

Aus der Klinik für Kardiologie / Zentrum für Innere Medizin
Chefarzt: PD Dr. med. habil. B. Graf
HELIOS Kliniken Schwerin
Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Rostock

**Untersuchungen zu den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der
Pharmakokinetik von Torasemid**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Heinbüchner, Svetlana
geb. in Tjumen/Russland

aus Schwerin

Rostock, 2009
Dekan: Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0077-5

Gutachter:

1. Herr PD Dr. med. Dierk Werner
Chefarzt der Inneren Abteilung II, evangelisches Krankenhaus Stift Bethlehem
GmbH, Ludwigslust
2. Herr Prof. Dr. med. Burkhard Hinz, Direktor des Instituts für Toxikologie und
Pharmakologie der Universität Rostock
3. Herr Prof. Dr. med. Martin F. Fromm, Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich – Alexander Universität Erlangen –
Nürnberg

Die Promotionsverteidigung fand am 03.03.2010 statt.

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1.EINLEITUNG</u>	<u>Seite 06 - 19</u>
<u>1.1. Geschlechterunterschiede in der kardiovaskulären Pharmakotherapie</u>	<u>Seite 06 - 08</u>
1.1.1. Bekannte Geschlechterunterschiede in der kardiovaskulären Pharmakotherapie	Seite 06–07
1.1.2. Spezielle Daten zum Geschlechterunterschied bei Schleifendiuretika	Seite 07-08
<u>1.2. Das Schleifendiuretikum Torasemid</u>	<u>Seite 9 - 11</u>
1.2.1. Klinischer Stellenwert von Diuretika	Seite 9
1.2.2. Stellenwert von Torasemid in der Therapie der arteriellen Hypertonie und chronischen Herzinsuffizienz	Seite 9-10
1.2.3. Pharmakokinetik von Torasemid	Seite 10-11
<u>1.3. Metabolisation von Torasemid über Cytochrom P450 2C9</u>	<u>Seite 11-15</u>
1.3.1. Cytochrom P450 – Enzymsystem	Seite 11-12
1.3.2. Isoenzym CYP2C9	Seite 12-13
1.3.3. CYP2C9 – Polymorphismus	Seite 13-15
<u>1.4. Organisches Anionen–Transport–Polypeptid (OATP)</u>	<u>Seite 16-18</u>
1.4.1. Allgemein	Seite 16-17
1.4.2. OATP-Polymorphismus	Seite 18
1.4.3. OAT4	Seite 18
<u>1.5. Zusammenfassende Fragestellung</u>	<u>Seite 19</u>
<u>2. METHODIK</u>	<u>Seite 20 -26</u>
<u>2.1 .Allgemeiner Studienaufbau</u>	<u>Seite 20 -22</u>
2.1.1. Studienpopulation	Seite 20-21
2.1.2. Studienplanung	Seite 21-22
<u>2.2. Probengewinnung, -verarbeitung und Dokumentation</u>	<u>Seite 22 -24</u>

<u>2.3 Analytik</u>	<u>Seite 24-25</u>
2.3.1. Substratquantifizierung	Seite 24
2.3.2. Pharmakokinetische Analyse	Seite 24-25
2.3.3. Genotypisierung	Seite 25
<u>2.4. Statistik</u>	<u>Seite 25-26</u>
<u>3. ERGEBNISSE</u>	<u>Seite 27-37</u>
<u>3.1. Parameter der Studienpopulation</u>	<u>Seite 27 -28</u>
<u>3.2. Torasemid</u>	<u>Seite 29 -37</u>
3.2.1. Pharmakokinetische Basisparameter	Seite 29-31
3.2.2. Pharmakokinetische Basisparameter von Torasemid in Abhängigkeit von SNPs	Seite 31-36
3.2.3. Abhängigkeit von der Komedikation	Seite 36-37
3.2.4. AUC ₀₋₂₄ in Abhängigkeit vom Geschlecht in den einzelnen Altersgruppen	Seite 38
<u>4. DISKUSSION</u>	<u>Seite 39 -44</u>
<u>4.1. Einleitung</u>	<u>Seite 39</u>
<u>4.2. Torasemid –Basiswerte</u>	<u>Seite 40 -44</u>
4.2.1. Plasmakonzentration, HWZ, Clearance	Seite 40
4.2.2. AUC _{0-24h} vs. Geschlecht	Seite 41
4.2.3. AUC _{0-24h} vs. CYP2C9–, OATP1B1–und OAT4-Genotyp	Seite 41-43
4.2.4. Altersabhängigkeit	Seite 44
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>Seite 45 -46</u>
<u>6. ANLAGEN</u>	<u>Seite 47 -55</u>
<u>7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>Seite 56-58</u>
<u>8. ABBILDUNGS–UND TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>Seite 59</u>
<u>9. LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>Seite 60-64</u>
<u>10. LEBENSLAUF</u>	<u>Seite 65-66</u>
<u>11. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u>	<u>Seite 67</u>
<u>12. DANKSAGUNG</u>	<u>Seite 68</u>

1. EINLEITUNG

1.1. GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER KARDIOVASKULÄREN PHARMAKOTHERAPIE

Torasemid ist eines der am häufigsten verschriebenen Diuretika in Deutschland (Arzneiverordnungsreport 2007). Es wird zur Behandlung von akutem und chronischem Herzversagen und bei arterieller Hypertonie eingesetzt. Ziel dieser Studie soll sein, einen möglichen Geschlechterunterschied in der Pharmakokinetik von Torasemid zu überprüfen, ggf. statistisch zu belegen.

1.1.1. Bekannte Geschlechterunterschiede in der kardiovaskulären Pharmakotherapie

Mittlerweile liegen zahlreiche Untersuchungen im kardiovaskulären Bereich vor, die geschlechtsspezifische Unterschiede in der medikamentösen Therapie aufweisen. Ein erstes wichtiges Beispiel ist die retrospektive geschlechtsspezifische Analyse der Digoxin- (DIG)-Studie an Patienten mit Herzinsuffizienz. Diese Studie ergab, dass die Mortalität bei Frauen unter Digoxintherapie höher ist als bei Frauen unter Placebo, während bei Männern die Sterblichkeit unter Digoxin im Vergleich zu Placebo leicht abnimmt (*Rathore et al. 2002*).

Ein zweites Beispiel betrifft die Verabreichung von Acetylsalicylsäure (ASS) zur kardiovaskulären Primärprävention. Kontrollierte Studien haben in der Vergangenheit die Wirksamkeit niedrig dosierter ASS zur Primärprävention des Myokardinfarkts bei Männern ohne kardiovaskuläre Erkrankungen belegt, während das Schlaganfallrisiko praktisch nicht beeinflusst wurde. In der Women's Health Study wurde dieser Frage an nahezu 40 000 Frauen nachgegangen. Hier zeigte sich überraschenderweise ein ganz anderes Bild: eine niedrigdosierte ASS-Gabe schützt Frauen ab dem 45. Lebensjahr ohne kardiovaskuläre Vorerkrankungen nicht vor Myokardinfarkten (*Ridker et al. 2005*). Auch eine definierte ASS-Konzentration zeigt bei Frauen einen geringeren Effekt auf die Thrombozytenaggregation als bei Männern (*Spranger et al. 1989*).

Geschlechtsspezifische Unterschiede sind auch für Cytochrom-P450-Enzyme nachgewiesen. Der Betablocker Metoprolol wird überwiegend über CYP2D6 abgebaut;

nach einer standardisierten Tagesdosis von 100 mg weisen Frauen etwa 40% höhere maximale Plasmakonzentrationen und etwa doppelt so hohe AUC-Werte der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve wie Männer auf (*Luzier et al. 1999*).

Es wurde auch gezeigt, dass bei Frauen unerwünschte, teilweise schwerwiegende Arzneimittelwirkungen häufiger als bei Männern auftreten (*Wuttke et al. 2002*). In dieser Studie waren so genannte Poor Metaboliser im Vergleich zur Normalbevölkerung überproportional vertreten.

1.1.2. Spezielle Daten zum Geschlechterunterschied bei Schleifendiuretika

Aus tierexperimentellen Daten sind bereits folgende Einzelheiten zum Geschlechterunterschied der Diuretikawirkung, insbesondere zu Furosemid, bekannt. So zeigt eine Arbeit bei Ratten, dass die diuretischen, natriuretischen und kaliuretischen Effekte von Furosemid bei weiblichen Ratten signifikant stärker ausgeprägt sind als bei männlichen Tieren (*Brandoni et al. 2004*). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei weiblichen Sprague-Dawley Ratten die Thiazid-Rezeptorendichte doppelt so hoch wie bei männlichen Tieren ist (*Chen et al. 1994*).

Vergleichbare klinische Daten für Torasemid liegen derzeit nicht vor. Lediglich im Rahmen einer tierexperimentellen Studie von *Kling et al. 1991* wurde eine ähnliche Tendenz beschrieben. Dabei zeigten sich Daten, die auf eine gesteigerte lumino-tubuläre Reabsorption von Torasemid bei gleicher tubulärer Sekretion von weiblichen im Vergleich zu männlichen Ratten hingewiesen haben. Für die Entfaltung der vollen Wirkung benötigen die weiblichen Ratten im Mittel lediglich 0,42 mg/kg entgegen 1,87 mg/kg bei den Männchen.

Tatsache ist, dass Frauen häufiger an unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen leiden als Männer (*Martin et al. 1988, Rademaker 2001, Thürmann 1998&2007, Zopf et al. 2008*). Unter der Therapie mit Indapamid weisen weibliche Patienten häufiger die Nebenwirkungen wie Hyponatriämie und Hypokaliämie auf (*Charman et al. 2002*). In der Datenbank der deutschen Pharmakovigilanzzentren war bei der geschlechtsspezifischen Auswertung auffällig, dass besonders Diuretika übermäßig zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei Frauen führen (*Thürmann et al. 2007*).

Gesamtbevölkerung 2005
(Kreise HRO, DBR, OVP, HGW, Jena, Weimar, Weimar-Land und SHK)

Gesamtanzahl aller Patienten mit
I3/I4-UAW durch Diuretika (C03*)
(2000- Juni 2006)

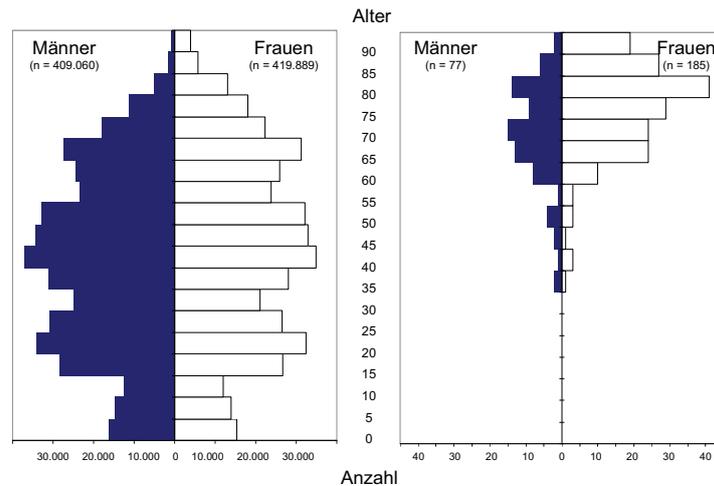


Abbildung 1: Anzahl der Patienten, die 2000 – 2006 in den 4 deutschen Pharmakovigilanzzentren wahrscheinlich oder sehr wahrscheinlich auf Grund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen unterschiedlicher Diuretika hospitalisiert wurden im Vergleich zur Gesamtbevölkerung in den betreffenden Kreisen (Thürmann et al. 2007)

Leider fehlen flächendeckende Angaben zur geschlechtsspezifischen Verordnungshäufigkeit von Diuretika. Laut Arzneimittelverordnungsreport 2005 erhielten Frauen mehr Diuretika verordnet als Männer, wenngleich hier keine quantitativen Angaben gemacht wurden (*Schwabe und Paffrath 2005*). Im GEK-Report 2006 (umfasst 1,55 Millionen Versicherte in Deutschland) wird pauschal von einer Verordnungshäufigkeit von High-Ceiling-Diuretika bei Männern zu Frauen von 1,57: 1, von Low-Ceiling-Diuretika von 1,3: 1 berichtet (GEK-Report 2006). Diese vorhandenen Verordnungsdaten können aber die höhere Nebenwirkungsrate der Diuretika bei Frauen nicht erklären.

Als Zufallsbefund einer pharmakokinetischen Interaktionstudie zwischen Torasemid und AT1-Blockern Irbesartan und Losartan auf der Ebene des Cytochroms CYP2C9 fanden sich signifikant höhere Plasmakonzentrationen von Torasemid bei Frauen. Die AUC₀₋₂₄ war bei Frauen im Mittel um 52% erhöht (nach Gewichtskorrektur um 71%). (*Werner et al. 2008*), allerdings war die Zahl der eingeschlossenen Frauen (n=7) sehr klein; ihre Torasemid-Plasmakonzentrationen sehr variabel.

1.2. DAS SCHLEIFENDIURETIKUM TORASEMID

1.2.1. Klinischer Stellenwert von Diuretika

Zwei Indikationen für den Einsatz von Diuretika sind die arterielle Hypertonie und die chronische Herzinsuffizienz. Hierbei spielt vor allem die Beeinflussung diverser zellulärer Transportmechanismen von Elektrolyten in der Niere - insbesondere der Natriumrückresorption - eine wichtige Rolle. So wird über den Gesamtnatriumbestand des Körpers, welcher als wichtigster osmotisch wirksamer Parameter das intravasale Flüssigkeitsvolumen reguliert, der Blutdruck über Verschiebungen von Flüssigkeiten von intra - nach extrazellulär und umgekehrt wesentlich beeinflusst. Je nach Angriffsort der Diuretika am Nephron hinsichtlich der Natriumresorption unterscheidet man verschiedenste Klassen. Die Gruppe der Schleifendiuretika ist gekennzeichnet durch eine kompetitive Blockade des Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporters.

Diuretika sind als first-line Medikamente fest in den Leitlinien zur Therapie der arteriellen Hypertonie verankert. In zahlreichen Langzeit-Studien hat sich ein deutlicher Benefit in Bezug auf die Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität gezeigt. Da viele der Patienten, insbesondere ältere weibliche Patienten, mit einer essentiellen Hypertonie an einem "kochsalzsensitiven" Blutdruck leiden, kommt der Salurese eine immens wichtige Rolle zu (*Fortuno 1999; Luft 1993; ESC Guidelines Treatment of Hypertension 2003*). Auf der anderen Seite sind die älteren Frauen hinsichtlich der Exsikkose gefährdeter als die älteren Männer (*Haveman-Nies et al. 1997*). Diesbezüglich sind Erkenntnisse über Geschlechterunterschiede in der Pharmakokinetik der Diuretikatherapie besonders wichtig, um mögliche Nebenwirkungen vermeiden zu können.

1.2.2. Stellenwert von Torasemid in der Therapie der arteriellen Hypertonie und der chronischen Herzinsuffizienz

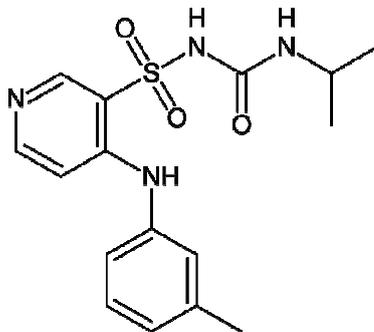
Maßgeblich verantwortlich für die Bedeutung von Torasemid in den aktuellen Therapiestandards sind die Ergebnisse der TORIC-Studie. Im direkten Vergleich mit Furosemid bezogen auf Sicherheit, Toleranz, Hospitalisationsrate sowie Mortalität konnte eine Überlegenheit von Torasemid verzeichnet werden.

