

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Studienkonzept**

Es handelt sich um eine prospektive Anwendungsbeobachtung mit einer explorativen Stichprobenerhebung, wobei eine Selektion der Studienteilnehmer nach vorgegebenen Ein- und Ausschlusskriterien erfolgte.

### **3.2 Probanden**

In diese Studie wurden 99 männliche und weibliche Patienten aufgenommen. Die Patienten erhielten aufgrund behandlungsbedürftiger starker Schmerzen bei unterschiedlicher Grundkrankheit orale Opiate und Opioide und wurden sowohl stationär als auch ambulant innerhalb der Charité behandelt. Die Auswahl der Studienteilnehmer erfolgte nach folgenden Ein- und Ausschlusskriterien.

#### **3.2.1 Einschlusskriterien**

- Behandlungsbedürftige starke Schmerzen
- Alter > 18 Jahre
- Einstellung auf orale Opiate oder Opioide
- Dosiserhöhung bereits verabreichter Opiate oder Opioide

#### **3.2.2 Ausschlusskriterien**

- Schwangerschaft, Stillzeit
- obstruktive oder entzündliche Erkrankungen, Anus praeter
- Nieren- und Leberinsuffizienz
- Prostatahypertrophie, Harninkontinenz
- ZNS-Tumoren oder ZNS-Metastasen
- Psychiatrische Erkrankungen
- Medikation wird über Opiatpumpen verabfolgt

### **3.2.3 Einwilligungserklärung/ Ethikkommission**

Alle Teilnehmer wurden mündlich und schriftlich über den Inhalt und den Ablauf der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Die Studie wurde nach Zustimmung der zuständigen Ethikkommission durchgeführt.

## **3.3 Ablauf der Befragung**

### **3.3.1 Fragebögen**

siehe Anhang B

Die Datenerfassung erfolgte über insgesamt 8 Fragebögen:

- 1) 2 Erhebungsbögen
- 2) 2 Bögen für die Erstuntersuchung
- 3) 1 Bogen zur Dokumentation der Medikamenteneinnahme zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung
- 4) 2 Bögen für die Folgeuntersuchung
- 5) 1 Bogen zur Dokumentation der Medikamenteneinnahme zum Zeitpunkt der Folgeuntersuchung.

Die Erstbefragung erfolgte im stationären Bereich bzw. in der Schmerzambulanz der Charité am Tag der Neueinstellung bzw. der Dosissteigerung. Erhebungsbögen und Erstuntersuchungsbögen, einschließlich des Medikamentenerstuntersuchungsbogens, wurden zusammen mit dem Patienten ausgefüllt. Die Bögen wurden anhand der Patientenakte vervollständigt. Im Rahmen dieser Ersterhebung erfolgte eine venöse Blutentnahme. Nach sieben Tagen wurden die Daten für die Folgeuntersuchungsbögen, einschließlich des Medikamentenfolgeuntersuchungsbogens, erhoben. Dabei wurden die Bögen dem Patienten stationär bzw. ambulant persönlich ausgehändigt oder per Post zum jeweiligen Wohnort gesandt.

### **3.3.2 Methodik der Befragung**

Die Befragung erfolgte in standardisierten Einzelinterviews in mündlicher und schriftlicher Form. Es wurden sowohl qualitative Fragen als auch quantitative Fragen verwendet, wobei es sich bei den qualitativen Fragen in der Mehrheit um dichotome Fragen oder Katalogfragen handelte. In die Fragebögen wurde die visuelle Analogskala als Messinstrument integriert, die ein

anerkanntes, sensibles Instrument zur Messung von Schmerzveränderungen ist [Huskisson EC et al.1982]. Die visuelle Analogskala besteht aus einem 170 mm langen horizontalen Balken, der mit einer von links nach rechts kontinuierlich zunehmenden Graufärbung unterlegt ist. Die zwei Endpunkte des Balkens repräsentieren den beschwerdefreien Idealzustand bzw. den extremen Beschwerdezustand. Auf diesem Balken gibt der Patient seine subjektiv empfundene Befindlichkeit einmal zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung und dann nach einwöchiger Therapieumstellung an. Die Differenz der angegebenen Werte war Ausdruck der Opioidwirkung und wurde mit den Daten der Rezeptormutation in Beziehung gesetzt.

