

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Medizinische Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Thema:

**„Einfluss von Tolterodin auf die Struktur und die Qualität des Schlafes
unter besonderer Berücksichtigung des Alters sowie
des CYP2D6- Genotyps“**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Jaeger

aus Bad Harzburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Roots.....
2. Prof. Dr. med. Ch. Witt.....
3. Prof. Dr. med. M. Wiegand.....

Datum der Promotion: 18.09.2009.....

	Abkürzungsverzeichnis	4
1	Einleitung	6
1.1	Epidemiologie des Syndroms der überaktiven Blase	6
1.2	Therapie des Syndroms der überaktiven Blase	7
1.3	ZNS- Nebenwirkungen einer Therapie mit anticholinergen Substanzen	8
1.4	Untersuchungsmethoden zur Evaluierung von Medikamenteneffekten auf den Schlaf und die Kognition	9
1.5	Unterschiede in der ZNS- Wirksamkeit anticholinergischer Substanzen	10
1.5.1	Pharmakokinetische Eigenschaften von Tolterodin und deren Beeinflussung durch den CYP2D6- Enzymstatus	12
1.5.2	Einfluss des Alters auf die ZNS- Wirkungen anticholinergischer Substanzen	14
2	Fragestellung	16
3	Material und Methoden	17
3.1	Probandenauswahl und Ablauf der Studie	17
3.1.1	Probanden	17
3.1.1.1	Voruntersuchung	17
3.1.1.2	Nachuntersuchung.....	18
3.1.1.3	Einschlusskriterien	18
3.1.1.4	Ausschlusskriterien	18
3.1.2	Prüfdesign	20
3.1.3	Untersuchungsdurchführung	21
3.1.4	Studienmedikation	22
3.1.5	Polysomnographie	23
3.1.5.1	Ableitung der Polysomnographie	23
3.1.5.2	Auswertung der Polysomnographie	23
3.1.6	Kognitive Testverfahren.....	24
3.1.7	Fragebögen	25
3.1.7.1	Morgen- und Abendprotokolle	25
3.1.7.2	Schlafragebogen B nach Görtelmeyer	33
3.1.7.3	Epworth Schläfrigkeitsskala	33
3.2	Genotypisierung	34
3.2.1	Blutentnahme	34

3.2.2	DNA- Extraktion.....	34
3.2.2.1	Material für die DNA- Extraktion.....	34
3.2.2.2	DNA-Extraktion mit dem MagNa Pure LC	34
3.2.3	Detektion von Mutationen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) und des Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus (RFLP)	35
3.2.3.1	Material für PCR und RFLP	35
3.2.3.2	Funktionsprinzip der Polymerasekettenreaktion.....	35
3.2.3.3	Bestimmung von Mutationen mit Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus (RFLP)	36
3.2.3.4	Material für die Gelelektrophorese	36
3.2.3.5	Funktionsprinzip der Gelelektrophorese.....	37
3.2.3.6	Herstellung der Agarosegele.....	37
3.2.4	Detektion von Mutationen auf dem <i>CYP2D6</i> - Gen mit PCR und RFLP.....	38
3.2.4.1	Amplifikation des 5750 bp- Fragmentes.....	38
3.2.4.2	Identifikation von <i>CYP2D6</i> *4 (G1846A) und *6 (1707Tins/del) mittels PCR- RFLP	39
3.2.4.3	Identifikation von <i>CYP2D6</i> *3 (2549ins/delA) mittels PCR- RFLP	41
3.2.4.4	Identifikation von <i>CYP2D6</i> *5 (Deletion).....	42
3.2.4.5	Identifikation von <i>CYP2D6</i> *MxN (Duplikation).....	44
3.3	Biometrie und Statistik	46
3.3.1	Schätzung der erforderlichen Probandenzahl	46
3.3.2	Testung der subjektiven und objektiven Parameter	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Probanden	47
4.2	Objektive Schlafparameter (Polysomnographie).....	48
4.2.1	Primärer Zielparameter: REM- Schlafanteil (% TST)	49
4.2.2	REM- Latenz.....	50
4.2.3	Schlafeffizienz	51
4.2.4	NonREM- Schlafparameter.....	52
4.3	Kognitive Tests	54
4.3.1	Zahlen- Verbindungs- Test (ZVT)	54
4.3.2	d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test (d2- Test).....	55
4.4	Subjektive Schlafparameter (Fragebögen)	56

4.4.1	Subjektive Schlafdauer und Einschlafzeit	56
4.4.2	Subjektive Befindlichkeit	58
4.5	Genotypisierung	60
4.5.1	REM- Schlafparameter in den Genotyp- Gruppen	62
4.5.2	NonREM- Schlafparameter in den Genotyp- Gruppen.....	64
4.5.3	Kognitive Tests in den Genotyp- Gruppen	66
4.5.4	Subjektive Schlafparameter in den Genotyp- Gruppen.....	68
4.6	Unerwünschte Wirkungen	70
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
5	Diskussion	72
5.1	Einfluss von Tolterodin auf den Schlaf und die kognitiven Fähigkeit unter besonderer Berücksichtigung des Alters.....	74
5.2	Einfluss von Tolterodin auf den Schlaf und die kognitiven Fähigkeit unter besonderer Berücksichtigung des Genotyps	80
5.3	Kritische Bewertung der Methodik und Ausblick	85
6	Zusammenfassung	87
7	Literaturverzeichnis.....	90
8	Danksagung	96
9	Eidesstattliche Erklärung.....	97
10	Lebenslauf	98

Abkürzungsverzeichnis

5- HM	5- Hydroxymethyl-Tolterodin
ALAT	Alaninaminotransferase
ASAT	Aspartataminotransferase
BMI	Bodymassindex
Bp	Basenpaare
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
CYP2D7	Cytochrom P450 2D7
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
D	Dalton (Einheit für Molekulargewicht)
d2- Test	d2- Aufmerksamkeits- Belastungstest
DGSM	Deutsche Gesellschaft für Schlafmedizin und Schlafforschung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
EM	Extensive metabolizer (Schnellmetabolisierer)
EMG	Elektromyogramm
EOG	Elektrookulogramm
ESS	Epworth Schläfrigkeitsskala
fT3	freies Trijodthyronin
fT4	freies Thyroxin
GES	Gefühl des Erholtseins nach dem Schlaf
GZ	Gesamtzahl im d2- Aufmerksamkeits- Belastungstest
GZ- F	Korrigierte Gesamtzahl im d2- Aufmerksamkeits- Belastungstest
Hb- Wert	Hämoglobin- Wert
IM	Intermediäre Metabolisierer
M1- Rezeptor	Muskarinrezeptor 1
M2- Rezeptor	Muskarinrezeptor 2
M3- Rezeptor	Muskarinrezeptor 3
NIH	National Institutes of Health (nationales US-Gesundheitsinstitut)
NonREM- Schlaf	Nicht- REM (Rapid Eye Movement)- Schlaf

PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	Poor metabolizer (Langsammetabolisierer)
REM- Schlaf	Rapid Eye Movement- Schlaf (Traumschlaf)
RFLP	Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus
SPSS	Statistik-Software
SPT	Schlafperiode
SQ	Schlafqualität
SWS	Tiefschlaf
TIB	Zeit im Bett (von Licht löschen bis Licht anschalten)
TSH	Thyreoidea- stimulierendes Hormon
TST	Gesamtschlafzeit
UE	Unerwünschtes Ereignis
UM	Ultraprapid metabolizer (Ultraschnelle Metabolisierer)
VAS	Visuelle Analogskalen
VIS- A	Visuelle Analogskala zur Erfassung der Schlafqualität am Abend
VIS- M	Visuelle Analogskala zur Erfassung der Schlafqualität am Morgen
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVT	Zahlenverbindungstest

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Syndroms der überaktiven Blase

Die Harninkontinenz ist ein wichtiges und häufiges Gesundheitsproblem, dessen Prävalenz abhängig ist von den verwendeten Definitionen und von der Altersstruktur der untersuchten Bevölkerung. Die meisten Studien, die sich mit der Epidemiologie der Inkontinenz beschäftigen, zeigen, dass die Prävalenz der Harninkontinenz mit dem Alter ansteigt und bei Männern höher als bei Frauen ist. Von den in Deutschland mit einer behandlungs- oder versorgungsbedürftigen Harninkontinenz lebenden vier Millionen Menschen sind mehr als zwei Millionen älter als 60 Jahre, dies entspricht mehr als 10 % der Senioren. Etwa 30 % der über 80- Jährigen und mehr als die Hälfte aller Heimbewohner sind betroffen. Inkontinenz ist statistisch die häufigste Ursache für die Einweisung in ein Pflegeheim (Hader et al. 2003).

Unter dem Begriff der Inkontinenz wurde bei diesen Untersuchungen die sogenannte Belastungsinkontinenz (Stressinkontinenz) und Dranginkontinenz zusammengefasst und nicht getrennt untersucht.

An Stelle der alten Begriffe „Dranginkontinenz“ und „Reizblase“ wird heute die Bezeichnung „Syndrom der überaktiven Blase“ (engl. "overactive bladder") verwendet.

Das Syndrom der überaktiven Blase stellt einen Symptomenkomplex dar. Leitsymptom ist ein plötzlicher, imperativer Harndrang, welcher oft nur mit Mühe unterdrückt werden kann und in dessen Folge es zu Pollakisurie und Nykturie kommen kann. Der Harndrang kann in der leichten Form ohne Harnverlust bleiben, später im Verlauf zur spontanen unwillkürlichen Miktion bzw. zur Inkontinenz führen. Als Ursache der Symptomatik müssen eine Infektion der Harnwege oder andere urologische Erkrankungen ausgeschlossen sein (u.a. Abrahms et al. 2002). Die Folge des Syndroms der überaktiven Blase ist eine deutliche Minderung der Lebensqualität, oft assoziiert mit Schlafstörungen, Sexualstörungen und Depressionen (Muhlstein, Deval 2008).

Es wird davon ausgegangen, dass ca. 49 Millionen Menschen in Europa vom Syndrom der überaktiven Blase betroffen sind. Die größte internationale, populationsbasierte Querschnittsstudie (Irwin et al. 2006) zur Abschätzung der Prävalenz von Symptomen des unteren Harntraktes (EPIC- Studie) zeigt bei den 19.165 Studienteilnehmern eine Gesamtprävalenz des Syndroms der überaktiven Blase von 11,8 % (keine geschlechtsspezifischen Unterschiede) so-

wie einen Trend zum Anstieg mit dem Alter (Haschim, Abraham 2007). In dieser Studie konnte auch bestätigt werden, dass sich die geschlechtsspezifischen Kurven etwa ab dem 60. Lebensjahr kreuzen: in jüngeren Altersgruppen ist das Syndrom der überaktiven Blase bei Frauen häufiger (postmenopausale Hormondefizienz), während das häufig mit irritativen Symptomen vergesellschaftete Prostatawachstum des alternden Mannes chronisch fortschreitet und im hohen Alter zu Prävalenzen führt, welche die der Frauen überschreiten (Hampel et al. 2003).

Daher ist das Syndrom der überaktiven Blase ein Problem mit wachsendem gesellschaftspolitischen Gewicht und wird bei der zu erwartenden demographischen Entwicklung und der mit steigendem Lebensalter zunehmenden Inzidenz noch weiter an Bedeutung gewinnen.

1.2 Therapie des Syndroms der überaktiven Blase

Die Behandlung des Syndroms der überaktiven Blase (mit/ ohne Dranginkontinenz) erfolgt konservativ und hat das Ziel, die funktionelle Blasenkapazität zu erhöhen und damit die Miktionsintervalle zu verlängern. Dabei kommen Verhaltenstherapie, externe Elektrostimulation und Magnetstimulationstherapie allein oder in Kombination mit einer Pharmakotherapie zum Einsatz.

Bei der medikamentösen Behandlung eines Syndroms der überaktiven Blase werden orale Anticholinergika eingesetzt, wie z. B. Oxybutynin, Tolterodin, Propiverin und Trospiumchlorid (Nilvebrant et al. 1997; Clemett, Jarvis 2001; Hills et al. 1998). Neuere Wirkstoffe sind anticholinerge Substanzen mit höherer Selektivität für den M3- Rezeptor wie z.B. Solifenacin und Darifenacin (Vella et al. 2006). Ziel der medikamentösen Therapie ist die Absenkung der Überaktivität des Detrusors durch Verminderung oder Blockierung unwillkürlicher Detrusorkontraktionen. Ein Cochrane- Review über placebokontrollierte und vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Anticholinergika hat gezeigt, dass diese Substanzen sowohl die Zahl der Inkontinenzepisoden und Entleerungen (jeweils pro 24h) erniedrigen, als auch die Lebensqualität signifikant verbessern (Nabi et al. 2006).

Wenn Anticholinergika nicht zum erwünschten Effekt führen, bzw. wegen Unverträglichkeit nicht in der notwendigen Dosis gegeben werden können, besteht als medikamentöse Alternative noch die Möglichkeit der endoskopischen Injektion von Botulinumtoxin A in den Musculus detrusor vesicae. Dieses Verfahren findet insbesondere bei der neurogen bedingten Detrusorhyperaktivität Anwendung. Weiterhin werden Östrogene in Form von vaginalen Suppositorien eingesetzt, die einen Einfluss auf adrenerge, cholinerge und endokrine Rezep-

torsysteme haben und somit die Steuerungsmechanismen der urovesikalen Einheit beeinflussen können (Petri, Thüroff 2004).

Keine der oben genannten Substanzen ist blasenspezifisch. Anticholinergika dämpfen auch andere glattmuskuläre Organe in ihrer Aktivität. Verminderte Speichelproduktion führt zu Mundtrockenheit, eine Schwächung des Ziliarmuskels hat Akkommodationsstörungen zur Folge. Die anticholinerge Wirkung auf den Magen- Darm- Trakt kann zu Magenentleerungsstörungen und Obstipation führen. Engwinkelglaukom, Tachyarrhythmie und Restharn über 50 % der funktionellen Blasenkapazität stellen eine Kontraindikation für den Einsatz der Anticholinergika dar. Änderungen des Applikationsweges und der Applikationsart, insbesondere die Anwendung von slow- release- Formen, können sowohl die Verträglichkeit als auch ihre Effizienz weiter erhöhen.

1.3 ZNS- Nebenwirkungen einer Therapie mit anticholinergen Substanzen

Relativ häufig limitieren anticholinerge Nebenwirkungen Therapieresultate und Compliance der Patienten, die anticholinerge Substanzen zur Therapie eines Syndroms der überaktiven Blase einnehmen. Neben typischen peripheren Nebenwirkungen werden unter der Therapie mit einigen anticholinergen Substanzen Wirkungen auf das ZNS beobachtet. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es unter Oxybutynin zu kognitiven Einschränkungen (Katz et al. 1998; Herberg 1999) sowie zur Veränderung der EEG- Aktivität am Tage kommt, während unter Trospiumchlorid keine solchen Effekte gezeigt werden konnten (Pietzko et al. 1994). Außerdem existieren Berichte über neuropsychiatrische Nebenwirkungen unter Oxybutynin, wie beispielsweise Halluzinationen, Psychosen, Verwirrheitszustände, Konzentrations- und Orientierungsstörungen sowie Müdigkeit und Schläfrigkeit (Donellan et al. 1997; In T'Veld et al. 1998). Unter Tolterodin werden ebenfalls neuropsychiatrische Nebenwirkungen wie Halluzinationen und Verwirrheitszustände sowie Schläfrigkeit, Nervosität und Parästhesien beschrieben (Appell 1997; Guay 1999). Unter Trospiumchlorid wurden bisher keine kognitiven Einschränkungen beschrieben. Einflüsse von Oxybutynin, Tolterodin oder Trospiumchlorid auf den Schlaf wurden bisher noch nicht untersucht, wobei die Meldungen über neuropsychiatrische Nebenwirkungen, Berichte über das Auftreten von pavor nocturnus unter Therapie mit Oxybutynin (Valsecia et al. 1998) sowie Parallelen zu anderen, bereits untersuchten anticholinergen Substanzen vermuten lassen, dass auch teilweise der Schlaf beeinträchtigt wird. So wurden sowohl Sedation und REM- Suppression als auch anticholinerge Nebenwirkungen bei der Therapie mit trizyklischen Antidepressiva beobachtet (Voderholzer et al. 1997) und ausgeprägte

Veränderungen der Schlafstruktur unter nichtselektiven (z.B. Scopolamin) wie auch unter selektiven Anticholinergika (z.B. Pirenzepin), registriert. In diesen Fällen war sowohl der REM- Schlaf als auch der NonREM- Schlaf betroffen.

1.4 Untersuchungsmethoden zur Evaluierung von Medikamenteneffekten auf den Schlaf und die Kognition

Zur Objektivierung des Einflusses von Medikamenten auf den Schlaf wird die Schlafstruktur mittels Polysomnographie untersucht. Weiterhin werden die subjektive Befindlichkeit mittels standardisierter Fragebögen und die kognitiven Fähigkeiten mittels Testbatterie evaluiert. Die Polysomnographie bezeichnet die Aufzeichnung des Schlafes, die auf der Grundlage der Ableitung von Hirnströmen (EEG), Muskelspannungen (EMG), Augenbewegungen (EOG) und kardio- respiratorischen Parametern ein Polysomnogramm erstellt, welches Hinweise auf den Schlafverlauf und dessen Störungen gibt. Im Polysomnogramm erfolgt eine Zuordnung von kurzen Epochen zu Wachphasen, NonREM- Schlaf und REM- Schlaf. Der NonREM- Schlaf unterteilt sich in Leichtschlaf (Schlafstadium 1), mittlere Schlaftiefe (Schlafstadium 2) und Tiefschlaf (Schlafstadium 3 und 4). Die Auswertung des Schlafes im Polysomnogramm erfolgt visuell nach streng definierten und anerkannten Kriterien (Rechtschaffen, Kales 1968).

Das Schlafprofil eines jungen gesunden Erwachsenen zeigt die folgenden Eigenschaften:

- dem Schlafbeginn geht die so genannte Schlaflatenz voraus, die als Periode zwischen dem Zeitpunkt des gewünschten Einschlafens (zumeist mit dem Zeitpunkt des Ausschalten des Lichtes übereinstimmend) und dem ersten Auftreten von Schlaf im Polysomnogramm definiert ist.
- der Schlaf beginnt mit einer stufenförmigen Vertiefung des NonREM- Schlafes.
- NonREM- und REM- Schlaf wechseln sich in regelmäßigen Perioden von ungefähr 90 Minuten ab.
- Tiefschlaf tritt bevorzugt im ersten Nachtdrittel auf, gegen Morgen wird der NonREM- Schlaf flacher.
- REM- Schlaf- Perioden sind vermehrt in der zweiten Nachthälfte zu finden.

1.5 Unterschiede in der ZNS- Wirksamkeit anticholinergischer Substanzen

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass nicht alle Substanzen mit einer anticholinergen Aktivität Wirkungen im ZNS desselben Ausmaßes verursachen. Mitbestimmend für die Wirkungen im ZNS sind die Penetrationsfähigkeit der Substanzen durch die Blut- Hirn- Schranke und die Rezeptorselektivität (Madersbacher 2006). Weitere Einflussfaktoren auf das Wirkungsprofil der anticholinergen Substanzen sind deren pharmakokinetische Eigenschaften. Individuelle Einflußgrößen sind z.B. Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Leber- und Nierenfunktion sowie die genetische Prädisposition.

Die Fähigkeit von Substanzen, die Blut- Hirn- Schranke zu penetrieren, hängt u.a. von der Struktur, der Lipidlöslichkeit, der elektrischen Ladung und der Molekülgröße ab (Benet et al. 1996; Bradbury 2000). Substanzen mit einer hohen Molekülgröße, die relativ hydrophil sind und eine elektrische Ladung besitzen, können die Blut- Hirn- Schranke schlechter penetrieren als Substanzen mit entgegengesetzten Eigenschaften (siehe auch Abbildung 1). Anticholinerge Substanzen mit quartärer Aminstruktur sind deutlich hydrophiler als tertiäre Amine und können somit im Gegensatz zu diesen die Blut- Hirn- Schranke nicht oder nur sehr schlecht überwinden.

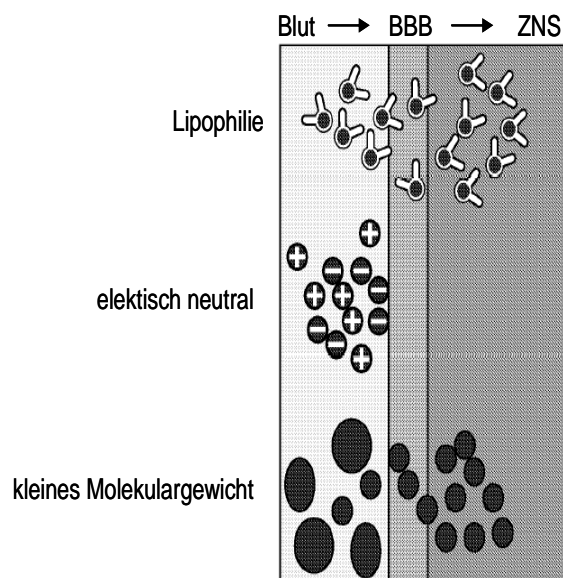


Abbildung 1:
Einflußfaktoren auf die Penetrationsfähigkeit von Substanzen durch die Blut- Hirn- Schranke (BBB). Die Penetrationsfähigkeit ist gesteigert bei hoher Lipophilie, elektrisch neutraler Ladung (niedrigem Ionisierungsgrad) und kleinem Molekulargewicht (modifiziert nach Scheife und Takeda 2005)

Tolterodin ist strukturell (ebenso wie Oxybutynin) den tertiären Ammoniumverbindungen zuzuordnen, Tropiciumchlorid den quartären Ammoniumverbindungen (siehe Abbildung 2). Tolterodin und dessen aktiver Metabolit 5- Hydroxymethyl- Tolterodin (5- HM) sind deutlich we-

niger lipophil als Oxybutynin. Tolterodin ist elektrisch positiv geladen und hat als Tartrat eine geringere Molekülgröße als Oxybutynin. Damit ist die Penetrationsfähigkeit von Tolterodin geringer als die von Oxybutynin einzuschätzen.

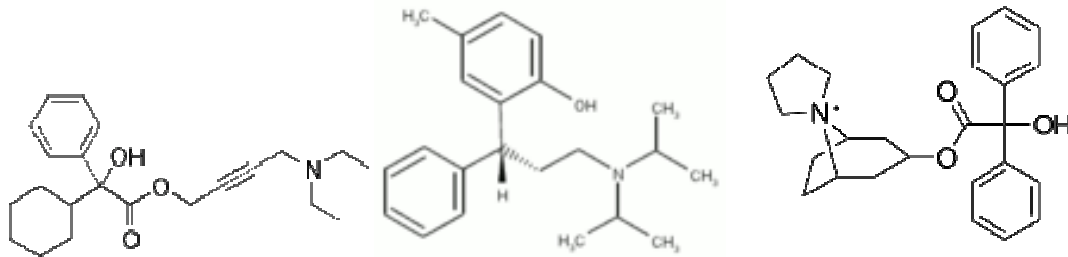


Abbildung 2 Strukturformel der tertiären Ammoniumverbindungen Oxybutynin und Tolterodin sowie der quartären Ammoniumverbindung Trospiumchlorid (von links nach rechts)

Für die Qualität der zentralnervös bedingten Effekte spielen pharmakodynamische Eigenschaften eine bestimmende Rolle. Tolterodin gehört ebenso wie Trospiumchlorid zu den nichtselektiven Antagonisten, Oxybutynin scheint M1- selektive (Donnellan et al. 1997) bzw. M3- selektive (Schwantes, Topfmeier 1999) Eigenschaften zu besitzen.

Bei nichtselektiven cholinergen Antagonisten (z.B. Scopolamin) zeigen sich ausgeprägte Veränderungen der Schlafstruktur, wobei der REM- Schlaf stärker als der NonREM- Schlaf betroffen ist. Neben einer Verringerung des REM- Schlafes um 20 - 60 % zeigen sich eine variable Verlängerung der REM- Latenz um bis zu 130 % sowie ein Anstieg der REM- Aktivität (Sagales et al. 1975; Sitaram et al. 1978; Poland et al. 1989, Poland et al. 1997; McCracken et al. 1997). Bei M1- selektiven Antagonisten sind unterschiedliche Ergebnisse bezüglich ihres Einflusses auf den REM- Schlaf bekannt (McCracken et al. 1997; Velazquez-Moctezuma et al. 1991; Imeri et al. 1992; Salin-Pascual et al. 1993; Zoltoski et al. 1993). M2- selektive Antagonisten wirken sowohl auf die REM- Schlafdauer als auch auf die REM- Latenz (Imeri et al. 1991; Velazquez-Moctezuma et al. 1991; Imeri et al. 1992). M3- selektive Antagonisten zeigen keine Veränderungen auf den REM- Schlaf, jedoch Modifizierungen der NonREM- Schlafstruktur durch Veränderungen des Wach- und Tiefschlafanteils (Imeri et al. 1991, 1992).

1.5.1 Pharmakokinetische Eigenschaften von Tolterodin und deren Beeinflussung durch den CYP2D6- Enzymstatus

Tolterodin wird schnell und komplett absorbiert und erreicht nach 1 bis 3 Stunden seine maximale Serumkonzentration. Die Bioverfügbarkeit ist mit 10 % bis 74 % sehr variabel, unabhängig von der Dosierung.

Plasmaspiegel und Verstoffwechslung von Tolterodin sind abhängig von der Aktivität von Cytochrom P4502D6 (CYP2D6) und damit vom CYP2D6- Genotyp.