So wurde eine Reduktion der Gesamtmortalität um 51,5%, der kardialen Mortalität um 59,7% und in Hinblick auf den Endpunkt plötzlicher Herztod sogar eine Reduktion um 65,8% verzeichnet. Hierfür wurden vor allem die deutlich verminderten Kaliumverluste gegenüber Furosemid diskutiert. Damit kommt es zu einer Verringerung des Risikos einer durch abnorm erniedrigte Serumkaliumwerte getriggerten malignen Herzrhythmusstörung (Cosin et al. 2002).

Murray et al. zeigten ebenfalls eine Überlegenheit von Torasemid gegenüber Furosemid bei der stationären Wiederaufnahmerate von Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz. Primär wird hier eine konstantere Bioverfügbarkeit und eine bessere Compliance z.B. aufgrund einer weniger überschießenden Diurese diskutiert (Murray et al. 2001).

Die antialdosteronogene Wirkung von Torasemid sowie die Unterdrückung der myokardialen Fibrosierung im Tierexperiment sind weitere Gesichtspunkte für die Therapie der Herzinsuffizienz mit Torasemid (Veeraveedu et al. 2008).

1.2.3. Pharmakokinetik von Torasemid



Torasemid

Torasemid gehört zur Gruppe der Pyrid-Sulfonyl-Harnstoff-Abkömmlinge. Es ist gut oral resorbierbar. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 80%. Bei einem Verteilungsvolumen von 0,2 l/kg besteht eine hohe Proteinbindung (>99%). Der maximale Serumspiegel wird nach 1-2 Stunden erreicht. Der first-pass Effekt, dem Torasemid unterliegt, beträgt 10-20%. Es unterliegt einem ausgeprägten hepatischen Metabolismus. Dabei entstehen Cytochrom P450 2C9 abhängig 3 Metabolite mit unterschiedlichen Eigenschaften.

Die Metabolite M1 und M5 werden durch eine stufenweise Oxidation der Methylgruppe am Phenylring erzeugt. Der Metabolit M3 entsteht durch Ringhydroxylierung. Dabei geht die diuretische Wirkung im Wesentlichen von Torasemid selbst und dem Metaboliten M3 aus. M1 weist nur eine sehr geringe Aktivität auf, M5 ist diuretisch unwirksam.

Torasemid unterliegt einer dosislinearen Kinetik. Die terminale Halbwertszeit beträgt 3 – 4 Stunden. Die Elimination erfolgt zu 24% unverändert über die Niere und zu 57% in Form von Metaboliten, die teilweise diuretisch wirksam sind. Den größten Anteil an der renalen Ausscheidung hat M5 mit immerhin 41% (M1 12%, M3 3%). Die totale Clearance beträgt 40 ml/min (renal ca. 10 ml/min).

Bei einer vorliegenden Niereninsuffizienz sind die totale Clearance und die Eliminationshalbwertszeit unverändert. Allerdings verlängert sich die Halbwertszeit von M3 und M5, wobei die eigentliche Wirksamkeit und Wirkdauer unbeeinflusst bleiben. Eine Leberfunktionsstörung beeinflusst die Halbwertszeit nur geringfügig. Eine Kumulation ist nicht zu erwarten. Ebenso konnte keine Abhängigkeit der Resorption von der Nahrungsaufnahme beobachtet werden (*Knauf, Mutschler 1998; Fachinformation des Herstellers; Risler et al. 1994, Miners et al. 1995, Miners et al. 2000*).

1.3. METABOLISATION VON TORASEMID ÜBER CYTOCHROM P450 2C9

1.3.1. Cytochrom P450 – Enzymsystem

Bei der Supergenfamilie des Cytochrom P450-Enzymsystems handelt es sich um eine Gruppe von intrazellulären, membrangebundenen Hämproteinen. Diese funktionieren als terminale bzw. mischfunktionelle Oxidasen, welche eine herausragende Bedeutung im menschlichen Körper für den Metabolismus von Fremdstoffen haben. Sie sind verantwortlich für die Metabolisierung von ca. 50% aller Medikamente.

Beim Menschen allein sind derzeit 35 verschiedene Cytochrom P450-Gene bekannt. Bei allen Spezies zusammengenommen wurden bisher 481 Gene und 22 Pseudogene gezählt. Die Klassifizierung erfolgt dabei nach Homologie innerhalb der ca. 500 Aminosäuren umfassenden Sequenz. Arabische Nummern kodieren Sequenzen mit

einer Identität von mehr als 40% als zu einer Familie zugehörig. Bei über 55% Übereinstimmung erfolgt die Zuteilung der Cytochrom-Gene zu einer Subfamilie per lateinischen Buchstaben. Beim Menschen sind mittlerweile 17 Familien und 42 Subfamilien bekannt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Metabolisierung von Medikamenten und anderen natürlichen exogenen oder synthetischen Substanzen über die Familien 1 – 3 gewährleistet wird. Alle übrigen Familien sind größtenteils für die Metabolisierung endogener Substanzen (wie zum Beispiel Hormone) verantwortlich.

1.3.2. Isoenzym CYP2C9

Seit längerer Zeit ist die wichtige Rolle des Isoenzym Cytochrom P450 2C9 in der Medikamentenmetabolisierung bekannt. Zur Subfamilie der CYP 2C gehören 4 bekannte Isoenzyme: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19. Anhand genetischer Analysen wird derzeit das Vorliegen weiterer 3 Untergruppen diskutiert. Die vorhandenen Isoformen teilen sich mehr als 82% ihrer Aminosäuresequenz und trotzdem kommt es hier nur zu einer geringen Überlappung in der Substratspezifität.

CYP2C9 besteht aus einer Sequenz von 490 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von ca. 55,6 kDa. Es wird in der Leber synthetisiert und macht dort ca. 20% des Gesamtgehaltes an Cytochrom P450 aus. Die metabolisierten Substrate weisen als strukturelle Gemeinsamkeit eine Entfernung von 7Å zwischen dem Kohlenstoffatom, das in der Phase-I-Reaktion oxidiert wird, und einem anionischen Bereich auf. Zur Substraterkennung dienen 6 Substraterkennungsstellen (substrate recognition sites = SRS). Die Möglichkeit, ein bestimmtes Substrat zu metabolisieren, ist hier definiert durch einige wenige kurze Sequenzen bzw. einzelne Aminosäuren innerhalb eines SRS (z.B. Ile359Leu – Substitution in SRS5 → Hydroxylierung von Tolbutamid und Phenytoin; Phe114Leu – Substitution in SRS1 → Warfarin-Hydroxylierung). Dabei sind die meisten der Cytochrom P450 2C9 Substrate schwache Säuren mit einem pKa-Wert von 3,8 – 8,1.

Einen Überblick über die häufigsten Substrate gibt Tabelle 1.

Substanzklasse	Vertreter
Nichtsteroidale Antiphlogistika	Diclofenac, Ibuprofen, Meloxicam, Piroxicam, Indometacin, S-Naproxen
Cumarine	S-Warfarin, Phenprocoumon
Antiepileptika	Phenytoin
Antidepressiva	Amitryptilin, Fluoxetin
Orale Antidiabetika / Insulinsensitizer	Tolbutamid, Glipizid, Rosiglitazon
Angiotensin-2-Rezeptorantagonisten	Losartan, Irbesartan
HMG-CoA-Reduktasehemmer	Fluvastatin
Schleifendiuretika	Torasemid

Tabelle 1: Beispiele für Substrate des Cytochrom P450 2C9 (modifiziert nach <http://medicine.iupui.edu>)

1.3.3. CYP2C9 – Polymorphismus

Es konnten verschiedenste Polymorphismen des Cytochrom P450 2C9 identifiziert werden. Jedoch sind lediglich 2 Allelvariationen klinisch interessant, da mit ihnen eine signifikant verringerte Funktion im Vergleich mit dem Wildtyp einhergeht. Hierbei handelt es sich um das Allel *2, bei der eine Aminosäure-Substitution Arg144Cys vorliegt. Aus einer veränderten Interaktion zur CYP-Oxidoreduktase resultiert eine reduzierte maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}). Die zweite Allelvariation (*3) entsteht durch eine Ile359Leu Substitution und hat durch eine veränderte Substratspezifität ein Absinken der V_{max} und ein Anstieg der Michaelis-Menten Konstante (K_m) zur Folge. Eine Übersicht über die klinisch relevanten Allelvariationen gibt die Tabelle 2.

Enzym	Allelvariante	Mutation	Konsequenz	In-vitro Enzymaktivität
CYP2C9.1	CYP2C9 *1	Wildtyp (Arg >144/Ile359)		Normal
CYP2C9.2	CYP2C9 *2	Arg > 144Cys	Reduz. Affinität zur Cytochrom-P450- Oxidoreduktase	Vermindert
CYP2C9.3	CYP2C9 *3	Ile > 359Leu	Veränderte Substratspezifität	Höhere K_m und/oder niedrigere V_{max}

Tabelle 2: Allelvariationen des CYP2C9 und ihre spezifischen Charakteristika (modifiziert nach <http://www.imm.ki.se>)

Das Vorliegen eines hetero – oder homozygoten *3 Genotypes geht bei allen Substraten des CYP2C9 immer mit einer verringerten totalen Clearance einher. Im Vergleich zum Wildtyp beträgt die Enzymaktivität der *3-Allelvariante 10 – 30% (Tabelle 2). Der *2 Genotyp weist diese eingeschränkte Clearance dagegen nicht bei allen Substraten auf (Vormfelde et al. 2004; Kirchheiner et al. 2005).

Beispiele für diese Abhängigkeit der Clearance vom Genotyp zeigt Abbildung 2.

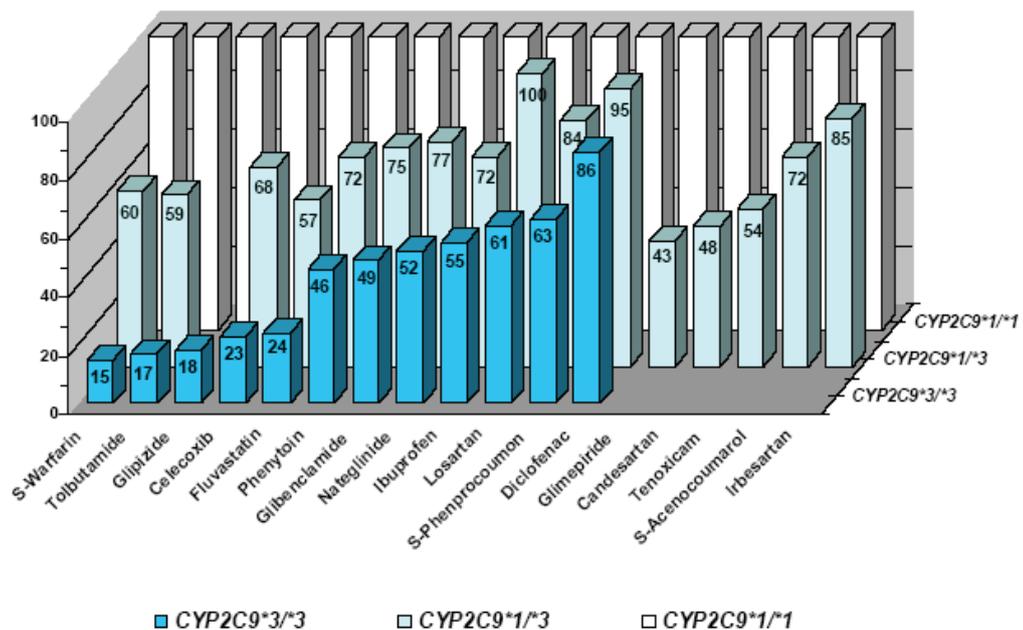


Abbildung 2: Prozentuale Clearancereduktion in Abhängigkeit vom CYP2C9-Genotyp (Kirchheiner et al 2005)

Das Vorkommen der Allelvariationen gestaltet sich innerethnisch unterschiedlich. Innerhalb der kaukasischen Bevölkerungsgruppe belaufen sich die Häufigkeiten wie folgt: *1: 79-86%; *2: 8 – 13%; *3: 3 – 9% (*Kirchheiner et al. 2005*).

Auf Basis des bekannten Cytochrom P450 2C9 - Polymorphismus und den daraus resultierenden Aktivitätsunterschieden der Enzyme entstand die Fragestellung nach einer eventuellen Erhöhung des Torasemid - Plasmaspiegel bei einem gering aktiven CYP2C9-Genotyp. In einer Studie aus dem Jahr 2004 konnten *Vormfelde et al.* tatsächlich eine signifikante Erhöhung der AUC und c_{\max} bei Probanden mit dem CYP2C9 Genotyp *3 nachweisen. Einen Unterschied zwischen *1 und *2 ergab sich hingegen nicht.

2006 zeigte *Vormfelde* auf, dass die orale Clearance von Torasemid linear mit dem Vorliegen von CYP2C9 *3 Allelen assoziiert ist ($*1/*3 > *2/*3 > *3/*3$) (*Vormfelde et al. 2008*).

1.4. ORGANISCHES ANIONEN – TRANSPORT – POLYPEPTID (OATP)

1.4.1. Allgemein

Zunehmend kam es in den letzten Jahren zu Beobachtungen, dass zwischen Medikamenten, die keinen gemeinsamen bekannten Metabolismus (z.B. über das Cytochrom-Enzymsystem) bestritten, trotzdem Interaktionen nachweisbar waren. Vermehrt zeigte sich, dass verschiedenste Arzneimitteltransporter eine Rolle auch bei einigen Interaktionen haben. Der Angriffspunkt ist der für die Elimination einer Substanz wichtige transmembranale Transport z.B. bei der Aufnahme aus dem portalen Blut in die Leberzellen. Die bekannten Transporter für organische und anorganische Substanzen sind unterteilt in zwei große Superfamilien: die ATP Binding Cassette Transportes (ABCs) und die Solute Carrier Family Transporters (SLCs).

Die ABCs sind hauptsächlich für den Export von Arzneimitteln zuständig. Diese transportieren Substanzen aus Zellen unter Energieverbrauch. Sie sind auf das Vorhandensein von ATP angewiesen, aus dem sie die nötige Energie für den Transport von Substanzen aus der Zelle und der Zellmembran durch ATP-Hydrolyse beziehen. Dazu gehören P-gP (ABCB), MPRs (ABCC, BCRP/MXR (ABCG)).

Die SLCs dienen in erster Linie dem Import von Arzneimitteln. SLC-Transporter umfassen passive Transporter sowie ionengekoppelte Symporter und Antiporter, welche entweder in der Zellmembran oder intrazellulär sitzen. Vertreter hierfür sind OATPs (SLC21), OCTs/OATs (SLC22). Die SLC-Superfamilie besteht derzeit aus 47 Familien (SLC1 bis SLC47), die bei Menschen, Ratten und Mäusen identifiziert worden sind.

Die Kinetik der Arzneimittel ist ein Ergebnis von koordinierten Aktivitäten von Influx- und Efflux-Transportern. Die Transporter bestimmen hier die Kinetik in den einzelnen Organen.

