetischer Studien dienen, um zu zeigen, inwieweit interindividuelle Varianten im Arzneimittelstoffwechsel genetisch beeinflusst werden. Vesell entwickelte dazu die Formel $H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$ (Vesell 1978) und Falconer führte die Formel $H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$ (Falconer und Mackay 1996) ein. In beiden Formeln stellen r_{MZ} und r_{DZ} die Pearson-Korrelationskoeffizienten der mono- und dizygoten Zwillinge dar.

Anwendung für diese beiden Formeln zeigt beispielsweise eine Untersuchung von Vesell, in der die Erblichkeit der Wirkweise mehrerer Arzneimittel getestet wurde. Dabei wurden Blutkonzentrationen nach Verabreichung von Phenylbutazon (Vesell und Page 1968b), Antipyrin (Vesell und Page 1968c) sowie Dicumarol (Vesell und Page 1968a) an monozygoten und dizygoten Zwillingen gemessen, um daraus pharmakokinetische Parameter wie Halbwertszeit und Clearance zu ermitteln. Mittels der verschiedenen Berechnungsverfahren ließen sich so die Erblichkeiten bestimmen (siehe Abbildung 2).

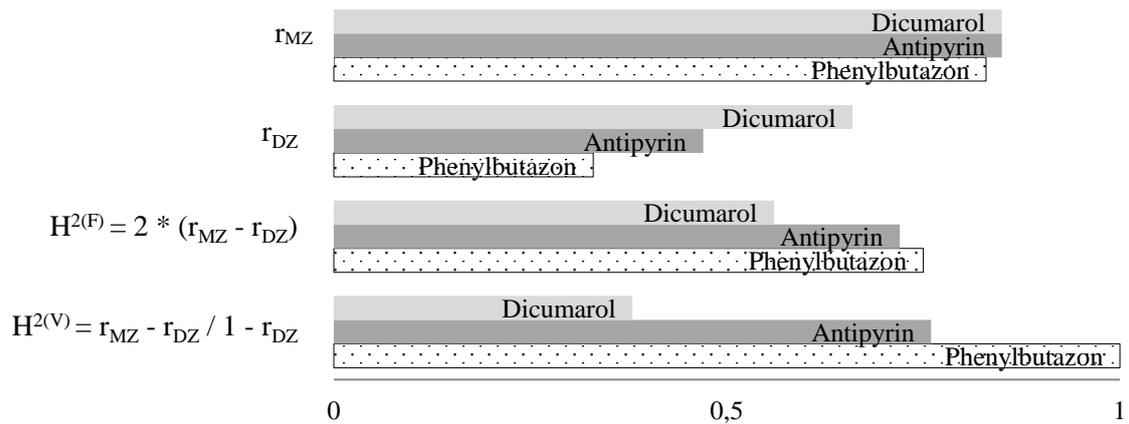


Abbildung 2 Erblichkeitsberechnungen nach Vesell

Dargestellt sind die Ergebnisse der Erblichkeiten der untersuchten Arzneimittel Dicumarol, Antipyrin und Phenylbutazon; r_{MZ} und r_{DZ} sind die Pearson-Korrelationskoeffizienten der mono- und dizygoten Zwillinge. Je mehr sich das Ergebnis der 1 nähert, desto mehr Erblichkeit lässt sich nachweisen. Es zeigt sich, dass je nach Formel Unterschiede im genetischen Einfluss berechnet werden (modifiziert nach Vesell 1989).

Zur weiteren Differenzierung genetischer Faktoren in additive und dominante Einflüsse eignen sich Analysen mittels Strukturgleichungsmodellierung (siehe Abbildung 3).

Dabei betrachtet man die latenten Variablen A (additive genetische Einflüsse), D (dominante genetische Einflüsse), C (gemeinsam erlebte Umwelteinflüsse) sowie E (individuell erlebte Umwelteinflüsse), die die Variationen der Phänotypen eines Zwillingspaars bedingen. Mithilfe der Pearson-Korrelationskoeffizienten (r_{MZ} und r_{DZ}) lassen sich die latenten Variablen je nach mono- oder dizygotem Zwillingenpaar modellieren und Werte berechnen (Rijsdijk und Sham 2002).

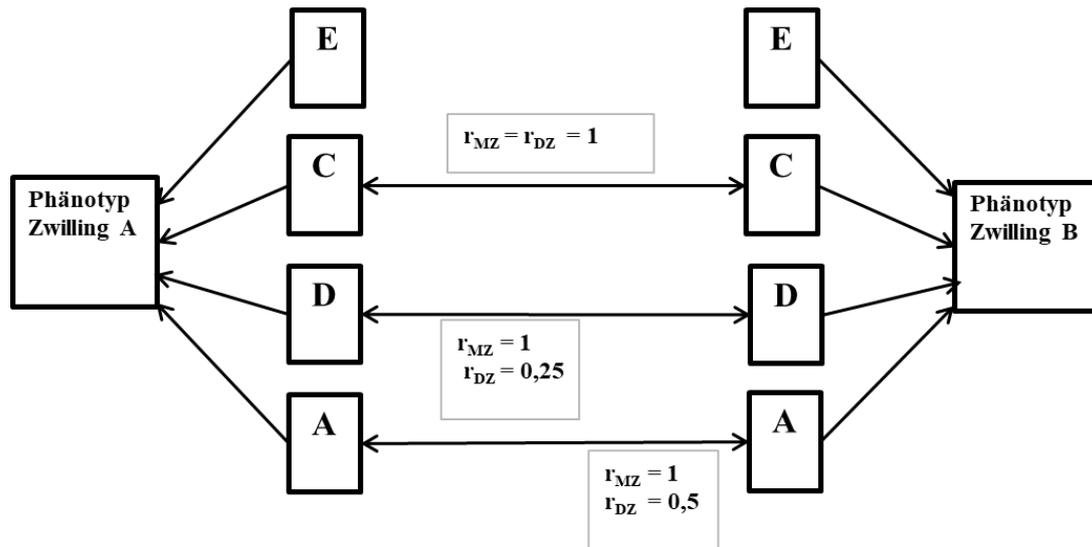


Abbildung 3 Grundlagen der Strukturgleichungsmodellierung

Die großen Rechtecke stellen den jeweiligen Phänotyp eines Zwillingpaares dar; die kleineren Rechtecke beschreiben die latenten Variablen A (additive genetische Einflüsse), D (dominante genetische Einflüsse), C (gemeinsam erlebte Umwelteinflüsse) sowie E (individuell erlebte Umwelteinflüsse). Für die Variablen A, D und C besteht bei monozygoten Zwillingen eine Korrelation von 1; bei dizygoten Zwillingen besteht für die Variable A eine Korrelation von 0,5, für die Variable D eine Korrelation von 0,25 und für die Variable C eine Korrelation von 1. Die Variable E steht für die individuellen Einflüsse eines jeden Zwillingings (modifiziert nach Rijdsdijk und Sham 2002).

Um die Ergebnisse aus Zwillingstudien auf die Allgemeinbevölkerung übertragen zu können, sollten in der Theorie die in Tabelle 10 genannten Voraussetzungen erfüllt werden (Rijdsdijk und Sham 2002).

Tabelle 10 Anforderung an die klassische Zwillingstudie

Monozygote und dizygote Zwillinge wachsen gemeinsam auf und werden durch fast identische Umweltfaktoren geprägt.

Für das untersuchte Merkmal liegen nur sehr wenige bis keine Interaktionen zwischen Umweltfaktoren und Genen vor.

Die Zwillinge unterscheiden sich in dem untersuchten Merkmal nicht von der Allgemeinbevölkerung.

Tabelle nach Rijdsdijk und Sham 2002

Neben der *klassischen* Zwillingstudie existieren weitere Variationen der Methode, die nur kurz erwähnt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, getrennt aufwachsende monozygote Zwillinge auf ein Merkmal zu untersuchen und diese mit zusammenaufwachsenden monozygoten Zwillingen zu vergleichen. Hierbei kann vor allem der Einfluss von nicht-erblichen Faktoren näher betrachtet und

eventuell identifiziert werden. Als weitere anerkannte methodische Untersuchungskonzepte können die Korrelationen zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen mit anderen Geschwistern oder Familienmitgliedern oder mit einer nicht-verwandten Gruppe aus der Allgemeinbevölkerung verglichen werden (Boomsma et al. 2002).

Ein weiteres Instrument der pharmakogenetischen Forschung bildet neben der Zwillingsstudie die Familienstudie. In Familienstudien werden erbliche Einflüsse innerhalb einer Familie untersucht. Grundlage ist, dass unter Verwandten ersten Grades (Eltern, Kinder, Geschwister) das Erbgut zu 50 Prozent übereinstimmt und unter Verwandten zweiten Grades (Tante, Onkel, Nichte, Neffe) das Erbgut zu 25 Prozent gleich ist. Bezüglich eines interessierenden Merkmals wird die Häufigkeit des Auftretens diesen Phänotyps innerhalb der Familie mit der Gesamtbevölkerung verglichen, wodurch mögliche Hinweise auf eine erblich bedingte Ursache vermutet werden können. Tritt der Phänotyp vermehrt in der Familie auf, so kann dies auf eine erhöhte Erblichkeit hinweisen. Familienstudien sind nicht dazu geeignet, einen neuen genetischen Zusammenhang nachzuweisen, vielmehr haben sie das Ziel die Art des Vererbungsgangs nach Mendel (dominant gegenüber rezessiv) beispielsweise mittels Stammbaumanalyse zu identifizieren. Familienstudien finden eine häufige Anwendung in der psychiatrischen Forschung (Lux 2012). Jedoch auch in Arzneimittelstudien werden Familienstudien angewandt, um die Vererbungsart der Variationen im Metabolismus von Arzneimitteln zu bestimmen (Vesell 1991).

Die vorliegende Arbeit wurde anhand einer *klassischen* Zwillingsstudie durchgeführt. Hierzu wurden monozygote sowie gleichgeschlechtliche dizygoten Zwillinge untersucht.

1.6 Aufgabenstellung

1.6.1 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

In der Medizin werden bekanntermaßen die meisten Medikamente oral verabreicht, sodass ein gutes Verständnis der Variabilität in der Pharmakokinetik und damit in Folge auch in den Wirkungen und Nebenwirkungen nach oraler Verabreichung sehr wichtig sein könnte. Im Gegensatz zur intravenösen Medikamentenapplikation beginnen nach oraler Medikamentenverabreichung die ersten Stoffwechselforgänge schon direkt im Magen-Darm-Trakt, wo bereits intestinale Transporter und Enzyme angesiedelt sind. Inwieweit hier erbliche Faktoren, die nur einen Einfluss auf die Pharmakokinetik oral verabreichter Arzneimittel ausüben, eine Rolle spielen und welche Unterschiede zur intravenösen Applikation bestehen, ist bisher nur wenig erforscht und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Diese Arbeit hat folgende Ziele und Fragestellungen:

- Bestimmung der Erbllichkeit in der Variation der Pharmakokinetik des Medikaments Torasemid (Substrat des Transportproteins OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9) anhand einer Studie mit mono- und dizygoten Zwillingen nach oraler Dosierung und im Vergleich zur intravenösen Dosierung.
- Bestimmung der Erbllichkeit in der Variation der Pharmakokinetik des Medikaments Midazolam (Substrat des Enzyms CYP3A4) anhand einer Studie mit mono- und dizygoten Zwillingen nach oraler Dosierung und im Vergleich zur intravenösen Dosierung.
- Wieviel der Erbllichkeit bei oraler Dosierung kann mit den bereits bekannten genetischen Polymorphismen in OATP1B1, CYP2C9 und CYP3A4 erklärt werden?
- Wie sind hierbei Unterschiede bei oraler und intravenöser Medikamentenapplikation?
- Wie groß ist die erbliche Auswirkung auf die absolute orale Bioverfügbarkeit der untersuchten Substanzen?

2 Material und Methoden

2.1 Klinische Studie

2.1.1 Konzept

Grundlage dieser Arbeit ist die Zwillingsstudie "Open Label Repeated Dose Study for the Evaluation of Heritability of and Genetic Influences on Drug Pharmacokinetics" (im Folgenden wird die Kurzform "TWINS-II" verwendet). Es handelt sich bei dieser klinischen Prüfung um eine offene, nicht randomisierte pharmakokinetische und pharmakogenetische Arzneimittelstudie. Die Durchführung erfolgte auf Grundlage der Deklaration von Helsinki sowie unter Berücksichtigung der Verordnung der Guten Klinischen Praxis und des Arzneimittelgesetzes. Konkret bedeutet dies insbesondere, dass die Studie vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte genehmigt worden ist und ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission für die Studie vorlag. Ferner haben alle Probanden nach ausführlicher Information über die Studie schriftlich ihr Einverständnis erteilt. Schließlich ist die Studie in einer international einsehbaren Datenbank (*ClinicalTrials.gov*) veröffentlicht worden. Die Studie wurde auf der Probandenstation des Instituts für klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Die klinische Prüfung „TWINS-II“ soll klären, inwieweit sich die Variation in der Pharmakokinetik durch bekannte erbliche Polymorphismen erklären lässt und wie viel andererseits an Variation zwischen den Probanden durch die gegenwärtig bekannten und als relevant eingeschätzten Varianten noch nicht erklärt werden kann.

In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf den Vergleich der Pharmakokinetik zwischen oraler und intravenöser Medikation der Prüfsubstanzen Torasemid und Midazolam gelegt. Die Prüfmedikation, insbesondere Midazolam, wurde so niedrig dosiert, dass eine systematische Auswertung der Arzneimittelwirkung nicht sinnvoll war, was in dieser Studie jedoch auch nicht das Ziel war.

2.1.2 Studienübersicht

Die Studie lässt sich in zwei Studienperioden unterteilen. Die Studienperiode I beinhaltet dabei die intravenöse Dosierung von Torasemid und Midazolam; die Studienperiode II nur die orale Dosierung der beiden Medikamente. Die Studienperiode I umfasste insgesamt drei Studienphasen und war in

zwei Studientage (Sd) unterteilt. Die Studienperiode II umfasste hingegen nur eine Studienphase mit zwei Studientagen. Eine Voruntersuchung war dem ersten Studientag vorangestellt (siehe Tabelle 11).

Zunächst bestand die Studie nur aus der Studienperiode I. Um jedoch einen Vergleich zwischen oraler und intravenöser Verabreichung von Medikamenten zu erreichen, wurde der Prüfplan um eine zusätzliche Studienperiode erweitert. Diese zweite Studienperiode konnte vor oder nach der ersten Studienperiode stattfinden. Nicht möglich aber war ein Stattfinden der Studienperiode II während der laufenden Studienperiode I.

Tabelle 11 Studienübersicht

Aufbau der TWINS-II-Studie	
Voruntersuchung (Visite 1, Screening)	
Studienperiode I (intravenöse Dosierung)	Studienperiode II (orale Dosierung)
mit Studienphase 1 (Visite 2+3, Sd 1+2)	mit Studienphase 1 (Visite 2+3, Sd 1+2)
mit Studienphase 2 (Visite 4+5, Sd 3+4)	
mit Studienphase 3 (Visit 6+7, Sd 5+6)	

Sd=Studientag (Studyday)

Der zeitliche Abstand zwischen zwei Studienphasen musste mindestens sieben Tage und sollte wenn möglich nicht mehr als 30 Tage betragen. Die Tabelle 12 gibt einen Überblick über den gesamten Studienablauf.

Tabelle 12 Studienablauf der TWINS-II-Studie

	Screening	Studienperiode I						Studienperiode II	
Studienphase		1	2	3				1	
Visite	1	2	3	4	5	6	7	2	3
Einverständnis und medizinische Untersuchung	X								
Verabreichung der Prüfmedikation		X		X		X		X	
Blutentnahme Genotypisierung		X							
Blutentnahme Pharmakokinetik		X	X	X	X	X	X	X	X
Urinsammlung Pharmakokinetik		X	X	X	X	X	X	X	X
Erfassung unerwünschter Wirkungen		X	X	X	X	X	X	X	X

2.1.2.1 *Ablauf einer Studienphase*

Zu Beginn eines jeden Studientages erfolgte eine kurze Untersuchung der Probanden, um eine eventuell neu aufgetretene Erkrankung ausschließen zu können. Außerdem wurde ein besonderes Augenmerk darauf gelegt, ob der Proband seit dem letzten Treffen neue Medikamente eingenommen habe, ob er länger krank gewesen sei, ob er Blut oder Thrombozyten gespendet oder er an einer weiteren Medikamentenstudie teilgenommen habe. Wurden diese Fragen alle verneint und bestand ein negativer Atemalkohol- und Drogentest sowie bei Frauen ein negativer Schwangerschaftstest, so konnte mit der Applikation der Medikation begonnen werden. Der Ablauf der Studienperiode I und der Studienperiode II folgte einem bestimmten Zeitschema, welches in Tabelle 13 dargestellt ist.

Während des gesamten Studientages erfolgten eine kardiale Monitorüberwachung der Probanden sowie eine Betreuung durch das Studienpersonal. Veränderungen im Ablauf des Studientages sowie unerwartete Vorkommnisse wurden sofort vermerkt. Zwischen den Zeitpunkten 14 und 15 war ein Verbleiben der Studienteilnehmer auf der Probandenstation nicht notwendig. Um eine Studienphase jedoch abzuschließen, mussten die Probanden 24 Stunden nach erster Medikamentenapplikation noch einmal untersucht werden. Zusätzlich wurde dort ein letztes Mal Blut entnommen und die Sammlung des 24-Stunden-Urins beendet (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13 Zeitplan beider Studienperioden

Zeitplan der Studienperiode I															
Zeit (in Minuten)	0	15	30	45	60	90	120	150	180	240	300	360	420	480	1440
Zeitpunkt (Timepoint)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Midazolam-verabreichung (2 Minuten Infusion i. v.)	X														
Torasemid-verabreichung (2 Minuten Infusion i. v.)		X													
Blutentnahme Pharmakokinetik	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DNA-Blutprobe Genotypisierung	X														
Urinsammlung Pharmakokinetik	X										X			X	X
Erfassung unerwünschter Wirkungen	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Zeitplan der Studienperiode II															
Zeit (in Minuten)	0	15	30	45	60	90	120	150	180	240	300	360	420	480	1440
Zeitpunkt (Timepoint)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Orale Midazolam- verabreichung	X														
Orale Torasemid- verabreichung	X														
Blutentnahme Pharmakokinetik	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Urinsammlung Pharmakokinetik	X										X			X	X
Erfassung unerwünschter Wirkungen	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

i. v.=intravenös

Es wurden pro Studienphase zu je 15 Zeitpunkten jeweils drei EDTA-Monovetten mit 2,7 ml Blut abgenommen. Dabei belief sich die Blutabnahmemenge der gesamten Studie auf insgesamt 646 ml. Durch den vorgeschriebenen Mindestabstand von einer Woche zwischen den vier einzelnen Studienphasen war eine Beeinträchtigung des Kreislaufes bzw. des Leistungszustandes der Studienteilnehmer nicht zu erwarten. Bei einer Blutspende beispielsweise werden 500 ml Blut innerhalb von 15 Minuten entnommen.

Die Blutentnahmen der Zeitpunkte 1 bis 14 erfolgten in der Regel über eine Venenverweilkanüle. Diese wurde am Ende des Studientages entfernt, sodass zum Zeitpunkt 15 am darauffolgenden Tag die Blutentnahme mittels Butterfly durchgeführt wurde. Nach der Blutentnahme wurden die Röhrchen zehn Minuten zentrifugiert und das danach abgeführte Blutplasma bei -20°C tiefgefroren.

Die Probanden gaben vor Beginn der Arzneimittelapplikation eine Urinprobe ab. Ein Teil der Probe wurde, wie schon erläutert, mittels Urin-Sticks und Drogentest untersucht, ein weiterer Teil (2*10 ml) wurde zu Analysezwecken bei -20°C tiefgefroren. Nach der ersten Arzneiapplikation begann die 24h-Urinsammlung. Zu den Zeitpunkten 11, 14 und 15 wurden die Urinsammelbehälter jeweils gewogen und Proben daraus entnommen.

2.1.3 Prüfmedikation

Jede Prüfsubstanz steht für ein bestimmtes Enzym der Cytochrom-P450-Familie bzw. für einen bestimmten Transporter. Durch Messen der Substratkonzentration der verabreichten Medikamente im Blutplasma und im Urin zu festgelegten Zeitpunkten kann man so Rückschlüsse auf die Aktivität dieser Enzyme bzw. Transporter ziehen. Wichtig bei der Wahl der Prüfsubstanzen ist, dass keine Wechselwirkungen bestehen. Außerdem wurden die Medikamente so gewählt, dass sie alle über einen anderen Weg verstoffwechselt werden.

Die Medikamente der Studienperiode I sind auf dem Markt etablierte und zugelassene Arzneimittel in sehr niedrig dosierten Mengen. Die in der Studienperiode II oral applizierten Medikamente sind ebenfalls auf dem Markt zugelassene Arzneimittel, doch wurden sie noch sehr viel geringer dosiert als üblicherweise verordnet. Bei der oralen Prüfsubstanz Torasemid liegt die Dosierung sogar unter den kleinsten im Handel erhältlichen Medikamentendosierungen. Aus diesem Grund wurde dieses Medikament GMP-konform extra für die Studie von der Universitätsapotheke in Ulm hergestellt.

In Tabelle 14 ist die für diese Arbeit relevante Prüfmedikation aufgelistet, die den Probanden verabreicht wurde. In der Studienperiode I erfolgte die Arzneimittelapplikation intravenös, in der Studienperiode II dagegen als niedrig dosierte orale Medikation.

Tabelle 14 Prüfmedikation der Studienperiode I und II

Studienperiode I			
Prüfsubstanz	Handelsname	Dosis	Verabreichung
Torasemid	Torem®	2,5 mg	intravenös
Midazolam	Dormicum®	0,2 mg	intravenös
Studienperiode II			
Prüfsubstanz	Handelsname	Dosis	Verabreichung
Torasemid	Torem RR 2,5 mg Tabletten, Berlin- Chemie, Berlin Deutschland	0,25 mg	per os
Midazolam	Midazolam-ratiopharm 2 mg/ml Lösung, Ulm, Deutschland	1 mg	per os

Die Lagerung der Prüfmedikation erfolgte entsprechend den jeweiligen Fachinformationen. Nur das Studienpersonal hatte Zugriff auf diese Substanzen.

Zur Herstellung der intravenös-applizierten Medikamente wurden 0,2 mg Midazolam und 2,5 mg Torasemid in jeweils 0,9 prozentiger Kochsalzlösung zu einem totalen Endvolumen von jeweils 5 ml gelöst. Die Injektion lief dann jeweils für zwei Minuten über eine separate Venenverweilkanüle in den Probanden.

2.1.4 Probandenauswahl

Für die Studie wurden gesunde monozygote und gleichgeschlechtliche dizygoten Zwillingspaare im Alter von 18 bis 65 Jahren rekrutiert. Die Teilnahme war nur als Paar möglich. Das Bekanntmachen der Studie erfolgte vor allem durch Aushänge im Raum Göttingen und Hannover sowie durch Zeitungsannoncen in Südniedersachsen, Nordhessen und Thüringen.

2.1.4.1 Einschlusskriterien

Um in die Studie eingeschlossen zu werden, mussten die Probanden folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Vorliegen der schriftlichen sowie mündlichen Einverständniserklärung (*informed consent*)
- Alter zwischen 18 und 65 Jahren
- Gewicht zwischen 50 und 120 kg; BMI zwischen 18 und 33 kg/m²
- Keine pathologischen Untersuchungsergebnisse
- Keine Ausschlusskriterien laut Anamnese
- Rauchgewohnheiten ähnlich des Zwillingspartners (± 10 Zigaretten / Tag)
- Bei zweieiigen Zwillingspaaren musste Gleichgeschlechtlichkeit bestehen
- Bei Frauen: negativer Schwangerschaftstest und die Bereitschaft während der Studie zu verhüten

2.1.4.2 **Ausschlusskriterien**

Neben den oben genannten Einschlusskriterien gab es noch bestimmte Punkte, die Probanden von vornherein von einer Studienteilnahme ausschlossen:

- Teilnahme an einer anderen Arzneimittelstudie innerhalb der letzten 30 Tage vor Studienbeginn sowie während der Studie
- Blut-, Plasma- oder Thrombozytenspende in den letzten 30 Tagen vor Studienbeginn
- Bei Frauen: Schwangerschaft oder Stillzeit
- Akute Erkrankungen oder Fieber von über 37,5 °C
- Störungen der Leber- und/oder der Nierenfunktion
- Infektionen der Niere und/oder der ableitenden Harnwege
- Herzerkrankungen
- Chronische Erkrankungen wie z. B. Hepatitis B, Hepatitis C oder HIV
- Größere gastrointestinale Operationen und/oder Erkrankungen, vor allem da diese die Pharmakokinetik der Prüfmedikation beeinflussen können
- Bekanntes Raynaud-Syndrom
- Bekanntes Asthma bronchiale im Stadium 2 bis 4
- Laborwerte außerhalb der Norm
- Regelmäßige Medikamenteneinnahme in den letzten sieben Tagen vor Studienbeginn und während der Studie. Ausnahmen waren orale Kontrazeptiva und andere Medikamente nach Abwägung des Studienpersonals; die Einnahme von milden Analgetika (wie z. B. Aspirin, Paracetamol, Ibuprofen) wurde nach Rücksprache bis zu 6 Stunden vor sowie 24 Stunden nach Einnahme der Studienmedikation gestattet.
- Suchterkrankungen wie z. B. Alkoholabhängigkeit oder Drogen-Abusus
- Bekannte schwere Überempfindlichkeitsreaktionen oder Anaphylaxie
- Bekannte Allergie auf die verwendete Prüfmedikation; bei Allergie auf nur eine Prüfsubstanz konnte die Studie trotzdem unter Herausnahme dieses Medikaments durchgeführt werden.
- Jeglicher pathologischer Befund in der Voruntersuchung, der gegen eine Teilnahme an der Studie spricht (Beachtung vor allem von Leber- und Nierenparametern).
- Unfähigkeit, die Probandeninformation zu verstehen und die Studienregeln zu befolgen

2.1.4.3 *Screening der Probanden*

Zunächst wurden die interessierten Zwillingspaare in einem ausführlichen Gespräch über die Inhalte und Hintergründe der Medikamentenstudie aufgeklärt. Hierbei gab es viel Raum für Fragen und jedem Interessenten wurde eine Probandeninformation ausgehändigt. In dieser waren alle Details der Studie genau beschrieben. Zusätzlich gab es genügend Bedenkzeit, um sich einer Studienteilnahme ganz sicher zu sein. Entschied sich ein Zwillingsspaar dazu, an der Studie teilzunehmen, so begann nach Unterschrift der Einverständnis- sowie Datenschutzerklärung die Voruntersuchung.

Die Voruntersuchung setzte sich aus einer ausführlichen Anamnese und einer gründlichen körperlichen Untersuchung anhand der oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien zusammen. Dabei wurden ein 12-Kanal-EKG geschrieben sowie Temperatur, Blutdruck und Puls gemessen. Der Urin wurde mittels U-Sticks auf pH-Wert, Leukozyten, Nitrit, Protein, Glukose, Ketonkörper, Urobilirubin, Bilirubin und Blut/Hämoglobin untersucht. Außerdem erfolgte ein Urindrogenscreening auf die Substanzen Metamphetamin/MDMA, Benzodiazepin, Kokain, Opioid und THC. Bei Frauen erfolgte zusätzlich ein Schwangerschaftstest im Urin. Zum Abschluss wurde den Zwillingen Blut für die laborchemische Untersuchung entnommen. Die Analysen erfolgten hierzu durch die Abteilung Klinische Chemie, Universitätsmedizin Göttingen. Die folgenden Parameter wurden dabei bestimmt: Natrium, Kalium, Calcium, Glutamat-Oxalat-Transaminase (GOT), Gesamt-Bilirubin, Kreatinin sowie Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten.

Ein Einschluss (*enrolment*) in die TWINS-II-Studie konnte dann erfolgen, wenn ein Zwillingsspaar alle oben aufgeführten Einschlusskriterien erfüllt hatte und keine oben genannten Ausschlusskriterien aufwies und so aus medizinischer Sicht keine Bedenken bestanden an der Studie teilzunehmen.

Der Abstand zwischen Voruntersuchung und erstem Studientag durfte nicht mehr als 42 Tage betragen. Wurde dieses Zeitintervall überschritten, so musste vor Beginn des ersten Studientages eine erneute Blutentnahme sowie eine Auffrischung der Anamnese und Untersuchung durchgeführt werden.

2.1.5 **Allgemeine Vorschriften und Regelungen zur Studie**

2.1.5.1 *Verhaltensregeln*

Während der Studienteilnahme waren die Probanden angehalten, bestimmte Verhaltensregeln zu befolgen. Dies diente zum einen der Sicherheit der Studienteilnehmer, um beispielsweise Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln zu vermeiden. Zum anderen musste gewährleistet sein,

dass keine zusätzlichen Störfaktoren die zu bestimmenden pharmakokinetischen Parameter verfälschten.

Ganz allgemein war die Einnahme von Drogen während der gesamten Studie verboten. Medikamente oder Nahrungsergänzungsmittel durften nur nach Rücksprache mit dem Studienpersonal eingenommen werden, was dann notiert werden musste. Ab zwei Wochen vor Beginn einer jeden Studienphase musste auf den Genuss von Chinin-haltigen Erfrischungsgetränken und von Grapefruit in jeglicher Form verzichtet werden. Von zusätzlichen Diätmaßnahmen während des Studienablaufs wurde abgeraten. Eine Woche vor Beginn einer jeden Studienphase war die Aufnahme von Kaffee, Cola, Energy-Drinks, schwarzem sowie grünem Tee und Schokolade nicht erlaubt. Intensive sportliche Aktivitäten sollten ebenfalls vermieden werden. Ab 48 Stunden vor und während der Studienphase war das Konsumieren von Alkohol verboten. Ebenso waren das Führen von Kraftfahrzeugen sowie das Bedienen von Maschinen, die den Probanden selbst und andere Menschen gefährden könnten, bis 20 Stunden nach der letzten Arzneimitteleinnahme nicht erlaubt.

2.1.5.2 *Abbruch der Studie*

Jeder Proband hatte das Recht, die Teilnahme an der Studie zu jedem Zeitpunkt abubrechen. Er war dabei nicht verpflichtet einen Grund anzugeben. Auf der anderen Seite konnte ein Proband von der Studienteilnahme ausgeschlossen werden, wenn er sich nicht an die Verhaltensregeln hielt oder wenn die o.g. Ausschlusskriterien nachträglich auftraten.

2.1.5.3 *Probandensicherheit und Datenschutz*

Aus Datenschutzgründen wurde jedem Probanden ein eigener Studiencode zugeordnet. Dies erfolgte durch Vergabe einer individuellen Nummer für jedes Paar an sich und zur weiteren Differenzierung der jeweiligen Zwillinge mit dem Zusatz A und B. Zusätzlich erhielt jeder Proband einen eigenen Studienordner. In diesem wurde jedes Ereignis und jede Intervention, die während der Studie auftraten, auf speziellen Dokumentationsbögen in Form eines sogenannten *Case-Report-Form (CRF)* notiert. Nur dem Studienpersonal war eine Zuordnung der Studiennummer zum jeweiligen Probanden möglich.

Während des Studientages wurden die Probanden zur Überwachung an einen Monitor angeschlossen. Es wurde regelmäßig der Blutdruck gemessen sowie zu Beginn eines jeden Studientages die Temperatur.

Trat ein unvorhersehbares Ereignis ein, gab es verschiedene Formen der Dokumentation, die nach den Regeln der GCP-Richtlinien in folgende Ereignisse unterschieden werden (GCP-Verordnung 2012):

Das *Adverse Event (AE)* oder auch das unerwünschte Ereignis (UE) beschreibt jedes schädliche Vorkommnis, das einem Probanden widerfährt, dem ein Arzneimittel verabreicht wurde. Dabei muss die Medikamentengabe nicht im kausalen Zusammenhang mit dem Ereignis stehen.

Das *Serious Adverse Event (SAE)* oder auch schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis (SUE) beschreibt jedes schädliche Vorkommnis, was einem Probanden widerfährt, dem ein Arzneimittel im Rahmen einer klinischen Studie verabreicht wurde und welches entweder tödlich oder lebensbedrohlich ist, einen stationären Aufenthalt erfordert, zu einer bleibenden oder schwerwiegenden Behinderung führt oder einen Geburtsfehler zur Folge hat. Dabei muss die Medikamentengabe nicht im kausalen Zusammenhang mit dem Ereignis stehen.