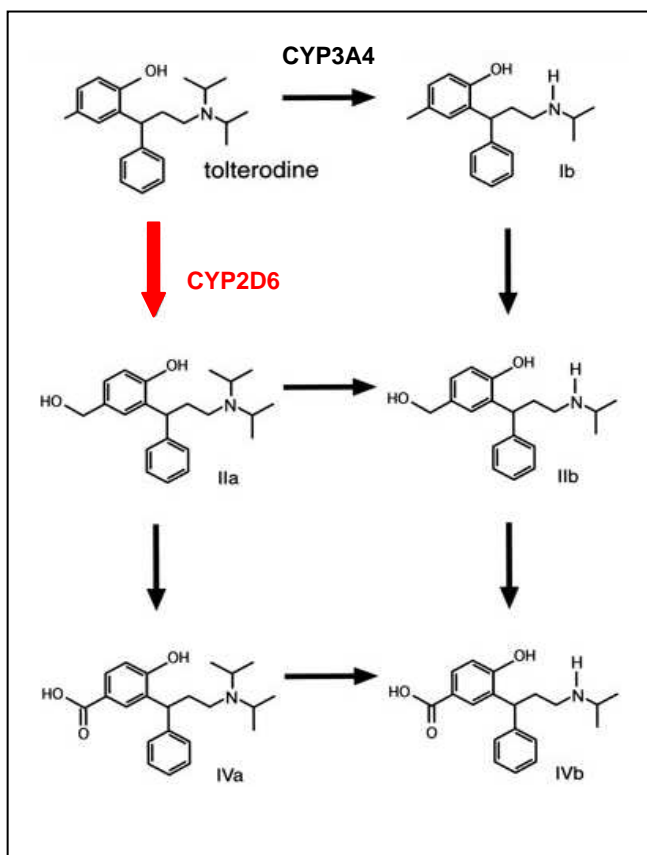


Abbildung 3: Abbauweg von Tolterodin, abhängig vom Enzymstatus bezüglich CYP2D6 (modifiziert nach Brynne et al. 1997)

Ib: N- dealkyliertes Tolterodin

IIa: 5- Hydroxymethyl-Tolterodin

IIb: Dealkyliertes 5- Hydroxymethyl- Tolterodin

IVa: Tolterodin- Carboxylsäure

IVb: Dealkylierte Tolterodin- Carboxylsäure

Bei Personen mit unveränderter CYP2D6- Enzymaktivität (Schnellmetabolisierer = „extensive metabolizer“ = EM) wird Tolterodin via CYP2D6 zu dem aktiven 5- Hydroxymethyl- Metaboliten (5- HM) umgewandelt, welcher wahrscheinlich signifikant zum therapeutischen Effekt von Tolterodin beiträgt (Brynne 1998). Bei Personen ohne CYP2D6- Enzymaktivität

(Langsammetabolisierer = „poor metabolizer“ = PM) wird die Muttersubstanz via CYP3A4 in N- dealkyliertes Tolterodin umgewandelt, welches nicht zum therapeutischen Effekt von Tolterodin beiträgt (Brynne et al. 1998). Ca. 7 % der kaukasischen Bevölkerung sind von einer CYP2D6- Defizienz betroffen, wobei insgesamt 4 Varianten im CYP2D6- Gen (siehe Tabelle 1) für über 95 % der phänotypischen Langsammetabolisierer der kaukasischen Bevölkerung verantwortlich sind (Sachse et al. 1997, Griese et al. 1998).

Tabelle 1: Auswahl von CYP2D6- Varianten, genetischer Effekt und Auswirkungen auf die Enzymaktivität (OMIM: 124030, GenBank No. M33388).

Allel CYP2D6	Nukleotid- veränderungen	genetischer Effekt	Enzymaktivität	Referenz
*1	keine	„Wildtyp“	Normal EM	Kimura et al. 1989
*3	2549ins/delA	Verschiebung des Leserasters durch Deletion	Keine PM	Kagimoto et al. 1990
*4	C100T G1846A G4180C	Verschiebung des Spleißsignals durch Punktmutationen	Keine PM	Kagimoto et al. 1990, Gough et al. 1990, Hanioka et al. 1990, Yokota et al. 1993, Marez et al. 1997
*5	CYP2D6 deletiert	CYP2D6- Deletion	Keine PM	Gaedigk et al. 1991, Steen et al. 1995
*6	T1707ins/delT	Verschiebung des Leserasters durch Deletion	Keine PM	Saxena et al. 1994, Evert et al. 1994, Daly et al. 1995

Die Elimination der Tolterodin- Metaboliten erfolgt nach weiteren Metabolisierungsschritten (Oxidation, Dealkylierung) zu 80 % über die Niere. Bei EM hat Tolterodin eine Eliminationshalbwertszeit von 2 bis 3 Stunden, 5- HM von 3 bis 4 Stunden (Brynne et al. 1998). Trotz der kurzen Halbwertszeiten ist wegen der andauernden Effekte der Substanzen auf die Blasenfunktion (Stahl et al. 1995, Brynne et al. 1997) eine zweimal tägliche Gabe ausreichend.

Die verminderte Clearance und verlängerte Halbwertszeit (ca. 10 Stunden) von Tolterodin (Brynne et al. 1998) bei PM bedingen im Vergleich zu EM eine ca. 7- fach höhere Plasmakonzentration. Gleichzeitig lässt sich der pharmakologisch aktive 5- Hydroxymethyl- Metabolit nicht nachweisen. Dies führt dazu, dass bei gleicher Dosierung die Konzentration von ungebundenem Tolterodin bei PM mit der Gesamtmenge des ungebundenen Wirkstoffs und des 5- Hydroxymethyl- Metaboliten bei EM vergleichbar ist.

Somit differieren die pharmakokinetischen Parameter zwischen EM und PM deutlich, was jedoch hinsichtlich des pharmakologischen Effektes eine nur geringe klinische Relevanz darzustellen scheint, da der aktive Metabolit 5- HM signifikant zum pharmakologischen Effekt in EM beiträgt und dieser Effekt bei PM durch Tolterodin allein übernommen wird. Sicherheit, Verträglichkeit und klinische Wirksamkeit der Substanz waren in Studien unabhängig vom Phänotyp in ähnlicher Weise gegeben (Larsson et al. 1999).

Es ist jedoch denkbar, dass Tolterodin und 5- HM die Bluthirnschranke aufgrund unterschiedlicher physiko- chemischer Eigenschaften unterschiedlich gut penetrieren. Auch kann der Metabolismus von Tolterodin durch Substanzen, welche CYP2D6 induzieren bzw. inhibieren, beeinflusst werden. Da Langsammetabolisierer Tolterodin hauptsächlich über CYP3A4 abbauen, ergeben sich hier Interaktionsmöglichkeiten mit Inhibitoren und Induktoren von CYP3A4.

Aufgrund dieser Kenntnisse lässt sich vermuten, dass der CYP2D6- Genotyp für die Wirksamkeit und Sicherheit von Tolterodin Bedeutung hat.

Tabelle 2: Typische Induktoren und Inhibitoren von CYP2D6 und CYP3A4

CYP2D6	Inhibitoren	Induktoren
Psychopharmaka	Fluoxetin, Norfluoxetin, Thioridazin, Sertralin, Moclobemid, Haloperidol	Paroxetin, Carbamazepin, Citalopram,
Andere	Chinidin, Cimetidin	Rauchen
CYP3A4	Inhibitoren	Induktoren
Psychopharmaka	Fluvoxamin, Nefadozon, Norfluoxetin	Carbamazepin
Andere	Erythromycin, Ketokonazol, Verapamil, Dexamethason	Rauchen, Phenobarbital, Phenytoin, Rifampicin

1.5.2 Einfluss des Alters auf die ZNS- Wirkungen anticholinergischer Substanzen

Der Schlaf verändert sich im Alter, er wird, auch bei gutem Gesundheitszustand, fragiler und stör anfälliger. Die weit verbreitete Ansicht, ältere Menschen benötigten weniger Schlaf als jüngere, ist falsch. Häufig besteht lediglich eine Diskrepanz zwischen der Bettliegezeit und dem Schlafbedarf. Während die im Bett verbrachte Zeit beim älteren Menschen zunimmt, bleibt die

echte Schlafzeit weitgehend unverändert, allenfalls verringert sie sich geringfügig (Williams 1974; Bliwise 2005). Im Alter nimmt jedoch die Fähigkeit ab, durchgehend und lange zu schlafen. Die Anzahl der Schlafunterbrechungen nimmt zu (Danker-Hopfer et al. 2005; Bliwise 2005), was sich in häufigeren Schlafstadienwechseln und kurzen Weckreaktionen, so genannten Arousals, äußert. Die Wachzeiten werden länger. Mit zunehmendem Alter verschlechtert sich außerdem die Fähigkeit, einzuschlafen. Weiterhin zeigen sich Veränderungen im Schlafprofil insofern, dass der Anteil des REM- Schlafes im Alter gleich bleibt, der Tiefschlaf sich aber verkürzt (Carskadon, Dement 2005). Im Ausgleich verlängert sich die Leichtschlafzeit (Bliwise 2005; Redline 2004).

Die Wirkung anticholinerg Substanzen auf die Schlafstruktur und die kognitive Funktion ist im Alter, bei Erkrankungen, die den REM- Schlaf beeinträchtigen (wie z.B. Depression) sowie bei Schlafstörungen, deutlich ausgeprägter (Gillin et al. 1991; Nies, Spielberg 1996; Riemann et al. 1994; Poland et al. 1997; Donellan et al. 1997; Katz et al. 1998). Für die verstärkten anticholinergen Nebenwirkungen im Alter sind sowohl Veränderungen der pharmakokinetischen als auch der pharmakodynamischen Eigenschaften verantwortlich.

Den pharmakokinetischen Unterschieden liegen insbesondere Veränderungen bei der Verteilung von Substanzen sowie Veränderungen in der Funktion der Eliminationsorgane zugrunde. Bereits physiologisch kommt es im Alter zu einer Abnahme der Muskelmasse um ca. 20 %, einer Veränderung der anteilmäßigen Zusammensetzung von Flüssigkeit und Fett (Reduktion des Gesamtkörperwassers um ca. 20 %, Anstieg des Körperfettanteils um ca. 50 - 100 %), einem erniedrigten Herzzeitvolumen und einer Reduktion der Plasmaproteinkonzentration um ca. 20 %. Mit zunehmendem Alter nehmen sowohl die Nierenfunktion als auch die hepatische Eliminationsleistung ab. Pathologische Zustände wie z.B. Malnutrition, Dehydratation, Ödeme, Herzinsuffizienz oder Niereninsuffizienz können diese Veränderungen noch weiter beeinflussen.

Für die Bedeutung pharmakodynamischer Veränderungen im Alter spricht eine höhere Frequenz sowie eine höhere Suszeptibilität zentralnervöser Effekte, auch wenn die Dosierung der Substanzen den altersentsprechenden pharmakokinetischen Veränderungen angepasst wird (Nies, Spielberg 1996; Platt, Mutschler 1999).

2 Fragestellung

Anticholinerge Substanzen wie Oxybutynin, Tolterodin, Propiverin und Trosipiumchlorid werden zur Therapie von Symptomen einer überaktiven Blase, welche insbesondere ältere Menschen betreffen, eingesetzt. Relativ häufig limitieren anticholinerge Nebenwirkungen Therapieresultate und Compliance der Patienten.

Unter Tolterodin werden gelegentlich zentralnervöse Effekte, wie Schläfrigkeit, Verwirrtheitszustände und Halluzinationen beobachtet, davon sind am häufigsten ältere Patienten betroffen. Die im Vergleich zu Oxybutynin deutlich niedrigere Rate von zentralnervösen Nebenwirkungen unter Tolterodin wird am ehesten den physikochemischen Eigenschaften zugeschrieben, welche zu einer geringeren Penetrationfähigkeit über die Blut- Hirn- Schranke führt.

Zur Verbesserung der Sicherheit in der Anwendung sowie zur Evaluierung von zentralnervösen Nebenwirkungen und möglichen Auswirkungen auf den Schlaf, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Substanz Tolterodin untersucht und mit einer Placebomedikation verglichen.

Das Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf den Einflüssen des Alters sowie des Metabolisierungsweges, auf der subjektiven und objektiven Schlafstruktur sowie auf kognitiven Parametern nach einer Einmalgabe von Tolterodin am Abend. Dazu wurden die Ergebnisse der Studie an einer jüngeren Probandengruppe mit denen der Studie an der Hauptzielpopulation für diese Medikamente, an über 50 Jahre alten Personen, verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit genetisch bedingte Veränderungen im Cytochrom- P450 CYP2D6 (CYP2D6), und damit im Metabolismus von Tolterodin, zu Unterschieden bei den ZNS- Effekten führen.

3 Material und Methoden

3.1 Probandenauswahl und Ablauf der Studie

Die klinischen Daten wurden aus zwei identisch aufgebauten Studien gewonnen, die sich lediglich im Alter der Probanden unterschieden. Insgesamt wurde an 24 jungen und 24 älteren schlafgesunden Probanden die Akutwirkung von drei verschiedenen Anticholinergika (Tropiumchlorid, Tolterodin und Oxybutynin) gegen Placebo getestet. Im Rahmen der hier vorgestellten Doktorarbeit wurden jedoch nur die Daten zu Tolterodin verwendet.

3.1.1 Probanden

Auf Grundlage der Fallzahlschätzung (s. Biometrie und Statistik) wurde festgelegt, dass in jede Studie jeweils 24 Probanden mit vollständigem Datensatz aufgenommen werden. Entstandene Dropouts wurden ersetzt.

In die erste Studie an **jungen Probanden** wurden Probanden im Alter zwischen 22 und 43 und in die zweite Studie **ältere Probanden** im Alter zwischen 51 und 65 Jahren eingeschlossen. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Probanden untersucht. Alle Probanden waren schlafgesund. Zur Auswahl der Probanden wurde folgende Voruntersuchung durchgeführt.

3.1.1.1 Voruntersuchung

Die Voruntersuchung bestand aus folgenden Teilen:

1. Erhebung von Anamnese und klinischem Status:
Zum Ausschluss einer Schlafstörung wurde von den Probanden vor der ärztlichen Untersuchung ein Schlafragebogen nach Görtelmeyer (B) ausgefüllt (Görtelmeyer 1996). In der Anamnese waren besonders zum Zeitpunkt der Untersuchung bestehende internistische und neurologisch/ psychiatrische Erkrankungen zu eruieren, des Weiteren wurde eine möglichst ausführliche Schlafanamnese erstellt. Der klinische Status umfasste die Überprüfung des Allgemeinzustandes, des kardiovaskulären Systems, der Schilddrüsenmorphologie sowie des Bewegungsapparates.
2. Ableitung eines 12- Kanal EKG's.
3. Blutabnahme zur Bestimmung folgender Labordaten:
Hämatologie: Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl
Klinische Chemie: Kreatinin, Harnstoff, ALAT, ASAT, Gamma- GT

Schilddrüsenfunktion: TSH, fT3, fT4
Urinuntersuchung: Proteine, Glucose
Drogenscreening

Die Voruntersuchung beinhaltete eine vollständige kardiorespiratorische Polysomnographie. Nach vollständiger Durchführung und Auswertung der Voruntersuchung wurden die Ein- und Ausschlusskriterien geprüft und eine Entscheidung über den Einschluss in die Studie getroffen.

3.1.1.2 Nachuntersuchung

Die Nachuntersuchung erfolgte spätestens eine Woche nach der letzten Studiennacht. Sie beinhaltete eine anamnestische Befragung, eine körperliche Untersuchung, eine EKG- Ableitung und die Erfassung unerwünschter Ereignisse. Des Weiteren wurde eine Blutentnahme zur Bestimmung der Laborparameter wie in der Voruntersuchung durchgeführt.

3.1.1.3 Einschlusskriterien

Folgende Kriterien mussten für die Teilnahme an einer der beiden Studien erfüllt sein:

- Alter > 20 Jahre (erste Studie) bzw. > 50 Jahre (zweite Studie)
- Proband ist in der Lage, Umfang und Tragweite der Studie zu verstehen.
- Einverständniserklärung des Probanden zur Teilnahme an der Studie liegt vor.
- altersentsprechender körperlicher Untersuchungsbefund einschließlich EKG und Laborstatus in der Voruntersuchung.
- gesunder Schlaf (Schlaffragebogen nach Görtelmeyer SF- B, Epworth Schläfrigkeitsskala)

3.1.1.4 Ausschlusskriterien

Folgende Kriterien schlossen Probanden von der Teilnahme an diesen klinischen Untersuchungen aus:

- Gravidität, Stillzeit und unzureichende Schwangerschaftsverhütung bei Frauen im gebärfähigen Alter
- Unvermögen des Einhaltens eines regelmäßigen Schlaf- Wach- Rhythmus bzw. des Unterlassens von Kurz- oder Mittagsschlaf am Tag der Adaptations- oder Studiennacht
- Überempfindlichkeit gegen einen der Wirk- oder Hilfsstoffe der Studienmedikation

-
- anamnestischer Hinweis auf das Vorliegen einer der folgenden Erkrankungen:
Funktionsstörungen der Schilddrüse (außer euthyreote Struma),
 - Diabetes mellitus sowie bekannte Glukosetoleranzstörungen,
 - Myasthenia gravis,
 - Erkrankungen oder Operationen des Gastrointestinaltraktes, die Kontraindikationen für einen der Wirkstoffe darstellen oder die Resorption beeinflussen
 - akute und chronische Lebererkrankungen, Cholangitis, Verschlussikterus,
 - Pankreatitis,
 - akute und chronische Nierenerkrankungen, obstruktive Harnabflussstörungen verbunden mit dem Risiko des Harnverhalts,
Herz- Kreislauferkrankungen, Herzrhythmusstörungen (Ausnahme: behandelter Hypertonus ohne Einnahme von Beta- Blockern),
 - Zerebralsklerose, akute und/ oder chronische psychiatrische/ neurologische Erkrankungen
 - systemische Erkrankungen (z.B. Kollagenosen, hämatologisch- onkologische Erkrankungen),
 - Engwinkelglaukom,
 - unzulässige Begleitmedikation während bzw. 7 Tage vor Studienbeginn:
Anticholinergika und Cholinergika bzw. Arzneimittel mit anticholinergen oder cholinergen Wirkungen wie z. B. Amantadin und andere Antiparkinsonmittel, Antihistaminika, Neuroleptika, Chinidin, trizyklische Antidepressiva, Atropin und verwandte Verbindungen,
beta- Sympathikomimetika, Medikamente, welche die Schlafstruktur bzw. die Schlafqualität beeinflussen wie z.B. Benzodiazepine, trizyklische Antidepressiva, motilitätsanregende Arzneimittel wie z. B. Metoclopramid, Cisaprid, Medikamente, welche CYP2D6 und 3A4 beeinflussen, wie z. B. Fluoxetin, Makrolidantibiotika (Erythromycin, Clarithromycin), Antimykotika wie z.B. Ketoconazol, Itraconazol, Miconazol.
 - Einnahme von zentralwirksamen Medikamenten in den letzten 2 Monaten vor Studienbeginn
 - Alkohol- und/ oder Drogenabusus
 - Rauchen (häufiger als 1x pro Woche, bzw. positiver Cotinin- Test in der Zeit zwischen Vor- und Nachuntersuchung)

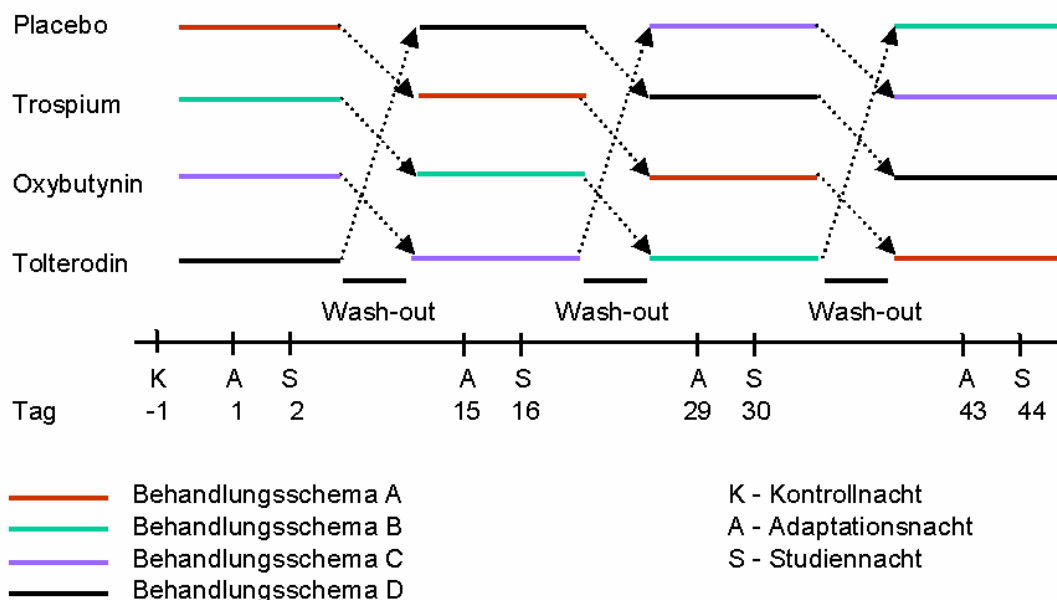
- Teilnahme an anderen klinisch- pharmakologischen Prüfungen innerhalb der letzten 4 Wochen oder Blutspende (≥ 400 ml) innerhalb der letzten 3 Monate.

3.1.2 Prüfdesign

Es handelt sich um eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Untersuchung im 3-fach Cross- over- Design.

Im Rahmen der Untersuchung verbrachten die Probanden insgesamt acht Nächte im Schlaflabor und unterzogen sich Polysomnographien sowie kognitiven Tests. Diese acht Nächte setzten sich aus vier Versuchsblöcken zu je zwei Nächten zusammen, wobei die Versuchsblöcke jeweils gleich abliefen.

Die erste Nacht diente der Adaptation, die zweite Nacht stellte die eigentliche Studiennacht dar, deren Ergebnisse für die Auswertung der Studie verwendet wurden. Die Einnahme der Medikation erfolgte als Einmalgabe zu Beginn der Studiennacht. Im Anschluss an die zwei Nächte im Schlaflabor folgte jeweils eine mindestens 14- tägige Auswaschphase.



Insgesamt dauerte die Studie (ohne Voruntersuchung, Kontrollnacht und Nachuntersuchung) für jeden Probanden mindestens 44 Tage.

3.1.3 Untersuchungsdurchführung

Am Abend jedes Untersuchungstages fand sich der Proband um 20.00 Uhr im Schlaflabor des Institutes für Klinische Pharmakologie ein. Die Medikation wurde jeweils vor der Studiennacht (zweiter Untersuchungstag des Versuchsblocks, entsprechend Tag 2, 16, 30, 44) um 20.30 Uhr vom Probanden eingenommen.

Die Untersuchungs Nächte wurden immer mit dem gleichen Ablauf durchgeführt:

1. 20.00 Uhr Ankunft im Schlaflabor
2. Ausfüllen des Abendprotokolls der DGSM
3. Abendtoilette
4. 20.30 Uhr Einnahme der Abendmedikation unter Aufsicht
5. Anlegen der Elektroden
6. 21.30 Uhr Durchführung der kognitiven Tests
7. Bioeichung
8. 22.30 Uhr Beginn der Schlafableitung

9. am Morgen Beendigung der Schlafableitung (Zeitpunkt nach Wunsch des Probanden, jedoch max. 6.30 Uhr)
10. Entfernen der Elektroden
11. Morgentoilette
12. Ausfüllen des Morgenprotokolls der DGSM
13. Frühstück
14. Kontrolle des Ablaufes und Befragung
15. Entlassung des Probanden nach Hause

Die Probanden wurden gebeten, am Abend nach der letzten Nacht jedes Versuchsblockes (Tag 3, 17, 31, 45) das Abendprotokoll selbständig auszufüllen und zum Beginn des nächsten Versuchsblockes mitzubringen.

3.1.4 Studienmedikation

Die Prüfpräparate wurden als Oblatenkapseln in äußerlich gleicher Form gegeben. Die Einnahme der Medikamente erfolgte gemäß der üblichen Dosierung, in der diese Medikamente für die Behandlung von Detrusor- Instabilität oder Detrusor- Hyperreflexie angewendet werden. Die Einnahme erfolgte eine Stunde vor den kognitiven Tests bzw. zwei Stunden vor dem Schlafenlegen. Jeder Proband erhielt in randomisierten Reihenfolge:

- Trospiumchlorid 45 mg (3 Oblatenkapseln mit jeweils 1 Tablette à 15 mg),
- Oxybutynin 15 mg (3 Oblatenkapseln mit jeweils 1 Tablette à 5 mg)
- **Tolterodin 4 mg** (2 Oblatenkapseln mit jeweils 1 Tablette à 2 mg und 1 Oblatenkapsel mit 1 wirkstofffreien Tablette)
- Placebo (3 Oblatenkapseln mit je 1 wirkstofffreien Tablette).

3.1.5 Polysomnographie

3.1.5.1 Ableitung der Polysomnographie

Die Schlafableitung fand im Probandenbereich des Institutes für Klinische Pharmakologie der Charité in speziell dafür eingerichteten, abdunkelbaren, gut ventilerten Räumen statt. Es wurden maximal zwei Probanden gleichzeitig in identischen, aber voneinander getrennten Räumen abgeleitet. Der Nachtdienst hielt sich in einem von diesen beiden Räumen getrennten Monitorraum auf, von dem aus beide Probanden mittels Infrarot- Kamera und Wechselsprechanlage überwacht wurden.

Die Schlafableitung beinhaltete entsprechend den Empfehlungen zur Durchführung einer kardi-respiratorischen Polysomnographie folgende Parameter:

- EEG: 4 unipolare Ableitungen entsprechend dem 10- 20- System (C3, O1 gegen A2; C4, O2 gegen A2)
- 2 EOG- Kanäle (rechte und linke Ableitung)
- 2 EMG- Kanäle (submental und tibial)
- EKG (Dipol)
- thorakale und abdominelle Atmungsanstrengung (piezoelektrische Messung)
- Pulsoximetrie (Ableitung am Finger)
- Nasenfühler (Thermistor)
- Kehlkopfmikrofon

Zur Ableitung dieser Signale wurde das System Alice3 (Heinen Löwenstein) verwendet. Vor Beginn der Aufzeichnung wurde eine technische und biologische Eichung durchgeführt. Für jeden Kanal wurde eine optimale Amplitude eingestellt, die während der Aufzeichnung nicht verändert wurde.

3.1.5.2 Auswertung der Polysomnographie

Die Auswertung der polysomnographischen Aufzeichnung zur Beurteilung des Schlafprofils erfolgte wegen der unzureichenden automatischen Schlafstadienerkennung visuell in 30- s- Epochen nach den üblichen Regeln (Rechtschaffen, Kales 1968). Die Analyse der Schlafsta-

dien ermöglichte die Darstellung der Makrostruktur nach den auf internationaler Ebene üblichen Auswertungskriterien.

Tabelle 2: Parameter zur Beschreibung des Schlafprofils

Abkürzung	Definition	Einheit
TST	Gesamtschlafzeit = Dauer von REM + NonREM	min
TIB	Zeit im Bett (von Licht löschen bis Licht anschalten)	min
SE	Schlafeffizienz = Anteil der TST an TIB x 100	%
REM	Schlafstadium REM	% von TST
NonREM1	Schlafstadium 1	% von TST
NonREM2	Schlafstadium 2	% von TST
SWS	Tiefschlaf (= Schlafstadium 3 + Schlafstadium 4)	% von TST
SO	Sleep Onset = Einschlaf latenz Zeit vom Lichtlöschen bis zum Schlafbeginn (= erste von mindestens sechs 30- s- Epochen kontinuierlichen S2)	min
SWS- L	Zeit vom Schlafbeginn bis zur ersten Epoche SWS	min
REM- L	Zeit vom Schlafbeginn bis zur ersten Epoche REM	min

3.1.6 Kognitive Testverfahren

Im Verlauf der Studie wurden zwei verschiedene Testverfahren eingesetzt:

- der Zahlen- Verbindungs- Test (ZVT)
- der d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test (d2- Test)

Der ZVT (Oswald, Roth 1998) dient der Erfassung der basalen, allen Intelligenzleistungen zugrunde liegenden, weitgehend milieunabhängigen und genetisch bedingten kognitiven Leistungsgeschwindigkeit. Diese korrespondiert mit jenen Fähigkeitsbündeln, welche in der Literatur als „flüssige“ Intelligenz oder „Bearbeitungsgeschwindigkeit“ bezeichnet werden. Dem Probanden wurden bei jeder kognitiven Testreihe 4 ZVT- Bögen vorgelegt. Gemessen wurden die Reaktionszeiten bei der Bearbeitung der vier Bögen, woraus die mittlere Reaktionszeit pro Testreihe berechnet wurde.