Für die Aufnahme von amphipatisch - organischen Stoffen wie Gallensäuren, Steroidhormonen und ihren jeweiligen Konjugaten, sowie Eicosanoiden und Arzneimitteln ist insbesondere die Subfamilie der Organischen Anionen Transportproteine (OATP bzw. SLC21A) zuständig (*Pizzagalli 2003*).

Dabei obliegt der Transport von Arzneistoffen in der Hauptsache den organischen Anionentransportern OAT1 – 3 und den Kationentransportern OCT1 - 3 der SLC – Superfamilie (*Cerrutti et al. 2002; König et al. 2000, 2006*).

Die OATP's findet man dabei vor allem an der sinusoidalen Plasmamembran der Hepatozyten. Sie werden allerdings auch in anderen Geweben exprimiert (Niere, Gehirn und Darm). Sie stellen ein Natrium - abhängiges Transportsystem dar.

Zur besseren Unterscheidung wurde eine Unterteilung dieser heterogenen SLC-Superfamilie in einzelne Untergruppen vorgenommen. So erfolgt eine Gliederung in 6 Familien mit $\geq 40\%$ Aminosäuren Übereinstimmung in der Gensequenz, erkennbar an den arabischen Zahlen 1 – 6. Diese werden wiederum in Subfamilien mit $\geq 60\%$ Sequenzübereinstimmung gruppiert (*Tabelle 3*).

neuer Gen-Name	neuer Protein-Name	altes Gen-Symbol	alter Protein-Name	Vordergr. Substrate	Expr. ort	Genort	Sequence Accession ID
SLCO 1B1	OATP 1B1	SLC 21A6	OATP-C LST-1 OATP2	Biliäre Salze, org. Anionen	Leber	12p12(h)	NM006446

Tabelle 3: Nomenklatur des OATP1B1 (modifiziert nach SLC21/SLCO: The organic anion transporting family; Hagenbuch, Meier 2004)

Einige der Superfamilien weisen dabei eine sehr hohe Substratspezifität auf mit einem engen Spektrum an Transportsubstraten. Hier stehen mehr die spezifischen physiologischen Funktionen in den einzelnen Organen im Vordergrund. Im Gegensatz dazu gibt es OATPs mit einer breiten Substratspezifität. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Bioverfügbarkeit, Aufnahme und Elimination verschiedenster amphipatischer organisch anionischer Stoffe (*Hagenbuch, Meier 2004*).

Insbesondere das OATP1B1 weist ein Leber – spezifisches Vorkommen auf und ist für die Aufnahme vieler verschiedener Substanzen zuständig. Es liegt somit die Vermutung vor, dass es auch für das in dieser Studie untersuchte Torasemid der entscheidende Mediator für die hepatische Elimination ist. (*Tirona et al. 2001, Nozawa et al. 2002*)

1.4.2. OATP-Polymorphismus

Bei den OATP1B1 sind viele verschiedene Einzelnucleotid Polymorphismen (Single NPs) identifiziert worden. Insbesondere die Mutation c.521TC (Val174A1a) ist assoziiert mit einer deutlich herabgesetzten Aktivität des Transporters (in vitro) und damit eventueller Plasmaspiegelkumulation einer transportpflichtigen Substanz vor dem Transporter in vivo (*Hagenbuch, Meier 2004; Niemi 2004*).

Die letzten Literaturdaten zeigen eine deutliche Abhängigkeit der Torasemid-Pharmakokinetik von OATP1B1-Genotyppolymorphismus (*Vormfelde 2008; Werner D et al. 2008*).

Die Abhängigkeit der Torasemidplasmakonzentration vom c.521T>C-Polymorphismus des OATP1B1 weist auch auf eine aktive Transportfunktion dieses Aufnahmetransportes hin. So wiesen Probanden mit dem Genotyp TC eine im Mittel um 38% höhere mittlere Körpergewichts – korrigierte AUC_{0-24h} als die Träger des TT – Genotypes auf (*Werner D et al. 2008*).

1.4.3. OAT4

Der Organische-Anionen-Transporter 4 (OAT4) gehört zur SLC-Superfamilie (Solute Carrier Family Transporters), kommt nur beim Menschen vor und ist in der apikalen (harnseitigen) Membran proximaler Tubuluszellen lokalisiert. Er kann auszuscheidende organische Anionen (p-Aminohippursäure, Diuretika-einschließlich Torasemid, andere Pharmaka) aus der Zelle in den Harn transportieren (Efflux-Modus) und dabei gegen Chlorid austauschen. Die genetischen Variationen dieser Transportproteine kann die renale Clearance von Torasemid beeinflussen. So wiesen Träger von AA-Allelen eine um 35% höhere Clearance im Vergleich zu Trägern von TT-Allelen auf (*Vormfelde et al. 2006, 2008*).

1.5. ZUSAMMENFASSENDE FRAGESTELLUNG

In dieser Studie wird das Schleifendiuretikum Torasemid zur Klärung von möglichen geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Pharmakokinetik untersucht. Bis jetzt sind überwiegend männliche Probanden in die klinischen Torasemid-Studien eingeschlossen worden (Metaanalyse Knauf, Mutschler et al. 1998), sodass eine geschlechtsspezifische Datenauswertung ausblieb. Wie bereits berichtet, existieren deutliche Hinweise zu den Geschlechterunterschieden in der kardiovaskulären Pharmakotherapie.

Die tierexperimentellen Daten für Diuretika beweisen bei Tieren die oben genannte Tendenz. Die Tatsache, dass überwiegend Frauen Nebenwirkungen unter Torasemid aufweisen, erhärtet diese Frage.

Hieraus resultierte die Initiierung der vorliegenden Studie unter folgenden Fragestellungen:

1. Liegt ein Geschlechterunterschied in der Pharmakokinetik von Torasemid vor?

2. Wird dieser mögliche Geschlechterunterschied durch den Genotyp des CYP2C9, des OATP1B1 oder OAT4 beeinflusst?

2. METHODIK

2.1. ALLGEMEINER STUDIENAUFBAU

Die Genehmigung der Studie erfolgte nach Vorlage des Prüfplanes, des Studienprotokolls, der Patientenerklärung einschließlich der Einwilligung und Prüfung durch die Ethikkommission der Ärztekammer Mecklenburg-Vorpommern am 04.05.2007. Es bestanden keine berufsrechtlichen und berufsethischen Vorbehalte. Hinsichtlich der zusätzlich benötigten Blutentnahmen innerhalb des Studienplanes waren alle Patienten über die klinikinterne Haftpflichtversicherung abgesichert.

Die Patientenrekrutierung, Datenerfassung und Probengewinnung erfolgte an der Klinik für Kardiologie der HELIOS Kliniken Schwerin. Die daraufhin notwendige Probenaufbereitung wurde im Institut für Labormedizin selbigen Klinikums durchgeführt. Arzneimittelanalytik und Genotypisierung erfolgte anschließend im Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

Es handelt sich um eine prospektive klinische Studie eines zugelassenen und von den Fachgesellschaften für die Behandlung von arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz empfohlenen Arzneimittels.

2.1.1. Studienpopulation

Einschlusskriterien:

- Stabile Einstellung auf Torasemid in der Standarddosierung 1x 10 mg p.o.
- Stabile Begleitmedikation sowie keine Komedikation mit CYP2C9-Inhibitoren
- freiwillige Teilnahme, Einwilligung
- klinische Stabilität des Patienten (z.B. keine dekompensierte Leber-, Herz- und Niereninsuffizienz)

Ausschlusskriterien:

- Minderjährigkeit

- Schwangerschaft
- fehlende Einwilligungsfähigkeit
- Niereninsuffizienz (anamnestisch bekannte renale Erkrankungen)
- Leberinsuffizienz (anamnestisch bekannte hepatische Erkrankungen; Bilirubin im Normbereich)
- Operationen, Angiographien, Kontrastmittelgaben oder andere invasive Prozeduren am Studientag
- klinische Instabilität des Patienten (dekompensierte Herzinsuffizienz, Sepsis, systemische Entzündungen)

2.1.2. Studienplanung

Eine vorangegangene Studie zur Interaktion von Torasemid mit beiden AT1-Blockern Losartan und Irbesartan zeigte als Nebenbefund eine Geschlechtsabhängigkeit der Pharmakokinetik von Torasemid, allerdings bei niedriger Fallzahl von 7 Frauen (*Werner D et al. 2008*).

Um diesen Befund zu prüfen, schlossen wir nach einer Fallzahlschätzung jetzt 45 Probanden je Geschlecht ein.

Die Patienten mit einer klinischen Indikation zur Torasemid-Therapie wurden in Aufklärungsgesprächen und anhand von Informationsbögen eingehend über Sinn, Ziele und Ablauf der Studie unterrichtet.

Die Aufnahme des Plasmakonzentrations-Zeitverlaufes von Torasemid erfolgte nach morgendlicher Einnahme von 10 mg Torasemid (mindestens 3 Tage als Dauermedikation vorhanden).

Studientag	Studienphase	Ablauf
Tag 0	Rekrutierung	Anamnese Einschluss -/Ausschlusskriterien Aufklärung Einverständniserklärung
Tag 1	Kinetik	Konstante Einnahme 10 mg Torasemid aus klinischer Notwendigkeit Blutentnahme für Pharmakokinetik (8x/24 h) Blutentnahme für Genotypisierung

Tabelle 4: Studienablauf

Zusätzlich erfolgte eine Genotypisierung der Probanden in Bezug auf Cytochrom P450 2C9, OATP1B1 und OAT4 als bekannte Kovariable der Torasemidpharmakokinetik.

Einnahmeordnung

Die Einnahme von Torasemid geschah konstant als Torem[®] 10 (Berlin-Chemie AG; Menarini-Group; Berlin) einmal täglich morgens. Die Medikamenteneinnahme erfolgte unter Aufsicht des Prüfarztes.

2.2. PROBENGEWINNUNG, - VERARBEITUNG UND DOKUMENTATION

Rekrutierung – Tag 0

Die Probanden rekrutierten sich aus dem jeweils aktuellen Patientenpool der Klinik für Kardiologie der HELIOS Kliniken Schwerin.

Nach Überprüfung der Einschluss-relevanten Parameter (Torasemid-Dauermedikation, stabile Begleitmedikation, Creatinin, Bilirubin) erfolgte die Aufklärung des Patienten über Studienhintergrund, Zielsetzung, Durchführung, zeitlichen und formellen Ablauf, zusätzliche Belastungen außerhalb der üblichen Stationsroutine, mögliche Risiken und Begleiterscheinungen schriftlich und mündlich. Jeder Teilnehmer hinterlegte eine schriftliche Einverständniserklärung.

Ebenso wurde auf die absolute Freiwilligkeit und damit verbunden auch jederzeit bestehende Möglichkeit der Revision seines Einverständnisses hingewiesen (*Patientenaufklärung siehe Anhang*).

Nachfolgend wurden die folgenden studienrelevanten Parameter erhoben und protokolliert:

- Name, Geburtsdatum
- Größe, Gewicht, Geschlecht
- Haupt- und Nebendiagnosen
- Begleitmedikation (Dauer- und Bedarfsmedikation)
- Creatinin
- Bilirubinwert.

Zum Zweck der Anonymisierung und eindeutigen Zuordenbarkeit der Proben erfolgte die Vergabe eines standardisierten 10-stelligen Codes.

Pharmakokinetik

Die Erhebung der pharmakokinetischen Daten erstreckte sich über 24 Stunden. Dabei wurden über diesen Zeitraum zu 8 standardisierten Zeitpunkten jeweils 7,5 ml EDTA-Blut entnommen.

Zu diesem Zweck wurde dem Probanden am Entnahmetag eine Flexüle in eine periphere Vene eingelegt.

Zum Zeitpunkt 0 / Tag 1 erfolgte die erstmalige Entnahme. Gleichzeitig wurde eine zusätzliche Probe 7,5ml EDTA-Blut zur Genotypisierung des Cytochrom P450 2C9 und des OATP1B1 entnommen. Anschließend nahm der Patient sofort unter Aufsicht des durchführenden Arztes seine Standardmedikation einschließlich 10 mg Torasemid ein.

Die weiteren Blutentnahmen wurden ab dem Zeitpunkt der Einnahme nach 0,5, 1, 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden durchgeführt. Diese letzte Blutentnahme fand wiederum vor der erneuten morgendlichen Medikamentengabe statt. Die weiteren (patientenspezifischen) Medikamenteneinnahmen erfolgten im normalen stationären Tagesverlauf.

Der Entnahmezeitpunkt wurde zusammen mit der Patienten-ID-Nummer auf jeder Monovette vermerkt. Ebenso erfolgte die Protokollierung des Entnahmezeitpunktes, etwaiger Besonderheiten bei der Abnahme oder unerwünschter Ereignisse im Studienprotokoll (*Studienprotokoll siehe Anhang*).

Probenverarbeitung

Zur Genotypisierung wurde jeweils eine Monovette Vollblut verwendet. Die gewonnenen Proben wurden zentrifugiert. Das erhaltene Plasma wurde pipettiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert. Es erfolgte der Versand auf Trockeneis zur weiteren Analyse in das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.

2.3. ANALYTIK

2.3.1. Substratquantifizierung

Für die Messung der Plasmakonzentrationen von Torasemid wurden am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg zwei LC/MS-Analysen entwickelt, deren Güte entsprechend der Methodik von *Shah et al.* validiert wurde. Die wesentlichen Parameter der verschiedenen analytischen Methoden sind im Anhang dargestellt.

2.3.2. Pharmakokinetische Analyse

Die Plasmakonzentrations-Zeitkurven wurden über ein Non-Kompartiment-Modell mittels Win Nonlin Version 3.3 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) ermittelt. Die maximale Plasmakonzentration (c_{\max}) und der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (t_{\max}) wurden direkt aus den beobachteten Daten übernommen. Die Eliminations-Halbwertszeit ($t_{1/2}$) berechnet sich aus $\ln 2 / \lambda_z$ ($\lambda_z =$ Eliminationsgeschwindigkeitskonstante).

Die Fläche unter der Kurve (Area under curve, AUC_{0-24h}) über eine Zeitdauer von 24 Stunden wurde unter Nutzung der linearen Trapezregel kalkuliert. Die orale Clearance errechnet sich als $Dosis / AUC_{0-24h}$.

2.3.3. Genotypisierung

Die notwendige DNA-Menge wurde aus 200 μ l peripherem venösen Blut extrahiert. Die Antikoagulation erfolgte per Ethylendiamintetraessig-Säure (Flexigene Kit – QUIAGEN, Hilden; Deutschland). Die Genotypisierung wurde über vorgefertigte TaqMan Tests (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Methodik wurde von *Egger et al. 2005* beschrieben. Die Vermehrung des genetischen Materials erfolgte in 5 μ l (Volumen), welches 1 μ l DNA-Lösung (5ng/ μ l), 0,1 μ l jedes Primers (100pmol/ μ l), 0,1 μ l jeder Probe (100pmol/ μ l) und 2,5 μ l des PCR Master Mix (Absolute PCR Master Mix, Abgene, Hamburg, Germany) enthält unter Nutzung des ABI Prism Sequenz Detektors 7900 (Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany).

Die Bearbeitung von Parametern erfolgte folgendermaßen: 95°C für 10 min und da 40 Zyklen mit 95 °C für 15 s und 60°C für 1 min. Nach der PCR Fluoreszenz ergaben sich zwei unterschiedliche Farben. Es wurde die SDS 2.1 Software (Applied Biosystems) für Grafiken und automatische Genotypisierung auf der Basis der Zwei-Parameter-Grafik mit Fluoreszenzintensivität von FAM und VIC verwendet.