### **3.3.3 Erhebungsbögen**

In den Erhebungsbögen 1 und 2 wurden folgende wesentliche Komponenten erfasst:

- Geschlecht, Geburtsdatum, Gewicht und Größe
- Ausbildung, Berufstätigkeit, Familienstand
- schmerzrelevante Grunderkrankung und deren Dauer. Bei Tumorerkrankungen wurden Daten zur Histologie und TNM-Klassifikation aus der Krankenakte ergänzt.
- strukturierte Schmerzanamnese mit qualitativen Fragen zur Dauer, Qualität und Lokalisation des Schmerzes, Umfang der bisherigen Therapie sowie die Anzahl der vorbehandelnden Ärzte

### **3.3.4 Bögen der Erst- und Folgeuntersuchung**

Die Fragenkomplexe für die Erst- und Folgeuntersuchung waren identisch.

In die Untersuchungsbögen wurde zur Evaluation der Schmerzintensität und der Intensität der Nebenwirkungen die visuelle Analogskala als standardisierte Dokumentationshilfe integriert.

Folgende Parameter wurden erfasst:

- die Schmerzintensität differenziert nach unterschiedlichen Belastungssituationen (Schmerz in Ruhe, Schmerz bei Belastung),
- das Ausmaß der schmerzbedingten Beeinträchtigung am Tag und in der Nacht (Energieverlust durch Schmerz, Schlafstörung),
- Intensität der Nebenwirkungen durch die Therapie (Müdigkeit und Übelkeit),
- Einschätzung der Hilfe durch die Schmerztherapie.

Mit Hilfe von geschlossenen dichotomen Fragen, die eine „Ja“- oder „Nein“- Antwort fordern, wurden vorhandene Nebenwirkungen wie Erbrechen, Verstopfung, Miktionsstörungen, Verwirrung und Schwindel eruiert. Bei vorliegenden Nebenwirkungen erfolgte eine Zählung ihrer Auftretenshäufigkeit jeweils bezogen auf die vergangenen sieben Tage und eine detailliertere Beschreibung.

### **3.3.5 Medikationsbögen**

Es erfolgte die Dokumentation aller applizierten Medikamente mit Dosierung und Applikationsdauer. Dabei wurde eine Kategorisierung in zentrale und periphere Analgetika und weitere Medikamente vorgenommen. Für die zentralen Analgetika wurden die Morphinäquivalente und die Morphiumtagesdosis bestimmt und eine Einordnung in das WHO-Schmerztherapie-Stufenschema vorgenommen. Bei der Folgeuntersuchung erfolgte auch die Dokumentation weiterer schmerztherapeutisch relevanter Eingriffe während des Beobachtungszeitraumes.

## **3.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Nach schriftlichem Einverständnis zur Teilnahme wurden 10 ml venöses Blut mittels EDTA-Monovette gewonnen. Die Bearbeitung der Proben im Labor erfolgte verblindet.

### **3.4.1 DNA-Extraktion**

Das in 10 ml EDTA-Monovetten gewonnene Blut wurde mit vier Volumenanteilen eines Erythrozyten-Lyse-Puffers hoher Osmolarität versetzt, anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 min bei 4° C und 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 1,5 ml 1x TEN-Puffer aufgenommen und bis zur DNA-Extraktion bei –20°C tiefgefroren. Chemikalien und Lösungen siehe Tab. 3.1.

**Tabelle 3.1** Chemikalien und Lösungen zur Lyse der Erythrozyten

10 x Erythrozytenlysepuffer	61,5 g	NH <sub>4</sub> Cl (1,15 M)
	10 g	KHCO <sub>3</sub> (0,1 M)
	2 ml	0,5 M EDTA (1 mM)
		mit aqua bidest ad 1l
1x Erythrozytenlysepuffer	Gebrauchslösung 1:10 mit aqua bidest verdünnen	
1 x TEN Puffer	2,4 g	Tris/HCl pH 7,5 (0,2 M)
7,5 (0,2 M)	400 µl	0,5 M EDTA (0,02 M)
	17,5 g	NaCl (0,3 M)
		mit aqua bidest. ad 1l
1 x TEN Puffer	Gebrauchslösung 1:10 mit aqua bidest verdünnen	