2.2 Arzneimittel-analytische Methoden

Zur Analyse der Plasmakonzentration der hier untersuchten Medikamente Torasemid und Midazolam wurde jedem Probanden zu festdefinierten Zeitpunkten Blut mittels EDTA-Monovetten entnommen. Die Blutproben wurden direkt im Anschluss für zehn Minuten zentrifugiert. Nach erfolgter Plasmaseparation wurden diese bei -20° Celsius eingefroren. Die weitere Analyse erfolgte dann durch das Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart mittels Flüssigkeitschromatographie mit anschließender Detektion durch Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS-MS).

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von Torasemid und seinem Metaboliten Hydroxytorasemid sowie der Konzentrationen von Midazolam wurden zunächst 100 µg Plasma mit 10 µg Eichpunktlösung versetzt. Als interne Standards wurden hierzu die Substanzen Torasemid-d₇ (Toronto Research Chemicals Nr. T548752), Hydroxytorasemid-d₇ (Toronto Research Chemicals Nr. H969982) sowie Midazolam-d₆ (Roche, Nr. RO0213981-010) genutzt. Fünf Minuten nach dem Mischvorgang erfolgte die Proteinfällung mit 200 µl Acetonitril und anschließender Zentrifugation für zehn Minuten bei 13000 U/min in der Eppendorf-Zentrifuge 5424R. Der gesamte Überstand wurde danach in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und vollständig bei 37°C unter Stickstoff abgeblasen. Der dadurch entstandene Rückstand wurde wiederum in 50 µl Eluent aufgenommen und fünf Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 40 µl des Überstands in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Von dieser Lösung konnten nun 10 µl zur LC-MS-MS-Messung genutzt werden. Dazu wurde das Agilent 6460 Triple Quadrupole Massenspektrometer (Agilent, Waldbronn, Germany)

verwendet, welches an das Agilent 1200 HPLC-System gekoppelt war. Dieses System bestand aus dem Eluentenentgaser G1379B, der binären Pumpe G1312B, dem Mikrotiterplatten-Autosampler G1367D und dem Säulenthermostat G1316B. Die aufgearbeiteten Proben wurden mithilfe einer US6240-HPLC-Säule (Modulo-cart QK Strategy 5 pro 100*2,1mm, Interchim, Mannheim) in ihre Analyten aufgetrennt und diese mittels Elektro-Spray-Ionisation detektiert.

Zur Aufarbeitung der Plasmaproben zur Messung des Metaboliten 1'-Hydroxy Midazolam wurde zur Herstellung als interner Standard 1'-Hydroxymidazolam-d₅ (Toronto Research Chemicals, Nr. H948423) genutzt. In einem 10 ml Rundbodenzentrifugenglas mit Schraubverschluss wurde 1 ml Plasma mit 10 µl Eichpunktlösung, 1 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 5 ml Diethylether mittels Überkopfmischer für zehn Minuten vermixt. Anschließend wurde die Lösung für zehn Minuten bei 3000 U/min in der Megafuge 1.0 R Kendro zentrifugiert. Im Anschluss wurden 4 ml Überstand in spitze Zentrifugengläser überführt und mittels Stickstoff abgeblasen. Die vollständig getrocknete Probe wurde danach mit 50 µl Acetonitril/Wasser (im Verhältnis 1:1) und 25 µl Wasser versetzt, um anschließend bei 4000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert zu werden. Nach diesem Vorgang wurden 50 µl der entstandenen Lösung vorsichtig in die Mikrotiterplatte pipettiert. Hiervon wurden wiederum 10 µl für die LC-MS-MS-Messung genutzt, die nach den oben genannten Standards ablief.

Zur Standardisierung und Validierung wurden Eichgeraden aus den Kalibrierproben durch gewichtete lineare Regression ($1/x$) des Peakflächenverhältnisses Analyt / Interner Standard gegen das Konzentrationsverhältnis Analyt / Interner Standard gebildet. So konnten die entsprechenden Deuterium-markierten Analoga der Analyten als interne Standards verwendet werden. Es wurden bei jeder Messung die Nullprobe, die Kalibrierproben sowie drei verschiedene Qualitätsproben mindestens zweimal mitgemessen.

2.3 Molekulargenetische Methoden

Bei jedem Probanden wurde zu Beginn der Studie einmalig eine zusätzliche 2,7 ml EDTA-Monovette peripheres Vollblut für Genotypisierungszwecke entnommen, welches bei -20 ° Celsius gelagert wurde. Die molekulargenetischen Analysen dieser Blutproben wurden im Institut für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Herrn PD Dr. Tzvetkov durchgeführt. Es wurden neben den in dieser Arbeit besprochenen Genotypen des Transporters OATP1B1 sowie der Enzyme CYP2C9 und CYP3A4 zudem die Genotypen der Transporter OCT1, ADRB1 und ADRB2 sowie die Genotypen der Enzyme CYP2D6, CYP2C19 und UGT2B7 bestimmt.

Die genomische DNA aus den Blutproben konnte mithilfe des BioRobot EZ1 (Firma Qiagen) gewonnen werden. Der Vorgang erfolgte automatisch. Die DNA wurde mithilfe eines Magneten aus dem Vollblut extrahiert. Aus der Ausgangssubstanz von 350 μl peripheren Vollbluts konnte so eine Ausbeute von 200 μl DNA-Lösung mit einer durchschnittlichen Konzentration von 70 $\text{ng}/\mu\text{l}$ erreicht werden. Im Anschluss erfolgte die Vervielfältigung der DNA mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*).

Um Monozygotie oder Dizygotie der in dieser Studie eingeschlossenen Zwillinge bestimmen zu können, wurden die Polymorphismen der oben genannten Strukturen miteinander verglichen. Bei völlig identischer Übereinstimmung aller untersuchten Genotypen wurde der Zwillingsstatus als monozygot, bei fehlender Übereinstimmung als dizygot festgelegt.

2.4 Pharmakokinetische Analysen

2.4.1 Pharmakokinetische Parameter und deren Berechnung

Um die Pharmakokinetik von Arzneimitteln und deren Metaboliten zu beschreiben und daraus Anweisungen für eine richtige Dosierung von Medikamenten herzuleiten, hat es sich bewährt, diese mittels pharmakokinetischer Parameter wiederzugeben. Diese Parameter werden aus Konzentrations-Zeit-Verläufen von den applizierten Arzneimitteln in Blut und Harn gewonnen. Essentielle pharmakokinetische Parameter, die für die beiden *In-vivo*-Indikatorsubstanzen Torasemid und Midazolam in dieser Dissertationsarbeit berechnet wurden, werden im Folgenden näher erläutert (Mutschler et al. 2013; Gugeler und Klotz 2000).

C_{max} . Ein Parameter zur Berechnung der Geschwindigkeit der Resorption eines Pharmakons ist die Konstante C_{max} . Er beschreibt die Maximalkonzentration, die im Blut nach Gabe eines Arzneimittels gemessen wird.

t_{max} . Der Parameter t_{max} gibt die Zeit zwischen Arzneimittelapplikation und Erreichen der maximalen Plasmakonzentration C_{max} wieder. Die Geschwindigkeit der Resorption ist davon abhängig, ob ein Medikament oral, intravenös oder auf anderem Wege appliziert wird. Je schneller die Aufnahme eines Arzneimittels erfolgt, desto kürzer ist die Zeit (t_{max}), die zum Erreichen der Maximalkonzentration (C_{max}) führt.

AUC. Ein essentieller Parameter ist die AUC (*area under the curve*). Sie stellt das Integral der Arzneimittelkonzentration im Blut über die Zeit t (von $t = 0$ bis zu einem definierten Zeitpunkt oder

bis unendlich) dar und ist ein Maß für die vorhandene Substanzmenge im Körper. Sie verhält sich proportional zu der im Blutkreislauf befindlichen Substanzmenge. Berechnet wird die AUC mithilfe der Trapezformel. Dazu teilt man die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve anhand der verschiedenen Messpunkte in Vierecke und erhält durch Aufsummation die Gesamtfläche. Es können dann letztendlich zwei verschiedene Messmethoden verwendet werden. Zum Erhalt der $AUC_{0-\infty}$ wird vom letzten gemessenen Zeitpunkt aus mithilfe der terminalen Eliminationshalbwertszeit gegen unendlich extrapoliert. Zum Erhalt der AUC_{last} wird dahingehend die letzte messbare Konzentration der Substanzmenge genutzt.

MRT. Die mittlere Residenzzeit (*mean residence time*) ist die Bezeichnung für die mittlere Verweildauer eines intakten Arzneimittelmoleküls im Körper. Die MRT wird berechnet aus der AUC und der AUMC in folgender Gleichung: $MRT = AUMC / AUC$. Die AUMC beschreibt die Fläche unter der ersten Momentkurve, die definiert ist als das Produkt der Zeit t und der Plasmakonzentration C_{max} von $t = 0$ bis unendlich.

Verteilungsvolumen. Das Verteilungsvolumen (V) beschreibt die Größe des Raumes, in dem sich eine Substanz gleichmäßig verteilt. In der Regel ist es ein rein fiktives Volumen. Es verbindet die intravenös verabreichte Dosis D mit der daraus resultierenden Plasmakonzentration C_0 durch die Formel $C_0 = D / V$. Man unterscheidet dabei das zentrale Verteilungsvolumen V_c , in welches sich das Medikament nach Aufnahme schnell verteilt, vom Verteilungsvolumen im *Steady State* V_{ss} , welches nach der Medikamentenverteilung und Anreicherung im Gewebe im Körper entsteht.

Totale Clearance. Ein Parameter der Elimination stellt die totale Clearance (Cl) dar. Ganz allgemein beschreibt die Clearance das Blutvolumen, welches in einer bestimmten Zeit von einer bestimmten Substanz befreit wird. Die totale Clearance oder auch Gesamtkörperclearance wird dadurch bestimmt, dass man die Dosis (D) einer Substanz durch die AUC dividiert.

$$Cl = D / AUC$$

Die totale Clearance setzt sich in den meisten Fällen aus verschiedenen Teil-Clearances zusammen, wobei der Großteil dabei aus der renalen und hepatischen Clearance besteht.

Eliminationshalbwertszeit. Dieser Parameter, der auch als Plasmahalbwertszeit ($t_{1/2}$) bezeichnet wird, ist die Zeit, in der die Plasmakonzentration einer Substanz auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes abfällt. Bei einem 2-Kompartiment-Modell wird unterschieden in $t_{1/2\alpha}$, welches die Halbwertszeit zu Beginn des Konzentrations-Zeit-Verlaufs bezeichnet. In der α -Phase fällt die Plasmakonzentration durch die schnelle Verteilung des Pharmakons im Körper bedingt rasch ab. Im Anschluss daran

schließt sich der langsamere β -Strom an, der die restliche Elimination und die Rückverteilung des Stoffes darstellt und durch $t_{1/2 \beta}$ beschrieben ist. Zuletzt ist $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ als terminale Halbwertszeit aus dem Abfall der letzten drei bis fünf Konzentrationen beschrieben und berechnet sich mit folgender Gleichung:

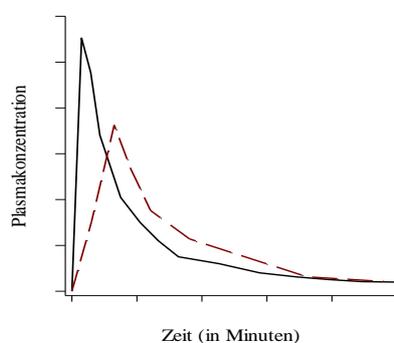
$$t_{1/2 \text{ Lambda } z} = \ln(2) / \text{Lambda } z$$

Lambda z stellt die Eliminationskonstante dar, die bei halblogarithmischer Darstellung aus der Steigung des linearen Konzentrationsabfalls berechnet wird.

Bioverfügbarkeit. Die Bioverfügbarkeit (F) beschreibt den Anteil der Substanzmenge, die nach Applikation in den systemischen Kreislauf gelangt und damit ihren Wirkort erreicht. Bei intravenöser Applikation beträgt die Bioverfügbarkeit definitionsgemäß 100 Prozent. Die AUC ist unabhängig von der Applikationsart proportional zur bioverfügbaren Dosis $F * D$.

Es gilt: $AUC = F * D / Cl$

Absolute orale Bioverfügbarkeit (F). Bei oral verabreichten Medikamenten wird die Bioverfügbarkeit u. a. durch unvollständige gastrointestinale Resorption und durch den präsystemischen Metabolismus in Darmschleimhaut und Leber beeinflusst und vermindert. Daraus ergeben sich zwei verschiedene Verläufe der Konzentrations-Zeit-Kurven bei oraler und intravenöser Applikation (siehe Abbildung 4). Dies bedeutet, dass bei vollständiger Bioverfügbarkeit die Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven bei intravenöser und bei oraler Medikamentengabe gleich groß sind. Ist die Fläche bei oraler Applikation jedoch kleiner, so ergibt sich daraus eine verminderte orale Bioverfügbarkeit. Es gilt die Beziehung: $F = (AUC_{po} / AUC_{iv}) * (D_{iv} / D_{po})$



Exemplarisch dargestellt sind die pharmakokinetischen Parameter eines Probanden (10A) nach oraler (gestrichelter Kurvenverlauf) sowie intravenöser (durchgehender Kurvenverlauf) Torasemidapplikation. Es lässt sich ein späteres Erreichen der C_{max} sowie eine langsamere Verteilungs- und Eliminationsphase nach oraler Dosierung im Vergleich zur intravenösen Dosierung erkennen.

Abbildung 4 Konzentrations-Zeit-Kurven nach oraler und intravenöser Arzneimittelapplikation

2.4.2 Pharmakokinetische Modelle

Zur Berechnung der pharmakokinetischen Parameter ist es in einigen Fällen hilfreich mathematische Modellannahmen zu benutzen. Mithilfe sogenannter Kompartimentmodelle lassen sich die komplizierten und vielfältigen pharmakokinetischen Vorgänge im menschlichen Körper vereinfachend darstellen. Dabei teilt man den Körper in vereinfachte hypothetische Kompartimente auf, die die verschiedenen physiologischen Körperflüssigkeits- und Geweberäume darstellen. Es wird von einem offenen System ausgegangen, da das aufgenommene Arzneimittel den Körper unverändert oder in Form seiner Metaboliten wieder verlässt. Grundsätzlich unterscheidet man das Ein-Kompartiment-Modell von dem Zwei- oder Mehr-Kompartiment-Modell. Während sich das Pharmakon im Ein-Kompartiment-Modell rasch und einheitlich verteilt, diffundiert das Pharmakon im Zwei- oder Mehr-Kompartiment-Modell in unterschiedlich großen Verteilungsräumen hin und her. Dabei wird zwischen einem zentralen (V_1) und peripheren (V_2) Kompartiment unterschieden. Die schnelle Verteilung und anfängliche Elimination eines Medikamentes bewirkt zunächst in der Regel einen raschen Konzentrationsabfall. Diese sogenannte Verteilungsphase wird auch als *alpha*-Phase bezeichnet. Im Anschluss an diese Phase kommt es häufig zu der langsameren Elimination nach Rückverteilung des Pharmakons, die durch einen nur diskreten Konzentrationsabfall gekennzeichnet ist. Diese sogenannte Eliminationsphase wird häufig als *beta*-Phase bezeichnet. Mithilfe der Eliminationshalbwertszeiten $t_{1/2\alpha}$ sowie $t_{1/2\beta}$ lassen sich für die beiden Phasen die jeweiligen Halbwertszeiten berechnen (Gugeler und Klotz 2000).

2.5 Statistische Methoden

Das Ziel der TWINS-II-Studie ist es, die Erbllichkeit im Arzneimittelmetabolismus anhand pharmakokinetischer Parameter von monozygoten und dizygoten Zwillingen vergleichend zu untersuchen. Die wichtigsten primären Parameter sind hierbei die AUC bzw. die sich daraus ergebene CI. Die Ermittlung der deskriptiven statistischen Werte wurde anhand der Konzentrations-Zeit-Kurven der Probanden vorgenommen. Die pharmakokinetischen Parameter wurden mithilfe der nicht-parametrischen Analyse als Testverfahren berechnet. Als Grundlage dienten hierbei die Mittelwerte pro Proband. In der Studienperiode I wurde der Mittelwert aus allen absolvierten Studienphasen (in der Regel drei) pro Proband berechnet; in der Studienperiode II der Mittelwert aus der einzelnen Studienphase pro Proband. Die Berechnungen der Parameter erfolgten durch das Programm WinNonlin™ Version 2.1. Für die weiteren statistischen Auswertungen sowie die graphische Darstellung wurden die Programme SigmaPlot™ Version 12.5, Microsoft Excel™ 2007 und R™ Version 2.15.3 genutzt.

2.5.1 Berechnung der Erblichkeit

Zur Berechnung der Erblichkeit wurden verschiedene Herangehensweisen gewählt.

Erblichkeitsberechnung nach Falconer. Schon in den 1960er Jahren entwickelte D.S. Falconer eine Formel, die zur Ermittlung der Erblichkeit herangezogen wird. Sie lautet

$$H^{2(F)} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ}).$$

Dabei steht H^2 für die Erblichkeit, r_{MZ} und r_{DZ} geben den Korrelationskoeffizienten für monozygote (MZ) und dizygote (DZ) Zwillinge an (Falconer und Mackay 1996).

Erblichkeitsberechnung nach Vesell. In den 1970er Jahren führte E.S. Vesell eine weitere Formel zur Abschätzung der Erblichkeit ein, die sich nur wenig von der Falconer-Formel unterscheidet:

$$H^{2(V)} = r_{MZ} - r_{DZ} / 1 - r_{DZ}$$

Hier stehen r_{MZ} und r_{DZ} für den Korrelationskoeffizienten der monozygoten (MZ) und dizygoten (DZ) Zwillinge (Vesell 1978).

Erblichkeitsberechnung mithilfe der Strukturgleichungsmodell-Analyse. Mithilfe dieser Analyse können die vielfältigen Einflussfaktoren der Variabilitäten genauer identifiziert und quantitativ eingeschätzt werden. Dabei wird unterschieden zwischen genetischen Aspekten, aufgeteilt in genetisch additive Einflüsse (A) und dominante Effekte (D), und Umweltaspekten, aufgeteilt in gemeinsam erlebte Umweltfaktoren (C) und individuell spezifische Umweltfaktoren (E), wobei das letztgenannte auch Messfehler beinhaltet. Die phänotypische Variante (P) ergibt sich aus der Summe der genannten Komponenten: $P = A + D + C + E$. Mono- und dizygote Zwillingen erleben zu 100 Prozent den gleichen Umwelteinfluss (C). Nur hinsichtlich ihrer genetischen Aspekte unterscheiden sie sich. Während monozygote Zwillinge in Bezug auf ihre Gene (A und D) vollkommen identisch sind, unterscheiden sich dizygote Zwillinge zu 50 Prozent in den additiven genetischen Aspekten (A) und zu 25 Prozent in den dominanten Effekten (D). Die individuell erlebten Umweltereignisse (E) werden immer getrennt voneinander erlebt (Rijsdijk und Sham 2002).

$$P_{MZ} = A + D + C$$

$$P_{DZ} = 0,5 A + 0,25 D + C$$

Eine eindeutige Isolierung von Variablen C und E ist bei einer *klassischen* Zwillingsstudie nicht möglich, sodass zu weiteren Analysezielen die Modelle ACE, ADE, AE und CE gebildet werden.

Die Testgüte wird mithilfe des χ^2 -(x^2 -) und p-Wertes ermittelt. Als Vergleich dient das saturierte Modell, welches genau aus der Anzahl aller in die Strukturmodellanalyse eingegebenen Parameter besteht, jedoch keinen Spielraum für latente Variablen lässt. Im Vergleich zum saturierten Modell bedeutet ein nicht-signifikanter p-Wert in Bezug auf die genannten Modellvarianten, dass das gewählte Modell gut zu den Werten passt. Zudem sollte das getestete Modell den niedrigsten Wert der AIC (*akaike information criterion*) und damit die minimalste Varianz der Residuen aufweisen. Dadurch wird sichergestellt, dass das Modell zur Erblichkeitsabschätzung nicht unnötig komplex wird (Rijsdijk und Sham 2002). Die Berechnung erfolgt mithilfe des Programms RTM und dem Softwarepaket mets Version 0.2.3 (entwickelt von Klaus K. Holst und Thomas Scheike, Universität Kopenhagen, Dänemark).

3 Ergebnisse

3.1 Die untersuchte Stichprobe

An der klinischen Studie haben insgesamt 58 Zwillingspaare teilgenommen. Davon haben 50 Zwillingspaare (86 Prozent) den gesamten ersten Teil der Studie (Studienperiode I) mit drei Dosierungen abgeschlossen. Die restlichen acht Paare beendeten die Studie aus unterschiedlichsten Gründen nach der ersten bzw. zweiten Dosierung vorzeitig. An dem zweiten Teil der Studie (Studienperiode II), der nur die oralen Dosierungen beinhaltete, nahmen von den 58 Zwillingspaaren 37 Paare (64 Prozent) teil. Im Folgenden werden die Zwillingspaare in die Auswertung einbezogen, die die orale und intravenöse Dosierung von Torasemid und Midazolam erhalten haben. Dies entspricht den Teilnehmern der Studienperiode II. Die demographischen Daten der betrachteten Studienpopulation sind in Tabelle 15 abgebildet.

Tabelle 15 Demographische Daten der betrachteten Studienpopulation

	Gesamt	Geschlecht		Alter [Jahre]	Gewicht [kg]	Größe [m]	BMI [kg/m ²]
		♀	♂				
	n	n	n	Mittelwert (Standardabweichung) Bereich			
	(Angabe in Prozent)						
Alle Probanden	74 (100)	54 (73)	20 (27)	24,7 (± 7,0) 18-51	65,0 (± 10,4) 48-97,5	1,70 (± 0,09) 1,55-1,95	22,6 (± 3,2) 17,9-30,2
Monozygot	58 (78)	40 (69)	18 (31)	25,3 (± 7,6) 18-51	64,6 (± 10,6) 48-97,5	1,70 (± 0,09) 1,55-1,95	22,4 (± 3,0) 17,9-30,2
Dizygot	16 (22)	14 (87,5)	2 (12,5)	22,1 (± 2,9) 18-27	66,1 (± 9,9) 53,5-83,5	1,69 (± 0,09) 1,60-1,95	23,2 (± 3,7) 18,9-29,7

n = Anzahl; ♀ = weiblich; ♂ = männlich

Von 37 Zwillingspaaren waren 29 monozygot (78 Prozent) und 8 dizygot (22 Prozent). Dieses Verhältnis ist im Vergleich zur Normalbevölkerung in Richtung monozygot verschoben, da aus der Studie dizygote Paare mit unterschiedlichem Geschlecht ausgeschlossen worden sind. Hinsichtlich der Geschlechterverteilung bestand ein leichtes Ungleichgewicht zu Ungunsten der männlichen Teilnehmer: 27 Zwillingspaare waren weiblich (73 Prozent) und 10 Paare männlich (27 Prozent).

Während des gesamten Studienverlaufs wurde die Studienmedikation insgesamt gut vertragen. Es kam nur zu einigen unspezifischen *adverse events* (AE) wie Kopfschmerzen, Schwindel oder Müdigkeit. Zudem wurden fünf *serious adverse events* (SAE) beschrieben, die in der Tabelle 16 genannt sind. Dabei ist anzumerken, dass sich diese Ereignisse auf die gesamte Studienmedikation der ganzen Zwillingstudie beziehen.

Tabelle 16 SAE der gesamten TWINS-II-Studie

Studiencode des Probanden	Ereignis	Kausaler Zusammenhang zwischen Studienmedikation und SAE
16 A	Cholezystektomie bei Gallensteinen	Unwahrscheinlich
16 B	Schmalkomplextachykardie über wenige Minuten (Frequenz bis 145/min)	Möglich
17 B	Operation nach lumbalen Bandscheibenprolaps	Unwahrscheinlich
19 B	Pylonephritis mit Hospitalisierung	Unwahrscheinlich
48 B	Infekt nach Weisheitszahn-Operation mit Hospitalisierung	Unwahrscheinlich

Diese Ereignisse, die nach den Regeln der Einordnung unerwünschter Ereignisse in klinischen Studien als schwerwiegend eingeordnet werden mussten, waren bis auf ein Ereignis nach Koffeinverabreichung höchstwahrscheinlich ohne jeden kausalen Zusammenhang mit der Studie. Insbesondere nach Midazolam- oder Torasemidverbreichung gab es keine schwerwiegende unerwünschte Reaktion auf die Studienmedikation oder die Studienprozeduren.

3.2 Häufigkeit der Genvarianten OATP1B1, CYP2C9 und CYP3A4

Um in dieser Arbeit unbekanntes von bereits bekannten genetischen Varianten berücksichtigen zu können, wurden Genotypisierungen der häufigen aus der Literatur bereits bekannten Genvarianten durchgeführt.

In Tabelle 17 werden die in der untersuchten Studienpopulation gefundenen Häufigkeiten der vermehrt vorkommenden Varianten im OATP1B1-Polymorphismus demonstriert.

Tabelle 17 Häufigkeiten bekannter Varianten im OATP1B1-Polymorphismus

	Anzahl (gesamt)	Anzahl (MZ)	Anzahl (DZ)	Phänotyp Frequenz (gesamt)	Phänotyp Frequenz (MZ)	Phänotyp Frequenz (DZ)
Variante im Val174Ala-Polymorphismus						
Homozygoter Träger von Valin (TT) Wildtyp	53	42	11	71,6 %	56,7 %	14,9 %
Heterozygoter Träger von Valin und Alanin (CT)	17	12	5	23,0 %	16,2 %	6,8 %
Homozygoter Träger von Alanin (CC)	4	4	-	5,4 %	5,4 %	-
Variante im Asn130Asp-Polymorphismus						
Homozygoter Träger von Asparagin (AA) Wildtyp	21	18	3	28,4 %	24,3 %	4,1 %
Heterozygoter Träger von Asparagin und Asparaginsäure (AG)	36	26	10	48,6 %	35,1 %	13,5 %
Homozygoter Träger von Asparaginsäure (GG)	17	14	3	23,0 %	18,9 %	4,1 %

Betrachtung der Daten nach intravenöser Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen;
MZ= monozygot, DZ= dizygot

In Tabelle 18 wird die Verteilung der OATP1B1-Genotypen und deren Auswirkung auf die Genaktivität dargestellt. Der Val174Ala-Polymorphismus und der Asn130Asp-Polymorphismus treten

häufig als kombinierte Mutationen auf, woraus die vier Haplotypen *1a=Asn130Val174, *1b=Asp130Val174, *5=Asn130Ala174, *15=Asp130Ala174 resultieren. Bei Austausch von Valin durch Alanin an Position 174 des *SLCO1B1*-Gens resultiert eine reduzierte Aktivität des Transporters.

Tabelle 18 Häufigkeiten bekannter OATP1B1-Genotypen

OATP1B1-Genotyp	Anzahl (74)	Aktivität
*1a/*1a	19	Hoch
*1a/*1b	25	Hoch
*1a/*5	2	Intermediär
*1a/*15	11	Intermediär
*1b/*1b	9	Intermediär
*1b/*15	4	Niedrig
*15/*15	4	Niedrig

Betrachtung der Daten nach intravenöser Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen

In Tabelle 19 werden die Häufigkeiten der CYP2C9-Genotypen mit Auswirkung auf die Genaktivität aufgeführt, die in der hier untersuchten Studienpopulation gefunden worden sind.

Tabelle 19 Häufigkeiten bekannter CYP2C9-Genotypen

CYP2C9-Genotyp	Anzahl (gesamt)	Anzahl (MZ)	Anzahl (DZ)	Phänotyp	Phänotyp	Phänotyp	Aktivität
				Frequenz (gesamt)	Frequenz (MZ)	Frequenz (DZ)	
*1/*1	41	38	3	86,5 %	70,3 %	16,2 %	Normal
*1/*2	19	12	7				
*2/*2	4	2	2				
*1/*3	9	6	3	13,5 %	8,1 %	5,4 %	Niedrig
*2/*3	1	-	1				

Betrachtung der Daten nach intravenöser Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen.

Für die durch die Genvariante *2 kodierte Enzymvariante von CYP2C9 bei Torasemid ist eine normale Aktivität bekannt, während Träger der Variante *3 eine verringerte Metabolisierungsaktivität

bei Torasemid zeigen. Bezogen auf die untersuchte Stichprobe kann eine normale Aktivität für das Enzym CYP2C9 bei 64 Probanden und eine verringerte Aktivität bei 10 Probanden vorausgesagt werden.

In Tabelle 20 wird die Verteilung der CYP3A4-Genotypen und deren Auswirkung auf die Genaktivität dargestellt. Für das Enzym CYP3A4 wurde das Auftreten des *22-Genotyps bestimmt, für den eine erniedrigte Enzymaktivität bekannt ist.

Tabelle 20 Häufigkeiten bekannter CYP3A4-Genotypen

CYP3A4-Genotyp	Anzahl (gesamt)	Anzahl (MZ)	Anzahl (DZ)	Phänotyp Frequenz (gesamt)	Phänotyp Frequenz (MZ)	Phänotyp Frequenz (DZ)	Aktivität
*1/*1	69	54	15	93,2 %	72,9 %	20,3 %	Normal
*1/*1b	3	2	1	4,1 %	2,7 %	1,4 %	Normal
*1/*22	2	2	-	2,7 %	2,7 %		Niedrig

Betrachtung der Daten nach intravenöser Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen.

3.3 Variabilität von OATP1B1 und CYP2C9 gemessen mit Torasemid als *In-vivo*-Indikatorsubstanz

3.3.1 Pharmakokinetik von Torasemid nach oraler Applikation

Es folgt zunächst die Abbildung und Analyse von Konzentrations-Zeit-Kurven, die nach oraler Applikation gemessen wurden. Die graphische Darstellung der Konzentrationsverläufe nach oraler Dosierung von Torasemid ist im Folgenden in linearer und halblogarithmischer Form aufgetragen. Aus der linearen Darstellung (Abbildung 5) wird ersichtlich, dass nach der oralen Torasemidapplikation die Maximalkonzentration (C_{\max}) erst nach einiger Verzögerung erreicht wird (Median der t_{\max} monozygot= 60 Minuten; Median der t_{\max} dizygot= 46 Minuten). Ansonsten unterscheiden sich die Graphen der mono- und dizygoten Zwillinge nicht wesentlich voneinander.

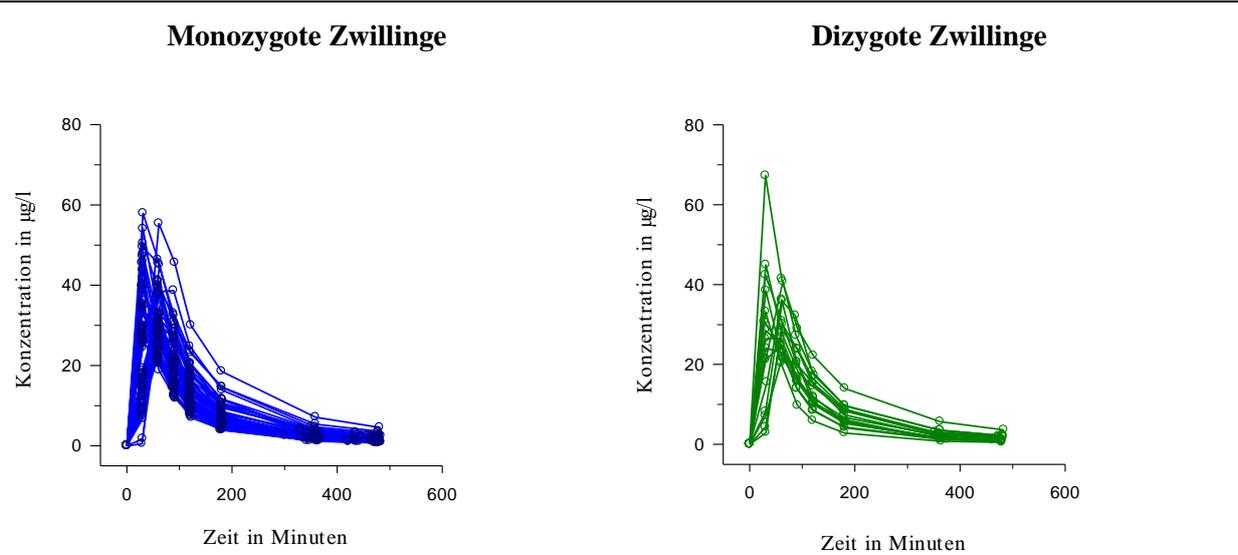


Abbildung 5 Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid nach oraler Applikation

Berücksichtigung aller Studienteilnehmer der Studienperiode II (n = 74), unterteilt in mono- und dizygoten Zwillingen

In der halblogarithmischen Darstellung (siehe Abbildung 6) kann man nach dem initialen Konzentrationsanstieg einen diskreten biphasischen Konzentrationsabfall erkennen.