2.4. STATISTIK

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung im Text und in den Tabellen und als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) in den Figuren angegeben. Auf Grundlage einer vorangegangenen Studie mit 24 Patienten, die eine 1,52-fache höhere dosis- und gewichtskorrigierte AUC für Frauen zeigte, erfolgte im Vorfeld eine Fallzahlkalkulation. Bei einer Fallzahl von 45 Frauen und 45 Männern liegt bei einer statistischen Power von 99% bzw. 98% der Typ-1-Fehler bei 0,05 bzw. 0,01. Inwieweit die Variabilität der Pharmakokinetik von Torasemid durch das Geschlecht, den Polymorphismus von CYP2C9, OATP1B1 und OAT4 bestimmt wurde, ist per faktorieller Varianzanalyse überprüft worden.

Der statistische Vergleich der pharmakokinetischen Variablen zwischen Mutationsträgern (hetero-/homozygot) und Nichtträgern dieser Single Nukleotid Polymorphismen und Frauen vs. Männer erfolgte durch den Mann-Whitney U oder Kruskal – Wallis Test. Das Signifikanzniveau ist auf $< 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

3.1. PARAMETER DER STUDIENPOPULATION

Im Studienverlauf wurden insgesamt 90 Patienten eingeschlossen, welche initial alle Einschlusskriterien erfüllten. Unter den 90 Probanden waren 45 Frauen und 45 Männer. Die Indikationen zur Torasemidbehandlung waren eine medikamentöse Therapie der arteriellen Hypertonie und der chronischen myokardialen Insuffizienz NYHA II-III, wobei Patienten mit einer manifesten Herzinsuffizienz ausgeschlossen waren.

In unserer Studiengruppe waren die Indikationen zur Torasemidtherapie wie arterielle Hypertonie und chronische Herzinsuffizienz geschlechtsgleich verteilt: wir hatten an herzinsuffizienten Patienten 23 Männer und 22 Frauen; an Hypertonikern 22 Männer und 23 Frauen. Die gleichmäßige Verteilung der Geschlechter in den beiden Indikationsgruppen schließt einen relevanten Einfluss auf unsere Studienergebnisse aus. In keinem der Fälle war in der Komedikation ein CYP2C9-Inhibitor vorhanden. Bei einer Patientin mit Cyclosporin A in der Komedikation, das ein bekannter OATP1B1-Inhibitor ist, fanden sich sehr hohe AUC-Werte. 25 Patienten nahmen ein weiteres CYP2C9 – Substrat ein (10 x Phenprocoumon, 4 x Ibuprofen, 3 x Glimepirid, 3 x Glibenclamid, 1 x Irbesartan, 1 x Celecoxib, 2 x Diclofenac, 1 x Rosiglitazon). Das Durchschnittsalter der Probanden lag dabei insgesamt bei 68,4 Jahren (72,1±8,7 vs. 64,7±9,4; Frauen vs. Männer).

Der Body Mass Index betrug 29,0 ±5,1 vs. 27,4 ±4,5; Frauen vs. Männer.

Die Patientencharakteristik ist in der Tabelle 2 zusammengefasst. Es fanden sich signifikante Unterschiede im Alter, Body Mass Index (BMI) und endogener Kreatinin-Clearance (CL_{cr}), während das Serumkreatinin bei Männern und Frauen ähnlich war.

Die Frequenzen der Polymorphismen von CYP2C9 c.230T, CYP2C9 c.1075A, SLCO1B1 c.388G, SLCO1B1 c.521C und SLC22A11g. – 20166T wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern auf.

Parameter	Geschlecht		p
	Weiblich (n=45)	Männlich (n=45)	
Diagnose (art. Hypertonie/Herzinsuffizienz)	23/22	22/23	
Anzahl der Medikamente	8,0 ± 2,2	8,5 ± 2,3	0,034^a
Alter (Jahre)	72,1 ± 8,7	64,7 ± 9,4	<0,001^a
BMI (kg/m ²)	29,0 ± 5,1	27,4 ± 4,5	0,039^a
Kreatinin (µmol/l)	75,3 ± 33,6	83,2 ± 36,4	0,321 ^a
CL _{CR} (MDRD, ml/min/1.72 m ²)	83,9 ± 47,2	95,0 ± 34,9	0,035^a
<i>CYP2C9</i> c.430T Allel Frequenz	0,133	0,144	0,829 ^b
<i>CYP2C9</i> c.1075A Allel Frequenz	0,078	0,056	0,550 ^b
<i>SLCO1B1</i> c.388G Allel Frequenz	0,378	0,356	0,757 ^b
<i>SLCO1B1</i> c.521C Allel Frequenz	0,200	0,156	0,436 ^b
<i>SLC22A11</i> g.-20166T Allel Frequenz	0,589	0,567	0,975 ^b

Tabelle 5: Patientencharakteristik

3.2. TORASEMID

3.2.1. Pharmakokinetische Basisparameter

Pharmakokinetische Parameter	Männlich (n = 45)	Weiblich (n = 45)	Signifikanz (p value)
AUC _(0-24h) /D (µg*h/l/mg)	381,7 ± 142,5	569,7 ± 283,4	<0,001
Body mass corrected AUC _(0-24h) /D (kg*h/l)	30,9 ± 10,3	42,1 ± 20,4	<0,001
C _{max} /D (µg/l/mg)	97,5 ± 40,7	129,6 ± 57,0	0,009
t _{max} (h)	1,0 (0,5 – 4,0)	1 (0,5 – 4,0)	0,373
t _{1/2} (h)	3,6 ± 1,0	4,3 ± 1,2	0,003
Cl _{oral} (l/h)	3,0 ± 1,1	2,1 ± 0,8	<0,001

Tabelle 6: Pharmakokinetische Basisparameter von Torasemid (10mg oral) in Abhängigkeit vom Geschlecht

Als ein Parameter der Torasemid-Pharmakokinetik wurde die Area under concentration time curve (AUC/_{Torasemid}0-24h in µg*h/l/mg) ermittelt. Diese wurde gewichts- und dosiskorrigiert (kg*h/l). Weiterhin erfolgte eine Analyse des Konzentrationsmaximum (C_{max}/D in µg/l/mg), des Zeitpunktes der maximalen Plasmakonzentration (t_{max} in h), der Eliminationshalbwertzeit in Stunden (t_{1/2} in h) und letztlich der oralen Clearance (Cl_{oral} in l/h).

Bei den weiblichen Probanden war AUC/D im Mittel höher als bei den männlichen Probanden (569,7 ± 283,4 vs. 381,7 ± 142,5 µg*h/l/mg). Dieser signifikante Unterschied (p > 0,001) blieb nach der Gewichtskorrektur erhalten (42,1 ± 20,4 vs. 30,9 ± 10,3 kg*h/l; p < 0,001). Im Mittel war die gewichtskorrigierte AUC_{0-24h}/D bei weiblichen Probanden um das 1,52-fache höher als bei den Männern (Tabelle 6).

Ebenfalls konnte bei Frauen ein signifikanter Anstieg der maximalen Plasmakonzentration/Dosis (129,6 ± 57,0 vs. 97,5 ± 40,7µg/l/mg; p < 0,001) und der Eliminationshalbwertzeit (4,3 ± 1,2 vs. 3,6 ± 1,0; p = 0,003) verzeichnet werden. Die orale Clearance, dagegen, war bei weiblichen vs. männlichen Probanden signifikant erniedrigt (2,1 ± 0,8 vs. 3,0 ± 1,1 l/h).

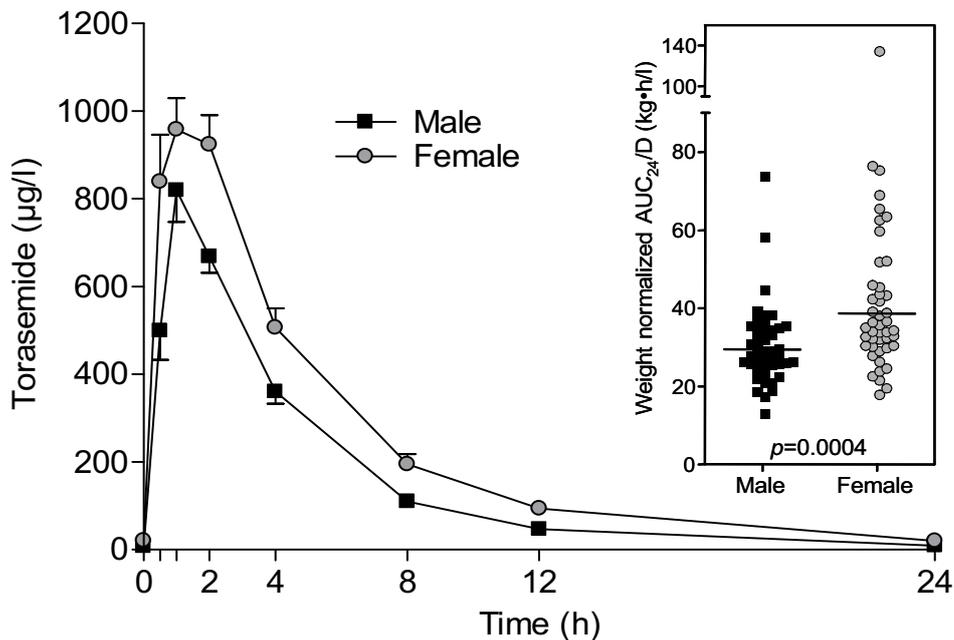


Abbildung 3: Mittlere Plasmakonzentration von 10 mg Torasemid (\pm Standardabweichung) über 24 Std. bei Patienten mit stabiler Dauermedikation in Abhängigkeit vom Geschlecht

In unserer Studienpopulation beobachteten wir eine sehr hohe individuelle Variabilität in der Torasemidpharmakokinetik. So schwanken die körperlernormalisierte AUC_{24/D} und C_{max} um das 14,5 fache (Abb. 3 coefficient of variation (CV) – 51,1%) und 10,3 fache (CV - 45,7%). Die Torasemidkonzentrationen im Plasma waren im Mittel bei Frauen höher als bei Männern. Abgesehen von t_{max}, ließen sich in allen pharmakokinetischen Parametern die Geschlechtsunterschiede nachweisen. Dies bedeutete im Mittel etwa 30-40% höhere AUC₂₄ und C_{max} bei Frauen; die mittlere orale Torasemidclearance (CL_{oral}) war um 33% reduziert bei weiblichen Probanden im Vergleich zu männlichen Probanden.

3.2.2. Pharmakokinetische Basisparameter von Torasemid in Abhängigkeit von SNPs

Die Variabilität von SNPs (single nucleotide polymorphism) in CYP2C9 (c.230> und c.1075A>C), SLCO1B1 (c.388A>G und c.521T>C) und SLC22A11 (g.-20166A>T) Genen ist eine Ursache für die großen individuellen Unterschiede in der totalen oralen Clearance (Rademaker 2001). Von den in der Studie untersuchten genetischen Faktoren hatte nur der SLCO1B1 c.521T>C SNP einen signifikanten Effekt auf die Torasemidpharmakokinetik, wie es die nachfolgenden Tabellen zeigen.

CYP2C9-Genotyp-Abhängigkeit

Phenotyp	*1 / *1	*1 / *2	*1 / *3
CYP2C9			
AUC_{0-24h} kg*h/l	30,27 ± 10,27	30,21 ± 12,26	35,24 ± 3,17
(Männer)	(n=28)	(n=12)	(n=5)
AUC_{0-24h} kg*h/l	39,42 ± 15,57	47,02 ± 31,20	42,99 ± 14,33
(Frauen)	(n=26)	(n=12)	(n=7)

Tabelle 7: gewichtskorrigierte AUC₀₋₂₄ in Abhängigkeit der CYP2C9-Genotypen (Gesamtstudienpopulation)

Die Verteilung der Genotypen intersexuell stellt sich wie in Tab.7 aufgeführt dar. Die Genotypenfrequenz war zwischen den Geschlechtern gleichmäßig verteilt. Eine signifikante Genotyp-Abhängigkeit des AUC-Anstieges ließ sich nicht nachweisen.

OATP1B1 – Genotyp - Abhängigkeit

Phenotyp	TT	TC	CC
521 T>C			
AUC_{0-24h} kg*h/l (Männer)	28,3 ± 6,77 (n=32)	37,4 ± 15,10 (n=12)	32,68 (n=1)
AUC_{0-24h} kg*h/l (Frauen)	39,5 ± 10,13 (n=28)	45,03 ± 15,47 (n=16)	63,13 (n=1)

Tabelle 8: gewichtskorrigierte AUC_{0-24 h} in Abhängigkeit der SLCO1B1 c.521 T>C-Genotypen (Gesamtstudienpopulation)

Abhängig vom Vorhandensein der TT – und TC - Allelvariante des spezifischen hepatischen OATP1B1 – Rezeptors konnte eine signifikante Steigerungsrate der AUC_{0-24h} beobachtet werden. So waren die mittleren AUC-Werte am tiefsten bei männlichen Homozygoten mit SLCO1B1 c.521 Wildtyp-Allelen (gewichtskorrigierte AUC₂₄ 28,3 ± 6,7 kg*h/l) und erhöht mit 63% bei Frauen mit der SLCO1B1 c.521 Allelvariante (45,03 ± 15,47 kg*h/l, p<0,001).

Phenotyp	AA	AG	GG
388A>G			
AUC_{0-24h} kg*h/l (Männer)	33,35 ± 12,7 (n=18)	29,20 ± 8,7 (n=22)	28,73 ± 5,6 (n=5)
AUC_{0-24h} kg*h/l (Frauen)	41,89 ± 27,60 (n=15)	41,55 ± 16,82 (n=26)	45,32 ± 15,19 (n=4)

Tabelle 9: gewichtskorrigierte AUC₀₋₂₄ in Abhängigkeit der SLCO1B1 c.388A>G-Genotypen (Gesamtstudienpopulation)

Innerhalb der Studiengruppe war nahezu eine Gleichverteilung der Genotypen zwischen den beiden Geschlechtern zu beobachten. Ein signifikanter Einfluss von SLCO1B1 c.388A>G –Genotypen auf die AUC-Werte fand sich nicht.

OAT4 – Genotyp - Abhängigkeit

Phenotyp OAT4	TT	AT	AA
AUC _{0-24h} kg*h/l (Männer)	30,78 ± 10,59 (n= 13)	31,40 ± 11,06 (n=23)	29,11 ± 8,23 (n=8)
AUC _{0-24h} kg*h/l (Frauen)	33,92 ± 9,41 (n=16)	48,61 ± 26,88 (n=21)	40,8 ± 10,24 (n=8)

Tabelle 10: gewichtskorrigierte AUC₀₋₂₄ in Abhängigkeit der SLC22A11 g.-20166A>T-Genotypen (Gesamtstudienpopulation)

Die intersexuelle Verteilung der OAT4 - Genotypen innerhalb des vorhandenen Patientenkollektivs stellte sich sehr gleichmäßig dar. Bei einem männlichen Probanden war der OAT4 – Genotyp nicht bestimmbar. Es zeigt sich eine tendenzielle Zunahme der AUC bei Trägern des AT-Allels. Jedoch erreicht dieser Unterschied nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,639$).