Der d2- Test (Brickenkamp 1998) stellt eine standardisierte Weiterentwicklung der so genannten Durchstreichtests dar. Er misst Tempo und Sorgfalt des Arbeitsverhaltens bei der Unterscheidung ähnlicher visueller Reize (Detail- Diskrimination) und ermöglicht damit die Beurteilung individueller Aufmerksamkeits- und Konzentrationsleistungen. Der Proband wurde gebeten, in einer vorgegebenen Zeit alle richtigen Buchstaben zu markieren. Gemessen wurde die Anzahl der bearbeiteten Zeichen (GZ) sowie die Anzahl der Fehler (F). Aus beiden Größen wurde der Gesamtleistungswert als Differenz aus der Anzahl der bearbeiteten Zeichen und der Fehleranzahl (GZ- F) berechnet

3.1.7 Fragebögen

Im Verlauf der Studie wurden vier verschiedene Fragebögen eingesetzt:

- modifiziertes Abendprotokoll der DGSM
- modifiziertes Morgenprotokoll der DGSM
- Fragebogen B nach Görtelmeyer (SF- B)
- Epworth Schläfrigkeitsskala (ESS)

3.1.7.1 Morgen- und Abendprotokolle

Während des Aufenthaltes im Schlaflabor wurden modifizierte Morgen- und Abendprotokolle der Deutschen Gesellschaft für Schlafmedizin und Schlafforschung (DGSM) verwendet. Sie wurden zur Einschätzung der subjektiven Schlafparameter und Befindlichkeit sowie zur Kontrolle der Compliance verwendet. Die in den Original- Schlafragebögen der DGSM (Hoffmann 1997) enthaltenen Ordinalskalen (von 1 bis 5) wurden durch Intervallskalen (in Form von visuellen Analogskalen) ersetzt. Die Items wurden beibehalten. Visuelle Analogskalen (VAS) wurden bereits bei anderen Schlafragebögen, wie beispielsweise dem VIS- M und dem VIS- A (Ott et al. 1996), zur Evaluierung der subjektiven Befindlichkeit eingesetzt. Auf den VAS sollten die Probanden auf einer horizontalen Linie zwischen der negativsten und positivsten Auswahlmöglichkeit den Punkt markieren, welcher ihren jeweiligen Empfindungen entsprach. Die Linie wurde in 100 Abschnitte eingeteilt, wobei die negativste Alternative mit 0 Punkten bewertet wird, die positivste mit 100 Punkten. Die Anordnung der positiven und negativen Eigenschaften auf der rechten oder linken Seite der Linie wurde variiert, um Automatismen beim Ausfüllen zu vermeiden.

Das Morgenprotokoll enthielt Fragen zur Morgenbefindlichkeit, zur Erholbarkeit des Schlafes, zum Einschlafen, zum Durchschlafen, zu Träumen, zum Erwachen am Morgen, zur Schlafdauer, zu Störungen während der Nacht sowie zu Medikamenteneinnahmen am Abend und während der Nacht.

Im Abendprotokoll sollten Fragen zur Befindlichkeit am Abend, zur Tagesbefindlichkeit, zur Tagesmüdigkeit und Schlaf am Tage, zu Belastungen während des Tages, zur Einnahme von koffeinhaltigen Getränken, Alkohol oder Nikotin im Laufe der letzten vier Stunden sowie zur Medikamenteneinnahme am Tage beantwortet werden.

Das Ausfüllen der Protokolle wurde unter standardisierten Bedingungen unter der Aufsicht des Nachtdienstes durchgeführt. Dieser war auch für die Kontrolle auf Vollständigkeit verantwortlich. Das Abendprotokoll wurde bei Einnahme der Studienmedikation, das Morgenprotokoll vor dem Frühstück am Morgen ausgefüllt.

Aus den Morgen- und Abendprotokollen wurden folgende Parameter zur subjektiven Bewertung des Schlafes ausgewählt:

- | | | |
|-----------------|-------------------|--------------------------|
| – Einschlafzeit | als Angabe in min | aus dem Morgenprotokoll, |
| – Schlafdauer | als Angabe in min | aus dem Morgenprotokoll |

sowie zur Bewertung der Befindlichkeit am Morgen und während des Tages:

- | | | |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|
| – Schlafqualität | als VAS von 0 bis 100 | aus dem Morgenprotokoll, |
| – Morgenbefinden | als VAS von 0 bis 100 | aus dem Morgenprotokoll, |
| – Leistungsfähigkeit | als VAS von 0 bis 100 | aus dem Abendprotokoll. |

(Morgen- und Abendprotokolle siehe folgende Seiten)

Universitätsklinikum Charité Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin Schlafmedizinisches Zentrum Luisenstr. 13a, 10117 Berlin Tel.: (030) 2802 4855	Datum:
	Name, Vorname:

Abendprotokoll

1. Wie fühlen Sie sich jetzt?

|-----|
 bedrückt unbeschwert

|-----|
 matt frisch

|-----|
 angespannt entspannt

2. Schätzen Sie den heutigen Tag ein:

Wie leistungsfähig waren Sie heute?

|-----|
 unproduktiv sehr leistungsfähig

Wie energiegeladen fühlten Sie sich?

|-----|
 müde, abgespannt frisch, energiegeladen

Wie ausgeglichen fühlten Sie sich heute?

|-----|
 nervös, labil ruhig, entspannt

3. Haben Sie sich heute müde oder erschöpft gefühlt?

JA / NEIN

- wenn ja: ein wenig müde ziemlich müde sehr müde
 ein wenig erschöpft ziemlich erschöpft sehr erschöpft

4. Haben Sie heute tagsüber geschlafen? JA / NEIN

wenn ja: Wie lange insgesamt: ca. _____ min Wie oft: _____ mal
 Zu welchen Zeiten: _____

5. Hat es für Sie heute besonders starke Belastungen gegeben? JA / NEIN

wenn ja: körperlicher Natur geistiger Natur seelischer Natur

6. Haben Sie in den letzten 4 Stunden Genußmittel zu sich genommen?

JA / NEIN

wenn ja:

	Menge	War dies für Sie im Vergleich mit den letzten zwei Wochen:
Kaffee oder Tee	_____ Tassen	<input type="radio"/> wenig <input type="radio"/> normal <input type="radio"/> viel
Cola	_____ Gläser	
Bier (0,2 Liter)	_____ Gläser	<input type="radio"/> wenig <input type="radio"/> normal <input type="radio"/> viel
Wein oder Sekt	_____ Gläser	
Schnaps, Cognac, Likör	_____ Gläser	
Zigaretten	_____ Stück	<input type="radio"/> wenig <input type="radio"/> normal <input type="radio"/> viel
Zigarren oder Pfeifen	_____ Stück	

7. Haben Sie heute Medikamente eingenommen? JA / NEIN

wenn ja:

Präparat	Uhrzeit und Dosis	Uhrzeit und Dosis	Uhrzeit und Dosis	Uhrzeit und Dosis

Universitätsklinikum Charité Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität Berlin Schlafmedizinisches Zentrum Luisenstr.13a, 10117 Berlin Tel.: (030) 2802 4855	Datum:
	Name, Vorname:

Morgenprotokoll

1. Wie fühlen Sie sich jetzt?

-----	-----
bedrückt	unbeschwert
-----	-----
müde, erschöpft	frisch, ausgeruht
-----	-----
angespannt	entspannt

2. Wie erholsam war Ihr Schlaf?

-----	-----
ausgezeichnet	gar nicht erholsam

3. Wie gut sind Sie gestern eingeschlafen?

-----	-----
gar nicht	sofort

Dauer bis zum Einschlafen: ca. ____ Std. ____ min


War dies für Sie im Vergleich mit den letzten zwei Wochen:

sehr kurz
 kurz
 normal
 lang
 sehr lang

4. Woran hat es gelegen, wenn Sie schlecht einschlafen konnten?

- | | | |
|--|--|--|
| <input type="radio"/> persönliche Probleme | <input type="radio"/> berufliche Probleme | <input type="radio"/> Geräusche/Lärm |
| <input type="radio"/> ungewohnte Schlaf-
umgebung | <input type="radio"/> körperliche
Mißempfindungen | <input type="radio"/> Beschäftigung mit
Banalitäten |
| <input type="radio"/> konnte nicht aufhören zu
denken | <input type="radio"/> Innere Unruhe | <input type="radio"/> Weiß ich nicht |
| <input type="radio"/> Sonstiges: _____ | | |

5. Wie häufig sind Sie in der Nacht aufgewacht?



 ständig gar nicht

Anzahl: ca. _____ mal

War dies für Sie im Vergleich mit den letzten zwei Wochen: selten normal häufig

wenn ja, wie lange waren Sie insgesamt wach: ca. _____ Std. _____ min

War dies für Sie im Vergleich mit den letzten zwei Wochen: kurz normal lang

6. Sofern Sie nachts wach wurden, woran hat es gelegen?

- Hunger oder Durst mußte zur Toilette starkes Schwitzen
 Atembeschwerden Herzbeschwerden Schmerzen
 Geräusche/Lärm hatte geträumt persönliche Probleme
 berufliche Probleme weiß ich nicht
 Sonstiges

7. Sofern Sie Schwierigkeiten mit dem Wiedereinschlafen hatten, woran hat es dann gelegen?

- persönliche Probleme berufliche Probleme Geräusche/Lärm
 ungewohnte Schlaf-
umgebung körperliche
Mißempfindungen Beschäftigung mit
Banalitäten
 konnte nicht aufhören zu
denken Innere Unruhe Weiß ich nicht
 Sonstiges: _____

8. Haben Sie heute nacht geträumt?

- wenn ja: kurz normal lang
 angenehm neutral unangenehm

9. Wann sind Sie heute nacht endgültig aufgewacht? _____ Uhr

Wann sind Sie aufgestanden? _____ Uhr

Wurden Sie zuletzt von alleine wach geweckt

Empfanden Sie das als zu früh genau richtig zu spät

10. Wie lange haben Sie heute nacht insgesamt geschlafen?

|-----|
gar nicht ausreichend

Dauer: ca. _____ Std. _____ min

War dies für Sie im Vergleich mit den letzten zwei Wochen:

sehr kurz kurz normal lang sehr lang

**11. Haben Sie vor dem Schlafengehen oder während der Nacht
Medikamente eingenommen?**

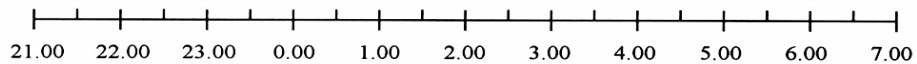
Präparat	Uhrzeit	Dosis

12. Wurden Sie heute nacht gestört durch:

	nein	bemerkt, nicht störend	leicht gestört	sehr gestört
Elektroden				
Geräusche				
Raumklima				
Sonstiges:				

bitte wenden =>

13. Bemerkenswerte Tages- oder Nachtereignisse:

**14. Bitte markieren Sie mit einem Pfeil,
wann Sie eingeschlafen und wann Sie endgültig aufgewacht sind!****Bitte kreuzen Sie in den Kästchen an (1/2 Stunde) an,
in welchen Zeiten Sie wach gelegen haben!**

3.1.7.2 Schlafragebogen B nach Görtelmeyer

Der SF- B wurde zur Voruntersuchung ausgefüllt und erhebt Daten zu schlafrelevanten Ereignissen während der letzten zwei Wochen. Dadurch konnte das Bestehen einer Schlafstörung in diesem Zeitraum verifiziert werden. Die Items des Fragebogens wurden zu folgenden Faktoren zusammengefasst:

- SQ Schlafqualität
- GES Gefühl des Erholtseins nach dem Schlaf
- PSYAA Psychische Ausgeglichenheit am Abend
- PSYEA Psychische Erschöpftheit am Abend
- PSS Psychosomatische Symptome

Die Faktoren SQ und GES wurden mit den Werten $SQ > 3,5$ und $GES > 2,5$ als Kriterium für einen gesunden Schlaf verwendet.

3.1.7.3 Epworth Schläfrigkeitsskala

Die ESS erhebt retrospektiv Daten zur Tagesschläfrigkeit in acht typischen Alltagssituationen. Dadurch kann das Bestehen von Schlafstörungen, speziell von Hypersomnien, verifiziert werden. Ein ESS- Gesamtscore ≤ 11 wurde als Kriterium für einen gesunden Schlaf verwendet.

3.2 Genotypisierung

3.2.1 Blutentnahme

Das zur Genotypisierung benötigte Vollblut wird über eine Venenpunktion in ein 9 ml EDTA-Röhrchen der Fa. Sarstedt aufgenommen und zwecks Durchmischung geschüttelt. Die Röhrchen werden eindeutig mit der Probandenidentifikation gekennzeichnet.

3.2.2 DNA- Extraktion

3.2.2.1 Material für die DNA- Extraktion

Geräte: DNA Extraktor: MagNa Pure LC (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)

Reagenzien: Extraktionszubehör: MagNa Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)

3.2.2.2 DNA- Extraktion mit dem MagNa Pure LC

Die DNA- Extraktion erfolgt mit dem vollautomatischen MagNa Pure LC der Firma Roche. Dazu werden je 200 µl Blut in eine 96er Platte gegeben und in dem Gerät platziert. Anschließend erfolgt automatisch die Zugabe von Lysierungs- und Bindungspuffer, welche für eine komplette Zellauflösung sorgen. Nach der Denaturierung liegt die DNA als freies Molekül vor. Durch Zugabe von Proteinkinase K werden die zellulären Proteine verdaut. Die ebenfalls im Lysierungs- und Bindungspuffer enthaltenen chaotropischen Salze und die hohe ionische Stärke des Puffers sorgen dafür, dass die DNA an die siliziumbeschichtete Oberfläche der magnetischen Glaspartikelsuspension binden kann. Danach wird der Waschpuffer I hinzugegeben, welcher Proteine (Nukleasen) und Zellmembranen sowie PCR- Inhibitoren wie Heparin und Hämoglobin entfernt. Der Waschpuffer II entfernt Verunreinigungen (Zellreste) und vermindert die Konzentration chaotropischer Salze. Die DNA wird dann bei erhöhter Temperatur in 100 µl Lösungspuffer gegeben. Nach dem Abkühlen ist die DNA gebrauchsfertig.

3.2.3 Detektion von Mutationen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) und des Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus (RFLP)

3.2.3.1 Material für PCR und RFLP

Geräte: Hochleistungsthermocycler 9700 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

Hochleistungsthermocycler 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, USA)

Zentrifuge GS- 6R (Beckman, USA)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Reagenzien: Biotherm™ DNA Polymerase (Rapidozym, Berlin)

Expand™ Long Template PCR System (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim)

MgCl₂ (Rapidozym, Berlin)

10xPuffer (Rapidozym, Berlin)

2, 3- Desoxy- guanosin- 5- triphosphat, dGTP (Rapidozym, Berlin)

2, 3- Desoxy- thymidin- 5- triphosphat, dTTP (Rapidozym, Berlin)

2, 3- Desoxy- adenosin- 5- triphosphat, dATP (Rapidozym, Berlin)

2, 3- Desoxy- cytosin- 5- triphosphat, dCTP (Rapidozym, Berlin)

Oligonukleotid- Primer (TIB Molbiol, Berlin)

Restriktionsendonuklease *Bst* NI (New England BioLabs, Frankfurt a.M.)

Inkubationspuffer NEB blau

Restriktionsendonuklease *Bsa* AI (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot)

Inkubationspuffer NEB rot

Lösungen: dNTP- Lösung; dGTP (2mM), dTTP (2mM), dATP (2mM), dCTP (2mM)

3.2.3.2 Funktionsprinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht es, spezifische DNA- Fragmente mit Hilfe einer DNA- Polymerase zu vervielfältigen (Mullis et al. 1986). Zu Beginn der Reaktion wird der zu amplifizierende DNA- Doppelstrang thermisch denaturiert. An der einzelsträngigen Matrizen- DNA hybridisieren dann antiparallel zueinander als Startermoleküle zwei synthetische DNA- Oligonukleotide (Primer). Durch Anwesenheit von dNTPs, 10xPuffer und MgCl₂ kann gezielt die DNA- Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigt werden. Bei der kontinuierlichen Durchführung der PCR- Zyklen, der Denaturierung, Hybridisierung der Primer (Annealing) und Polymerisierung zum Doppelstrang (Elongation) entsteht ein spezifisches, exponentiell vermehrtes DNA- Fragment. Für jede PCR muss die optimale Anlagerungstemperatur für die Primer ermittelt werden, da diese von der Länge der Primer und deren Nukleotidfolge abhängt.

Die Reaktionsprodukte werden nachgewiesen, indem ein Teil des Amplifikates auf Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt wird. Bei jedem Versuch wird eine Negativprobe mitgeführt, um gegebenenfalls Kontaminationen erkennen zu können.

Die Detektion von Mutationen kann direkt während der PCR erfolgen oder durch sich anschließende Reaktionen.

3.2.3.3 Bestimmung von Mutationen mit Restriktionsfragmentlängen- Polymorphismus (RFLP)

Um Mutationsstellen nachzuweisen, nutzt man Restriktionsendonukleasen. Sie sind eine Gruppe bakterieller Enzyme, welche sequenzspezifisch DNA- Doppelstränge spalten. Da Nukleotidsubstitutionen zu Veränderungen in der Erkennungssequenz der Endonukleasen führen, kommt es so zum Verlust oder Neuauftreten einer Schnittstelle. Es resultieren Restriktionsfragmente unterschiedlicher Länge. Durch eine anschließende Elektrophorese lassen sich die Fragmente der Größe nach zuordnen und auf diese Art Mutationsstellen identifizieren.

3.2.3.4 Material für die Gelelektrophorese

Material: Elektrophoresekammer (Protrans, Ketsch)

Elektrophoresekammer BioRad Power PAC 200 (BioRad)

Elektrophoresenetzgerät 500/500 (Renner GmbH, Dannstadt)

Geldokumentationssystem Eagle Eye®II (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Mikrowelle (Samsung, M1712N)

Reagenzien: 100- bp- DNA- Längenleiter (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot)

100- bp- DNA- Längenleiter plus (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot)

1- kb- DNA- Längenleiter (MBI Fermentas GmbH, St. Leon- Rot)

Agarosepulver, Eurogentec (Molecular Biology Grade Agarose)

Sybr® Green (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA)

Sephadex™ G 50 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)

Lösungen: TBE- Puffer: Tris (900 mM), Borsäure (900 mM), EDTA (2,5 mM), pH 8

DNA- Probenlaufpuffer: Bromphenolblau (0,25 %), Ficoll Typ 400 (15 %), 1xTBE(1 %)

3.2.3.5 Funktionsprinzip der Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese kommt es zur Auftrennung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Die dabei verwendeten Gele dienen durch Ausbildung einer Netzstruktur als Molekularsieb. Dieses behindert die Wanderung größerer Moleküle stärker als die der kleineren. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern DNA-Fragmente durch Agarosegele und können so identifiziert werden. Die Agarosekonzentration und die Dauer der Elektrophorese richten sich nach der Größe der zu separierenden Fragmente.

Die Gele werden nach der Elektrophorese in einer Sybr Green®-haltigen Lösung unter Schütteln gebadet. Diese Lösung enthält 25 µl Sybr Green® und 500 ml 1xTBE-Puffer. Anschließend werden die Gele unter UV-Licht im Eagle Eye®II fotografiert.

3.2.3.6 Herstellung der Agarosegele

Die hier verwendeten Agarosegele werden hergestellt, indem 300 ml 1xTBE-Puffer mit einer dem Prozentsatz entsprechenden Menge Agarosepulver in einem Mikrowellengerät gekocht werden. Die Gele werden dann in vorgefertigte Schlitten mit eingelegten Kämmen zur Ausformung der Geltaschen gegossen. Wenn die Gele erstarrt sind, werden sie in mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammern eingesenkt.

3.2.4 Detektion von Mutationen auf dem *CYP2D6*- Gen mit PCR und RFLP

Zur Genotypisierung der Probanden werden die Polymorphismen 2549ins/delA (*3), G1846A (*4) und 1707ins/delT (*6) sowie die Deletion des gesamten Gens (*5) und die Genduplikation (*MxN) mittels PCR- RFLP bestimmt. Die Position der Mutationen sowie Primer und Schnittstellen werden (wenn nicht anders ausgewiesen) entsprechend der Referenzdatenbanken dargestellt (OMIM: 124030, GenBank No. M33388).

Zunächst wird ein 5750- bp- Fragment amplifiziert (3.2.4.1), welches alle 9 Exons von *CYP2D6* enthält und als Ausgangsmaterial für nested- PCR- RFLP- Tests verwendet wird, mit deren Hilfe die Allele *3 (3.2.4.3), *4 und *6 (3.2.4.2) detektiert werden. Im Anschluss erfolgt die Detektion der Deletion (3.2.4.4) und der Duplikation (3.2.4.5).

3.2.4.1 Amplifikation des 5750 bp- Fragmentes

Dieses Fragment wird mit Hilfe des Expand™ Long PCR- Systems amplifiziert.

Tabelle 3 Primer für die Amplifikation des 5750 bp- Fragmentes

Primer	Spezifität	Primerlänge	Position	Nukleotidsequenz
LA- F01	(5')	23 bp	598- 620	5'- CCA gAA AgC AgT ggA ggA ggA Cg
LA- R01	(3')	23 bp	6347- 6325	5'- CCT ggC ATA Tag CTC CCT gAC gC

Der PCR- Mastermix besteht aus Mastermix 1 (gesamt 15 µl) und Mastermix 2 (gesamt 10 µl). Mastermix 1 enthält je 0,75 µl der Primer (10 µM), 6,25 µl dNTP (Rapidozym, 2 mM), 0,55 µl Biotherm- Polymerase und 6,7 µl H₂O (bidest, steril). Zum Mastermix 1 werden 2 µl genomische DNA und zum Abschluss Mastermix 2 dazugegeben, welcher aus 2,7 µl 10x Expand- Puffer 2, 2,5 µl 0,1U/µl PWO und 4,8 µl H₂O (bidest, steril) besteht. Nach kräftigem Mischen und Abzentrifugieren, findet die Reaktion im programmierbaren Thermocycler statt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Temperaturzyklen des programmierbaren Thermocyclers zur Amplifikation des 5750- bp- Fragmentes

„Hot start“: vor dem Positionieren der Proben Thermocycler auf 85°C vorheizen				
Vordenaturierung		94°C	2 min	
35 Zyklen	Denaturierung	96°C	10 s	Rampe von 50 % 40 s
	Annealing	57°C	20 s	Rampe von 50 % 40 s
	Elongation	68°C	5 min	
Endelongation		68°C	7 min	

Die Gelelektrophorese zur Kontrolle des PCR- Produktes erfolgt bei 120 Volt für 45 min. Proben mit einem Fragment bei 5750 bp sind positiv für diese PCR. Die PCR- Produkte werden mit PCR- Wasser auf 1:5 verdünnt und bei 4°C gelagert.

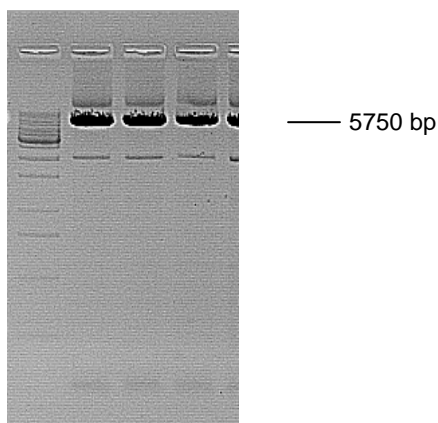


Abbildung 4: PCR- Kontrolle des 5750- bp- Fragmentes

3.2.4.2 Identifikation von CYP2D6*4 (G1846A) und *6 (1707Tins/del) mittels PCR- RFLP

Als Ausgangsmaterial für diese Reaktion wird das amplifizierte 5750- bp- Fragment verwendet (s. 3.2.4.1). Mittels nested- PCR wird zunächst ein 353- bp- Fragment hergestellt.

Tabelle 5 Primer für die Amplifikation des 353- bp- Fragmentes

Primer	Spezifität	Primerlänge	Position	Nukleotidsequenz
Primer P*3 (5')		25 bp	3301 - 3325	5'- CCT ggg CAA gAA gTC gCT ggA CCA g
Primer P2 (3')		19 bp	3654 - 3635	5'- gAg ACT CCT Cgg TCT CTC g

Der Mastermix enthält 2,0 µl 10x Gene Craft Puffer, 0,6 µl MgCl₂ (50 mM), 2,0 µl dNTPs (2mM), 0,5 µl je Primer (10 mM), 0,2 µl Biotherm- Polymerase und wird auf 25 µl mit H₂O (steril, bi-

dest.) aufgefüllt. Zu 20 µl dieses Mastermixes wird 1,2 µl verdünntes PCR-Produkt (3.2.4.1) dazugegeben. Nach kräftigem Mischen und Abzentrifugieren, findet die Reaktion im programmierbaren Thermocycler statt. Nach der Vordenaturierung (94°C für 2 min) werden 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C für 30 s), Annealing (60°C für 10 s) und Elongation (72°C für 1 min) durchgeführt und durch die Endelongation (72°C für 7 min) beendet.

Nach erfolgreicher Amplifikation des 353-bp-Fragmentes werden 10 µl des spezifischen PCR-Produktes mit 10 µl Mastermix gemischt, der 3 µl Puffer NEB blau und 1 µl der Restriktionsendonuklease *Bst* NI enthält und über Nacht bei 60°C schüttelnd inkubiert. Nach der Gelelektrophorese (3,5% Agarosegel, 110 Volt für 60 min) ergeben sich Fragmente verschiedener Länge, welche in folgendem Schema einem Genotyp zugeordnet werden können.

Fragmentlänge					Codierung		Genotyp
					*4	*6	
-	190	163	-	-	0	0	*1/*1
-	190	163	139	23	0	1	*1/*6
-	190	-	139	23	0	2	*6/*6
353	190	163	-	-	1	0	*1/*4
353	-	-	-	-	2	0	*4/*4
353	190	-	139	23	1	1	*4/*6

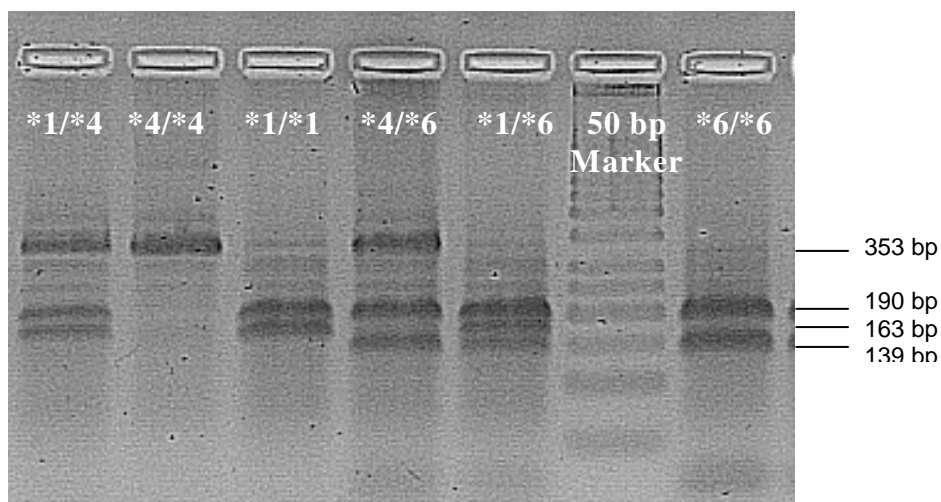


Abbildung 5: Restriktionsmuster nach dem Verdau des 353-bp-Fragmentes mit der Restriktionsendonuklease *Bst* NI

3.2.4.3 Identifikation von CYP2D6*3 (2549ins/delA) mittels PCR- RFLP

Als Ausgangsmaterial für diese Reaktion wird ebenfalls das amplifizierte 5750- bp- Fragment verwendet (s. 3.2.4.1). Mittels nested- PCR wird ein 201- bp- Fragment hergestellt.