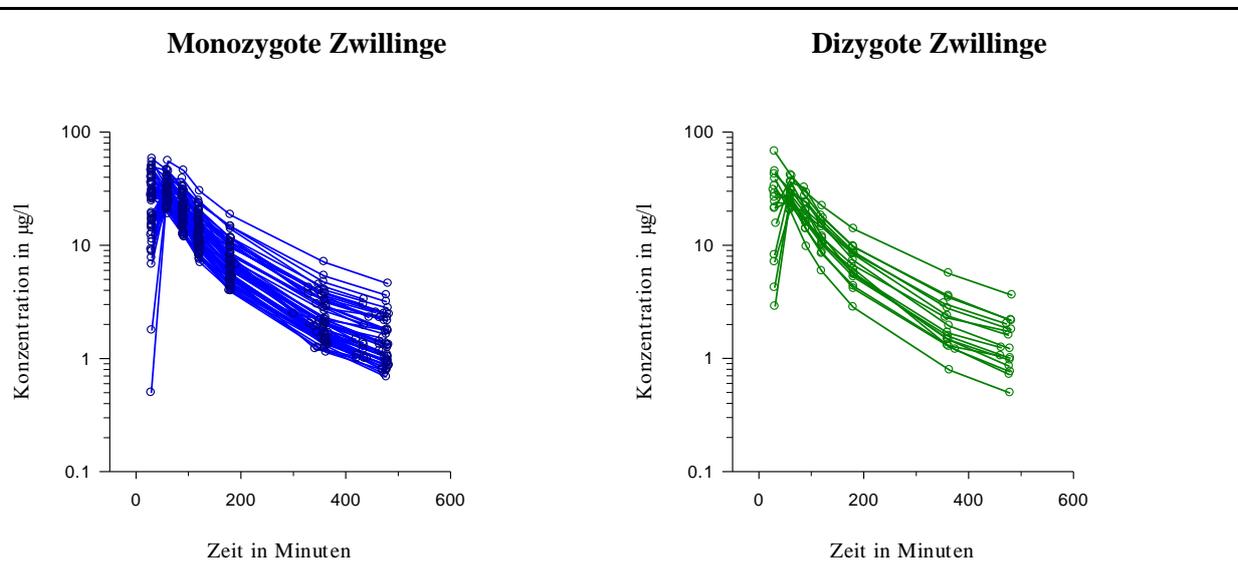


Abbildung 6 Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid nach oraler Applikation

Wenn man in Gedanken eine Gerade durch alle abfallenden Konzentrationswerte legt, sieht man initial einen etwas stärkeren Abfall als gegen Ende. Eine Interpretation könnte sein, dass in den ersten etwa 100 Minuten neben der Elimination auch noch die Verteilung des Medikamentes im Körper stattfindet.

Zur weiteren Analyse der Pharmakokinetik von Torasemid wurden zusammenfassend pharmakokinetische Parameter und Kenngrößen mittels nicht-parametrischer Analyse bestimmt. Die Daten der gesamten Studienpopulation getrennt nach mono- und dizygot für Torasemid nach oraler Gabe sind in Tabelle 21 dargestellt. Im statistischen Vergleich der Parameter zwischen den Gruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 21 Analyse der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Torasemidapplikation

Monozygote Zwillinge					
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	33	29	41	21-58	2,8
t_{\max} [min]	60	31	61	29-89	3,1
AUC_{inf} [$\text{mg} \cdot \text{min/l}$]	4,3	3,5	5,3	2,6-9,1	3,5
Cl [l/min]	0,058	0,048	0,072	0,027-0,095	3,5
MRT [min]	145	133	163	110-214	1,9
V_z [l]	9,5	8,2	11,9	5,2-16,2	3,1
$t_{\frac{1}{2} \text{ Lambda } z}$ [min]	116	104	129	79-153	1,9
Dizygote Zwillinge					
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	32	27	40	21-67	3,2
t_{\max} [min]	46	30	61	28-63	2,3
AUC_{inf} [$\text{mg} \cdot \text{min/l}$]	3,7	3,4	5,2	2,7-8,7	3,2
Cl [l/min]	0,067	0,048	0,073	0,029-0,091	3,1
MRT [min]	147	132	173	107-188	1,8
V_z [l]	9,9	8,9	11,6	6,4-15,4	2,4
$t_{\frac{1}{2} \text{ Lambda } z}$ [min]	113	108	117	98-154	1,6

3.3.2 Pharmakokinetik von Torasemid nach intravenöser Applikation

Die graphische Darstellung von Torasemid nach intravenöser Applikation unterteilt nach mono- und dizygoten Zwillingen nur der Studienteilnehmer der Studienperiode I, die auch an der Studienperiode II mit der oralen Dosierung teilnahmen, ist in Abbildung 7 dargestellt. Einige Daten der hier präsentierten insgesamt 74 Probanden wurden in der Doktorarbeit von J. Matthaei dargestellt (Matthaei 2014). Darüber hinaus wurden Ergebnisse der intravenösen Torasemidapplikation in dem Paper „Heritability of metoprolol and torsemide pharmacokinetics“ veröffentlicht (Matthaei et al. 2015). Einige dieser Daten wurden der Vollständigkeit halber in die Auswertung mit einbezogen. Es wurden in dieser Arbeit jedoch nur die Probanden betrachtet, die die intravenöse und orale Dosierung erhalten haben.

Die Konzentrations-Zeit-Kurven zwischen den beiden Gruppen und untereinander gestalten sich sehr ähnlich, wie in der Abbildung 7 nachzuvollziehen ist.

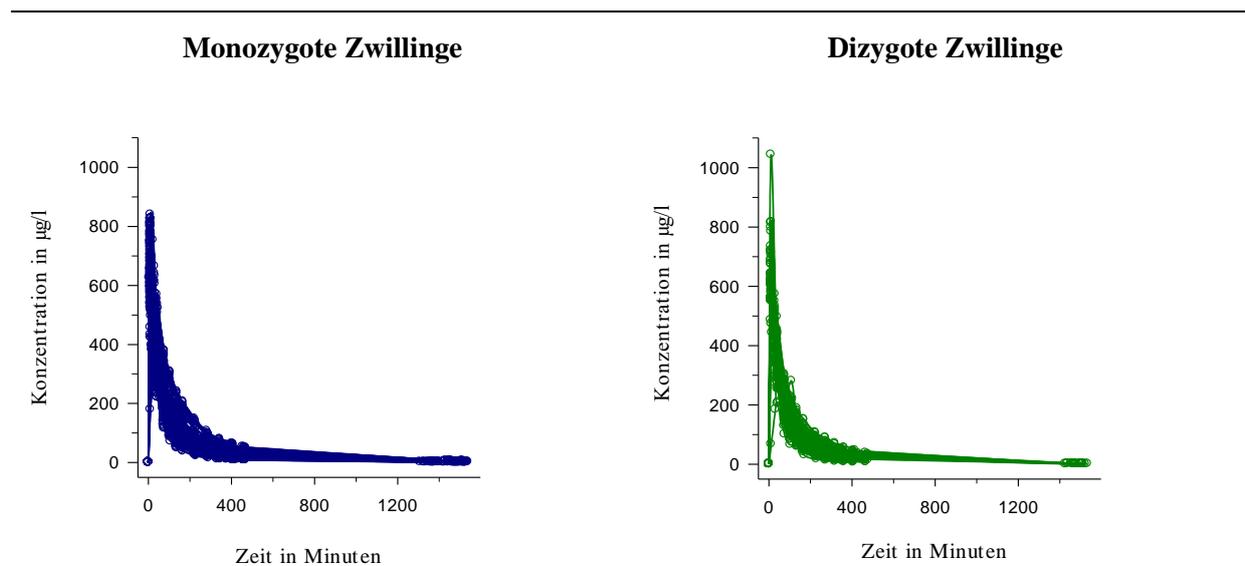


Abbildung 7 Konzentrations-Zeit-Kurven von Torasemid intravenös

Berücksichtigung der Studienpopulation der Studienperiode I, die auch an Studienperiode II mit oraler Dosierung teilnahmen (n = 74); Betrachtung aller drei Studienphasen, unterteilt in mono- und dizygote Zwillinge.

3.3.3 Erbllichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Torasemid

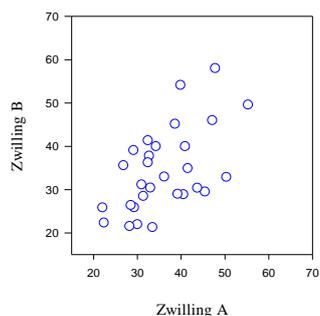
3.3.3.1 Erbllichkeitsberechnung nach Falconer und Vesell

Um Erbllichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell anstellen zu können, werden die Korrelationen der pharmakokinetischen Parameter zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen benötigt. Die dazugehörigen Korrelationsgraphen nach oraler Torasemidapplikation sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt. Dabei wurden jeweils die arithmetischen Mittelwerte der Parameter C_{\max} , t_{\max} , AUC_{inf} , Cl , MRT , V_z und $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ eines Zwillingpaares miteinander korreliert. Für eine hohe Korrelation spricht die Anordnung der Punkte auf einer annähernden Geraden. Liegen die Punkte gehäuft in der Mitte oder sind gleichmäßig im Raum verteilt, so spricht dies gegen eine hohe Korrelation.

Für die orale Gabe von Torasemid ließen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen nachvollziehen. Eine augenscheinlich hohe Korrelation wiesen am ehesten AUC_{inf} sowie Cl auf. Die Häufung der t_{\max} -Werte bei bestimmten Werten hat methodische Gründe, da nur zu bestimmten Zeitabständen Blutproben entnommen wurden, sodass eine augenscheinlich niedrige Korrelation von t_{\max} imponiert.

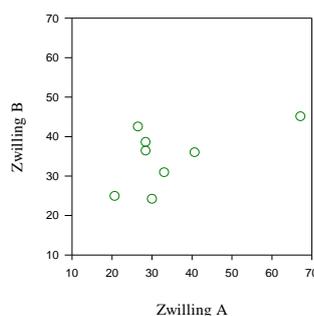
Monozygote Zwillinge

C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]



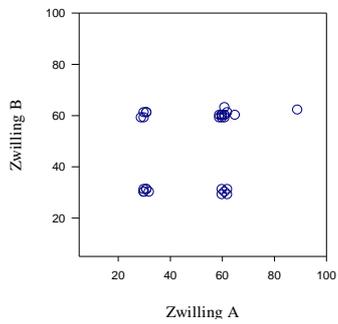
Dizygote Zwillinge

C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]



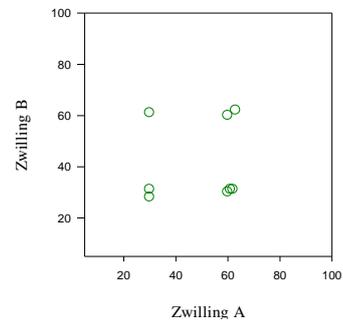
Monozygote Zwillinge

t_{\max} [min]

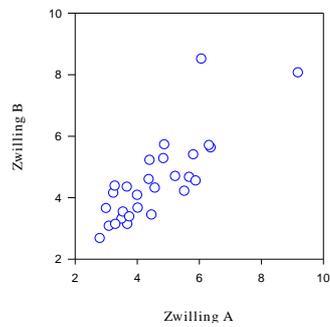


Dizygote Zwillinge

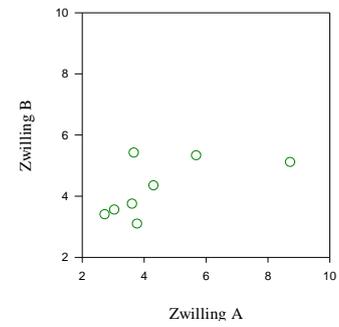
t_{\max} [min]



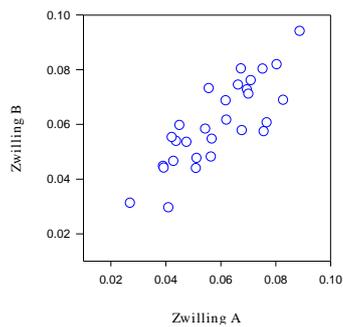
AUC_{inf} [mg*min/l]



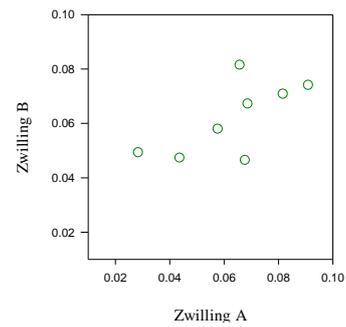
AUC_{inf} [mg*min/l]



Cl [l/min]

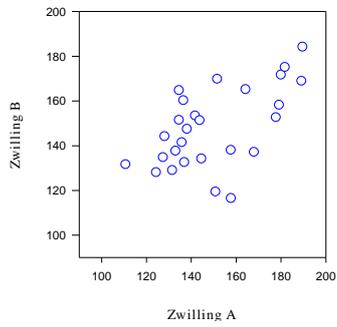


Cl [l/min]



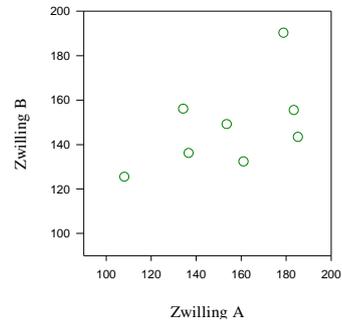
Monozygote Zwillinge

MRT [min]

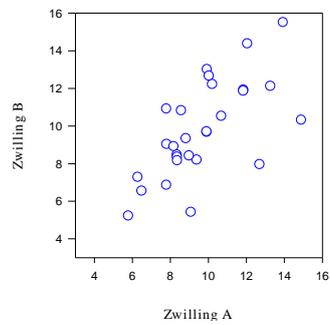


Dizygoter Zwillinge

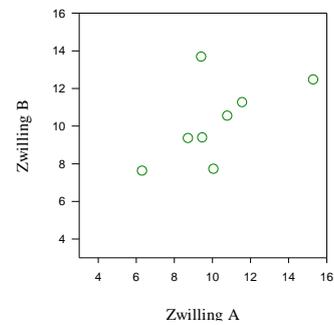
MRT [min]



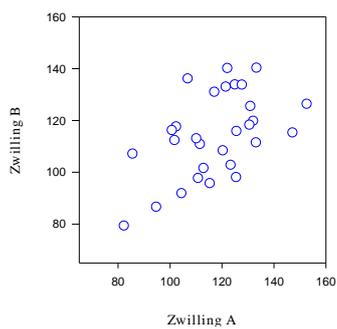
V_z [l]



V_z [l]



$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ [min]



$t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ [min]

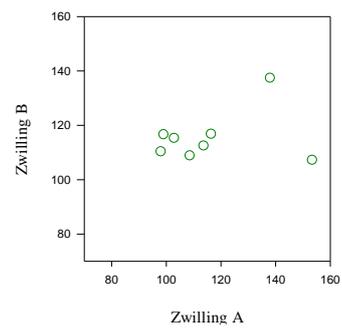


Abbildung 8 Korrelationsgraphen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach oraler Torasemidapplikation

Im Weiteren konnte die Bestimmung der Pearson-Korrelationskoeffizienten unter den Geschwistern erfolgen, um dann wiederum die Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell durchführen zu können (Tabelle 22).

Tabelle 22 Korrelationen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach Torasemidapplikation

Pearson-Korrelationskoeffizient	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Parameter	r_{MZ} oral (95%-KI)	r_{DZ} oral (95%-KI)	r_{MZ} intravenös (95%-KI)
C_{max}	0,57 (0,25-0,77)	0,57 (-0,23-0,91)	0,17 (-0,21-0,51)	0,68 (-0,04-0,94)
t_{max}	0,28 (-0,1-0,59)	0,10 (-0,65-0,75)	0,07 (-0,30-0,43)	0,90 (0,54-0,98)
AUC_{inf}	0,82 (0,65-0,91)	0,61 (-0,17-0,92)	0,84 (0,68-0,92)	0,86 (0,41-0,97)
Cl	0,82 (0,66-0,91)	0,67 (-0,06-0,93)	0,87 (0,73-0,94)	0,91 (0,57-0,98)
MRT	0,53 (0,21-0,75)	0,52 (-0,29-0,90)	0,85 (0,71-0,93)	0,65 (-0,10-0,93)
V_z	0,69 (0,43-0,84)	0,58 (-0,21-0,91)	0,77 (0,57-0,89)	0,38 (-0,45-0,85)
$t_{\frac{1}{2} \text{ Lambda } z}$	0,51 (0,17-0,74)	0,23 (-0,56-0,81)	0,77 (0,57-0,89)	0,60 (-0,18-0,92)

Intravenöse Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch orale Dosierung erhielten;

r = Pearson-Korrelationskoeffizient, Angabe des 95%-Konfidenzintervalls in Klammern (95%-KI)

In der Tabelle 22 ist der Pearson-Korrelationskoeffizient sowohl für monozygote Zwillinge (r_{MZ}) als auch für dizygoten Zwillinge (r_{DZ}) der pharmakokinetischen Parameter von Torasemid aufgeführt. Zum direkten Vergleich zwischen oraler und intravenöser Applikation wurden hier nur die Daten der Probanden nach intravenöser Dosierung betrachtet, die auch die orale Dosierung erhalten haben.

Bei Betrachtung der monozygoten Zwillingen zeigten sich für den Parameter AUC_{inf} nach oraler Dosierung ($r_{MZ \text{ oral}} = 0,82$) sowie nach intravenöser Dosierung ($r_{MZ \text{ intravenös}} = 0,84$) ähnlich hohe

Pearson-Korrelationskoeffizienten. Bei Betrachtung der dizygoten Zwillinge fiel eine niedrigere Korrelation nach oraler Dosierung ($r_{DZ\text{ oral}} = 0,61$) als nach intravenöser Dosierung ($r_{DZ\text{ intravenös}} = 0,86$) auf. Ähnliche Werte ließen sich auch für den Parameter CI finden. Auffällig war, dass nach oraler Dosierung für die beiden Parameter AUC_{inf} und CI höhere Korrelationen bei den monozygoten Zwillingen bestanden als bei den dizygoten Zwillingen. Im Vergleich dazu zeigten sich nach intravenöser Dosierung für die AUC_{inf} sowie für die CI höhere Korrelationen der dizygoten gegenüber der monozygoten Zwillingspaare, was am ehesten durch die kleine Fallzahl bedingt war.

Auf Grundlage der nun bestimmten Pearson-Korrelationskoeffizienten ließen sich Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell durchführen. Diese sind in Tabelle 23 unterschieden nach oraler und intravenöser Dosierung angegeben.

Tabelle 23 Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell nach Torasemidapplikation

Erblichkeits- berechnungen	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Falconer	Vesell	Falconer	Vesell
Parameter	$H^2 (F)_{\text{oral}} = 2*(r_{MZ}-r_{DZ})$	$H^2 (V)_{\text{oral}} = (r_{MZ}-r_{DZ}) / (1-r_{Dz})$	$H^2 (F)_{\text{intravenös}} = 2*(r_{MZ}-r_{DZ})$	$H^2 (V)_{\text{intravenös}} = (r_{MZ}-r_{DZ}) / (1-r_{Dz})$
C_{max}	0	0	< 0	< 0
t_{max}	0,36	0,2	< 0	< 0
AUC_{inf}	0,42	0,54	< 0	< 0
CI	0,30	0,45	< 0	< 0
MRT	0,02	0,02	0,4	0,57
V_z	0,22	0,26	0,78	0,63
t_{1/2 Lambda z}	0,56	0,36	0,34	0,43

Für den Parameter AUC_{inf} nach oraler Applikation zeigte sich für die geschätzte Erblichkeit nach Falconer ein Wert von 0,42 und für die geschätzte Erblichkeit nach Vesell ein Wert von 0,54. Nach intravenöser Dosierung konnte für die Parameter AUC_{inf} und CI keine Erblichkeit berechnet werden, da es aufgrund der geringen Fallzahl zu einer ungenaueren Schätzung des Pearson-Korrelationskoeffizienten kam.

3.3.3.2 *Erblichkeitsberechnung mittels Strukturgleichungsmodellanalyse*

Mittels Strukturgleichungsmodellanalyse wurden Erblichkeitsberechnungen für den primären Parameter AUC_{inf} nach oraler Applikation von Torasemid durchgeführt. Das Modell mit dem kleinsten AIC-Wert (*akaike information criterion*) und dem größten p-Wert wurde als das am besten geeignete Modell gewählt (siehe Tabelle 24).

Tabelle 24 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erblichkeit der AUC_{inf} nach oraler Torasemiddosierung

Modell	A	C	D	E
AE	0,817	-	-	0,183
CE	-	0,726	-	0,274
ACE	0,754	0,063	-	0,183
ADE	0,817	-	0,000	0,183

Modell	AIC	p-Wert
AE	1256,4	0,62
CE	1261,5	0,28
ACE	1258,4	0,55
ADE	1258,4	0,55

Es wurde das Modell gewählt, welches den höchsten p-Wert im Vergleich zum saturierten Modell und den kleinsten AIC aufwies; als beste Anpassung erwies sich hier das AE-Modell (fett markiert)

Bei Betrachtung des Parameters AUC_{inf} nach oraler Applikation stellte sich das Modell AE mit den latenten Variablen A (additive genetische Faktoren) und E (individuelle Umweltfaktoren) als das am besten geeignete dar. Es wies den kleinsten AIC-Wert sowie den größten p-Wert im Vergleich aller Modelle auf. Die Variation der AUC_{inf} nach oraler Torasemidgabe lässt sich danach zu 81,7 Prozent durch additive genetische Einflüsse und zu 18,3 Prozent durch individuelle Umwelteinflüsse erklären (siehe Tabelle 24).

3.4 Absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid

Mithilfe der Mediane von AUC_{oral} und AUC_{iv} konnte die absolute orale Bioverfügbarkeit (F) für Torasemid berechnet werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25 Analyse von F für Torasemid

	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)
Monozygote Zwillinge					
Orale AUC _{inf} [mg*min/l]	4,3	3,5	5,3	2,6-9,1	3,5
Intravenöse AUC _{inf} [mg*min/l] ¹	59,0	50,0	70,8	35,3-115,9	3,3
Intravenöse AUC _{inf} /10 [mg*min/l]	5,9	5,0	7,1	3,5-11,6	3,3
F [Prozent]	73,8	66,8	79,1	51,1-91,6	1,8
Dizygote Zwillinge					
Orale AUC _{inf} [mg*min/l]	3,7	3,4	5,2	2,7-8,7	3,2
Intravenöse AUC _{inf} [mg*min/l] ¹	56,4	47,2	66,5	32,8-83,4	2,5
Intravenöse AUC _{inf} /10 [mg*min/l]	5,6	4,7	6,6	3,3-8,3	2,5
F [Prozent]	72,4	66,1	83,1	60,8-100	1,6

F in Prozent (fett markiert);

¹: intravenöse AUC nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen

Es ist zu beachten, dass die intravenöse Torasemidapplikation mit einer zehnfach höheren Dosis als bei der oralen Torasemidapplikation erfolgte. Die Berechnung der absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) wurde mittels der Formel $F = (AUC_{\text{oral}} / AUC_{\text{iv}}) * (D_{\text{iv}} / D_{\text{oral}})$ durchgeführt. Im statistischen Vergleich mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Aus der Tabelle 25 lässt sich kein signifikanter Unterschied von F für Torasemid zwischen den monozygoten und dizygoten Zwillingen zeigen. Das Maß der Variation zeigte sich gering ausgeprägt und wies bei beiden betrachteten Gruppen ähnliche Werte auf.

Die Häufigkeitsverteilungen von F sind in den folgenden Histogrammen (Abbildung 9) unterschieden nach monozygoten und dizygoten Zwillingen dargestellt.

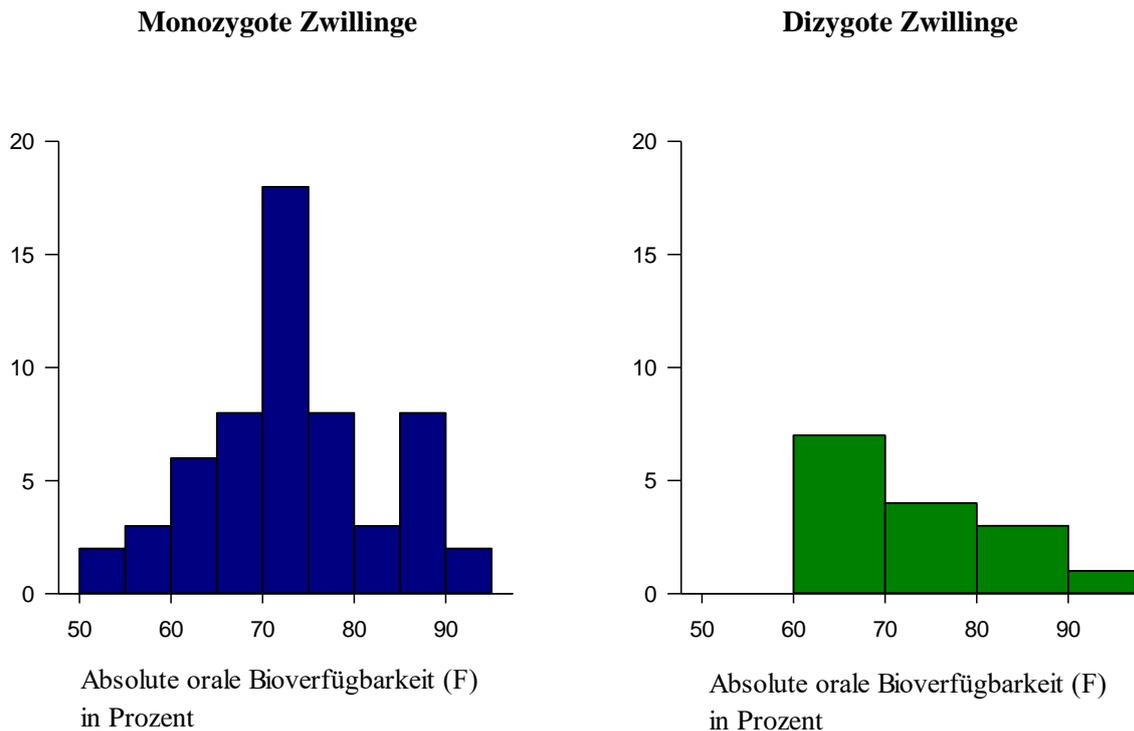


Abbildung 9 Häufigkeitsverteilungen von F nach Torasemidapplikation

Im Histogramm (Abbildung 9) liegt der größte Anteil der monozygoten Zwillinge von F zwischen 70 und 75 Prozent. Bei den dizygoten Zwillingen liegen die Häufigkeiten von F augenscheinlich etwas niedriger zwischen 60 und 70 Prozent. Die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilungen von F kann anhand Tabelle 25 reproduziert werden.

Zur Detektion möglicher Einflüsse durch bekannte erbliche Varianten im OATP1B1- und CYP2C9-Polymorphismus auf die Erbllichkeit von F für Torasemid erfolgte die Zuordnung der Häufigkeiten von F zu den einzelnen Genvarianten wie in Tabelle 26 dargestellt. Der erhöhte Wert von F im CYP2C9-Polymorphismus *2/*3 resultiert mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der geringen Fallzahl, da nur ein Proband in der gesamten Studie mit dieser Genvariante detektiert wurde. Darüber hinaus konnten keine weiteren relevanten Unterschiede dokumentiert werden.

Tabelle 26 F von Torasemid, unterteilt nach Genvarianten

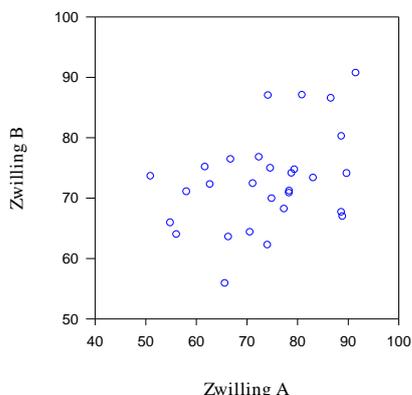
	Genvariante	F [in Prozent]*	Anzahl (gesamt)	Phänotyp- Frequenz (gesamt)
CYP2C9	*1/*1	73,0	41	55,4 %
	*1/*2	74,4	19	25,7 %
	*1/*3	73,8	9	12,1 %
	*2/*2	74,0	4	5,4 %
	*2/*3	93,0	1	1,4 %
OATP1B1	Val174Val	73,8	53	71,6 %
	Val174Ala	73,4	17	23,0 %
	Ala174Ala	75,5	4	5,4 %
	Asn130Asn	73,6	21	28,4 %
	Asn130Asp	74,4	36	48,6 %
	Asp130Asp	72,8	17	23,0 %

*Angabe des arithmetischen Mittelwerts

3.4.1 Erblichkeitsberechnung von F nach Falconer und Vesell

In Abbildung 10 werden die Korrelationsgraphen von F für Torasemid präsentiert, in denen augenscheinlich eine geringe Korrelation der monozygoten und dizygoten Zwillinge untereinander imponiert.

Monozygote Zwillinge



Dizygote Zwillinge

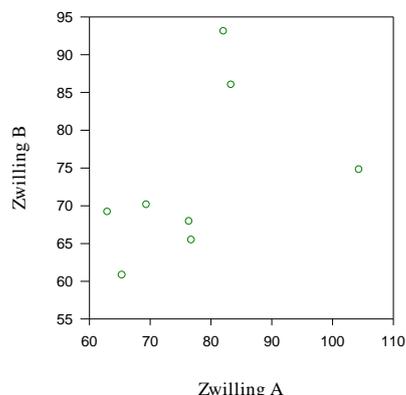


Abbildung 10 Korrelationsgraphen von F für Torasemid

Die in Tabelle 27 dargestellten Pearson-Korrelationskoeffizienten zeigten ebenfalls eine geringe Korrelation. Aus den daraus resultierenden Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell konnte keine Erblichkeit in der Variabilität von F für Torasemid berechnet werden, da der Korrelationskoeffizient bei den dizygoten Zwillingen höher als bei den monozygoten war, was wahrscheinlich aufgrund der kleinen Fallzahl bedingt war.

Tabelle 27 Korrelationen von F für Torasemid

Parameter	Pearson-Korrelationskoeffizient		Erblichkeitsberechnungen nach	
	r_{MZ} (95%-KI)	r_{DZ} (95%-KI)	Falconer $H^2(F) = 2*(r_{MZ}-r_{DZ})$	Vesell $H^2(V) = (r_{MZ}-r_{DZ}) / (1-r_{DZ})$
F	0,41 (0,05-0,67)	0,45 (-0,37-0,88)	< 0	< 0

Angabe des 95%-Konfidenzintervalls in Klammern (95%-KI)

3.4.2 Erblichkeitsberechnung von F mittels Strukturgleichungsmodellanalyse

Bei der Berechnung der Erblichkeit von F für Torasemid stellte sich das CE-Modell mit dem geringsten AIC-Wert sowie mit dem höchsten p-Wert als das am besten geeignete dar (siehe Tabelle 28). Daraus wird deutlich, dass die Variabilitäten von F zu 36 Prozent durch gemeinsam erlebte

Umweltfaktoren (C) und zu 64 Prozent durch individuell spezifische Umweltfaktoren (E) bedingt sind. Genetische Einflüsse spielten wiederum eine untergeordnete Rolle. Auch wenn man nach dem recht ähnlichen Wert des AIC Kriteriums (551,7 gegenüber 552,3) das AE-Modell hier nicht ganz ausschließen möchte, bleibt dennoch bei dem AE-Modell nur 38 Prozent der Variabilität von F erblich erklärt.

Tabelle 28 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erbllichkeit von F für Torasemid

Modell	A	C	D	E
AE	0,38	-	-	0,62
CE	-	0,36	-	0,64
ACE	1	0	-	0
ADE	0,38	-	0	0,62

Modell	AIC	p-Wert
AE	552,3	0,61
CE	551,7	0,66
ACE	1121	$< 2,2 * 10^{-16}$
ADE	554,3	0,54

Es wurde das Modell gewählt, welches den höchsten p-Wert und den kleinsten AIC aufweist; als beste Anpassung erwies sich hier das CE-Modell (fett markiert)

3.5 Berücksichtigung der bekannten Genvarianten von OATP1B1 und CYP2C9

Für die Variabilität des OATP1B1-Transporters wurden bei den Probanden dieser Studie die Genvarianten analysiert, die einen Einfluss auf die Aktivität des Transporters ausüben. Für das Vorliegen eines homozygoten Trägers von Alanin im Val174Ala-Polymorphismus ist eine verminderte Aktivität bekannt. Für die Variabilität des CYP2C9-Enzyms erfolgte bei den Probanden ebenfalls die Analyse der Varianten, die einen Einfluss auf die Aktivität ausüben. Hier ist bei Vorliegen der Genvariante *CYP2C9*3* eine verminderte Aktivität bekannt.

