Aus der Klinik für Neurologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Th. Münte

Zusammenhang zwischen der klinischen Symptomatik der Multiplen Sklerose und ausgewählten Parametern des Thiopurinstoffwechsels (Thiopurin-S-Methyltransferase-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin)

Inauguraldissertation
zur
Erlangen der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Julia Frederike Tafazzoli-Lari
aus Osterholz-Scharmbeck

Lübeck 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Moser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Otte

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck den 21.01.2011

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Multiple Sklerose	1
1.2.	Epidemiologie	2
1.3.	Symptomatik und Verlauf	4
1.4.	Ätiologie	7
1.5.	Pathophysiologie	8
1.6.	Diagnostik	10
1.7.	Therapie	16
1.7.1.	Schubtherapie der Multiplen Sklerose	16
1.7.2.	Verlaufsmodifizierende Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose	17
1.7.3.	Symptomatische Therapien der Multiplen Sklerose	21
1.8.	Azathioprin und sein Abbau im Thiopurinstoffwechselsystem	23
1.8.1.	Renale Elimination der Thiopurine	29
1.8.2.	Wirkmechanismus von Azathioprin	30
1.9.	Fragestellung	30
2.	Patienten und Methoden	32
2.1.	Patientenkollektiv, Einschlusskriterien	32
2.2.	Untersuchungsinstrumente	33
2.2.1.	Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC)	33
2.2.2.	Expanded Disability Status Scale (EDSS)	37
2.3.	Bestimmung der Laborparameter	39
2.3.1.	Substanzen	39
2.3.2.	Probenvorbereitung	40
2.3.3.	Inkubation	40
2.3.4.	Eichreihe und Qualitätskontrolle	41
2.3.5.	Extraktion	41
2.3.6.	Chromatographie	42
2.3.7.	Messung des Hämoglobingehalts in den Erythrozyten	42
2.3.8.	Berechnung der Thiopurin-S-Methyltransferase-Aktivität	43
2.3.9.	Bestimmung der Metabolite 6-Methyl-Mercaptopurin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Thioguanin	43
2.3.9.1.	Probenvorbereitung	44
2.3.9.2.	Extraktion von 6-Methyl-Mercaptopurin und 6-Methyl-Thioguanin aus Erythrozyten	44
2.3.9.3.	Bestimmung der 6-Thioguanin-Konzentration in Erythrozyten	45
2.3.9.4.	Eichreihen und Qualitätskontrollen	46
2.4.	Statistische Methoden	46

3. Ergebnisse 48
3.1. Demographische Ergebnisse 48
3.2. Veränderungen des EDSS und MSFC zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten 51
3.3. Veränderung der Laborparameter (TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin, 6-Methyl-Mercaptopurin) zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten 53
3.4. Zusammenhang zwischen den Laborparametern TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin mit den klinischen MS-Bewertungsschemata EDSS und MSFC zu beiden Beobachtungszeitpunkten 58
3.5. Regressionsanalysen 62
3.6. Metabolitenkonzentration in Abhängigkeit von der TPMT-Aktivität und der Azathioprindosierung beim Beobachtungsbeginn 68
3.7. EDSS-Score in Abhängigkeit von der 6-MMP-Konzentration und der Azathioprindosis 73

4. Diskussion 75

5. Zusammenfassung 90

6. Literaturverzeichnis 92

7. Danksagung 108

8. Lebenslauf 109

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (Enzephomyelitis disseminata, Polysklerose) wurde im 19. Jahrhundert vom französischen Neurologen Jean-Martin Charcot (1825-1893) erstmals beschrieben. Ihm waren während seiner Tätigkeit am Pariser Armenkrankenhaus La Salpetrière verschiedene Patienten aufgefallen, die, wenn sie ihn von der Seite anblickten, einen Nystagmus bekamen. Wenn er ihnen die Hand reichte, zeigten die Patienten einen Intentionstremor, die Sprechweise zeichnete sich durch eine skandierende Betonung jeder Silbe aus. Im Jahre 1863 diagnostizierte er erstmals eine Multiple Sklerose (Sclérose en plaques) bei einer schwangeren Patientin, deren Symptome bereits 1855 begonnen hatten. Später fielen Charcot entsprechende Symptome bei einer in seinem Haushalt beschäftigen Dienstmagd auf, bei der er nach ausführlicher Untersuchung von der anfänglichen Verdachtsdiagnose eines M. Parkinson auf die neue Diagnose der Multiplen Sklerose überwechselte. Am 8. März 1865 präsentierte Charcot der Société Médicale des Hopiteaux erstmals drei Fälle mit Multipler Sklerose und veröffentlichte binnen kurzem zunächst vier Artikel zu diesem Thema (Charcot, 1865; Charcot, 1868a; Charcot, 1868b; Charcot, 1868c). Allerdings wurden Charcot's Beobachtungen zur Multiplen Sklerose erst nach der Publikation späterer Arbeiten bekannt (Charcot, 1872; Charcot, 1875; Charcot, 1887), wobei eine englische Übersetzung und Veröffentlichung seiner Berichte durch die New Sydenham Society (Charcot, 1877) am wichtigsten für die Verbreitung der Kenntnis der neuen Diagnose war. Die Symptomatik wurde als "Charcot-Trias" bekannt und die "Scleose en plaques" wurde im Lauf der Jahre zur am besten bekannten Nervenkrankheit (Compston, 2005).

Bei der Multiplen Sklerose handelt es sich um eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems. T-Zell- und antikörpervermittelte autoimmunologische Prozesse gegen Antigene im Myelin führen zur Demyelinisierung und Zerstörung der Oligodendrozyten. Die Neuro-

glia werden durch Entmarkungsherde ersetzt (Sklerose). Diese Herde liegen häufig periventrikulär und sind auch im Kleinhirn, dem Hirnstamm, dem N. opticus und dem Rückenmark zu finden (Bremer et al., 2007).

1.2. Epidemiologie

Die Multiple Sklerose gehört zu den häufigsten organischen Krankheiten des Nervensystems und hat in Europa eine jährliche Inzidenz von 3-7 Personen pro 100.000 Einwohner mit einer Prävalenz von 30-60/100.000 Einwohner. Etwa 8% der in neurologischen Kliniken behandelten Patienten leiden an dieser Erkrankung (Poeck und Hacke, 2006). Weltweit dürften etwa eine Million Patienten von Multipler Sklerose betroffen sein, jedoch liegen verlässliche Daten hierzu nicht vor (Compston und Coles, 2002).

Aufgrund der bisher existierenden epidemiologischen Daten scheint die Multiple Sklerose unter der weißen Bevölkerung in äquatorfernen Ländern häufiger aufzutreten. Die Inzidenz ist in den Industrienationen der Nordhalbkugel und in Australien höher (Bremer, 2007).

Bereits innerhalb Großbritanniens lässt sich ein deutliches Nord-Süd-Gefälle der MS-Inzidenz feststellen. So liegt im Süden Englands die Inzidenz bei 99/100.000 Einwohner, während sie im Nordirland und im Norden der Republik Irland 168-184/100.000 beträgt. In geographisch ebenso weit nördlich liegenden Regionen Süd-Schottlands beläuft sie sich auf 187/100.000 (McGuigan et al., 2004) - siehe auch Abbildung 1.

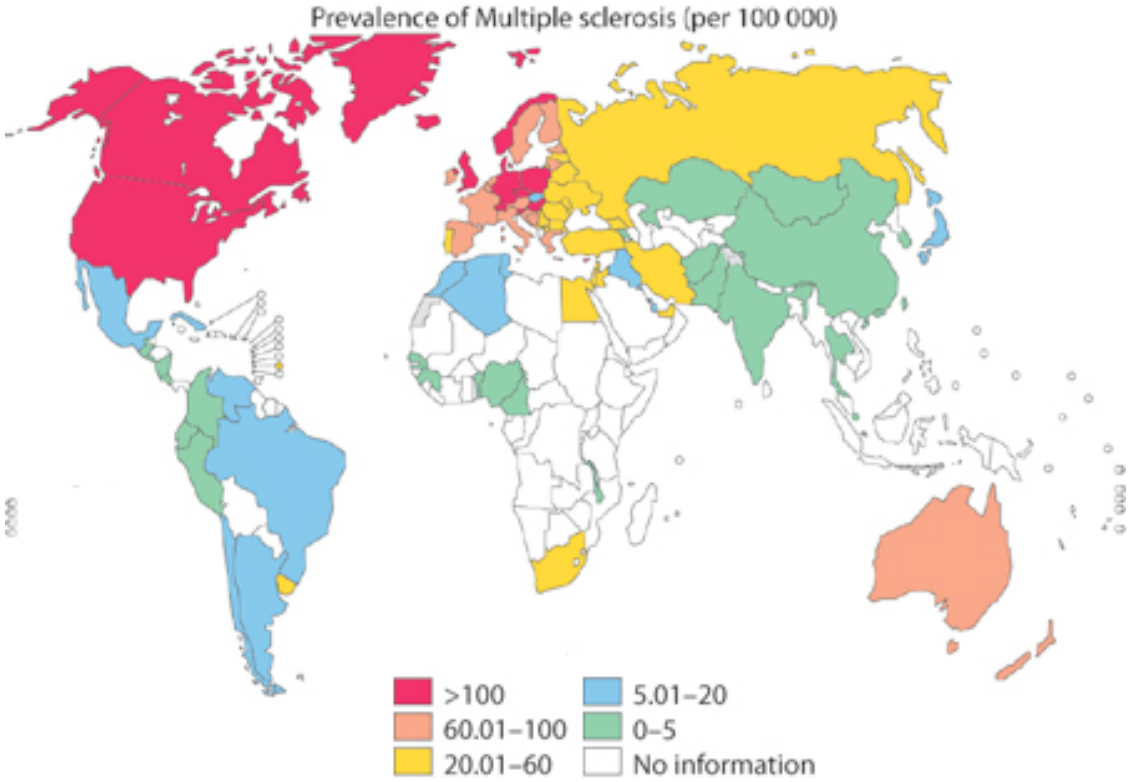

Abbildung 1: Verteilung der Prävalenz der Multiplen Sklerose in unterschiedlichen Regionen der Erde (http:www.msif.org/images/global_prevalence_of_MS1.jpg)

In der Untersuchung von Dean und Elian (1997) zeigte sich, dass bei einer Auswanderung aus Asien oder der Karibik nach England vor dem 15. Lebensjahr das individuelle Erkrankungsrisiko des Auswandernden jenem Risiko entspricht, welches im Einwanderungsland für die englische Bevölkerung vorhanden ist. Liegt das Auswanderungsalter jedoch über dem 15. Lebensjahr, nimmt der Auswandernde das Erkrankungsrisiko seines Herkunftslandes mit sich in seine neue Heimat (Dean und Elian, 1997).

Verschiedene aktuelle Studien bestätigen unterschiedliche Erkrankungsrisiken für Immigranten, die in nördlich gelegene Industrienationen übersiedeln. In Kanada untersuchten Kennedy et al. (2006) auf der Basis von 44 Kindern und 573 Erwachsenen mit Multipler Sklerose. Sie stellten fest, dass obwohl sowohl die Kinder als auch die Erwachsenen im gleichen Landesteil Ontario geboren und aufgewachsen waren, hatten die an MS leidende Kinder deutlich häufiger Vorfahren aus der Karibik, Asien oder dem Mittleren Osten im Vergleich zu den

erst im Erwachsenenalter an Multipler Sklerose erkrankten Personen. Letztgenannte hatten deutlich häufiger europäische Vorfahren. Die Autoren schlossen aus ihren Daten, dass Einwanderer aus Regionen mit niedriger MS-Prävalenz in jüngerem Alter an MS erkrankten, während Einwanderer aus Regionen mit hoher MS-Prävalenz überproportional häufig erst im Erwachsenenalter erkrankten. Desweiteren waren die Autoren der Auffassung, dass ein entscheidender Faktor für das MS-Risiko der Wohnsitz des Patienten in der Kindheit sei.

Auf der Basis repräsentativer Umfagen in Arztpraxen sowie aufgrund von Schätzungen der Deutschen Multiple Sklerose Gesellschaft wird von einer Zahl von etwa 120.000 MS-Patienten für Deutschland ausgegangen (Hein und Hopfenmüller, 2000). Frauen erkranken etwa doppelt so häufig wie Männer an Multipler Sklerose (Poeck und Hacke, 2006).

1.3. Symptomatik und Verlauf

Klinisch beginnt die Multiple Sklerose bei etwa 80% der Betroffenen mit einem schubförmigen Verlauf. Unter den Frühsymptomen sind Sensibilitätsstörungen, eine Gangstörung mit belastungsabhängiger Schwäche der Beine in Kombination mit Gangunsicherheit sowie eine einseitige Optikusneuritis am häufigsten (Weinshenker, 1998). Ein Beginn während der Kindheit im Alter unter 16 Jahren ist selten und betrifft zwischen 0,4-10,5% der Patienten (Renoux et al., 2007). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 30.-40. Lebensjahr und die durchschnittliche Zeitspanne zwischen Auftreten der Erstsymptome bis zur endgültigen Diagnosestellung beträgt 3,4 Jahre (Flachenecker et al., 2005) - siehe auch Tabelle 1.

Tabelle 1: Geschlechts- und Altersverteilung, Anteil von Patienten mit schubförmigem Verlauf, Krankheitsdauer und Krankheitsschwere (EDDS-Score) von MS-Patienten in epidemiologischen Studien

Autor(en)/Jahr	N	Anteil		Alter	Anteil (%) von Patienten mit schubförmigem Verlauf	Krankheitsschwere (EDDS)		
		M	F			niedrig (< 4 Pkt.)	mittelgradig (5-7 Pkt)	schwer (≥ 8 Pkt.)
Flachenecker et al. 2005	3223	28%	72%	42,9 ± 11,2	64%	69%	21%	3%
Haas et al. 2003	654	24%	76%	47,4 ± 12,3	33%	13%	67%	21%
Kobelt et al. 2001	737	27%	73%	41,9 ± 11,4	35%	54%	29%	2%
Weinshenker et al. 1989	1099	34%	66%	42,4 ± 9,9	66%	49%	49%	12%
Rodriguez et al. 1994	162	25%	75%	47,5	58%	57%	39%	14%
Pittock et al. 2004	201	30%	70%	51,8	65%	62%	36%	14%

N = Anzahl untersuchter Patienten in der Studie; M = Männer; F = Frauen

Die Erkrankung lässt sich in verschiedene Verlaufsformen untergliedern: den schubförmig remittierenden Typ (Relapsing Remitting, RR), den sekundär progredienten Typ (SP) und den primär progredienten Typ (PP). Der schubförmig remittierende Verlauf tritt am häufigsten auf und ist charakterisiert durch Schübe, die zumeist vollständig remittieren (Weinshenker et al., 1989). Beim sekundär progredienten Typ treten zwar ebenfalls Schübe auf, diese remittieren allerdings nicht bzw. nicht vollständig. Außerdem ist das Krankheitsbild hier weit weniger durch die Schübe bestimmt, die zudem schwächer ausgeprägt sind als bei der schubförmig remittierenden Form, sondern vielmehr durch die langsame Progredienz zwischen den Schüben. Häufig beginnt die MS mit der schubförmig remittierenden Form und geht dann in die sekundär progrediente Form über (Weinshenker et al., 1989). Beim primär progredienten Verlauf beginnt die Erkrankung schleichend und schreitet chronisch fort, ohne dass Schübe oder Remissionen auftreten (Fowler, 1989).
Bei den meisten Patienten bilden sich die Symptome eines Schubes innerhalb von 6-8 Wochen zurück. Wenn neu aufgetretene Beschwerden über sechs Monate anhalten, sinkt die Chance auf eine Rückbildung der Symptome auf unter 5% (Ellison et al., 1994). Die nachfolgende Abbildung 2 gibt einen ersten Überblick über die auftretenden Symptome.