Tabelle 6: Primer für die Amplifikation des 201- bp- Fragmentes

Primer	Spezifität	Primerlänge	Position	Nukleotidsequenz
Primer P51 (5')		17 bp	3988 - 4004	5'- gCT ggg gCC TgA gAC TT
Primer D2 (3')		20 bp	4188 - 4169	5'- ggC Tgg gTC CCA ggT CAT AC

Der Mastermix enthält 2,5 µl 10x Gene Craft Puffer, 0,6 µl MgCl₂ (50 mM), 2,5 µl dNTPs (2mM), 0,5 µl je Primer (10 mM), 0,25 µl Biotherm-Polymerase und wird auf 25 µl mit H₂O (steril, bi-dest.) aufgefüllt. Zu 25 µl dieses Mastermixes wird 1 µl verdünntes PCR- Produkt (3.2.4.1) dazugegeben. Nach kräftigem Mischen und Abzentrifugieren, findet die Reaktion im programmierbaren Thermocycler statt. Nach der Vordenaturierung (94°C für 2 min) werden 25 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C für 30 s), Annealing (60°C für 10 s) und Elongation (72 °C für 1 min) durchgeführt und durch die Endelongation (72°C für 7 min) beendet.

Nach erfolgreicher Amplifikation des 201- bp- Fragmentes werden 10 µl des spezifischen PCR- Produktes mit 10 µl Mastermix gemischt, der 3 µl Puffer NEB rot und 1 µl der Restriktionsendonuklease *Bsa*I enthält und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert.

Nach der Gelelektrophorese (3,5% Agarosegel, 100 Volt für 60 min) ergeben sich Fragmente verschiedener Länge, welche in folgendem Schema einem Genotyp zugeordnet werden können

	Fragmentlänge		Codierung	Genotyp
201	-	-	0	*1/*1
201	180	20	1	*1/*3
-	180	20	2	*3/*3

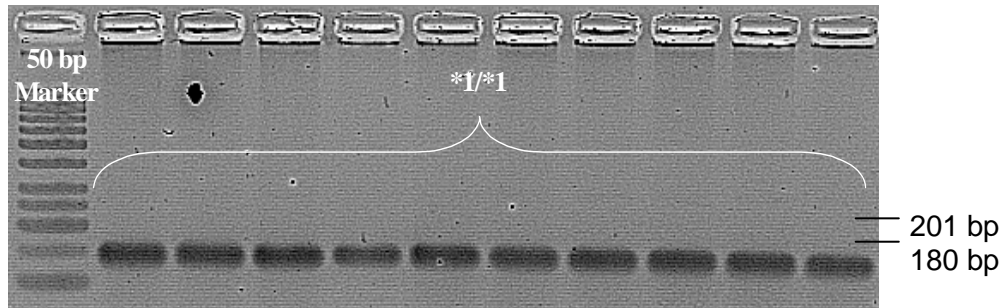


Abbildung 6: Restriktionsmuster nach dem Verdau des 201- bp- Fragmentes mit der Restriktionsendonuklease Bsa-I

3.2.4.4 Identifikation von CYP2D6*5 (Deletion).

Zur Detektion der CYP2D6- Deletion wird die Methode nach Sachse et al. (Sachse 1997) angewendet, welche im Gegensatz zu früheren Methoden einen zusätzlichen Standardprimer (P24) innerhalb des CYP2D6- Gens verwendet. Dadurch entsteht ein Genotyp- unabhängiges Standardfragment. Im Falle einer Deletion von CYP2D6 entsteht durch die Positionierung eines Primers (P13) in der Region zwischen CYP2D7 und CYP2D6 (CYP2D7- CYP2D6 intergenic region; OMIM: X90926) ein zusätzliches Fragment. Falsch negative Resultate können somit vermieden werden. Die Fragmente werden mit Hilfe des Expand™ Long PCR Systems hergestellt.

Tabelle 7: Primer für die Amplifikation der beiden Fragmente

Primer	Spezifität	Primerlänge	Position	Nukleotidsequenz
			CYP2D6 (Intron 7)	
P81	(5')	20 bp	(GenBank No. M33388): 5152 - 5171	5'- CgT CTA gTg ggg AgA CAA AC
			CYP2D6 (3')	
P24	(3')	22 bp	(GenBank No. M33388): 9374 - 9353	5'- gCA TgA gCT AAg gCA CCC AgA C
			CYP2D7- CYP2D6 intergenic region	
P13	(5')	21 bp	(GenBank No. X90926): 46 - 66	5'- ACC ggg CAC CTg TAC TCC TCA

Der PCR- Mastermix besteht aus Mastermix 1 (gesamt 15 µl) und Mastermix 2 (gesamt 10 µl). Mastermix 1 enthält je 0,75 µl der Primer (10 µM), 6,25 µl dNTP (Rapidozym, 2 mM), 0,35 µl Biotherm- Polymerase und 6,15 µl H₂O (bidest, steril). Zum Mastermix 1 werden 2 µl genomische DNA und zum Abschluss Mastermix 2 dazugegeben, der aus 2,7 µl 10x Expand- Puffer 2, 1,5 µl 0,1U/µl PWO und 5,8 µl H₂O (bidest, steril) besteht. Die PCR- Reaktion findet im pro-

grammierbaren Thermocycler analog zur Amplifikation des gesamten CYP2D6- Gens (Tabelle 4) statt. Nach der Gelelektrophorese (1,5 % Agarosegel, 120 Volt für 90 min) ergeben sich Fragmente verschiedener Länge, welche in folgendem Schema einem Genotyp zugeordnet werden können:

Fragmentlänge		Codierung	Genotyp
4222	-	0	*1/*1
4222	3501	1	*1/*5
-	3501	2	*5/*5

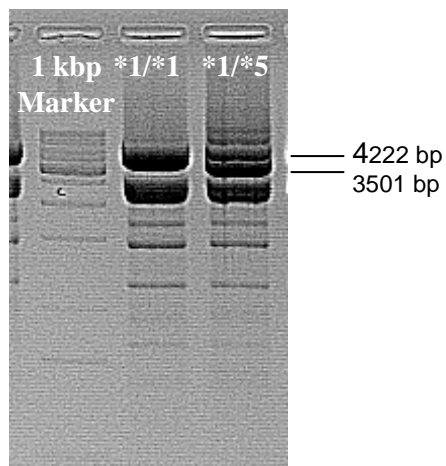


Abbildung 7: PCR- Muster nach Amplifikation der beiden Fragmente zur Detektion der CYP2D6- Deletion

3.2.4.5 Identifikation von CYP2D6*MxN- (Duplikation)

Zur Detektion der CYP2D6- Duplikation wird die Methode nach Løvlie et al. (Løvlie 1996) verwendet. Dabei wird der Vorwärtsprimer so ausgewählt, dass er sowohl an das 3'- Ende von CYP2D7 als auch von CYP2D6 bindet. Der Rückwärtsprimer bindet am 5'- Ende von CYP2D6. Damit entsteht grundsätzlich ein Genotyp- unabhängiges Standardfragment von 5.2 kb zwischen den 3'- Ende von CYP2D7 und dem 5'- Ende von CYP2D6. Falsch negative Resultate können somit vermieden werden. Im Falle einer Duplikation von CYP2D6 entsteht ein zusätzliches Fragment von 3.6 kb zwischen dem 3'- Ende von CYP2D6 und dem 5'- Ende des CYP2D6- Duplikates. Mit dieser Methode sind jedoch keine Aussagen über die Anzahl der Duplikationen auf dem jeweiligen Allel möglich. Das Wissen um das Vorhandensein einer Duplikation an sich erscheint jedoch für diese Untersuchung ausreichend, da bereits das Vorliegen einer Duplikation zu einer deutlich höheren Enzymaktivität führt und mehrfache Duplikationen sehr selten sind.

Tabelle 8: Primer für die Amplifikation des Fragmentes

Primer	Spezifität	Primerlänge	Position	Nukleotidsequenz
			CYP2D7 (3')	
			(GenBank No. M33387): 15726 - 15745	
			CYP2D6 (3')	
			(GenBank No. M33386): 6066 - 6085	5'- TCC CCC ACT gAC CCA ACT
Cyp- 17 (5')		20 bp	(GenBank No. AY545216.1): 8648 - 8667	CT
			CYP2D6 (5')	
Cyp- 32 (3')		20 bp	(GenBank No. AY545216.1):110 - 91	5'- CAC gTg CAg ggC ACC TAg AT

Die Fragmente werden mit Hilfe des Expand™ Long PCR- Systems hergestellt. Der PCR-Mastermix besteht aus Mastermix 1 (gesamt 15 µl) und Mastermix 2 (gesamt 10 µl). Mastermix 1 enthält je 0,75 µl der Primer (10 µM), 6,25 µl dNTP (Rapidozym, 2 mM), 0,35 µl Biotherm-Polymerase und 6,9 µl H₂O (bidest, steril). Zum Mastermix 1 werden 2 µl genomische DNA und zum Abschluss Mastermix 2 dazugegeben, der aus 2,7 µl 10x Expand- Puffer 2, 1,5 µl 0,1U/µl PWO und 5,8 µl H₂O (bidest, steril) besteht. Die PCR- Reaktion findet im programmierbaren Thermocycler analog zur Amplifikation des gesamten CYP2D6- Gens (3.2.4.1, Tabelle 4) statt. Nach der Gelelektrophorese (1,5% Agarosegel, 120 Volt für 90 min) ergeben sich Fragmente verschiedener Länge, welche in folgendem Schema einem Genotyp zugeordnet werden können.

Fragmentlänge		Codierung	Genotyp
5,2 kbp	-	0	*1/*1
5,2 kbp	3,6 kbp	1	*1/*MxN
-	3,6 kbp	2	*MxN/*MxN

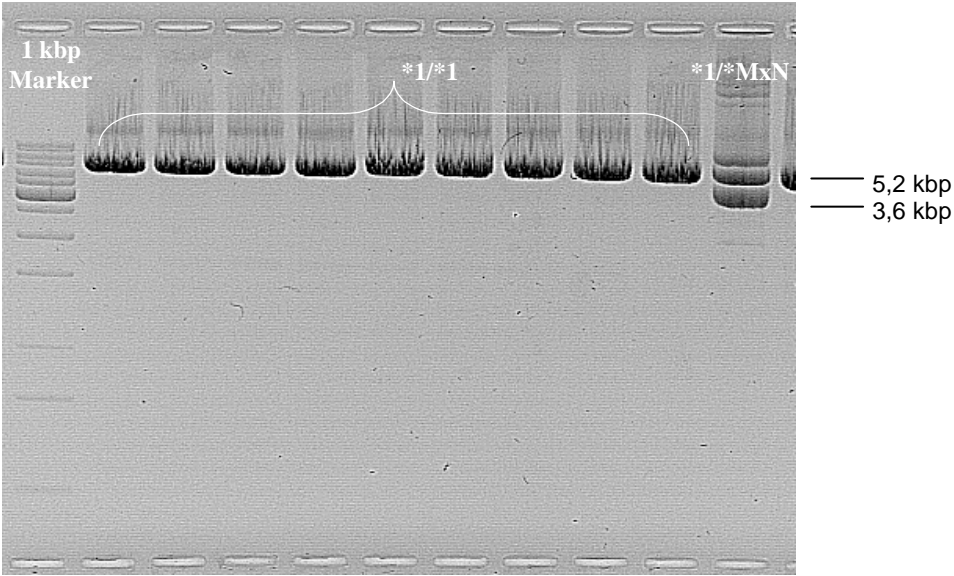


Abbildung 8: PCR- Muster nach Amplifikation zur Detektion einer CYP2D6- Duplikation

3.3 Biometrie und Statistik

Die statistische Analyse umfasste, neben der Fallzahlschätzung, die Testung der objektiven, subjektiven und kognitiven Parameter auf signifikante Unterschiede. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt.

3.3.1 Schätzung der erforderlichen Probandenzahl

Die Fallzahlschätzung wurde auf Grundlage einer Reduktion des REM- Schlafanteils um 20 % durchgeführt, die in verschiedenen Studien an gesunden Probanden nach der Einnahme anticholinergischer Substanzen beobachtet wurde (Sagales et al. 1975; Sitaram et al. 1978; Poland et al. 1989; Riemann et al. 1994). Eine Verringerung des REM- Schlafanteiles um 20 % wurde als klinisch relevant definiert. Bei einem alpha- Fehler von 0,05 und einer Power von 0,8 wurde eine Fallzahl von 23 Probanden berechnet. Somit wurde eine Fallzahl von 24 Probanden je Studie festgelegt. Dropouts wurden entsprechend des Randomisierungsschemas ersetzt.

3.3.2 Testung der subjektiven und objektiven Parameter

Als primärer Zielparameter wurde die REM- Schlafdauer in % der Gesamtschlafzeit (% TST) ausgewählt. Die weiteren objektiven und subjektiven Parameter sowie die Ergebnisse der kognitiven Tests wurden ebenfalls analysiert. Da jedoch keine alpha- Adjustierung stattfand, konnten diese Ergebnisse nur auf deskriptivem Level interpretiert werden.

Unterschiede zwischen Placebo und Tolterodin wurden für die Gesamtgruppe sowie für die beiden Studien (ältere bzw. jüngere Probanden) und die Genotyp- Gruppen separat unter Zuhilfenahme des gepaarten Wilcoxon- Tests für verbundene Stichproben getestet. Unterschiede zwischen den beiden Studien wurden durch den Mann- Whitney- U- Test dargestellt.

Sämtliche statistischen Tests wurden mit Hilfe von SPSS (Version 11.0) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Probanden

Insgesamt wurden in die erste Studie 54 Probanden einbezogen, in die zweite Studie 49 Probanden. Alle Probanden wurden über Zielstellung und Inhalt der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Die nach einem telefonischen Vorscreening verbliebenen 34 bzw. 29 Probanden durchliefen eine vollständige Voruntersuchung. Nach der Voruntersuchung konnten 6 bzw. 4 Probanden nicht eingeschlossen werden, da einzelne Einschlusskriterien nicht erfüllt waren bzw. Ausschlusskriterien zutrafen.

In die Studie wurden 28 bzw. 25 Probanden eingeschlossen, davon durchliefen jeweils 24 Probanden die Studie vollständig, 4 Probanden der ersten Studie und ein Proband der zweiten Studie mussten die Studie vorzeitig abbrechen und werden als Dropouts beschrieben. Ein Proband der ersten Studie durchlief sowohl den Tolterodin- als auch den Placeboarm und wurde daher in die Bewertung einbezogen. Im Folgenden sind die demographischen Daten für die eingeschlossenen Probanden je Studie sowie für beide Studien gesamt aufgezeigt.

Tabelle 9: Demographische Daten für alle Studienteilnehmer und getrennt nach Studie (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	Junge Probanden	Ältere Probanden	gesamt
Anzahl	28	25	53
Alter (Jahre)	28,1 \pm 5,0	60,2 \pm 4,2	42,8 \pm 16,7
Frauen (Anzahl)	7	13	20
BMI (kg/m ²)	23,2 \pm 2,8	25,3 \pm 2,5	24,2 \pm 2,9

Keiner der Gründe für Dropouts war im Zusammenhang mit der Studienmedikation zu sehen:

- unerlaubte Alkoholeinnahme bzw. positives Drogenscreening
- starke Störung des Schlafes wegen Gichtanfall bei bekannter Neigung zu einer Hyperurikämie bzw. wegen Exazerbation einer berichteten Wollwachsallergie mit (durch Jucken, Kratzen) stark variabler Schlafstörung und Beeinträchtigung des Schlafprofils

4.2 Objektive Schlafparameter (Polysomnographie)

Die Übersichtstabelle der objektiven Schlafparameter zeigt für die Gesamtgruppe unterschiedlich stark ausgeprägte Veränderungen der REM- Schlafparameter nach Tolterodin im Vergleich zu Placebo, die in den nachfolgenden Abschnitten noch näher beschrieben werden. Die Schlafeffizienz sowie die NonREM- Schlafparameter sind deutlich weniger beeinträchtigt.

Tabelle 10: Objektive Schlafparameter für alle 49 Probanden (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
REM- Schlafanteil (% TST)	17,9 [14,0 - 20,5]	20,0 [16,2 - 22,6]	0,048
REM- Latenz (min)	72,3 [58,4 - 96,5]	67,3 [59,5 - 94,8]	0,035
Wachanteil (% SPT)	3,7 [1,6 - 9,3]	4,8 [1,6 - 9,7]	0,529
Einschlaflatenz (min)	14,3 [8,8 - 22,9]	15,7 [8,0 - 31,5]	0,166
NonREM1- Schlafanteil (% TST)	7,6 [5,0 - 10,4]	7,4 [5,4 - 10,2]	0,644
NonREM2- Schlafanteil (% TST)	63,7 [56,8 - 68,4]	60,2 [55,8 - 63,9]	0,007
SWS- Schlafanteil (% TST)	12,2 [5,5 - 15,0]	12,2 [8,1 - 14,6]	0,655
SWS- Latenz (min)	14,5 [11,0 - 20,5]	15,7 [10,2 - 20,2]	0,988
Schlafeffizienz (%TST/TIB)	92,3 [83,8 - 95,7]	91,7[87,5 - 96,0]	0,395

4.2.1 Primärer Zielparameter: REM- Schlafanteil (% TST)

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte für die Gesamtgruppe eine signifikant niedrigere REM- Schlafdauer für Tolterodin ($p = 0,048$) im Vergleich zu Placebo.

Während der REM- Schlafanteil zwischen jüngeren und älteren Probanden unter Placebo kaum differierte ($p = 0,914$), zeigte sich bei den älteren Probanden eine deutlich stärkere Reduktion des REM- Schlafanteils unter Tolterodin im Vergleich zu den jüngeren Probanden:

- bei jüngeren Probanden Reduktion des REM- Schlafanteils im Median um 5 % von 20,1 % TST, unter Placebo auf 19,1 % TST unter Tolterodin ($p = 0,864$)
- bei älteren Probanden Reduktion des REM- Schlafanteils im Median um 15 % von 19,7 % TST, unter Placebo auf 16,7 % TST unter Tolterodin ($p = 0,012$).

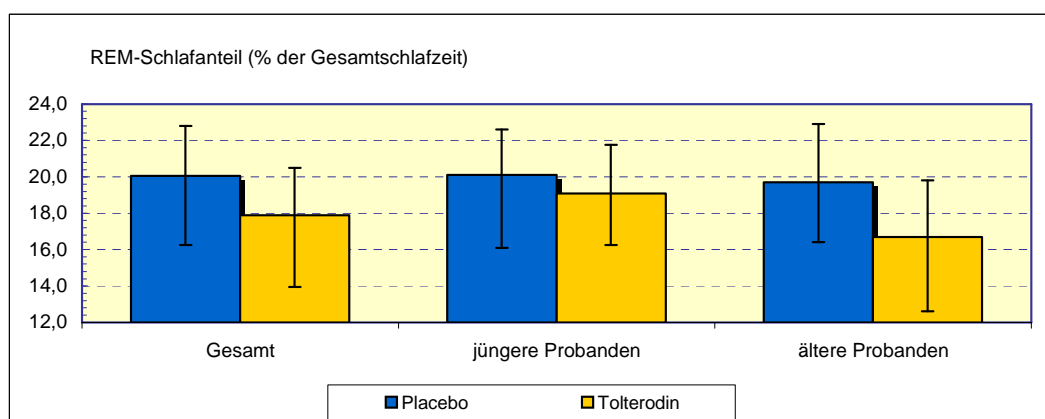


Abbildung 9: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) des primären Zielparameters REM- Schlafanteil an der Gesamtschlafdauer für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.2.2 REM- Latenz

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte eine signifikant verlängerte REM- Latenz für Tolterodin ($p = 0035$) im Vergleich zu Placebo.

Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der REM- Latenz zwischen jüngeren und älteren Probanden unter Placebo ($p = 0,390$). Sowohl in der Untergruppe der jüngeren als auch der älteren Probanden zeigten sich jedoch Trends zu einer verlängerten REM- Latenz unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo:

- bei jüngeren Probanden nahm die REM- Latenz unter Tolterodin im Median um 5 min von 64,8 min auf 69,8 min zu ($p = 0,199$)
- bei älteren Probanden nahm die REM- Latenz im Median um 6,5 min von 68,5 min auf 75,9 min zu ($p = 0,089$), wobei insbesondere die Streuung unter Tolterodin sehr groß war.

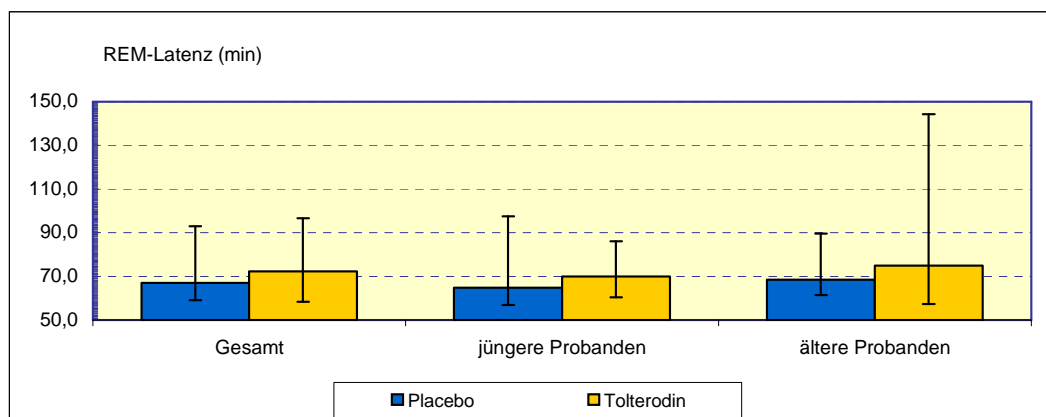


Abbildung 10: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) der REM- Latenz in min für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.2.3 Schlafeffizienz

Für die Schlafeffizienz zeigten sich für die Gesamtgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Tolterodin und Placebo ($p = 0,395$).

Die Schlafeffizienz bei jüngeren Probanden war unter Placebo 10 % höher als bei älteren Probanden ($p = 0,002$). Keine statistisch signifikanten Unterschiede konnten zwischen Tolterodin und Placebo bei jüngeren und älteren Probanden gefunden werden:

- bei jüngeren Probanden Schlafeffizienz unter Placebo 94,8 % vs. 95,5 % unter Tolterodin ($p = 0,179$)
- bei älteren Probanden Schlafeffizienz unter Placebo 85,1 % vs. 85,0 % unter Tolterodin ($p = 0,732$).

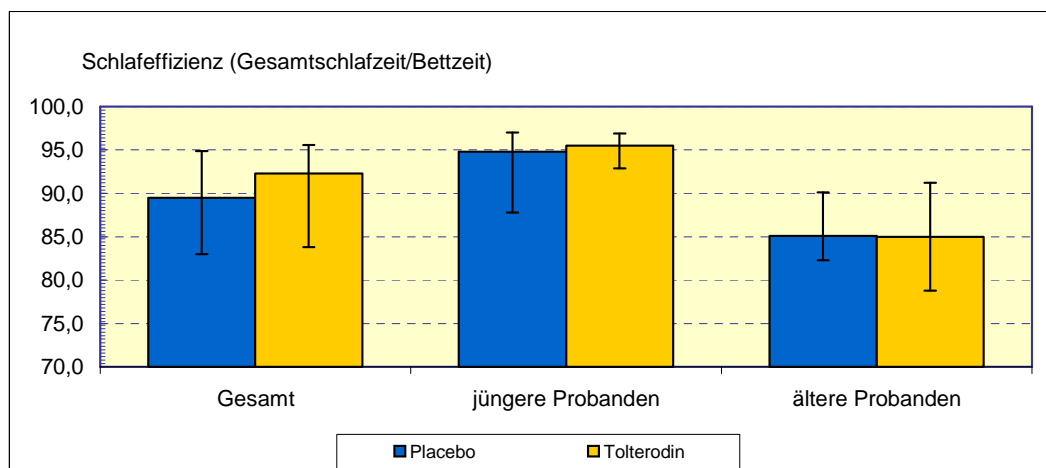


Abbildung 11: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) Schlafeffizienz für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.2.4 NonREM- Schlafparameter

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte signifikant höhere Schlafanteile (NonREM2) an der Gesamtschlafzeit für Tolterodin ($p = 0,007$) im Vergleich zu Placebo. Dabei zeigte sich insbesondere bei älteren Probanden eine verlängerte NonREM2- Schlafzeit unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo:

- bei jüngeren Probanden Anstieg des NonREM2- Schlafanteils im Median um 1 % von 57,6 % TST unter Placebo auf 58,3 % TST unter Tolterodin ($p = 0,236$)
- bei älteren Probanden Anstieg des NonREM2- Schlafanteils im Median um 8 % von 62,8 % TST unter Placebo auf 67,9 % TST unter Tolterodin ($p = 0,009$)

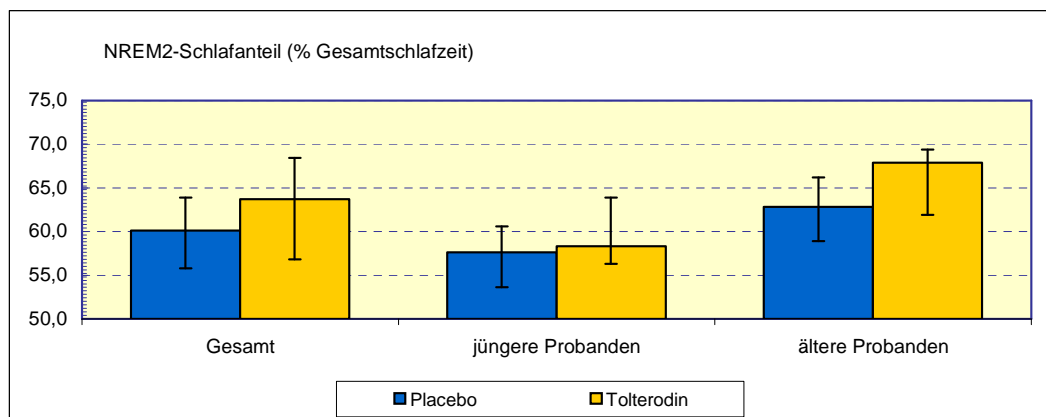


Abbildung 12: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) des NREM2- Schlafanteils an der Gesamtschlafzeit für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

Für die weiteren NonREM- Schlafparameter konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Tolterodin und Placebo gefunden werden:

- Anteil Leichtschlaf (NonREM1) an der Gesamtschlafzeit (TST)
- Tiefschlafanteil (SWS = NonREM3 + NonREM4) an der Gesamtschlafzeit (TST)
- Wachanteil an der Schlafperiode (SPT)
- Einschlaf latenz
- Tiefschlaf latenz.

