

2. Material und Methoden

Der Beginn der Untersuchung war im Jahr 1996 und wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AkdÄ) durchgeführt. Diese erhält über ein freiwilliges Meldesystem verschlüsselte Daten über spezifische unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Die Meldungen erfolgen sowohl von Ärzten aus der Klinik als auch aus dem niedergelassenen Bereich. Zusätzlich werden die Meldenden gebeten, nähere klinische Angaben zu den Betroffenen zu machen (Arztbriefe in anonymisierter Form, persönliche Aufzeichnungen, Laborbefunde). Für unsere genetischen Untersuchungen wurden die Betroffenen via meldenden Arzt um eine Blutprobe von 30 ml gebeten.

2.1. Patientenkollektiv und Einschlusskriterien

Das Patientenkollektiv setzte sich aus Fällen zusammen, bei denen es unter Therapie mit Psychopharmaka, Ticlopidin und Thyreostatika, sowie Arylaminen und sulfonamidhaltigen Antibiotika zu einer Arzneimittel induzierten Agranulozytose kam. Es gelangten nur Fälle zum Einschluss, die die Kriterien der Agranulozytose bei mindestens einem im Behandlungsverlauf durchgeführten Differentialblutbild erfüllten (<500 neutrophile Granulozyten oder <1500 Leukozyten). Zum Stichtag kamen insgesamt $152 + 65$ Fälle aus einer vorangegangenen Clozapin-Studie zum Einschluss (Psychopharmaka 38 Fälle, Arylamine 7 Fälle, Sulfonamide 7 Fälle, Thyreostatika 41 Fälle, Ticlopidin 59 Fälle).

Als Kontrollgruppe diente eine Kohorte von 75 Patienten, die unter der Therapie mit Clozapin in einem Zeitraum von mindestens 2 Jahren keine Agranulozytose oder Neutropenie entwickelt haben.

2.2. Prinzip der Datenerhebung

Die gemeldeten Fälle der AkdÄ wurden mit Hilfe der dort geführten Datenbank „Phönix“ ermittelt. Um auch eventuelle falsch diagnostizierte Fälle einer Agranulozytose zu erfassen, wurden die Meldungen über das Auftreten von folgenden Nebenwirkungen ausgewertet: Agranulozytose, Leukopenie, Knochenmarkaplasie, Knochenmarkdepression, Granulozytopenie, Panzytopenie. Mit Hilfe der archivierten Erfassungsbögen (siehe Abbildung 2.1.) konnten retrospektiv Patientendaten erhoben werden. Diese konnten zum Teil zusätzlich durch die von

den Krankenhäusern und behandelnden Ärzten angeforderten Krankengeschichten ergänzt werden. Die anonymisierten und streng vertraulichen Daten wurden in einer Tabelle mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel® dokumentiert.

Bericht über unerwünschte Arzneimittelwirkungen (auch Verdachtsfälle) an die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft · Postfach 41 01 25 · 50861 Köln									
Fax: (02 21) 40 04-5 39 ☎ (02 21) 40 04-0					Schraffierte Felder nicht ausfüllen!				
Code Nr.	Pat. Init.	Geburtsdatum	Geschlecht	Größe	Gewicht	Tätigkeit	ethn. Zugeh.	Schwangersch.-Monat.	
			m <input type="checkbox"/> w <input type="checkbox"/>						
Beobachtete unerwünschte Wirkungen aufgetreten am: Daugr Std./Tage									
<input type="checkbox"/> lebensbedrohlich?									
Arzneimittel/Darreichungsform	Tagesdosis	Applikation	gegeben von/bis		wegen		BGA-Nr.*		
(auslös)									
1.									
2.									
3.									
4.									
Vermuteter Zusammenhang mit Arzneimittel Nr.		dieses früher gegeben		vertragen		ggf. Reexposition			
<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4		ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>		ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/>		neg. <input type="checkbox"/> pos. <input type="checkbox"/>			
Grunderkrankung:					Begleiterkrankungen:				
Anamn. Besonderheiten: Nikotin <input type="checkbox"/> Alkohol <input type="checkbox"/> Kontrazeptiva <input type="checkbox"/> Schrittmacher <input type="checkbox"/> Implantate <input type="checkbox"/> Strahlentherapie <input type="checkbox"/> physikal. Therapie <input type="checkbox"/> Diät <input type="checkbox"/> Allergien* <input type="checkbox"/> Stoffwechseldefekte* <input type="checkbox"/> Arzneimittelabusus* <input type="checkbox"/> Sonstige:									
* weitere Erläuterungen:									
Veränderung von Laborparametern in Zusammenhang mit der unerwünschten Arzneimittelwirkung:									
ggf. Berichtsbogen beil.									
Verlauf und Therapie der unerwünschten Arzneimittelwirkung:									
Ausgang der unerwünschten Arzneimittelwirkung:									
wiederhergestellt <input type="checkbox"/> wiederhergestellt mit Defekt <input type="checkbox"/> noch nicht wiederhergestellt <input type="checkbox"/> unbekannt <input type="checkbox"/> Exitus <input type="checkbox"/> Sektion ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> (ggf. Befund beifügen) Todesursache:									
a) beh. Arzt b) Hersteller c) Arzneim.-Komm. Ärzte	Weitere Bemerkungen:								
	(ggf. Anlage verwenden)								
Wer wurde informiert: BGA <input type="checkbox"/> Hersteller <input type="checkbox"/> Arzneim.-Komm. Ärzte <input type="checkbox"/> Sonstige:									
Name des Arztes:						Datum:			
Fachrichtung:						Unterschrift			
PLZ:									
Klinik ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> (ggf. Stempel)									
* Registrations-Nr., Zulassungs-Nr. oder Eingangs-Nr. (soweit bekannt)									