Unter anderem wurde eine Regressionsanalyse adjustierend mit folgenden Parametern wie Alter, BMI und CL_r durchgeführt (Tab. 11).

Parameter		B	CI	P
Gewichtsnormalisierte AUC ₂₄ /D (kg·h/l)	Geschlecht	9,4	1,0 – 17,9	0,029
	<i>SLCO1B1</i> c.388A>G	-1,7	-14,1 – 10,6	0,783
	<i>SLCO1B1</i> c.521T>C	8,3	0,5 – 16,1	0,037
	<i>CYP2C9</i> c.430C>T	3,8	-4,6 – 12,1	0,374
	<i>CYP2C9</i> c.1075C>A	4,9	-5,8 – 15,7	0,366
	<i>SLC22A11</i> g.-20166A>T	2,4	-7,6 – 12,3	0,639
	C _{max} /D (µg/l/mg)	Geschlecht	32	7 – 56
<i>SLCO1B1</i> c.388A>G		13	-23 – 49	0,483
<i>SLCO1B1</i> c.521T>C		-8	-30 – 15	0,508
<i>CYP2C9</i> c.430C>T		18	-6 – 45	0,140
<i>CYP2C9</i> c.1075C>A		17	-14 – 48	0,287
<i>SLC22A11</i> g.-20166A>T		27	-2 – 56	0,070
t _{1/2} (h)		Geschlecht	0,4	-0,1 – 1,0
	<i>SLCO1B1</i> c.388A>G	0,6	-0,3 – 1,4	0,187
	<i>SLCO1B1</i> c.521T>C	0,3	-0,2 – 0,8	0,281
	<i>CYP2C9</i> c.430C>T	0,3	-0,2 – 0,9	0,263
	<i>CYP2C9</i> c.1075C>A	0,0	-0,7 – 0,7	0,980
	<i>SLC22A11</i> g.-20166A>T	0,3	-0,3 – 1,0	0,308
	CL _{oral} (l/h)	Geschlecht	-0,8	-1,2 – -0,3
<i>SLCO1B1</i> c.388A>G		0,0	-0,6 – 0,6	0,957
<i>SLCO1B1</i> c.521T>C		-0,6	-1,0 – -0,3	0,002
<i>CYP2C9</i> c.430C>T		0,1	-0,3 – 0,5	0,609
<i>CYP2C9</i> c.1075C>A		-0,4	-0,9 – 0,2	0,211
<i>SLC22A11</i> g.-20166A>T		-0,1	-0,6 – 0,4	0,792

Tabelle 11: Regressionsanalyse der Effekte vom Geschlecht und *SLCO1B1*, *CYP2C9* und *SLC22A11* Polymorphismen auf die pharmakokinetischen Parameter von Torasemid. (B, Regressionskoeffizient; CI, 95% Konfidenzintervall)

In unserer Analyse blieb das Geschlecht eine stark unabhängige Determinante von AUC₂₄/D, C_{max}/D und CL_{oral}. Im Mittel waren die gewichtsnormalisierte AUC₂₄/D 9,4 kg·h/l höher und die CL_{oral} 0,76 l/h niedriger bei weiblichen Patienten vs. männlichen Patienten.

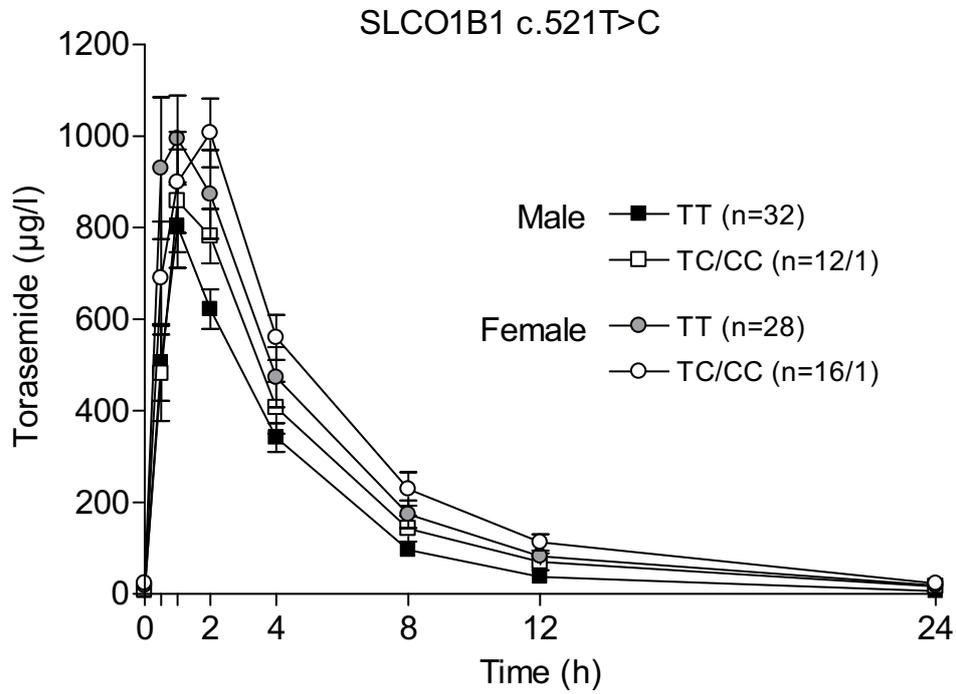
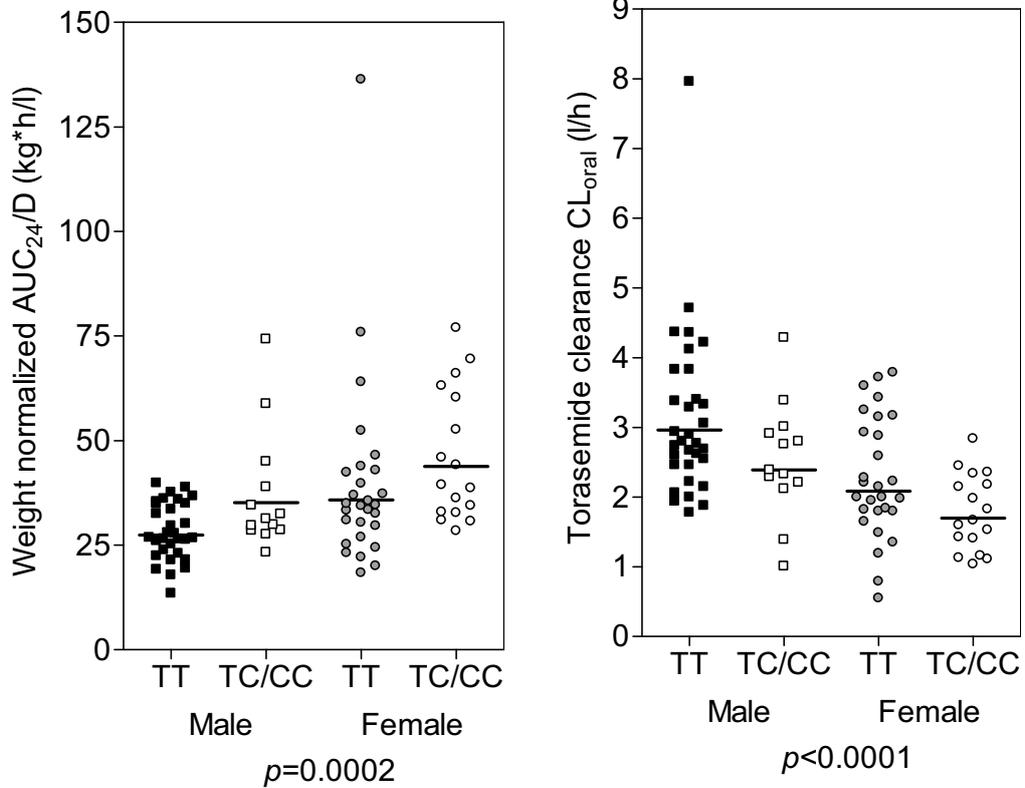
A**B**

Abbildung 4: Einfluss des Geschlechtes und SLCO1B1 c.521>C Genotypes auf die AUC_{24}/D und CL_{oral} von Torasemid

Abbildung 4 zeigt den Einfluss des Geschlechtes und SLCO1B1c.521>C Genotypes auf die Plasmakonzentration-Zeit-Kurve, AUC_{24/D} und CL_{oral} von Torasemid.

Im Mittel war die orale Clearance höher bei männlichen Patienten mit dem SLCO1B1 c.521TT Genotyp ($3,1 \pm 1,2$ l/h), hingegen bei weiblichen Patienten mit den TC oder CC Genotypen um 42% niedriger ($1,8 \pm 0,5$ l/h, $p < 0,0001$). Deswegen waren die mittleren AUC-Werte konsekutiv am tiefsten bei männlichen Homozygoten mit SLCO1B1 c.521 Wildtyp-Allelen (gewichts- und dosiskorrigierte AUC₂₄ $28,3 \pm 6,7$ kg*h/l) und erhöht mit 63% bei Frauen mit SLCO1B1 c.521 Allelvariante ($46,1 \pm 15,6$ kg*h/l, $p < 0,001$).

3.2.3 Abhängigkeit von der Komedikation

In der Tabelle 12 sind die Komedikamente aufgeführt. Es fand sich im Mittel keine signifikante Differenz in der Anzahl der verschriebenen Medikamente zwischen Männern und Frauen (8,5 vs. 8,0).

Medikation	Frauen (n)	Männer (n)
Acetylsalicylsäure	27	36
Allopurinol	7	5
Amlodipin	5	6
Atorvastatin	8	13
Bisoprolol	26	26
Candesartan	8	3
Clopidogrel	11	8
Digitoxin	16	9
Metamizol	5	4
Felodipin	10	19
Levothyroxin	7	0
Metformin	4	4
Metoprolol	2	6
Moxonidin	11	2
Pantoprazol	31	34
Phenprocoumon	8	2
Quinapril	10	6
Ramipril	13	15
Simvastatin	19	27
Sultamicillin	2	11
Verapamil	7	2

Tabelle 12: Frequenz der Begleitmedikation (In der Tabelle sind die Medikamente aufgeführt, die bei mehr als 5 Patienten angeordnet worden sind.)

3.2.4 AUC₀₋₂₄ in Abhängigkeit vom Geschlecht in den einzelnen Altersgruppen

Verfolgt man die gewichtskorrigierten AUC-Werte geschlechtsabhängig in den einzelnen Altersgruppen, ergibt sich ein Geschlechterunterschied – in jeder Altersgruppe weisen Frauen höhere AUC-Werte auf.

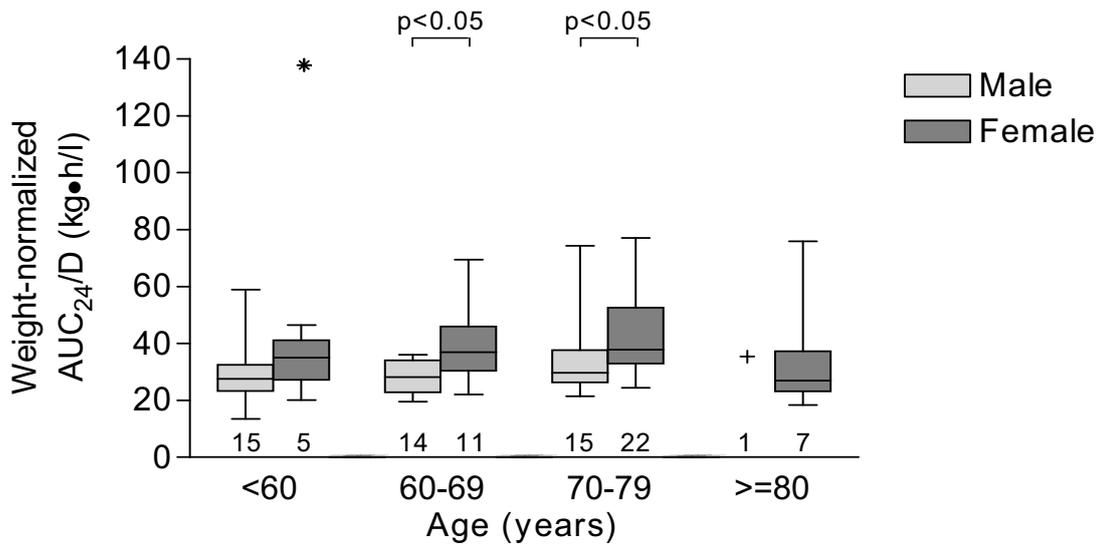


Abbildung 5: AUC₀₋₂₄ von Torasemid geschlechtsabhängig in den einzelnen Altersgruppen

4. DISKUSSION

4.1. EINLEITUNG

Klinische Daten zu geschlechtsspezifischen Unterschieden im Hinblick auf therapeutische oder unerwünschte Wirkungen von Diuretika fehlen weitgehend, obwohl es einige tierexperimentelle Studien hierzu gibt. So haben Cerutti et al. z. B. gezeigt, dass die renale Clearance von Torasemid bei weiblichen Ratten deutlich niedriger ist (Cerutti et al. 2002). Außerdem induzieren Furosemid und Torasemid bei weiblichen Ratten die Diurese, die Natriurese und die Kaliurese effizienter im Vergleich zu männlichen Ratten (Brandoni et al. 2004; Kling et al. 1991).

Eine kürzlich durchgeführte Auswertung von Daten aus den deutschen Pharmakovigilanzzentren weist darauf hin, dass Hospitalisationen häufiger bei Frauen durch Diuretika bedingt sind als bei Männern (Thürmann et al. 2008; Werner U. et al. 2009). Dieses häufigere Auftreten von schwerwiegenden Arzneimittelnebenwirkungen bei Frauen konnte bei allen Diuretika einschließlich Torasemid nachgewiesen werden (29 Berichte von schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei Männern im Vergleich zu 57 bei Frauen). Durch eine Analyse der geschlechtsspezifischen Verordnungshäufigkeit dieser Diuretika konnte diese Tatsache nicht erklärt werden (Werner U. et al. 2009). Ziel dieser Studie war es, prospektiv den Einfluss des Geschlechts auf die Steady-State-Pharmakokinetik von Torasemid zu untersuchen, um eventuell zumindest teilweise das unausgewogene Verhältnis des Auftretens von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zwischen den Geschlechtern erklären zu können.

4.2. TORASEMID – BASISWERTE

4.2.1. Plasmakonzentration, HWZ, Clearance

Die über einen Zyklus von jeweils 24 Stunden erhobenen Basiswerte der Pharmakokinetik von Torasemid beziehen sich auf den Plasmakonzentrations – Zeitverlauf (Area under concentration – time curve), die maximale Plasmakonzentration, die Zeit bis zum Erreichen des Konzentrationsmaximums, die Eliminationshalbwertszeit und die orale Clearance.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den bekannten Daten aus einer von Knauf und Mutschler 1998 veröffentlichten Metaanalyse von 14 Torasemid – Pharmakokinetik – Studien, so bestätigen sich die bekannten pharmakokinetischen Eigenschaften Torasemids, besonders bei männlichen Patienten unserer Studie. Es ist zu erwähnen, dass in die o.g. 14 Studien mit insgesamt 142 Probanden nur insgesamt 8 Frauen eingeschlossen worden sind.