Mittels multipler Regressionsanalyse konnte bestimmt werden, inwiefern der primäre Parameter AUC_{inf} nach oraler Torasemidapplikation abhängig von den bekannten genetischen Varianten von OATP1B1 und CYP2C9 ist und inwiefern der Parameter durch äußere Faktoren wie Geschlecht und

Gewicht der Probanden beeinflusst wird. Hierbei konnte, wie in Tabelle 29 dargestellt, für die Genvariante *CYP2C9*3* und die Anzahl der Val174-Allele im Genpolymorphismus von OATP1B1 ein signifikanter Einfluss gezeigt werden.

Tabelle 29 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf die AUC_{inf} nach oraler Torasemidgabe

Modell	R	R-Quadrat
Abhängige Variable: AUC_{inf}^{oral}	0,721	0,520

Unabhängige Einflussparameter	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Anteil von R-Quadrat
Anzahl von <i>CYP2C9*3</i> -Allelen	1003	346,4	0,005	0,059
Anzahl von OATP1B1-Val174-Allelen	-1537	198,4	<0,001	0,417
Geschlecht	-262,8	280,8	0,352	nicht signifikant
Gewicht (kg)	-43,61	12,28	<0,001	0,088

Wie viel der Variation der abhängigen Variablen durch die Einflussvariablen erklärt werden kann, wird durch den Anteil von R-Quadrat beschrieben (in Tabelle 29 fett markiert). Demnach wird deutlich, dass sich die AUC_{inf} nach oraler Torasemidapplikation signifikant durch die Genaktivität von *CYP2C9*3* (5,9 Prozent) und durch die Anzahl der Val174-Allele im OATP1B1-Gen (41,7 Prozent) beeinflussen lässt. Zudem konnte ein signifikanter Einfluss des Körpergewichts der Probanden (8,8 Prozent) gezeigt werden. Weitere Einflussfaktoren waren nicht signifikant.

Unter Verwendung der AUC_{inf} nach oraler und intravenöser Torasemiddosierung war es möglich, die absolute orale Bioverfügbarkeit (F) zu berechnen. Inwiefern F abhängig von den bekannten genetischen Varianten des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 ist und darüber hinaus durch weitere Faktoren wie Geschlecht und Gewicht beeinflusst wird, wurde ebenfalls mittels multipler Regressionsanalyse berechnet (Tabelle 30).

Wie in Tabelle 30 ersichtlich, konnte kein signifikanter Einfluss auf F nachgewiesen werden. Insbesondere ergab sich keine Signifikanz für den Einfluss von bekannten Genvarianten im OATP1B1-Polymorphismus sowie in den CYP2C9-Genvarianten. Das könnte bedeuten, dass diese

Gene bzw. die davon kodierten Enzyme und Transportproteine keinen nennenswerten Einfluss beim First-Pass-Effekt (Metabolismus und Transport bei der ersten Passage durch Darmwand und Leber) haben. Das wiederum passt zu dem Ergebnis, dass insgesamt die Bioverfügbarkeit von Torasemid recht hoch ist.

Tabelle 30 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf F von Torasemid

Modell	R	R-Quadrat
Abhängige Variable: F	0,201	0,0403

Unabhängige Einflussparameter	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Anteil von R-Quadrat
Anzahl von <i>CYP2C9</i> *3-Allelen	6,046	5,398	0,267	nicht signifikant
Anzahl von <i>OATP1B1</i> -Val174-Allelen	-0,718	2,084	0,731	nicht signifikant
Alter (Jahre)	-0,184	0,184	0,319	nicht signifikant
Geschlecht	-1,775	3,080	0,566	nicht signifikant
Größe (cm)	-0,0215	0,0293	0,466	nicht signifikant
Gewicht (kg)	-0,0294	0,138	0,832	nicht signifikant

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Torasemid

Die untersuchte Prüfsubstanz Torasemid wird über den *OATP1B1*-Transporter in die Leberzellen aufgenommen, um anschließend dort katalysiert über das Enzym *CYP2C9* verstoffwechselt zu werden. Die ermittelten Erblichkeitsberechnungen der pharmakokinetischen Parameter von Torasemid können somit Informationen über die Erblichkeit der Aktivitäten des Transporters *OATP1B1* sowie des Enzyms *CYP2C9* wiedergeben.

Für die quantitative Einschätzung der Erblichkeit der Aktivität des Transporters *OATP1B1* sowie des Enzyms *CYP2C9* werden für die AUC_{inf} die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Für die orale Dosierung ergab sich nach der Berechnung von Falconer ein Wert von 0,42 (entspricht 42 Prozent Erblichkeit), nach der Berechnung von Vesell ergab sich ein Wert von 0,54 (entspricht 54

Prozent Erblichkeit). Im Vergleich dazu konnte nach intravenöser Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen, keine Erblichkeit berechnet werden. Dies ist jedoch höchstwahrscheinlich aufgrund der kleinen Fallzahl bedingt, was zu Ungenauigkeit der Schätzung der Regressionskoeffizienten führt.

In der Strukturgleichungsmodellierung erklärten sich 81,7 Prozent der Variation der AUC_{inf} nach oraler Verabreichung durch genetische Effekte. Mittels multipler Regressionsanalyse können bereits bekannte Genvarianten des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 die Variabilität der AUC_{inf} nach oraler Torasemidapplikation zu 5,9 Prozent durch die Genaktivität von *CYP2C9*3* und zu 41,7 Prozent durch die Anzahl der Val174-Allele im OATP1B1-Gen bedingen. Damit ist zumindest ein relativ großer Anteil der erblichen Variation in der Pharmakokinetik von Torasemid durch die bereits bekannten angeborenen Polymorphismen in OATP1B1 und CYP2C9 erklärt.

In der Abbildung 11 werden diese Ergebnisse nochmal veranschaulichend zusammengefasst.

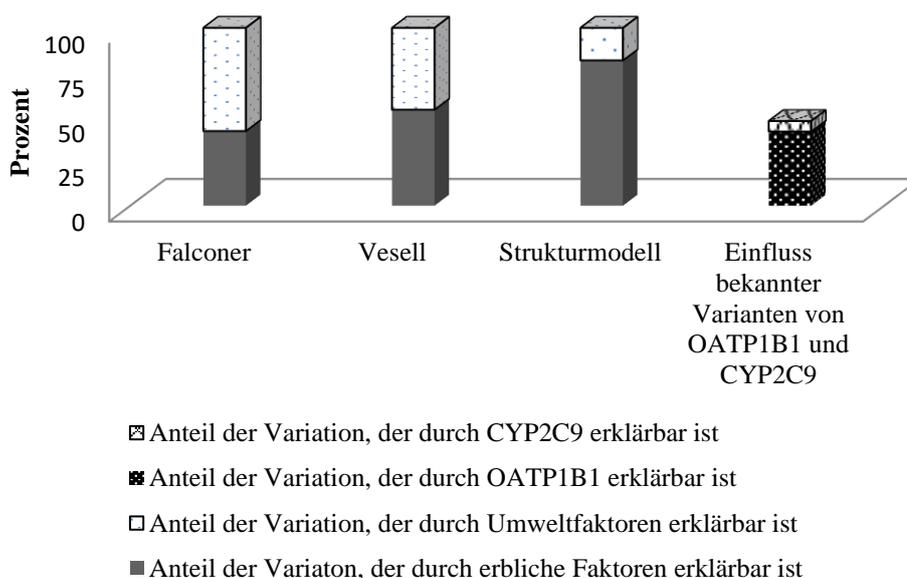


Abbildung 11 Zusammenfassende Darstellung der Erblichkeit der Aktivität von OATP1B1 und CYP2C9

Verwendet wurden die Ergebnisse der Erblichkeitsberechnungen der Variation der AUC_{inf} sowie die Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse des Einflusses der Genaktivität von *CYP2C9*3* und der Anzahl der Val174-Allele im OATP1B1-Gen auf die AUC_{inf} nach oraler Torasemiddosierung.

Für die Variabilität von F ließen sich in den hier durchgeführten Berechnungen keine Hinweise auf Erblichkeit finden. Die Berechnungen nach Falconer und nach Vesell zeigten sogar einen Wert < 0 ,

was aber nur durch die Ungenauigkeit der Schätzung der Regressionskoeffizienten bei geringer Fallzahl erklärt werden konnte. In der Strukturmodellanalyse konnten genetischen Einflüsse ebenfalls nicht eindeutig identifiziert werden. Einflüsse von bereits bekannten Genvarianten des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 zeigten mittels multipler Regressionsanalyse für die orale Bioverfügbarkeit keine signifikanten Ergebnisse. In Abbildung 12 wird dies veranschaulicht.



Abbildung 12 Einflüsse auf F von Torasemid

Verwendet wurden die Ergebnisse der Strukturgleichungsmodellanalyse

3.7 Variabilität der Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid

Die Auswertung der pharmakokinetischen Parameter des Metaboliten Hydroxytorasemid erfolgte mittels nicht-parametrischer Analyse unterschieden zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen.

3.7.1 Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid nach oraler Applikation

Für den primären Parameter AUC_{inf} des Metaboliten Hydroxytorasemid nach oraler Applikation ergab sich ein Median von 0,21 mg*min/l für die monozygoten Zwillinge sowie ein Median von 0,17 mg*min/l für die dizygoten Zwillinge. Im Vergleich zur Ausgangssubstanz Torasemid ließ sich eine größere Streuung der Variation der pharmakokinetischen Parameter feststellen (siehe Tabelle 31).

Mittels Mann-Whitney-U-Test ergaben sich für die Parameter C_{max} sowie AUC_{inf} statistisch signifikante Unterschiede zwischen den monozygoten und dizygoten Zwillingen. Die weiteren Parameter wiesen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

Tabelle 31 Analyse der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxytorasemid nach oraler Applikation

Monozygote Zwillinge						
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)	
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	1,9	1,5	2,4	0,7-4,1	5,9	
t_{\max} [min]	59,5	31	61	29-89	3,1	
AUC_{inf} [$\text{mg}^*\text{min/l}$]	0,21	0,18	0,25	0,08-0,43	5,4	
$t_{\frac{1}{2}\text{Lambda z}}$ [min]	88	76	103	50-414	8,3	
Dizygote Zwillinge						
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)	
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	1,5	1,3	1,9	0,8-3,9	4,9	
t_{\max} [min]	60	31	62	28-90	3,2	
AUC_{inf} [$\text{mg}^*\text{min/l}$]	0,17	0,14	0,22	0,08-0,33	4,1	
$t_{\frac{1}{2}\text{Lambda z}}$ [min]	83	53	96	37-139	3,8	

3.7.2 Erbllichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Hydroxytorasemid

Für den Parameter AUC_{inf} ließen sich nach oraler sowie intravenöser Applikation für den Metaboliten Hydroxytorasemid vergleichend zur Muttersubstanz Torasemid ebenfalls insgesamt hohe Korrelationen finden. Auch hier wurden nur die Studienteilnehmer nach intravenöser Dosierung in die Auswertung einbezogen, die auch an der oralen Dosierung teilnahmen (siehe Tabelle 32).

Nach oraler Dosierung waren allgemein die Korrelationen bei den dizygoten höher als bei den monozygoten Zwillingen. Die Korrelationen der AUC_{inf} nach intravenöser Applikation zeigten sich bei den monozygoten Zwillingen höher als bei den dizygoten Zwillingen. In den Erbllichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell zeigte sich für den Parameter AUC_{inf} nach oraler Applikation im Vergleich zur intravenösen Applikation keine Erbllichkeit (siehe Tabelle 32).

Tabelle 32 Korrelationen des Metaboliten Hydroxytorasemid nach Torasemidapplikation

Pearson- Korrelations- koeffizient	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Parameter	$r_{MZ\ oral}$ (95%-KI)	$r_{DZ\ oral}$ (95%-KI)	$r_{MZ\ intravenös}$ (95%-KI)
C_{max}	0,72 (0,48-0,86)	0,93 (0,67-0,99)	0,92 (0,84-0,96)	0,50 (-0,31-0,89)
t_{max}	0,15 (-0,23-0,49)	0,53 (-0,28-0,9)	0,67 (0,41-0,83)	0,87 (0,43-0,98)
AUC_{inf}	0,78 (0,57-0,89)	0,89 (0,49-0,98)	0,89 (0,78-0,95)	0,50 (-0,32-0,89)
$t_{\frac{1}{2}\ \lambda\ z}$	-0,07 (-0,43-0,30)	0,65 (-0,1-0,93)	0,47 (0,12-0,71)	0,69 (-0,02-0,94)
Erblichkeits- berechnungen	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Falconer	Vesell	Falconer	Vesell
Parameter	$H^2 (F)_{oral} =$ $2*(r_{MZ}-r_{DZ})$	$H^2 (V)_{oral} =$ $(r_{MZ}-r_{DZ}) / (1-r_{Dz})$	$H^2 (F)_{intravenös} =$ $2*(r_{MZ}-r_{DZ})$	$H^2 (V)_{intravenös} =$ $(r_{MZ}-r_{DZ}) / (1-r_{Dz})$
C_{max}	< 0	< 0	0,84	0,84
t_{max}	< 0	< 0	< 0	< 0
AUC_{inf}	< 0	< 0	0,78	0,78
$t_{\frac{1}{2}\ \lambda\ z}$	< 0	< 0	< 0	< 0

Intravenöse Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen

Angabe des 95%-Konfidenzintervalls in Klammern (95%-KI)

In der Strukturgleichungsmodellierung erwies sich das CE-Modell (p-Wert > 0,05; kleinster AIC) für den Parameter AUC_{inf} von Hydroxytorasemid nach oraler Applikation als am besten geeignet (C=0,80; E=0,20), was ebenfalls auf fehlende Erblichkeit hinweist.

3.8 Variabilität von CYP3A4 gemessen mit Midazolam als *In-vivo*-Indikatorsubstanz

In diesem Kapitel werden entsprechend zu den Ausführungen des Kapitels 3.3 „Variabilität von OATP1B1 und CYP2C9 gemessen mit Torasemid als *In-vivo-Indikatorsubstanz*“ die Ergebnisse und Analysen zur Erbllichkeit des Enzyms CYP3A4 vorgestellt. Auf eine wiederholende detaillierte Ausführung einiger bereits erläuterter Aspekte wird verzichtet.

3.8.1 Pharmakokinetik von Midazolam nach oraler Applikation

Die Konzentrations-Zeit-Kurven der mono- und dizygoten Zwillinge nach oraler Dosierung von Midazolam sind in Abbildung 13 dargestellt. Es fällt auf, dass die maximal erreichten Plasmakonzentrationen bei den dizygoten Zwillingen niedriger als bei den monozygoten waren (Median der C_{\max} monozygot = 4,88 $\mu\text{g/l}$; Median der C_{\max} dizygot = 3,35 $\mu\text{g/l}$); dies kann aber teilweise einfach mit der geringeren Zahl dizygoter Zwillinge zusammenhängen, sodass durch Zufall einfach in der kleineren Gruppe weniger Probanden mit hohen Konzentrationswerten waren.

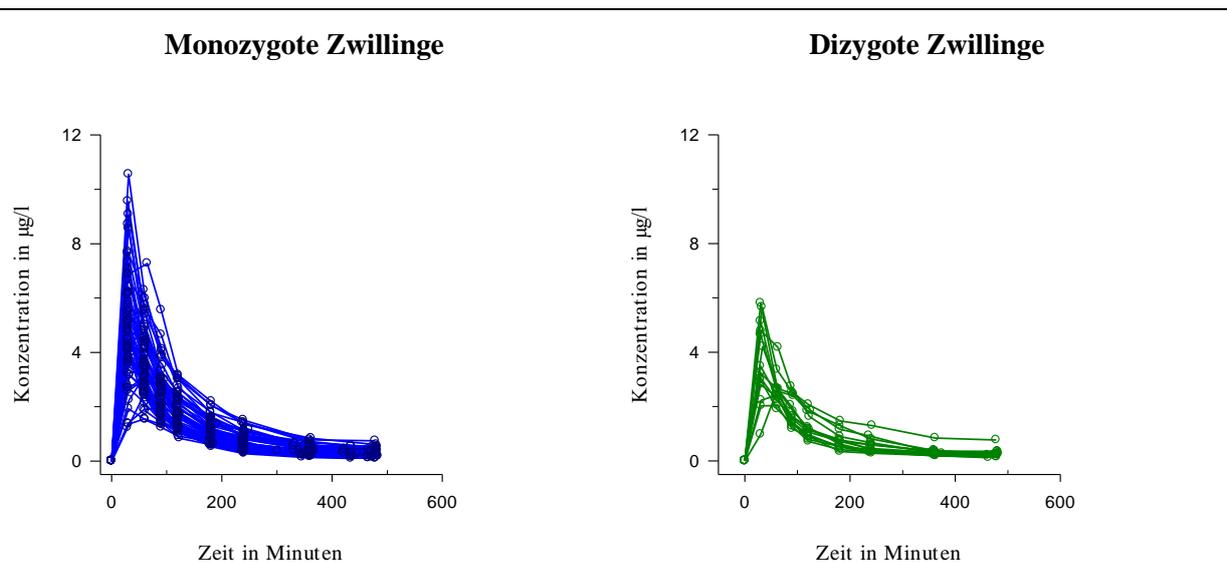


Abbildung 13 Lineare Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam nach oraler Applikation

Berücksichtigung aller Studienteilnehmer der Studienperiode II (n = 72), unterteilt in mono- und dizygoter Zwillinge

In der halblogarithmischen Darstellung (Abbildung 14) zeigt sich ähnlich zur Prüfsubstanz Torasemid ein biphasischer Konzentrationsabfall, der jedoch nur schwach ausgeprägt ist. Initial stellt sich ein etwas steilerer Abfall der Geraden als gegen Ende dar. Dies ist am ehesten dadurch bedingt, dass

neben der Medikamenten-Elimination auch die Medikamenten-Verteilung im Körper in den ersten ca. 200 Minuten eine Rolle spielen und von daher den anfänglichen etwas steileren Abfall der Gerade bedingen.

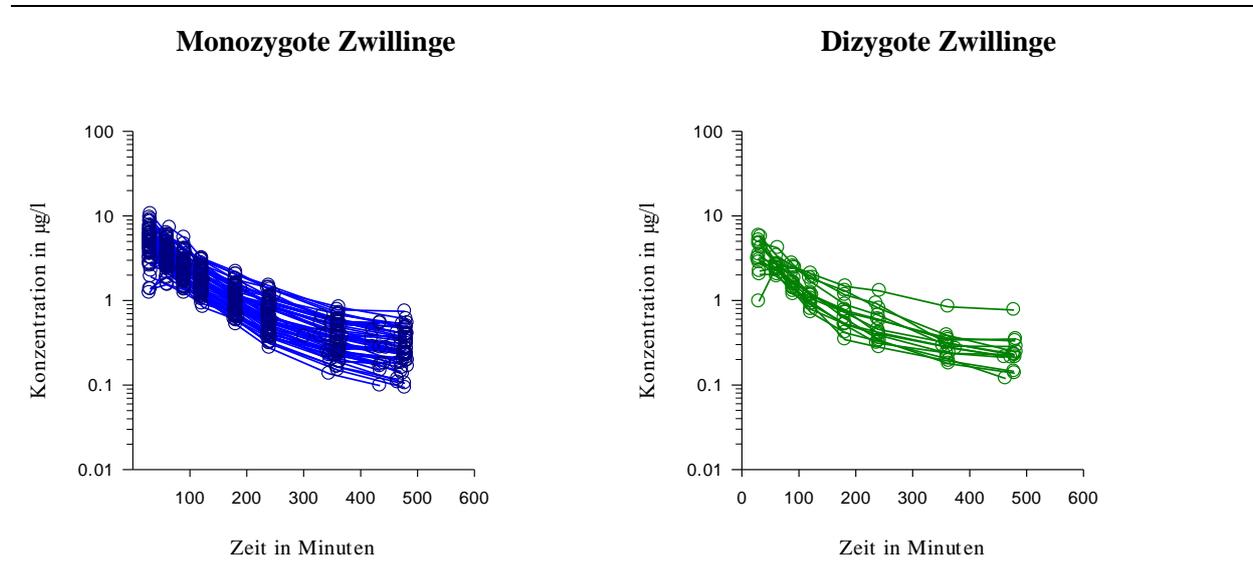


Abbildung 14 Halblogarithmische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam nach oraler Applikation

Die nicht-parametrische Analyse einiger pharmakokinetischer Parameter und Kenngrößen getrennt nach monozygoten und dizygoten Zwillingen für Midazolam nach oraler Gabe ist in Tabelle 33 dargestellt.

Im statistischen Vergleich der Parameter mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests zeigten sich zwischen den Gruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge bis auf den Parameter $t_{1/2\lambda z}$ signifikante Unterschiede. Anzumerken dabei ist, dass die untersuchte Stichprobe der dizygoten Zwillinge mit $n=14$ verhältnismäßig klein ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass ein Zwillingsspaar der Studienperiode II keine orale Verabreichung von Midazolam aufgrund einer Allergie gegen Benzoesäure, welches ein Inhaltsstoff des oralen Arzneimittels ist, erhalten hat.

Tabelle 33 Analyse der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Midazolamapplikation

Monozygote Zwillinge						
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)	
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	4,88	3,74	6,25	1,55-10,55	6,8	
t_{\max} [min]	30,5	30,0	31,3	29,0-90,0	3,1	
AUC_{inf} [$\text{mg}^*\text{min/l}$]	0,62	0,48	0,82	0,31-1,31	4,2	
Cl [l/min]	1,60	1,22	2,10	0,77-3,26	4,2	
MRT [min]	177	153	196	114-423	3,7	
V_z [l]	320	248	473	174-833	4,8	
$t_{\frac{1}{2}\text{Lambda}_z}$ [min]	143	123	169	82-429	5,2	
Dizygote Zwillinge						
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)	
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]	3,35	2,75	4,87	2,03-5,80	2,9	
t_{\max} [min]	30,0	30,0	40,8	28,0-62,0	2,2	
AUC_{inf} [$\text{mg}^*\text{min/l}$]	0,49	0,37	0,60	0,32-1,01	3,2	
Cl [l/min]	2,04	1,66	2,73	1,00-3,10	3,1	
MRT [min]	208	162	239	148-304	2,1	
V_z [l]	519	329	676	251-1057	4,2	
$t_{\frac{1}{2}\text{Lambda}_z}$ [min]	193	115	234	106-257	2,4	

3.8.2 Pharmakokinetik von Midazolam nach intravenöser Applikation

Die graphische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam nach intravenöser Applikation nur der Studienteilnehmer der Studienperiode I, die auch an der Studienperiode II mit der oralen Dosierung teilnahmen, wurde in Abbildung 15 dargestellt. Einige Daten der hier präsentierten insgesamt 74 Probanden wurden bereits in der Doktorarbeit von Jakob Strube vorgestellt (Strube 2015). In dieser Arbeit wurden jedoch nur die Studienteilnehmer betrachtet, die an der oralen und intravenösen Dosierung teilnahmen. Um einen Überblick über die Daten aller an der Studie

teilgenommenen Zwillinge zu bekommen, wurden einige dieser Daten in die folgenden Berechnungen miteinbezogen. Es erfolgte die Unterteilung in mono- und dizygoten Studienteilnehmer.

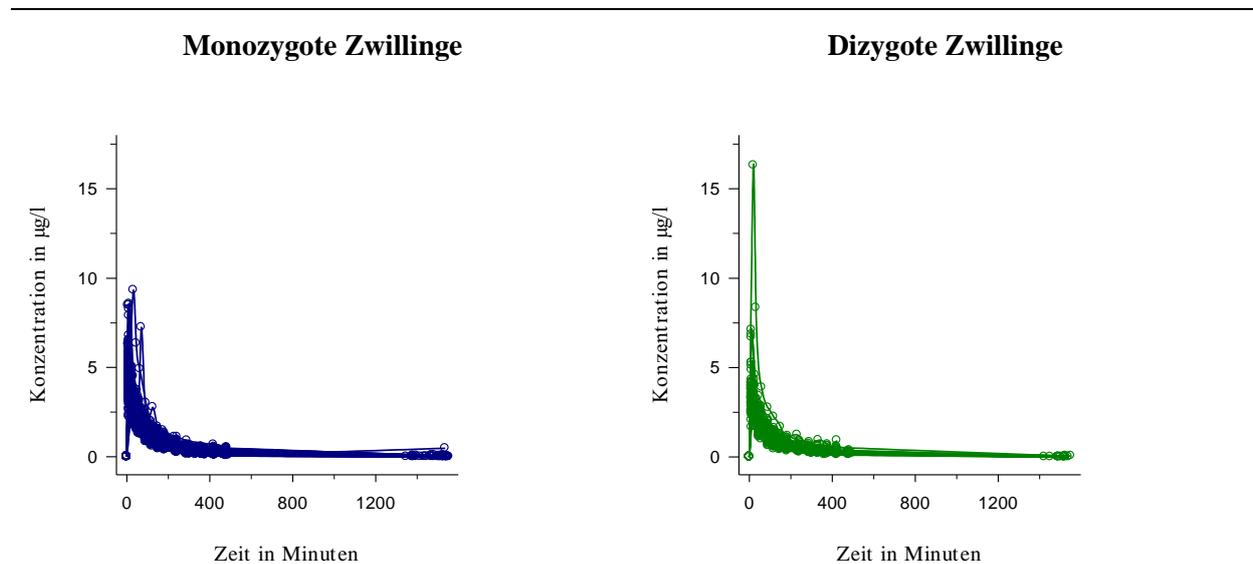


Abbildung 15 Konzentrations-Zeit-Kurven von Midazolam intravenös

Berücksichtigung der Studienpopulation der Studienperiode I, die auch an Studienperiode II mit oraler Dosierung teilnahmen (n = 74); Betrachtung aller drei Studienphasen, unterteilt in mono- und dizygoten Zwillinge

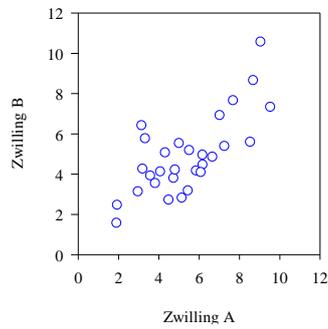
3.8.3 Erbllichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Midazolam

3.8.3.1 Erbllichkeitsberechnung nach Falconer und Vesell

Zur Berechnung der Erbllichkeit nach Falconer und Vesell wurden zunächst die Korrelationen sowie die Korrelationsgraphen der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Midazolamdosierung zwischen den monozygoten und dizygoten Zwillingen ermittelt. Die Korrelationsgraphen sind in Abbildung 16 graphisch dargestellt. Dabei erfolgte jeweils die Korrelation der arithmetischen Mittelwerte von C_{max} , t_{max} , AUC_{inf} , Cl , MRT , V_z und $t_{1/2 \text{ Lambda } z}$ eines Zwillingepaares untereinander. Auch hier wird ähnlich wie bei Torasemid die Häufung der t_{max} -Werte bei bestimmten Werten methodische Gründe haben, da während der Studie nur zu bestimmten Zeitabständen Blutproben entnommen wurden.

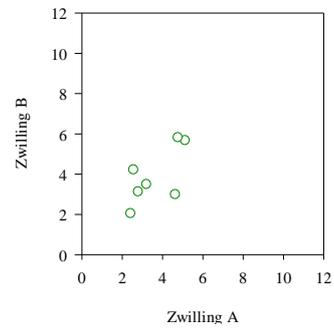
Monozygote Zwillinge

C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]

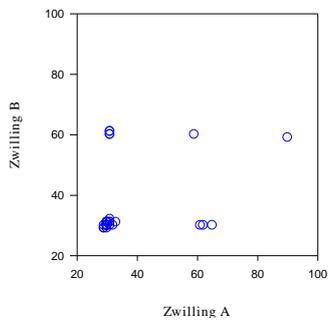


Dizygote Zwillinge

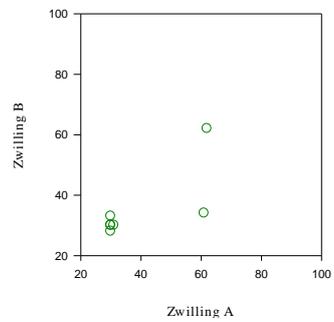
C_{\max} [$\mu\text{g/l}$]



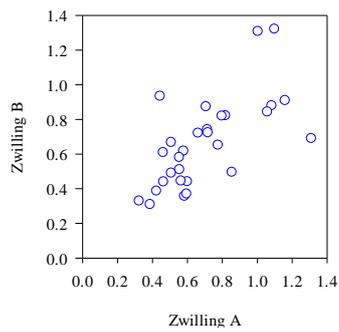
t_{\max} [min]



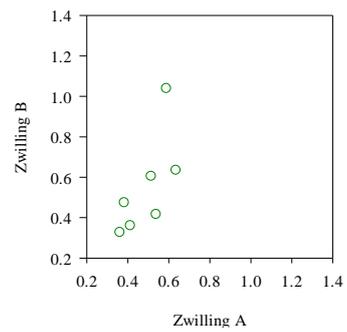
t_{\max} [min]



AUC_{inf} [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]

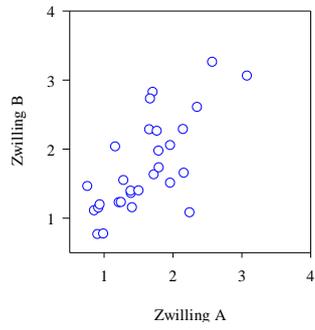


AUC_{inf} [$\text{mg}\cdot\text{min/l}$]



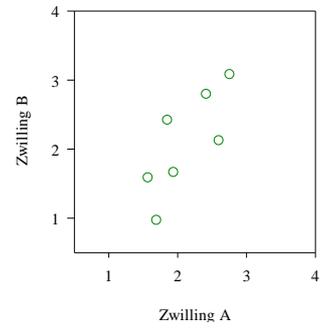
Monozygote Zwillinge

Cl [l/min]

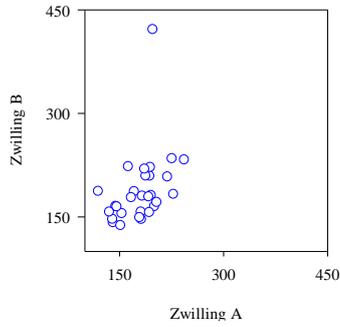


Dizygote Zwillinge

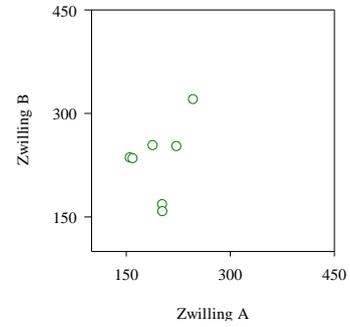
Cl [l/min]



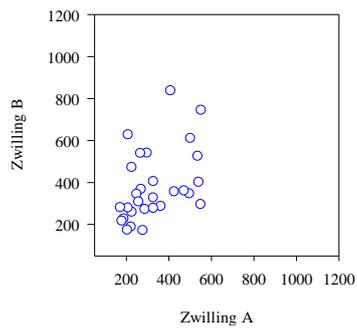
MRT [min]



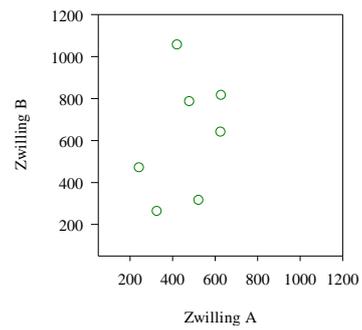
MRT [min]



V_z [l]



V_z [l]



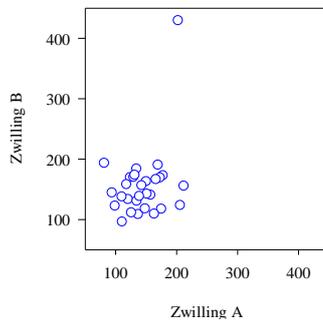
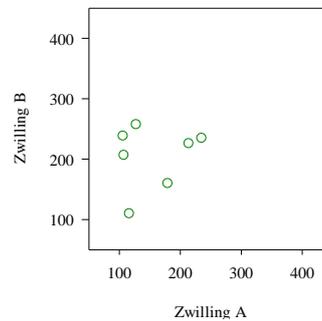
Monozygote Zwillinge $t_{1/2\text{ Lambda z}}$ [min]**Dizygote Zwillinge** $t_{1/2\text{ Lambda z}}$ [min]

Abbildung 16 Korrelationsgraphen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach oraler Midazolamapplikation

Im Weiteren folgen die Pearson-Korrelationskoeffizienten unter den Geschwistern, die in der Tabelle 34 unterteilt nach monozygoten Zwillingen (r_{MZ}) und dizygoten Zwillingen (r_{DZ}) dargestellt sind. Hierbei wurden analog der Ergebnisse zu Torasemid nur die Daten der Studienteilnehmer nach intravenöser Dosierung betrachtet, die auch die orale Dosierung erhalten haben.