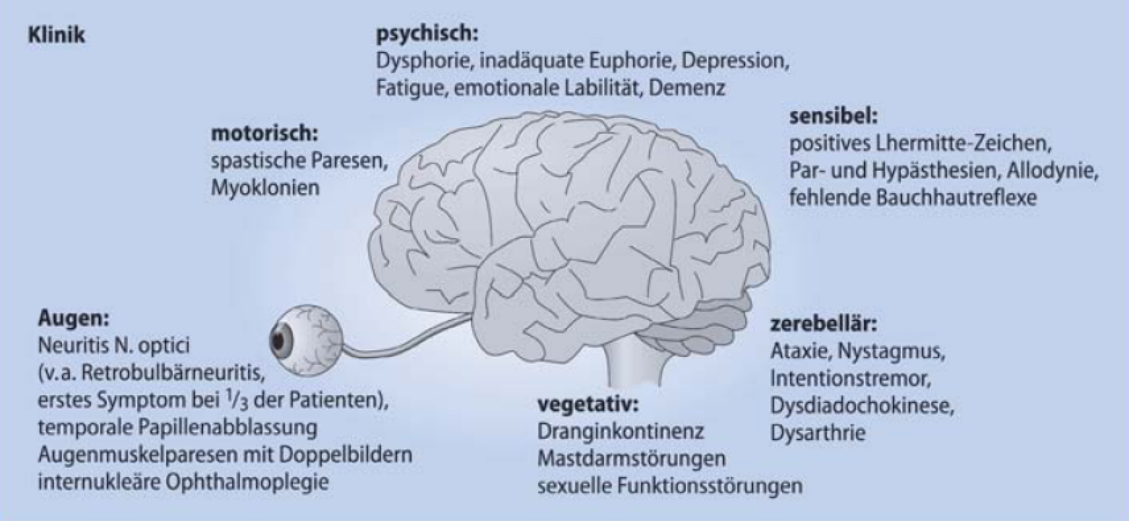

Abbildung 2: Verteilung klinischer Symptome während der Entwicklung einer Multiplen Sklerose (Bremer, 2007; S.54)

Beim natürlichen Verlauf der unbehandelten Erkrankung liegt die Schubrate initial bei etwa zwei Schüben jährlich und nimmt in den Folgejahren kontinuierlich ab. Eine hohe Anzahl von Schüben innerhalb der ersten beiden Krankheitsjahre ist mit einer raschen Progredienz verbunden. Der zweite Schub tritt bei 25-50% der Patienten innerhalb des ersten Jahres, bei 60% innerhalb von drei Jahren ein. Die Hälfte der Erkrankten entwickelt innerhalb von 10 Jahren nach Erstmanifestation eine progrediente Verlaufsform (Poeck und Hacke, 2006).

Für die Entwicklung der Symptome lassen sich keine einheitlichen Regeln aufstellen. Es finden sich eine Optikus- und Retrobulbärneuritis, wobei letztere in 30% der Fälle ein Erstsymptom ist. Ebenfalls treten unter den Symptomen eine Okulomotorikstörung auf sowie Funktionsstörungen der übrigen Hirnnerven, wobei die kaudalen Hirnnerven in der Regel nicht befallen sind, im Gegensatz zum N. facialis und des sensiblen N. trigeminus. Deshalb findet sich bei MS-Patienten häufig zunächst scheinbar idiopathische Trigeminusneuralgie. Auch eine hemifaziale Myokymie ist für Multiple Sklerose typisch, ggf. in Kombination verschiedener Symptome (halbseitige Gefühlsstörung im Gesicht und auf der Zunge mit halbseitiger Geschmacksstörung). Hinzutreten zentrale Paresen, wobei distale Gliederabschnitte häufiger als proximale betroffen sind. Die

Beeinträchtigungen reichen von Störungen der Feinmotorik und Steifigkeit des Ganges bis hin zu kompletten Para-, Tetra- oder Hemiplegien. Als wichtiges Frühsymptom bei Multipler Sklerose kann die in 70% der Fälle nachweisbare Einschränkung oder das vollständige Ausbleiben der Bauchhautreflexe angesehen werden. Es treten ebenfalls Sensibilitätsstörungen (Taubheit, Pelzigkeit, Kribbeln) im Bereich von Händen und Füßen, meist ohne begleitende Schmerzen auf. Blasenentleerungsstörungen sind bei 20% der Betroffenen nachweisbar. Kleinhirnfunktionsstörungen zeigen sich in der Charcot-Trias (Nystagmus, Intentionstremor, skandierendes Sprechen) (Poeck und Hacke, 2006). Kognitive Veränderungen finden sich bei 50-70% der Patienten. Hierbei dominiert neben Gedächtnisstörungen die chronische Tagesmüdigkeit, die bei 65% der Patienten vorhanden ist und von 15-40% der Patienten als am meisten beeinträchtigend empfunden wird (Hadjimichael et al., 2008).

1.4. Ätiologie

Definierte exogene Faktoren (schwere körperliche Arbeit, überwiegende sitzende Tätigkeit, Mangelernähgung, Temperatureinflüsse, Trauma mit ZNS-Beteiligung) haben bei der MS-Erkrankung im Erwachsenenalter keinen erkennbaren Einfluss (Poeck und Hacke, 2006).

Obwohl eine genetische Prädisposition bei der Entwicklung einer Multiplen Sklerose von erheblicher Bedeutung zu sein scheint, sind bis heute nur wenige diesbezügliche Gen-Loci identifiziert worden. Der in den meisten Studien bisher untersuchte MHC-Komplex des Chromosoms 6p21 (HLA-DRB1*1501) scheint bisher der am besten etablierte Risikofaktor zu sein (Sawcer 2008). Dieser Gen-Locus erklärt jedoch nicht die gesamte genetische Variabilität der Multiplen Sklerose, so dass auch andere Gen-Loci (Proteinkinase Cα/PRKCA, Interleukin-7-Rezeptor-α-Kette-Gen/IL7RA, Interleukin-2-Rezeptor-α-Kette-Gen/IL2RA, Interleukin-Regulator-Faktor 5/IRF5) von Bedeutung sein können (Kristjansdottir et al., 2008).

Eine genetische Prädisposition allein erklärt jedoch nicht die rasche Zunahme von Multipler Sklerose in Regionen des Mittelmeeres wie Sardinien (Rosati, 2001), Sizilien (Nicoletti et al., 2005) oder Malta (Dean et al., 2002) in wenigen Jahrzehnten. Ebenso erklärt es nicht die Zunahme der Multiplen Sklerose Inzidenz innerhalb einer einzigen Generation. Deshalb werden in der Literatur auch virale Ursachen (Humane Herpesviren, Ebstein-Barr-Virus, Varicella Zoster Virus) zum Teil kontrovers diskutiert. Möglicherweise sind diese Viren nicht die Ursache der Erkrankung selbst, sie könnten jedoch eine Rolle im Erkrankungsverlauf bzw. der Progression einer Multiplen Sklerose spielen. Durch die Infektion von ZNS-Zellen könnten sie indirekte zytopathische Effekte bis hin zur Einleitung der Apoptose auslösen, die Zytokin- und Chemokin-mediierten Signalkaskaden auslösen, eine polyklonale B-Zell-Aktivierung mit Erhöhung der Antikörperproduktion bewirken, eine Komplementaktivierung bewerkstelligen und durch eine Kreuzimmunität (sog. molekulare Mimikry) die Produktion verschiedener Antimyelin-Antikörper bewirken, die den Erkrankungsverlauf beschleunigen (Christensen, 2007).
Andere Ursachen wie die Benutzung von Mobiltelefonen oder die Exposition gegenüber elektromagnetischen Wellen haben beim Menschen nachweislich keinen Einfluss auf die Auftretenswahrscheinlichkeit einer Multiplen Sklerose (Schütz et al., 2009)

1.5. Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Multiplen Sklerose beginnt wahrscheinlich dadurch, dass autoreaktive T-Lymphozyten in der Peripherie aktiviert werden. Vermutlich wird dies durch eine virale Infektion ausgelöst. Diese T-Lymphozyten docken an Rezeptoren der Blut-Hirn-Schranke an und durchwandern diese in Richtung Hirngewebe. Nach klonaler Proliferation der T-Zellen kommt es zu einer neuerlichen Aktivierung dieser T-Zell-Nachkomen durch ZNS-Strukturen (vor allem basische Myelinproteine, aber auch Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein, Myelin-assoziiertes Glykoprotein, Proteolipoprotein), die irrtümlicherweise

als Antigene wahrgenommen werden. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine werden andere zelluläre Komponenten des Immunsystems (Makrophagen, T- und B-Zellen) aktiviert, deren Zusammenwirken zu einer entzündlichen Markscheidenschädigung mit gliöser Vernarbung (Sklerosebildung) führt. In den MS-Läsionen lassen sich immunhistochemisch und molekularbiologisch vier verschiedene immunpathogenetische Subtypen differenzieren:

- *Oligodendrozytenerhalt:* T-Zell- und Makrophageninfiltration, schnelle und fast vollständige Remyelinisierung.
- *Olidogendrozytenverlust:* T-Zell- und Makrophageninfiltration, Plasmazelleninfiltration, Immunglobulin- und Komplementablagerung, Rekrutierung von oligodendroglialen Vorläuferzellen.
- *Oligodendrozytendystropie und apoptotische Olidodendrozyten:* schwächere T-Zell-Infiltration, gestörte Myelinexpression, selektiver Verlust von Myeylin-assoziiertem Glykoprotein, Überexpression von Myelin-Olidogendrozyten-Glykoprotein).
- *primäre Degeneration von Olidogendrozyten in der weißen Substanz:* vollständiger Oligodendrozytenverlust in der Plaque, T-Zell- und Makrophageninfiltration.

Die ersten beiden Typen weisen eine große Ähnlichkeit mit T-Zell- oder T-Zell/ Antikörper-mediierten autoimmunen Enzephalomyelitiden der Maus bzw. der Ratte auf, während der primäre Oligodendrozytenschaden die letzten beiden Typen den virus- oder toxininduzierten demyelinisierten Läsionen in anderen Tiermodellen der Ratte und Maus ähnelt (Poeck und Hacke, 2007).

Im frühen Erkrankungsstadium sind die Markscheiden an den erkrankten Stellen rötlich geschwollen und aufgelockert. Die Plaques zeigen in Abhängigkeit vom Alter entzündliche Infiltrate mit Demyelinisierung, Axonenverlust und gliotische Narben. Die Infiltrate bestehen aus Lymphozyten und Monozyten. Frische und sklerotische Herde werden im ZNS nebeneinander angetroffen. Prädilektionsstellen für die Plaquelokalisation sind Sehnerven, Balken, Hirnstamm, Brücke mit Augenmuskelkernen, Kleinhirn und Kleinhirnstiele, die Pyramidenbahn, Boden des IV. Ventrikels und die Hinterstränge des Rücken-

marks. Seltener sind Hirnrinde, Basalganglien und die graune Substanz des Rückenmarks betroffen (Poeck und Hacke, 2007).

1.6. Diagnostik

Die klassische Diagnostik der Multiplen Sklerose stützt sich zunächst auf die Erhebung der Anamnese. Hierbei wird auf bereits früher auftretene neurologische Ereignisse mit Schubcharakter geachtet. Ebenso ist nach anderen Autoimmunerkrankungen beim gleichen Patienten wie auch dessen Familienmitgliedern zu fragen (Broadley et al., 2000; Chan et al., 2008). Beschwerden und Symptome im Bereich der Blasen-, Mastdarm- und Sexualfunktion müssen unter entsprechender Rücksichtnahme erfragt werden. Es ist eine gezielte Befragung nach "versteckten Symptomen" wie verstärkte Ermüdbarkeit (Fatigue), Konzentrationsstörungen und depressive Verstimmung notwendig, da diese die Lebensqualität des Patienten beeinträchtigen können (Lobentanz et al., 2004).

Für die korrekte Einstufung der klinischen Befunde ist zunächst die exakte Definition des MS-Schubes von Bedeutung (Chan et al. 2008). Dabei müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Anhalten des Schubes über mindestens 24 Stunden
- ein Zeitintervall von mindestens 30 Tagen muss zwischen dem aktuellen und dem vorausgegangenen Schub verstrichen sein
- die Veränderungen dürfen nicht durch eine Änderung der Körpertemperatur oder durch eingetretene Infektionen erklärbar sein.

Einzelne und nur kurz andauernde paroxysmale Episoden wie tonische Spasmen oder Trigeminusneuralgien werden definitionsgemäß keinem MS-Schub zugeordnet. Multiple Episoden dieser paroxysmalen Ereignisse, die länger als 24 Stunden andauern, können jedoch sehr wohl Ausdruck einer Entzündungsaktivität und als Zeichen eines MS-Schubes bewertet werden. Die Beachtung dieser MS-Definition ist wichtig, da die Anzahl der Schübe innerhalb eines festgelegten Zeitraums entscheidend für die Indikationsstellung einer verlaufs-

modifizierenden Behandlung sind und auch bei der Beurteilung des Therapieeffektes berücksichtigt werden (Chan et al., 2008).

Der Anamneseerhebung folgt im Rahmen der MS-Diagnostik die vollständige neurologische Untersuchung. Diese umfasst die Inspektion des Körpers, die Untersuchung des Kopfes, der Hirnnervenfunktion, der Kraftentfaltung, der Reflexe, der Bewegungskoordination, eine Prüfung der Sensibilität, der vegetativen Funktionen, des psychischen Befundes sowie eine orientierende internistische Untersuchung. Auch eine Visusprüfung des Patienten ist erforderlich. Dieses Vorgehen dient u.a. dem Auschluss bzw. Nachweis typischer Symptomkombinationen, die eine MS-Diagnose wahrscheinlich machen. Dabei handelt es sich um:

- Gefühlsstörungen an den Händen und spastische Paraparese der Beine
- spastisch-ataktischer Gang mit Missempfindungen und Blasenstörungen
- inkomplettes Querschnittssyndrom mit Nystagmus und skandierendem - Sprechen
- sowie rezidivierende, flüchtige Lähmungen wechselnder Augenmuskelnerven.