Es zeigten sich unter Placebo signifikante Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Probanden (Tabelle 11 und Tabelle 12):

- bei älteren Probanden war der NonREM1- Schlafanteil signifikant höher ($p = 0,006$) ebenso wie der NonREM2- Schlafanteil ($p = 0,002$) und der Wachanteil ($p = 0,001$)
- bei älteren Probanden war der SWS- Schlafanteil signifikant vermindert ($p < 0,001$)
- bei älteren Probanden war die Tiefschlaf latenz signifikant verlängert ($p = 0,005$).

Keine Unterschiede zeigten sich für die Einschlaf latenz.

Tabelle 11: NonREM- Schlafparameter für 25 jüngere Probanden (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
NonREM1- Schlafanteil (% TST)	7,2 [4,7 - 9,0]	6,0 [4,9 - 8,2]	0,637
NonREM2- Schlafanteil (% TST)	58,3 [56,3 - 63,9]	57,6 [53,6 - 60,6]	0,236
SWS- Schlafanteil (% TST)	14,6 [12,2 - 17,1]	14,5 [13,7 - 15,9]	0,568
Wachanteil (% SPT)	1,6 [0,9 - 3,4]	1,6 [0,7 - 4,8]	0,447
Einschlaf latenz (min)	14,8 [9,3 - 24,7]	16,0 [8,0 - 31,8]	0,376
SWS- Latenz (min)	14,5 [9,2 - 19,6]	12,3 [9,7 - 15,8]	0,607

Tabelle 12: NonREM- Schlafparameter für 24 ältere Probanden (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
NonREM1- Schlafanteil (% TST)	8,3 [6,4 - 11,3]	8,4 [6,9 - 11,8]	0,875
NonREM2- Schlafanteil (% TST)	67,9 [61,9 - 69,4]	62,8 [58,9 - 66,2]	0,009
SWS- Schlafanteil (% TST)	5,7 [2,8 - 11,4]	8,2 [3,9 - 11,5]	0,819
Wachanteil (% SPT)	8,2 [5,0 - 13,9]	7,8 [4,6 - 10,4]	0,141
Einschlaf latenz (min)	14,0 [7,2 - 21,4]	13,3 [6,9 - 31,5]	0,324
SWS- Latenz (min)	14,9 [12,1 - 23,8]	19,9 [12,6 - 25,6]	0,689

4.3 Kognitive Tests

4.3.1 Zahlen- Verbindungs- Test (ZVT)

Für die Reaktionszeit im ZVT zeigten sich für die Gesamtgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Tolterodin und Placebo ($p = 0,552$), ebenso wenig wie in der Gruppe der jüngeren ($p = 1,000$) bzw. der älteren Probanden ($p = 0,658$).

Der Median der Reaktionszeit war mit 46,5 [41,9 – 55,9] s bei jüngeren Probanden unter Placebo signifikant geringer ($p < 0,001$) als bei älteren Probanden mit 75,0 [66,5 – 82,0] s, die damit im Median eine um 61 % längere Reaktionszeit hatten.

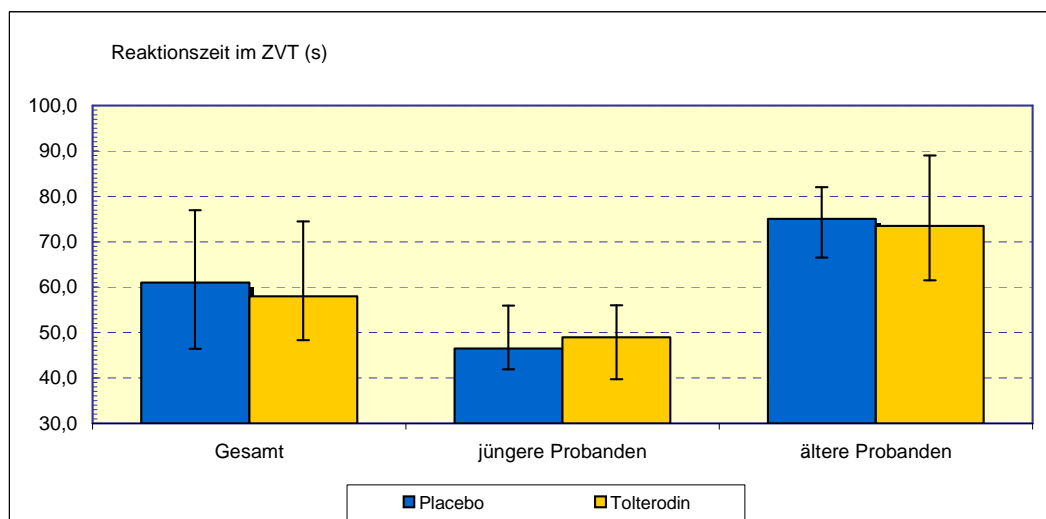


Abbildung 13: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) der Reaktionszeit in s im Zahlen- Verbindungs- Test (ZVT) für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.3.2 d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test (d2- Test)

Für die Gesamtzahl sowie die korrigierte Gesamtzahl im d2 zeigten sich für die Gesamtgruppe keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Tolterodin und Placebo, auch nicht in der Gruppe der jüngeren bzw. der älteren Probanden (s. Tabelle 13).

Jüngere Probanden zeigten für beide Parameter signifikant höhere Werte als ältere.

- bei älteren Probanden war die Gesamtzahl im Median um 22 % niedriger als bei jüngeren ($p = 0,001$)
- bei älteren Probanden war die Fehler deutlich höher, was sich in einer um 26 % niedrigeren korrigierten Gesamtzahl im Vergleich zu jüngeren ($p < 0,001$) niederschlug.

Tabelle 13: Ergebnisse des d2- Tests für alle Studienteilnehmer und getrennt nach Studie (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
Gesamt			
Gesamtzahl	417,0 [365,5 - 472,0]	419,0 [360,0 - 473,5]	0,958
Korrigierte Gesamtzahl	401,0 [331,0 - 468,5]	411,0 [338,5 - 467,0]	0,896
Jüngere Probanden			
Gesamtzahl	470,0 [394,0 - 546,5]	464,0 [413,5 - 518,0]	0,841
Korrigierte Gesamtzahl	463,0 [383,5 - 538,5]	462,0 [407,0 - 513,5]	0,749
Ältere Probanden			
Gesamtzahl	378,0 [316,0 - 423,3]	362,5 [316,8 - 426,8]	0,796
Korrigierte Gesamtzahl	344,0 [292,8 - 401,8]	343,0 [308,0 - 405,5]	0,523

4.4 Subjektive Schlafparameter (Fragebögen)

Die Übersichtstabelle der subjektiven Schlafparameter zeigt für die Gesamtgruppe keine signifikanten Veränderungen nach Tolterodin im Vergleich zu Placebo, die in den nachfolgenden Abschnitten noch näher beschrieben werden.

Tabelle 14: Objektive Schlafparameter für alle 49 Probanden (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
Einschlafzeit (min)	20 [10 - 30]	15 [10 - 30]	0,731
Schlafdauer (min)	420 [390 - 451,5]	420 [390 - 445]	0,979
Schlafqualität (% VAS)	67,3 [41,7 - 83,3]	72,0 [49,0 - 85,3]	0,351
Morgenbefinden (% VAS)	76,7 [65,0 - 88,7]	81,8 [74,8 - 92,0]	0,090
Leistungsfähigkeit am Tage (% VAS)	72,7 [56,7 - 82,0]	77,3 [60,5 - 83,8]	0,611

4.4.1 Subjektive Schlafdauer und Einschlafzeit

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte sowohl für die subjektive Schlafdauer als auch für die subjektive Einschlafzeit für Tolterodin im Vergleich zu Placebo:

- in der Gesamtgruppe (s. Tabelle 14) keine signifikanten Änderungen
- bei jüngeren Probanden für die Einschlafzeit (Tabelle 15) ebenso wie für die Schlafdauer (s. Abbildung 14; $p = 0,940$) keine signifikanten Änderungen
- bei älteren Probanden für die Einschlafzeit (Tabelle 15) ebenso wie für die Schlafdauer (s. Abbildung 14; $p = 0,955$) keine signifikanten Änderungen

Tabelle 15: Ergebnisse des subjektiven Einschlaflatenz (min) getrennt nach Studie (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
Jüngere	15 [9 - 30]	15 [11 - 30]	0,309
Ältere	20 [11,3 - 47,5]	17,5 [10 - 30]	0,636

Die subjektive Einschlafzeit war zwischen jüngeren und älteren Probanden unter Placebo vergleichbar ($p = 0,777$).

Unter Placebo zeigte sich für die jüngeren Probanden im Median mit 440 [420 – 450] min eine signifikant längere subjektive Schlafdauer im Vergleich zu älteren Probanden, die im Median 420 [367,5 – 420] min schliefen ($p = 0,013$).

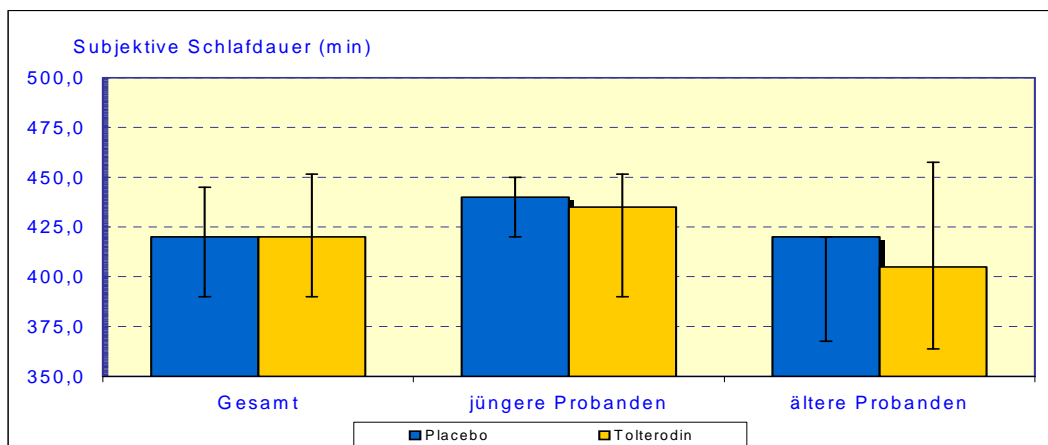


Abbildung 14: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) der subjektiven Schlafdauer in min für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.4.2 Subjektive Befindlichkeit

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte sowohl für die Schlafqualität, das Morgenbefinden sowie die Leistungsfähigkeit am Tage in den visuellen Analogskalen (VAS) zwischen Placebo und Tolterodin:

- in der Gesamtgruppe im Median nicht signifikant niedrigere Werte unter Tolterodin (s. Tabelle 14)
- bei jüngeren Probanden eine nur geringfügig (nicht signifikant) schlechtere subjektive Befindlichkeit (s. Tabelle 16)

Tabelle 16: Parameter der subjektiven Befindlichkeit für 24 jüngeren Probanden (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
Schlafqualität (% VAS)	70,7 [71,7 - 84,4]	72,0 [42,0 - 88,0]	0,658
Morgenbefinden (% VAS)	81,8 [63,2 - 88,9]	86,2 [71,2 - 92,2]	0,236
Leistungsfähigkeit am Tage (% VAS)	74,7 [59,0 - 83,3]	75,0 [48,7 - 84,4]	0,218

- bei älteren Probanden unter Tolterodin für die Schlafqualität und das Morgenbefinden nicht signifikant niedrigere Werte sowie eine signifikant schlechtere Leistungsfähigkeit am Tage

Tabelle 17: Parameter der subjektiven Befindlichkeit für 24 älteren Probanden (Median [1. – 3. Quartile])

	Tolterodin	Placebo	Signifikanz
Schlafqualität (% VAS)	65,0 [40,8 - 82,2]	69,3 [52,8 - 83,8]	0,383
Morgenbefinden (% VAS)	73,9 [66,4 - 88,1]	80,8 [74,4 - 91,9]	0,253
Leistungsfähigkeit am Tage (% VAS)	68,7 [52,5 - 79,0]	77,3 [65,2 - 83,8]	0,049

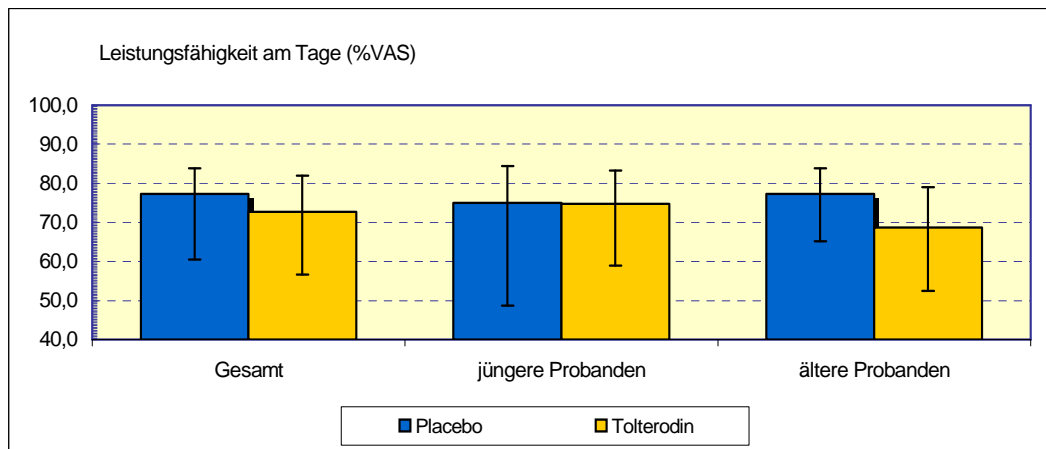


Abbildung 15: Median (Balken) und 1. bzw. 3. Quartile (Whisker) der subjektiven Leistungsfähigkeit am Tage für alle Studienteilnehmer (Gesamt) und getrennt nach Studie (jüngere und ältere Probanden) für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

Zwischen jüngeren und älteren Probanden zeigten sich nach der Auswertung der visuellen Analogskalen (VAS) keine signifikanten Unterschiede für die Schlafqualität ($p = 0,984$), das Morgenbefinden ($p = 0,795$) und die Leistungsfähigkeit am Tage ($p = 0,364$).

4.5 Genotypisierung

47 der 53 Probanden, die in die Studien eingeschlossen wurden, gaben ihre Zustimmung zur Genotypisierung. Von diesen 47 Probanden liegen bei 44 Probanden objektive und subjektive Schlafdaten und kognitive Tests für Tolterodin vor, für 43 Probanden Daten für Placebo. Bei diesen Probanden erfolgte die vollständige Bestimmung der beschriebenen CYP2D6-Polymorphismen und Unterteilung in die folgenden Metabolisierergruppen nach den bereits beschriebenen Einteilungen (Kirchheiner et al. 2004):

1. Schnellmetabolisierer (EM)

Homozygote Träger von zwei funktionellen CYP2D6- Allelen:

- Genotyp $*1/*1$ (n = 19)

Träger von einem duplizierten Allel und einem defizienten Allel:

- Genotypen $*MxN/*3$, $*MxN/*4$, $*MxN/*5$ oder $*MxN/*6$ (n = 0)

2. Intermediäre Metabolisierer (IM)

Träger von einem defizienten CYP2D6- Allel (Heterozygote):

- Genotyp $*1/*3$ (n = 2)
- Genotyp $*1/*4$ (n = 16)
- Genotyp $*1/*5$ (n = 2)
- Genotyp $*1/*6$ (n = 0)

3. Langsammetabolisierer (PM)

Träger von zwei defizienten CYP2D6- Allelen:

- Genotyp: $*3/*3$ (n = 0)
- Genotyp $*4/*4$ (n = 3)
- Genotyp $*5/*5$ (n = 0)
- Genotyp $*6/*6$ (n = 0)
- Kombinationen aus den defizienten Allelen: Genotyp $*3/*5$ (n = 1)

4. Ultraschnelle Metabolisierer (UM)

Träger von mindestens einem duplizierten und einem funktionellen Allel:

- Genotyp *MxN/*1 (*2x2/*1, n = 1)

In dem untersuchten Probandenkollektiv fanden sich demnach 19 (43,2 %) EM, 20 (45,5 %) IM, 4 (9,1 %) PM und 1 (2,3 %) UM, die sich in ihren demographischen Daten nicht signifikant voneinander unterschieden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Demographische Daten der Probanden nach CYP2D6- Genotyp (Mittelwert \pm Standardabweichung)

	EM	IM	PM	UM	Signifikanz
Anzahl	19	20	4	1	
Alter (Jahre)	41 \pm 18	47 \pm 16	54 \pm 16	28	0,310
BMI	24,1 \pm 2,1	24,5 \pm 3,5	25,2 \pm 3,7	21,0	0,662

Wegen der geringen Gruppenstärke der PM beruht ein Großteil der Ergebnisse auf folgenden 2 Gruppen:

- Probanden mit CYP2D6- Wildtyp (EM)
- Probanden mit defizientem CYP2D6 (IM + PM)

Der einzelne UM wurde nicht in die weiteren statistischen Betrachtungen einbezogen.

4.5.1 REM- Schlafparameter in den Genotyp- Gruppen

Die Übersichtstabelle der REM- Schlafparameter zeigt je nach Genotyp unterschiedlich stark ausgeprägte Veränderungen nach Tolterodin im Vergleich zu Placebo, die nachfolgend näher beschrieben werden.

Tabelle 19: REM- Schlafparameter unter Tolterodin und Placebo stratifiziert nach Genotyp (Median [1. – 3. Quartile])

	Placebo	Tolterodin	Signifikanz
EM (n= 19)			
REM- Schlafanteil (% TST)	18,4 [16,0 - 21,2]	17,5 [12,6 - 20,9]	0,658
REM- Latenz (min)	64,5 [56,5 - 100]	75,0 [61,5 - 144,8]	0,077
IM + PM (n= 24)			
REM- Schlafanteil (% TST)	21,8 [16,1 - 23,4]	17,4 [14,1 - 20,0]	0,019
REM- Latenz (min)	68,3 [60,5 - 74,0]	73,4 [54,3 - 113]	0,059

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte für die Gruppe mit defizientem CYP2D6 eine deutlich stärkere Reduktion des REM- Schlafanteils (% TST) unter Tolterodin im Vergleich zu den Schnellmetabolisierern:

- bei Schnellmetabolisierern eine nicht signifikante Reduktion des REM- Schlafanteils im Median um 5 % unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo ($p = 0,658$)
- bei Probanden mit Defizienz im CYP2D6 (IM + PM) eine signifikante Reduktion des REM- Schlafanteils im Median um 20 % unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo ($p = 0,019$)
- bei separater Betrachtung der IM und PM eine Reduktion des REM- Schlafanteils in beiden Gruppen, jedoch wegen der geringen Gruppengröße bei den PM statistisch nur als Trend erkennbar.

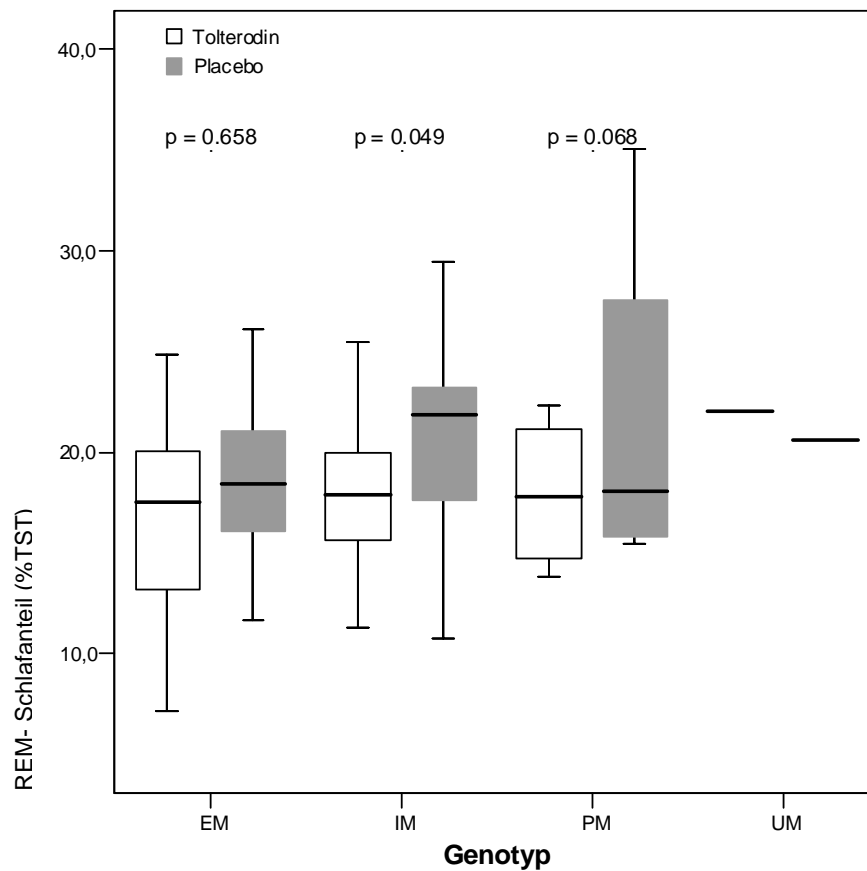


Abbildung 16: Boxplots für den REM- Schlafanteil (% TST) getrennt nach Genotyp für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

Die REM- Latenz war für beide Gruppen im Trend verlängert:

- bei Schnellmetabolisierern ein Anstieg der REM- Latenz im Median um 10,5 min unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo ($p = 0,077$)
- bei Probanden mit Defizienz im CYP2D6 (IM + PM) ein Anstieg der REM- Latenz im Median um 5,1 min unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo ($p = 0,059$) .

4.5.2 NonREM- Schlafparameter in den Genotyp- Gruppen

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte insbesondere bei Probanden mit Defizienz im CYP2D6 eine verlängerte NonREM2- Schlafzeit unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo:

- bei Schnellmetabolisierern ein Anstieg des NonREM2- Schlafanteils im Median um 3 % von 61,9 [57,6 – 63,9] % TST unter Placebo auf 63,7 [57,0 – 68,9] % TST unter Tolterodin ($p = 0,295$)
- bei Probanden mit Defizienz im CYP2D6 ein Anstieg des NonREM2- Schlafanteils im Median um 7 % von 59,7 [54,2 – 63,9] % TST unter Placebo auf 63,8 [56,5 – 68,6] % TST unter Tolterodin ($p = 0,012$)
- bei separater Betrachtung der IM und PM ein Anstieg des NonREM2- Schlafanteils in beiden Gruppen, jedoch wegen der geringen Gruppengröße bei den PM statistisch nur als Trend erkennbar.

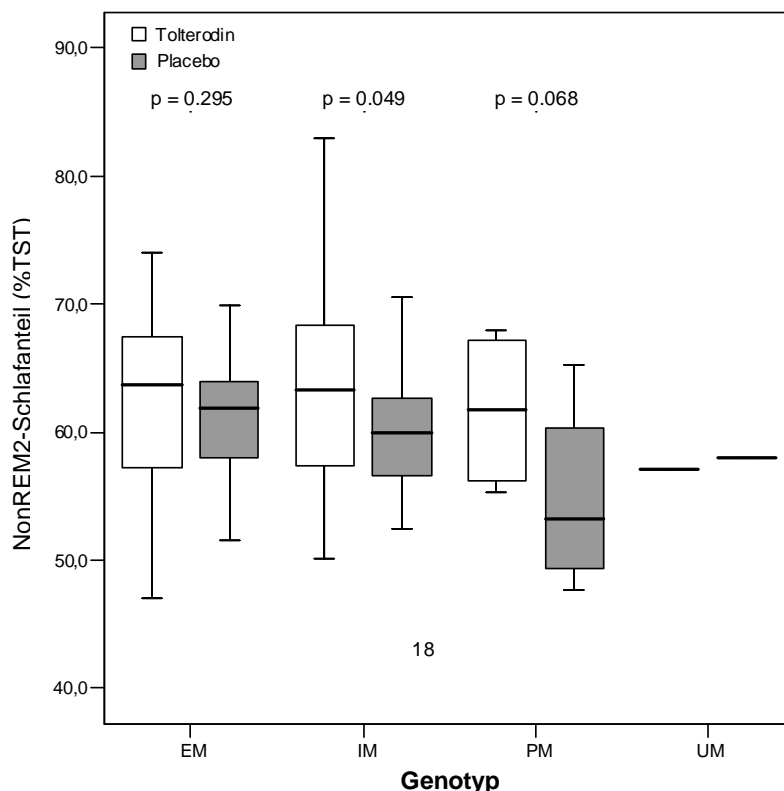


Abbildung 17: Boxplots für den NonREM2- Schlafanteil getrennt nach Genotyp für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

Für die weiteren NonREM- Schlafparameter konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede für beide Genotyp- Gruppen zwischen Tolterodin und Placebo gefunden werden:

- Anteil Leichtschlaf (NonREM1) an der Gesamtschlafzeit (TST)
- Tiefschlafanteil (SWS = NonREM3 + NonREM4) an der Gesamtschlafzeit (TST)
- Wachanteil an der Schlafperiode (SPT)
- Einschlaflatenz
- Tiefschlaf latenz
- Schlafeffizienz.

4.5.3 Kognitive Tests in den Genotyp- Gruppen

Für die Gruppe der CYP2D6- defizienten Probanden zeigten sich sowohl unter Tolterodin als auch unter Placebo deutlich niedrigere Werte für die Gesamtzahl und die korrigierte Gesamtzahl im d2- Test sowie eine längere Reaktionszeit im ZVT im Vergleich zu Schnellmetabolisierern.

Tabelle 20: Ergebnisse der kognitiven Tests unter Tolterodin und Placebo stratifiziert nach Genotyp (Median [1. – 3. Quartile])

	Placebo	Tolterodin	Signifikanz
EM (n= 19)			
Gesamtzahl im d2- Test	440 [386 - 517]	417 [389 - 484]	0,965
Korrigierte Gesamtzahl im d2- Test	433 [361 - 495]	393 [366 - 474]	0,794
Reaktionszeit (s) im ZVT	56,3 [48,5 - 66,0]	56,5 [49 - 72,0]	0,573
IM + PM (n= 24)			
Gesamtzahl im d2- Test	385 [314 - 460]	378 [316 - 459]	0,808
Korrigierte Gesamtzahl im d2- Test	355 [306 - 434]	362,5 [292,8 - 450,8]	0,768
Reaktionszeit (s) im ZVT	74 [46,5 - 82,0]	71 [53,3 - 89]	0,465

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte jedoch für keine der kognitiven Parameter signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Schnellmetabolisierer und der Gruppe mit defizientem CYP2D6- Genotyp (IM + PM) im Vergleich von Tolterodin und Placebo.