Bei Betrachtung der monozygoten Zwillingen konnten für den Parameter AUC_{inf} nach oraler Dosierung ($r_{MZ\text{ oral}} = 0,66$) sowie nach intravenöser Dosierung ($r_{MZ\text{ intravenös}} = 0,66$) gleiche Pearson-Korrelationskoeffizienten gezeigt werden. Bei Betrachtung der dizygoten Zwillinge fiel eine niedrigere Korrelation nach intravenöser Dosierung ($r_{DZ\text{ intravenös}} = 0,32$) auf. Nach oraler Dosierung konnten keine Unterschiede bezüglich der Korrelation zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen detektiert werden. Ähnliche Werte ließen sich auch für den Parameter Cl finden. Hierbei war im Gegensatz zur intravenösen Dosierung die höhere Korrelation der dizygoten Zwillinge ($r_{DZ\text{ oral}} = 0,74$) gegenüber der monozygoten Zwillinge ($r_{MZ\text{ oral}} = 0,71$) nach oraler Dosierung auffällig (siehe Tabelle 34).

Tabelle 34 Korrelationen ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach Midazolamapplikation

Pearson- Korrelations- koeffizient	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Parameter	$r_{MZ\ oral}$ (95% -KI)	$r_{DZ\ oral}$ (95% -KI)	$r_{MZ\ intravenös}$ (95% -KI)
C_{max}	0,73 (0,50-0,87)	0,68 (-0,15-0,96)	0,37 (-0,01-0,65)	0,67 (-0,06-0,93)
t_{max}	0,28 (-0,09-0,59)	0,74 (-0,03-0,96)	0,18 (-0,20-0,51)	0,99 (0,92-1,0)
AUC_{inf}	0,66 (0,39-0,83)	0,66 (-0,18-0,94)	0,66 (0,38-0,82)	0,32 (-0,50-0,83)
Cl	0,71 (0,47-0,86)	0,74 (-0,03-0,96)	0,67 (0,40-0,83)	0,42 (-0,41-0,87)
MRT	0,35 (-0,02-0,63)	0,28 (-0,60-0,85)	0,55 (0,23-0,76)	-0,06 (-0,73-0,67)
V_z	0,44 (0,09-0,70)	0,33 (-0,57-0,87)	0,48 (0,14-0,72)	0,15 (-0,62-0,77)
t_{½ Lambda z}	0,31 (-0,06-0,61)	0,18 (-0,66-0,82)	0,40 (0,04-0,67)	-0,17 (-0,78-0,61)

Intravenöse Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen

Angabe des 95%-Konfidenzintervalls in Klammern (95%-KI)

Mithilfe des Pearson-Korrelationskoeffizienten ließ sich für die unterschiedlichen Parameter die Berechnung der Erblichkeit nach Falconer sowie nach Vesell durchführen. Für den Parameter AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation konnte keine Erblichkeit nach Falconer und nach Vesell berechnet werden. Nach intravenöser Dosierung zeigte sich für die geschätzte Erblichkeit des Parameters AUC_{inf} nach Falconer ein Wert von 0,68 und für die geschätzte Erblichkeit nach Vesell ein Wert von 0,5; für den Parameter Cl zeigte sich nach Falconer eine geschätzte Erblichkeit von 0,5 und nach Vesell eine Erblichkeit von 0,43 (siehe Tabelle 35).

Tabelle 35 Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell nach Midazolamapplikation

Erblichkeits- berechnungen	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Falconer	Vesell	Falconer	Vesell
Parameter	$H^2 (F)_{\text{oral}} =$ $2^*(rMZ-rDZ)$	$H^2 (V)_{\text{oral}} =$ $(rMZ-rDZ) / (1-rDz)$	$H^2 (F)_{\text{intravenös}} =$ $2^*(rMZ-rDZ)$	$H^2 (V)_{\text{intravenös}} =$ $(rMZ-rDZ) / (1-rDz)$
C_{max}	0,10	0,16	< 0	< 0
t_{max}	< 0	< 0	< 0	< 0
AUC_{inf}	0	0	0,68	0,5
CI	< 0	< 0	0,5	0,43
MRT	0,14	0,097	1,22	0,58
V_z	0,22	0,16	0,66	0,39
t_{1/2 Lambda z}	0,26	0,16	1,14	0,49

3.8.3.2 Erblichkeitsberechnung mithilfe der Strukturgleichungsmodellanalyse

Unter Einbezug individueller und gemeinsam erlebter Umwelteinflüsse sowie genetischer Faktoren konnte mithilfe der Strukturgleichungsmodellanalyse die Erblichkeit berechnet werden. Hierfür wurde der primäre Parameter AUC_{inf} nach oraler Applikation betrachtet. Das Modell, welches am besten geeignet ist, sollte dabei den kleinsten AIC-Wert (*akaike information criterion*) aufweisen und nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum gesättigten Modell sein; letzteres galt hier für alle Modelle. Nach oraler Midazolamapplikation stellte sich das Modell CE mit den Variablen C (gemeinsam erlebte Umweltfaktoren) und E (individuelle Umweltfaktoren) als das nach den vordefinierten Kriterien am besten geeignete dar (siehe Tabelle 36).

Danach lassen sich 64,7 Prozent der Variation der AUC_{inf} nach oraler Midazolamgabe durch die gemeinsam erlebten Umwelteinflüsse und 35,3 Prozent mittels individueller Umwelteinflüsse erklären. Genetische Effekte spielten demnach keine Rolle. Allerdings unterschied sich auch das AE Modell nicht erheblich, sodass doch eine additive Erblichkeit von etwa 65 Prozent nach dieser Studie nicht auszuschließen ist (siehe Tabelle 36).

Tabelle 36 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erbllichkeit der AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation

Modell	A	C	D	E
AE	0,647	-	-	0,353
CE	-	0,647	-	0,353
ACE	0,000	0,647	-	0,353
ADE	0,64	-	0,0	0,36

Modell	AIC	p-Wert
AE	991,2	0,10
CE	989,5	0,15
ACE	991,5	0,11
ADE	993,2	0,08

Es wurde das Modell gewählt, welches den höchsten p-Wert im Vergleich zum saturierten Modell und den kleinsten AIC aufwies; als beste Anpassung erwies sich das CE-Modell (fett markiert). Die Unterschiede zwischen dem CE- und dem ACE-Modell mögen in den nicht dargestellten Nachkommastellen liegen, da sich aber die Aussage inhaltlich ohnehin nicht unterscheidet, wurde dem nicht weiter nachgegangen.

3.9 Absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Midazolam

In diesem Kapitel werden entsprechend zu den Ausführungen des Kapitels 3.4 „Absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid“ die Ergebnisse und Analysen zur absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) von Midazolam vorgestellt. Auf eine wiederholende detaillierte Ausführung einiger bereits erläuterter Aspekte wird verzichtet.

Es ist zu beachten, dass die intravenöse Midazolamapplikation mit einer fünffach kleineren Dosis als bei der oralen Midazolamapplikation erfolgte. Die absolute orale Bioverfügbarkeit (F) beider Gruppen unterschied sich nicht wesentlich voneinander. Im Mann-Whitney-U-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied der beiden Gruppen.

Die Ergebnisse der nicht-parametrischen Analyse von F für Midazolam sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37 Analyse von F für Midazolam

	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)
Monozygote Zwillinge					
Orale AUC _{inf} [mg*min/l]	0,62	0,48	0,82	0,3-1,3	4,3
Intravenöse AUC _{inf} [mg*min/l] ¹	0,5	0,4	0,6	0,3-0,9	3
Intravenöse AUC _{inf} *5 [mg*min/l]	2,6	2,1	3,0	1,5-4,4	2,9
F [Prozent]	23,9	19,3	28,8	11,7-47,5	4,1
Dizygote Zwillinge					
Orale AUC _{inf} [mg*min/l]	0,49	0,37	0,6	0,3-1,0	3,3
Intravenöse AUC _{inf} [mg*min/l] ¹	0,4	0,4	0,5	0,3-0,7	2,3
Intravenöse AUC _{inf} *5 [mg*min/l]	2,2	2,0	2,5	1,5-3,7	2,5
F [Prozent]	24,1	19,4	27,8	14,5-38,6	2,7

F in Prozent (fett markiert)

¹: intravenöse AUC nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen

Im Vergleich von F für Midazolam zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen konnten ähnliche Werte gezeigt werden. Es fiel jedoch ein erhöhtes Maß der Variation von F bei den monozygoten Zwillingen (4,1) gegenüber der dizygoten Zwillingen (2,7) auf.

Im Folgenden wird die Darstellung von F nach Midazolamapplikation unterteilt nach monozygot und dizygot zur Verdeutlichung der Häufigkeitsverteilung (Abbildung 17) demonstriert.

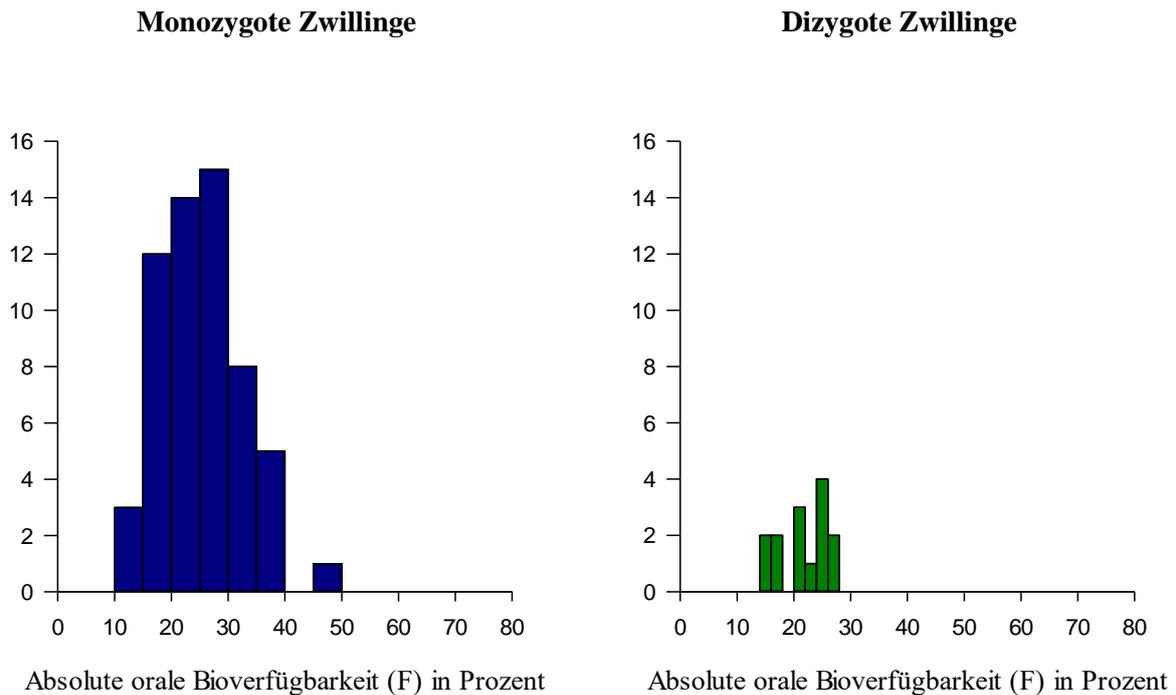


Abbildung 17 Häufigkeitsverteilungen von F nach Midazolamapplikation

Insgesamt lässt sich in dem Histogramm in Abbildung 17 zeigen, dass F von Midazolam unter 50 Prozent liegt und damit niedrig ist. Eine Häufung der monozygoten sowie dizygoten Zwillinge lässt sich augenscheinlich zwischen 20 und 30 Prozent finden, was sich auch mittels Tabelle 37 reproduzieren lässt.

Zur Detektion möglicher Einflüsse durch bekannte erbliche Varianten im CYP3A4-Polymorphismus auf die Erbllichkeit von F für Midazolam erfolgte die Zuordnung der Häufigkeiten von F zu den einzelnen Genvarianten wie in Tabelle 38 dargestellt. Es konnten ähnliche Werte für F unter den bekannten Genvarianten ohne relevante Auffälligkeiten gefunden werden.

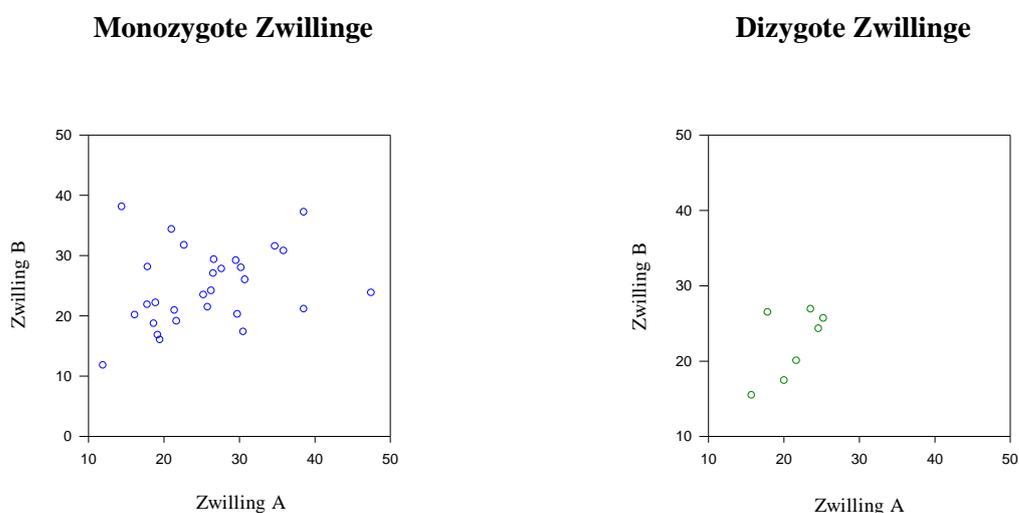
Tabelle 38 F von Midazolam, unterteilt nach Genvarianten

Genvariante	F [in Prozent]*	Anzahl (gesamt)	Phänotyp Frequenz (gesamt)
CYP3A4	*1*1	67	93,0 %
	*1*1b	3	4,2 %
	*1*22	2	2,8 %

*Angabe des arithmetischen Mittelwerts von F

3.9.1 Erblichkeitsberechnung von F nach Falconer und Vesell

Die Korrelationsgraphen von F für Midazolam unterschieden zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen stellen sich wie in Abbildung 18 aufgeführt dar. Es imponiert eine augenscheinlich geringe Korrelation der monozygoten und dizygoten Zwillinge untereinander.

**Abbildung 18** Korrelationsgraphen von F für Midazolam

Die in Tabelle 39 dargestellten Pearson-Korrelationskoeffizienten zeigten ebenfalls eine geringe Korrelation. Aus den daraus resultierenden Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell konnte keine Erbllichkeit in der Variabilität von F gezeigt werden. Zu beachten ist, dass vor allem die Werte der dizygoten Zwillingspaare aufgrund der niedrigen Fallzahl und dem daraus resultierenden sehr breiten 95-Prozent-Konfidenzintervall einer großen Streuung unterliegen.

Tabelle 39 Korrelationen von F für Midazolam

Parameter	Pearson-Korrelationskoeffizient		Erblichkeitsberechnungen nach	
	r_{MZ} (95%-KI)	r_{DZ} (95%-KI)	Falconer $H^2(F) = 2*(r_{MZ}-r_{DZ})$	Vesell $H^2(V) = (r_{MZ}-r_{DZ}) / (1-r_{DZ})$
F	0,28 (-0,09-0,59)	0,60 (-0,28-0,93)	< 0	< 0

Angabe des 95%-Konfidenzintervalls in Klammern (95%-KI)

3.9.2 Erblichkeitsberechnung von F mittels Strukturgleichungsmodellanalyse

Bei der Erblichkeitsberechnung mittels Strukturgleichungsmodellanalyse konnte das CE-Modell mit dem geringsten AIC-Wert (485,0) sowie mit dem höchsten p-Wert (0,26) als das am besten geeignete erfasst werden (siehe Tabelle 40). Die Variabilitäten von F resultierten demnach zu 25 Prozent aus gemeinsam erlebten Umweltfaktoren (C) und zu 75 Prozent aus individuell spezifischen Umweltfaktoren (E). Die genetischen Faktoren spielten eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 40 Strukturgleichungsmodellanalyse der Erblichkeit von F für Midazolam

Modell	A	C	D	E
AE	0,22	-	-	0,78
CE	-	0,25	-	0,75
ACE	0	0,25	-	0,75
ADE	0,22	-	0	0,78

Modell	AIC	p-Wert
AE	485,6	0,23
CE	485,0	0,26
ACE	487,0	0,21
ADE	487,6	0,18

Es wurde das Modell gewählt, welches den höchsten p-Wert im Vergleich zum saturierten Modell und den kleinsten AIC aufwies; als beste Anpassung erwies sich hier das CE-Modell (fett markiert)

3.10 Berücksichtigung der bekannten Genvarianten von CYP3A4

Für die Variabilität des Enzyms CYP3A4 erfolgte bei den Probanden die Analyse der Varianten, bei denen in der Literatur ein Einfluss auf die Metabolisierungsrate von Midazolam bekannt ist. Hierbei wurden die Häufigkeiten der Genvarianten *CYP3A4*1b* sowie *CYP3A4*22* untersucht. Mittels multipler Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit des primären Parameters AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation von der Genaktivität des Enzyms CYP3A4 sowie von möglichen weiteren Einflussfaktoren wie Geschlecht und Gewicht ermittelt. R-Quadrat beschreibt dabei den Anteil, wie viel der Variation der abhängigen Variablen durch die Einflussvariablen erklärt werden kann (in Tabelle 41 fett markiert).

Aus Tabelle 41 ist ersichtlich, dass sich demnach die AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation zu 12,5 Prozent signifikant durch die Genaktivität von *CYP3A4*22* erklären lässt. Alle weiteren Einflussfaktoren konnten keine signifikanten Ergebnisse zeigen.

Tabelle 41 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf die AUC_{inf} nach oraler Midazolamgabe

Modell	R	R-Quadrat
Abhängige Variable: AUC_{inf}	0,528	0,279

Unabhängige Einflussparameter	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Anteil von R-Quadrat
Anzahl von <i>CYP3A4*1b</i> - Allelen	-162,2	130,0	0,217	Nicht signifikant
Anzahl von <i>CYP3A4*22</i> - Allelen	535,5	157,5	0,001	0,125
Geschlecht	-154,1	62,42	0,016	Nicht signifikant
Gewicht (kg)	-7,111	2,692	0,010	Nicht signifikant

Zur Analyse der Abhängigkeit von F für Midazolam von den genannten Einflussfaktoren erfolgte ebenfalls eine multiple Regressionsanalyse wie in Tabelle 42 angegeben.

Tabelle 42 Multiple Regressionsanalyse möglicher Einflussfaktoren auf F von Midazolam

Modell	R	R-Quadrat
Abhängige Variable: F	0,329	0,108

Unabhängige Einflussparameter	Regressionskoeffizient	Standardfehler	p-Wert	Anteil von R-Quadrat
Anzahl von <i>CYP3A4*1b</i> - Allelen	-3,924	4.030	0,334	Nicht signifikant
Anzahl von <i>CYP3A4*22</i> - Allelen	4,953	4,882	0,314	Nicht signifikant
Geschlecht	-4,236	1,935	0,032	Nicht signifikant
Gewicht (kg)	-0,113	0,0835	0,182	Nicht signifikant

Es konnte kein signifikanter Einfluss auf F nachgewiesen werden. Insbesondere ergab sich keine Signifikanz für den Einfluss der bekannten *CYP3A4*-Genvarianten.

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Midazolam

Unter Beachtung der pharmakokinetischen Parameter für Midazolam lässt sich in dieser Arbeit festhalten, dass nur wenige erbliche Effekte die Variabilität des *CYP3A4*-Enzyms beeinflussen. Anhand des primären Parameter AUC_{inf} kann folgendes zusammengefasst werden:

Nach oraler Dosierung konnten die Berechnungen nach Falconer und Vesell einen Wert < 0 zeigen, was auf eine fehlende Erblichkeit hindeutet. Nach intravenöser Dosierung waren die Erblichkeitsberechnungen nach Falconer mit 0,68 und nach Vesell mit 0,5 deutlich höher. Aus der Strukturmodellanalyse konnte kein Einfluss erblicher Effekte auf die Variation der AUC_{inf} nach oraler Midazolamgabe detektiert werden. Es ließen sich 64,7 Prozent durch gemeinsam erlebte Umwelteinflüsse und 35,3 Prozent durch individuelle Umwelteinflüsse beschreiben. Mittels multipler Regressionsanalyse konnte jedoch ein signifikanter Einfluss auf die AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation von 12,5 Prozent durch die Genaktivität von *CYP3A4*22* nachgewiesen werden. Die Abbildung 19 gibt einen zusammenfassenden Überblick.

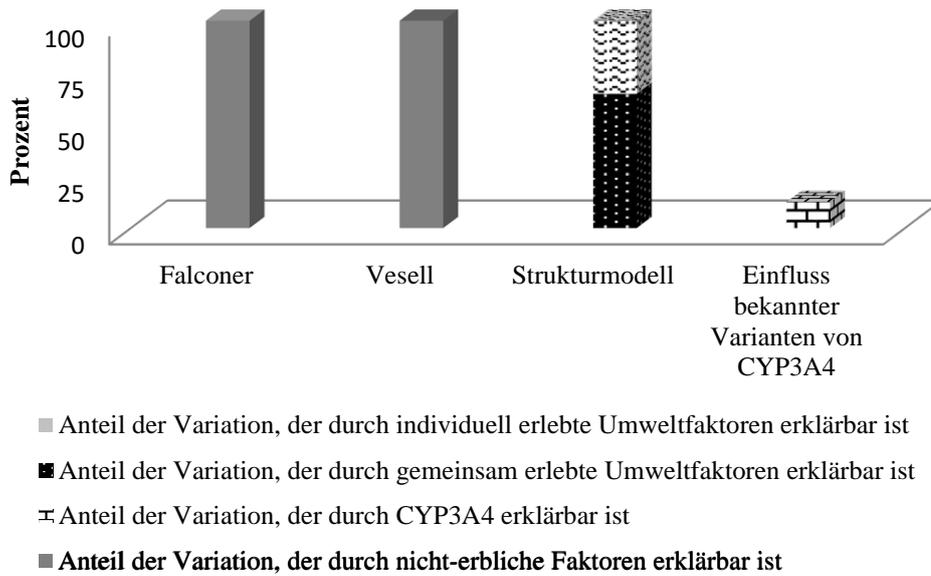


Abbildung 19 Zusammenfassende Darstellung der Erbllichkeit der Aktivität von CYP3A4

Verwendet wurden die Ergebnisse der Erbllichkeitsberechnungen der Variation der AUC_{inf} sowie die Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse des Einflusses der Genaktivität von $CYP3A4^{*22}$ auf die AUC_{inf} nach oraler Midazolamdosierung.

Für die Variabilität von F für Midazolam ergaben sich keine sicheren Hinweise auf erbliche Effekte. Die Abschätzung der Erbllichkeit nach Falconer und Vesell ergab einen Wert < 0 , was auf eine fehlende Erbllichkeit hindeutet.

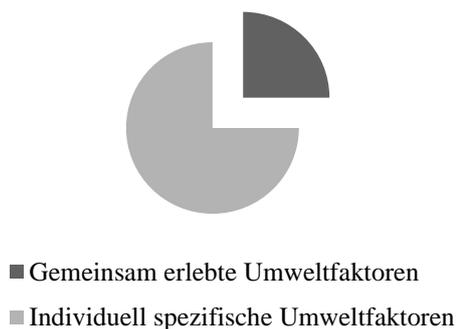


Abbildung 20 Einflüsse auf F von Midazolam

Verwendet wurden die Ergebnisse der Strukturgleichungsmodellanalyse

Die Strukturmodellanalyse beschrieb den Einfluss zu 25 Prozent durch gemeinsam und zu 75 Prozent durch individuell erlebte Umweltfaktoren, was in Abbildung 20 graphisch dargestellt ist. Einflüsse von

bereits bekannten Genvarianten des Enzyms CYP3A4 konnten mittels multipler Regressionsanalyse für die orale Bioverfügbarkeit keine signifikanten Ergebnisse zeigen.

3.12 Variabilität der Pharmakokinetik von Hydroxymidazolam

3.12.1 Pharmakokinetik von Hydroxymidazolam nach oraler Applikation

Die Tabelle 43 zeigt die nicht-parametrische Analyse der pharmakokinetischen Parameter des Metaboliten Hydroxymidazolam. Für den primären Parameter AUC_{inf} von Hydroxymidazolam nach oraler Applikation ergab sich ein Median von 0,29 mg*min/l für die monozygoten Zwillinge sowie ein Median von 0,19 mg*min/l für die dizygoten Zwillinge. Die Streuung der Variation bei den monozygoten Zwillingen war vergleichsweise höher als bei den entsprechenden Parametern bei Midazolam. Die Streuung der Variation der dizygoten Zwillinge war dagegen vergleichsweise gering.

Tabelle 43 Analyse der pharmakokinetischen Parameter von Hydroxymidazolam nach oraler Applikation

Monozygote Zwillinge						
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)	
C_{max} [μ g/l]	2,3	1,7	3,4	0,6-7,1	11,8	
t_{max} [min]	31	30	59	29-90	3,1	
AUC_{inf} [mg*min/l]	0,29	0,20	0,35	0,09-0,75	8,3	
$t_{\frac{1}{2} \text{ Lambda } z}$ [min]	102	91	125	66-248	3,8	
Dizygoten Zwillinge						
Parameter [Einheit]	Median	25 %	75 %	Bereich	Variation (Max/Min)	
C_{max} [μ g/l]	1,6	1,0	2,8	0,7-3,5	5	
t_{max} [min]	31,5	30	61	28-63	2,3	
AUC_{inf} [mg*min/l]	0,19	0,13	0,30	0,12-0,40	3,3	
$t_{\frac{1}{2} \text{ Lambda } z}$ [min]	115	94	157	77-291	3,8	

Mittels Mann-Whitney-U-Test ergaben sich für die Parameter C_{max} sowie AUC_{inf} wie bereits bei Midazolam nach oraler Applikation statistisch signifikante Unterschiede zwischen den monozygoten

und dizygoten Zwillingen. Die weiteren Parameter wiesen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

3.12.2 Erbllichkeit für die Variabilität in der Pharmakokinetik von Hydroxymidazolam

Für die Pearson-Korrelations-Koeffizienten von Hydroxymidazolam der mono- und dizygoten Zwillinge nach oraler sowie nach intravenöser Dosierung konnten für den Parameter AUC_{inf} jeweils höhere Korrelationen bei den monozygoten Zwillingen nachgewiesen werden (siehe Tabelle 44).

Tabelle 44 Korrelationen des Metaboliten Hydroxymidazolam nach Midazolamapplikation

Pearson-Korrelationskoeffizient	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Parameter	$r_{MZ\ oral}$ (95%-KI)	$r_{DZ\ oral}$ (95%-KI)	$r_{MZ\ intravenös}$ (95%-KI)
C_{max}	0,34 (-0,03-0,63)	0,47 (-0,43-0,9)	0,57 (0,26-0,78)	0,77 (0,14-0,96)
t_{max}	0,11 (-0,26-0,46)	0,40 (-0,51-0,89)	0,47 (0,13-0,71)	0,79 (0,19-0,96)
AUC_{inf}	0,47 (0,12-0,71)	0,26 (-0,61-0,85)	0,73 (0,50-0,87)	0,64 (-0,11-0,93)
$t_{1/2\ Lambda\ z}$	0,44 (0,09-0,70)	0,85 (0,26-0,98)	0,71 (0,47-0,86)	0,79 (0,19-0,96)
Erblichkeitsberechnungen	...nach oraler Dosierung		...nach intravenöser Dosierung	
	Parameter	Falconer	Vesell	Falconer
	$H^2 (F)_{oral} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	$H^2 (V)_{oral} = (r_{MZ} - r_{DZ}) / (1 - r_{Dz})$	$H^2 (F)_{intravenös} = 2 * (r_{MZ} - r_{DZ})$	$H^2 (V)_{intravenös} = (r_{MZ} - r_{DZ}) / (1 - r_{Dz})$
C_{max}	< 0	< 0	< 0	< 0
t_{max}	< 0	< 0	< 0	< 0
AUC_{inf}	0,42	0,28	0,18	0,25
$t_{1/2\ Lambda\ z}$	< 0	< 0	< 0	< 0

Intravenöse Dosierung nur der Studienteilnehmer, die auch am Studientag mit oraler Dosierung teilnahmen; Angabe des 95%-Konfidenzintervalls in Klammern (95%-KI)

Analog zu den Ergebnissen von Torasemid und Hydroxytorasemid wurden nur die Studienteilnehmer nach intravenöser Dosierung in die Auswertung einbezogen, die auch an der oralen Dosierung teilnahmen. Die Erblichkeit nach Falconer und Vesell der AUC_{inf} des Metaboliten Hydroxymidazolam war nach oraler Applikation ($H^2^{(F)} = 0,42$ und $H^2^{(V)} = 0,28$) vergleichsweise höher als nach intravenöser Applikation ($H^2^{(F)} = 0,18$ und $H^2^{(V)} = 0,25$). In Bezug auf die Ausgangssubstanz Midazolam war nach oraler Applikation eine geringe Erblichkeit für die AUC_{inf} des Metaboliten nachweisbar. Für die weiteren Parameter ließ sich nach Falconer und Vesell keine Erblichkeit nachweisen (siehe Tabelle 44).

In der Strukturgleichungsmodellanalyse konnte für den Parameter AUC_{inf} von Hydroxymidazolam nach oraler Applikation am ehesten das CE-Modell (kleinster AIC) mit $C = 0,48$ und $E = 0,52$ als das am besten geeignete Modell ausgewählt werden. Jedoch unterschied sich das Modell nicht signifikant ($p < 0,01$) zum gesättigten Modell, sodass die Aussagekraft hier eingeschränkt ist.

4 Diskussion

Anhand einer Studie mit mono- und dizygoten Zwillingspaaren sollte in dieser Arbeit untersucht werden, wie groß die Unterschiede bezüglich der Erbllichkeit in der Variation der Aktivitäten des Arzneimitteltransporters OATP1B1 sowie der Enzyme CYP2C9 und CYP3A4 sind. Als Prüfsubstanzen für die Aktivitätsbestimmungen fungierten hierbei Torasemid (Substrat des Transportproteins OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9) sowie Midazolam (Substrat des Enzyms CYP3A4) jeweils in oraler und intravenöser Applikationsform. Dabei ging es in dieser Arbeit besonders um die Variabilität nach oraler Dosierung, die nicht nur von der Leber, sondern auch von Darmfunktionen einschließlich des Membrantransportes und der Metabolisierung in der Darmmukosa abhängt.

Im klinischen Alltag werden die meisten Arzneimittel in oraler Applikationsform verordnet. Darauf aufbauend hatte diese Arbeit das Ziel, ein besseres Verständnis für die Variabilität der Pharmakokinetik nach oraler Applikation und damit auch ein besseres Verständnis der Wirkungen und Nebenwirkungen nach oraler Applikation zu erreichen. Dafür bot sich eine vergleichende Untersuchung mit oral und intravenös verabreichten Prüfsubstanzen an, da hieraus auch die absolute orale Bioverfügbarkeit der Medikamente berechnet werden kann.

Es sind eine Reihe von Polymorphismen in den Genen des Transportproteins OATP1B1 sowie der Enzyme CYP2C9 und CYP3A4 bekannt, die für die genetische Variabilität und damit verbunden auch für die hohe Variabilität in der Wirkung von beispielsweise Arzneimitteln verantwortlich sein können (Goldstein 2001). Dabei ist bislang jedoch unbekannt, wie hoch der Anteil der bekannten genetischen Polymorphismen an der Gesamtvariation der Enzym- bzw. Transportaktivität ist. Ungeklärt bleibt zudem, wie groß Unterschiede des genetischen Anteils an der Variation nach oraler bzw. intravenöser Applikation sind. All dies ist relevant für die Frage, ob es sich lohnt, weitere Polymorphismen mit relevantem Einfluss auf die Pharmakokinetik von Arzneimitteln zu suchen, um dadurch eine zukünftig noch stärker *individualisierte* Arzneimitteltherapie mit weniger Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen anbieten zu können.