Zur Quantifizierung der im Rahmen der klinisch-neurologischen Untersuchung gewonnenen Informationen dienen verschiedene weiterere etabilierte Test-Systeme. Am wichtigsten hierbei ist der Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983). Dieser erlaubt die Bewertung folgender funktioneller Systeme: Pyramidenbahn (z.B. Lähmungen), Kleinhirn (z.B. Ataxie, Tremor), Hirnstamm (z.B. Sprach-/Schluckstörungen), Sensorium (z.B. Verminderung des Berührungsempfindens), Blasen- und Mastdarmfunktion (z.B. Harn- oder Stuhlinkontinenz), Sehfunktion (z.B. eingeschränktes Gesichtsfeld) und zerebrale Funktionen (z.B. Wesensveränderung, Demenz). Die Skala erstreckt sich über einen Bereich von 0-10 Punkten (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Expanded Disability Status Score (EDSS) nach Kurtzke (1983)	
Score	Bedeutung (FS = funktionelles System)
0 Pkt.	normale neurologische Untersuchung
1 Pkt.	keine Einschränkung, minimale Zeichen in einem FS
1,5 Pkt.	keine Einschränkung, minimale Zeichen in mehr als einem FS
2 Pkt.	leichte Einschränkung in einem FS
2,5 Pkt.	leichte Einschränkung in einem FS oder minimale Einschränkung in zwei FS
3 Pkt.	mäßige Einschränkung in einem FS oder leichte Einschränkung in drei oder vier FS; voll gehfähig
3,5 Pkt.	voll gehfähig mit mäßigen Einschränkungen in ≥ 1 FS oder mehr als nur leichte Einschränkungen in verschiedenen anderen FS
4 Pkt.	voll gehfähig ohne Hilfsmittel und Rast für mindestens 500 m; aktiv während mindestens 12 Std./Tag trotz relativ schwerer Behinderung
4,5 Pkt.	voll gehfähig ohne Hilfsmittel und Rast für mindestens 300 m; ganztägig arbeitsfähig; leichte Einschränkungen bei der Arbeit; benötigt minimale Hilfe; relativ schwere Behinderung
5 Pkt.	voll gehfähig ohne Hilfsmittel und Rast für etwa 200 m, Behinderung ist so schwer, dass tägliche Arbeit beeinträchtigt wird;
5,5 Pkt.	voll gehfähig ohne Hilfsmittel und Rast für etwa 100 m, Behinderung ist so schwer, dass tägliche Arbeit beeinträchtigt wird; Behinderung so schwer, dass tägliche Arbeit unmöglich wird
6,0 Pkt.	Patient bedarf Gehhilfe (Krücke, Stock, Schiene) entweder intermittierend oder auf einer Seite permanent, um 100 m ohne Rast zu gehen
6,5 Pkt.	Patient bedarf beidseits Gehhilfe (Krücke, Stock, Schiene), um 20 m ohne Rast zu gehen
7 Pkt.	Patient ist unfähig, ohne Hilfe mehr als 5 m zu gehen; weitgehend rollstuhlpflichtig, bewegt diesen noch selbst und transferiert hiermit ohne Hilfe
7,5 Pkt.	Patient ist unfähig, alleine mehr als nur ein paar Schritte zu gehen; ist an Rollstuhl gebunden, benötigt Hilfe bei Transfer; bewegt Rollstuhl noch selbst, kann aber nicht den ganzen Tag in ihm verbringen; ggf. Bedarf für motorisierten Rollstuhl
8 Pkt.	weitgehend bettlägrig bzw. rollstuhlpflichtig; Pflege noch weitgehend selbständig; meist guter Gebrauch der Arme
8,5 Pkt.	weitgehend auch tagsüber bettlägrig; Einsatz der Arme noch einsetzbar; einige Selbstpflege noch möglich
9 Pkt.	hilfloser, bettlägriger Patient; kann selbst essen und kommunizieren
9,5 Pkt.	gänzlich hilfloser Patient; unfähig, selbst zu essen oder zu kommunizieren
10 Pkt.	Tod infolge Multipler Sklerose

Neben dem EDSS stehen noch eine Reihe von Testbatterien für die Dokumentation des neuropsychologischen Befundes zur Verfügung (Rao, 1995). Bei Patienten mit eingeschränkter Gehfähigkeit (< 1 km ohne Pause) ist bei der Erstuntersuchung sowie mindestens einmal jährlich die maximale Gehstrecke ohne Pause mit Zeitmessung und Angabe eventuell verwendeter Hilfsmittel zu bestimmen (Albrecht et al., 2001). Zur Quantifizierung weiterer Funktionsbereiche hat sich die Multiple Sclerosis Functional Composite-(MSFC)-Skala als geeignet erwiesen (Cutter et al., 1999; Schwid et al., 2002). Der MSFC besteht aus verschiedenen Teilkomponenten. Der "Timed 25-Foot Walk" dient zur Bewertung einer kurzen Gehstrecke von 7,6 m, die innerhalb von 180 Sekunden vor- und zurückgegangen werden muss und der die motorische Funktion der unteren Extremität prüft. Beim "Nine Hole Peg Test" handelt es sich um einen Steckbrett-Test, bei dem die motorische Funktion der oberen Extremität geprüft wird. Der "Paced Auditory Serial Addition Test" untersucht die Aufmerksamkeit und Konzentrationsfähigkeit des Patienten. Durch Berechnung eines Z-Scores erlaubt der MSFC eine inter- und intraindividuelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Fischer et al., 2001). Auch dieser Test sollte sowohl bei Diagnosestellung einer Multiplen Sklerose durchgeführt werden als auch danach in jährlichem Abstand, um etwaige Veränderungen zu dokumentieren.
Gibt der Patient im Rahmen der Anamnese Blasenfunktionsstörungen an, muss vor Beginn der Therapie ein Miktionsprotokoll erstellt, eine Restharnbestimmung durchgeführt und ein Urinstatus vorgenommen werden. Optimalerweise erfolgt auch eine urodynamische Untersuchung, da u.a. der EDSS keine verlässliche Vorhersage für Einschränkungen der Blasenfunktion erlaubt (Blumhardt et al., 2000; Kragt et al., 2004).

Die Aufzeichnung evozierter Potentiale (VEP, SSEP, MEP, AEP) dienen dem Nachweis einer subklinischen Krankheitsdissemination. Visuell evozierte Potentiale (VEP) dienen der Beurteilung des Sehnerven und der Sehbahn für die Verlaufsdiagnostik einer Optikusneuritis bei Multipler Sklerose. Somatosensibel evozierte Potentiale (SSEP) lassen die Beurteilung der zentralen somatosensiblen Leitungsbahn sowie peripherer sensibler Nerven zu. Motorisch evozierte

Potentiale (MEP) dienen der Bewertung des Funktionszustandes des kortikospinalen Traktes. Akustisch evozierte Potentiale (AEP) helfen bei der Beurteilung des Funktionszustandes der zentralen akustischen Bahn im Hirnstamm und des N. acusticus.

Ein kranielles MRT dient ebenfalls zum Nachweis einer subklinischen Krankheitsdissemination bzw. ist ein Kernelement der Diagnosestellung der Grunderkrankung Multiple Sklerose. Von erheblicher Bedeutung ist bei dieser Bildgebung das Einhalten von Mindestanforderungen, die die Vergleichbarkeit der Befunde über einen längeren Untersuchungszeitraum hinweg erlauben. So muss ein standardisiertes Protokoll eingehalten werden, dass eine exakte Positionierung, eine transversale PD-T_2-Gewichtung sowie transversal T_1-gewichteter Aufnahmen mit und ohne Kontrastmittelgabe (Gadolinium) beinhaltet (Chan et al., 2008). Zusätzlich zum konventionellen MRT können transversale und sagittale FLAIR-Aufnahmen durchgeführt werden (Fazekas et al., 1999; Gass et al., 1999; Gass und Moseley, 2000).
Evozierte Potentiale und die MRT-Untersuchung sind nicht nur bei der Diagnostik der Initial-symptomatik von Bedeutung. Sie erlauben es auch, im weiteren Erkrankungsverlauf relevante Veränderungen der Krankheitssymptomatik und -dynamik anzuzeigen (Rieckmann et al., 2005). Die Verfahren dienen zusätzlich der Differentialdiagnostik, die Tumoren, arteriovenöse Fehlbildungen, Neuromyelitis optica mit mehrsegmentalen langstreckigen Läsionen auszuschließen helfen (Poser und Brinar, 2004).

Von wesentlicher Bedeutung im Rahmen der MS-Diagnostik ist auch die Liquoruntersuchung. Sie dient zum Ausschluss infektiöser Erkrankungen (z.B. Borreliose) (Bourahoui et al., 2004) als auch zum Nachweis der intrathekalen Synthese von IgG und IgM, die einen Hinweis auf einen chronisch-entzündlichen Prozess liefern und auch prognostisch relevant sein können (Tintore et al., 2003). Die Liquordiagnostik umfasst die Zytologie, die Albuminbestimmung sowie die IgG-, IgA- und IgM-Bestimmung nach dem Quotienten-Schema (Reiber-Felgenhauer-Diagramm), den Nachweis oligo-

klonaler IgG-Banden im Liquor sowie die Erfassung einer polyspezifischen, intrathekalen Immunglobulinsynthese durch die MRZ-Reaktion (Masern-, Röteln- und Zoster-Antikörper-Index; Werte von > 1,5 sind diagnostisch bedeutsam) zum Ausschluss einer Infektion durch Masern-, Röteln- oder Herpes Zoster-Viren.

Obligate sonstige Laboruntersuchungen in der diagnostischen Phase umfassen nach der Behandlungsleitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2008) die Bestimmung von C-reaktivem Protein (CRP), großem Blutbild, Serumchemie, Blutzucker, Vitamin B_{12}, Rheumafaktor, ANA, Anti-Phospholipid-Antikörper, Lupus-Antikoagulanz, ACE, Borrelienserologie und Urinstatus. Fakultativ können bei klinisch möglicher Differentialdiagnose noch ANCA, ENA, HIV-Serologie, TPHA, die Bestimmung langkettiger Fettsäuren, eine Myokoplasmen-Serologie und die Methylmalonylausscheidung im Urin vorgenommen werden (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2008).

Nach den aktuellen und international anerkannten Diagnosekriterien kann eine Multiple Sklerose bereits dann gestellt werden, wenn nach einem ersten Krankheitsschub mit klinisch nachweisbaren Auffälligkeiten in mindestens einem Funktionssystem sich im Liquor MS-typische Veränderungen (intrathekale IgG-Synthese) zeigen bzw. sich zwei oder mehr charakteristische Läsionen im initialen MRT finden (Chan et al., 2008). Das darüber hinaus erforderliche Kriterium der zeitlichen Dissemination ist erfüllt, wenn eine neue kontrastmittelaufnehmende Läsion mindestens drei Monate später in einer erneuten bildgebenden Untersuchung gefunden wird oder mindestens eine neue Läsion im MRT binnen 30 Tagen nach Auftreten der ersten klinischen Symptome zur Darstellung gelangt (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005).

1.7. Therapie

Bis heute gibt es noch keine kurative Therapie der Multiplen Sklerose. Die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (2008) stellt mangels dieser Therapie folgende Hauptziele der Behandlung in den Vordergrund: möglichst vollständige Rückbildung schubassoziierter Symptome, Vorbeugung weiterer Krankheitsschübe, Unterbindung oder Verlangsamung der Entwicklung dauerhafter neurologischer Defizite sowie bei bereits eingetretenen dauerhaften Ausfällen die Stabilisierung der funktionellen Einschränkungen auf ein möglichst niedriges Niveau (Chan et al., 2008).
Die medikamentöse Therapie der Multiplen Sklerose teilt sich derzeit in drei größere Bereiche (Schubtherapie, verlaufsmodifizierende Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose und die symptomatische Therapie), welche nachfolgend einzeln vorgestellt werden sollen.

1.7.1. Schubtherapie der Multiplen Sklerose

Wenn keine Kontraindikationen vorhanden sind (akuten Infektion, Kontraindikation für eine Kortikosteroidtherapie) besteht die Schubtherapie aus der intravenösen Gabe von Methylprednisolon in hoher Dosierung innerhalb von drei bis fünf Tagen nach Beginn der klinischen Symptomatik. Die Dosis beträgt 1 g an drei bis maximal fünf aufeinanderfolgenden Tagen unter Magenschutz und Thromboseprophylaxe (Milligan et al., 1987; Beck et al., 1992; Kaufmann et al., 2000; Grauer et al., 2000). Ähnlich wirksam ist die hochdosierte orale Gabe von 500 mg Methylprednisolon (Sellebjerg et al., 1998). Eine morgendliche Gabe entspricht eher dem physiologischen Hormonverlauf und führt seltener zu Schlafstörungen. Unter der Therapie ist eine engmaschige Überwachung von Blutzucker, Blutdruck und Elektrolyten erforderlich. Nach Therapieende ist in der regel kein Ausschleichen der intravenösen Therapie erforderlich. Bei der oralen Therapie kann das Ausschleichen über 14 Tage mit initial 80 mg per os Methylprednisolon erfolgen.

Zwei Wochen nach Abschluss der Schubtherapie erfolgt eine neuerliche quantitative neurologische Untersuchung. Bei ungenügender intravenöser Therapie erfolgt eine Wiederholung mit erhöhter Dosis (bis zu 5 x 2 g Methylprednisolon) (Olivieri et al., 1999; Bassetti et al., 2006) und dies neuerlich über drei bis fünf Tage.

Auch nach dieser etwaigen zweiten Therapie ist eine weitere quantitative neurologische Untersuchung erforderlich. Bei mangelnder Rückbildung der Symptomatik kann eine Plasmapherese in einem MS-Zentrum binnen eines Zeitraums von maximal 4-6 Wochen angezeigt erscheinen. Bei kontinuierlicher Verschlechterung der Symptomatik während der fünftägigen Kortikosteroid-Pulstherapie kann eine Plasmapherese-Behandlung auch anstelle einer Wiederholung der Pulstherapie erfolgen (Ruprecht et al., 2004; Keegan et al., 2005; Schilling et al., 2006).

Ist der Verlauf der Multiplen Sklerose schwer und progredient mit anhaltender subklinischer Krankheitsaktivität, so kann von dem beschriebenen Ablauf abgewichen werden und schon frühzeitig mit einer immunsuppressiven Behandlung mit Mitoxantron (s. Kapitel 1.7.2.) begonnen werden (Chan et al., 2008).

1.7.2. Verlaufsmodifizierende Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose

Für die Behandlung dieser MS-Form sind in Deutschland eine Reihe von Präparaten zugelassen, die zur Reduktion der Schubfrequenz und -schwere führen (Chan et al., 2008):

a) Interferon-β_{1b} (Betaferon® in einer Dosierung von 8 MIU jeden 2. Tag s.c.)
b) Interferon-β_{1a} (Avonex® in einer Dosierung von 30 mg einmal wöchentlich i.m.; Rebif® in einer Dosierung von 22 mg oder 44 mg dreimal pro Woche s.c.)
c) Glatirameracetat (Copaxone® in einer Dosierung von 20 mg täglich s.c.)
d) Natalizumab (Tysabri® in einer Dosierung von 300 mg i.v. alle vier Wochen)

d) Azathioprin (z.B. Imurek® mit einer Dosierung von 2-3 mg/kg Körpergewicht unter Anpassung der Dosis nach Blutbildkontrolle)
e) Mitoxantron (Ralenova® in einer Dosierung von 12 mg/m2 Körperoberfläche i.v. alle drei Monate bei Versagen der Basistherapie).