Innerhalb der PM- Genotyp- Gruppe zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der korrigierten Gesamtzahl im d2- Test.

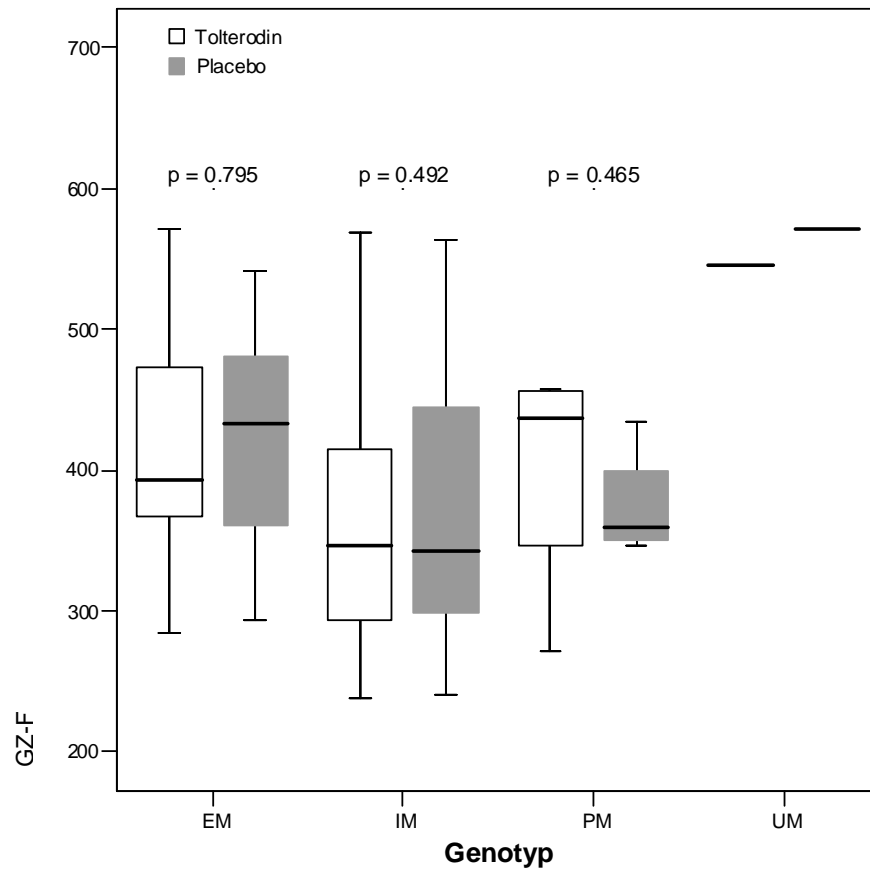


Abbildung 18: Boxplots für die korrigierte Gesamtzahl (GZ- F) im d2- Test getrennt nach Genotyp für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.5.4 Subjektive Schlafparameter in den Genotyp- Gruppen

Der gepaarte Wilcoxon- Test zeigte keine Unterschiede für die subjektive Schlafdauer und Einschlafzeit zwischen den Genotyp- Gruppen. Für die Schlafqualität, das Morgenbefinden sowie die Leistungsfähigkeit am Tage in den visuellen Analogskalen (VAS) zwischen Placebo und Tolterodin zeigten sich:

- in der Gruppe der Schnellmetabolisierer signifikant niedrigere Werte unter Tolterodin für das Morgenbefinden ($p = 0,014$) sowie ein Trend zu einer niedrigeren Leistungsfähigkeit am Tage ($p = 0,091$)
- in der Gruppe der Probanden mit defizientem CYP2D6 keine signifikanten Unterschiede

Tabelle 21: Subjektive Schlafparameter unter Tolterodin und Placebo stratifiziert nach Genotyp (Median [1. – 3. Quartile])

	Placebo	Tolterodin	Signifikanz
EM (n= 19)			
Schlafdauer (min)	420 [290 - 440]	420 [390 - 450]	0,864
Einschlafzeit (min)	15 [8 - 45]	20 [7 - 40]	0,777
Schlafqualität (% VAS)	72,0 [42,0 - 88,7]	62,7 [29,3 - 84,0]	0,091
Morgenbefinden (% VAS)	86,4 [77,3 - 93,1]	73,3 [65,8 - 85,8]	0,014
Leistungsfähigkeit am Tage (% VAS)	72,7 [52,7 - 88,7]	72,7 [52,0 - 81,3]	0,809
IM + PM (n= 24)			
Schlafdauer (min)	420 [390 - 450]	425 [363,8 - 465]	0,455
Einschlafzeit (min)	20 [15 - 30]	20 [10 - 37,5]	0,672
Schlafqualität (% VAS)	74 [58,7 - 84,7]	73,7 [58,5 - 82,2]	0,761
Morgenbefinden (% VAS)	81,8 [76,2 - 92,7]	82,6 [70,6 - 89,6]	0,648
Leistungsfähigkeit am Tage (% VAS)	78,0 [66,7 - 83,3]	71,0 [56,3 - 82,8]	0,277

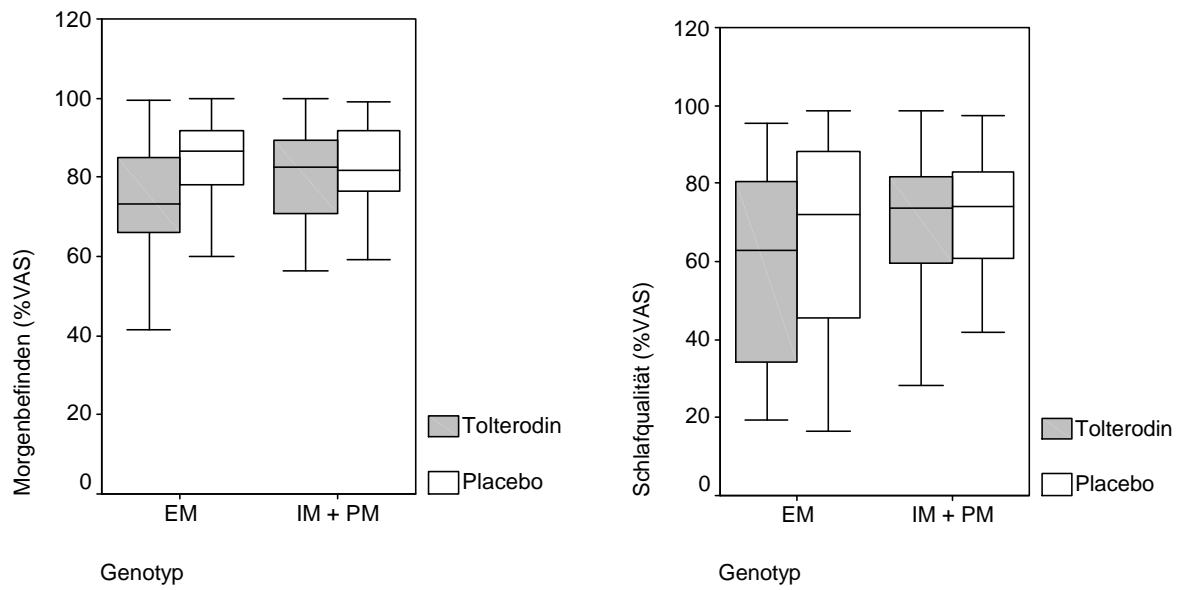


Abbildung 19: Boxplots für die subjektiven Befindlichkeiten – Morgenbefinden und Schlafqualität in % VAS - getrennt nach Genotyp für Tolterodin im Vergleich zu Placebo

4.6 Unerwünschte Wirkungen

Im Verlauf der beiden Studien wurden unter Tolterodin 12 unerwünschte Ereignisse (11 davon bei älteren Probanden) und unter Placebo 10 unerwünschte Ereignisse (5 davon bei älteren Probanden) beobachtet. Von den 22 UE sind bezüglich des Schweregrades 17 als mild, 5 als tolerierbar und kein UE als schwer beurteilt worden.

Es zeigte sich somit keine erhöhte Nebenwirkungsrate unter Tolterodin in der Gesamtgruppe, jedoch ein deutlich häufigeres Auftreten von Nebenwirkungen bei älteren Probanden unter Tolterodin. In dieser Gruppe traten insbesondere Störungen auf, die eine bekannte Nebenwirkung anticholinergischer Substanzen darstellen (Mundtrockenheit, Harnverhalt und gastrointestinale Störungen). Deren Beziehung zur Studienmedikation wurde deshalb als wahrscheinlich eingestuft.

	Placebo		Tolterodin	
	Jüngere	Ältere	Jüngere	Ältere
Mundtrockenheit	1	3	-	4
Schlafstörungen +/- Mundtrockenheit	2/1	-	-	-
Orthostatische Dysregulation	-	-	-	-
Miktionsstörungen (z.B. Harnverhalt)	-	1	-	1
Kopfschmerzen	-	-	-	1
Gastrointestinale Störungen	-	-	1	2
Andere	1	1	-	3
Gesamt	5	5	1	11

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Der REM- Schlaf unter Tolterodin war bei jüngeren Probanden (mittleres Alter $28,1 \pm 5,0$ Jahre) kaum beeinträchtigt (Reduktion des REM- Schlafanteils um 5 %, nicht signifikant) während der REM- Schlaf bei älteren Probanden (mittleres Alter $60,2 \pm 4,3$) unter Tolterodin deutlich reduziert war (Reduktion des REM- Schlafanteils um 15 %, $p = 0,012$).

Bei Probanden, die zumindest ein defizientes CYP2D6- Allel besitzen, war eine ausgeprägte Beeinträchtigung des REM- Schlafes unter Tolterodin zu beobachten (Reduktion des REM- Schlafanteils um 20 %; $p = 0,019$), während bei Schnellmetabolisierern, der Einfluss auf den REM- Schlaf geringer war (Reduktion des REM- Schlafanteils um 5 %, nicht signifikant).

Bei den NonREM- Schlafparametern zeigten sich deutlich geringere Effekte unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo.

5 Diskussion

Anticholinerge Substanzen wie Oxybutynin, Tolterodin, Propiverin und Trosipiumchlorid werden zur Therapie von Symptomen einer überaktiven Blase, welche insbesondere ältere Menschen betrifft, eingesetzt (Schwantes, Topfmeier 1999; Füsigen Hauri 2000). Relativ häufig limitieren anticholinerge Nebenwirkungen Therapieresultate und Compliance der Patienten. Neben typischen peripheren Nebenwirkungen an Speicheldrüsen, Herz und Gastrointestinaltrakt werden unter der Therapie mit einigen dieser anticholinergen Substanzen Wirkungen auf das ZNS beobachtet.

In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es unter der anticholinergen Substanz Oxybutynin zu kognitiven Einschränkungen (Katz et al. 1998; Herberg 1999; British National Formulary No. 34) sowie zur Veränderung der EEG- Aktivität am Tage kommt (Pietzko et al. 1994). Außerdem existieren Berichte über neuropsychiatrische Nebenwirkungen unter Oxybutynin, wie beispielsweise Halluzinationen, Psychosen, Verwirrtheitszustände, Konzentrations- und Orientierungsstörungen sowie Müdigkeit und Schläfrigkeit (Donnellan et al. 1997; In T'Veld et al. 1998; Valsecia et al. 1998).

Unter der anticholinergen Substanz Tolterodin werden zentralnervöse Effekte wie Schläfrigkeit, Verwirrtheitszustände und Halluzinationen eher selten beobachtet, am häufigsten jedoch bei Älteren. In der Literatur existieren Fallberichte über Einschränkungen der kognitiven Funktion und Halluzinationen (Tsao, Heilman 2003; Womack, Heilman 2003). Weiterhin werden Nervosität und Parästhesien als Nebenwirkungen angegeben (Appell 1997; Guay 1999).

Die im Vergleich zu Oxybutynin deutlich niedrigere Rate von zentralnervösen Nebenwirkungen unter Tolterodin wird am ehesten seinen physikochemischen Eigenschaften zugeordnet, die zu einer geringeren Penetrationfähigkeit über die Blut- Hirn- Schranke führt:

- Tolterodin ist im Vergleich zu Oxybutynin deutlich weniger lipophil (Oxybutynin log D: 2.17, Tolterodin log D: 1.83),
- Tolterodin hat einen niedrigeren Ionisierungsgrad als Oxybutynin
- Tolterodin hat ein größeres Molekulargewicht (Oxybutynin: 393 D, Tolterodin 496 D).

Die hier vorgestellte Arbeit basiert auf zwei Studien, die durchgeführt wurden, um ZNS Effekte anticholinerg Substanzen (u.a. Tolterodin) im Vergleich zu Placebo zu prüfen. Dabei liegt das Hauptaugenmerk der Arbeit auf den Einflüssen des Alters, indem die Ergebnisse der Studie an einer jüngeren Probandengruppe mit denen der Studie an der Hauptzielpopulation für diese Medikamente, an über 50 Jahre alten Personen, verglichen wurde. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwieweit genetisch bedingte Veränderungen im Metabolismus von Tolterodin zu Unterschieden bei den ZNS- Effekten führen.

In den zwei gleich konzipierten, randomisierten, doppelblinden Studien wurden im überkreuzten Design objektive und subjektive Schlafparameter sowie kognitive Tests als Indikatoren für ZNS- Effekte nach der Einnahme anticholinerg Substanzen u.a. Tolterodin im Vergleich zu Placebo bei älteren bzw. jüngeren Probanden untersucht.

Zur Objektivierung des Schlafverhaltens wurde nach einer Adaptationsnacht unter standardisierten Bedingungen im Schlaflabor eine Ableitung des Schlafes durchgeführt und das Schlafprofil visuell ausgewertet. Zur Einschätzung der subjektiven Schlafparameter und Befindlichkeit wurden außerdem um visuelle Analogskalen erweiterte Morgen- und Abendprotokolle der DGSM verwendet. Die Berücksichtigung sowohl objektiver als auch subjektiver Schlafparameter ist sinnvoll, da zahlreiche Studien belegen, dass trotz statistisch guter Korrelation zwischen beiden Schlafparametern weder Schlafgesunde noch Schlafgestörte die Schlaflatenz, die Anzahl oder die Dauer der nächtlichen Wachzeit in jedem Fall zuverlässig genau einschätzen können. So findet sich z.B. bei insomnischen Beschwerden häufig ein deutlich gestörter Schlaf ohne objektive Korrelate in der Polysomnographie, während es z.B. Schlafapnoe-Patienten gibt, die trotz pathologischer Veränderungen in der Schlafaufzeichnung subjektiv nicht beeinträchtigt sind.

Die unter anticholinergen Substanzen beobachtete Beeinflussung der kognitiven Leistungsfähigkeit kann neben direkten Einflüssen auch durch einen beeinträchtigten Schlaf hervorgerufen werden. Zur Erfassung der kognitiven Leistungsgeschwindigkeit wurde der Zahlen- Verbindungs- Test eingesetzt. Der d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test ermöglichte die Beurteilung individueller Aufmerksamkeits- und Konzentrationsleistungen.

Die Studienmedikation wurde als Einmalgabe in Höhe der empfohlenen gesamten Tagesdosis verabreicht, um die Behandlungsdauer zu verkürzen. Vorhergehende Untersuchungen der Wirkung von anticholinergen Substanzen auf das quantitativ- topographische EEG bzw. die kognitiven Fähigkeiten haben bereits gezeigt, dass dieses Verfahren geeignet ist, Veränderungen der neurobiologischen Aktivität zu untersuchen (Pietzko et al. 1994; Todorova et al. 2001).

Das überkreuzte Design wurde gewählt, um den Einfluss der interindividuellen Varianz der Schlafparameter zu minimieren. Die erhebliche interindividuelle Variabilität von Schlafdauer und Schlafablauf (Williams et al. 1974) macht die Normierung von allgemeingültigen Schlafparametern schwierig. Etwa ein Viertel der Bevölkerung sind Kurz- bzw. Langschläfer, deren regelmäßige Schlafdauer sich deutlich von der mittleren (7 bis 8 Stunden) unterscheidet (Kripke et al. 1979, 2002). Die Existenz von Abendtypen, die erst in den Abendstunden ihre Leistungsspitzen erreichen, spät Zubettgehen und Aufstehen, sowie von Morgentypen, den Frühaufstehern, ist ein weiterer Hinweis auf die Heterogenität des Schlafverhaltens in der Bevölkerung (Kerkhof 1985; Duffy et al. 1999). Für den individuellen Schlafablauf stellt das Lebensalter die wichtigste Einflußgröße dar (Carskadon, Dement 2005). Weiterhin wird das Schlafverhalten u.a. durch Geschlecht, Persönlichkeit, Lebensstil, Umgebung und Essgewohnheiten beeinflusst.

5.1 Einfluss von Tolterodin auf den Schlaf und die kognitiven Fähigkeit unter besonderer Berücksichtigung des Alters

Gemäß der Einschlusskriterien waren die Probanden, die an der Studie zum Einfluss anticholinergischer Substanzen an gesunden jungen Probanden teilnahmen, im Mittel 28 (± 5) Jahre alt, die Teilnehmer der Studie an älteren Probanden waren im Mittel 60 (± 4) Jahre alt.

In der erstgenannten Studie war etwa ein Viertel der Probanden weiblichen Geschlechts, in der zweiten Studie etwa die Hälfte. Geschlechtsspezifische Einflüsse auf das Schlafverhalten werden kontrovers dargestellt, wobei es Hinweise darauf gibt, dass bei Männern mehr Leichtschlaf, weniger Tiefschlaf und mehr Weckreaktionen auftreten als bei Frauen (Bixler 1984, Bliwise 2005). Obwohl das Geschlecht somit einen Einfluss auf die Schlafparameter hat und damit einen möglichen Bias darstellt, sind die Einflüsse im Vergleich zum Lebensalter deutlich geringer und inkonsistent. Bei Männern scheinen altersabhängige Veränderungen stärker ausgebildet zu sein als bei Frauen (Bixler et al. 1984; Bliwise 2005).

Der BMI war für die älteren Probanden mit $25,3 \pm 2,5 \text{ kg/m}^2$ signifikant höher als der für die jüngeren Probanden, der bei $23,2 \pm 2,8 \text{ kg/m}^2$ lag. Keiner der Probanden war jedoch adipös gemäß der NIH Guideline (Clinical Guidelines for the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults 1998), in der Adipositas ab einem BMI von 30 kg/m^2 definiert wird. Da Adipositas insbesondere ein Risikofaktor für schlafbezogene Atemstörungen darstellt (Kryger 2005), was zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Schlafprofils führen kann, ist es wichtig, diesen Parameter in Schlafstudien zu beachten. In unserem Probandenkol-

ektiv war daher (trotz eines signifikant höheren BMI bei den älteren Probanden) kein essentieller Einfluss des höheren BMI auf das Schlafprofil zu erwarten.

Zur **Charakterisierung des Einflusses des Lebensalters auf den Schlaf** wurden zunächst die unter Placebo beobachteten objektiven und subjektiven Schlafparameter sowie die Ergebnisse der kognitiven Tests in den beiden Studienpopulationen ausgewertet.

Die subjektive Schlafqualität sowie das Morgenbefinden und die Leistungsfähigkeit am Tage unterschieden sich zwischen älteren und jüngeren Probanden nicht – beide Probandengruppen waren als gesunde Schläfer rekrutiert worden und waren mit ihrem Schlaf zufrieden.

Typische altersabhängige Veränderungen zeigten sich bei der Auswertung des Schlafprofils. Bei den älteren Probanden war die Schlafeffizienz um ca. 10 % signifikant verringert, was insbesondere aus einem Anstieg des Wachanteils an der Schlafperiode (Zeit zwischen der ersten und letzten Schlafepoche einer Nacht) resultierte, während die Einschlafzeit nicht signifikant verlängert war. Die objektive Einschlafzeit betrug bei den älteren Probanden 13,3 min und bei den jüngeren 14,5 min im Median. Der Wachanteil an der Schlafperiode lag bei allen jüngeren Probanden unter 5 % (Median aller jüngeren Probanden 1,6 %) und damit im Normbereich für einen gesunden Schlaf in dieser Altersgruppe (Carskadon, Dement 2005). Bei den älteren Probanden lag der Wachanteil an der Schlafperiode bei einem Großteil der Probanden zwischen 5 % und 10 % (Median 7,8 %). Auch in der Literatur ist ein erhöhter Wachanteil mit zunehmendem Alter beschrieben, der insbesondere durch einen Anstieg der Anzahl und Dauer der Schlafunterbrechungen hervorgerufen wird (Bliwise 2005; Danker- Hopfer et al. 2005). Weiterhin nimmt beim älteren Menschen typischerweise die im Bett verbrachte Zeit zu, wohingegen die echte Schlafzeit weitgehend unverändert bleibt, allenfalls verringert sie sich etwas (Williams 1974, Bliwise 2005). Dieser Einflussfaktor auf eine verringerte Schlafeffizienz wurde in den beiden Studien weitgehend eliminiert, indem die maximale Dauer des Nachtschlafes auf acht Stunden fixiert wurde, die Probanden hinsichtlich typischer Störfaktoren des Schlafes aufgeklärt worden waren und vor jeder Studiennacht eine Adaptationsnacht vorgeschaltet war.

Hinsichtlich der Verteilung der Schlafstadien an der Gesamtschlafzeit zeigten sich ebenfalls typische Veränderungen, wie u.a. von Ohayon et al. 2004 aufgezeigt, der in einer Metaanalyse die Veränderungen quantitativer Schlafparameter gesunder Individuen von der Kindheit bis zum hohen Alter aufzeigte.

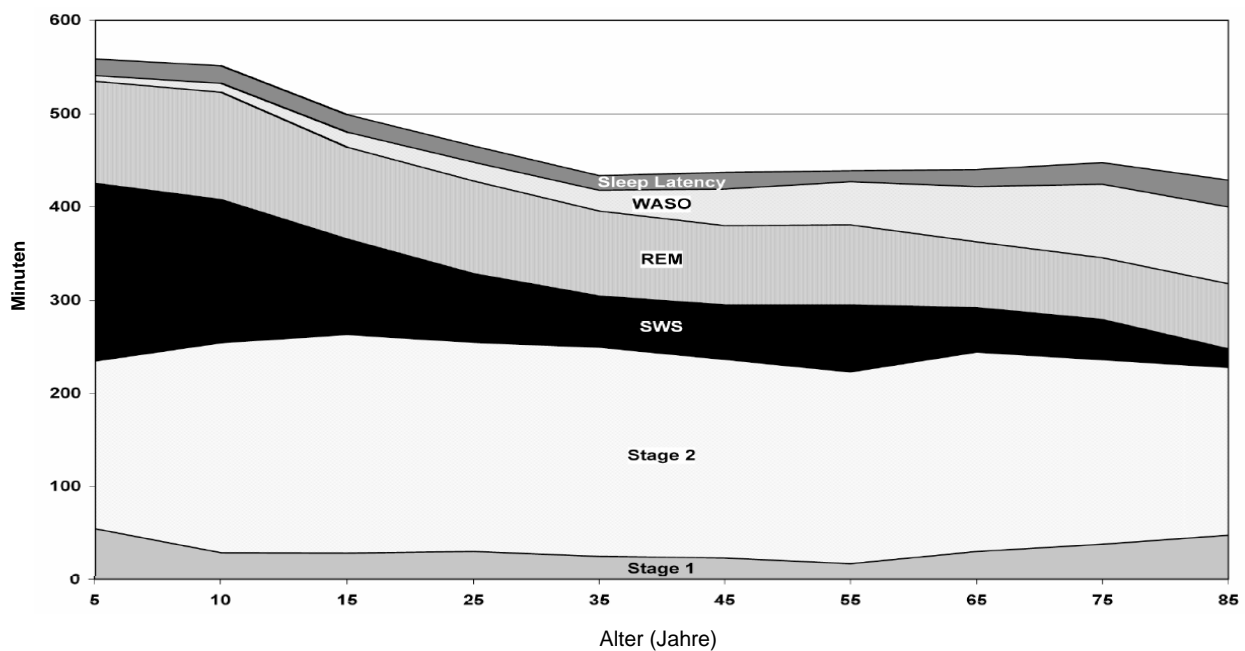


Abbildung 20 Altersabhängige Trends für NonREM1 (Stage 1), NonREM2 (Stage 2), Tiefschlaf (SWS), REM-Schlaf und Wach an SPT (WASO) und Einschlaf latenz in Minuten (nach Ohayon et al. 2004)

Als Ergebnis der Untersuchung zeigten sich folgende charakteristische Altersveränderungen der Schlafstadien bei gesunden jüngeren im Vergleich zu älteren Probanden:

- Der Anteil des REM- Schlafes lag sowohl bei den jüngeren Probanden als auch bei den älteren Probanden bei ca. 20 % der Gesamtschlafzeit und somit im Normbereich, der zwischen 20 % - 25 % für jüngere gesunde Probanden angegeben wird. In Übereinstimmung mit der Literatur (Carskadon, Dement 2005) blieb der REM- Schlafanteil mit zunehmendem Alter weitgehend gleich, solange die Hirnfunktion nicht beeinträchtigt war.
- Der Anteil des Tiefschlafes an der Gesamtschlafzeit lag bei den jüngeren Probanden bei ca. 15 % der Gesamtschlafzeit im Normbereich für diese Altersgruppe (Carskadon, Dement 2005). Im Vergleich dazu verkürzte sich der Tiefschlaf deutlich bei älteren Probanden auf ca. 8 % der Gesamtschlafzeit und reduzierte sich damit im Vergleich zu den jüngeren Probanden um ca. 40 %. Eine deutliche Abnahme der Tiefschlafanteile ist übereinstimmend in der Literatur beschrieben, wobei insbesondere ab einem Alter von 60 Jahren kaum noch Tiefschlaf vorhanden sein kann (Carskadon, Dement 2005).

- Jüngere Probanden benötigten ca. 12 Minuten vom Einschlafen bis zum Erreichen des ersten Tiefschlafes. Diese Zeit war beim älteren Probanden mit ca. 20 Minuten um ca. 60 % länger.
- Im Ausgleich verlängert sich der Leichtschlafanteil (NonREM1 und NonREM2) bei älteren Probanden deutlich. Auch diese Verschiebung der NonREM- Schlafstadien hinsichtlich eines leichteren Schlafes ist aus der Literatur bekannt (Redline et al. 2004, Bliwise 2005).

Auch die subjektive Einschätzung der Probanden spiegelte diese Veränderungen in der Schlafdauer und Schlafstruktur wider: die älteren Probanden gaben eine um ca. 5 % verringerte Schlafdauer an, während die subjektive Einschlafzeit nicht differierte. Bezüglich ihrer subjektiven Befindlichkeit gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen. Sowohl jüngere als auch ältere Probanden schätzten ihre Schlafqualität als gut mit ca. 70 Punkten auf der Visuellen Analogskala von 0 - 100 ein, fühlten sich am Morgen frisch und gut ausgeschlafen (> 80 Punkte im Median) und waren über den Tag hinweg gut leistungsfähig (> 75 Punkte im Median)

Wie zu erwarten, schnitten bei dem kognitiven Test die jüngeren Probanden signifikant besser ab: die Reaktionszeit im Zahlen- Verbindungs- Test war signifikant schneller, die Gesamtzahl im d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test war signifikant höher und die Fehlerquote deutlich geringer.