4.1 Die OATP1B1- und CYP2C9-Aktivität

4.1.1 Pharmakokinetik von Torasemid

Torasemid ist ein Substrat des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 (Vormfelde et al. 2008) und könnte damit eine bedeutende Prüfsubstanz zur Messung der *In-vivo*-Aktivität dieser beiden Proteine sein. Um als *In-vivo*-Indikatorsubstanz fungieren zu können, werden einige Anforderungen an das Medikament gestellt. Beispielsweise darf es keine schwerwiegenden Nebenwirkungen beim Probanden hervorrufen; es sollte demzufolge in möglichst niedriger Konzentration verabreicht werden können (Tucker et al. 1998). Alternativen zum *In-vivo*-Nachweis der Aktivität des Enzyms CYP2C9 stellen neben Torasemid Arzneimittel wie Tolbutamid und Warfarin dar (Miners und Birkett 1998; US Food and Drug Administration 2018). Für den Transporter OATP1B1 werden unter anderem Atorvastatin, Bosentan, Ezetimib, Pravastatin oder Valsartan als *In-vivo*-Testsubstanzen benutzt (US Food and Drug Administration 2018). Eine Besonderheit von Torasemid als Prüfsubstanz ist, dass es sowohl dem CYP2C9-Metabolismus unterliegt als auch Substrat für den OATP1B1-Transporter ist. Nachteil dabei ist, dass sich damit nur teilweise die Aktivitäten von CYP2C9 und OATP1B1 differenzieren lassen. Andererseits gibt es jedoch wohl kaum eine Substanz, die CYP2C9-Substrat ist und im Membrantransport nicht von Transportproteinen abhängt. Basierend auf der Tatsache, dass fast alle Substrate von CYP2C9 im menschlichen Körper negativ geladen sind (organische Anionen), wird vermutet, dass die OATP1B1-Transporter noch weitere CYP2C9-Substrate transportieren (Vormfelde et al. 2008).

Im Folgenden (Tabelle 45) werden die in dieser Studie ermittelten Daten zur Pharmakokinetik von Torasemid nach oraler Applikation mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Daten verglichen. Für den Parameter t_{\max} , der die Zeit zwischen Arzneimittelapplikation und Erreichen der maximalen Plasmakonzentration C_{\max} wiedergibt, lassen sich in der Literatur vergleichbare Werte finden. Zum genaueren Vergleich wurden C_{\max} sowie AUC auf eine Dosis von 1 mg normiert (*kursiv*). Damit lagen die hier erhobenen Werte ebenfalls im gleichen Bereich wie die in der Literatur publizierten. In der vorliegenden Studie zeigte sich im Vergleich zu anderen Untersuchungen eine etwas höhere Clearance sowie eine niedrigere Halbwertszeit. Dies könnte anhand der extrem niedrigen Dosis der hier vorliegenden Studienmedikation diskutiert werden. Bei hoher Dosis ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass Enzyme und Transporter bereits gesättigt sind. Allerdings ließ sich kein Hinweis in der Literatur finden, der dafür sprach, dass im Dosierungsbereich von Torasemid bis 20 mg eine Sättigung im Stoffwechsel- oder Membrantransport auftritt. Somit könnte als Erklärung auch gelten, dass bei den hier verwendeten sehr niedrigen Dosen relativ gesehen ein größerer Anteil unterhalb der Nachweisgrenze bei den Analysen vorlag als bei den höheren Dosen. Insgesamt gestalteten sich die

Unterschiede aber nur gering, sodass die an den Zwillingen erhobenen Daten mit den aus der Allgemeinbevölkerung erhobenen Daten, die in der Regel nicht als Zwillinge geboren und aufgewachsen sind, vergleichbar sind (siehe Tabelle 45).

Tabelle 45 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten zur Pharmakokinetik nach oraler Torasemidapplikation

Referenz	Eigene Studie	Eigene Studie	(Neugebauer et al. 1988)	(Schwartz et al. 1993)	(Vormfelde et al. 2004)	(Werner et al. 2010)**	
Statistischer Parameter	Median (Bereich)	Mittel ± SD	Median (Bereich)	Mittel ± SD	Median (Bereich)	Mittel ± SD	
Dosis	0,25 mg	0,25 mg	20 mg	10 mg	10 mg	10 mg	
						♀	♂
C_{max} [µg/l]	33,0 (20,8-67,3)	35,0 ± 9,4	2700 (1200-4100)	1270 ± 130	1100* (500-1900)	k. A.	k. A.
<i>Normiert auf 1 mg:</i>							
	131,9	140,0	135,0	127,0	110,0		
t_{max} [h]	0,99 (0,47-1,5)	0,81 ± 0,26	1,0 (0,3-2,0)	0,86 ± 0,18	k. A.	1 (0,5-4)	1 (0,5-4)
AUC_{inf} [mg*min/l]	4,2 (2,6-9,1)	4,5 ± 1,4	k. A.	222 ± 102	180* (96-354)	k. A.	k. A.
<i>Normiert auf 1 mg:</i>							
	16,8	18,0		22,2	18,0		
Cl [ml/min]	59,1 (27,3-94,6)	60,6 ± 15,6	k. A.	k. A.	56,7* (28,3-113,3)	35 ± 13,3	50 ± 18,3
t_½ [h]	1,9 (1,3-2,6)	1,9 ± 0,27	3,2 (2,0-4,1)	3,5 ± 1,2	2,6* (2,1-7,1)	4,3 ± 1,2	3,6 ± 1,0

SD = Standardabweichung; k. A.= keine Angabe; * Werte für Genotyp CYP2C9*1/*1; ** Studie mit geschlechter-getrennter Analyse

Im Vergleich der berechneten absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) der vorliegenden Studie mit der absoluten oralen Bioverfügbarkeit aus anderen Studien fällt ein eher niedrigerer Wert auf (siehe Tabelle 46), was die gleichen Gründe wie oben genannt haben könnte. Darüber hinaus könnte es sein, dass das hier verwendete orale Präparat eine etwas schlechtere Bioverfügbarkeit hat als die in den

anderen Studien verwendeten Präparate. Es ließen sich darüber hinaus nur wenige Untersuchungen finden, in denen zwischen oraler und intravenöser Torasemiddosierung direkt verglichen wurde. Die Unterschiede könnten auch dadurch erklärt werden, dass die orale Arzneimittelresorption durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Dies kann einerseits durch den bereits bekannten Einfluss von genetischen Polymorphismen diskutiert werden. Bei der oralen Absorption stellt die Mucosa des Dünndarms ein erstes Hindernis dar. Dort konnten bereits unterschiedliche Genvarianten von Enzymen und Transportern detektiert werden (Chan et al. 2004; Fricker et al. 1996). Andererseits spielen vor allem bei der oralen Applikationsform äußere Faktoren wie Ernährungsgewohnheiten, Gebrauch von Noxen wie Nikotin und Alkohol sowie mögliche Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten eine Rolle. Durch beispielsweise unterschiedliche Ein- und Ausschlusskriterien für die Probanden der Studien, damit verbundenen unterschiedlichen Ernährungsvorschriften vor und während der Studie und so verschiedenen äußeren Einflussfaktoren, lässt sich die Variabilität der Bioverfügbarkeit zum Teil erklären.

Tabelle 46 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten der oralen Bioverfügbarkeit von Torasemid

Referenz	Eigene Studie		(Schwartz et al. 1993)	(Brater 1992)	(Knauf und Mutschler 1998)	(Lesne et al. 1982; Lesne 1988)
Statistischer Parameter	Median (Bereich)	Mittel ± SD	Mittel ± SD	Median (Bereich)	k. A.	k. A.
Dosis				k. A.	k. A.	
Oral	0,25 mg	0,25 mg	10 mg			20 mg
Intravenös	2,5 mg	2,5 mg	10 mg			20 mg
Orale Bioverfügbarkeit [Prozent]	73,8 (51,1-100)	73,8 ±10,1	96,3 (84-100)	80	80	91

4.1.2 Erbllichkeit der Pharmakokinetik von Torasemid

Für die Variation der Pharmakokinetik von Torasemid nach oraler Applikation konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass genetische Effekte eine große Rolle spielen. Im Ergebnisteil 3.2 wurden bereits die Häufigkeiten der bekannten Genvarianten von OATP1B1 und CYP2C9 aufgelistet. Dabei wurden nur die Zwillingspaare in die Auswertung einbezogen, die die orale und intravenöse Dosierung erhalten haben, was den Probanden der Studienperiode II entspricht.

Im Hinblick auf den Val174Ala-Polymorphismus des Transporters OATP1B1 ließ sich bei 71,6 Prozent der Probanden der Wildtyp (homozygoter Träger von Valin) nachweisen; 23 Prozent wiesen sich als heterozygoter Träger von Valin und Alanin aus und 5,4 Prozent waren homozygoter Träger von Alanin. Im Asn130Asp-Polymorphismus des Transporters OATP1B1 wiesen 28,4 Prozent der Probanden den Wildtyp (homozygot für Asparagin) vor; 48,6 Prozent waren heterozygoter Träger von Asparagin und Asparaginsäure; 23 Prozent zeigten sich homozygot für Asparaginsäure.

Im CYP2C9-Polymorphismus waren 86,5 Prozent der Probanden Träger der Genotypen mit normaler Enzymaktivität (*1/*1, *1/*2, *2/*2); 13,5 Prozent der Probanden konnten als Träger einer Anlage für erniedrigte Enzymaktivität detektiert werden (*1/*3, *2/*3).

4.1.2.1 ***Erblichkeit der OATP1B1- und CYP2C9-Aktivität***

4.1.2.1.1 ***OATP1B1***

Eines von vielen Substraten des Transportproteins OATP1B1 stellt Torasemid dar (Vormfelde et al. 2008). Das Transportprotein OATP1B1 wird auf dem *SLCO1B1*-Gen kodiert und befindet sich an der basolateralen sinusoidalen Membran der Hepatozyten. Es existieren zwei häufig vorkommende Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP), die die Aktivität von OATP1B1 beeinflussen (Tirona et al. 2001; Niemi 2007). Bei dem Val174Ala-Polymorphismus führt der Austausch der Aminosäure Valin durch Alanin (c.521 T > C / p.Val174Ala) zu einer verminderten Aktivität des OATP1B1-Transporters (Kameyama et al. 2005). Häufig gekoppelt mit dem Val174Ala-Polymorphismus liegt der Asn130Asp-Polymorphismus vor, in dem ein Austausch der Aminosäure Asparagin durch Asparaginsäure (c.388 A > G / p.Asn130Asp) besteht. Letztere Aminosäuresubstitution könnte für sich allein betrachtet sogar eine leicht erhöhte Aktivität haben (Kameyama et al. 2005). Daraus ergeben sich vier funktionell unterschiedliche Kombinationen (Haplotypen): OATP1B1*1a [Asn130/Val174] (Referenztyp), OATP1B1*1b [Asp130/Val174], OATP1B1*5 [Asn130/Ala174] und OATP1B1*15 [Asp130/Ala174]. Für den *15-Haplotyp lässt sich eine verminderte Aktivität in der Literatur finden (Nozawa et al. 2005; Tachibana-Iimori et al. 2004). Uneinigkeit herrscht in der Literatur jedoch über die Aktivität des Haplotyp *1b [erhöht: (Kameyama et al. 2005), ohne Einfluss: (Tirona et al. 2001)].

Der Val174Ala-Polymorphismus hat eine gut dokumentierte klinische Bedeutung für die Verträglichkeit der meisten HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Statine). In mehreren Studien ließ sich eine erhöhte Konzentration der Statine im Blutplasma mit dem Vorliegen des Val174Ala-Polymorphismus assoziieren, was wiederum zur Statin-induzierten Myopathie führen kann (Link et al. 2008; Mwinyi et al. 2004; Ho et al. 2007). Dies hat beim Medikament Cerivastatin sogar soweit

geführt, dass es aufgrund einer Häufung von schweren Verlaufsformen mit Todesfolgen (Rhabdomyolysen) vom Markt genommen werden musste. In der Studie zeigte sich, dass die Transportaktivität bei Vorliegen eines homozygoten Trägers von Alanin im Val174Ala-Polymorphismus um 40 Prozent im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist (Marciante et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach oraler Torasemidapplikation ebenfalls ein signifikanter Einfluss durch die Anzahl des Val174-Allels nachgewiesen werden. In einer vorangehenden Studie mit Torasemid ließen sich hierzu vergleichbare Ergebnisse finden (Vormfelde et al. 2008). Matthaei et al. konnte mittels multipler Regressionsanalyse ebenfalls zeigen, dass nach intravenöser Torasemidapplikation ein signifikanter Einfluss von 39 Prozent bei Vorliegen eines homozygoten Trägers von Alanin im Val174Ala-Polymorphismus besteht (Matthaei et al. 2015). Im direkten Vergleich mit den ermittelten Daten dieser Arbeit fällt auf, dass nach multipler Regressionsanalyse der Einfluss durch die Anzahl der Val174-Allele mit 41,7 Prozent auf die AUC_{inf} nach oraler Torasemidapplikation nicht wesentlich abweicht. Dies bedeutet, dass homozygote Träger des Alanins im Val174Ala-Polymorphismus eine um 41,7 Prozent höhere AUC nach oraler Torasemidgabe vorweisen, da die Aktivität des OATP1B1-Transporters vermindert ist. Dementsprechend zeigt sich kein wesentlicher Unterschied nach oraler oder intravenöser Applikationsform bezüglich des Einflusses des Val174-Allels auf die Aktivität von OATP1B1.

4.1.2.1.2 CYP2C9

Das polymorphe Enzym CYP2C9 ist in den Stoffwechsel von etwa 20 Prozent aller Medikamente involviert (Kirchheiner und Brockmöller 2005). Es existieren neben dem Wildtyp-Allel (*CYP2C9*1*) noch zwei weitere Allele (*CYP2C9*2* und *CYP2C9*3*), für die in der europäischen Bevölkerung eine erniedrigte enzymatische Aktivität für eine Vielzahl von Medikamenten bekannt ist (Lee et al. 2002). Dabei sind die Allelfrequenzen von *CYP2C9*2* zu 11 Prozent und von *CYP2C9*3* zu 7 Prozent in der europäischen Bevölkerung vertreten (Kirchheiner und Brockmöller 2005). Es sind weitere Allelvarianten (*CYP2C9*4*, *CYP2C9*5*, *CYP2C9*6* und *CYP2C9*11*) bekannt, die jedoch bei Europäern sehr selten sind und in afrikanischen oder asiatischen Bevölkerungsstichproben gefunden wurden (Allabi et al. 2004).

Bezogen auf die in dieser Arbeit betrachtete Prüfsubstanz Torasemid konnte nur für das Allel *CYP2C9*3* eine signifikant erniedrigte Aktivität nachgewiesen werden. In einer Arbeit von Vormfelde aus dem Jahr 2004 konnte gezeigt werden, dass die Pharmakokinetik von Torasemid signifikante Unterschiede zwischen den CYP2C9-Genotypen vorweist. So sind die AUC_{inf} und C_{max} höher und die orale Clearance niedriger bei Probanden mit dem *3-Genotyp als bei Probanden mit dem *1- oder *2-

Genotyp (Vormfelde et al. 2004). Jedoch ließen sich in einer weiteren Studie mit Torasemid nur 20 Prozent der Variabilität durch bekannte genetische Variationen der totalen Clearance nach CYP2C9-Genotypisierung erklären (Vormfelde et al. 2007). In einer weiteren Studie mit Torasemid ließ sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss auf die AUC_{inf} durch das *CYP2C9*3*-Allel nachweisen; zudem ließ sich dort gleichzeitig ein signifikanter Einfluss des Val174Ala-Polymorphismus dokumentieren (Werner et al. 2008). Ein signifikanter Einfluss von 2 Prozent durch die *CYP2C9*3*-Genvariante auf die AUC_{inf} nach intravenöser Torasemidapplikation konnte in der Arbeit von Matthaei nachgewiesen werden (Matthaei et al. 2015). In dieser Arbeit zeigte sich mittels multipler Regressionsanalyse ein Einfluss auf die AUC_{inf} durch die Genaktivität von *CYP2C9*3* mit knapp 6 Prozent. Im direkten Vergleich beider Arbeiten wird deutlich, dass der Einfluss durch das *CYP2C9*3*-Allel nach oraler Torasemidapplikation diskret erhöht ist. Dies kann dadurch erklärt werden, dass das Enzym CYP2C9 in geringer Konzentration im Darm nachweisbar ist (de Waziers et al. 1990). Somit ist nach oraler Dosierung das Enzym CYP2C9 bereits in der Darmwand aktiv, was nach intravenöser Dosierung keine Rolle spielt. Die intestinale Expression von CYP2C9 unterliegt jedoch einer großen interindividuellen Variation. In einer Studie, die den Anteil aller Cytochrom-P450-Enzyme im Darm untersucht hat, war das Enzym CYP2C9 mit einem Anteil von bis zu 14 Prozent in der Darmwand am zweithäufigsten vertreten. Dabei konnte jedoch eine bis zu neunfache interindividuelle Variation in der Expressionshäufigkeit von CYP2C9 detektiert werden (Paine et al. 2006). In einer ähnlichen Untersuchung, in der Diclofenac^{4'}-Hydroxylase als Prüfsubstanz für CYP2C9 fungierte, zeigte sich sogar eine bis zu 18-fache Variabilität in der intestinalen Expression von CYP2C9 (Obach et al. 2001). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Genvarianten von CYP2C9 nach oraler Dosierung einen größeren Einfluss auf den Metabolismus von Torasemid zu haben scheinen als nach intravenöser Dosierung. Es muss dabei aber die hohe interindividuelle Schwankungsbreite in der Expression und damit Aktivität von CYP2C9 in den menschlichen Enterozyten berücksichtigt werden. Dabei sind weitere Faktoren, die diese Unterschiede bedingen, bisher noch nicht ausreichend erforscht und bieten Grundlage für weitere Studien.

Matthaei konnte durch Strukturgleichungsmodellanalyse zeigen, dass sich die Variabilität der AUC_{inf} nach intravenöser Torasemidapplikation zu 86 Prozent durch additive genetische Faktoren und zu 14 Prozent durch individuelle Umweltfaktoren beschreiben lässt (Matthaei et al. 2015). Mittels Strukturgleichungsmodellanalyse konnten in vorliegender Arbeit ebenfalls vergleichbare Daten ermittelt werden. Es zeigte sich hierbei kein wesentlicher Unterschied zwischen oraler und intravenöser Applikationsform.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich weniger als 50 Prozent der Variation der AUC_{inf} nach oraler Torasemidapplikation durch bereits bekannte Genvarianten in OATP1B1 und CYP2C9 erklären

lassen. Dabei scheint *CYP2C9*3* eine größere Rolle nach oraler Applikation zu spielen. Der insgesamt jedoch relativ geringe Einfluss von *CYP2C9*-Allelen in der multifaktoriellen Regressionsanalyse ist durch die relativ geringe Häufigkeit der funktionell relevanten Genotypen *CYP2C9*1/*3* und insbesondere *CYP2C9*3/*3* zu erklären. Abbildung 21 soll dies noch einmal veranschaulichen.

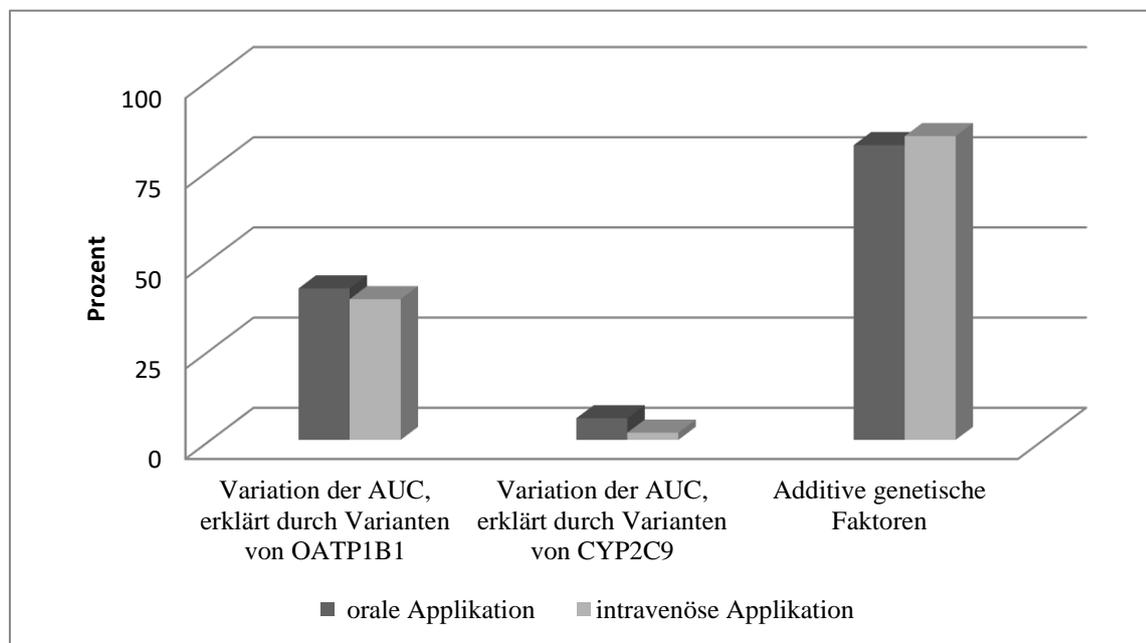


Abbildung 21 Erbllichkeit der OATP1B1- und CYP2C9-Aktivität im Vergleich oral und intravenös

Verwendet wurden die Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse des Einflusses der Genaktivität von *CYP2C9*3* und der Anzahl der Val174-Allele im OATP1B1-Gen auf die AUC_{inf} nach oraler und intravenöser Torasemiddosierung; die Ermittlung der additiven genetischen Faktoren erfolgte mittels Strukturgleichungsmodellanalyse. Die Daten nach intravenöser Applikation (Matthaei et al. 2015) sind hier vergleichend aufgeführt.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient der AUC_{inf} nach oraler Torasemiddosierung der monozygoten Zwillinge ($r_{MZ\ oral}=0,82$) erwies sich gegenüber dem der dizygoten Zwillinge ($r_{DZ\ oral}=0,61$) als höher, was für einen hohen Anteil erblicher Einflüsse spricht. In der Literatur ließen sich für das Enzym *CYP2C9* ähnliche Ergebnisse finden. In einer Übersichtsarbeit zu inter- und intraindividuellen Einflüssen auf die Pharmakokinetik häufig verwendeter oraler Antikoagulantien, die als *CYP2C9*-Substrat fungieren, konnte eine Vielzahl bekannter genetischer Varianten gefunden werden, jedoch erwies sich die Anzahl unbekannter genetischer Einflüsse weiterhin sehr hoch (Verhoef et al. 2014).

4.1.3 Erbllichkeit der absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid

Definitionsgemäß beträgt die Bioverfügbarkeit F nach intravenöser Applikation 100 Prozent. So war es möglich, in der vorliegenden Arbeit durch den Erhalt der AUC_{inf} nach oraler und intravenöser Torasemiddosierung die absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid zu berechnen. Im Weiteren konnte untersucht werden, inwiefern die bekannten genetischen Varianten einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Torasemid haben. Mittels Erbllichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell sowie nach Strukturmodellierung konnte für die Variabilität der absoluten oralen Bioverfügbarkeit keine Erbllichkeit nachgewiesen werden.

Die folgende Abbildung 22 stellt die arithmetischen Werte der absoluten oralen Bioverfügbarkeit unterteilt nach den unterschiedlich detektierten Genvarianten dar. Auffällig ist der hohe Anteil der Bioverfügbarkeit bei der Genvariante *CYP2C9*2/*3*. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass in der Studie nur ein Proband mit dieser Genvariante detektiert worden ist, sodass nicht sicher differenziert werden kann, ob dies tatsächlich durch den sehr langsamen Metabolismus oder durch andere Faktoren bedingt war (erklärbare Besonderheiten fanden sich bei dem Probanden nicht). Bei Betrachtung der weiteren Varianten sind keine großen Unterschiede ersichtlich.

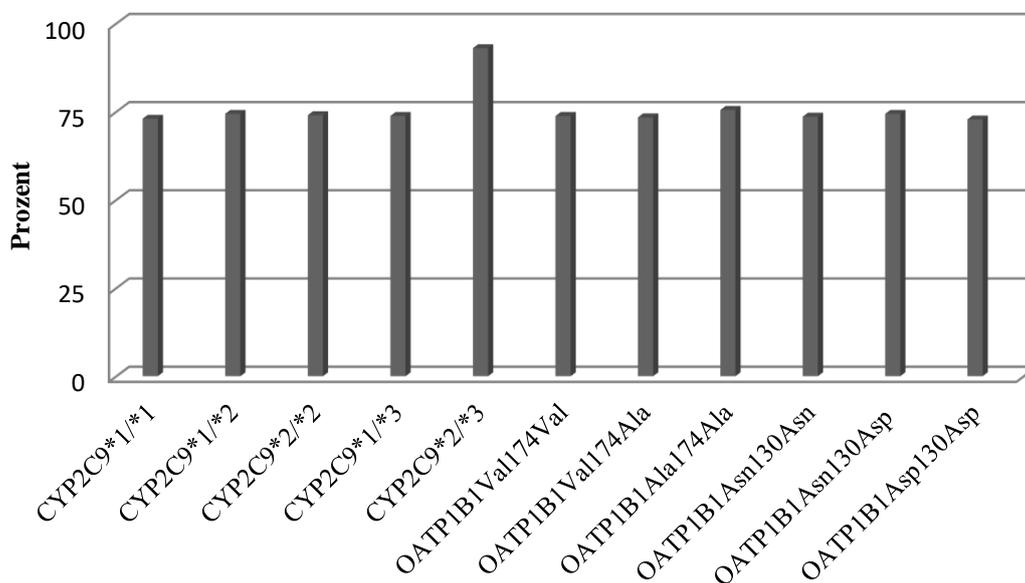


Abbildung 22 F von Torasemid, unterteilt nach bekannten Genvarianten

Mittels multipler Regressionsanalyse konnte kein signifikanter Einfluss der bekannten Genvarianten auf die orale Bioverfügbarkeit von Torasemid gezeigt werden.

Der fehlende Nachweis der Erbllichkeit könnte zum einen bedeuten, dass die Genvarianten und die davon kodierten Enzyme und Transportproteine keinen nennenswerten Einfluss beim Metabolismus und Transport bei der ersten Darm- und Leberpassage haben. Dieses passt wiederum dazu, dass die orale Bioverfügbarkeit von Torasemid insgesamt recht hoch ist.

Zum anderen könnte der fehlende Nachweis der Erbllichkeit ein Indiz dafür sein, dass die orale Bioverfügbarkeit von Torasemid vor allem durch äußere Umweltfaktoren beeinflusst wird. Widersprüchlich ist jedoch, dass sich bei Berechnung der Erbllichkeit der Variabilität nach oraler Torasemidapplikation ein hoher genetischer Einfluss in dieser Arbeit sowie in weiteren vorangegangenen Arbeiten nachweisen lässt.

Ein auslösender Faktor der diskrepanten Ergebnisse wird durch die kleine Studienpopulation der Studienperiode II, die nur die orale Dosierung beinhaltet, vermutet. Dadurch kam es zu einer breiten Streuung der Ergebnisse und Zufälligkeiten wurden begünstigt. Die hier dargestellte Studie ist als ergänzende Unterstudie erst nach Beginn der Hauptstudie begonnen worden und nicht alle Probanden konnten für diese Studie gewonnen werden. Zudem zeigten sich mittels Mann-Whitney-U-Testung der erhobenen pharmakokinetischen Parameter für Hydroxyltorasemid nach oraler Dosierung statistisch signifikante Unterschiede vor allem für den primären Parameter AUC_{inf} .

Bei Betrachtung der Strukturgleichungsmodellierung der absoluten oralen Bioverfügbarkeit für Torasemid wurde das CE-Modell favorisiert, was zu 36 Prozent für gemeinsam erlebte Umweltfaktoren (C) und zu 64 Prozent für individuell spezifische Umweltfaktoren (E) steht. Jedoch ist das AE-Modell, in dem genetische Effekte eine Rolle spielen, nur knapp bei fast identischen AIC und p-Wert dem CE-Modell unterlegen. In dem AE-Modell werden additive genetische Effekte (A) zu 38 Prozent und individuell spezifische Umweltfaktoren (E) zu 62 Prozent beschrieben, womit sich nach diesem Berechnungsverfahren ein Hinweis auf mögliche erbliche Faktoren finden lässt. Die erschwerte Differenzierung zwischen gemeinsam erlebten Umweltfaktoren (C) und additiven genetischen Effekten (A) hängt vor allem damit zusammen, dass die Gruppe der hier für die Differenzierung entscheidenden dizygoten Zwillinge vergleichsweise klein war. So konnte nicht definitiv zwischen gemeinsamen Umweltfaktoren und additiven erblichen Faktoren unterschieden werden.

4.2 Die CYP3A4-Aktivität

4.2.1 Pharmakokinetik von Midazolam

Midazolam ist eine vielfach genutzte Prüfsubstanz, die die Aktivität der Enzyme CYP3A4 sowie CYP3A5 widerspiegelt (Thummel et al. 1994; Kenworthy et al. 1999). Insbesondere bei Untersuchung neuer Medikamente scheint Midazolam recht empfindlich anzuzeigen, ob das zu prüfende Medikament eine Enzymhemmung oder eine Enzyminduktion verursacht. Midazolam kann als Testsubstanz so niedrig dosiert werden, dass es keine relevante Sedierung verursacht und dennoch im Plasma und Urin beispielsweise mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie nachweisbar ist (Carrillo et al. 1998). Zudem wird Midazolam primär nur über Enzyme der CYP3A-Familie verstoffwechselt, sodass bei oraler Gabe Rückschlüsse auf die intestinale wie hepatische CYP3A4-Aktivität möglich sind und bei intravenöser Gabe Rückschlüsse auf die hepatische CYP3A4-Aktivität gezogen werden können. Das aus Midazolam entstehende Stoffwechselprodukt Hydroxymidazolam wird in der Folge allerdings auch glukuronidiert (Thummel et al. 1994; Paine et al. 2000). Es existiert eine weitere Anzahl von Testsubstanzen für CYP3A4 und CYP3A5 (Kenworthy et al. 1999) wie beispielsweise Triazolam, Alfentanil und Cortisol (Liu et al. 2007). Zudem wurde unter anderem vielfach ein so genannter Erythromycin-Atemtest durchgeführt (Watkins et al. 1989). Daneben stehen Alprazolam und Vinchristin als selektive Vertreter von CYP3A5 (Liu et al. 2007). Als relativ neu entdeckter selektiver Vertreter von CYP3A4 existiert die Substanz Bufalin (Ge et al. 2013).

In Tabelle 47 werden die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Pharmakokinetik von Midazolam nach oraler Dosierung mit denen aus der Literatur verglichen. Die Parameter C_{\max} sowie AUC wurden zum besseren Vergleich jeweils auf eine Dosis von 1 mg normiert (*kursiv*).

Im Vergleich der Daten nach oraler Midazolamapplikation fallen eine in dieser Studie etwas geringere AUC_{inf} und eine etwas längere Halbwertszeit auf. Die Unterschiede sind dabei am ehesten durch unterschiedliche analytische Methoden, abweichende Berechnungsverfahren, unterschiedliche Studieneinschlusskriterien sowie z.T. sehr kleine Gruppengrößen erklärbar.

Tabelle 47 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten zur Pharmakokinetik nach oraler Midazolamapplikation

Referenz	Eigene Studie	Eigene Studie	(Thummel et al. 1996)	(Smith et al. 1981)	(Heizmann et al. 1983)	
Statistischer Parameter	Median (Bereich)	Mittel ± SD	Mittel ± SD	Mittel ± SD	Mittel ± SD	
Dosis	1 mg	1 mg	2 mg	10 mg	10 mg	20 mg
C_{max} [µg/l]	4,7 (1,5-10,5)	4,9 ± 2,0	k. A.	77,5 ± 27,8	k. A.	k. A.
<i>Normiert auf 1 mg</i>	4,7 (1,5-10,5)	4,9 ± 2,0		7,8 ± 2,8		
t_{max} [h]	0,5 (0,47-1,5)	0,62 ± 0,23	k. A.	0,74 ± 0,45	k. A.	k. A.
AUC_{inf} [mg*min/l]	0,59 (0,31-1,3)	0,64 ± 0,25	k. A.	8,8 ± 4,7	11,3 ± 3,6	26,2 ± 8,8
<i>Normiert auf 1 mg</i>		0,64 ± 0,25		0,88 ± 0,47	1,1 ± 0,36	1,3 ± 0,44
Cl [l/min]	1,7 (0,77-3,3)	1,8 ± 0,64	1,4 ± 0,81	k. A.	k. A.	k. A.
t_{½ Lambda z} [h]	2,4 (1,4-7,2)	2,6 ± 0,83	k. A.	1,4 ± 1,1	1,8 ± 0,24	1,9 ± 0,39

Die in der vorliegenden Studie ermittelte absolute orale Bioverfügbarkeit von Midazolam ist analog zu den in dieser Studie ermittelten Werten der absoluten oralen Bioverfügbarkeit von Torasemid ebenfalls niedriger als zu den in der Literatur publizierten Daten (siehe Tabelle 48).