Die β-Interferone gehören zur Zytokinfamilie und wirken vermutlich über die Monozyten als entscheidende Zielzellen auf die für die Multiple Sklerose relevanten Immunreaktionen (Prinz et al., 2008). Alle Präparate vermindern signifikant die Schubfrequenz, die Schwere der Schübe und die kernspintomographisch nachweisbare Krankheitsaktivität (Goodin et al., 2002). Für Interferon-β_{1a}-Präparate konnte beim schubförmigen Verlauf auch eine Verringerung der Krankheitsprogression während der Behandlung demonstriert werden (Jacobs et al., 1996; Ebers et al., 1998). Für alle verwendeten ß-Interferone konnte gezeigt werden, dass deren Einsatz bereits nach dem ersten MS-verdächtigen Ereignis die Zeit bis zum Auftreten weiterer MS-Schübe sowie die Krankheitsprogression im MRT signifikant verzögern kann (Comi et al., 2001a; Jacobs et al., 2000; Kappos et al., 2006). Die Wirksamkeit der Präparate war besonders ausgeprägt bei Patienten mit initial hoher Läsionslast im MRT (Barkhof et a. 2003, Filippi et al., 2004; O'Connor, 2003). Als Nebenwirkungen der Behandlung mit Interferonen können grippeähnliche Nebenwirkungen (Fieber, Schüttelfrost, Myalgien) auftreten, die die Lebensqualität des Patienten wesentlich negativ beeinflussen können. Die Nebenwirkungen lassen sich durch eine abendliche Injektion des Interferon-Präparates unter prophylaktischer Gabe von 0,5-1 g Acetaminophen/Paracetamol oder 400-800 mg Ibuprofen 30 Minuten vor der Injektion kupieren (Bayas und Rickmann 2000). Wird das Interferonpräparat subkutan appliziert, können als unerwünschte Wirkungen Reizungen, Schmerzen, Rötung oder Verhärtungen an der Einstichstelle auftreten. Ein Therapieeffekt der Interferonbehandlung setzt in Abhängigkeit vom bisherigen Krankheitsverlauf frühestens nach sechs Monaten ein. Es kann aber auch bis zu einem Jahr verstreichen (Chan et al., 2008).

Bei Glatirameracetat (Copaxone®) handelt es sich um ein synthetisches Oligopeptid aus L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin. Seine immunmodulierende Wirkung beruht auf einer Beeinflussung der Antigenpräsentation, der T-Zelldifferenzierung und der Induktion antiinflammatorisch wirkender Th_2-polarisierter Glatirameracetat-reaktiver T-Zellen (Farina et al., 2005; Weber et al., 2007). Die Substanz führt zu einer signifikanten Reduktion der MS-Schübe swie der Reduktion entzündlicher Läsionen im MRT (Comi et al., 2001b). Es kann deshalb als Basistherapie der ersten Wahl bei der schubförmigen Multiplen Sklerose angesehen werden (Wolinsky, 2004). Glatirameracetat ist auch bei täglicher Injektion gut verträglich, kann aber zu lokalen Reizungen an der Injektionsstelle und subkutanen Indurationen führen. Selten kommt es zu einer systemischen Postinjektionsreaktion mit Luftnot und Herzrasen, die innerhalb von 30 Sekunden bis 30 Minuten spontan sistiert. Lymphknotenschwellungen und Lipoatrophien wurden ebenfalls beschrieben (Wolinsky et al., 2004).

Bei Natalizumab handelt es sich um einen humanisierten Antikörper. Dieser blockiert das α4-Integrin, eine von zwei Komponenten des VLA4-Moleküls auf der Leukozytenoberfläche. Dadurch reduziert sich die Transmigration von potentiellen Entzündungszellen aus dem Gefäßsystem in das Zielgewebe erheblich (Yednock et al., 1992; von Adrian und Engelhardt, 2003). In der AFFIRM-(Polman et al. 2006) und in der SENTINEL-Studie (Rudick et al., 2006) konnte über eine zweijährige Beobachtungszeitspanne eine 68%ige Reduktion der Schubaktivität und eine 50%ige Reduktion der EDSS-Progression sowie eine komplette Stabilität verschiedener klinischer und kernspintomographischer Verlaufsparameter in einem Drittel der Studienteilnehmer festgestellt werden. Allerdings besteht die selten Gefahr der Entwicklung einer progressiven multikofalen Leukenzephalopathie, weshalb die Anwendung von Natalizumab nur als Monotherapie in Kombination mit einem aufwendigen Pharmako-Vigilanzprogramm zulässig ist (Gold et al., 2007). Davon ausgenommen sind ist der Einsatz von Kortikosteroid-Pulstherapien zur Behandlung von MS-Schüben (Chan et al., 2008). Natalizumab ist derzeit letztlich nur bei Patienten mit schub-förmigem Verlauf und hoher Krankheitsaktivität anzuwenden, wobei bei

Frauen eine strikte Einhaltung der Antikonzeption und bei Stillenden ein Verzicht auf Stillen empfohlen wird (Chan et al., 2008).

Azathioprin hat seit Einführung neuer oraler Therapeutika heute nur noch als Reservepräparat der Basistherapie der schubförmigen Multiplen Sklerose seinen Stellenwert. Es findet vor allem Anwendung bei Koinzidenz der Multiplen Sklerose mit anderen Autoimmunerkrankungen oder bei Unverträglichkeit von Interferon-β bzw. Ablehnung von Injektionen durch den Patienten. Bis zum Wirkungseintritt von Azathioprin können drei bis sechs Monate vergehen. Während der Therapie müssen regelmäßig Blutbild-kontrollen in zwei- bis vierwöchigem Abstand erfolgen. Die Lymphozytenzahl sollte unter der Azathioprinbehandlung auf Werte um 600-1000/ml absinken. Es können jedoch gastrointestinale Nebenwirkungen und stärkere Blutbildveränderungen auftreten, die eine Dosisanpassung oder sogar eine Therapiepause erfordern (Chan et al., 2008)

Die Therapie der Multiplen Sklerose mit dem Antrazendionderivat Mitoxantron beruht auf der Interaktion des Arzneimittels mit proliferierenden Lymphozyten. Vor allem die Apoptose von B-Zellen induziert und Makrophagen deaktiviert (Chan, 2005). Durch die Applikation kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Schubzahl und auch zu einer Verminderung der Krankheitsprogression sowie von MRT-Verlaufsparametern (Hartung et al., 2002; Edan et al., 2004).
Mitoxantron ist seit dem Jahr 2002 zur Behandlung der progressiv-schubförmigen oder sekundär-progredienten Multiplen Sklerose (EDSS 3-6) bei Versagen oder Unverträglichkeit einer Vortherapie mit Immunmodulatoren zugelassen. Vor der ersten Therapie muss eine ausführliche Aufklärung der Patienten über Risiken und Nebenwirkungen erfolgen. Häufig kommt es unter der Behandlung zur passageren Amenorrhoe, aber auch zu persistierender Amenorrhoe. Männliche Patienten müssen vor Therapiebeginn über die Möglichkeit einer Samenspende aufgeklärt werden. Im EKG und in der transthorakalen Echokardiographie muss die linksventrikuläre Ejektionsfraktion bestimmt werden. Dies deshalb, weil dosisabhängig ein Risiko für das Auftreten einer

Kardiomyopathie besteht. Liegt die kumulative Grenzdosis unter 140 mg/m^2 Körperoberfläche, beträgt das Kardiomyopathierisiko 0,2% (Ghalie et al., 2002a). Bei Frauen im gebährfähigen Alter muss ein negativer Schwangerschaftstest vorliegen und eine sichere Kontrazeption bestehen (Chan et al., 2008). Es gibt Hinweise, dass die gleichzeitige Durchführung einer kurzen Steroid-Pulstherapie (3 x 1 g Methylprednisolon i.v.) sinnvoll sein kann (Zingler et al., 2005). Akute Nebenwirkungen der Mitoxantronbehandlung umfassen Übelkeit und Erbrechen, kurzzeitige Diarrhoe und Knochenmarksuppression. Eine akute Leukämie stellt eine potentielle Langzeitfolge der Behandlung dar (Ghalie et al., 2002b).

1.7.3. Symptomatische Therapien der Multiplen Sklerose

Die hauptsächlichen Ziele der symptomatischen Therapie der Multiplen Sklerose sind die Beseitigung und Reduktion von Krankheitssymptomen. Häufige Symptome wie Spastik, Ataxie, Blasenstörung oder Schmerzen/Dysästhesien können stationäre, medikamentöse und/oder physiotherapeutische Behandlung notwendig machen. Eine Aufstellung der Maßnahmen zeigt die Tabelle 3.

Tabelle 3: Behandlungsmöglichkeiten im Rahmen der symptomatischen Therapie der Multiplen Sklerose (nach Chan et al., 2008)		
Symptom	Behandlung	Kommentar
Spastik	intensive Physiotherapie zur Tonusnormalisierung	ausreichende Intensität und Häufigkeit sind für den Erfolg notwendig
	Baclofen p.o. (5-120 mg/dl) Tizanidin p.o. (2-24 mg/d) Gabapentin (300-2400 mg/d)	individuelle Einzeldosierung mit dem Ziel der Funktionsgewinns (Gabapentin ist Mittel der 2. Wahl)
	Botulinum-Toxin	bei ausgeprägter Adduktorenspastik
	kontinuierliche intrathekale Baclofenapplikation via Pumpe	bei schwerster, sonst nicht zu beeinflussender Spastik (v.a. untere Extremität)
	intrathekale Gabe von Triamcolon-Acetonid	nur in Kliniken mit besonderer Erfahrung im Umgang mit der Therapie sinnvoll
Fatigue	Kühlungsmaßnahmen, Energieeffizienztrainig	aerobe Trainingsmaßnahmen
	Amantadin p.o. (100-200 mg/d) Modafinil p.o. (200-400 mg/d) 4-Aminopyridin (10-30 mg/d) Fampridine (20-30 mg/d)	Modafinil und Fampridine sind off-label. Keine Abendmedikation. Aminopyridin hat enge therapeutische Breite.
Schmerzen	Amitriptylin retard (25-150 mg/d)	besonders bei chronischen Par- und Dysästhesien
	Carbamazepin (1200-2400 mg/d)	bei Trigeminusneuralgie und andere schmerzhaften Paroxysmen
	Gabapentin (800-2400 mg/d)	bei schmerzhaften Paroxysmen
Blasen-funktions-störungen	Trospiumchlorid (30-45 mg/d) Tolterodin (2-4 mg/d) Oxybutynin (5-15 mg/d)	bei imparativem Harndrang nach Ausschluss eines Harnwegsinfektes und Restharn < 120 ml
	sterile Einmalkatheterisierung	bei anhaltendem Restharn > 150 ml
	Methionin p.o. (1,5-3 mg/d)	Ansäuerung des Urins zur Harnwegsprophylaxe
	Desmopressin 20 mg nasal	bei therapieresistenter Nykturie
	suprabusicher Urinkatheter	Ultima ratio bei Versagen anderer Verfahren
Sexual-funktions-störungen	Sildenafil (25-100 mg/d) Vardenafil (5-20 mg/d) Tadalafil (2,5-5 mg/d)	vor Anwendung ist Ausschluss einer KHK notwendig
	Tibolin (2,5 mg/d)	bei Libidoverlust oder Dyspareunie
Intentions-tremor	Propranolol (80-320 mg/d) Primidon (62,5-250 mg/d) Carbamazepin (400-800 mg/d) Isoniazid (600-1200 mg/d)	Pharmakotherapie ist durch Nebenwirkungen begrenzt. Bei unzureichendem Effekt ist Medikamentekombination sinnvoll. Begleitend Physio-/Ergotherapie
kognitive Störungen	Donepezil (10 mg/d)	wirksam bei MS-assoziierten Gedächtnisstörungen
	neuropsychologische Therapie	auf individuelle Störungsmuster abgestimmtes Verfahren, interdisziplinäre Betreuung erforderlich
	Interferon-β	Besserung der kognitiven Leistung erzielbar
Depression	Fluoxetin (20-60 mg/d) Sertralin (50-200 mg/d) Imipramin (50-150 mg/d)	Beachtung begleitender Symptome (Blasenstörung, Fatigue und Dysästhesien) und begleitende Psychotherapie nötig

Als Indikationen für eine stationäre Rehabilitationsmaßnahme im Rahmen der symptomatischen Therapie der Multiplen Sklerose sind nach Chan et al. (2008):

a) eine ungenügende Erholung des Patienten von einem akuten MS-Schub trotz hochdosierter Steroidtherapie mit persistierender und funktionell bedeutsamer Beeinträchtigung und Handicap.
b) drohender Verlust wichtiger Funktionen und/oder der Selbständigkeit des Patienten bei erheblicher Zunahme körperlicher Funktionsstörungen oder psychischer bzw. psychosomatischer Belastung trotz ambulanter Therapie.
c) Patienten mit mehreren gleichzeitig vorhandenen funktionellen Defiziten
d) schwerstbehinderte Patienten mit klar definierten Therapiezielen und Symptomen, die ein interdisziplinäres Vorgehen erforderlich machen

1.8. Azathioprin und sein Abbau im Thiopurinstoffwechselsystem

Azathioprin, 6-Mercaptopurin (Analogon des Hypoxanthins) und 6-Thioguanin (Analogon des Guanins) gehören zur Substanzklasse der Purinanaloga. Azathioprin wurde von den späteren Nobelpreisträgern George Hitchings (1905-1998) und Gertrude Elion (1918-1999) als Derivat von 6-Mercaptopurin entwickelt. Azathioprin [6-(1-Methyl-4-nitro-5-imidazolyl-)Mercaptopurin] ist das Nitroimidazolderivat von 6-Mercaptopurin (Elion 1989). Durch die Umwandlung von Azathioprin in 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin und deren weitere pharmakologische Wirkung wird letztlich die GMP- und AMP-Synthese sowie die de-novo-Purinbiosynthese gehemmt. Thio-IMP bzw. Thio-GMP werden zusätzlich als falsche Nukleotide in die DNA eingebaut. Damit eignen sich Purinanaloga für die Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie akuter lymphatischer Leukämien im Kindes- und Erwachsenenalter, akute nicht-lymphpatische Leukämien des Erwachsenenalters, akuter myeloischer Leukämien des Kindesalters, Non-Hodgkin-Lymphomen, Morbus Crohn, ulzerative Colitis, Autoimmunhepatitis, rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus Erythematosus, Psoriasis, atopisches Ekzem des Kindesalters und (allerdings aufgrund besser wirksamer Arzneimittel heutzutage nur noch

eingeschränkt) für die immunsuppressive Therapie bei Organtransplantationen. Bei Multipler Sklerose wird Azathioprin ebenfalls eingesetzt (Sahasranaman et al., 2008).

