

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Klinische Untersuchungen an stationären Patienten

#### 2.1.1 Studiendesign und Ablauf der Studie

Es wurde eine prospektive Anwendungsbeobachtung (Kohortenstudie) bei Patienten mit akuten Psychosen (Schizophrenie, Manie; Aufteilung nach ICD 10 siehe unten) durchgeführt. Die Studie wurde unter naturalistischen Bedingungen durchgeführt und blieb somit ohne Einfluss auf die klinische Behandlung der Patienten (Auswahl des Antipsychotikums, Höhe der Medikamentenmenge und Zeitraum der Medikamentengabe). Für dieser Beobachtungsstudie lang eine Genehmigung durch die lokalen Ethik-Kommissionen (Medizinische Fakultät des Universitätsklinikums Benjamin Franklin, Berlin (UKBF) und der Charité, Humboldt Universität, Berlin) vor.

In die Studie eingeschlossen wurden stationär aufgenommene, mit Antipsychotika behandelte Patienten aus vier Berliner Krankenhäusern, nämlich aus

- der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität Berlin
- der Psychiatrischen Klinik des Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin
- dem Wilhelm-Griesinger-Krankenhaus
- der Psychiatrischen Abteilung der Kliniken im Theodor-Wenzel-Werk („Waldhaus“).

Für diese Arbeit wurden die Ergebnisse für die beiden (neben Clozapin) in den oben genannten Krankenhäusern am häufigsten verordneten Antipsychotika Haloperidol und Perazin zusammengefasst.

#### 2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten mit Störungen aus dem schizophrenen Formenkreis (Ersterkrankung und Rezidiv, mit oder ohne Vorbehandlung), sowie ein Teil der affektiven Erkrankungen (manische Auslenkungen).

Tab. 4: Diagnosenverteilung der eingeschlossenen Patienten

| <b>Diagnose</b>                             | <b>ICD-10</b> | <b>DSM-IV</b> |
|---|---------------|---------------|
| Jegliche Form von Schizophrenie             | F20.xx        | 295.xx        |
| Schizotype Störungen                        | F 21          | 301.22        |
| Anhaltende wahnhaftige Störungen            | F 22.x        | 297.1         |
| Vorübergehende akute psychotische Störungen | F 23.xx       | 298.8         |
| Induzierte wahnhaftige Störungen            | F 24          | 297.3         |
| Schizoaffektive Störungen                   | F 25.x        | 295.7         |
| Manische Episode                            | F 30          | 296.0x        |
| Bipolare affektive Störungen, manisch       | F31.1, F 31.2 | 296.4x        |

Patienten mit den oben aufgeführten Diagnosen wurden prinzipiell alle in die Studie eingeschlossen, sofern sie nicht ihre Zustimmung verweigerten. Hierdurch wurde sichergestellt, dass alle, also auch schwer kranke Patienten für die Studie berücksichtigt wurden. Dies entspricht einer sog. „Intention-to-Treat-Analyse“, die gewählt wurde, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch vorherige Selektion der Patienten zu vermeiden.

Ausgeschlossen wurden dabei:

- jegliche der oben genannten Erkrankungen, die nicht mit Antipsychotika behandelt wurden
- Patienten mit Depression (F32.x, F33.x, F34.x, F38.x und F39.x nach ICD 10)
- Patienten mit Angststörungen (F40.xx und F41.xx), Zwangsstörungen (F42) und Persönlichkeitsstörungen (F60.x)
- Patienten, die jünger als 18 und älter als 65 Jahre waren
- Patienten mit organischen Psychosen (Traumata, degenerativen Hirnerkrankungen, unmittelbar mit Alkohol oder anderen Drogen in Zusammenhang stehende psychotische Erscheinungen)
- Patienten, die nicht deutscher Abstammung sind (aufgrund von unterschiedlicher genetischer Verteilung in verschiedenen Populationen).

### 2.1.3 Ablauf der klinischen Studie

Nach Aufnahme eines Patienten in die Studie (Ein- und Ausschlusskriterien siehe oben) wurde bei unmedizierten Patienten eine Untersuchung am Aufnahmetag durchgeführt (U0). Als Tag 1 der Studie wurde der Tag gewertet, an dem ein Patient erstmals mit einem Neuroleptikum behandelt wurde. Die Medikation eines jeden Patienten wurde vollständig dokumentiert.