Nach der Lyse wurde die DNA aus den Leukozyten isoliert. Dazu wurde die aufgetaute Zellsuspension mit je 100 µl 20% SDS-Lösung und 100 µl Proteinase-K-Lösung versetzt und im Überkopfschüttler mit 40 min<sup>-1</sup> über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Der Verdau wurde anschließend 4 h mit 1 Volumen Phenol-Lösung (pH 8,0) im Rotationsmischer mit 30 min<sup>-1</sup> extrahiert. Die Phasen wurden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 3000 rpm getrennt. Die obere wässrige Phase wurde separiert und mit 1 Volumen Chloroform-Lösung 1 h im Überkopfschüttler von Lipidbestandteilen gereinigt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die obere wässrige Phase abgetrennt und mit 100 µl 3 M Natriumacetat sowie 2 Volumina 96% Ethanol geschüttelt. Die DNA wurde durch 10-minütiges Zentrifugieren sedimentiert. Im Anschluss wurde der wässrige Überstand dekantiert und das Gefäß zum Verdunsten des Restethanols vorsichtig kopfüber auf Filterpapier gestellt.

Zum Lösen der DNA wurden je 600 µl TE-Puffer in die Gefäße gegeben und über Nacht bei 55°C schüttelnd inkubiert. Die DNA wurde am Folgetag in sterile Gefäße überführt und bei 4°C aufbewahrt. Chemikalien und Lösungen siehe Tabelle 3.1.

**Tab. 3.2** Chemikalien und Lösungen zur DNA- Extraktion

---

20% SDS	20 g SDS (Natriumdodecylsulfat, Fa Merck) in 100 ml H <sub>2</sub> O lösen
Proteinase K-Lösung	je Probe 2 mg Proteinase K (Boehringer Mannheim ) in 100 µl 1 x TEN- Puffer lösen
Phenol-Lösung	Phenol/Chloroform/Wasser der Firma Perkin Elmer in gebrauchsfertiger Form
Chloroform-Lösung	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 (v/v)
Natriumacetat	40,8 g CH <sub>3</sub> COONa (3 M) ad 100 ml mit aqua bidest mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen.
TE- Puffer	121 mg Tris-HCL (10 mM), 200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 (1 mM) ad 100 ml mit aqua bidest.

---

### 3.4.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließendem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus. Die verwendete Methode zur Sequenzierung von DNS-Fragmenten basiert auf der Kettenabbruchmethode [Sanger F et al. 1977].

### 3.4.3 PCR- RFLP

#### 3.4.3.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen und Geräte

**Tab. 3.3** PCR-RFLP: Chemikalien und Hersteller

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Expand <sup>TM</sup> Long PCR System	Roche, Germany
dNTPs	MBI Fermentas
DNA-Oligonucleotide (PCR-Primer)	TIBMOLBIOL Berlin
DNA Polymerase AmpliTaq <sup>TM</sup> 10 x PCR – Puffer, 25 mM MgCl <sub>2</sub>	Perkin Elmer
Restriktionsendonukleasen	MIBI Fermentas, New England Biolabs

---

**Tab. 3.4** PCR-RFLP: Geräte und Hersteller

---

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Sequenzierer	Applied Biosystems Abi Prism 3100Sequenzierer Genetic Analyzer (Foster City / USA)
Mikrowelle MWS 2820	Bauknecht (Frankfurt)
Agagel Maxi Elektrophoresekammer Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Fluor S MultiImager	Biorad (München)
Centrifuge 5810 R Multipette® plus Pipetten Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
PTC 200 Gradientencycler	MJ Research (South San Francisco/USA)
Expand Long Template PCR system	Roche Germany

---

### 3.4.3.2 Synthetische Nukleotide

Die synthetischen Oligonukleotide (19 bis 23 Basen) wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert und gefriergetrocknet geliefert. Positionsangaben ab Startcodon.

Exon 1

forward OPRM 1: 5'-CGC AGA GGA GAA TGT CAG AT- 3'

Basenposition -197 / -178

reverse OPRM 2: 5'-AAG AAA AAA CAG AAA AGT AG-3'

Basenposition 460 – 479

### 3.4.3.3 PCR, Reaktionsbedingungen

#### Amplifikation von Exon 1-2

Ein Reaktionsansatz von 25 µl enthält: 100 ng DNA, 200 µM dNTP, 1 µM Primer (1), 10 x Puffer 2 und 2.8 Einheiten Taq-Pwo-mix DNA-Polymerasen. Die Amplifikation wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung: 2 min bei 94°C, 35x(30 s 94°C-20 s 55° C-5 min 72° C-7 min 72° C).