Nach oraler Gabe wird Azathioprin im Darm zu 88% resorbiert, während 12% unverändert binnen 48 Stunden mit dem Stuhl verloren gehen. Nach der Resorption von Azathioprin erfolgt dessen Ausscheidung primär biliär, lediglich 1-2% (maximal 10%) werden renal eliminiert (Berlit und Gretz, 1993). Pharmakologisch wirksam wird Azathioprin erst nach seiner Umsetzung zu 6-Mercaptopurin. Die dafür notwendige nicht-enzymatische Spaltung des Azathioprin erfolgt *in-vitro* als auch *in-vivo* an der Thioätherbrücke zwischen dem Purin- und dem Imidazolring (Chalmers et al., 1967; DeMiranda et al., 1973), wobei Gluthathion und nukleophile Amino- oder Sulfhydrylgruppen von Proteinen als Co-Faktoren dienen (DeMiranda et al., 1973). Beim Menschen findet diese nicht-enzymatische Umwandlung in den roten Blutkörperchen statt, bevor der Abbau von Azathioprin in der Leber beginnt. Etwa 90% des resorbierten Azathioprins werden dieser nicht-enzymatischen Umwandlung zu 6-Mercaptopurin unterzogen (Sahasranaman et al., 2008). Der restliche Anteil wird vermutlich auch durch enzymatische Aktivität (z.B. Human Gluthation Transferase, enzymatische Thiolyse) in 6-Mercaptopurin umgewandelt (Eklund et al., 2006; Kaplowitz, 1976; Watanabe et al., 1978).

Die Bioverfügbarkeit des resultierenden 6-Mercaptopurins beträgt dann im Mittel 47% bzw. liegt zwischen 27-83% (van Os EC et al., 1996). Üblicherweise wird deshalb ein Konversionsfaktor von 2 (1 mg 6-Mercaptopurin entspricht 2 mg oral appliziertem Azathioprin) angenommen (Shahasranaman et al., 2008).

6-Mercaptopurin ist in der Lage, die Zellmembran schnell zu passieren, wobei es intrazellulär zu 6-Methylmercaptopurin und über Zwischenschritte zu 6-Thioguaninnukleotide (6-Thioguanosin-5'-Mono-, Di- bzw. Triphosphat) metabolisiert wird (Anstey und Lear, 1998).Die Ausscheidung dieser zum Teil aktiven Metaboliten erfolgt überwiegend renal. Azathioprin hat eine Serumhalbwertszeit von fünf Stunden. Binnen 24 Stunden nach Applikation von Azathioprin finden sich nach enteraler Resorption nach 24 Stunden 20-50% sowie nach 48 Stunden 70% der Metaboliten im Urin. Die Metabolite mit Purinring werden

schneller ausgeschieden als jene mit Imidazolring. Bis zum Eintritt eines Steady-state im Rahmen einer Azathioprintherapie kann es Wochen bis Monate dauern, was den verzögerten Wirkeintritt von Azathioprin erklärt (Leuscher, 2006).

Nach dem bisher akzeptierten Modell des Abbaus aus Azathioprin freigesetzten 6-Mercaptopurins stehen drei unterschiedliche und miteinander konkurrierende Stoffwechselwege offen. Es handelt sich um den primär metabolischen Abbau, den sekundären metabolischen Abbau sowie einen anabolen Stoffwechselweg. Zusätzlich kann Azathioprin durch die Aldehyd-Oxidase enzymatisch oxidiert werden zu 8-Hydroxy-Azathioprin, das dann nicht-enzymatisch durch Gluthation zu 8-Hydroxy-6-Mercaptopurin umgewandelt wird (van Scoik et al., 1985) und wiederum zu Thioharnsäure abgebaut werden kann (s. Abb. 3).

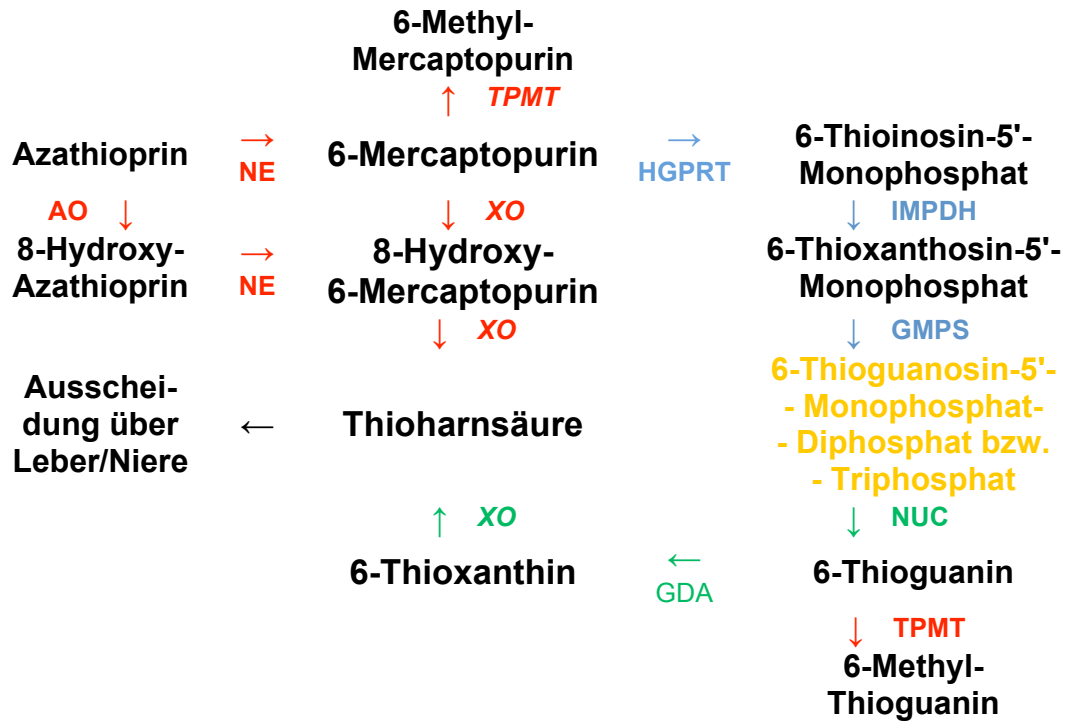

Abbildung 3: Schematische Abbildung des primären metabolischen Abbaus (rot), des sekundären metabolischen Abbaus (grün) und des anabolen Abbaus (blau) von Azathioprin. Vom orange markierten 6-Thioxanthosin-Monophosphat aus erfolgt der Einbau in die DNA (Kurowski und Iven 1991; Dubinsky et al. 2003). AO = Aldehydoxidase; XO = Xanthinodixase; NE = nichtenzymatisch; SH-abhängige Umwandlung; HGPRT = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase; GMPS = Guanin Monophosphat Synthetase; NUC = Nucleotidase; GDA = Guanin-Deaminase

Der anabole Stoffwechselweg des Azathioprin-Abbaus beginnt mit der Phosphoribosylierung von 6-Mercaptopurin zu 6-Thioinosin-Monophosphat. Hier wird in Gegenwart von Magnesium über die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) die Phosphoribosyleinheit von α-5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) auf 6-Mercaptopurin übertragen. Dieser Schritt wird über die Verfügbarkeit von PRPP reguliert.

Im „normalen“ Purinstoffwechsel teilen sich an diesem Punkt (Inosin-Monophosphat) die Stoffwechselwege für Guanin und Adenin auf, wobei ATP für den Guanin-Stoffwechselweg als Phosphatdonor dient. Umgekehrt dient GTP als Phosphatdonor für den Adenin-Stoffwechselweg. Die reziproke Substratbeziehung dient normalerweise dem Gleichgewicht in der Produktion von Adenin- und Guaninnukleotiden. AMP bzw. GMP regulieren über einen Feedback-Mechanismus die Purin de-novo-Synthese an den von der Inosinsäure ausgehenden Reaktionen. Es ist jedoch nicht geklärt, ob Thioguanosin-Monophosphat in gleicher Weise in den Thiopurinstoffwechsel eingreift.

Die Konversion von 6-Thioinosin-Monophosphat in 6-Thioxanthosin-Monophosphat wird von der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) katalysiert. Für dieses Enzym wurden zwei Isoformen charakterisiert. 6-Thioxanthosin-Monophosphat wird durch die Guanosin-Monophosphat-Synthetase (GMPS) aminiert. Es entsteht 6-Thioguanosin-Monophosphat. Die Umwandlung von 6-Thioguanosin-Monophosphat in die entsprechenden Di- und Triphosphate wird über Kinasen katalysiert, wobei die Monophosphat-Kinase die größte Spezifität besitzt. Thioguanosin-Triphosphat wird in die RNA eingebaut. Die Reduktion von 6-Thioguanosin-Disphosphat in 6-Thio-desoxyguanosin-Diphophat wird durch das Enzym Ribonukleotid-Reduktase begünstigt. 6-Thiodesoxyguanosin-Diphosphat wird phosphoryliert zu 6-Thiodesoxyguanosin-Triphosphat und in die DNA eingebaut. Dieser Einbau der Thiopurine in die DNA und RNA konnte an Zellkulturen bestätigt werden (Maybaum und Mandel, 1983; Tidd und Paterson, 1974).

Der katabole Stoffwechselweg des Azathioprinabbaus beginnt mit dem 6-Mercaptopurin und endet in zwei Schritten mit der Oxidation über die Xanthinodixase bei der 6-Thioharnsäure entsteht. Diese Reaktion findet beim Menschen hauptsächlich im Magen-Darm-Trakt und in der Leber statt. In der normalen Bevölkerung sind die Aktivitätsschwankungen der Xanthinoxidase gering und ein genetisch bedingter vollständiger Enzymmangel ist sehr selten (Simmonds, 1987). Allerdings hemmt Allopurinol in erheblichem Umfang die Aktivität der Xanthinoxidase, so dass bei gleichzeitiger Einnahme von Azathioprin und Allopurinol die Azathioprindosis um 25-33% reduziert werden muss (Derijks et al., 2006).

Ein weiterer, dritter Abbauweg des Azathioprins, der ebenfalls zum katabolen Stoffwechselweg zu zählen ist und mit 6-Mercaptopurin beginnt, ist dessen Methylierung an der Sulfhydryl-Gruppe durch das Enzym Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT). Die TPMT wurde 1963 in der Leber- und Nierengewebe von Mäusen entdeckt (Remy, 1963), 1978 erstmalig beim Menschen beschrieben (Weinshilboum et al., 1978) und 1983 biochemisch charakterisiert (Woodsen und Weinshilboum, 1983). Als zytosolisches Enzym ist die TPMT in jeder Säugerzelle vorhanden. Insbesondere ist sie in Erythrozyten, Leber- und Nierengewebe zu finden (Krynetski et al.;1995, Szumlandski et al., 1992; van Loon und Weinshilboum, 1982). 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin werden wegen ihrer Sulfhydrylgruppen bevorzugt durch die TPMT katalysiert (Deininger et al., 1994; Woodsen und Weinshilboum, 1983). Wahrscheinlich ist, dass sämtliche Metabolite mit freier Thiolgruppe durch die TPMT methyliert werden. Als Methyldonor fungiert das S-Adenosyl-Methionin (SAM). Ein endogenes physiologisches Substrat der TPMT ist bis heute jedoch noch nicht gefunden worde, so dass seine physiologische Rolle unbekannt ist (Ganiere-Monteil et al., 2004).
Die TPMT ist auf dem Chromosom 6 kodiert (Szumlandski et al., 1992). Das Gen ist 34 Kilobasen lang und weist einen Ableserahmen von 735 Nukleotiden mit 10 Exons und 9 Introns auf. Das Protein wird aus 245 Aminosäuren gebildet und hat eine Molmasse von 28,2 Kilodalton (Honchel et al., 1993). Auf

Chromosom 18 ist ein Pseudogen lokalisiert worden, das eine 96% Übereinstimmung mit der Nukleotidsequenz der DNA auf Chromosom 6 zeigt (Lee et al., 1995).

Es sind inzwischen neun verschiedene Allele des TPMT Gens bekannt. Ein Allel kodiert den Wildtyp ($TPMT^H$) und weist eine hohe Enzymaktivität aus. Die übrigen acht kodieren für eine niedrige Enzymaktivität ($TPMT^L$). Sie sind in ihrer Sequenz um eine, zwei oder drei Aminosäuren verändert (Krynetski et al., 1995; Krynetski et al., 1996; Otternes et al., 1997; Park-Hah et al., 1996; Tai et al., 1997; Yates et al., 1997). Es sind zwei Isoenzyme in Niere und Leber mit einem Anteil an der Enzymaktivität von 15% bekannt (Szumlanski et al., 1992; van Loon und Weinshilboum, 1982).

Die Enzymaktivität der TPMT wird durch einen genetischen Polymorphismus bestimmt (Vouchetich et al., 1995; Weinshilboum und Sladeck et al., 1980). So haben etwa 89% der kaukasischen Bevölkerung eine hohe, 11% eine mittlere und 0,3% eine sehr geringe oder sogar gar keine TPMT-Aktivität (Kröpelin et al., 1998). Die hohe Aktivität wird aus dem homozygoten Allel $TPMT^H$ kodiert, die mittlere Aktivität besteht aus der heterozygoten Form $TPMT^H$ und $TPMT^L$ und die nicht messbare Aktivität besteht aus der homozygoten Form $TPMT^L$. Diese trimodale Verteilung konnte weltweit nachgewiesen werden (Chocair et al., 1993; Ferroni et al., 1996; Jacqz-Aigrain et al., 1994; Jang et al., 1996; Jones et al., 1993; Lee und Kalow, 1993; Lennard und Singleton, 1994; McLeod et al., 1995; Park-Hah et al., 1996; Schütz et al., 1996; Tinel et al., 1991). In einigen ethnischen Populationen wurden unterschiedliche TPMT-Aktivitäten gemessen. Farbige Amerikaner haben eine um 17% niedrigere TPMT-Aktivität, während ein norwegisches Saami Kollektiv eine um 29% höhere Enzymaktivität aufwies (Klemetsdal et al., 1993; McLeod et al., 1994).

Der genetische Polymorphismus ist für die Dosierung von Azathioprin von großer Bedeutung. Patienten mit fehlender TPMT-Aktivität reagierten mit starken myelotoxischen Reaktionen auf eine Azathioprin- bzw. 6-Mercaptopurin-Therapie. Gleichzeitig fand man exzessiv hohe 6-Thioguanin Konzentrationen in Erythrozyten (Anstey et al., 1992; Chocair et al., 1993; Escousse et al., 1995; Gummert et al., 1995; Kerstens et al., 1995; Leipold et al., 1997;

Lennard et al., 1993; Lennard und Lilleymann, 1996; Lennard et al., 1989; Schütz et al., 1996; Tidd und Patterson, 1974). Analog dazu wurden bei Leukämiepatienten mit hoher TPMT-Aktivität sehr niedrige 6-Thioguanin Konzentrationen in Erythrozyten gefunden (Evans et al., 1991). Deswegen ist es notwendig, vor Therapiebeginn mit Azathioprin die TPMT-Aktivität zu messen, um derartige Reaktionen zu vermeiden. Patienten mit fehlender Enzymaktivität benötigen eine Dosisreduktion auf 5 bis 10 Prozent oder eine Alternativmedikation (Krynetski et al., 1996). Patienten mit einer sehr hohen Enzymaktivität müssten mit einer höheren Azathioprindosis therapiert werden. Die Messung der TPMT-Aktivität ist an einigen Zentren zur Routine geworden.
Bei einigen Individuen wurden Änderungen der TPMT-Aktivität festgestellt. So sind bei Kindern mit akuter Lymphoblastischer Leukämie unter 6-Mercaptopurin und bei nierentransplantierten Patienten unter Azathioprin Anstiege der TPMT-Aktivität beobachtet worden (Chocair et al., 1991; Chocair et al., 1993; Lennard et al., 1990; McLeod HL et al., 1995). Eine Hemmung der TPMT-Aktivität ist durch bestimmt Pharmaka wie Acetylsalicylsäure, Sulphasalazine, Thiazid- oder Schleifendiuretika möglich (Lewis et al., 1997; Lysaa et al., 1996; Szumlanski et al. 1992).