Für die **Untersuchung der ZNS- Effekte unter anticholinergen Substanzen** wurde die REM- Schlafdauer als primärer Zielparameter ausgewählt, da dieser die gesamte Nacht widerspiegelt. In der Gesamtgruppe aller Probanden aus den beiden Studien fand sich eine Reduktion der REM- Schlafdauer unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo um 10,5 %. Es zeigte sich außerdem in der Gesamtgruppe eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zum Erreichen des ersten REM- Schlafes (REM- Latenz) unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo. Der Einfluss anticholinergischer Substanzen auf den Schlaf ist aus der Literatur bekannt. So zeigte Oxybutynin, was in beiden Studien ebenfalls untersucht wurde (Daten hier nicht gezeigt), im Vergleich zu Tolterodin eine noch deutlich ausgeprägtere Beeinflussung der REM- Schlafdauer sowie der REM- Latenz in beiden untersuchten Altersgruppen (Diefenbach 2003, 2005). Dies könnte auf die bessere Penetrationsfähigkeit der Blut- Hirn- Schranke zurückgeführt werden. Für Scopolamin, das ebenso wie Tolterodin zu den nichtselektiven cholinergen Antagonisten zählt, ist eine deut-

liche Beeinträchtigung des REM- Schlafes beschrieben. Hier zeigte sich insbesondere eine Verringerung des REM- Schlafanteiles um 20 – 60 % und eine variable Verlängerung der REM- Latenz um bis zu 130 % (Sagales et al 1975, Sitaram et al. 1978, Poland et al. 1989, Poland et al 1997, McCracken et al. 1997). Obwohl diese anticholinergen Substanzen nicht direkt verglichen wurden, scheinen die Effekte von Scopolamin auf den REM- Schlaf ausgeprägter zu sein, was wegen guter Penetrationsfähigkeit der Substanz durch die Blut- Hirn- Schranke nicht überrascht:

- Scopolamin ist im Vergleich zu Oxybutynin und Tolterodin zwar relativ schlecht lipidlöslich (Scopolamin log D: 0.72, Oxybutynin log D: 2.17, Tolterodin log D: 1.83).
- Scopolamin hat aber einen deutlich niedrigen Ionisierungsgrad als Oxybutynin und Tolterodin (Patil 2004).
- Scopolamin hat mit 303 D eine deutlich kleinere Molekülgröße als Oxybutynin (393 D) und Tolterodin (476 D).

Zusätzlich war die Wirksamkeit von Tolterodin auf den REM- Schlaf deutlich altersabhängig. Die Verringerung des REM- Schlafes unter Tolterodin war bei den älteren Probanden mit ca. 15 % im Median besonders ausgeprägt. Im Vergleich dazu zeigte sich bei der Untersuchung jüngerer Probanden nur eine Reduktion um ca. 5 % unter Tolterodin, welche auch nicht statistisch signifikant war. Während in der Gesamtgruppe die REM- Latenz im Median um 5 min zunahm, war die REM- Latenz in den beiden Populationen mit 5 min bei den jüngeren und 6,5 min bei den älteren Probanden nicht signifikant verlängert. Bei der Interpretation der Resultate der REM- Latenz darf man jedoch nicht aus den Augen verlieren, dass dieser Parameter nur den Beginn der Nacht widerspiegeln kann.

Wie bereits unter verschiedenen anderen anticholinergen Substanzen (z.B. Scopolamin) bzw. Substanzen mit anticholinergem Wirkkomponente (z.B. Antidepressiva) in der Literatur beobachtet (Sagales et al 1975, Sitaram et al. 1978, Poland et al. 1989, Poland et al 1997, McCracken et al. 1997), zeigten sich bei den NonREM- Schlafparametern deutlich geringere Effekte unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo. Keine Unterschiede zeigten sich für die Schlafeffizienz. Es wurde eine nur geringe Verschiebung in den Schlafstadien beobachtet, welche aber ebenfalls bei den älteren Probanden stärker ausgeprägt war. In dieser Gruppe zeigte sich eine Verlängerung des Leichtschlafstadiums NonREM2, wahrscheinlich auf Kosten einer signifikanten Verringerung der REM- Schlafanteiles sowie einer nicht signifikanten Verringerung des SWS- Anteiles.

Obwohl der REM- Schlafanteil nach Einnahme von Tolterodin auf 19,1% der Gesamtschlafzeit bei den jüngeren Probanden und auf 16,7 % bei den älteren Probanden sank (und damit insbesondere bei den älteren Probanden unterhalb des Normbereiches lag), erreichte er noch keine pathologisch erniedrigten Werte. Daher war keine ausgeprägte Beeinträchtigung der Konzentration oder der kognitiven Funktion zu erwarten. So zeigte sich kein manifester Effekt von Tolterodin auf die kognitive Leistungsgeschwindigkeit bzw. auf die Aufmerksamkeits- und Konzentrationsleistungen. Um Gedächtnisstörungen bei Älteren ausschließen zu können, wären dennoch weitere kognitive Tests notwendig, welche subtile Veränderungen der Gedächtnisleistungen auf verschiedenen Ebenen erfassen.

Bei der subjektiven Befindlichkeit zeigten sich sowohl in der Gesamtgruppe als auch in den beiden Altersgruppen niedrigere Werte unter Tolterodin, die jedoch lediglich bei den älteren Probanden für die Leistungsfähigkeit am Tage signifikant schlechtere Werte erreichten.

Zusammenfassend zeigte sich hinsichtlich des Alterseinflusses bei Personen über 50 Jahren unter der anticholinergen Substanz Tolterodin eine deutlichere Beeinträchtigung insbesondere des REM- Schlafes im Vergleich zu den Jüngeren. Diese Beobachtung deckt sich mit der von verschiedenen Autoren beschriebenen Altersabhängigkeit unter anderen anticholinergen Substanzen (z.B. Scopolamin) sowie mit Berichten über neuropsychiatrische Nebenwirkungen insbesondere bei älteren Patienten, die mit tertiären Anticholinergika wie Oxybutynin oder Tolterodin behandelt wurden. Diese Ergebnisse unterstreichen auch, dass neben pharmakokinetischen auch pharmakodynamische Aspekte eine wichtige Rolle für die Häufigkeit und Intensität von ZNS- Nebenwirkungen bei anticholinergen Substanzen spielen. In der Literatur wurden bei älteren Menschen ausgeprägtere ZNS- Wirkungen beobachtet, selbst wenn die Dosierung an die altersbedingten Veränderungen des Körpers und die Ausscheidung angepasst wurde. Somit kann eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit sowie neuropsychiatrische Nebenwirkungen unter Tolterodin nicht ausgeschlossen werden, insbesondere, wenn ältere Patienten behandelt werden und diese Patienten im Ausgangsbefund bereits durch verschiedene psychiatrische Erkrankungen (z.B. Depression) und/ oder Schlafstörungen eine Beeinträchtigung des REM- Schlafes zeigen. Es bleibt dabei zu bedenken, dass in den hier vorliegenden Studien nur die Effekte einer Einmaldosis in Höhe der empfohlenen gesamten Tagesdosis untersucht wurden und diese Substanzen häufig bei chronisch Kranken eingesetzt werden. Die Entwicklung der Effekte auf die Schlafstruktur unter Dauertherapie und deren Einfluss auf die kognitiven Fähigkeiten ist nicht bekannt.

5.2 Einfluss von Tolterodin auf den Schlaf und die kognitiven Fähigkeit unter besonderer Berücksichtigung des Genotyps

Von den 53 in die Studien eingeschlossenen Probanden lagen für 44 Probanden sowohl eine Zustimmung zur Genotypisierung als auch objektive und subjektive Schlafdaten und kognitive Tests für Tolterodin vor. Alle 44 Probanden waren Kaukasier.

Unter den 44 Probanden (d.h. 88 Allelen) fanden sich folgende Allelfrequenzen:

- 67 % für das Wildtyp- Allel *1 (n = 59)
Die Häufigkeit des Wildtyp- Allels *1 liegt bei Sachse et al. bei 36,4 %, dazu kommen noch 32,4 % als Träger des Allels *2 für das keine eingeschränkte CYP2D6 postuliert wird. (Allel *1 + Allel *2: 68,8 %) Aus diesem Grunde wurde in dieser Untersuchung nicht zwischen diesen beiden Allelen differenziert, beide Allele finden sich in der Schnellmetabolisierer- Gruppe unter Allel *1 wieder.
- 25 % für das Langsammetabolisierer- Allel *4 (n = 22), sowie je 3,4 % für die Langsammetabolisierer- Allele *3 und *5 (je n = 3)
Frequenzen für die Langsammetabolisierer- Allele *3, *4, *5 und *6, bei denen es zu einem Verlust der Enzymaktivität kommt, werden bei Sachse et al. (1997), der CYP2D6-Varianten von 589 Kaukasiern untersuchte, mit 2,04 %, 20,7 %, 1,95 % und 0,93 % angegeben. Erwartungsgemäß war sowohl in unserer Studie als auch bei der von Sachse et al. die Splice- site- Mutation G1846A, die als Allel *4 definiert ist, die häufigste Mutation.
- 1,1 % für das duplizierte Allel *2x2 (n = 1)
Die Häufigkeit für das duplizierte Allel liegt bei Sachse et al. (1997) bei 1,34 %.
- das Allel *6 wurde nicht detektiert.

Damit liegen die Allelfrequenzen unseres Probandenkollektivs im Bereich der Referenzwerte für die kaukasische Bevölkerung.

Bezüglich der Genotypen fanden wir unter den 44 Probanden:

- 43 % (n = 19) Schnellmetabolisierer (EM)
- 46 % (n = 20) intermediäre Metabolisierer (IM), die mindestens ein defizientes Allel (Allele *3, *4 oder *5) besaßen

- 9 % (n = 4) Langsammetabolisierer (PM) mit zwei defizienten Allelen
Die Häufigkeit der Langsammetabolisierer wird bei Sachse et al. mit 7,24 % angegeben und umfasst die Allele *3, *4, *5, *6 und *15, wobei die Allelfrequenzen der nicht von uns untersuchten Variante *15 mit 0,08 % einen nur unbedeutenden Anteil einnimmt.
- 2 % (n = 1) ultraschnelle Metabolisierer (UM) mit mindestens einem duplizierten Allel *2
Die Häufigkeit der ultraschnellen Metabolisierer mit mindestens 3 aktiven Allelen wird bei Sachse et al. mit 2,63 % angegeben, wobei die Duplikation des Allels *2 mit einer Allelfrequenz von 1,34 % im Vergleich zu den Duplikationen des Allels *1 und *4 mit einer Allelfrequenz von 0,51 % und 0,08 % den größten Anteil darstellt.

Damit liegt die Häufigkeit der Langsammetabolisierer und der ultraschnellen Metabolisierer aus unserer Studie im Bereich der für Kaukasier gefundenen Referenzwerte.

Die demographischen Daten, d.h. Alter und BMI, unterschieden sich nicht signifikant zwischen Schnellmetabolisierern, intermediären Metabolisierern und Langsammetabolisierern.

Wegen der geringen Gruppenstärke der Langsammetabolisierer beruht ein Großteil der Ergebnisse auf einer Kombination der Gruppen mit einem oder zwei defizienten CYP2D6- Allelen (IM + PM).

Zur **Charakterisierung des Einflusses des Genotyps auf den Schlaf** an sich wurden zunächst die unter Placebo beobachteten objektiven und subjektiven Schlafparameter sowie die Ergebnisse der kognitiven Tests in den beiden Studienpopulationen ausgewertet.

Hinsichtlich der objektiven Schlafparameter zeigten sich keine Einflüsse des CYP2D6- Genotyps auf die Verteilung der Schlafstadien an der Gesamtschlafzeit, die Schlaflatenzen oder die Schlafeffizienz. Insbesondere die REM- Schlafdauer als Hauptzielparameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den Schnellmetabolisierern und den Probanden mit Defizienz im CYP2D6- Genotyp. Auch für die subjektiven Schlafparameter zeigte sich kein Einfluss des CYP2D6- Genotyps. Dieses deckt sich mit dem Ergebnis einer Literaturrecherche in medizinischen Literaturdatenbanken (Pubmed, Medline), die keine Hinweise auf einen Einfluss des CYP2D6- Genotyps auf den Schlaf lieferte.

Bei den kognitiven Tests zeigte sich sowohl für den Zahlen- Verbindungs- Test als auch für den Aufmerksamkeits- Belastungs- Test eine deutlich schlechtere Performance für die Probanden mit Defizienz im CYP2D6. Im d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test war bei Probanden mit

Defizienz im CYP2D6 die Gesamtzahl um 12 % signifikant niedriger, die Fehlerquote um 18 % höher. Im Zahlen- Verbindungs- Test war die Reaktionszeit bei diesen Probanden um etwa 30 % länger. Bisher finden sich in der Literatur keine Hinweise auf einen Einfluss des CYP2D6- Genotyps auf die kognitiven Fähigkeiten. Dieses Ergebnis sollte dennoch Anlass geben, die kognitive Leistungsfähigkeit in Abhängigkeit vom CYP2D6- Genotyp in weiteren prospektiven Untersuchungen zu evaluieren. Insbesondere sollte bei Studien, die den Einfluss des CYP2D6- Genotyps auf Psychopharmaka untersuchen, darauf geachtet werden, dass auch Placebowerte mit berücksichtigt werden.

Als primärer Zielparameter für die **Darstellung der ZNS- Effekte unter Tolterodin** wurde die REM- Schlafdauer ausgewählt, da dieser Parameter die gesamte Nacht widerspiegelt. Differenziert man die Reduktion der REM- Schlafdauer unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo, die in der Gesamtgruppe bei 10,5 % lag, nach Genotyp, zeigt sich eine deutliche Beeinträchtigung bei den Probanden mit CYP2D6- Defizienz:

- Bei Schnellmetabolisierern war eine Reduktion des REM- Schlafanteils unter Tolterodin um 5 % zu beobachten, wobei diese Reduktion nicht signifikant war.
- Im Vergleich lag bei Probanden mit CYP2D6- Defizienz eine signifikante Reduktion des REM- Schlafanteils unter Tolterodin um im Median 20 % vor.

Da die Probandengruppe mit CYP2D6- Defizienz sowohl intermediäre Metabolisierer als auch Langsammetabolisierer enthält, wurde zusätzlich eine separate Analyse des REM- Schlafanteils für diese beiden Gruppe durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion des REM- Schlafanteils bei den intermediären Metabolisierern ($p = 0,049$) während sich für die Langsammetabolisierer lediglich ein Trend zeigte ($p = 0,068$). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieses Ergebnis auf die geringe Fallzahl in der Gruppe der Langsammetabolisierer ($n = 4$) zurückzuführen ist. Daher wurde im weiteren Verlauf keine separate Analyse dieser beiden Gruppen mit CYP2D6- Defizienz durchgeführt.

Während in der Gesamtgruppe die REM- Latenz im Median um 5 min zunahm, war die REM- Latenz in den beiden Genotyp- Populationen mit 10 min bei den Schnellmetabolisierern und 5 min bei Probanden mit defizientem CYP2D6- Genotyp nicht signifikant verlängert.

Bei Langsammetabolisierern wird Tolterodin nicht via CYP2D6 zu dem aktiven 5- Hydroxymethyl- Metaboliten (5- HM) abgebaut, sondern via CYP3A4 zu inaktivem N- dealkylierten Tolterodin. Diese Defizienz im Hauptabbauweg über CYP2D6 führt bei Langsammetabolisierern zu einer deutlich verminderten Clearance von Tolterodin. Daher wird bei

Langsammetabolisierern eine ca. 7-fach höhere Konzentration im Vergleich zu Schnellmetabolisierern gefunden. Weiterhin ist die Halbwertszeit von Tolterodin bei Langsammetabolisierern deutlich verlängert (Brynne et al. 1998). Da sich diese Veränderungen insbesondere auf die Eliminationsphase auswirken, während die Absorption weitgehend unverändert bleibt, ist es nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse der Untersuchung der REM-Latenz, die lediglich die ersten ca. 1.5 Stunden einer Nacht widerspiegelt, keine Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen zeigten. Eine Beeinträchtigung des REM-Schlafes ist im Falle einer CYP2D6-Defizienz erst im Laufe der Nacht zu erwarten, was sich deutlich an den Veränderungen des REM-Schlafanteils widerspiegelt.

Bei den NonREM-Schlafparametern zeigten sich erwartungsgemäß deutlich geringere Effekte unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo. Keine Unterschiede zeigten sich für die Schlafeffizienz. Es zeigte sich lediglich eine geringfügige Verschiebung in den Schlafstadien insbesondere bei Probanden mit defizientem Genotyp. In dieser Gruppe wurde eine Verlängerung der NonREM2-Dauer wahrscheinlich auf Kosten einer signifikanten Verringerung des REM-Schlafanteiles beobachtet. Da die Reduktion des REM-Schlafes jedoch keine pathologischen Werte erreichte, war keine ausgeprägte Beeinträchtigung der kognitiven Funktion zu erwarten. Für keinen der untersuchten kognitiven Parameter konnten Unterschiede zwischen der Gruppe der Schnellmetabolisierer und der Gruppe mit defizientem CYP2D6-Genotyp im Vergleich von Tolterodin und Placebo gefunden werden.

Wie bereits aufgezeigt, differieren die pharmakokinetischen Parameter zwischen Langsammetabolisierern und Schnellmetabolisierern deutlich, was jedoch hinsichtlich des pharmakologischen Effektes eine nur geringe klinische Relevanz darzustellen scheint, da der aktive Metabolit 5-HM signifikant zum pharmakologischen Effekt bei Schnellmetabolisierern beiträgt und dieser Effekt bei Langsammetabolisierern durch Tolterodin allein übernommen wird. In einer klinischen Studie konnten keine Unterschiede bezüglich der Sicherheit, Verträglichkeit und klinischen Wirksamkeit von Tolterodin in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Metabolisierungswegen detektiert werden (Larsson 1999). Inwieweit die in dieser Studie gezeigten pharmakokinetischen Unterschiede einen Einfluss insbesondere auf das Nebenwirkungsprofil haben, kann diese Studie jedoch nicht allumfassend beantworten, dazu ist die Fallzahl der Langsammetabolisierer (N= 3 - 5 pro Dosisgruppe) zu klein und das Design sowie die Methodik nicht geeignet, spezifische Nebenwirkung, z.B. im ZNS-Bereich, zu erfassen. Dass der Therapieerfolg und/ oder die Nebenwirkungsrate neben individuellen Einflussfaktoren, wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Leber- und Nierenfunktion, auch vom Metabolisierer-Status ab-

hängt, konnte bereits für verschiedene Psychopharmaka gezeigt werden, die über CYP2D6 abgebaut werden. (Kirchheiner et al. 2004). Dazu waren jedoch große multizentrische Studien mit umfassender Erfassung und Auswertung von Nebenwirkungen notwendig.

Aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften ist es denkbar, dass Tolterodin und sein aktiver 5- Hydroxymethyl- Metabolit (5- HM) jeweils unterschiedliche Penetrationsfähigkeiten der Blut- Hirn- Schranke besitzen:

- Tolterodin ist im Vergleich zu dessen aktiven Metabolit 5- Hydroxymethyl- Tolterodin deutlich lipophiler (Tolterodin log D: 1.83 vs. 5- HM log D: 0.74)
- durch das Hinzufügen der Hydroxymethylgruppe besitzt 5- HM außerdem ein höheres Molekulargewicht sowie einen niedrigeren Ionisierungsgrad als Tolterodin

Tolterodin dürfte deshalb die Blut- Hirn- Schranke besser penetrieren.

Daher ist es möglich, dass zentralnervöse Effekte bei Probanden mit einer Defizienz im CYP2D6 im Vergleich zu Schnellmetabolisierern häufiger auftreten, da durch den defizienten Metabolisierungsweg Tolterodin höhere Spiegel erreicht und langsamer abgebaut wird. Im Gegensatz dazu wandeln Schnellmetabolisierer Tolterodin sehr schnell zu 5- Hydroxymethyl- Tolterodin um.

Wirkungen von Tolterodin, die denen einer CYP2D6- Defizienz ähnlich sind, könnten durch Interaktionen mit Substanzen auftreten, die CYP2D6 inhibieren (s. Tabelle 2). Dadurch könnten bei Probanden, die eigentlich Schnellmetabolisierer sind, aber Substanzen einnehmen, die CYP2D6 inhibieren, ähnliche Effekte wie bei Langsammetabolisierern hervorgerufen werden. Bei Langsammetabolisierern sind im Falle von Tolterodin außerdem Substanzen zu beachten, die den CYP3A4- Metabolismus (s. Tabelle 2) beeinträchtigen können, da bei Langsammetabolisierern Tolterodin via CYP3A4 zum inaktiven N- dealkylierten Tolterodin umgewandelt wird. Die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen Anwendung von mehreren Medikamenten ist bei älteren Patienten deutlich höher. So zeigte beispielsweise die Berliner Altersstudie, dass mehr als ein Drittel der über 70jährigen mehr als 5 Medikamente täglich einnimmt.

Zusammenfassend zeigte sich hinsichtlich des Einflusses des Genotyps bei Probanden, die zumindest ein defizientes CYP2D6- Allel besitzen, eine deutlich ausgeprägtere Beeinträchtigung insbesondere des REM- Schlafes unter der anticholinergen Substanz Tolterodin als bei Schnellmetabolisierern, die zwei funktionelle Allele besitzen. Die Ergebnisse dieser Untersu-

chung zeigen auch, dass pharmakokinetische Aspekte eine wichtige Rolle für die Häufigkeit und Intensität von ZNS- Nebenwirkungen bei anticholinergen Substanzen spielen können. Somit können eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit und neuropsychiatrische Nebenwirkungen unter Tolterodin nicht ausgeschlossen werden, insbesondere wenn ältere Patienten behandelt werden, die eine Defizienz im CYP2D6- Gen besitzen. Weiterhin sind Interaktionen mit Substanzen zu beachten, die CYP2D6 inhibieren und damit zu einer höheren Exposition von Tolterodin führen. Bei Langsammetabolisierern sind auch Substanzen zu beachten, die CYP3A4 beeinflussen.

5.3 Kritische Bewertung der Methodik und Ausblick

Es bleibt dabei jedoch zu bedenken, dass in der hier vorliegenden Untersuchung lediglich retrospektiv Daten analysiert wurden. Weiterhin kritisch anzumerken ist, dass die Daten nicht im Rahmen einer Studie gewonnen wurden, sondern aus zwei Studien stammen. Dennoch schien das Zusammenführen der Daten beider Studien geeignet, um die Altersabhängigkeit und den Einfluss des CYP2D6- Genotyps zu testen sowie Hypothesen für weitere Studien zu generieren, da beide Studien identisch im Design waren und sich lediglich in dem eingeschlossenen Probandenkollektiv unterschieden. Als primärer Parameter wurde in beiden Studien der REM-Schlafanteil ausgewählt und die Fallzahl der Studien dementsprechend berechnet.

Bei der Analyse der Alterabhängigkeit wurden die Daten aus der ersten Studie an jungen Probanden im Alter zwischen 22 und 43 Jahren mit denen aus der zweiten Studie an älteren Probanden im Alter zwischen 51 und 65 Jahren verglichen. Optimal wäre eine prospektive Studie, welche die Einflüsse des Alters in ein und derselben Studie untersucht. Eine solche Studie ist jedoch insbesondere wegen des hohen Kostenaufwandes für eine Schlafuntersuchung in diesem Ausmaße kaum zu realisieren.

Bei der Analyse des Einflusses des CYP2D6- Genotyps wurden die Probanden aus beiden Studien zusammengeführt, um eine höhere Fallzahl zu erreichen (insgesamt 44 Probanden), wobei sich die Genotyp- Gruppen hinsichtlich ihrer demographischen Daten nicht unterschieden. Da die Auswahl der Probandenkollektive nicht hinsichtlich des Genotyps erfolgte und auch die Studie nicht auf eine Subgruppenanalyse ausgerichtet war, fanden sich Allelfrequenzen in dem in der kaukasischen Bevölkerung gefundenen Bereich. Daher ist die Gruppe der Langsammetabolisierer mit einer Fallzahl von vier für eine statistische Auswertung sehr gering und es fand sich nur ein Proband mit einem ultraschnellen Metabolisierer- Status. Die Resultate des Einflusses des CYP2D6- Genotyps auf den REM- Schlafanteil (primärer Zielparameter der Stu-

dien) unter der Einnahme von Tolterodin zeigten sowohl für die intermediären Metabolisierer als auch für die Langsammetabolisierer einen deutlichen Einfluss. Daher wurde im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit entschieden, diese beiden Gruppen gemeinsam zu analysieren. Auf eine Analyse und den Vergleich der Daten des ultraschnellen Metabolisierers wurde verzichtet. Optimal wäre eine prospektive Untersuchung von gleich großen Gruppen von Schnellmetabolisierer, intermediären Metabolisierer, Langsammetabolisierer und ultraschnellen Metabolisierern hinsichtlich des Einflusses von Tolterodin auf den Schlaf und die kognitiven Fähigkeiten. Eine solche Untersuchung ist jedoch mit einem hohen Aufwand hinsichtlich der Auswahl der Probanden verbunden, da nur ca. 7,3 % der kaukasischen Bevölkerung einen Langsammetabolisierer-Status aufweisen und nur ca. 2,6 % einen ultraschnellen. Außerdem ist der Aufwand einer Untersuchung der objektiven Schlafparameter mittels Polysomnographie, unter der Berücksichtigung von 4 Metabolisierergruppen, als sehr hoch einzuschätzen, zumal eine solche Untersuchung im Parallelgruppen-Design durchgeführt werden müsste. In den beiden analysierten Studien wurde ein überkreuztes Design gewählt, um den Einfluss der interindividuellen Varianz der Schlafparameter zu minimieren. Eine Analyse der Schlafparameter in einem Parallelgruppen-Design würde eine deutlich höhere Fallzahl verlangen, als in den hier verwendeten Studien.

Weiterhin ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten, dass Effekte einer Einmaldosis in Höhe der empfohlenen gesamten Tagesdosis bei gesunden Probanden analysiert wurden. Zwar konnten vorhergehende Untersuchungen zeigen, dass dieses Verfahren geeignet ist, Veränderungen der neurobiologischen Aktivität nach Gabe von anticholinergen Substanzen zu untersuchen, dennoch ist dies keine allumfassende Aussage. So könnten bei Mehrfachgabe z.B. Effekte, die durch einen veränderten Metabolisierungsweg entstehen, insbesondere zeitabhängige pharmakokinetische Aspekte (Kumulation), eine Rolle spielen. Weiterhin könnten Gewöhnungseffekte nach längerdauernder Therapie auftreten, wie diese z.B. unter der anticholinergen Substanz Scopolamin berichtet wurden. Daher ist auch die Entwicklung der Effekte auf die Schlafstruktur unter Dauertherapie nicht ohne weiteres vorhersehbar.