Zu Beginn der Studie wurde für jeden Patienten ein Zahlencode vergeben. Folgende Daten wurden anonym für jeden eingeschlossenen Patienten notiert: Geschlecht, Alter, Körpergewicht bei Aufnahme und bei den Untersuchungszeitpunkten, Körpergröße, Kreatinin-Serumwert und eventuell vorhandene Begleiterkrankungen.

Darüber hinaus wurden Informationen zur Familienanamnese sowie zur Nikotin- und Drogenanamnese erhoben und dokumentiert. Zur Erfassung des sozioökonomischen Status wurden Schullaufbahn und Beruf erfragt.

Schließlich wurde die Diagnose nach DSM-IV (Saß H et al., 1996) und ICD-10 (Dilling H et al., 1991) notiert und festgehalten, ob es sich um eine Ersterkrankung oder um ein Erkrankungsrezidiv handelte. Eventuell durchgeführte medikamentöse Vorbehandlungen wurden ebenfalls notiert.

Der angestrebte Untersuchungszeitraum umfasste 35-40 Tage. Während dieses Zeitraumes wurden zu drei Zeitpunkten (U1: 3.-5. Tag, U2: 14.-16.Tag, U3: 28.-30. Tag) Blutentnahmen durchgeführt und der Spiegel aller gegebenen Neuroleptika bestimmt (Therapeutisches Drug-Monitoring, TDM). Gleichzeitig mit der U1 wurde der Metabolisierer-Status bezogen auf den Polymorphismus der Cytochrom-P450-2D6 bestimmt. Für die Auswertung wurden auch die Daten der Patienten verwendet, die nur bis zur U1 oder U2 an der Studie teilnahmen (Intention-to-treat).

Die Behandlungsstrategie, also die Auswahl des Neuroleptikums oder die Höhe der gegebenen Arzneimittelmenge, blieb dem jeweiligen Stationsbetrieb überlassen (naturalistisches Studiendesign). Die gemessenen Laborwerte (Transaminasen, Blutbild) wurden ebenso notiert wie die Herzfrequenz und der Blutdruck zum Untersuchungszeitpunkt.

An den Untersuchungstagen (Tag 3, Tag 14, Tag 28) fand eine ausführliche, standardisierte Untersuchung des Patienten mit Erhebung des psychopathologischen Befundes nach der „Positive and Negative Syndrome Scale“ (PANSS) gemäß Kay SR et al., 1987, statt; darüber hinaus wurde eine Untersuchung auf extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen wie Rigor, Tremor, Gangstörungen und fehlende Mitbewegungen der Arme und Beine gemäß der „Extrapyramidal Syndrom Skale“ (EPS) nach Simpson GM et Angus JW, 1970 durchgeführt. Eine Untersuchung auf Symptome der Akathisie erfolgte nach der „Barnes Akathisie Rating Skala“ (BARS) nach Barnes TR, 1989. Außerdem erfolgte die Dokumentation der Anzeichen von Spätdyskinesien nach der „Abnormal Involuntary Movement Scale“ (AIMS) nach Guy W et al., 1976. Zusätzlich wurde eine genaue Untersuchung auf eventuell aufgetretene unerwünschte Arzneimittelwirkungen durchgeführt. Sämtliche im vierzigtägigen Untersuchungszeitraum aufgetretenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) wurden in Qualität und Quantität dokumentiert. Dabei wurden neben den eigenen Beobachtungen zu den Untersuchungszeitpunkten die in der Kurve der Patienten dokumentierten UAW (ärztlicher Verlauf, Pflegeberichte) mit aufgenommen und die behandelnden Stationsärzte befragt.

Der Nebenwirkungs-Erfassungsbogen wurde in Anlehnung an die in der AMÜP-Studie (Studie zur Arzneimittelüberwachung in der Psychiatrie, Grohmann R et al., 1994) verwendeten Bögen erstellt.