#### Amplifikation von Exon 3-4

Ein Reaktionsansatz von 25 µl enthält: 100 ng DNA, 200 µM dNTP, 1 µM Primer (2), 10 x Puffer 2 und 2.8 Einheiten Taq-Pwo-mix DNA-Polymerasen. Die Amplifikation wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung: 2 min bei 94°C, 35x (30 s 94°C-20 s 51°C -4 min 72°C-7 min 72°C).

### 3.4.3.4 RFLP

Die unterschiedlichen Genotypen der einzelnen Individuen wurden durch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) bestimmt, d.h. anhand von Unterschieden in der Länge der DNA- Fragmente nach Schnitt durch ein Restriktionsenzym. Punktmutationen verursachen neue Schnittstellen bzw. den Verlust von Schnittstellen, während Insertionen oder Deletionen Schnittstellen verschieben. Anhand der unterschiedlichen Längen der so entstandenen Fragmente können der Wildtyp und die Mutation unterschieden werden. Zur Bestimmung der RFLP wird das PCR-Produkt mit einem bestimmten Restriktionsenzym mindestens 4 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

### 3.5 Agarosegelherstellung

Für je 100 ml Agarosegel wurde eine der gewünschten Konzentration entsprechende Menge Agarose mit 1 x TBE Puffer auf 100 ml aufgefüllt und anschließend durch Aufkochen gelöst. Nach Erkalten auf ca. 45°C (handwarm) wurden 10 µl Ethidiumbromid / 100 ml Agarosegel zugegeben. Das Gel wurde danach blasenfrei in die dafür vorgesehenen Elektrophoreseschlitten mit den entsprechenden Kämmen gegossen. Nach Erkalten und Aushärten wurden die Kämmen entfernt.

#### 3.5.1 Elektrophorese

Das Ergebnis der PCR wurde auf 2%igen Agarosegelen mit einer Laufzeit von 30 min und einer Spannung von 120 V überprüft. Die nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen entstandenen DNA Fragmente wurden auf 3,5-4% Agarosegelen aufgetrennt (90 min, 120 V). Das Resultat der PCR wurde mit UV-Licht sichtbar gemacht und optisch dokumentiert (Eagle Eye).

**Tab. 3.5** Agarosegel-Elektrophorese: Reagenzien und Lösungen

---

#### Reagenzien und Lösungen

---

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (10x TBE, Konzentrat)	109 g Tris (900 mM) + 55 g Borsäure (890 mM) + 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0 (20 mM), pH-Wert mit 1 M HCl auf 8,0 eingestellt, ad 1 l mit aqua bidest verdünnen
1 x TBE	zum Gebrauch 10 x TBE 1:10 mit aqua bidest verdünnen
Ethidiumbromid-Stammlösung	100 mg Ethidiumbromid in 100 ml H <sub>2</sub> O gelöst.
Ethidiumbromid-Gebrauchslösung	10 µl Stammlösung/100 ml 1x TBE
Probenlaufpuffer	0,25 g Bromphenolblau 15 g Ficoll- 400 (Pharmacia)

	ad 100 ml aqua bidest mischen, bei 4°C lagern
Agarose ultrapure, Argarose amresco (3:1)	Biometra, Gibco BRL
100 bp und 1 kb DNA-Marker	MBI Fermentas
Marker V und Marker VI	Boehringer Mannheim

---

Die Elektrophorese wurde in Flachbett-Elektrophoresekammern und mit Elektrophorese-Spannungsgeräten von Pharmacia, Biorad und Hoefer durchgeführt.

### 3.6 Statistik

Die Daten der Befragung wurden mit Hilfe des Microsoft-Programmes Excel 98 aufgenommen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SPSS. Die Bearbeitung der statistischen Fragestellungen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Mit dem  $\chi^2$ -Test (bzw. dem exakten Test nach Fisher) wurde der Zusammenhang kategorialer Merkmale geprüft. Der Mann-Whitney-U-Test diente dem Auffinden von Unterschieden ordinaler Merkmale zwischen zwei unabhängigen Stichproben. Eine zweifaktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholungen wurde herangezogen, um den Einfluss des Faktors Mutation und des Faktors Zeit auf die interessierenden Merkmale zu untersuchen und Wechselwirkungen zwischen Mutation und Zeit aufzudecken. Durch Anwendung einer zweifaktoriellen nichtparametrischen Kovarianzanalyse für Daten mit Messwiederholungen mit der Kovariaten „Opioidverbrauch“ wurde der unterschiedliche Opioidverbrauch auf die interessierenden Merkmale berücksichtigt und der Einfluss von Mutation, Zeit und deren Wechselwirkungen geprüft.