Pharmakokinetische Parameter	Eigene Ergebnisse	Knauf, Mutschler 1998
AUC_{0-24h} (µg*h/l)	zw. 5697±2834(♀) - 3817±1425 (♂)	zw. 3357 ± 859 – 3871 ± 774
c_{max} (µg/l)	zw. 1296±570(♀) – 975 ± 407(♂)	zw. 988 ± 269 – 1507 ± 317
t_{max} (h)	1(0,5-4)(♂) – 1(0,5-4)(♀)	zw. 0.9 ± 0.4 – 1.5 ± 0.6
t_{1/2} (h)	zw. 4,3 ± 1,2(♀) – 3,6±1,0(♂)	zw. 3.2 ± 0.7 – 3.6 ± 1.3

Tabelle 13: Knauf, Mutschler 1998 – entnommene Werte von Studien mit gleicher Torasemid-Dosierung (=Dauermedikation; 10 mg; oral)

4.2.2. AUC_{0-24h} vs. Geschlecht

Die Geschlechterunterschiede der pharmakokinetischen Parameter von Torasemid, die in einer vorangegangenen Interaktionsstudie von Werner et al. 2008 zum ersten Mal beschrieben wurden, ließen sich bestätigen. In einer multiplen Regressionsanalyse (Tabelle 11, Seite 34) erwies sich das Geschlecht als prädiktionierende unabhängige Variable, welche die AUC_{0-24h} von Torasemid signifikant beeinflusst ($p=0,029$). So ergaben sich signifikante Unterschiede in den Werten für die AUC_{0-24h} / D von Frauen und Männern ($381,7 \pm 142,5$ vs. $569,7 \pm 283,4 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{l}/\text{mg}$; Männer vs. Frauen; $p < 0,001$).

Im Mittel zeigte sich eine 49%ige, nach Gewichtskorrektur eine 36 %ige Erhöhung der AUC_{0-24h} bei den Frauen. Ebenfalls als signifikant erhöht erwiesen sich in unserer Studie sowohl die maximale Plasmakonzentration (C_{max}/D) ($97,5 \pm 40,7$ vs. $129,6 \pm 57,0 \mu\text{g}/\text{l}/\text{mg}$; Männer vs. Frauen; $p=0,001$) als auch die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) ($3,6 \pm 1,0$ vs. $4,3 \pm 1,2$; Männer vs. Frauen; $p = 0.003$).

Daraus lässt sich die schlussfolgern, dass bei Frauen eine deutlich höhere Wirkung von Torasemid vorliegen kann, was die höhere Nebenwirkungsrate bei Frauen im deutschen Pharmakovigilanzprojekt miterklären könnte.

Eine Studie zur geschlechtsspezifischen Pharmakodynamik, um diese Daten zu erhärten, wäre hier in der Zukunft sinnvoll.

4.2.3. AUC_{0-24h} vs. $CYP2C9$ -, $OATP1B1$ – und $OAT4$ - Genotyp

- $CYP2C9$

Nach einer Aufschlüsselung nach $CYP2C9$ – Subgruppen hatten wir in unserer Patientenpopulation 54 Probanden mit $CYP2C9*1$ (Wildtyp), 24 – mit $CYP2C9*2$ und 12 – mit $CYP2C9*3$ -Genotyp. In unserer Studie konnte kein signifikanter Einfluss der Aktivität des Cytochrom P450 2C9 auf die pharmakokinetischen Parameter von Torasemid gefunden werden (Seite 31, Abbildung 3).

Um dieses Ergebnis zu erklären, muss darauf hingewiesen werden, dass in die bisherigen Studien über Cytochrom P 450 2C9 nur junge, gesunde Männer ohne Komedikation eingeschlossen worden sind.

In der klinischen Situation spielen folgende Faktoren, wie Geschlecht, fortgeschrittenes Alter, Stadium der Erkrankung, Komorbidität oder Komedikation eine große Rolle. So können diese den Einfluss der genetischen Faktoren reduzieren.

- OAT1B1

OAT1B1 ist ein Aufnahme-Transporter, der vor allem an der sinusoidalen Plasmamembran der Hepatozyten zu finden ist. Dieser ist für die Aufnahme von Arzneistoffen aus dem portalen Blut in die Leberzellen verantwortlich (*König et al. 2006; Seithel et al. 2008*).

Die bereits bekannte Abhängigkeit der Torasemidpharmakokinetik vom Polymorphismus der hepatischen Transportproteine konnte auch durch unsere Studie belegt werden. Ein signifikanter Einfluss vom SLCO1B1 521T>C Genotyp auf die totale orale Torasemidclearance ließ sich in einer klinischen Studie von *Vormfelde 2008* nachweisen. Der Transport von Torasemid war signifikant erniedrigt bei SLCO1B1 521T>C Genotyp-Trägern.

Dieses Ergebnis ließ sich auch in der vorangegangenen Arbeit von *Werner D et al. 2008* feststellen. Statistisch ergab sich ein Zusammenhang zwischen der AUC_{0-24h} und dem Vorliegen der Allelvariationen TT und TC eines speziellen hepatischen transmembranalen Transportproteins (OATP1B1). So betrug die AUC bei Trägern der TT – Mutation $41,6 \pm 17,1$ vs. $63,0 \pm 34,0 \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{l} \cdot \text{kg}$ bei TC-Allelträgern ($p = 0,03$) (*Werner D et al. 2008*).

In unserer Studienpopulation war die orale Clearance im Mittel höher bei männlichen Patienten mit dem SLCO1B1 c.521TT Genotyp ($3,1 \pm 1,2 \text{ l/h}$), während sie bei weiblichen Patienten mit den TC oder CC Genotypen um 42% niedriger war ($1,8 \pm 0,5 \text{ l/h}$, $p < 0,0001$). Deswegen waren mittlere AUC-Werte konsekutiv am tiefsten bei männlichen Homozygoten mit SLCO1B1 c.521 wild-type Allele (gewicht- und dosiskorrigierte $AUC_{24} 28,3 \pm 6,7 \text{ kg} \cdot \text{h}/\text{l}$) und erhöht mit 63% bei Frauen mit der SLCO1B1 c.521 Allelvariante ($46,1 \pm 15,6 \text{ kg} \cdot \text{h}/\text{l}$, $p < 0,001$) (Abb.2, Seite 32).

Für c.521T>C wurde ein signifikant reduzierter Transport von Torasemid nachgewiesen ($1,7 \pm 1,9$ pmol/mg/min, bzw. at 10 μ M Torasemid) im Vergleich zum Wildtyp OATP1B1 ($6.0 \pm 2,7$ pmol/mg/min). (Abbildung 3B)

Für den Genotyp c.388A>G wurde diese Tendenz nicht beobachtet ($6,6 \pm 2,7$ pmol/mg/min).

In der Literatur sind die Effekte der genetischen Variationen auf OATP1B1-Transportaktivität beschrieben (König *et al.* 2006; Seithel *et al.* 2008). Zwei genetische Variationen gehen anscheinend mit veränderter Funktion einher: OATP1B1 p.130Asn>Asp (*SLCO1B1* c.388A>G) and OATP1B1 p.174Val>Ala (*SLCO1B1* c.521T>C). Für OATP1B1 p.174Val>Ala – Genotyp wurde konsequenterweise eine reduzierte Aktivität beobachtet. Für OATP1B1 p.130Asn>Asp zeigte sich sowohl eine reduzierte als auch gleich bleibende oder sogar erhöhte Aktivität (König *et al.* 2006; Seithel *et al.* 2008; Tirona *et al.* 2003; Nozawa *et al.* 2002).

In unserer Studie wurde ein reduzierter hepatischer Transport von Torasemid in Zellen mit c.521T>C-Expression, aber nicht in den Zellen mit c.388A>G-Expression beobachtet.

- OAT4

2006 beschreiben Vormfelde *et al.* die Rolle des renalen Organic anionic transporters (OAT4) im Zusammenhang mit der Variabilität der Pharmakokinetik von Torasemid. So wiesen Träger von AA-Allelen eine um 35% höhere renale Torasemidclearance im Vergleich zu Trägern von TT-Allelen auf. Auch für andere Medikamente wie dem Schleifendiuretikum Furosemid ist eine Abhängigkeit der Aktivität von der Funktionalität des Organic anionic transporter Systems bekannt. Innerhalb einer tierexperimentellen Studie wurde dabei insbesondere auf einen geschlechtsabhängigen Unterschied in der Ausprägung der AUC hingewiesen (Cerrutti *et al.* 2002).

In unserer Studienpopulation wurden keine signifikanten Einflüsse vom *SLC22A11* g.-20166A>T-Genotyp auf pharmakokinetische Parameter von Torasemid beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür bleibt die Mitwirkung von Komorbidität, Komedikation, Geschlecht und Alter der Patienten unserer Studie. Dieses könnte die entstandene Diskrepanz zwischen den Studienergebnissen an den gesunden männlichen Probanden (Vormfelde *et al.* 2006) und unserer Studienpopulation erklären.

4.2.4. Altersabhängigkeit

Die Geschlechterunterschiede der gewichtskorrigierten AUC-Werte blieben in den einzelnen Altersgruppen bestehen. In jeder Altersgruppe wiesen Frauen höhere AUC-Werte auf (siehe Abbildung 5 auf Seite 37). Knauf und Mutschler haben bereits 1998 an einer kleineren Anzahl von männlichen Probanden verschiedener Altersgruppen keine relevante Differenz in den pharmakokinetischen Parametern von Torasemid finden können. Genau so wie in der oben genannten Literaturquelle konnte das Alter die geschlechtsdifferenten Ergebnisse unserer Studie nicht signifikant beeinflussen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

HINTERGRUND UND ZIELSETZUNG

Torasemid ist eines der am häufigsten verschriebenen Diuretika in Deutschland. Bis jetzt wurde die Pharmakokinetik dieses Medikamentes fast ausschließlich an Männern studiert. Die häufigere Nebenwirkungsrate laut aktuellen Daten haben aber die weiblichen Patienten. Die Aufdeckung einer geschlechtsabhängigen Pharmakokinetik von Torasemid ist von großer Wichtigkeit. Durch dieses Wissen könnte Torasemid unter Berücksichtigung des Geschlechtes rationaler verordnet bzw. können unerwünschte Nebenwirkungen vermieden werden.

Ziel dieser Studie war die Untersuchung eines möglichen Geschlechterunterschiedes in der Pharmakokinetik von Torasemid und diesen gegebenenfalls statistisch zu belegen. Zur Einschätzung des tatsächlichen Einflusses des Geschlechts sollten neben möglichen demographischen Kovariablen wie Körpergewicht, Alter und Nierenfunktion auch Polymorphismen von Cytochrom P450 2C9 (CYP2C9) und von organischen Anionentransporter OATP1B1 und OAT4 mit herangezogen und untersucht werden, inwieweit eine Abhängigkeit der Pharmakokinetik von Torasemid von verschiedenen Faktoren, wie Geschlecht, CYP2C9 – Aktivität, Genotyp des hepatischen transmembranalen Transportproteins OATP1B1 und des renalen Organic anionic transporters (OAT4) besteht.

METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine prospektive Studie mit insgesamt 90 Probanden und statistischer Power von 98 bis 99 % durchgeführt. Davon waren jeweils 45 weiblich und 45 Patienten männlich. Haupteinschlusskriterium war eine Dauermedikation von Torasemid aus klinischer Notwendigkeit. Bei diesen Patienten wurden jeweils 8 Blutentnahmen von jeweils 7,5 ml peripher-venösen Blutes in EDTA – Monovetten zur Ermittlung der Torasemidkinetik entnommen. Die Quantifizierung der Substrate erfolgte per LC/MS.

Die Genotypisierung für CYP2C9, OATP1B1 und OAT4 wurde mittels PCR durch vorgefertigter TaqMan Tests (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) unter Nutzung eines ABI Prism Sequenz Detektors durchgeführt.

ERGEBNISSE

Die Pharmakokinetik von Torasemid zeigte sich abhängig vom Geschlecht. Die AUC_{0-24h} war bei Frauen im Mittel um 49% erhöht (nach Gewichtskorrektur 36%).

Unter den untersuchten genetischen Faktoren SCC22A11 (OAT4), SLCO1B1 (OAT1B1) und CYP2C9 hatte in dieser Studie unter klinischen Bedingungen nur der OATP1B1 c.521T>C-Polymorphismus einen signifikanten Einfluss auf die Variabilität der Torasemidkinetik.

Die Geschlechtsdifferenz der Torasemid-Pharmakokinetik lies sich in allen Altersgruppen nachweisen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied in der Pharmakokinetik von Torasemid zwischen den beiden Geschlechtern gezeigt und statistisch belegt werden. Im Vergleich zum männlichen Geschlecht konnte bei Frauen eine signifikant höhere Plasmakonzentration von Torasemid nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang könnte diese Geschlechtsdifferenz in der Pharmakokinetik eine Ursache für die höhere Nebenwirkungsrate bei Frauen sein. Dieses Wissen erfordert ein bewusstes Einsetzen bzw. Dosisanpassung von Torasemid besonders bei weiblichen Patienten.

6. ANLAGEN

Anlage I Patientenaufklärung

Anlage II Studienprotokoll

Anlage III Einzelne Patientendaten

Anlage IV Thesen

Klinik für Kardiologie
Zentrum für Innere Medizin
Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. med. habil. B. Graf
HELIOS-Kliniken Schwerin
Wismarsche Straße 393 19055 Schwerin

Patientenname:

Geburtsdatum:

Information über die Studie zur Geschlechtsabhängigkeit der Torasemidplasmakonzentrationen

Zur Behandlung Ihres hohen Blutdrucks (Hypertonie) bzw. Ihrer Herz- oder Nierenschwäche (Herz oder Niereninsuffizienz) haben Ihre behandelnden Ärzte Ihnen das entwässernde Medikament Torasemid (Unat®, Torem®) gegeben. Für dieses Medikament gibt es seit anderthalb Jahrzehnten Erfahrungen, der klinische Nutzen dieser Therapie ist durch große Studien gut belegt.

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, daß die Blutspiegel der Menschen für das Medikament Torasemid trotz gleicher Dosierung jedoch unterschiedlich sind. Ursache dafür kann zum einen ein Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern sein, zum anderen sind auch der Abbau des Medikaments in der Leber über das Enzym CYP2C9, die Aufnahme im Darm und die Ausscheidung in der Niere über organische Anionentransporter (OAT) genetisch unterschiedlich.

Im Rahmen der geplanten Untersuchung möchten wir prüfen, ob die Blutkonzentrationen von Torasemid vom Geschlecht und dem genetisch unterschiedlichen Stoffwechsel des Medikaments abhängen. Aus diesem Grunde möchten wir Sie fragen, ob wir bei Ihnen innerhalb von 24 Stunden zu 8 Zeitpunkten je ein Röhrchen Blut a 9 ml abnehmen dürfen. Gleichzeitig möchten wir mit einer weiteren Blutprobe die Abbaukapazität Ihres Körpers (genetische Untersuchung des CYP2C9 und der OAT) für Torasemid untersuchen. Das Ergebnis dieser Untersuchung können Sie selbstverständlich erfahren. Ihre eigene medikamentöse Therapie wird durch diese Untersuchung in keiner Weise beeinflusst.

- Nach reiflicher Überlegung erkläre ich mich freiwillig zur Teilnahme an der bereit. Ich habe die Patientenaufklärung gelesen, meine Fragen wurden mir verständlich und vollständig beantwortet. Bei weiteren Fragen kann ich mich jederzeit an den Prüfarzt (Herrn PD Dr. Werner, Tel.: 0385-5202519) wenden. Ich weiß, daß ich jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, diese Einverständniserklärung zurückziehen kann.