Abbildung 2.1.: Meldebogen der AKdÄ über unerwünschte Arzneimittelwirkungen

2.3. Datenverarbeitung und -auswertung

Aus der Datenbank (Microsoft Excel®) erfolgte eine Übertragung der Daten in das Programm JMP® 5.0.1a, einem Statistik Programm, das seit 1989 mit regelmäßigen Verbesserungen zur Verfügung steht. Die Diagramme wurden mit Hilfe von Microsoft Excel® und JMP erstellt. Die statistische Auswertung der Genotypisierung erfolgte mit dem Programm SPSS 11.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, III).

2.4. Durchführung der Blutentnahmen

Da die Meldungen über unerwünschte Arzneimittelwirkungen der AkdÄ nur in anonymisierter Form vorlagen, wurden zunächst alle Krankenhäuser und Arztpraxen, welche die Fälle gemeldet haben, angeschrieben. So konnte auf schriftlichem oder telefonischem Wege geklärt werden, ob der Arzt oder die Ärztin bereit wäre, den Patienten nachträglich zu identifizieren und mit Einverständnis des Patienten weitere Daten zu erheben und eine Blutentnahme durchzuführen. Bei Zusage wurden 30ml EDTA-Blut aus der Armvene entnommen und in weniger als 24 Stunden geliefert und der weiteren Analyse zugeführt.

2.5. Genotypisierung der Fc- γ -Rezeptor-Polymorphismen

Insgesamt konnte von 80 Fällen Blut für eine weitere Analyse gewonnen werden. Um die spezifischen Allele zu bestimmen, wurden Polymerase Chain Reaction (PCR) Techniken verwendet. Die genomische DNA wurde mittels eines Standard-Chloroform/Phenol-Extraktes aus venösen Leukozyten isoliert. Zur Genotypisierung der Fc- γ -Rezeptor Polymorphismen wurden Allel spezifische Primer verwendet. Alle Polymerase-Kettenreaktionen wurden unter der Verwendung interner Kontrollen durchgeführt. Stichproben und alle Fälle mit unsicherem Ergebnis wurden mittels einer DNA-Sequenzierung überprüft.

Der Fc- γ -RIIa-Rezeptorpolymorphismus G507A wurde nach der Methode von Flesch (Flesch et al. 1998) bestimmt, der Fc- γ -RIIIa-Rezeptorpolymorphismus nach der Methode von Leppers-van de Straat und van der Pol. (Leppers-van de Straat et al. 2000). Die Fc- γ -RIIIb-Genotypisierung wurde wie von de Haas (Haas de et al. 1995) beschrieben durchgeführt.

Alle Produkte der Polymerase-Kettenreaktion wurden in einem Perkin-Elmer 9700 Thermocycler vervielfältigt, liefen auf 2%-3% Agarose-Gel, wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und mit ultraviolettem Licht visualisiert.

2.6. Statistik

Um die Gruppen auf signifikante Unterschiede hinsichtlich klinischer Variablen und Basisparameter zu untersuchen, wurde jeweils ein t-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Parallel wurde der Levene-Test durchgeführt. Dieser ist ein F-Test, der auf dem Vergleich der Varianzen beider Stichproben beruht. Ergab dieser Test eine Inhomogenität der Varianz, wurde die t-Test Variante für Stichproben mit ungleicher Varianz verwendet. Diese Tests wurden im Rahmen des Programms JMP® 5.0.1a angewandt.

Die zu erwartenden Häufigkeiten der Genotypen wurden mit dem Hardy-Weinberg- Equilibrium der Allel-Frequenzen berechnet. Die klinischen Variablen Alter und Geschlecht sind bekannte Risikofaktoren für das Auftreten einer Agranulozytose (Andres et al. 2004; Van der Klauw et al. 1999). Da unsere Fälle mit Agranulozytose nicht nach Alter und Geschlecht entsprechend zugeordnet wurden, wurde ein lineares logistisches Regressionsmodell verwendet, um das genetische Risiko, verursacht durch jeden Polymorphismus unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht, abzuschätzen. Dieser Test wurde im Rahmen des Programms SPSS 11.0 angewandt.