Tabelle 48 Vergleich publizierter Daten mit eigenen Daten der oralen Bioverfügbarkeit von Midazolam

Referenz	Eigene Studie	(Pentikainen et al. 1989)	(Allonen et al. 1981)	(Smith et al. 1981)	(Heizmann et al. 1983)	(Thummel et al. 1996)	(Kupferschmidt et al. 1995)	
Statistischer Parameter	Mittel ± SD	k. A.	k. A.	Mittel ± SD	Mittel ± SD	Mittel ± SD	Mittel ± SD	
Dosis								
Oral	1 mg	15 mg	7,5 mg	10 mg	10 mg	20 mg	2 mg	15 mg
Intravenös	0,2 mg	7,5 mg	0,08 mg/kg	5 mg	0,15 mg/kg	0,15 mg/kg	1 mg	5 mg
Orale Bioverfügbarkeit [Prozent]	24,5 ± 6,9	38	44	38 ± 12	46 ± 11	48 ± 12	30 ± 10	24 ± 3

Grundsätzlich müssen hier äußere Faktoren berücksichtigt werden wie beispielsweise unterschiedliche Bioverfügbarkeit der unterschiedlichen oralen Präparate oder unterschiedliche Studiendesigns mit unterschiedlichen Ein- und Ausschlusskriterien, die diese Variationen bedingen könnten. Weiterhin spielen analytische Methoden bei der Bestimmung der Parameter eine Rolle. Insgesamt lässt sich aber feststellen, dass die absolute orale Bioverfügbarkeit von Midazolam niedrig ist, was sich übereinstimmend in der Literatur nachvollziehen lässt.

4.2.2 Erbllichkeit der Pharmakokinetik von Midazolam

Für die Variation der Pharmakokinetik von Midazolam nach oraler Applikation konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass genetische Effekte eine eher untergeordnete Rolle spielen. In der Literatur lassen sich zu dieser Frage sehr weit divergierende Ergebnisse finden. Im Ergebnisteil 3.2. wurden die Häufigkeiten der bekannten Genvarianten des CYP3A4-Polymorphismus aufgelistet. Es konnten 72 Probanden mit einer normalen Enzymaktivität detektiert werden (CYP3A4-Genotypen $*1/*1$, $*1/*1b$), was einem Anteil an 97,3 Prozent aller hier untersuchten Probanden entsprach; zwei Probanden waren Träger der Genvariante mit bekannt niedriger Enzymaktivität (CYP3A4-Genotypen $*1/*22$), was einen Anteil von 2,7 Prozent der hier untersuchten Studienpopulation ausmachte.

4.2.2.1 ***Erblichkeit der CYP3A4-Aktivität***

Die CYP3A4-Aktivität unterliegt einer großen interindividuellen Variabilität, sodass es mehr als nur einen genetischen Einfluss geben muss (Wilkinson 1996). Dennoch existieren einige Studien, in denen auf eine hohe Erblichkeit der Aktivität von CYP3A geschlossen wurde. In einer der ersten Untersuchungen dieser Art ließ sich mittels einer Zwillingsstudie eine hohe Erblichkeit von 88 Prozent für den Metabolismus des CYP3A4-Substrats Phenazon (Antipyrin) zeigen (Penno et al. 1981). In einer Metaanalyse von 16 Studien mit insgesamt 161 Probanden konnte mittels wiederholter Gabe von insgesamt 10 unterschiedlichen CYP3A4-Substraten eine Erblichkeit zwischen 14 und 99 Prozent je nach Substanz und Studie gezeigt werden. Für Midazolam nach intravenöser Applikation zeigte sich beispielweise eine Erblichkeit von 96 Prozent (Ozdemir et al. 2000). In einer weiteren Zwillingsstudie wurde Chinin als CYP3A4-Substrat mit einem Johanniskrautpräparat zur CYP3A4-Induktion kombiniert, um den Einfluss von genetischen und nicht-genetischen Faktoren in der Variabilität von CYP3A4 zu untersuchen. Hierbei wurde mittels Strukturgleichungsmodellierung der induzierten CYP3A4-Aktivität ein Einfluss durch additive genetische Faktoren zu 66 Prozent beschrieben. Daten zum Einfluss der nicht-induzierten CYP3A4-Aktivität wurden jedoch nicht veröffentlicht (Rahmioglu et al. 2011). In einer Studie mit 26 gesunden Probanden ließ sich jedoch zeigen, dass erbliche Varianten von CYP3A4 und CYP3A5 nur einen geringen Einfluss auf den CYP3A-Midazolam-Metabolismus ausüben (He et al. 2005). Es lässt sich folglich ein Anteil an erblichen Faktoren in der Variabilität von CYP3A4 zeigen, der jedoch im Vergleich der Studien untereinander nicht konsistent ist. Es bestehen bereits mehrere Hinweise, dass genetische Polymorphismen einen Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4 haben, jedoch konnte noch kein wirklich relevanter Polymorphismus detektiert werden (Klein und Zanger 2013). Als erster CYP3A4-Polymorphismus wurde der *CYP3A4*1b*-Polymorphismus bekannt, der mit einer Frequenz von 2 bis 9 Prozent in der kaukasischen Bevölkerung vertreten ist (Rebbeck et al. 1998). In Bezug auf die *In-vivo*-Indikatorsubstanz Midazolam ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine reduzierte Enzymaktivität (Miao et al. 2009). Im Gegensatz dazu existiert als weitere Variante der *CYP3A4*22*-Polymorphismus, der mit einer erniedrigten Enzymaktivität in Bezug auf Midazolam einhergeht (Wang et al. 2011; Elens et al. 2011a; Elens et al. 2011b).

In der vorliegenden Arbeit konnte für Midazolam nach oraler Applikation mittels Erblichkeitsberechnungen von Falconer und Vesell keine Erblichkeit nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich in der Strukturgleichungsmodellierung mittels CE-Modell kein Anhalt für eine große Bedeutung genetischer Faktoren. Allerdings konnte ein zweites Modell, welches sich nicht erheblich vom CE-Modell unterschied, eine additive Erblichkeit von etwa 65 Prozent zeigen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den Göttinger Daten zur Erblichkeit nach intravenöser Dosierung von

Midazolam. Nach intravenöser Midazolamapplikation ließen sich mittels Strukturgleichungsmodellierung 80 Prozent der Variation des CYP3A4-Metabolismus durch individuell erlebte Umwelteinflüsse und 20 Prozent durch additive genetische Effekte erklären. Aufgrund ähnlicher AIC- und p-Werte wurde jedoch ebenfalls ein weiteres Modell diskutiert, in dem sich letztlich kein Nachweis auf erbliche Einflüsse berechnen ließ (Strube 2015).

Wie schon bei Torasemid dargestellt, ist bei der begrenzten Fallzahl insbesondere der dizygoten Zwillinge und den nicht sehr weit auseinanderliegenden Werten für das Akaike-Kriterium (siehe Tabelle 36) nicht definitiv zwischen gemeinsamen Umweltfaktoren und additiven erblichen Faktoren zu unterscheiden. Auffällig war auch, dass die hier erhobenen pharmakokinetischen Parameter nach oraler Midazolamapplikation im statistischen Vergleich mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests zwischen den Gruppen der monozygoten und dizygoten Zwillinge bis auf den Parameter $t_{1/2\lambda z}$ signifikante Unterschiede zeigten. Dies könnte zufällig bedingt sein, was wiederum die Interpretation der Ergebnisse erschwert.

Nach oraler Dosierung spielen die gastrointestinale Motilität, die intestinale Absorption und der Darmstoffwechsel eine große Rolle. Bereits bekannt ist das Vorkommen des CYP3A4-Enzyms in der Darmwand, welches den First-Pass-Effekt dadurch zum Teil bedingt (de Waziers et al. 1990; Lown et al. 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die CYP3A4-Aktivität in der Darmwand bereits große Auswirkung auf die Metabolisierungsrate von Midazolam hat und dabei große interindividuelle Variationen bestehen (Gorski et al. 1998). Darüber hinaus existieren weitere bisher nicht hinreichend erforschte Faktoren, sodass sich der Anteil der unbekannt genen genetischen und nicht-genetischen Faktoren nach oraler Absorption erneut vergrößert (Galetin et al. 2010). Nach intravenöser Applikation spielen diese Mechanismen keine Rolle und könnten somit zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Als weiterer Faktor muss berücksichtigt werden, dass in einigen vorherigen Studien Substanzen mit unterschiedlicher CYP3A4- und CYP3A5- Selektivität verwendet wurden, was zu uneinheitlichen Ergebnissen geführt haben kann.

Es konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit mittels multipler Regressionsanalyse ein erblicher Einfluss der *CYP3A4*22*-Variante auf die AUC_{inf} nach oraler Applikation gezeigt werden. Im Vergleich zu bisher noch nicht publizierten Göttinger Daten nach intravenöser Midazolamapplikation kann hier ein ähnliches Ergebnis gefunden werden. Zusätzlich zu dem genetischen Einfluss der *CYP3A4*22*-Variante konnten nach intravenöser Applikation noch weitere signifikante Einflüsse durch exogene Faktoren wie Geschlecht, Gewicht und der Gebrauch von hormonellen Kontrazeptiva

detektiert werden. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nach oraler Applikation nicht ermittelt werden. Jedoch weisen die niedrigen Korrelationen der pharmakokinetischen Marker untereinander daraufhin, dass es weitere Einflüsse auf das Enzym CYP3A4 geben muss.

In Hinblick auf den Metaboliten Hydroxymidazolam nach oraler Dosierung ließ sich mittels Berechnung nach Falconer und Vesell im Vergleich zur Ausgangssubstanz Midazolam für die AUC_{inf} eine geringe Erbllichkeit nachweisen ($H^2^{(F)} = 0,42$ und $H^2^{(V)} = 0,28$). In der Strukturmodellierung ergaben sich unter strenger Einhaltung der Regeln für die Entscheidungsfindung (kleinster Wert für das Akaike-Kriterium bei nicht signifikantem Unterschied zum gesättigten Modell) keine starken Hinweise auf genetische Einflüsse, wobei das gewählte Modell sich nicht wesentlich von dem gesättigten Modell unterschied und daher eine Erbllichkeit von bis etwa 65 Prozent auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die Aktivität von CYP3A4 wohl aus einem multifaktoriell bedingten Zusammenspiel von mehreren Genen, Gen-Gen-Interaktionen und Umweltfaktoren resultiert, wobei in dieser Arbeit eine geringe Bedeutung der genetischen Effekte beigemessen wurde.

4.2.3 Erbllichkeit der absoluten oralen Bioverfügbarkeit (F) von Midazolam

Die Darmwand ist für viele Arzneimittel bereits ein zentrales Organ für erste Metabolisierungsvorgänge. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass der intestinale Arzneimittelstoffwechsel und damit die präsystemische Elimination die orale Bioverfügbarkeit signifikant mindern kann. Das Enzym CYP3A4 ist mit ca. 80 Prozent unter allen Cytochrom-P450-Enzymen das am häufigsten detektierte Enzym in der Darmwand (de Waziers et al. 1990; Paine et al. 2006). Obwohl nur etwa 1 Prozent aller CYP3A4-Enzyme in der Darmwand exprimiert werden, konnte für dieses Enzym ein signifikanter Einfluss auf den intestinalen First-Pass-Effekt nachgewiesen werden. In einer pharmakokinetischen Analyse nach oraler und intravenöser Midazolamapplikation zeigte sich, dass die absolute orale Bioverfügbarkeit von Midazolam durch den intestinalen (Mittel 43 Prozent \pm 24 Prozent) sowie hepatischen (Mittel 44 Prozent \pm 14 Prozent) Metabolismus bedingt ist (Paine et al. 1996; Thummel et al. 1996). In einer weiteren Arbeit konnte bei zehn lebertransplantierten Patienten und damit Ausschluss des hepatischen Metabolismus ebenfalls ein hoher und vergleichbarer intestinaler Metabolismus (43 Prozent \pm 18 Prozent) gezeigt werden (Paine et al. 1996). Damit konnte die niedrige absolute orale Bioverfügbarkeit von Midazolam durch Stoffwechselvorgänge, die bereits im Darm ablaufen, erklärt werden. In den beiden genannten Studien zeigten sich zudem intraindividuell bedingte Variationen der oralen Bioverfügbarkeit, die

unterschieden nach hepatischer Extraktion zwischen 22 und 76 Prozent und nach intestinaler Extraktion zwischen 0 und 77 Prozent bei gesunden Probanden und zwischen 14 und 59 Prozent bei Patienten nach Lebertransplantation variierten (Thummel et al. 1996; Paine et al. 1996). In einer weiteren Untersuchung der Anzahl der intestinalen CYP3A4-Enzyme in 20 Biopsaten des menschlichen Duodenums konnte eine 11-fache Variabilität für die intestinale CYP3A4-Expression detektiert werden (Lown et al. 1994), was in weiteren Studien bestätigt werden konnte (Paine et al. 1997). Dies ist einer von vielen ursächlichen Faktoren für die intraindividuelle Variation der absoluten oralen Bioverfügbarkeit von Midazolam, was sich ebenfalls in dieser Arbeit zeigen ließ. Es existieren, wie bereits ausgeführt, viele genetische Polymorphismen des Enzyms CYP3A4, wobei in dieser Arbeit nur für die Variante *CYP3A4*22* ein Hinweis auf eine verminderte Enzymaktivität zu finden war. Es ließ sich analog zu den hepatischen CYP3A4-Enzymen jedoch bisher kein relevanter Polymorphismus mit Einfluss auf die intestinale CYP3A4-Expression detektieren (Floyd et al. 2003; Mouly et al. 2005). Auch in einer jüngsten Studie konnte kein Nachweis von intestinaler *CYP3A4*22* Expression gefunden werden (Wang und Sadee 2016). In der vorliegenden Arbeit ließ sich mittels unterschiedlichster Erblchkeitsberechnungen für die absolute orale Bioverfügbarkeit von Midazolam kein Hinweis auf genetische Einflüsse feststellen. In der Literatur ließen sich keine direkt vergleichbaren Erblchkeitsberechnungen der oralen Bioverfügbarkeit finden. Jedoch kann bei Betrachtung der intestinalen Aktivität der CYP3A4-Enzyme ein indirekter Rückschluss auf die orale Bioverfügbarkeit gezogen werden. Somit lassen sich vergleichbare Ergebnisse finden.

In der folgenden Abbildung 23 werden die arithmetischen Werte von F für Midazolam unterteilt nach den bekannten Genvarianten veranschaulicht dargestellt.

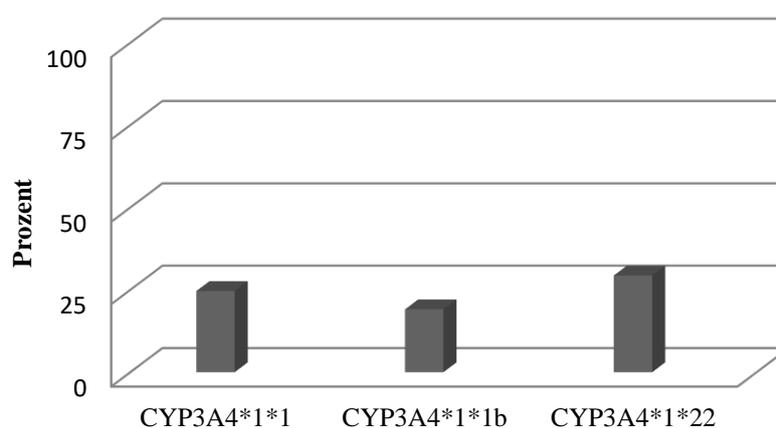


Abbildung 23 F von Midazolam, unterteilt nach bekannten Genvarianten

Auffällig ist der etwas höhere Anteil der Bioverfügbarkeit bei der Genvariante *CYP3A4*I*22*, für die in dieser Arbeit ein Hinweis auf eine verminderte Enzymaktivität zu finden war. Jedoch sind insgesamt nur zwei Probanden mit dieser Genvariante in dieser Studie detektiert worden, sodass von einem zufällig hohen Wert auszugehen ist (siehe Abbildung 23).

Zur Beschreibung der Einflüsse von F für Midazolam müssen zudem vor allem nicht-genetische Faktoren beachtet werden. So ließ sich in einer vergleichenden Studie zwischen oral und intravenös appliziertem Midazolam ein Einfluss des Inhibitors Ketokonazol vor allem auf die Clearance des oral verabreichten Midazolams zeigen (Tsunoda et al. 1999). Weitere Einflüsse auf die orale Bioverfügbarkeit insbesondere für Midazolam sind für Nahrungsmittel bekannt. Grapefruitsaft erhöht beispielsweise die orale Bioverfügbarkeit nach oral appliziertem Midazolam. Die Substanzen aus dem Grapefruitsaft erreichen im Wesentlichen nur die Darmschleimhaut, sodass nur der Membrantransport und der Metabolismus in der Darmschleimhaut davon betroffen sind. In einer Untersuchung hierzu wurde acht gesunden männlichen Probanden 15 mg Midazolam oral sowie 5 mg Midazolam intravenös verabreicht. Begleitend erhielten die Probanden Wasser oder Grapefruitsaft. Nach intravenöser Midazolamapplikation ließen sich keine Unterschiede auf die Pharmakokinetik von Midazolam nach Wasser oder Grapefruitsaft detektieren; nach oraler Midazolamapplikation kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg der oralen Bioverfügbarkeit nach Grapefruitsaft (35 Prozent \pm 3 Prozent) gegenüber Wasser (24 Prozent \pm 3 Prozent) (Kupferschmidt et al. 1995). Für das Nahrungsergänzungsmittel Johanneskraut lässt sich ebenfalls ein Einfluss auf die intestinale CYP3A4-Aktivität nachweisen, was in einer Studie mit zwölf gesunden Probanden zu einem Absinken der oralen Bioverfügbarkeit von 28 Prozent \pm 0,15 auf 17 Prozent \pm 0,06 geführt hat. Einflüsse nach intravenöser Midazolamapplikation ließen sich auch in diesem Fall nicht zeigen (Wang et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurde durch Verhaltens- und Ernährungsvorschriften versucht, diese bekannten nicht-genetischen Effekte einzudämmen.

In Hinblick auf nicht-erbliche Faktoren könnte es bedeutsam sein, noch mehr als bisher Umweltfaktoren wie die Ernährung in Zusammenhang mit CYP3A4 zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wird dem Fachgebiet der Epigenetik, welches sich mit Einflussfaktoren auf die Gene und deren Funktion beschäftigt, die nicht auf Mutation beruhen, eine immer größere Bedeutung beigemessen. Mittels DNA-Methylierung oder Modifikation von Histonen wird, ohne dass die DNA-Sequenz verändert wird, gesteuert, welche Genfunktionen abgerufen, moduliert oder abgeschaltet werden. Diese epigenetischen Veränderungen werden im Laufe des Lebens erworben und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen übertragen (Bird 2007). In einer epigenetischen Studie aus dem Jahre 2012 wurden DNA-Methylierungsprofile aus Nabelschnurblut sowie Plazentagewebe von 22 monozygoten und 12 dizygoten Zwillingen erstellt. Überraschend dabei war, dass sich nicht nur bei

den dizygoten, sondern auch bei den monozygoten Zwillingen deutliche Unterschiede im Methylierungsmuster ergaben. Dabei konnte nicht festgestellt werden, warum es zu diesen Unterschieden kam (Gordon et al. 2012). Dies bedeutet, dass der Einfluss von Umweltfaktoren bereits während der Entwicklung im Mutterleib relevant sein könnte. Fragen, inwiefern epigenetische Veränderungen auch die Aktivität von Arzneimittel-metabolisierenden Transportern und Enzymen beeinflussen und welche Ansätze sich daraus für die personalisierte Medizin ergeben, bieten Grundlage für weiterführende Studien.

Darüber hinaus sollte auch der Einfluss des menschlichen Mikrobioms nicht in seinem Stellenwert unterschätzt werden. In einer Probandenstudie wurde vor und nach Einnahme des Analgetikums Paracetamol die Blutkonzentration von p-Cresol gemessen, einem Abbauprodukt unterschiedlichster Darmbakterien des menschlichen Mikrobioms. In der Studie ließ sich zeigen, dass bei Probanden mit einer bereits vor der Einnahme von Paracetamol signifikant erhöhten Konzentration des p-Cresols, das Paracetamol nur teilweise verstoffwechselt wurde. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Bakterien der Darmschleimhaut Metaboliten produzieren, die bereits am Arzneimittelmetabolismus beteiligt sein können. Damit wird deutlich, dass der intestinale Arzneistoffmetabolismus nicht nur durch Transporter und Enzyme beeinflusst wird (Clayton et al. 2009). In einer englischen Zwillingsstudie mit 1126 Zwillingspaaren ließ sich darüber hinaus zeigen, dass es genetische Zusammenhänge gibt, welche Darmbakterien sich in der Darmflora ansiedeln. Dabei ließ sich beispielsweise zeigen, dass ein erhöhtes Vorkommen einer Genvariation im *LCT*-Gen, welches das Enzym Laktase kodiert, mit einem erhöhten Vorkommen sogenannter Bifidobakterien assoziiert ist (Goodrich et al. 2016). In welcher Weise beispielsweise auch der CYP3A4-Metabolismus durch das menschliche Mikrobiom beeinflusst wird, bietet Grundlage weiterführender Studien.

4.3 Diskussion der Methoden der Erblichkeitsberechnung

Das Konzept der *klassischen* Zwillingsstudie ermöglicht es, die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen zu vergleichen. Ziel dabei ist es, den erblichen und nicht-erblichen Anteil des Merkmals abzuschätzen (Boomsma et al. 2002). In dieser Studie wurden 58 monozygote und 16 gleichgeschlechtlich dizygoten Zwillinge eingeschlossen und bezüglich der Aktivitäten einiger pharmakokinetischer Parameter miteinander verglichen. Um die Ergebnisse der Zwillingsstudie mit der Allgemeinbevölkerung vergleichen zu können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt werden (Rijsdijk und Sham 2002).

Eine zu erfüllende Voraussetzung der *klassischen* Zwillingsstudie ist, dass monozygote und dizygoten Zwillinge den gleichen Umweltfaktoren ausgesetzt sein sollten. Monozygote Zwillinge entstehen aus

einer einzelnen befruchteten Eizelle. Neben ihren Genen teilen sie sich ebenso die von außen auf sie einwirkenden Faktoren. Dizygoten Zwillinge sind sich dagegen in ihren Genen nur zu 50 Prozent ähnlich, wachsen aber ebenfalls, und das unterscheidet sie von „normalen“ Geschwistern, in der gleichen Umgebung, bei derselben Familie, im gleichen Alter auf (Boomsma et al. 2002). Dass Mütter monozygote Zwillinge aufgrund ihrer Ähnlichkeit anders behandeln als dizygoten Zwillinge und es damit zu einer Fehleinschätzung der Erblichkeit kommt, konnte in Studien widerlegt werden (Rijsdijk und Sham 2002). Jedoch scheint das gemeinsame Aufwachsen nicht ein grundlegender Faktor für eine ähnliche Entwicklung zu sein. In der in den 1990er Jahren durchgeführten Minnesota Studie wurden monozygote Zwillinge aufgespürt, die seit der Geburt getrennt voneinander aufgewachsen sind. Es zeigte sich, dass die phänotypische Ausprägung der getrennt voneinander aufwachsenden Zwillinge ähnlich hoch war wie bei im Vergleich hinzugezogener gemeinsam aufwachsender Zwillinge (Bouchard et al. 1990).

Eine weitere Voraussetzung der *klassischen* Zwillingsstudie besagt, dass für das untersuchte Merkmal nur sehr wenige bis keine Interaktionen zwischen Umweltfaktoren und Genen vorliegen sollten. In der Praxis ist es jedoch sehr schwierig, einen Einfluss von Umweltfaktoren auf die untersuchte Genaktivität auszuschließen. Mittels multipler Regressionsanalyse lassen sich einige Hinweise auf mögliche konkurrierende Umweltfaktoren finden. Zudem finden sich unterschiedliche Korrelationen im Vergleich zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen, sodass sich mögliche Interaktionen im Mittel ausgleichen.

Zuletzt sollte erfüllt sein, dass sich Zwillinge nicht von der generellen Population unterscheiden. Dabei ist bekannt, dass Zwillinge im Vergleich zu Nicht-Zwillingen im Schnitt früher geboren werden, ein leichteres Geburtsgewicht vorweisen und in der ersten Phase des Lebens häufigere und längere Krankenhausaufenthalte bestehen (Chambers et al. 2014). Im Verlauf des Lebens heben sich diese Ungleichheiten jedoch auf (Rijsdijk und Sham 2002). Die in der vorliegenden Studie erhobenen pharmakokinetischen Parameter von Zwillingen wurden mit Daten aus der Literatur von Probanden, die keine Zwillinge waren, verglichen. Hierbei konnten vergleichbare Werte gefunden werden.

Zur Berechnung der Erblichkeit existieren unterschiedlichste Methoden, die im Wesentlichen auf die Korrelationen der monozygoten und dizygoten Zwillinge zurückzuführen sind. Die seit vielen Jahren etablierten Berechnungen nach Falconer und Vesell lassen mittels einfacher Formeln ($H^2^{(F)} = 2 \cdot [r_{MZ} - r_{DZ}]$ und $H^2^{(V)} = [r_{MZ} - r_{DZ}] / [1 - r_{Dz}]$) Rückschlüsse auf mögliche erbliche Zusammenhänge zu (Falconer und Mackay 1996; Vesell 1978, Vesell 1989). Zur Berücksichtigung von Umweltfaktoren und erblichen Faktoren können komplexere Methoden wie Strukturgleichungsmodellierungen herangezogen werden, in der genetisch additive Einflüsse (A), dominante Effekte (D), gemeinsam

erlebte Umweltfaktoren (C) und individuell spezifische Umweltfaktoren (E) als latente Variablen berechnet werden können (Rijsdijk und Sham 2002). Die angesprochenen Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit angewendet und konnten vergleichbare Werte der Erblichkeit in der Aktivität von OATP1B1, CYP2C9 sowie CYP3A4 nachweisen.

Die Pearson-Korrelationskoeffizienten der AUC_{inf} nach oraler und intravenöser Torasemidgabe zeigten sich bei den monozygoten Zwillingen insgesamt sehr hoch ($r_{MZ\ oral}=0,82$; $r_{MZ\ intravenös}=0,84$). Nach oraler Torasemiddosierung zeigte sich der Pearson-Korrelationskoeffizient der dizygoten Zwillinge vergleichsweise niedrig ($r_{DZ\ oral}=0,61$), was bereits als Hinweis auf einen großen Anteil des erblichen Einflusses diskutiert wurde. Nach Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten der dizygoten Zwillinge nach intravenöser Dosierung zeigte sich eine höhere Korrelation als bei den monozygoten Zwillingen nach intravenöser Dosierung ($r_{DZ\ intravenös} = 0,86$). Anzumerken ist hierbei, dass nur die pharmakokinetischen Daten der Probanden der intravenösen Dosierung einbezogen wurden, die auch die orale Dosierung erhalten haben (74 Probanden). Aufgrund der kleinen Fallzahl, vor allem der dizygoten Zwillinge, kam es dadurch zu einer ungenaueren Schätzung des Pearson-Korrelationskoeffizienten. Vergleicht man diese Daten mit bereits publizierten Daten der alleinigen Betrachtung der intravenösen Torasemidapplikation mit 116 Probanden, so konnte eine höhere Korrelation bei den monozygoten als bei den dizygoten Zwillingen gezeigt werden ($r_{MZ\ intravenös}=0,88$; $r_{DZ\ intravenös}=0,58$) (Matthaei et al. 2015). Dies unterstützt die These, dass die in dieser Arbeit berechneten höheren Korrelationen der dizygoten Zwillinge nach intravenöser Applikation durch die niedrige Fallzahl bedingt sein müssen.

Die Präzision der Korrelationen nach oraler Torasemiddosierung lässt sich für die monozygoten Zwillinge relativ hoch schätzen (95%-Konfidenzintervall nach oraler Torasemiddosierung: 0,65-0,91). Bei den dizygoten Zwillingen zeigen sich hingegen nach oraler Torasemiddosierung relativ breite 95%-Konfidenzintervalle (nach oraler Torasemiddosierung: -0,17-0,92), was wiederum durch die kleine Fallzahl der dizygoten Zwillinge erklärbar ist.

Bei Betrachtung der Korrelationen der AUC_{inf} des Metaboliten Hydroxytorasemid lässt sich nach oraler Applikation eine höhere Korrelation der dizygoten im Vergleich zu den monozygoten Zwillinge feststellen ($r_{MZ\ oral}=0,78$; $r_{DZ\ oral}=0,89$), was ebenfalls durch die kleine Fallzahl bedingt ist. Die Genauigkeit der Korrelation der monozygoten Zwillinge muss hierbei aufgrund des schmalen 95%-Konfidenzintervalls (0,57-0,89) als präziser angesehen werden als bei der Korrelation der dizygoten Zwillinge (95%-Konfidenzintervall 0,49-0,98). Betrachtet man die Werte von Hydroxytorasemid nach intravenöser Applikation, so zeigt sich allerdings hier eine höhere Korrelation der monozygoten Zwillinge ($r_{MZ\ intravenös}=0,89$) gegenüber der dizygoten Zwillinge ($r_{DZ\ intravenös}=0,50$).

Nach oraler sowie intravenöser Midazolamgabe zeigte sich kein auffälliger Unterschied zwischen monozygoten und dizygoten Korrelationen ($r_{\text{MZ oral}}=0,66$; $r_{\text{MZ intravenös}}=0,66$ gegenüber $r_{\text{DZ oral}}=0,66$; $r_{\text{DZ intravenös}}=0,32$). Es ergaben sich jedoch nach oraler Midazolamapplikation signifikante Unterschiede bezüglich der untersuchten Parameter zwischen den monozygoten und dizygoten Zwillingen. Durch die verhältnismäßig kleine Gruppe der dizygoten Zwillinge ($n=14$) wurden zudem Zufälligkeiten begünstigt, was auf mögliche Fehleinschätzungen der erblichen und umweltbedingten Einflüsse hinweisen könnte. Dies wiederum erschwerte, einen präzisen Korrelationskoeffizienten für die Berechnung nach Falconer, Vesell und mittels Strukturgleichungsmodellierung zu ermitteln. Dies spiegelt sich in den sehr breiten 95-Prozent-Konfidenzintervallen wider (95%-Konfidenzintervall nach oraler Midazolamdosierung der dizygoten Zwillinge: $-0,18-0,94$ gegenüber der monozygoten Zwillinge: $0,39-0,83$). Ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen wäre wünschenswert gewesen.

Für den Metaboliten Hydroxymidazolam zeigen sich nach oraler Applikation im Vergleich zur Ausgangssubstanz Midazolam nach oraler Applikation niedrigere Korrelationen ($r_{\text{MZ oral}}=0,47$; $r_{\text{DZ oral}}=0,26$). Auch hier liegen breite 95-Prozent-Konfidenzintervalle vor, sodass von einer breiten Streuung der Werte auszugehen ist.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass die Variabilitäten der pharmakokinetischen Parameter von Torasemid sowohl nach oraler als auch intravenöser Applikation durch erbliche Faktoren beeinflusst werden. Jedoch konnte nur weniger als die Hälfte der erblichen Faktoren durch bekannte Polymorphismen erklärt werden. Dabei spielte vor allem das Transportprotein OATP1B1 eine große Rolle. Nach oraler Dosierung ließen sich einige Hinweise finden, dass Varianten im CYP2C9-Polymorphismus einen etwas größeren Einfluss haben könnten als nach intravenöser Applikation. In Hinblick auf die ermittelte absolute orale Bioverfügbarkeit von Torasemid ließ sich jedoch kein Hinweis auf einen Einfluss erblicher Faktoren finden, was durch die bekannte hohe orale Bioverfügbarkeit von Torasemid bedingt sein könnte.