1.8.1. Renale Elimination der Thiopurine

Die Stoffwechselprodukte der Thiopurine entstehen vorwiegend durch Oxidation und Methylierung. 6-Mercaptopurin wird zu Thioharnsäure umgewandelt und über die Niere ausgeschieden. Beide sind im Urin messbar. Weiterhin lassen sich im Urin anorganische Sulfate nachweisen, die aus der Thiol-Gruppe von 6-Mercaptopurin stammen.
6-Methylsulfinyl-8-Hydroxypurin und andere methylierte Stoffwechselendprodukte nach oraler Applikation von 6-Mercaptopurin lassen sich ebenfalls im Urin nachweisen. 6-Methyl-Mercaptopurin wurde im Urin von Ratten gemessen, nicht jedoch im Urin von Mäusen oder Menschen.

Bei oraler Gabe von 6-Thioguanin findet man ebenfalls Thioharnsäure und Sulfate im Urin. Die methylierten Stoffwechselendprodukte sind hier als 6-Methyl-Thioguanin nachzuweisen. 6-Thioguanin ist nur nach i.v. Applikation im Urin messbar, nicht jedoch nach oraler Gabe.
Die Xanthinoxidase-Hemmer Allopurinol verhindert die Oxidation von Thiopurinen *in vivo* und *in vitro*, so dass die therapeutisch genutzte Wirkung, aber auch die Toxizität von Thiopurinen um ein Vielfaches ansteigt (Elion et al., 1962).

1.8.2. Wirkmechanismus von Azathioprin

Der Wirkmechanismus von Azathioprin wird vielfältig diskutiert. Eine direkte immunsuppressive Wirkung *in vivo* konnte bisher nicht bewiesen werden. *In vitro* Studien an Lymphozyten konnten (Bach et al., 1969) erstmals eine immunsuppressive Wirkung nachweisen. Die heute allgemein akzeptierte Theorie zum Wirkmechanismus von Azathioprin ist, dass es nach oraler Aufnahme zunächst zu im Verdauungstrakt zu etwa 90% resorbiert wird, in der Leber gespalten wird und dann die aktive Wirkform (6-Mercaptopurin-ribonukleoid) freigesetzt wird. Das freigesetzte 6-Mercaptourin hemmt die Purinstoffwechselsynthese und reduziert die DNA- und RNA-Synthese, die eben auch *in vitro* in Lymphzyten stattfindet. In vitro Untersuchungen zeigten, dass 6-Thioinsosin-Monophoshat und besonders 6-Methyl-Thioinosin-Monophosphat eine starke Hemmung der Proliferation von T-Lymphozyten verursachen (DeAbreu, 1994).

1.9. Fragestellung

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems, die sowohl schubartig als auch chronisch-progredient verlaufen kann. Bisher ist es schwierig, die Erkrankung hinsichtlich ihrer Verände-

rungen und des Schweregrades der durch sie erzeugten Behinderung objektiv zu erfassen. Bisher werden für diese Bewertung Scores oder Skalen-Systeme (z.B. EDSS) eingesetzt. Der EDSS-Wert zeigt jedoch eine geringe Reabilität, berücksichtigt überwiegend die Funktion der unteren Extremität und reagiert schwerfällig auf Veränderungen des Behinderungsgrades der Patienten über den Zeitverlauf der Erkrankung. Als Folge dieses Problems wurde im Jahre 1994 der MSFC-Test entwickelt, der eine hohe Reabilität aufweist und der sowohl die obere Extremität, die untere Extremität als auch die kognitiven Funktionen überprüft.

In der vorliegenden Studie wird versucht, einen Zusammenhang zwischen der klinischen MS-Symptomatik (validiert anhand des EDSS und MSFC), des Verlaufs der MS und vier Laborparametern herzustellen, die den Abbau von Azathioprin im Thiopurinstoffwechsel beschreiben. Es stellen sich folgende Fragen:

1) Kommt es zu Veränderungen des MSFC- und des EDSS-Wertes bei MS-Patienten zwischen den zwei Zeitpunkten einer Azathioprintherapie?
2) Hat die Verlaufsform der MS sowie die bisherige Dauer der Erkrankung bis zum Behandlungsbeginn einen Einfluss auf den MSFC- und den EDSS-Wert?
3) Besteht ein Zusammenhang zwischen der Thiopurin-S-Methyltransferase-Aktivität und der Konzentration der Metabolite 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin?
4) Besteht ein Zusammenhang zwischen den geprüften vier Laborparametern und den Scorewerten des EDSS bzw. des MSFC?

2. Patienten und Methoden

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine prospektive Studie an einem Untersuchungskollektiv von Patienten mit Multipler Sklerose, die zu zwei Zeitpunkten betrachtet werden.

2.1. Patientenkollektiv, Einschlusskriterien

In die Untersuchungsgruppe wurden 25 an MS erkrankte Patienten (20 Frauen, fünf Männer, Durchschnittsalter 49 Jahre) eingeschlossen. Die Patienten wurden unter folgenden Bedingungen in die Studie aufgenommen:

- Alter bei Studieneinschluss über 18 Jahre
- bisheriger Beobachtungszeitraum mindestens sechs Monate
- bisherige Azathioprin-Behandlungsdauer mindestens sechs Monate, die Einnahme einer definierten Mindestdosis war nicht erforderlich
- Vorhandensein einer Klassifikation der MS (schubförmig remittierend, sekundär chronisch progredient, primär chronisch progredient)
- Vorliegen einer Einverständniserklärung für die körperliche Untersuchung sowie die notwendigen Blutentnahmen

2.2. Untersuchungsinstrumente

2.2.1. Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC)

Der MSFC besteht aus einer Kombination von drei verschiedenen Tests, in denen quantitativ die Funktion der oberen (Nine Hole Peg Test) und der unteren Extremität (timed 25-foot walk) sowie der Aufmerksamkeit/Kognition (paced auditory serial addition test) untersucht werden. Die entsprechenden Untersuchungen wurden bei den Patienten nur Nachmittags vorgenommen.
Der *Nine Hole Peg Test (9-HPT)* dient der Quantifizierung einer möglichen Funktionsstörung der oberen Extremität (Goodkin et al., 1988) - siehe Abb. 4.

Abbildung 4: Darstellung der Vorgehensweise beim Nine Hole Peg Test (9-HPT). Der/die Proband/-in setzt neun Stifte in möglichst kurzer Zeit in entsprechende Löcher eines Steckbrettes (Quelle: http://www.abledata.com/product_image/images/95A0293.jpg

In einem ruhigen Raum muss der Patient neun Stifte einzeln in möglichst kurzer Zeit in die Bohrungen eines dafür vorgesehenen Steckbrettes einbringen und direkt im Anschluss wieder entfernen. Es wird die Zeit gemessen, die der Patient für diese Aufgabe benötigt. Der Test wird zweimal durchgeführt und

zwar jeweils für die dominante Hand als auch für die nicht-dominante Hand. Als Ergebnis des Tests wird die durchschnittliche Zeit aller vier Einzelmessungen verwendet.

Im Rahmen des *timed 25 foot walk Tests (T25W*) wird der Patient aufgefordert, eine festgelegte Distanz (7,6 Meter) möglichst zügig hin- und herzugehen. Die für den Test notwendigen Materialien zeigt die Abbildung 5.

Abbildung 5: Materialien zur Durchführung des timed 25 foot walk Tests (T25W). In einem Mäppchen sind enthalten: eine Handlungsanweisung, ein Messprotokoll einschließlich Stift, ein Messband (blau) zum Ausmessen der Gehdistanz, Klebeband (gelb) zur Markierung von Start und Ende der Gehstrecke sowie eine Stoppuhr zur Messung der benötigten Laufzeit des Patienten. (Quelle: http://movingmedicine.org/img/25-ft-walk-measurement-kit.jpg)

Auf der festgelegten Strecke dürfen keine Hindernisse stehen (z.B. Betten, Geräte) und es darf kein Durchgangsverkehr herrschen. Bei allen Untersuchungen des jeweiligen Patienten wird immer die gleiche Strecke verwendet. Der Patient muss die Distanz zweimal bewältigen und der Testwert besteht aus dem Mittelwert beider Messungen (Fischer et al., 2001).

Der *Paces Auditory Serial Addition Test (PASAT)* prüft etwaige Einschränkungen der kognitiven Funktion (Fischer et al., 2001). Dem Patienten werden in einem ruhigen Raum von einem Tonbandgerät Zahlen im Abstand von drei Sekunden vorgespielt. Seine Aufgabe besteht darin, zwei nacheinander genannte Zahlen zu addieren, das Ergebnis laut zu nennen und sich die letzte der beiden vorgespielten Zahlen zu merken. Nun wird wiederum eine Zahl vorgespielt, die der Patient zur gemerkten Zahl addieren, das Ergebnis laut nennen und sich die neue letzte Zahl merken muss. Dieser Test wird fortlaufend durchgeführt, bis 61 Zahlen abgespielt sind. Die Anzahl der richtig genannten Antworten (maximal 60) stellen das PASAT-Ergebnis dar. Vor der Durchführung des PASAT wird dem Patienten in drei kurzen Übungen mit einer Länge von 10 Zahlen das System des Tests erläutert.

Da die Messeinheiten des 9-HPT und des T25W Sekunden sind, während das Ergebnis des PASAT in Punkten ausgedrückt wird, und die Bewertung der drei Untertests verschieden ist (hohe Werte im 9-HPT und T25W zeigen eine Beeinträchtigung und damit einen zunehmend schlechten Befund an, hohe PASAT-Werte hingegen eine geringe Beeinträchtigung und einen zunehmend guten Befund), muss für die Ermittlung des MSFC-Resultates ein spezieller Wert (sog. Z-Score) berechnet werden.

Zunächst wird ein Z-Score für jeden der drei Teiltests ermittelt ($Z_{9\text{-HPT}}$, Z_{T25W} und Z_{PASAT}), wobei jeweils folgende Formel angewendet wird:

Z-Score des 9-HPT

zunächst wird ein Durchschnittswert für die vier Messdurchläufe des Test pro Patient gebildet. Von diesem Mittelwert wird der Durchschnittswert der Referenzpopulation (mean= 0,0439) abgezogen und das Resultat durch die Standardabweichung der Referenzpopulation (SD = 0,0101) geteilt.

$$Z_{9\text{-HTP}} = (\text{Durchschnittsscore}_{\text{Patient}} - \text{Mean}_{(0,0439)})/\text{SD}_{(0,0101)}$$

Z-Score des T25W

es wird der Durchschnittswert für die benötigte Zeit zur Absolvierung beider Gehstrecken pro Patient gebildet. Von diesem Mittelwert wird der Durchschnittswert der Referenzpopulation (mean= 9,5353) abgezogen und das Resultat durch die Standardabweichung der Referenzpopulation (SD = 11,4058) geteilt:

$$Z_{T25W} = (\text{Durchschnittsscore}_{Patient} - \text{Mean}_{(0,5353)})/\text{SD}_{(11,4058)}$$

Z-Score des Pasat

vom Punktewert des Pasat-Test wird der Durchschnittswert der Referenzpopulation (mean= 45,0311) abgezogen und das Resultat durch die Standardabweichung der Referenzpopulation (SD = 12,0771) geteilt:

$$Z_{T25W} = (\text{Durchschnittsscore}_{Patient} - \text{Mean}_{(45,0311)})/\text{SD}_{(12,0771)}$$

Die drei Z-Scores haben folgende Bedeutung: ein negatives bzw. positives Vorzeichen des Z-Scores für den Z_{T25W} bedeutet ein besseres bzw. schlechteres Abschneiden der Patienten im Vergleich zur Referenzpopulation von Fischer et al. (1999). Ein negatives bzw. positives negatives Vorzeichen beim $Z_{9\text{-}HPT}$ und beim Z_{PASAT} hingegen bedeutet ein schlechteres bzw. besseres Abschneiden der Patienten im Vergleich zur Referenzpopulation. Da es sich beim Z-Score um ein relatives Maß handelt, lässt er lediglich eine Aussage darüber zu, um wieviele Standardabweichungen die aktuelle Beobachtung des Sub-Tests sich von der Referenzpopulation von Fischer et al. (1999) unterscheidet (Fischer et al., 2001).

MSFC-Score

Aus diesen drei Z-Werten wird nun der MSFC-Scorewert als ein Mittelwert gebildet, wobei aus formeltechnischen Gründen der Reziprokwert des $Z_{9\text{-}HTP}$ verwendet werden muss:

$$\text{MSFC-Score} = ((1 / \text{Z-Score}_{9\text{-}HTP}) + \text{Z-Score}_{4T25W} + \text{Z-Score}_{Pasat}) / 3$$

Beim MSFC-Scorewert handelt es sich um eine kontinuierliche Parameter, dessen Verlauf bzw. Veränderung über die Zeit hinweg betrachtet und bewertet werden kann. Es gibt jedoch keine eigentlichen Normbereiche, sondern es werden die Unterschiede des Scorewertes zwischen zwei Zeitpunkten nur im Sinne einer Befundverbesserung oder -verschlechterung bewertet (Fischer et al., 2001).

2.2.2. Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Die Expanded Disability Status Scale wurde von Kurtzke (1983) als Fortentwicklung der Disability Status Scale (DSS) veröffentlicht. Der EDSS soll die Behinderungen eines Patienten durch die Multiple Sklerose quantifizieren.
Dabei werden die einzelnen Funktionssysteme untersucht und bewertet, woraus sich abschließend ein Gesamtpunktewert ergibt. Der Test ist untersucherabhängig und sollte nur von in der Methode erfahrenen Personen angewendet werden. Die Inter-Untersucher-Variabilität ist hoch, die Reliabilität deshalb niedrig. Der Test reagiert nur träge auf Veränderungen des Patienten über die Zeit. Die Bewertung der Funktion der unteren Extremität ist sehr stark gewichtet, wodurch Störungen anderer Funktionssysteme in die Gesamtbewertung weniger deutlich einfließen (Whitaker et al., 1995; Noseworthy et al., 1990; Hobart et al., 2000).
Der Untersucher bestimmt den neurologischen Status des Patienten, indem er folgende funktionelle Systeme einzeln untersucht und eventuelle Störungen bzw. Funktionseinbußen bewertet:

- Visuelles System (Fernvisus, Papillenablassung, Skotome)
- Hirnstamm (Augenbewegungensstörungen, Nystagmus, Trigeminusschäden, Gesichtsmuskelschwäche, Hörminderung, Dysarthrie, Dysphagie, andere bulbäre Zeichen)
- pyramidales System (Reflexe, Muskelkraft, Extremitätenspastik)
- zerebelläres System (Rumpfataxie, Extremitätenataxie, Kopftremor, Rebound, Gangataxie, Romberg-Test, Strichgang)

- Sensibilität (Oberflächensensibilität, Vibrationssinn, Lagesinn, Lhermitte, Parasthesien)
- vegetatives System (Blasen- und Mastdarmfunktion, sexuelle Dysfunktion)
- zerebrales System (Depression/Euphorie, kognitive Defizite, Müdigkeit)

In jedem funktionellen System werden Werte zwischen 0 und 5 bzw. 6 ermittelt, wobei 0 dem unauffälligen neurologischen Befunde entspricht und 1 in der Regel einem Defizit, das der Patient subjektiv nicht als Defizit bemerkt. Je stärker der Patient beeinträchtigt ist, desto höher liegt der Wert (siehe auch Tabelle 2a-2b).