Zusätzlich zur PANSS-Skala wurde die Stimmung und Depressivität der Patienten zu jedem Untersuchungszeitpunkt entlang des Interview-Schemas der „Hamilton Depression Rating Scale“ (HDRS) nach Hamilton M, 1967 untersucht und dokumentiert. Bei manischen Patienten fand darüber hinaus eine Beurteilung gemäß der „Bech-Rafaelsen Manie-Skala“ (BRMAS) nach Bech P et al., 1978, statt.

Tab. 5: Reihenfolge der Untersuchungen am einzelnen Patienten

| Tag 1   | U1<br>(Tag 3-5)                                    | U2<br>(Tag 14-16)                                  | U3<br>(Tag 28-30)                                  | Tag 35                     |
|---|--|--|--|----------------------------|
| Beginn<br>der medika-<br>mentösen<br>Therapie | TDM<br>UAW<br>EPS<br>BARS<br>AIMS<br>HDRS<br>PANSS | TDM<br>UAW<br>EPS<br>BARS<br>AIMS<br>HDRS<br>PANSS | TDM<br>UAW<br>EPS<br>BARS<br>AIMS<br>HDRS<br>PANSS | Ende<br>der<br>Beobachtung |

## 2.2 Laboruntersuchungen

### 2.2.1 Konzentrationsbestimmungen der Antipsychotika

Die Konzentrationen des Neuroleptikums Perazin und dessen Metaboliten Desmethylperazin wurde im psychopharmakologischen Labor der Psychiatrischen Klinik am UKBF mittels eines dünnschichtchromatographischen Verfahrens gemessen (siehe Kresse M et al., 1980). Die Messgenauigkeit ausgedrückt als Variationskoeffizient lag unter 10% für alle Konzentrationen über 50 ng/ml. Die Nachweisgrenze für Perazin und dessen Metaboliten Desmethylperazin lag bei diesem Verfahren bei 10 µg/L.

Die Konzentrationen des Neuroleptikums Haloperidol und dessen Metaboliten, des reduzierten Haloperidols, wurden am Institut für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikum Charité mittels HPLC und elektrochemischer Detektion gemessen in Anlehnung an publizierte Verfahren (Walter S et al., 1998). Die Nachweisgrenze lag bei 0,31 µg/L für Haloperidol und für den Metaboliten reduziertes Haloperidol. Der Variationskoeffizient für Haloperidol und reduziertes Haloperidol lag zwischen 6% bei 7,5 µg/L und 12% bei 1,25 µg/L. Jede Blutprobe wurde zweimal gemessen und der Mittelwert beider Messungen als Messwert festgehalten. Die Durchführung der Konzentrationsanalysen zu Haloperidol mittels HPLC war Inhalt einer anderen Doktorarbeit (Promotion von Frau Silke Walter).

### 2.2.2 Typisierung von Cytochrom-P450-2D6

Die molekulargenetische Typisierung der Cytochrom-P450-2D6 erfolgte am Institut für Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikum Charité nach Verfahren, die von Sachse C et al., 1997, veröffentlicht worden sind.

Aus den Genotyp-Analysen kann auf die metabolische Aktivität geschlossen werden. Im Einzelnen handelt es sich dabei um Varianten, die zu vollständigem Aktivitätsverlust führen (CYP2D6-Allele \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*8, \*11 oder \*14). Daneben wurden auch Varianten identifiziert, die zu Aktivitätsminderung führen (CYP2D6-Allele \*9 und \*10) und es wurde getestet, ob eine Genduplikation vorliegt (CYP2D6\*1x2). Literatur hierzu siehe Sachse C et al., 1997, und Sachse C et al., 1998.

Der Arbeitsablauf bei dieser Methode beginnt mit einer Extraktion der DNA aus einer Blutprobe. Hierbei werden aus der Blutprobe zunächst die Leukozyten isoliert. Anschließend wird aus den Leukozyten mittels Phenol-Chloroform-Methode die Desoxyribonukleinsäure (DNA) isoliert.

Der eigentliche Nachweis erfolgt dann mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Die PCR ist eine In-vitro-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonukleinsäure-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. In unserem Fall handelte es sich um chromosomale DNA aus den Patienten-Leukozyten.