Bei Betrachtung der Prüfsubstanz von Midazolam nach oraler und intravenöser Applikation gab es in der Literatur einige Hinweise darauf, dass erbliche Faktoren einen Einfluss ausüben. Jedoch gibt es bislang keine Genvarianten, mit deren Bestimmung sich die Midazolam-Pharmakokinetik genau voraussagen ließe. Vielmehr müssen ebenso nicht-erbliche Faktoren wie mögliche epigenetische Veränderungen oder der Einfluss des menschlichen Mikrobioms untersucht werden, was Anhalt für weitere pharmakokinetische Studien bietet.

Eine allgemeine Problematik der gesamten Untersuchung war, dass eine sehr viel größere Anzahl monozygoter Zwillinge als dizygoter Zwillinge eingeschlossen wurde. Dies lag zum einen daran, dass nur gleichgeschlechtlich dizygote Pärchen in die Studie eingeschlossen wurden. Eine weitere Problematik der Studie stellte die Studienperiode II dar, in der sehr viel weniger Probanden im Vergleich zur Studienperiode I teilnahmen und dadurch die Aussagekraft der pharmakokinetischen Parameter nach oraler Dosierung eingeschränkt wurde. Die Fallzahl dieser Studie war dennoch deutlich höher als in vielen anderen bekannten Zwillingsstudien.

Es zeigten sich sowohl nach oraler Torasemid- als auch nach oraler Midazolamapplikation Hinweise auf erbliche Faktoren, die nur nach oraler Applikation auftraten. Jedoch ließen sich nach oraler Dosierung beider Prüfsubstanzen keine sicheren erblichen Faktoren erfassen. Da in der Medizin bekanntermaßen die meisten Medikamente oral verabreicht werden, bietet dies Anhalt weitere Studien durchzuführen, um so ein besseres Verständnis der Variabilität in der Pharmakokinetik und damit einhergehend auch in den Wirkungen und Nebenwirkungen nach oraler Verabreichung zu erlangen. Denn wie bereits der Mainzer Pharmakologe Prof. Gustav Kuschinsky deutlich gemacht hat (Kuschinsky 2016, S. 23), ist die Erforschung der Ursachen von Wirkung und Nebenwirkungen von Arzneimitteln weiterhin eine zentrale Aufgabe der pharmakologischen Forschung und so ein wichtiger Schritt in Richtung einer *individualisierten* Medizin.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die erblich und nicht-erblich bedingten Unterschiede in der Aktivität des Transporters OATP1B1 sowie der CYP-Enzyme CYP2C9 und CYP3A4 im Vergleich zwischen oraler und intravenöser Dosierung zu untersuchen. Grundlage hierfür war eine offene, nicht randomisierte pharmakokinetische und pharmakogenetische Arzneimittelstudie nach dem Konzept der *klassischen* Zwillingsstudie. Es wurden insgesamt 58 Zwillinge in die Studie eingeschlossen. Die Studie bestand aus zwei Studienperioden. In der Studienperiode I erfolgte die intravenöse Applikation, in der Studienperiode II die orale Applikation. An der Studienperiode II nahmen von den 58 Zwillingspaaren 37 Paare teil, wovon 29 monozygot und 8 gleichgeschlechtlich dizygot waren.

Jedem Probanden wurden während der Studienphasen jeweils die Prüfsubstanz Torasemid (als Testsubstanz für OATP1B1 und CYP2C9) sowie Midazolam (als Testsubstanz für CYP3A4) verabreicht; in der Studienperiode I intravenös und in der Studienperiode II per os. Durch Messen der Konzentration der Medikamente im Blutplasma und im Urin zu festgelegten Zeitpunkten über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Einnahme konnten Rückschlüsse auf die *In-vivo*-Aktivität dieser Transporter bzw. Enzyme gezogen werden. Mithilfe von Konzentrations-Zeit-Kurven wurde der primäre Parameter AUC_{inf} (Fläche unter der Kurve von Null bis Unendlich) zur Aktivitätsmessung des Transporters OATP1B1 sowie der Enzyme CYP2C9 und CYP3A4 vergleichend nach oraler und intravenöser Dosierung herangezogen. Zur Ermittlung der Erblichkeit wurden verschiedene Verfahren (Berechnung der Korrelationskoeffizienten monozygoter und dizygoter Zwillinge, Erblichkeitsberechnungen nach Falconer und Vesell, Strukturgleichungsmodellierung) angewendet.

In der Variation der Aktivität des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 konnte in dieser Arbeit nach oraler Applikation der *In-vivo*-Indikatorsubstanz Torasemid ein hoher erblicher Anteil detektiert werden. Dieser erbliche Anteil ließ sich jedoch nur zu 47,6 Prozent durch bekannte Genvarianten des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 erklären. Im Vergleich zwischen oraler und intravenöser Dosierung zeigte sich in dieser Arbeit die Tendenz, dass Genvarianten von CYP2C9 nach oraler Dosierung einen geringfügig größeren Einfluss auf den Metabolismus von Torasemid haben könnten als nach intravenöser Dosierung. Dabei sollten jedoch die großen interindividuellen Unterschiede in der Expression und damit Aktivität des intestinalen CYP2C9-Enzyms vermehrt mit einbezogen werden, was Grundlage für weiterführende Studien bietet. Für die absolute orale Bioverfügbarkeit (F) von Torasemid ließ sich keine Erblichkeit nachweisen. Insbesondere ergab sich kein statistisch signifikanter Einfluss von bekannten Genvarianten des

OATP1B1-Polymorphismus sowie der CYP2C9-Genvarianten, was aber auch mit der Seltenheit einiger der Genvarianten zusammenhängen dürfte.

In der Variation der Aktivität des Enzyms CYP3A4 ergaben sich in dieser Arbeit nach oraler Dosierung keine statistisch signifikanten Hinweise auf bedeutende erbliche Einflüsse. Vielmehr standen Umweltfaktoren im Vordergrund. Mittels multipler Regressionsanalyse konnte dennoch ein signifikanter Einfluss auf die AUC_{inf} nach oraler Midazolamapplikation zu 12,5 Prozent durch die Genaktivität von *CYP3A4*22* erklärt werden. Auch in der Literatur finden sich kontroverse Daten bezüglich relevanter erblicher Faktoren, die die Aktivität von CYP3A4 beeinflussen. In dieser Arbeit wurde zudem die Aussagekraft nach oraler Dosierung eingeschränkt, da aufgrund der kleinen Fallzahl eingeschlossener dizygoter Zwillingspaare Zufälligkeiten der Ergebnisse nicht auszuschließen waren. Die Berechnungen der absoluten oralen Bioverfügbarkeit *F* von Midazolam zeigten keinen signifikanten Hinweis auf relevante genetische Einflüsse, insbesondere nicht für den Einfluss bekannter CYP3A4-Polymorphismen.

Als Fazit der vorliegenden Arbeit lässt sich festhalten, dass erbliche Faktoren nach oraler sowie intravenöser Dosierung einen wesentlichen Einfluss auf die Pharmakokinetik von Torasemid ausüben. Im Hinblick auf die variablen Aktivitäten des Transporters OATP1B1 und des Enzyms CYP2C9 existieren jedoch noch über 50 Prozent unbekannte genetische Polymorphismen. Hinsichtlich der variablen Aktivität des Enzyms CYP3A4 ergeben sich Zweifel, dass Genvarianten allein eine wesentliche Rolle für die Variation spielen; zumindest bei Betrachtung der Pharmakokinetik von Midazolam. Ein weiteres Fazit dieser Studie ist, dass vor allem nach oraler Dosierung Umweltfaktoren einen sehr hohen Stellenwert einnehmen, wobei hier ebenfalls eine Vielzahl unbekannter Umweltfaktoren existiert. Die Diskrepanz bezüglich der Ergebnisse der absoluten oralen Bioverfügbarkeit muss neben dem Einfluss exogener Faktoren auch im Zusammenhang mit dem ungleichen Verhältnis der monozygoten und dizygoten Zwillinge interpretiert werden. Für zukünftige Studien sollte vor allem auf ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen geachtet werden, möglicherweise hätte man doch dizygoten Zwillingspaare mit unterschiedlichem Geschlecht einschließen sollen. Es könnte zudem ratsam sein, noch mehr als bisher Umweltfaktoren wie die Ernährung in Zusammenhang mit z. B. CYP3A4 zu untersuchen wie beispielsweise epigenetische Faktoren oder den Einfluss des menschlichen Mikrobioms.

6 Literaturverzeichnis

- Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T et al. (1999): Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274, 17159–17163
- Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA (2010): A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061–1073
- Allabi AC, Gala J-L, Horsmans Y, Babaoglu MO, Bozkurt A, Heusterspreute M, Yasar U (2004): Functional impact of CYP2C95, CYP2C96, CYP2C98, and CYP2C911 in vivo among black Africans. *Clin Pharmacol Ther* 76, 113–118
- Allonen H, Ziegler G, Klotz U (1981): Midazolam kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 30, 653–661
- Arayne MS, Sultana N, Bibi Z (2005): Grape fruit juice-drug interactions. *Pak J Pharm Sci* 18, 45–57
- Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR (2015): A global reference for human genetic variation. *Nature* 526, 68–74
- Bird A (2007): Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398
- Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L (2002): Classical twin studies and beyond. *Nat Rev Genet* 3, 872–882
- Bouchard TJ, Lykken DT, McGue M, Segal NL, Tellegen A (1990): Sources of human psychological differences: the Minnesota Study of Twins Reared Apart. *Science* 250, 223–228
- Brater DC (1992): Clinical pharmacology of loop diuretics in health and disease. *Eur Heart J* 13 Suppl G, 10–14
- Brockmöller J, Tzvetkov MV (2008): Pharmacogenetics: data, concepts and tools to improve drug discovery and drug treatment. *Eur J Clin Pharmacol* 64, 133–157
- Carrillo JA, Ramos SI, Agundez JA, Martinez C, Benitez J (1998): Analysis of midazolam and metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography: probe of CYP3A. *Ther Drug Monit* 20, 319–324
- Chambers GM, van Hoang P, Lee E, Hansen M, Sullivan EA, Bower C, Chapman M (2014): Hospital costs of multiple-birth and singleton-birth children during the first 5 years of life and the role of assisted reproductive technology. *JAMA Pediatr* 168, 1045–1053
- Chan LM, Lowes S, Hirst BH (2004): The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci* 21, 25–51
- Clancy JP, Johnson SG, Yee SW, McDonagh EM, Caudle KE, Klein TE, Cannavo M, Giacomini KM (2014): Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for ivacaftor therapy in the context of CFTR genotype. *Clin Pharmacol Ther* 95, 592–597

- Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK (2009): Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 14728–14733
- Cosín J, Díez J (2002): Torasemide in chronic heart failure: results of the TORIC study. *Eur J Heart Fail* 4, 507–513
- de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH (1990): Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 387–394
- Eckford PD, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE (2012): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) potentiator VX-770 (ivacaftor) opens the defective channel gate of mutant CFTR in a phosphorylation-dependent but ATP-independent manner. *J Biol Chem* 287, 36639–36649
- Eichelbaum M, Burk O (2001): CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 7, 285–287
- Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ (1979): Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* 16, 183–187
- Eichelbaum M, Schwab M, Marx C, Zanger U, Fischer-Bosch M (2002): Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme: Bedeutung für Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten. *Dtsch Arztebl* 99, 497–504
- Elens L, Becker ML, Haufroid V, Hofman A, Visser LE, Uitterlinden AG, Stricker BC, van Schaik RH (2011a): Novel CYP3A4 intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study. *Pharmacogenet Genomics* 21, 861–866
- Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, Mourad M, Haufroid V (2011b): Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 12, 1383–1396
- Elens L, Nieuweboer A, Clarke SJ, Charles KA, de Graan A-J, Haufroid V, Mathijssen RH, van Schaik RH (2013): CYP3A4 intron 6 CT SNP (CYP3A4*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenomics* 14, 137–149
- Evans WE, Relling MV (1999): Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286, 487–491
- Evans WE, McLeod HL (2003): Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 348, 538–549
- Fachinformation Ivacaftor: Fachinformation Kalydeco® 150 mg Filmtabletten. Vertex pharmaceuticals, Großbritannien 2017
- Fachinformation Midazolam: Fachinformation Dormicum® Injektionslösung. Roche, Deutschland 2015

- Fachinformation Torasemid: Torem® 200/-200 Infusionslösung. Berlin-Chemie Menarini, Deutschland 2013
- Falconer DS, Mackay TFC: Introduction to quantitative genetics. 4. Auflage; Longman, Essex 1996
- Flockhart DA (2007): Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine. Internetquelle: <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/> Zugriff am 29.07.2018
- Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, Mayo G, George AL, Bhat K, Kim RB, Wilkinson GR (2003): Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 13, 595–606
- Fraser AG (1997): Pharmacokinetic interactions between alcohol and other drugs. *Clin Pharmacokinet* 33, 79–90
- Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C (1996): Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Br J Pharmacol* 118, 1841–1847
- Fukuda Y, Ishida N, Noguchi T, Kappas A, Sassa S (1992): Interleukin-6 down regulates the expression of transcripts encoding cytochrome P450 IA1, IA2 and IIIA3 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 960–965
- Galetin A, Gertz M, Houston JB (2010): Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. *Drug Metab Pharmacokinet* 25, 28–47
- Garcia Rodríguez LA, Hernández-Díaz S (2001): The risk of upper gastrointestinal complications associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs, glucocorticoids, acetaminophen, and combinations of these agents. *Arthritis Res* 3, 98–101
- GCP-Verordnung: Verordnung über die Anwendung der Guten Klinischen Praxis bei der Durchführung von klinischen Prüfungen mit Arzneimitteln zur Anwendung am Menschen (GCP-Verordnung-GCP-V) vom 9. August 2004 (BGBl. I S. 2081), die zuletzt durch Artikel 8 des Gesetzes vom 19. Oktober 2012 (BGBl. I S. 2192) geändert worden ist. Europäische Union 2012
- Ge G-B, Ning J, Hu L-H, Dai Z-R, Hou J, Cao Y-F, Yu Z-W, Ai C-Z, Gu J-K, Ma X-C et al. (2013): A highly selective probe for human cytochrome P450 3A4: isoform selectivity, kinetic characterization and its applications. *Chem Commun (Camb)* 49, 9779–9781
- Gibaldi M, Boyes RN, Feldman S (1971): Influence of first-pass effect on availability of drugs on oral administration. *J Pharm Sci* 60, 1338–1340
- Glombiewski JA, Nestoriuc Y, Rief W, Glaesmer H, Braehler E (2012): Medication adherence in the general population. *PLoS ONE* 7, e50537
- Goldstein JA (2001): Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 52, 349–355
- Goldstein JA, de Morais SM (1994): Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* 4, 285–299

- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA (1988): Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331, 442–446
- Goodrich JK, Davenport ER, Beaumont M, Jackson MA, Knight R, Ober C, Spector TD, Bell JT, Clark AG, Ley RE (2016): Genetic Determinants of the Gut Microbiome in UK Twins. *Cell Host Microbe* 19, 731–743
- Gordon L, Joo JE, Powell JE, Ollikainen M, Novakovic B, Li X, Andronikos R, Cruickshank MN, Conneely KN, Smith AK et al. (2012): Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. *Genome Res* 22, 1395–1406
- 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, 1643–1653
- Gorski JC, Jones DR, Haehner-Daniels BD, Hamman MA, O'Mara EM, Hall SD (1998): The contribution of intestinal and hepatic CYP3A to the interaction between midazolam and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther* 64, 133–143
- Gugeler N, Klotz U: Einführung in die Pharmakokinetik: Pharmakokinetische Grundkenntnisse, Prinzipien und ihre klinische Bedeutung, Terminologie und Tabellen pharmakokinetischer Daten. 2. neubearb. Auflage; Govi-Verlag, Frankfurt am Main 2000
- 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, 373–387
- Heizmann P, Eckert M, Ziegler WH (1983): Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man. *Br J Clin Pharmacol* 16 Suppl 1, 43S-49S
- Ho RH, Kim RB (2005): Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 78, 260–277
- Ho RH, Choi L, Lee W, Mayo G, Schwarz UI, Tirona RG, Bailey DG, Stein CM, Kim RB (2007): Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants. *Pharmacogenet Genomics* 17, 647–656
- Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG (1999): A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 274, 37161–37168
- Hughes DA, Vilar FJ, Ward CC, Alfirovic A, Park BK, Pirmohamed M (2004): Cost-effectiveness analysis of HLA B*5701 genotyping in preventing abacavir hypersensitivity. *Pharmacogenetics* 14, 335–342

- Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM (1992): Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* 44, 275–283
- Inoue K, Inazawa J, Nakagawa H, Shimada T, Yamazaki H, Guengerich FP, Abe T (1992): Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. *Jpn J Hum Genet* 37, 133–138
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004): Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931–945
- Kalliokoski A, Niemi M (2009): Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 158, 693–705
- Kalliokoski A, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M (2008): Effects of the SLCO1B1*1B haplotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *Pharmacogenet Genomics* 18, 937–942
- Kalow W (1982): Ethnic differences in drug metabolism. *Clin Pharmacokinet* 7, 373–400
- Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K (2005): Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1*5, SLCO1B1*15 and SLCO1B1*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics* 15, 513–522
- Kenworthy KE, Bloomer JC, Clarke SE, Houston JB (1999): CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *Br J Clin Pharmacol* 48, 716–727
- Kirchheiner J, Brockmüller J (2005): Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 77, 1–16
- Kivistö KT, Niemi M (2007): Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharm Res* 24, 239–247
- Klein K, Zanger UM (2013): Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the "Missing Heritability" Problem. *Front Genet* 4, 12
- Knauf H, Mutschler E (1998): Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of torasemide. *Clin Pharmacokinet* 34, 1–24
- Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB (1994): CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 4, 247–259
- Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD et al. (2001): Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27, 383–391
- Kupferschmidt HH, Ha HR, Ziegler WH, Meier PJ, Krahenbuhl S (1995): Interaction between grapefruit juice and midazolam in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58, 20–28
- Kuschinsky G: Generelle Prinzipien. Vorbemerkung. In: Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L (Hrsg.): *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen: ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften*, eine

Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker. 18. vollst. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2016, 23-24

Lapane KL, Spooner JJ, Mucha L, Straus WL (2001): Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug use on the rate of gastrointestinal hospitalizations among people living in long-term care. *J Am Geriatr Soc* 49, 577–584

Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN (1998): Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 279, 1200–1205

Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA (2002): Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 12, 251–263

Lesne M (1988): Comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of torasemide and furosemide in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 38, 160–163

Lesne M, Clerckx-Braun F, Duhoux P, van Ypersele de Strihou C (1982): Pharmacokinetic study of torasemide in humans: an overview of its diuretic effect. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 20, 382–387

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, 789–799

Liu Y-T, Hao H-P, Liu C-X, Wang G-J, Xie H-G (2007): Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 39, 699–721

Lown KS, Kolars JC, Thummel KE, Barnett JL, Kunze KL, Wrighton SA, Watkins PB (1994): Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test. *Drug Metab Dispos* 22, 947–955

Lux V: Genetik und psychologische Praxis. 1. Auflage; Springer VS, Wiesbaden 2012

Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL (1977): Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 2, 584–586

Marcianti KD, Durda JP, Heckbert SR, Lumley T, Rice K, McKnight B, Totah RA, Tamraz B, Kroetz DL, Fukushima H et al. (2011): Cerivastatin, genetic variants, and the risk of rhabdomyolysis. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 280–288

Martignoni M, de Kanter R, Grossi P, Mahnke A, Saturno G, Monshouwer M (2004): An in vivo and in vitro comparison of CYP induction in rat liver and intestine using slices and quantitative RT-PCR. *Chem Biol Interact* 151, 1–11

Matthaei J: Erblichkeit in der Aktivität der Enzyme CYP2D6 und CYP2C9 sowie des Transporters OATP1B1 unter Berücksichtigung der bereits bekannten genetischen Varianten. Med. Diss. Göttingen 2014

Matthaei J, Brockmoller J, Tzvetkov MV, Sehr D, Sachse-Seeboth C, Hjelmberg JB, Moller S, Halekoh U, Hofmann U, Schwab M et al. (2015): Heritability of metoprolol and torsemide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 98, 611–621

- Meehan RR, Gosden JR, Rout D, Hastie ND, Friedberg T, Adesnik M, Buckland R, van Heyningen V, Fletcher J, Spurr NK (1988): Human cytochrome P-450 PB-1: a multigene family involved in mephenytoin and steroid oxidations that maps to chromosome 10. *Am J Hum Genet* 42, 26–37
- Meyer UA, Zanger UM, Schwab M (2013): Omics and drug response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53, 475–502
- 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, 319–326
- Miners JO, Birkett DJ (1998): Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 45, 525–538
- Miners JO, Rees DL, Valente L, Veronese ME, Birkett DJ (1995): Human hepatic cytochrome P450 2C9 catalyzes the rate-limiting pathway of torsemide metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 272, 1076–1081
- Miners JO, Coulter S, Birkett DJ, Goldstein JA (2000): Torsemide metabolism by CYP2C9 variants and other human CYP2C subfamily enzymes. *Pharmacogenetics* 10, 267–270
- Motulsky AG (1957): Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc* 165, 835–837
- Mouly SJ, Matheny C, Paine MF, Smith G, Lamba J, Lamba V, Pusek SN, Schuetz EG, Stewart PW, Watkins PB (2005): Variation in oral clearance of saquinavir is predicted by CYP3A5*1 genotype but not by enterocyte content of cytochrome P450 3A5. *Clin Pharmacol Ther* 78, 605–618
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P: Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie; mit 257 Tabellen und 1417 Strukturformeln. 10. vollst. überarb. und erw. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, Stuttgart 2013
- Mwinyi J, Johne A, Bauer S, Roots I, Gerloff T (2004): Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 75, 415–421
- Nebert DW, Gonzalez FJ (1987): P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56, 945–993
- Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fujii-Kuriyama Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF (1991): The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 10, 1–14
- Nelson DR (2009): The cytochrome p450 homepage. *Hum Genomics* 4, 59–65
- Neugebauer G, Besenfelder E, von Mollendorff E (1988): Pharmacokinetics and metabolism of torasemide in man. *Arzneimittelforschung* 38, 164–166
- Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT (2006): Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 80, 565–581

- Niemi M (2007): Role of OATP transporters in the disposition of drugs. *Pharmacogenomics* 8, 787–802
- Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, Eichelbaum M, Kivistö KT, Neuvonen PJ (2005): Polymorphic organic anion transporting polypeptide 1B1 is a major determinant of repaglinide pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 77, 468–478
- Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ (2011): Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63, 157–181
- Nozawa T, Minami H, Sugiura S, Tsuji A, Tamai I (2005): Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms. *Drug Metab Dispos* 33, 434–439
- Obach RS, Zhang QY, Dunbar D, Kaminsky LS (2001): Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s. *Drug Metab Dispos* 29, 347–352
- Olkola KT, Ahonen J (2008): Midazolam and other benzodiazepines. *Handb Exp Pharmacol*, 335–360
- Ozdemir 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, 373–388
- Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM, Gillies BS, Thummel KE (1996): First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther* 60, 14–24
- Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, Shen DD, Kunze KL, Marsh CL, Perkins JD, Thummel KE (1997): Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283, 1552–1562
- Paine MF, Davis CL, Shen DD, Marsh CL, Raisys VA, Thummel KE (2000): Can oral midazolam predict oral cyclosporine disposition? *Eur J Pharm Sci* 12, 51–62
- Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC (2006): The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* 34, 880–886
- Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M (2008): Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 9, 19–33
- 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, 5193–5196
- Pentikainen PJ, Valisalmi L, Himberg JJ, Crevoisier C (1989): Pharmacokinetics of midazolam following intravenous and oral administration in patients with chronic liver disease and in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 29, 272–277

- Pharmacogene Variation Consortium: Table of cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9 alleles; Internetquelle: <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9> Zugriff am 29.07.2018 2002
- Piper JM, Ray WA, Daugherty JR, Griffin MR (1991): Corticosteroid use and peptic ulcer disease: role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Intern Med* 114, 735–740
- 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, 15–19
- Quteineh L, Verstuyft C, Descot C, Dubert L, Robert A, Jaillon P, Becquemont L (2005): Vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genetic polymorphism is associated to oral anticoagulant overdose. *Thromb Haemost* 94, 690–691
- Rahmioglu N, Heaton J, Clement G, Gill R, Surdulescu G, Zlobecka K, Hodgkiss D, Ma Y, Hider RC, Smith NW et al. (2011): Genetic epidemiology of induced CYP3A4 activity. *Pharmacogenet Genomics* 21, 642–651
- Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB (1998): Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 90, 1225–1229
- Redman AR (2001): Implications of cytochrome P450 2C9 polymorphism on warfarin metabolism and dosing. *Pharmacotherapy* 21, 235–242
- Rende RD, Plomin R, Vandenberg SG (1990): Who discovered the twin method? *Behav Genet* 20, 277–285
- Rijsdijk FV, Sham PC (2002): Analytic approaches to twin data using structural equation models. *Brief Bioinform* 3, 119–133
- Rottenkolber D, Schmiedl S, Rottenkolber M, Farker K, Saljé K, Mueller S, Hippus M, Thuermann PA, Hasford J (2011): Adverse drug reactions in Germany: Direct costs of internal medicine hospitalizations. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 20, 626–634
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, Sherry S, Mullikin JC, Mortimore BJ, Willey DL et al. (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409, 928–933
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I (1997): Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60, 284–295
- Schurig AM, Böhme M, Just KS, Scholl C, Dormann H, Plank-Kiegele B, Seufferlein T, Gräff I, Schwab M, Stingl JC (2018): Adverse Drug Reactions (ADR) and Emergencies. *Dtsch Arztebl Int* 115, 251–258
- Schwab M, Schaeffeler E, Zanger UM, Brauch H, Kroemer HK (2011): Pharmakogenomik: Hype oder Hope? *Dtsch Med Wochenschr* 136, 461–467
- Schwab M, Eichelbaum M: Wirkungen des Organismus auf Pharmaka: allgemeine Pharmakokinetik. In: Aktories K, Forth W, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (Hrsg.): *Allgemeine und spezielle*

Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 12. Auflage; Urban & Fischer/Elsevier, München 2017, 32-56

Schwartz S, Brater DC, Pound D, Green PK, Kramer WG, Rudy D (1993): Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of torsemide in patients with cirrhosis. *Clin Pharmacol Ther* 54, 90–97

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

Smith MT, Eadie MJ, Brophy TO (1981): The pharmacokinetics of midazolam in man. *Eur J Clin Pharmacol* 19, 271–278

Soldin OP, Mattison DR (2009): Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 48, 143–157

Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J (2001): Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med* 7, 201–204

Strube J: Studie zu erblichen Einflüssen auf die Pharmakokinetik von Midazolam und Koffein. Med. Diss. Göttingen 2015

Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR (1996): Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 6, 429–439

Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, Zhang Y, Ye K, Jun G, Fritz MH-Y et al. (2015): An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature* 526, 75–81

Tachibana-Iimori R, Tabara Y, Kusuhara H, Kohara K, Kawamoto R, Nakura J, Tokunaga K, Kondo I, Sugiyama Y, Miki T (2004): Effect of genetic polymorphism of OATP-C (SLCO1B1) on lipid-lowering response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 375–380

Takanashi K, Tainaka H, Kobayashi K, Yasumori T, Hosakawa M, Chiba K (2000): CYP2C9 Ile359 and Leu359 variants: enzyme kinetic study with seven substrates. *Pharmacogenetics* 10, 95–104

Taube J, Halsall D, Baglin T (2000): Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 96, 1816–1819

Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, Raisys VA, Marsh CL, McVicar JP, Barr DM (1994): Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther* 271, 549–556

Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Wilkinson GR (1996): Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 59, 491–502

- Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB (2001): Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 276, 35669–35675
- Tsunoda SM, Velez RL, von Moltke LL, Greenblatt DJ (1999): Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther* 66, 461–471
- Tucker GT, Rostami-Hodjegan A, Jackson PR (1998): Determination of drug-metabolizing enzyme activity in vivo: pharmacokinetic and statistical issues. *Xenobiotica* 28, 1255–1273
- US Food and Drug Administration: Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. Internetquelle: <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm080499.htm> Zugriff am 29.07.2018 2018
- Vavricka SR, van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K (2002): Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 36, 164–172
- Verhoef TI, Redekop WK, Daly AK, van Schie RM, de Boer A, Maitland-van der Zee AH (2014): Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. *Br J Clin Pharmacol* 77, 626–641
- Vesell ES: Twin studies in pharmacogenetics. In: Vogel F, Buselmaier W, Reichert W, Kellermann G, Berg P (Hrsg.): *Human Genetic Variation in Response to Medical and Environmental Agents: Pharmacogenetics and Ecogenetics*. Human Genetics. 1. Auflage; Springer, Berlin, Heidelberg 1978, 19–30
- Vesell ES (1989): Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies. *Pharmacol Ther* 41, 535–552
- Vesell ES (1991): Genetic and environmental factors causing variation in drug response. *Mutat Res* 247, 241–257
- Vesell ES, Page JG (1968a): Genetic control of dicumarol levels in man. *J Clin Invest* 47, 2657–2663
- Vesell ES, Page JG (1968b): Genetic control of drug levels in man: phenylbutazone. *Science* 159, 1479–1480
- Vesell ES, Page JG (1968c): Genetic control of drug levels in man: antipyrine. *Science* 161, 72–73
- Vormfelde SV, Engelhardt S, Zirk A, Meineke I, Tuchen F, Kirchheiner J, Brockmüller J (2004): CYP2C9 polymorphisms and the interindividual variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics of the loop diuretic drug torsemide. *Clin Pharmacol Ther* 76, 557–566
- Vormfelde SV, Schirmer M, Toliat MR, Meineke I, Kirchheiner J, Nürnberg P, Brockmüller J (2007): Genetic variation at the CYP2C locus and its association with torsemide biotransformation. *Pharmacogenomics J* 7, 200–211
- Vormfelde SV, Toliat MR, Schirmer M, Meineke I, Nürnberg P, Brockmüller J (2008): The polymorphisms Asn130Asp and Val174Ala in OATP1B1 and the CYP2C9 allele *3 independently affect torsemide pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 83, 815–817

- Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ (1995): Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 13, 129–134
- Wang D, Sadee W (2016): CYP3A4 intronic SNP rs35599367 (CYP3A4*22) alters RNA splicing. *Pharmacogenet Genomics* 26, 40–43
- Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W (2011): Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J* 11, 274–286
- Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang SM, Lesko LJ, Hall SD (2001): The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 70, 317–326
- Watkins PB, Murray SA, Winkelman LG, Heuman DM, Wrighton SA, Guzelian PS (1989): Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid-inducible liver cytochromes P-450. Studies in rats and patients. *J Clin Invest* 83, 688–697
- Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP (1988): Human liver microsomal steroid metabolism: Identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 263, 424–436
- Werner D, Werner U, Meybaum A, Schmidt B, Umbreen S, Grosch A, Lestin HG, Graf B, Zolk O, Fromm MF (2008): Determinants of steady-state torasemide pharmacokinetics: impact of pharmacogenetic factors, gender and angiotensin II receptor blockers. *Clin Pharmacokinet* 47, 323–332
- Werner U, Werner D, Heinbuchner S, Graf B, Ince H, Kische S, Thurmann P, König J, Fromm MF, Zolk O (2010): Gender is an important determinant of the disposition of the loop diuretic torasemide. *J Clin Pharmacol* 50, 160–168
- Wilkinson GR (1996): Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J Pharmacokinet Biopharm* 24, 475–490
- Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA (2002): Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* 30, 883–891
- Xu C, Li CY-T, Kong A-NT (2005): Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 28, 249–268
- Zevin S, Benowitz NL (1999): Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clin Pharmacokinet* 36, 425–438

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Brockmüller für die freundliche Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und für die gute Betreuung beim Verfassen der Arbeit.

Insbesondere danke ich Dr. med. Johannes Matthaei für die gute Einarbeitung und Betreuung auf der Probandenstation des Instituts für Klinische Pharmakologie. Ich danke für ein immer offenes Ohr und viel Geduld bei Fragen zu dieser Arbeit.

Darüber hinaus geht mein Dank an das gesamte Team der Probandenstation des Instituts für Klinische Pharmakologie mit Dr. med. Cordula Sachse-Seeboth und Daniel Sehr. Ein besonderer Dank geht an die Study Nurse Ulrike Schöning für die zahlreichen Stunden gemeinsam auf der Probandenstation oder unterwegs in Mitteldeutschland, um für die Zwillingstudie zu werben. Vielen Dank für die stets sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und das Engagement zum Fortführen der Studie auch den vorherigen sowie folgenden Doktoranden auf der Probandenstation.

Herrn Sven Müller danke ich für die Unterstützung bei der elektronischen Erfassung der erhobenen Daten.

Für die Durchführung der bioanalytischen Untersuchungen danke ich den zuständigen Mitarbeitern in den Laboren des Instituts für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Göttingen sowie des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie, Stuttgart.

Und natürlich danke ich allen Zwillingspaaren für die Teilnahme an dieser Studie.