Anschließend wird die Strecke ermittelt, die der Patient ohne Pausen gehen kann. Benötigt er dazu eine ein- bzw. beidseitige Gehilfe, wird dieses vermerkt und mit in die Bewertung einbezogen. Obligatorisch beträgt die Gehstrecke 500 m. Die beträgt nur 150 m, wenn eine Gehhilfe benötigt wird. Freie Gehstrecken über 500 m entsprechen einem EDSS-Wert kleiner als 4.

Aus den Werten der einzelnen Funktionssysteme und der Gehstrecke ergibt sich der EDSS-Gesamtwert, der zwischen 0 und 10 liegen kann. Wie bei den einzelnen funktionellen Systemen liegt der Wert umso höher, je beeinträchtigter der Patient ist. Dies bedeutet, ein Wert von 0 Punkten entspricht einem unauffälligen neurologischen Untersuchungsbefund und ein Punktewert von 10 entspricht dem Tod des Patienten durch MS. Die Abstufung dazwischen ist in 1/2 Punkte-Schritten möglich. EDSS-Werte kleiner als 4 zeigen an, dass der Patient keine Einschränkung der normalen Gehfähigkeit aufweist, während die Werte zwischen 4 und 5 von der Gehstrecke abhängen. Im Wertebereich zwischen 5,5 und 8 ist die Gehfähigkeit bzw. die Notwendigkeit eines Rollstuhls entscheidend für den Wert.

Der Gesamt-EDSS-Wert sollte nicht kleiner sein als der größte Wert eines der funktionellen Systeme. Der Gesamt-EDSS-Wert wird auf einer Rangskala zwischen den Werten 0 und 10 eingestuft. Aufgrund der Rangskala kann man keinen Mittelwert berechnen, sondern bestimmt die Verteilung der Werte innerhalb der Gruppe.

Um die Reliabilität möglichst groß zu halten, werden die Patienten vom gleichen Arzt, der in der EDSS-Wert-Bestimmung erfahren und trainiert ist, untersucht. Um diese Werte besser mit dem Ergebnis des MSFC vergleichen zu können, fanden in der vorliegenden Studie Untersuchungen am Nachmittag statt.

2.3. Bestimmung der Laborparameter

Für die Messung der Thiopurin-S-Methyl-Transferase Aktivität in Erythrozyten wurde die im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck entwickelte Methode verwendet (Kröpelin et al. 1998). Diese Methode benutzt 6-Thioguanin als Substrat. Die TPMT setzt dabei 6-Thioguanin in 6-Methyl-Thioguanin um, wobei S-Adenosyl-Methionin als Methyldonor dient. 6-Methyl-Thioguanin fluoresziert stark und kann mit Hilfe der Hochdruck-flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) und Fluoreszenzdetektion quantitativ gemessen werden.

2.3.1 Substanzen

Es wurden folgende Substanzen verwendet:
1) 6-Thioguanin (Fa. Serva, Heidelberg)
2) S-Adenosyl-Methionin (Fa. Sigma, Deisendorf)
3) 6-Methyl-Thioguanin (Fa. Sigma, Deisendorf)

Für die Extraktion und die Chromatographie wurden folgende Substanzen benötigt:
1) Tetrahydrofuran (Fa. E. Merck, Darmstadt)
2) Acetonitril (Fa. E. Merck, Darmstadt)
3) Chloroform (Fa. E. Merck, Darmstadt)
4) 2-Propanolol (Fa. E. Merck, Darmstadt)
5) Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. E. Merck, Darmstadt)

2.3.2 Probenvorbereitung

Die Blutproben wurden 10 Minuten bei 3.000 U/min (1.700 g) zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und verworfen. Nachdem die Erythrozyten einmal mit 1,5 ml isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl-Konzentration) gewaschen wurden, folgte eine zweite Zentrifugation mit 1.700 g für 10 Minuten.
Nach Trennung der Erythrozyten von der isotonischen Kochsalzlösung wurden 200 µl Erythrozyten in 800 µl 0,02M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 7,4) suspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Durch Einfrieren des Erythrozyten-Phosphatpuffer-Gemisches wurden die Erythrozyten hämolysiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.300g für 10 Minuten. Dadurch wurde das Hämolysat von den Zellmembranen getrennt und konnte für die Messung der TPMT-Aktivität und des Hämoglobingehaltes verwendet werden. Falls die TPMT-Aktivität nicht am selben Tag gemessen wurde, wurden die Proben bei -30°C eingefroren.

2.3.3 Inkubation

Vor jeder Inkubation wurde eine Lösung von 3 mmol/l 6-Thioguanin hergestellt. Hierzu wurden 1,5 mg 6-Thioguanin in 1 ml 0,1N Natronlauge (NaOH) gelöst und mit dem gleichen Volumen 0,1N Salzsäure (HCl) neutralisiert. Durch Zugabe von 3 ml 0,02 M Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 7,4) wurde die Konzentration von 3 mmol/l 6-Thioguanin erreicht. Bei Raumtemperatur war die Lösung nur zwei Stunden haltbar, danach fiel das 6-Thioguanin aus. Deshalb wurde die Lösung für jede Messung neu angesetzt. Die Inkubation wurde in 1,5 ml Polypropylen-Probengefäßen durchgeführt. 50 µl des Hämolysats wurden mit 50 µl S-Adenosyl-Methionin (SAM, 100 µg/ml) versetzt. Nach Zugabe von 50 µl 0,1M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (pH 7,4) und 50 µl doppelt destillierten Wassers wurden die Reaktion durch Zugabe von 50 µl der 3 mmol/l 6-Thioguanin Lösung gestartet.

Das Endvolumen im Polypropylen-Probengefäß betrug 250 µl, die Endkonzentration der Substrate lag für 6-Thioguanin bei 600 µmol/l, für S-Adenosyl-Methionin bei 32 µmol/l. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37 °C in einem Thermomixer oder in einem Schüttelwasserbad inkubiert.

2.3.4 Eichreihe und Qualitätskontrolle

Für die Eichreihe wurden 50 µl Standarderythrozytenhämolysat und 50 µl 0,1M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (pH 7,4) mit ansteigenden Konzentrationen von 6-Methyl-Thioguanin (3,125 ng/ml; 12,5 ng/ml; 50 ng/ml) versetzt und mit 150 µl destillierten Wasser auf ein Endvolumen von 250 µl gebracht. Diese Eichreihe wurde ebenfalls eine Stunde bei 37°C inkubiert.
Das Standarderythrozytenhämolysat wurde aus Blut eines gesunden Probanden hergestellt. Es wurde für die Eichreihe und für die Qualitätskontrolle verwendet, die unter den gleichen Bedingungen vorbereitet und inkubiert wurden wie die Proben. In jedem Analysegang wurde die TPMT-Aktivität dieser Qualitätskontrolle dreifach bestimmt.

2.3.5. Extraktion

Nach einer Stunde Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Chloroform/2-Propanolol (Verhältnis 9:1) beendet. Die Proben wurden 10 Minuten geschüttelt und 10 Minuten geschüttelt und 10 Minuten bei 1.300 g zentrifugiert. 800 µl der organischen Phase wurden in ein neues Polypropylen-Probengefäß überführt und die organische Phase durch Einblasen von Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl Fließmittel aufgenommen und für 30 Minuten bei 56°C in einem Heizblock gelöst. Nach Zentrifugieren bei 1300 g wurden die Proben in die HPLC-Anlage gegeben.

2.3.6. Chromatographie

Der quantitative Nachweis des Reaktionsprodukts 6-Methyl-Thioguanin durch die TPMT wurden durch Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) gemessen. Es wurde eine reversed-phase C18 Säule (LichroCart 125-4; Fa. E. Merck, Darmstadt) mit Vorsäule verwendet. Das Fließmittel setzte sich aus 0,05M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung, Acetonitril und Tetrahydrofuren zusammen (Verhältnis: 91/5/4; pH 6,2). Die Flussrate des Systems lag bei 1,2 ml/min. Zur Kontrolle des Messsystems wurde vor jeder Analyseserie 30 µl einer Stammlösung 6-Methyl-Thioguanin mit einer Konzentration von 100 ng/ml in die Anlage injiziert. 6-Methyl-Thioguanin wurde mittels Fluoreszenzdetektion bei einer Exzitationswellenlänge von 315 nm und einer Emissionswellenlänge von 390 nm gemessen.

2.3.7. Messung des Hämoglobingehalts in den Erythrozyten

Die TPMT-Akktivität wurde pro Gramm Hämoglobin bezogen. Für die Messung des Hämoglobingehaltes wurde ein kommerziell erhältliches Test-Kit benutzt. Hierbei wurde Hämoglobin in Cyan-Methämoglobon umgewandelt und die Konzentration durch Absorption bei 540 nm gemessen.

2.3.8. Berechnung der Thiopurin-S-Methyltransferase-Aktivität

Zwischen der TPMT-Aktivität und der Bildung von 6-Methyl-Thioguanin besteht ein linearer Zusammenhang. Aus den bei jeder Messung mitgeführten Eichreihen konnten Regressionsgeraden errechnet werden. Die Aktivität der TPMT wurde nach folgender Formel berechnet:

TPMT = (IF / MW / 181,2 / Hb) * F [nmol 6-MTG/g/Hb/h]

wobei: IF = Integrationsfläche des 6-MTG Peaks
MW = Mittelwert der Integrationsfläche für 1 ng 6-MTG
181,2 = Molekulare von 6-Methyl-Thioguanin
Hb = Hämoglobinkonzentration (g/dl)
F = Faktor 2000 (Verdünnungsfaktor des Erythrozytenhämolysats (g/dl) zu dem Volumen des Ansatzes (50µl)

Eine Einheit (Unit) TPMT repräsentiert die Bildung von 1 nmol 6-MTG/h.

2.3.9. Bestimmung der Metabolite 6-Methyl-Mercaptopurin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Thioguanin

Die Bestimmung der Konzentrationen von 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin erfolgt aus Erythrozytenmaterial. Alle drei Thiopurine lagen in Form von Nukleotiden vor. Freie Basen konnten nicht nachgewiesen werden. Durch Säurehydrolyse wurden aus den Nukleotiden die Basen freigesetzt, die dann die Summe der im Erythrozyten vorhandenen Mono-, Di- und Triphosphate und des Ribosids darstellen. Wenn also nachfolgend auf die Konzentrationen von 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin eingegangen wird, handelt es sich um die der entsprechenden Nukleotiden in den Erythrozyten.

2.3.9.1. Probenvorbereitung

400 µl Hämolysat wurde mit 400 µl 2N Schwefelsäure versetzt und bei 95°C für 15 Minuten inkubiert. Durch diese Säurehydrolyse wurden die Basen der Thiopurine aus den Nukleotiden freigesetzt. Danach ließ man die Proben für 5 Minuten im Eisbad abkühlen. Die ausgefällten Proteine wurden dann für 10 Minuten bei 1.300 g abzentrifugiert. Der klare, wässrige Überstand wurde abpipettiert und sowohl für die Bestimmung der methylierten Metabolite als auch zur Bestimmung von 6-Thioguanin verwendet.

2.3.9.2 Extraktion von 6-Methyl-Mercaptopurin und 6-Methyl-Thioguanin aus Erythrozyten

400 µl des wässrigen Überstandes wurden mit 80 µl einer 5M Natronlauge (NaOH) und 100 µl eines 1,5M Phosphatpuffers (KH_2PO_4) (pH 7,9) versetzt. Für die Extraktion wurde der Überstand mit 1000 µl Chloroform/Isopropanol (Verhältnis 9:/1) versetzt. Die Proben wurde für 10 Minuten geschüttelt und danach 10 Minuten bei 1300 g zentrifugiert.
800 µl der organischen Phase wurden in ein neues Probengefäß überführt und durch Einblasen von Stickstoff abgedampft. Der Rückstand wurde in 130 µl Fließmittel aufgenommen und für 30 Minuten bei 56°C in einem Heizblock belassen. 125 µl wurden in kleine Cups gefüllt. 50 µl wurden in die HPLC Anlage injiziert.
Für den quantitativen Nachweis von 6-Methyl-Mercaptopurin und 6-Methyl-Thioguanin wurden ein Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HLPC) System verwendet. Für die Trennung wurde eine „reversed-phase“ Säule (Lichro-Cart 125-4 RP18; Fa. E. Merck, Darmstadt) mit Vorsäule benutzt. Das Fließmittel setzte sich aus 455 ml 0,05M Kaliumyhdrogenphosphat-Lösung (KH_2PO_4), 25 ml Acetonitril und 20 ml Tetrahydrofuran bei einem pH von 6,2 zusammen. Die Flussrate betrug 1 ml/min. 6-Methyl-Mercaptopurin wurde

mittels UV-Detektion bei 290 nm nachgewiesen. 6-Methyl-Thioguanin wurde durch Fluoreszenzdetektion mit einer Exzitationswellenlänge von 315 nm und einer Emissionswellenlänge von 390 nm nachgewiesen.

2.3.9.3. Bestimmung der 6-Thioguanin-Konzentration in Erythrozyten

300 µl des wässrigen Überstandes, der aus der oben beschriebenen Säurehydrolyse stammte, wurde mit 18 µl 50% Perchlorsäure und 1 ml Dichlormethan versetzt. So wurden noch in der Lösung vorhandene Proteine gefällt und lipophile Verunreinigungen extrahiert. Die Proben wurden für 10 Minuten geschüttelt und 10 Minuten bei 1.300 g zentrifugiert. 200 µl der wässrigen Phase wurden mit 74 µl 2,5M Kaliumbikarbonat-Lösung ($KHCO_3$) versetzt. Bei einem pH-Wert von 7,5 fiel Kaliumperchlorat aus, das durch Zentrifugation von 5 Minuten bei 1.300 g von der wässrigen Phase getrennt wurde.
200 µl des neutralen Überstandes wurden mit 60 µl 0,5% Kaliumpermanganat-Lösung ($KMnO_4$) gemischt und 15 Minuten stehen gelassen. 6-Thioguanin wurde so zu einem fluoreszierenden Produkt oxidiert. Das überschüssige Kaliumpermanganat wurde mit Hilfe von 16 µl 15% Wasserstoffperoxyd-Lösung (H_2O_2) reduziert und so die Proben entfärbt. Dann wurde die Probe 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert, um den ausfallenden Braunstein abzutrennen. 50 µl des klaren Überstandes wurden auf die HPLC-Anlage injiziert. Für den quantitativen Nachweis des oxidierten 6-Thioguanin wurde ein Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) System verwendet. Für die Trennung wurde eine reversed-phase Säule (Waters Nova Pack 3,9 x 150 mm) benutzt. Das Fließmittel setzte sich aus 197 ml 0,05M Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (KH_2PO_4), 1,4 ml Acetonitril und 1,4 ml Tetrabutylammonium-Lösung (TBA; 100 mg/ml) bei einem pH von 7,9 zusammen. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Das oxidierte 6-Thioguanin wurde über Fluoreszenzdetektion bei einer Exzitationswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 400 nm nachgewiesen.