6 Zusammenfassung

Anticholinerge Substanzen wie Oxybutynin, Tolterodin, Propiverin und Trosipiumchlorid werden zur Therapie des Syndroms der überaktiven Blase, welches insbesondere ältere Menschen betrifft, eingesetzt. Relativ häufig limitieren anticholinerge Nebenwirkungen Therapieresultate und Compliance der Patienten. Unter Tolterodin werden zentralnervöse Effekte wie Schläfrigkeit, Verwirrheitszustände und Halluzinationen eher selten beobachtet, am häufigsten jedoch bei Älteren. Zur Verbesserung der Sicherheit in der Anwendung sowie zur Evaluierung von zentralnervösen Nebenwirkungen und möglichen Wirkungen auf den Schlaf wurde in der hier vorgestellten Arbeit die Substanz Tolterodin untersucht und mit einer Placebomedikation verglichen.

Die Arbeit basiert auf zwei Studien, die durchgeführt wurden, um ZNS- Effekte anticholinergere Substanzen (u.a. Tolterodin) zu prüfen. Dazu wurden die Ergebnisse der Studie an einer jüngeren Probandengruppe mit denen der Studie an der Hauptzielpopulation für diese Medikamente, an über 50 Jahre alten Personen, verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, inwieweit genetisch bedingte Veränderungen im Cytochrom- P450 CYP2D6 und damit im Metabolismus von Tolterodin zu Unterschieden bei den ZNS- Effekten führen. Zur Objektivierung des Schlafverhaltens wurde im Schlaflabor eine Ableitung des Schlafes durchgeführt. Zur Einschätzung der subjektiven Schlafparameter und Befindlichkeit wurden Morgen- und Abendprotokolle verwendet. Die kognitive Leistungsgeschwindigkeit wurde durch den Zahlen- Verbindungs- Test erfasst. Der d2- Aufmerksamkeits- Belastungs- Test ermöglichte die Beurteilung individueller Aufmerksamkeits- und Konzentrationsleistungen.

Bei der Auswertung des Schlafprofils ohne Medikamenteneinfluss (Placebo) zeigten sich typische, in der Literatur beschriebene, altersabhängige Veränderungen. Bei den älteren Probanden ($n = 25$, mittleres Alter 60 ± 4 Jahre) war die Schlafeffizienz im Vergleich zu den jüngeren Probanden ($n = 28$, mittleres Alter 28 ± 5 Jahre) um ca. 10 % signifikant verringert. Der Anteil des REM- Schlafes lag sowohl bei den jüngeren Probanden als auch bei den älteren Probanden bei ca. 20 % der Gesamtschlafzeit und somit im Normbereich. Im Vergleich zu den jüngeren Probanden verkürzte sich der Tiefschlaf bei älteren Probanden. Im Ausgleich verlängert sich bei dieser Altersgruppe der Leichtschlafanteil. Auch die subjektive Einschätzung der Probanden spiegelt diese Veränderungen in der Schlafdauer und Schlafstruktur wider. Wie zu erwarten war, schnitten bei dem kognitiven Test die jüngeren Probanden signifikant besser ab.

Beim unbehandelten Probanden (Placebo) wurden keine Einflüsse des CYP2D6- Genotyps auf

die objektiven Schlafparameter (Verteilung der Schlafstadien an der Gesamtschlafzeit, Schlaf-latenzen oder die Schlaffeizienz) beobachtet. Insbesondere die REM- Schlafdauer als Hauptzielparameter unterschied sich nicht signifikant zwischen den Schnellmetabolisierern ($n = 19$) und den Probanden mit Defizienz im CYP2D6- Genotyp ($n = 24$). Auch für die subjektiven Schlafparameter zeigte sich kein Einfluss des CYP2D6- Genotyps. Bei den kognitiven Tests zeigte sich sowohl im Zahlen- Verbindungs- Test als auch im Aufmerksamkeits- Belastungs- Test eine deutlich schlechtere Performanz bei den Probanden mit Defizienz im CYP2D6. Bisher findet sich in der Literatur kein Hinweis auf einen Einfluss des CYP2D6- Genotyps auf die kognitiven Fähigkeiten. Dieses Ergebnis sollte dennoch Anlass geben, die kognitive Leistungsfähigkeit in Abhängigkeit vom CYP2D6- Genotyp in weiteren prospektiven Untersuchungen zu evaluieren.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag jedoch auf den Einflüssen des Alters sowie des Metabolisierungsweges auf die subjektive und objektive Schlafstruktur sowie auf kognitive Parameter nach einer Einmalgabe von Tolterodin am Abend.

Bei Probanden, die zumindest ein defizientes CYP2D6- Allel besitzen, zeigte sich eine ausgeprägte Beeinträchtigung des REM- Schlafes unter der anticholinergen Substanz Tolterodin im Vergleich zu Placebo (Reduktion des REM- Schlafanteils um 20 %; $p = 0,019$), während bei Schnellmetabolisierern, die zwei funktionelle Allele besitzen, der Einfluss auf den REM- Schlaf geringer war (Reduktion des REM- Schlafanteils um 5 %; nicht signifikant). Bei den NonREM- Schlafparametern zeigten sich erwartungsgemäß deutlich geringere Effekte unter Tolterodin im Vergleich zu Placebo. Bei Langsammetabolisierern wird Tolterodin nicht via CYP2D6 zu dem aktiven 5- Hydroxymethyl- Metaboliten abgebaut, sondern via CYP3A4 zu inaktivem N- dealkylierten Tolterodin. Diese Defizienz im Hauptabbauweg über CYP2D6 führt bei Langsammetabolisierern zu einer deutlich verminderten Clearance von Tolterodin. Aufgrund unterschiedlicher pharmakologischer Eigenschaften ist es denkbar, dass Tolterodin im Vergleich zu seinem aktiven 5- Hydroxymethyl- Metabolit besser die Blut- Hirn- Schranke penetriert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen außerdem, dass neben pharmakologischen auch pharmakokinetische Aspekte eine wichtige Rolle für die Häufigkeit und Intensität von ZNS- Nebenwirkungen bei anticholinergen Substanzen spielen können.

Bei Probanden über 50 Jahren war der REM- Schlaf unter Tolterodin deutlich mehr beeinträchtigt als bei jüngeren (Reduktion des REM- Schlafanteils um 15 % bei älteren Probanden, $p = 0,012$ vs. 5 % bei jüngeren, nicht signifikant). Dieses Ergebnis deckt sich mit der von verschiedenen Autoren beschriebenen Altersabhängigkeit unter anderen anticholinergen Substanzen

sowie mit Berichten über neuropsychiatrischen Nebenwirkungen unter Tolterodin bei älteren Patienten. Diese Ergebnisse unterstreichen, dass zusätzlich pharmakodynamische Aspekte die Häufigkeit und Intensität von ZNS- Nebenwirkungen bei anticholinergen Substanzen beeinflussen.

Obwohl bei den untersuchten kognitiven Parametern keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Altersgruppen und in Abhängigkeit vom Metabolisierer- Status gefunden wurden, kann eine Beeinträchtigung der kognitiven Leistungsfähigkeit sowie neuropsychiatrische Nebenwirkungen unter Tolterodin nicht ausgeschlossen werden. Dies trifft insbesondere für die Behandlung älterer Patienten zu und könnte besonders dann in Erscheinung treten, wenn diese:

- bereits im Ausgangsbefund durch verschiedene psychiatrische Erkrankungen (z.B. Depression oder Demenz) und/ oder Schlafstörungen eine Beeinträchtigung des REM-Schlafes zeigen.
- eine Defizienz im CYP2D6- Gen besitzen.
- zusätzlich Substanzen einnehmen, die CYP2D6 inhibieren und damit zu einer höheren Exposition von Tolterodin führen (bei Langsammetabolisierern auch Substanzen, die CYP3A4 beeinflussen).

Es bleibt zu bedenken, dass in der hier vorliegenden Untersuchung retrospektiv Daten analysiert wurden, die nach einer Einmaldosis in Höhe der empfohlenen gesamten Tagesdosis bei gesunden Probanden erhoben wurden. Inwieweit diese Ergebnisse auf die Variationsbreite von Patienten unter Dauertherapie übertragen werden können, sollte in prospektiven Studien untersucht werden.

Die Ergebnisse geben Hinweise auf die Ursache individuell unterschiedlicher Suszeptibilität für zentralnervöse Nebenwirkungen unter Tolterodin sowie auf mögliche Auswirkungen auf den Schlaf.

7 Literaturverzeichnis

1. Abrams P, Cardozo L, Fall M, Griffiths D, Rosier P, Ulmsten U, van Kerrebroeck P, Victor A, Wein A; Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. The standardisation of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. 2002;21(2):167-78.
2. Appell RA. Clinical efficacy and safety of tolterodine in the treatment of overactive bladder: a pooled analysis. *Urology*. 1997 Dec;50(6A Suppl):90-6; discussion 97-9.
3. Benet LZ, Kroetz DL, Sheiner LB. 1996. Pharmacokinetics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, and Elimination: Principle of Therapeutics. In: Goodman and Gilman's eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th edn. New York: McGraw-Hill. P 3-28
4. Bixler EO, Kales A, Jacoby JA, Soldatos CR, Vela-Bueno A. Nocturnal sleep and wakefulness: effects of age and sex in normal sleepers. *Int J Neurosci*. 1984 Mar;23(1):33-42.
5. Bliwise DL, Ansari FP, Straight LB, Parker KP. Age changes in timing and 24-hour distribution of self-reported sleep. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2005 Dec;13(12):1077-82.
6. Bliwise DL. Normal aging. In: *Principles and practice of sleep medicine*, eds. Kryger MH, Roth T, Dement WC, 4th edition 2005. pp24-38.
7. Bradbury MW. 2000. history and physiology of blood- brain barrier in relation to delivery of drugs to the brain. In: Begley DJ, Bradbury MW, Keuter J eds, *The bloodbrain barrier and drug delivery to the CNS*. New York, Basel: Marcel Dekker. P 1-8.
8. Brickenkamp R.: Test d2 Aufmerksamkeits- Belastungs- Test. In *Testzentrale Testkatalog 1998/99*. Göttingen bern: 94 (1998)
9. British Medical Association, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. *British National Formulary*. No 34. London : BMA. RPS, 1997
10. Brynne N, Dalen P, Alvan G, Bertilsson L, Gabrielsson J. Influence of CYP2D6 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamic of tolterodine. *Clin Pharmacol Ther*. 1998 May;63(5):529-39.
11. Brynne N, Dalen P, Alvan G, Bertilsson L, Gabrielsson J. Influence of CYP2D6 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamic of tolterodine. *Clin Pharmacol Ther*. 1998 May;63(5):529-39.
12. Brynne N, Stahl MM, Hallen B, Edlund PO, Palmer L, Hoglund P, Gabrielsson J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolterodine in man: a new drug for the treatment of urinary bladder overactivity. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1997 Jul;35(7):287-95.
13. Carskadon MA, Dement WC. Normal Human Sleep an Overview. In: *Principles and practice of sleep medicine*, eds. Kryger MH, Roth T, Dement WC, 4th edition, Elsevier Saunders 2005. pp13-23.
14. Clemett D, Jarvis B. Tolterodine: a review of its use in the treatment of overactive bladder. *Drugs Aging*. 2001;18(4):277-304.

15. Daly AK, Leathart JB, London SJ, Idle JR. An inactive cytochrome P450 CYP2D6 allele containing a deletion and a base substitution. *Hum Genet.* 1995 Mar;95(3):337-41.
16. Danker-Hopfer H, Schäfer M, Dorn H, Anderer P, Saletu B, Gruber G, Zeitlhofer J, Kunz D, Barbanj M-J, Himanen SJ, Kemp B, Penzel T, Röschke J, Dorffner G: Percentile Reference Charts for Selected Sleep Parameters for 20- to 80-Year-Old Healthy Subjects from the SIESTA Database. *Somnologie.*2005;9(1):3-14.
17. Diefenbach K, Arold G, Wollny A, Schwantes U, Haselmann J, Roots I. Effects on sleep of anticholinergics used for overactive bladder treatment in healthy volunteers aged > or = 50 years. *BJU Int.* 2005 Feb;95(3):346-9.
18. Diefenbach K, Donath F, Maurer A, Quispe Bravo S, Wernecke D, Schwantes U, Haselmann J, Roots I. *Clin Drug Invest.* 2003; 23(&):395-404.
19. Donnellan CA, Fook L, McDonald P, Playfer JR. Oxybutynin and cognitive dysfunction. *BMJ.* 1997 Nov 22;315(7119):1363-4.
20. Duffy JF, Dijk DJ, Hall EF, Czeisler CA. Relationship of endogenous circadian melatonin and temperature rhythms to self-reported preference for morning or evening activity in young and older people. *J Investig Med.* 1999 Mar;47(3):141-50.
21. Evert B, Griese EU, Eichelbaum M. A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine 324 to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994 Oct;350(4):434-9.
22. Fusgen I, Hauri D. Trosipium chloride: an effective option for medical treatment of bladder overactivity. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000 May;38(5):223-34.
23. Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, Eichelbaum M, Meyer UA. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1991 May;48(5):943-50.
24. Gillin JC, Sutton L, Ruiz C, Darko D, Golshan S, Risch SC, Janowsky D. The effects of scopolamine on sleep and mood in depressed patients with a history of alcoholism and a normal comparison group. *Biol Psychiatry.* 1991 Jul 15;30(2):157-69.
25. Görtelmeyer R.: Schlafragebogen A und B. In CIPS (Hrsg.): Internationale Skalen für Psychiatrie. Weinheim (1996)
26. Gough AC, Miles JS, Spurr NK, Moss JE, Gaedigk A, Eichelbaum M, Wolf CR. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 CYP2D locus. *Nature.* 1990 Oct 25;347(6295):773-6
27. Griese EU, Zanger UM, Bruderhanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics.* 1998 Feb;8(1):15-26.
28. Guay DR. Tolterodine, a new antimuscarinic drug for treatment of bladder overactivity. *Pharmacotherapy.* 1999 Mar;19(3):267-80.
29. Hader C, Welz-Barth A, Keller T. Urinary incontinence—diagnosis. *Dtsch Med Wochenschr.* 2003 Apr 4;128(14):746-9.
30. Hampel C, Gillitzer R, Pahernik S, Hohenfellner M, Thuroff JW. Epidemiologie und Ätiologie der instabilen Blase [Epidemiology and etiology of overactive bladder]. *Urologe A.* 2003 Jun;42(6):776-86.

31. Hanioka N, Kimura S, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human CYP2D locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a G1934----A base change in intron 3 of a mutant CYP2D6 allele results in an aberrant 3' splice recognition site. *Am J Hum Genet.* 1990 Dec;47(6):994-1001.
32. Hashim H, Abrams P. Overactive bladder: an update. *Curr Opin Urol.* 2007 Jul;17(4):231-6.
33. Herberg KW. Alltags,- und Verkehrssicherheit unter Inkontinenz- Medikation: Neue Untersuchungen zum Sicherheitspotential urologischer Anticholinergika. *Med Welt* 1999; 50: 217-22
34. Hills CJ, Winter SA, Balfour JA. Tolterodine. *Drugs.* 1998 Jun;55(6):813-22.
35. Hoffmann RM. :Schlaf und Psychometrie. In: Schulz H, editor. DGSM. Ecomed, Landsberg/ Lech. Kompendium Schlafmedizin. 1997: II-2
36. Imeri L, Bianchi S, Angeli P, Mancina M. Differential effects of M2 and M3 muscarinic antagonists on the sleep-wake cycle. *Neuroreport.* 1991 Jul;2(7):383-5.
37. Imeri L, Bianchi S, Angeli P, Mancina M. M1 and M3 muscarinic receptors: specific roles in sleep regulation. *Neuroreport.* 1992 Mar;3(3):276-8.
38. In T'Veld BA, Kwee- Zuiderwijk WJM, Van Puijenbroek EP, et al. Neuropsychiatrische bijwerkingen toegeschreven aan her gebruik van oxybutynin. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1998; 142 (11): 590-2
39. Irwin DE, Milsom I, Hunskar S, Reilly K, Kopp Z, Herschorn S, Coyne K, Kelleher C, Hampel C, Artibani W, Abrams P. Population-based survey of urinary incontinence, overactive bladder, and other lower urinary tract symptoms in five countries: results of the EPIC study . *Eur Urol.* 2006 Dec;50(6):1306-14; discussion 1314-5.
40. Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem.* 1990 Oct 5;265(28):17209-14.
41. Katz IR, Sands LP, Bilker W, DiFilippo S, Boyce A, D'Angelo K. Identification of medications that cause cognitive impairment in older people: the case of oxybutynin chloride. *J Am Geriatr Soc.* 1998 Jan;46(1):8-13.
42. Kerkhof GA. Inter-individual differences in the human circadian system: a review. *Biol Psychol.* 1985 Mar;20(2):83-112.
43. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet.* 1989 Dec;45(6):889-904.
44. Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmoller J. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry.* 2004 May;9(5):442-73.
45. Kripke DF, Garfinkel L, Wingard DL, Klauber MR, Marler MR. Mortality associated with sleep duration and insomnia. *Arch Gen Psychiatry.* 2002 Feb;59(2):131-6.
46. Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC. Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Arch Gen Psychiatry.* 1979 Jan;36(1):103-16.

47. Kryger MH. Restrictive Lung Disorders. In: Principles and practice of sleep medicine, eds. Kryger MH, Roth T, Dement WC, 4th edition, Elsevier Saunders 2005. pp1136-1144.
48. Larsson G, Hallen B, Nilvebrant L. Tolterodine in the treatment of overactive bladder: analysis of the pooled phase II efficacy and safety data. *Urology*. 1999 May;53(5):990-8.
49. Lovlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS Lett*. 1996 Aug 19;392(1):30-4.
50. Madersbacher H. Oral anticholinergics in overactive bladder. *Urologe A*. 2006 Jul;45(7):830-4.
51. Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, Meyer UA, Broly F. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics*. 1997 Jun;7(3):193-202.
52. McCracken JT, Poland RE, Lutchmansingh P, Edwards C. Sleep electroencephalographic abnormalities in adolescent depressives: effects of scopolamine. *Biol Psychiatry*. 1997 Oct 1;42(7):577-84.
53. Milsom I, Abrams P, Cardozo L, Roberts RG, Thuroff J, Wein AJ. How widespread are the symptoms of an overactive bladder and how are they managed? A population-based prevalence study. *BJU Int*. 2001 Jun;87(9):760-6.
54. Muhlstein J, Deval B. Anticholinergic drugs in overactive bladder *Gynecol Obstet Fertil*. 2008 Jan 4;
55. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*. 1992;24:17-27.
56. Nabi G, Cody JD, Ellis G, Herbison P, Hay-Smith J. Anticholinergic drugs versus placebo for overactive bladder syndrome in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Oct 18;(4):CD003781.
57. Nies AS, Spielberg SP. Principle of therapeutics. In: Goodman and Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. New York: McGraw-Hill; 1996, pp. 43-62
58. Nilvebrant L, Gillberg PG, Sparf B. Antimuscarinic potency and bladder selectivity of PNU-200577, a major metabolite of tolterodine. *Pharmacol Toxicol*. 1997 Oct;81(4):169-72.
59. Ohayon MM, Carskadon MA, Guilleminault C, Vitiello MV. Meta-analysis of quantitative sleep parameters from childhood to old age in healthy individuals: developing normative sleep values across the human lifespan. *Sleep*. 2004;27(7):1255-73.
60. Oswald WD., Roth E.: *Der Zahlen- Verbindungs- Test*. In *Testzentrale, Testkatalog 1998/99*. Göttingen Bern: 86 (1998)
61. Ott H, Oswald I, Fichte K, Sastre-Hernandez M: *Visuelle Analogskalen zur Erfassung von Schlafqualität*. In: *CIPS: Internationale Skalen für Psychiatrie*. Beltz Test GmbH. Weinheim, 1986.
62. Patil PN. Parameters of drug antagonism: re-examination of two modes of functional competitive drug antagonism on intraocular muscles. *J Pharm Pharmacol*. 2004 Aug;56(8):1045-53.

63. Pietzko A, Dimpfel W, Schwantes U, Topfmeier P. Influences of trospium chloride and oxybutynin on quantitative EEG in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*. 1994;47(4):337-43.
64. Platt, D.; Mutschler E.: *Pharmakotherapie im Alter*. Wiss. Verl. Ges., Stuttgart, 1999
65. Poland RE, McCracken JT, Lutchmansingh P, Lesser IM, Tondo L, Edwards C et al. Differential response of rapid eye movement sleep to cholinergic blockade by scopolamine in currently de-pressed, remitted, and normal control subjects. *Biol Psychiatry* 1997;41:929-938
66. Poland RE, Tondo L, Rubin RT, Trelease RB, Lesser IM. Differential effects of scopolamine on nocturnal cortisol secretion, sleep architecture, and REM latency in normal volunteers: relation to sleep and cortisol abnormalities in depression. *Biol Psychiatry*. 1989 Feb 15;25(4):403-12.
67. Rechtschaffen A, Kales A (1968). *A manual of standardised terminology, techniques and scoring system for sleep of human sleep subjects*. Washington, DC: U. S. Government Printing Office
68. Redline S, Kirchner HL, Quan SF, Gottlieb DJ, Kapur V, Newman A. The effects of age, sex, ethnicity, and sleep-disordered breathing on sleep architecture. *Arch Intern Med*. 2004 Feb 23;164(4):406-18.
69. Riemann D, Hohagen F, Bahro M, Berger M. Sleep in depression: The influence of age, gender and diagnostic subtype on baseline sleep and the cholinergic REM induction test with RS 86. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1994;243:279-290
70. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997 Feb;60(2):284-95.
71. Sagales T, Erill S, Domino EF. Effects of repeated doses of scopolamine on the electroencephalographic stages of sleep in normal volunteers. *Clin Pharmacol Ther*. 1975 Dec;18(06):727-32.
72. Salin-Pascual RJ, Granados-Fuentes D, Galicia-Polo L, Nieves E, Gillin JC. Development of tolerance after repeated administration of a selective muscarinic M1 antagonist biperiden in healthy human volunteers. *Biol Psychiatry*. 1993 Feb 1;33(3):188-93.
73. Petri E, Thüroff JW. *Die weibliche Harninkontinenz*. Springer, Berlin; 2004.
74. Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, Caporaso N, Weiffenbach B. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet*. 1994 Jun;3(6):923-6.
75. Scheife R, Takeda M. Central nervous system safety of anticholinergic drugs for the treatment of overactive bladder in the elderly. *Clin Ther*. 2005 Feb;27(2):144-53.
76. Schwantes U, Topfmeier P. Importance of pharmacological and physicochemical properties for tolerance of antimuscarinic drugs in the treatment of detrusor instability and detrusor hyperreflexia--chances for improvement of therapy. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1999 May;37(5):209-18. Review.
77. Sitaram N, Moore AM, Gillin JC. Experimental acceleration and slowing of REM sleep ultradian rhythm by cholinergic agonist and antagonist. *Nature*. 1978 Aug 3;274(5670):490-2.

78. Stahl MM, Ekstrom B, Sparf B, Mattiasson A, Andersson KE. Urodynamic and other effects of tolterodine: a novel antimuscarinic drug for the treatment of detrusor overactivity. *Neurourol Urodyn.* 1995;14(6):647-55.
79. Steen VM, Molven A, Aarskog NK, Gulbrandsen AK. Homologous unequal cross-over involving a 2.8 kb direct repeat as a mechanism for the generation of allelic variants of human cytochrome P450 CYP2D6 gene. *Hum Mol Genet.* 1995 Dec;4(12):2251-7. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet.* 1994 Jun;3(6):923-6.
80. Todorova A, Vonderheid-Guth B, Dimpfel W. Effects of tolterodine, trospium chloride, and oxybutynin on the central nervous system. *J Clin Pharmacol.* 2001 Jun;41(6):636-44.
81. Tsao JW, Heilman KM. Transient memory impairment and hallucinations associated with tolterodine use. *N Engl J Med.* 2003 Dec 4;349(23):2274-5.
82. Valsecia ME, Malgor LA, Espindola JH, Carauni DH. New adverse effect of oxybutynin: "night terror". *Ann Pharmacother.* 1998 Apr;32(4):506.
83. Velazquez-Moctezuma J, Shalauta M, Gillin JC, Shiromani PJ. Cholinergic antagonists and REM sleep generation. *Brain Res.* 1991 Mar 8;543(1):175-9.
84. Vella M, Robinson D, Cardozo L, Cartwright R. New developments in the treatment of urinary incontinence. *Minerva Urol Nefrol.* 2006 Dec;58(4):299-310.
85. Voderholzer U, Hornyak M, Berger M, et al. Antidepressiva. In: Schulz H, editor. *DGSM. Ecomed, Landsberg/ Lech. Kompendium Schlafmedizin.* 1997: XI-2.3
86. Williams RL, Karacan I, Hirsch CJ. *EEG of Human Sleep, Clinical Applications*, New York, NY: John Wiley & Sons; 1974.
87. Womack KB, Heilman KM. Tolterodine and memory: dry but forgetful. *Arch Neurol.* 2003 May;60(5):771-3.
88. Yokota H, Tamura S, Furuya H, Kimura S, Watanabe M, Kanazawa I, Kondo I, Gonzalez FJ. Evidence for a new variant CYP2D6 allele CYP2D6J in a Japanese population associated with lower in vivo rates of sparteine metabolism. *Pharmacogenetics.* 1993 Oct;3(5):256-63.
89. Zoltoski RK, Velazquez-Moctezuma J, Shiromani PJ, Gillin JC. The relative effects of selective M1 muscarinic antagonists on rapid eye movement sleep. *Brain Res.* 1993 Apr 16;608(2):186-90.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. I. Roots möchte ich für die Bereitstellung des interessanten, anspruchsvollen Themas sowie für die Unterstützung bei der Bearbeitung der Fragestellung danken.

Für die intensive Betreuung während der Einarbeitung in die Thematik, Auswertung der Resultate und Review der Arbeit, die stete Hilfsbereitschaft und Motivation möchte ich mich bei Frau Dr. med. Konstanze Diefenbach bedanken. Ohne ihre fachlich übergreifende Kompetenz und immerwährende freundliche Unterstützung wären viele der aufgetretenen Probleme nicht so schnell gelöst worden.

Ferner bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und Anleitung bei der MTA Jasmin El-Din aus dem Labor für Molekulargenetik. Mit ihrer Hilfe konnte ich vorhandene Methoden zur Genotypisierung von CYP2D6 optimieren und anwenden.

Für die Unterstützung bei der Auswertung der Schlafprofile möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Schlafmedizinischen Zentrums der Charité, insbesondere bei Frau Beate Dieker bedanken.

Meinem Ehemann Andreas danke ich für seine Geduld und unermüdliche Motivation sowie für seine Hilfestellung bei urologischen Fragen. Auch meinen Kindern Hanna, Lilli und Tom rechne ich hoch an, dass sie mich des Öfteren entbehrt haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Jutta und Dr. med. Kurt Busse, ohne deren Engagement mein Studium und natürlich auch diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

9 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Katrin Jaeger, erkläre an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Einfluss von Tolterodin auf die Struktur und die Qualität des Schlafes unter besonderer Berücksichtigung des Alters sowie des CYP2D6- Genotyps" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt habe

Nürnberg, im Juli 09

Katrin Jaeger

10 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.