Datenschutz

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der Studie meine Daten einschließlich der Daten über Geschlecht, Alter, Gewicht und Körpergröße aufgezeichnet und ausschliesslich anonymisiert (d.h. ohne Namensnennung) ausgewertet werden.

Datum:..... Ärztin/Arzt:.....Proband:.....

Protokoll der
Studie zur Geschlechtsabhängigkeit der
Torasemidplasmakonzentrationen

Studennummer:

Patientenname:

Geb.-datum:

Gewicht:

Alter:

Torasemiddosis:

Diagnosen:

1.
2.
3.
4.
5.

Komedikation:

1.
2.
3.
4.
5.

Kreatinin:

Bilirubin:

Besonderheiten des Studienablaufes:

Zeitpunkt der Abnahme der CYP2C9 / OATP1B1- Genotypisierung:

Torasemidkinetik

Zeitl.Abstand (h)	Wahre Uhrzeit	Besonderheiten
0		
0,5		
1		
2		
4		
8		
12		
24		

Zeitpunkt des Probenversandes zur Analytik:

Hinweise für die abzunehmenden Proben:

1. Proben zur CYP 2C9 / OATP1B1 – Genotypisierung:

3 x 5 ml Vollblut (EDTA-Röhrchen, - 34 Grad lagern)

2. Proben zur Pharmakokinetik von Torasemid (Torasemid im steady state) bei Torasemiddauermedikation:

0 (= vor Gabe) - 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 – 12 – 24 Stunden, jeweils 7,5 ml EDTA-Plasmaröhrchen abnehmen, zentrifugieren und in 2 beschrifteten Eppendorf-Monovetten bei – 34 °C einfrieren. Proben zusammen auf Trockeneis verschicken

Anlage III - Einzelne Patientendaten

NUMMER_alle	GENDER	Alter	AUC*Gewicht	Gewicht	Tmax	Cmax	CL-oral	CYP2C9	388A>G	521T>C	OAT
	m=1 f=2		kg*h/l		hr	µg/l	l/h	GENOTYPE	GENOTYPE	GENOTYPE	OAT
1	2	79	30,76	67	2,0	797	2,18	*1/*1	AG	TC	AA
2	1	61	26,04	73	0,5	982	2,80	*1/*1	AA	TT	AA
3	2	79	64,05	76	4,0	1100	1,19	*1/*1	AG	TT	AA
4	1	65	32,50	72	2,0	861	2,22	*1/*1	AG	TT	AT
5	2	57	136,36	75	2,0	3050	0,55	*1/*2	AA	TT	AT
6	2	78	63,13	70	4,0	937	1,11	*1/*1	GG	CC	AT
7	1	72	34,87	72	0,5	1960	2,06	*1/*2	AG	TT	TT
8	2	84	37,27	67	2,0	1180	1,80	*1/*3	AG	TT	TT
9	1	69	28,48	68	2,0	837	2,39	*1/*1	AG	TC	AT
10	2	73	60,34	70	2,0	1416	1,16	*1/*1	AG	TC	AT
11	1	64	23,07	97,4	2,0	645	4,22	*1/*1	AG	TT	TT
12	1	71	35,95	98,5	2,0	561	2,74	*1/*3	AA	TT	AT
13	2	91	26,89	60	2,0	727	2,23	*1/*1	AA	TT	TT
14	2	77	33,31	66	2,0	732	1,98	*1/*2	AG	TT	TT
15	1	57	31,31	73	2,0	996	2,33	*1/*2	GG	TC	AA
16	1	66	33,58	98,7	1,0	990	2,94	*1/*1	AA	TT	TT
17	1	53	21,50	88,6	1,0	781	4,12	*1/*1	AG	TT	AT
18	2	54	46,51	103	0,5	996	2,21	*1/*2	AA	TT	AT
19	2	71	42,40	70	0,5	1840	1,65	*1/*1	AA	TT	TT
20	1	66	34,98	97	1,0	1090	2,77	*1/*1	AA	TT	TT
21	2	63	28,41	67	2,0	829	2,36	*1/*1	AG	TC	TT
22	1	57	38,89	83,5	0,5	1353	2,15	*1/*1	AA	TT	AT
23	1	76	36,75	121	1,0	768	3,29	*1/*3	AG	TT	AT
24	2	75	52,42	78	0,5	1921	1,49	*1/*3	AA	TT	AT
25	2	68	39,76	103	0,5	1030	2,59	*1/*2	AA	TT	AA
26	2	77	39,44	78	4,0	680	1,98	*1/*1	AG	TC	AA
27	1	51	13,19	105	2,0	540	7,96	*1/*2	AG	TT	TT
28	1	68	27,97	93	1,0	1032	3,33	*1/*1	GG	TT	AA
29	1	75	45,06	95,5	1,0	1067	2,12	*1/*2	AA	TC	AA
30	2	68	36,98	68	0,5	1560	1,84	*1/*3	AA	TT	TT

NUMMER alle	GENDER	Alter	AUC*Gewicht	Gewicht	Tmax	Cmax	CL-oral	CYP2C9	388A>G	521T>C	OAT
	m=1 f=2		kg*h/l		hr	µg/l	l/h	GENOTYPE	GENOTYPE	GENOTYPE	OAT
31	2	74	44,19	74	1,0	1050	1,67	*1/*2	AG	TC	AA
32	1	73	74,29	75	1,0	1330	1,01	*1/*1	AA	TC	AT
33	1	57	17,90	78	1,0	626	4,36	*1/*2	AA	TT	AT
34	1	72	26,44	90	2,0	565	3,40	*1/*1	AA	TT	AA
35	1	63	27,83	71	1,0	1540	2,55	*1/*1	AG	TT	AT
36	1	41	30,16	142	2,0	297	4,71	*2/*2	AG	TT	AT
37	1	69	19,51	66	2,0	930	3,38	*1/*1	AA	TT	AT
38	1	74	37,67	67	0,5	1330	1,78	*1/*3	AA	TT	AT
39	1	53	23,32	100	1,0	600	4,29	*1/*1	AA	TC	TT
40	1	49	19,21	84	0,5	589	4,37	*1/*1	GG	TT	AA
41	2	52	20,07	76	2,0	843	3,79	*1/*1	AG	TT	AT
42	2	69	34,51	98	2,0	839	2,84	*1/*2	GG	TC	TT
43	2	71	31,02	62	1,0	1400	2,00	*1/*1	GG	TT	AT
44	2	68	38,67	62	2,0	1380	1,60	*1/*1	AA	TC	AA
45	1	79	29,64	73	1,0	1030	2,46	*1/*1	AA	TT	AT
46	1	71	29,69	68	1,0	1647	2,29	*1/*3	AG	TC	TT
47	1	67	28,64	80,1	2,0	689	2,80	*1/*1	AG	TC	TT
48	2	74	34,61	101,3	0,5	1471	2,93	*1/*2	AA	TT	AA
49	2	86	75,90	60	0,5	3050	0,79	*1/*1	AG	TT	AT
50	1	71	21,42	82	2,0	785	3,83	*1/*2	AG	TT	AA
51	2	71	42,96	98	1,0	1370	2,28	*1/*1	AG	TT	TT
52	1	53	26,86	103	2,0	997	3,83	*1/*2	AG	TT	AT
53	1	59	26,42	68,7	1,0	1488	2,60	*1/*1	AA	TT	AT
54	2	73	43,88	80	2,0	1280	1,82	*1/*3	AG	TT	AT
55	1	59	26,73	72	4,0	617	2,69	*1/*1	AG	TT	TT
56	1	61	38,92	86	1,0	720	2,21	*1/*1	AA	TC	Undetermined
57	1	58	27,60	93,5	0,5	931	3,39	*1/*1	AG	TC	AT
58	2	78	36,26	78	0,5	1020	2,15	*1/*1	AA	TC	AT
59	2	60	45,96	84	1,0	939	1,83	*1/*1	AG	TC	TT
60	2	72	29,65	40	0,5	2360	1,35	*1/*2	AA	TT	AT

NUMMER alle	GENDER	Alter	AUC*Gewicht	Gewicht	Tmax	Cmax	CL-oral	CYP2C9	388A>G	521T>C	OAT
	m=1 f=2		kg*h/l		hr	µg/l	l/h	GENOTYPE	GENOTYPE	GENOTYPE	OAT
61	2	67	30,39	113	2,0	455	3,72	*1/*1	AG	TT	AT
62	1	73	36,11	70	1,0	2400	1,94	*1/*3	AG	TT	TT
63	2	79	32,76	50	0,5	1560	1,53	*1/*1	AG	TC	TT
64	1	56	58,83	82	2,0	985	1,39	*1/*2	AG	TC	TT
65	2	68	30,99	75,8	2,0	837	2,45	*1/*2	AG	TC	AT
66	2	69	66,06	93	1,0	1550	1,41	*1/*1	AG	TC	AT
67	1	78	39,90	75	2,0	989	1,88	*1/*1	AA	TT	AT
68	1	79	26,37	69	1,0	1270	2,62	*1/*2	AG	TT	AT
69	2	65	22,14	76	2,0	820	3,43	*1/*1	AG	TT	TT
70	1	67	22,47	60	1,0	1430	2,67	*1/*1	AG	TT	TT
71	1	82	35,46	71	4,0	719	2,00	*1/*1	AG	TT	AA
72	2	75	34,92	68	1,0	1360	1,95	*1/*1	AA	TT	AA
73	1	77	26,51	81	4,0	565	3,06	*1/*1	AA	TT	TT
74	2	73	52,63	75	0,5	1710	1,43	*1/*1	GG	TC	TT
75	1	73	23,88	69,3	2,0	647	2,90	*1/*2	AG	TT	AT
76	2	72	69,51	72	2,0	1093	1,04	*1/*3	AG	TC	AT
77	1	68	32,68	95	1,0	1260	2,91	*1/*2	GG	CC	AT
78	1	56	29,88	90	2,0	599	3,01	*1/*1	AG	TC	AT
79	2	86	23,17	73	0,5	1762	3,15	*1/*1	AG	TT	TT
80	2	80	25,21	80	1,0	1340	3,17	*1/*3	AG	TT	AT
81	2	86	32,57	65	0,5	1900	2,00	*1/*1	AA	TT	AT
82	2	78	77,03	87	2,0	1920	1,13	*1/*2	AG	TC	AT
83	2	57	35,64	64	2,0	1210	1,80	*1/*3	AG	TT	AT
84	2	74	33,49	72	2,0	834	2,15	*1/*1	AG	TT	AT
85	2	80	15,99	46	0,5	1000	2,88	*1/*1	AA	TT	TT
86	2	77	32,96	77	1,0	1630	2,34	*1/*2	AG	TC	TT
87	2	73	24,42	88	1,0	408	3,60	*1/*2	AA	TT	AT
88	2	59	34,42	112	0,5	1150	3,25	*1/*1	AG	TT	TT
89	1	71	25,24	62	4,0	800	2,46	*1/*1	AA	TT	AT
90	1	50	32,47	89,5	1,0	1034	2,76	*1/*1	GG	TC	AT

Anlage IV – Thesen

Hintergründe

- Torasemid ist eines der am häufigsten verschriebenen Diuretika in Deutschland (Arzneiverordnungsreport 2007). In der Zulassungszeit wurde die Pharmakokinetik dieses Diuretikums überwiegend an männlichen Patienten untersucht, sodass eine geschlechtsspezifische Auswertung bis jetzt ausblieb.
- Die häufigere Nebenwirkungsrate laut aktuellen Daten haben aber die weiblichen Patienten. Tierexperimentelle Studien zeigten signifikante Geschlechterunterschiede in der Pharmakokinetik der Diuretika, einschließlich für Torasemid.
- In einer vorangegangenen pharmakokinetischen Interaktionsstudie zwischen Torasemid und AT1-Blockern Irbesartan und Losartan auf der Ebene des Cytochroms CYP2C9 fanden sich als Zufallsbefund signifikant höhere Plasmakonzentrationen von Torasemid bei Frauen.
- Ziel dieser Studie soll sein, das anwachsende Wissen über Geschlechterunterschiede in der kardiovaskulären Pharmakotherapie, auch für Torasemid zu überprüfen, ggf. statistisch zu belegen.

Fragestellung

- Liegt ein Geschlechterunterschied in der Pharmakokinetik von Torasemid vor?
- Inwieweit bestehen Abhängigkeiten der Basispharmakokinetik von Torasemid von Genotypen des CYP2C9, OATP1B1 und OAT4?

Methodik

- Die Untersuchung war angelegt als prospektive klinische Studie mit insgesamt 90 Probanden (45 Probanden je Geschlecht).
- Bei vorbestehender Dauermedikation mit 10 mg Torasemid oral erfolgte die Ermittlung der pharmakokinetischen Basisparameter.
- Die Substratquantifizierung wurde per Liquid - Chromatographie/ Massenspektrometrie, die Genotypisierung über PCR per TaqMan Test unter Nutzung eines ABI Prism Sequenz Detektor durchgeführt.

Ergebnisse

- Die Pharmakokinetik von Torasemid zeigte sich abhängig vom Geschlecht. Die AUC_{0-24h} war bei Frauen im Mittel um 49% erhöht (nach Gewichtskorrektur 36%).
- Außerdem war eine Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp des OATP1B1 nachweisbar. In unserer Studienpopulation war die orale Clearance im Mittel höher bei männlichen Patienten mit dem SLCO1B1 c.521TT Genotyp, während bei weiblichen Patienten mit den TC oder CC Genotypen um 42% niedriger. Beide Ergebnisse sind geschlechtsabhängig und erstmals beschrieben.
- Eine Abhängigkeit der Pharmakokinetik von Torasemid vom CYP2C9 – Genotyp hat sich nicht bestätigt. Ebenso liegt keine signifikante Abhängigkeit der AUC vom OAT4 – Genotyp vor.