Die DNA bildet im natürlichen Zustand eine Doppelhelix aus zwei DNA-Strängen, die durch nicht-kovalente Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind und antiparallel zueinander verlaufen. Wasserstoffbrücken bilden sich dabei zwischen den komplementären Basen Cytosin (C) und Guanin (G) sowie Thymin (T) und Adenin (A).

Für die PCR werden zwei verschiedene Oligonukleotide-Primer (Amplifier) benötigt, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt einrahmen und komplementär zu je einem der beiden DNA-Stränge sind. Die zu kopierende DNA-Matrize (Template) wird auf ca. 94 Grad Celsius erhitzt, wodurch die DNA denaturiert wird und daher in Einzelsträngen vorliegt. Es folgt eine Temperatursenkung auf ca. 57 Grad Celsius, wobei die Primer mit der jeweils komplementären Sequenz des Templates hybridisieren. Diesen Vorgang nennt man Annealing. Nach dem Annealing schließen die Primer das spezielle, zu

replizierende Fragment ein und dienen einer hitzestabilen Polymerase als Startpunkt für die Kettenverlängerung (Elongation). Hierbei werden nach erneuter Erhöhung der Temperatur auf ca. 72 Grad Celsius Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) aus dem Reaktionspuffer komplementär gebunden, so dass schließlich wieder eine Doppelstrang-DNA vorliegt. Mindestens 20 bis 35 mal müssen die drei Temperaturschritte und damit der Zyklus Denaturierung, Annealing, Elongation wiederholt werden, um eine ausreichende Menge an DNA-Fragmenten für eine anschließende Gel-Elektrophorese zu vervielfältigen und damit eine Auswertung der PCR zu ermöglichen.

Die Ergebnisse wurden schließlich als Anzahl aktiver Allele pro Patient ausgedruckt. Diese Zahl beträgt 0, wenn der Patient Träger von 2 defekten Allelen ist – in diesem Fall liegt keinerlei CYP2D6-Aktivität vor (poor metabolizer, PM). Die Zahl beträgt 1, wenn der Patient heterozygot für 1 defektes und 1 aktives Allel ist. In diesem Falle liegt eine intermediäre CYP2D6-Aktivität (intermediate metabolizer, IM) vor. Die Zahl beträgt 2, wenn 2 aktive Allele vorliegen (extensive metabolizer, EM). Die Zahl beträgt 3, wenn der Patient auf einem Allel eine Genduplikation aufweist und auch auf dem anderen Chromosom 22 ein aktives CYP2D6-Allel trägt. In diesem Falle geht man von sehr hoher metabolischer Aktivität aus (ultrarapid metabolizers, UM). In einer kaukasischen Bevölkerung erwartet man einen Anteil von ca. 8% PM, 40% IM, 50% EM und ca. 2% UM.

### 2.2.3 Dokumentation und Statistische Methoden

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels der Programme SPSS (Version 10.0) und SAS (Version 6.12).

Da bei den meisten Daten nicht davon ausgegangen werden konnte, dass die Daten normalverteilt sind, wurden bei der Auswertung so genannte nichtparametrische Tests bevorzugt.

Die mittlere Lage der Daten wurde mit dem Mittelwert oder dem Median angegeben, die Streuung der Messwerte mit den 25. und 75. Quartilen sowie der Spannweite zwischen dem Minimalwert und dem Maximalwert der Messung.

## Material und Methoden

---

Unterschiede in Messwerten zwischen Gruppen wurden, sofern 2 Gruppen zu unterscheiden waren, mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Beim Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Soweit bei den Messgruppen-Vergleichen von Trends ausgegangen werden konnte (z.B. ein vermuteter Trend für die Metabolisierungsgeschwindigkeit  $PM < IM < EM < UM$ ), fand der Jonckheere-Terpstra-Trend-Test Verwendung. Bei einseitiger Testung wurde das Signifikanzniveau  $p < 0,05$  gestgelegt.

Unterschiede in Häufigkeiten wurden bevorzugt mit dem exakten Fischer-Test analysiert. Sofern hier mehr als 4 Felder zu vergleichen waren, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.