Schlussfolgerungen

- In Bezug auf die initiale Zielsetzung der Arbeit konnte ein klinisch relevanter Unterschied zwischen der beiden Geschlechtern in der Pharmokokinetik von Torasemid entdeckt und statistisch belegt werden. Im Vergleich zum männlichen Geschlecht konnte bei Frauen eine signifikant höhere Plasmakonzentration von Torasemid nachgewiesen werden.
- In diesem Zusammenhang gehen wir von einer konsekutiv stärkeren diuretischen Wirkung aus, dass die erhöhte Nebenwirkungsrate bei Frauen mit erklärt. Dieses Wissen erfordert ein bewusstes Einsetzen bzw. Dosisanpassung von Torasemid besonders bei älteren weiblichen Patienten.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μl	Mikroliter
μM	Mikromol
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
art.	arteriell
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area Under Concentration Time Curve
B.m.corr.	Body mass corrected
Blutentn.	Blutentnahme
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
$\text{Cl}_{(\text{oral})}$	orale Clearance
Cl_{cr}	Creatininclearance
c_{max}	maximale Plasmakonzentration
CoMed.	zusätzliche Medikation
D	Dosis von Torasemid (10 mg/d)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GEK	Gmünder ErsatzKasse (Bereich Gesundheitsanalyse)
EDRF – NO	Endothelium derived Relaxing Factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
h	Stunden
H^+	Wasserstoff
H_2O	Wasser
HCT	Hydrochlorothiazid
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HWZ	Halbwertszeit
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
K_i	substratspezifische K_m

K_m	Michaelis-Menten Konstante
l	Liter
LC/MS	liquid-chromatographie/mass-spectrometrie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
MRP	Multidrug-Resistance associated Proteine
n.s.	nicht significant
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat an H ⁺ geb.
ng	Nanogramm
NYHA	New York Heart Association
O ₂	Sauerstoff
OAT	organische Anionen-Transporter
OATP	organische Anionen-Transport-Proteine
OCT	organische Kationen-Transporter
p	Signifikanzniveau
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-gP	P-Glykoprotein
Pharm.kin.	Pharmakokinetik
pKa	Gleichgewichtskonstante einer Säure
SEM	Standard Error of the Mean
SG	Studiengruppe
Sign.	Signifikanz
SLC	Solute Carrier
SNP	single nucleotide polymorphism
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_{max}	Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration
t-PA	tissue Plasminogenaktivator
Tab.	Tabelle
TC	OATP1B1-Genotyp
TMP	Treatment periode
TT	OATP1B1-Genotyp

V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
V_z	Verteilungsvolumen
vs.	versus
X	Substrat
z.B.	zum Beispiel

8. ABBILDUNGS – UND TABELLENVERZEICHNIS

Abb. 1: Daten des deutschen Pharmakovigilanzprojektes (<i>Thürmann P 2007</i>)	Seite 8
Abb. 2: Prozentuale Clearancereduktion in Abhängigkeit vom CYP2C9-Genotyp	Seite 14
Abb. 3: Mittlere Plasmakonzentration von 10 mg Torasemid über 24 Std. bei Patienten mit stabiler Dauermedikation; Abhängigkeit vom Geschlecht	Seite 30
Abb. 4: Einfluss des Geschlechts und SLCO1B1c. 521>C – Genotyp auf Area under concentration – time curve 0-24h (AUC_{0-24h}) und orale Clearance von Torasemid	Seite 35
Abb. 5 AUC_{0-24} von Torasemid geschlechtsabhängig in den einzelnen Altersgruppen	Seite 37

Tab. 1: Beispiele für Substrate des Cytochrom P450 2C9	Seite 13
Tab. 2: Allelvariationen des CYP2C9 und ihre spezifischen Charakteristika	Seite 14
Tab. 3: Nomenklatur des OATP1B1	Seite 17
Tab. 4: Studienablauf	Seite 22
Tab. 5: Patientencharakteristik	Seite 28
Tab. 6: Pharmakokinetische Basisparameter Torasemid (10mg oral) in Abhängigkeit vom Geschlecht	Seite 29
Tab. 7: Gewichtskorrigierte AUC_{0-24} in Abhängigkeit der CYP2C9-Genotypen	Seite 31
Tab. 8: Gewichtskorrigierte AUC_{0-24} h in Abhängigkeit der SLCO1B1 c.521 T>C-Genotypen	Seite 32
Tab. 9: Gewichtskorrigierte AUC_{0-24} in Abhängigkeit der SLCO1B1 c.388A>G-Genotypen	Seite 32
Tab. 10: Gewichtskorrigierte AUC_{0-24} in Abhängigkeit der SLC22A11 g.-20166A>T-Genotypen	Seite 33
Tab. 11: Regressionsanalyse der Effekten vom Geschlecht und SLCO1B1, CYP2C9 und SLC22A11 Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Torasemid	Seite 34
Tab. 12: Frequenz der Begleitmedikation	Seite 36
Tab. 13: Knauf, Mutschler 1998 – entnommene Werte von Studien mit gleicher Torasemid Dosierung	Seite 39

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Brandoni** A, Villar SR, Torres AM. Gender-related differences in the pharmacodynamics of furosemide in rats. *Pharmacology* **2004**;70: 107-112.
2. **Cerrutti** JA, Quaglia NB, Brandoni A et al. Effects of gender on the pharmacokinetics of drugs secreted by the renal organic anions transport systems in the rat. *Pharmacol Research* **2002**; 45: 107-112.
3. **Cosin** J, Diez J. Torasemide in chronic heart failure: results of the TORIC study. *Eur J Heart Fail* **2002**; 4: 507-513.
4. **Chapman** MD et al. Hyponatraemia and hypokalaemia due to indapamide. *MJA* **2002**; 176: 219-221.
5. **Chen** Z, Vaughn DA, Fanestil DD. Influence of gender on renal thiazide diuretic receptor density and response. *J Am Soc Nephrol* **1994**; 5: 1112-9.
6. **Egger** T. Cytochrome P450 polymorphisms in geriatric patients: impact on adverse drug reactions-a pilot study. *Drugs Aging* **2005**; 22: 265-272.
7. **Fortuno** A. Torasemide inhibits angiotensin II-induced vasoconstriction and intracellular calcium increase in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1999**; 34: 138-143.
8. **Guidelines Committee**. European Society of Hypertension – European Society of Cardiology guidelines for the management of arterial hypertension. *J Hypertens* **2003**; 21: 1011-1053.
9. **Hagenbuch** B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* **2004**; 447: 653–665.
10. **Haveman-Nies** A et al. Fluid intake of elderly Europeans. *J Nutr Health Aging* **1997**; 1: 151-155.
11. **Johnson** DL, Lewis BC, Elliot DJ et al. Electrochemical characterisation of the human cytochrome P450 CYP2C9. *Biochemical Pharmacology* **2005**; 69: 1533 – 1541.
12. **Kato** Y, Kuge K, Kusuhara H et al. Gender difference in the urinary excretion of organic anions in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**; 302: 483 – 489.
13. **Kirchheiner** J. Arzneitherapieempfehlungen auf pharmakogenetischer Basis. Habilitation **2004**.

14. **Kirchheiner** J, Ufer M, Walter EC et al. Effects of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics of R - and S - phenprocoumon in healthy volunteers. *Pharmacogenetics* **2004**; 14: 19 – 26.
15. **Kirchheiner** J, Brockmöller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* **2005**; 77: 1–16.
16. **Kirchheiner** J, Roots I, Goldammer et al. Effect of genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 2C9 and CYP2C8 on the pharmacokinetics of oral antidiabetic drugs – clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* **2005**; 44: 1209–1225.
17. **Kirchheiner** J, Seeringer A, Brockmöller J et al. Stand der Pharmakogenetik in der klinischen Arzneimitteltherapie. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **2006**; 10: 995–1003.
18. **Kling** L, Schaumann W, Kaufmann B et al. Sex difference in saluretic and diuretic activity of torasemide in Sprague-Dawley rats (Abstract). *Naunyn – Schmiedeberg`s Arch Pharmacol* **1991**; 844: R114.
19. **Knauf** H, Mutschler E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of Torasemide. *Clin Pharmacokinet* **1998**; 34: 1-34.
20. **König** J, Cui Y, Nies AT et al. Localization and genomic organisation of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem* **2000**; 275: 23161–23168.
21. **König** J, Cui Y, Nies AT et al. A novel human organic anion transporting polypeptide localizes to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2000**; 278: G156–164.
22. **König** J, Seithel A, Gradhand U et al. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn-Schmiedeberg`s Arch Pharmacol* **2006**; 372: 432–443.
23. **Luft** FC. Torasemide in the treatment of arterial hypertension. *J cardiovasc Pharmacol*. **1993**; 22: 32-39.
24. **Luzier** AB, Kilian A, Wilton JH et al. Gender related effects on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **1999**; 66: 594-601.
25. **Martin** RM, Biswas PN, Freemantle SN et al. Age and sex distribution of suspected adverse drug reactions to newly marketed drugs in general practice in England: analysis of 48 cohort studies. *Br J Clin Pharmacol* **1998**; 46, 505-511.

26. **Miners** JO, Rees DLP, Valente L et al. Human hepatic cytochrome P450 2C9 catalyzes the rate-limiting pathway of torasemide metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* **1995**; 272: 1076 – 1081.
27. **Miners** JO, Coulter S, Birkett DJ et al. Torasemide metabolism by CYP2C9 variants and other human CYP2C subfamily enzymes. *Pharmacogenetics* **2000**; 10: 267–270.
28. **Murray** MD, Deer MM, Ferguson JA et al. Open-label randomized trial of torasemide compared with furosemide therapy for patients with heart failure. *Am J Med* **2001**; 111: 513-520.
29. **Niemi** M. High plasma pravastatin concentrations are associated with single nucleotide polymorphisms and haplotypes of organic anion transporting polypeptide – C (OATP-C, SLCO1B1). *Pharmacogenetics* **2004**; 14: 429–440.
30. **Nozawa** T, Nakajima M, Tamai I et al. Genetic polymorphisms of human organic anion transporters OATP-C (SLC1A6) and OATP-B (SLC21A9): allele frequencies in the Japanese population and functional analysis. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**; 302: 804–813.
31. **Paneitz** A, Meissner K, Kroemer HK et al. Arzneimittelinteraktionen: Neue Mechanismen und klinische Relevanz. *Internist* **2000**; 41: 338–343.
32. **Pizzagalli** F. Identification and functional characterization of human organic anion transporting polypeptides. Dissertation ETH Nr. 15146 **2003**; University of Basel.
33. **Rademaker** M. Do women have more adverse drug reactions? *Am J Clin Dermatol* **2001**; 2: 349-351.
34. **Rathore** SS, Wang Y, Krumholz HM. Sex-based differences in the effect of digoxin for the treatment of heart failure. *N Engl J Med* **2002**; 374:1403-1411.
35. **Ridker** PM, Cook NR, Lee I-M et al. A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*. **2005**; 352: 1293-1304.
36. **Risler** T, Schwab A, Kramer B et al. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of loop diuretics in renal failure. *Cardiology* **1994**; 84: 155–161.
37. **Seithel** A, Glaeser H, Fromm MF et al. The functional consequences of genetic variations in transporter genes encoding human organic anion-transporting polypeptide family members. *Expert Opin Drug Metab toxicol* **2008**; 4: 51-64.
38. **Shah** VP. Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* **2000**; 17: 1551-1557.
39. **Spranger** M, Aspey BS, Harrison MJ. Sex difference in antithrombotic effect of aspirin. *J AM Heart Assoc* **1989**; 20: 34-37.

40. **Schwabe** U, Paffrath D. Arzneimittelverordnungsreport 2006. Springer Medizin Verlag Heidelberg **2007**.
41. **Suzuki** K, Yanagawa T, Shibasaki T et al. Effect of CYP2C9 genetic polymorphisms on the efficacy and pharmacokinetics of glimepiride in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **2006**; 72: 148–154.
42. **Swedberg** K, Cleland J, Dargie H et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005). *Eur Heart J* **2005**; 26: 1115-1140.
43. **Tanaka** E. Gender-related differences in pharmacokinetics and their clinical significance. *J Clin Pharm Ther* **1999**; 24: 339–346.
44. **Thürmann** PA, Hompesch BC. Influence of gender on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* **1998**; 36: 586-590.
45. **Thürmann** PA. Sex-specific differences in drug treatment. *Ther Umsch* **2007**; 64: 325-329.
46. **Thürmann** PA. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik und –dynamik von Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **2005**; 48: 536-540.
47. **Thürmann** PA, Werner U, Hanke F et al. Arzneimittelrisiken bei hochbetagten Patienten: Ergebnisse deutscher Studien. *Fortschritt und Fortbildung in der Medizin* **2008**; 31: 216-224.
48. **Tirona** RG, Leake BF, Merino G et al. Polymorphismus in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European – and African-Americans. *J Biol Chem* **2001**; 276: 35669–35675.
49. **Tirona** RG, Leake BF, Wolkoff AW et al. Human organic anion transporting polypeptide-C (SLC21A6) is a major determinant of rifampin-mediated pregnane X receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**; 304:223-228.
50. **Veeraveedu** PT, Watanabe K, Ma M et al. Comparative effects of torasemide and furosemide in rats with heart failure. *Biochem Pharmacol* **2008**; 75: 649-659.
51. **Vormfelde** SV, Engelhardt S, Zirk A et al. CYP2C9 polymorphisms and the interindividual variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics of the loop diuretic drug torasemide. *Clin Pharmacol Ther* **2004**; 76: 557–566.
52. **Vormfelde** SV, Schirmer M, Toliat MR et al. The polymorphism Asn130Asp and Val174Ala in OATP1B1 and the CYP2C9 torasemide pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* **2008**; 83: 815-817.

53. **Vormfelde** SV, Schirmer M, Hagos Y et al. Torasemide renal clearance and genetic variation in luminal and basolateral organic anion transporters. *Br J Clin Pharmacol* **2006**; 62: 323-335.
54. **Werner** D, Wuttke H, Fromm MF et al. Effect of Amiodarone on the plasma levels of Metoprolol. *Am J Cardiol* **2004**; 94: 1319 – 1321.
55. **Werner** D, Werner U, Meybaum A et al. Determinants of steady-state torasemide pharmacokinetics: impact of pharmacogenetic factors, gender and angiotensin II receptor blockers. *Clin Pharmacokinet* **2008**; 47: 323-332.
56. **Werner** U, Szymanski J, Schmiedl S et al. Women suffer more frequently from serious adverse drug reactions caused by diuretics: Results from the German pharmacovigilance centres 2000-2006. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **2009** (in press).
57. **Wolf-Maier** K, Cooper RS, Banegas JR et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA* **2003**; 289: 2363–2369.
58. **Wuttke** H, Rau T, Heide R et al. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol – associated adverse effects. *Clin Pharmacol Ther* **2002**; 72: 429–437.
59. **Zopf** Y, Rabe C, Neubert A et al. Women encounter ADRs more often than do men. *Eur J Clin Pharmacol* **2008**; 64: 999-1004.

11. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Svetlana Heinbüchner an Eides Statt, dass ich diese Dissertation selbständig, ohne unzulässige Hilfe Dritter und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen angefertigt und die, der Literatur entnommenen Daten als solche gekennzeichnet habe.

Schwerin, den April 2009

Svetlana Heinbüchner

12. DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich allen „Danke“ sagen, die im Zeitraum der Entstehung dieser Arbeit vom Oktober 2007 bis März 2009 mit ihrer Unterstützung zum Gelingen des Projektes beigetragen haben. Durchgeführt wurde die Studie an der Klinik für Kardiologie der HELIOS Kliniken Schwerin (Lehrkrankenhaus der Universität Rostock). In diesem Rahmen möchte ich zu allererst ein besonderes Dankeschön Herrn PD Dr. med. D. Werner aussprechen, der die Arbeit betreute.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Fromm und dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich – Alexander Universität Erlangen - Nürnberg für die ständige Mitbetreuung der Arbeit. Danken möchte ich in diesem Kontext insbesondere noch Herrn PD Dr. O. Zolk für die Durchführung der Genotypisierung und die statistische Aufarbeitung der Daten. Herrn Prof. Dr. B. Hinz, Zentrum für Pharmakologie, Universität Rostock, möchte ich für die Vergabe des Promotionsthemas danken.

Den Mitarbeitern des Labormedizinischen Institutes der HELIOS Kliniken Schwerin, v.a. Herrn Prof. Dr. H. Lestin und Herrn Dr. A. Grosch danke ich für die gute Zusammenarbeit und zuverlässige Probenaufarbeitung. Für die Berechnung der pharmakokinetischen Daten bedanke ich mich bei Frau PD Dr. U. Werner, Institut für Pharmakologie, Universität Hamburg. Für die Unterstützung im klinischen Teil der Arbeit möchte ich mich bei Herrn ChA PD Dr. B. Graf und insbesondere bei Frau Dr. A. Würfel bedanken.