2.3.9.4. Eichreihen und Qualitätskontrollen

Für die Eichreihen wurden die zusammengefassten Erythrozyten von nicht mit Azathioprin behandelten Patienten mit ansteigenden Konzentrationen von 6-Methyl-Mercaptopurin (1000 ng/ml; 1500 ng/ml; 2000 ng/ml; 3000 ng/ml), 6-Methyl-Thioguanin (100 ng/ml; 150 ng/ml; 200 ng/ml; 250 ng/ml; 300 ng/ml) und von 6-Thiogunain (100 ng/ml; 200 ng/ml; 300 ng/ml; 400 ng/ml; 500 ng/ml) versetzt. Für die Qualitätskontrolle wurde zusammengefasstes Erythrozyten-hämolysat von Patienten verwendet, die mit Azathioprin behandelt wurden. Eichreihen und Qualitätskontrolle wurden in jedem Analysegang mitgemessen.

2.4. Statistische Methoden

Die erhobenen Daten wurden zunächst in ein Datenblatt des Programms Excel für Windows eingegeben. Nach Fertigstellung des Datenpools wurden zur Durchführung der statistischen Auswertung diese Daten in die Matrix des Statistikprogramms SPSS (Statistical Package for Social Sciences) übertragen.
Für die beschreibende Statistik wurden die absolute (n) und relative (%) Häufigkeit, Mittelwert (mean), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Median, Minimum (Min) und Maximum (Max) ermittelt. Für die Entscheidung, welche statistischen Prüfverfahren einzusetzen sind, wurde eine Normalverteilung der metrischen Parameter vorgenommen. Diese Prüfung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test ergab in der Regel eine Normalverteilung (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Prüfung metrischer Parameter auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test			
Parameter	Z-Wert	p-Wert	Bewertung
1. Beobachtungszeitpunkt			
Körpergewicht (kg)	0,867	0,440	Normalverteilung vorhanden
BMI (kg/m^2)	0,380	0,999	Normalverteilung vorhanden
A.-Therapie (Jahre)	0,601	0,863	Normalverteilung vorhanden
A.-Dosis (mg/d)	1,264	0,082	Normalverteilung vorhanden
A.-Dosis (mg/kg KG)	0,403	0,997	Normalverteilung vorhanden
EDSS (Pkt.)	0,951	0,327	Normalverteilung vorhanden
MSFC (Z-Score)	1,598	0,012	keine Normalverteilung
TPMT (U/g Hb)	0,948	0,330	Normalverteilung vorhanden
6-TG (ng/g Hb)	0,581	0,889	Normalverteilung vorhanden
6-MMP (ng/g Hb)	1,263	0,082	Normalverteilung vorhanden
6-MTG (ng/g Hb)	0,558	0,914	Normalverteilung vorhanden
2. Beobachtungszeitpunkt			
Körpergewicht (kg)	0,890	0,407	Normalverteilung vorhanden
BMI (kg/m^2)	0,618	0,840	Normalverteilung vorhanden
A.-Therapie (Jahre)	1,264	0,082	Normalverteilung vorhanden
EDSS (Pkt.)	0,853	0,461	Normalverteilung vorhanden
MSFC (Z-Score)	0,523	0,948	Normalverteilung vorhanden
TPMT (U/g Hb)	0,441	0,990	Normalverteilung vorhanden
6-TG (ng/g Hb)	1,263	0,082	keine Normalverteilung
6-MMP (ng/g Hb)	1,194	0,116	Normalverteilung vorhanden
6-MTG (ng/g Hb)	1,715	0,006	Normalverteilung vorhanden

A. = Azathioprin; KG = Körpergewicht; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; 6-MTG = 6- Methyl-Thioguanin

Daraufhin wurde für die Auswertung der metrischen skalierten Parameter sog. parametrische Prüfverfahren (t-Test für verbundene bzw. unverbundene Stichproben, Korrelation nach Pearson) verwendet. Es wurde eine Überlebenszeitanalyse nach Kaplan-Meier sowie ein Log-Rank-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau für alle Prüfverfahren wurde auf $p \leq 0,05$ gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Demographische Ergebnisse

Bei den in die Auswertung aufgenommenen 25 Patienten mit Multipler Sklerose handelte es sich in 80% der Fälle um Frauen und in 20% der Fälle um Männer. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 49,1 Jahre. Mehr als die Hälfte der Patienten (52%) waren 41-50 Jahre alt (s. Abb. 6 und Tab.5).

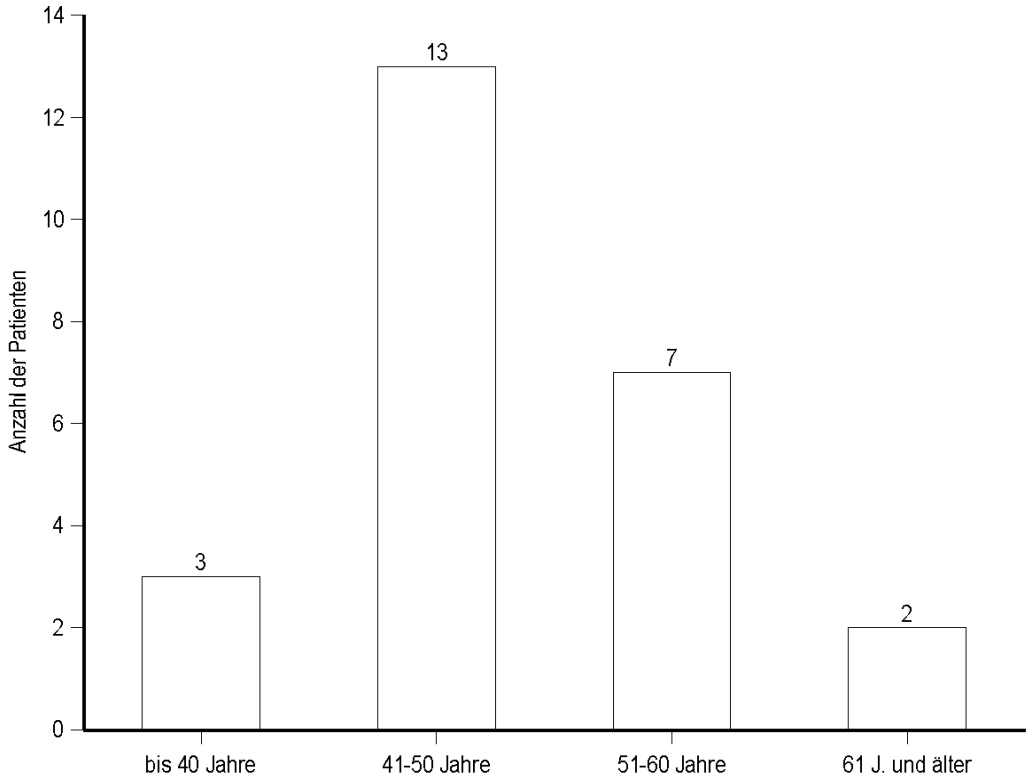

Abbildung 6: Altersverteilung im Gesamtkollektiv (10-Jahres-Klassen)

Tabelle 5: Altersverteilung im Gesamtkollektiv und beiden Geschlechtergruppen zu Studienbeginn

Parameter	Männer (n=5)	Frauen (n=20)	p-Wert[1)]	alle Patienten (n=25)
mean ± SEM	46,8 ± 3,2	49,7 ± 2,2	0,547	49,1 ± 1,8
Median	44	49		49
Min.-Max.	38 - 55	27 - 70		27 - 70

[1)] t-Test für unverbundene Stichproben

Die Patienten waren zum Zeitpunkt des Beobachtungsbeginns der Studie im Mittel 1,70 m groß und 71,3 kg schwer. Eine Zunahme des Körpergewichts zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten gab es nicht. Die Patienten waren bei Therapiebeginn in 41,7% der Fälle norm- und in 41,7% der Fälle übergewichtig. Ihr Body Mass Index veränderte sich zwischen dem ersten (24,6 kg/m^2) und zweiten (24,9 kg/m^2) Beobachtungszeitpunkt aber nicht signifikant (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Körpergewicht und -größe sowie Body Mass Index bei Beobachtungsbeginn und Beobachtungsende im Gesamtkollektiv

Parameter	Beobachtungsbeginn		Beobachtungsende		p-Wert[1)]
Körpergröße (cm):					
mean ± SEM	170,0 ± 2,3		-		-
Median	167				
Min.-Max.	153 - 193				
Körpergewicht (kg):					0,212
mean ± SEM	71,3 ± 3,0		72,0 ± 3,1		
Median	66		68		
Min.-Max.	47 - 107		47 - 108		
BMI (kg/m^2):					0,243
mean ± SEM	24,6 ± 0,8		24,9 ± 0,8		
Median	24,1		24,2		
Min.-Max.	16,7 - 32,0		16,7 - 31,3		
BMI in Klassen:					n.d.
untergewichtig	2	8,3%	2	8,0%	
normgewichtig	10	41,7%	11	44,0%	
übergewichtig	10	41,7%	9	36,0%	
Adipositas Grad I	2	8,3%	3	12,0%	

n.d. = Chi^2-Test nicht durchführbar

Die durchschnittliche Beobachtungszeit betrug im Gesamtkollektiv 212 Tage. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Mittel 32,8 Jahre alt gewesen und ihre Erkrankungsdauer bis zu Beginn der aktuellen Beobachtungsphase hatte 16,2 Jahre betragen. Die durchschnittlich täglich eingenommene Azathioprindosis betrug 120 mg. Bezogen auf das Körpergewicht lag die Azathioprin-Tagesdosis bei Beobachtungsbeginn bei 1,7 mg/kg KG. Einen signifikanten Unterschied dieser Daten zwischen den männlichen und weiblichen Patienten fand sich jeweils nicht ($p > 0,05$) - siehe auch Tabelle 7.

Tabelle 7: Beobachtungsdauer der Patienten in der Studie, Alter bei MS-Beginn und bisherige MS-Erkrankungsdauer

Parameter	mean ± SEM	Median	Min.	Max.
Beobachtungsdauer (d)	212 ± 8	217	134	343
Alter bei MS-Beginn	32,8 ± 1,6	34	21	49
MS-Erkrankungsdauer (Jahre)	16,2 ± 1,5	14	6	40
tägliche A.-Dosis (mg/d)	120 ± 8	100	50	200
tägl. A.-Dosis (mg pro kg KG)	1,7 ± 0,1	1,7	0,5	2,7

A. = Azathioprin; KG = Körpergewicht

Die Verlaufsform der multiplen Sklerose wurde zum Zeitpunkt des Beobachtungsbeginns bewertet. Zwei Drittel der Patienten litt an einer schubförmig remittierenden Multiplen Sklerose (64%). Etwas mehr als ein Viertel der Patienten wies eine sekundär progrediente und knapp 10% zeigten eine primär progrediente Multiple Sklerose. Bei männlichen Patienten waren mehr Patienten von einer schubförmigen MS betroffen als bei Frauen und bei Männern war kein primär progrediente MS nachweisbar. Zu bedenken ist hierbei jedoch die geringe Fallzahl männlicher Patienten (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Klassifikation der MS-Erkrankung im Gesamtkollektiv und beiden Geschlechtergruppen

Verlauf der MS	Männer		Frauen		alle Patienten	
schubförmig remittierend (RR)	4	80%	12	60%	16	64%
sekundär progredient (RRSP)	1	20%	6	30%	7	28%
primär progredient (RP)	-	-	2	10%	2	8%

RR = Relapsing Remitting; RRSP = Relapsing Remitting Secondary Progression; PP = Primary Progression

3.2. Veränderungen des EDSS und MSFC zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten

Der EDSS-Score betrug bei Beginn der Beobachtungsphase im Gesamtkollektiv der 25 MS-Patienten 2,92 Punkte und sank nach einer durchschnittlichen Beobachtungszeit von 212 Tagen auf 2,86 Punkte ab. Diese Reduktion des EDSS-Scores war jedoch nicht signifikant. Weder vor Beginn der Beobachtung noch bei Beobachtungsende fand sich ein signifikanter Unterschied des EDSS zwischen männlichen und weiblichen Patienten (t-Test für unverbundene Stichproben jeweils $p > 0,05$).

Der Z-Score des MSFC blieb zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten ebenfalls unverändert. Er betrug vor Studienbeginn 0,063 und lag beim zweiten Beobachtungszeitpunkt bei -0,063, wobei diese Reduktion statistisch nicht signifikant ausfiel. Auch hier fand sich zwischen männlichen und weiblichen Patienten weder zum 1. noch zum 2. Beobachtungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied des Z-Scores (t-Test für unverbundene Stichproben jeweils $p > 0,05$) - siehe auch Tabelle 9.

Tabelle 9: EDSS-Score sowie Z-Score des MSFC bei Beobachtungsbeginn und Beobachtungsende im Gesamtkollektiv

Parameter	Beobachtungsbeginn	Beobachtungsende	p-Wert[1)]
EDSS (Pkt.):			0,737
mean ± SEM	2,92 ± 0,35	2,86 ± 0,35	
Median	2,5	2,5	
Minimum	1	0	
Maximum	7	7	
MSFC (Z-Score):			0,559
mean ± SEM	0,063 ± 0,204	-0,063 ± 0,072	
Median	-0,065	-0,044	
Minimum	-0,921	-0,707	
Maximum	4,643	0,709	

Vor Beginn der ersten Beobachtungsphase unterschied sich der EDSS-Score signifikant zwischen Patienten mit unterschiedlichem MS-Verlauf. Patienten mit schubförmig remittierender MS wiesen den niedrigsten und damit günstigsten Scorewert auf, während Patienten mit primär progredienter MS bereits deutlich ungünstiger abschnitten (2,19 Pkt. vs. 2,75 Pkt.). Patienten mir sekundär progredienter MS hingegen wiesen den beiden erstgenannten Verlaufsformen gegenüber jedoch mit 4,64 Punkten den höchsten und damit schlechtesten EDSS-Score auf. Zum Zeitpunkt des Beobachtungsendes gab es keinen signifikanten Unterschied des EDSS-Scores zwischen Patienten mit schubförmig remittierender, primär oder sekundär progredienter MS mehr. Allerdings wiesen die erstgenannten Patienten wiederum die niedrigsten und die letztgenannten Patienten die höchsten EDSS-Scorewerte auf.

Der Z-Score des MSFC war zwischen Patienten mit schubförmig remittierender, primär oder sekundär progredienter MS weder beim 1. noch beim 2. Beobachtungszeitpunkt signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: EDSS-Score und Z-Score des MSFC bei 1. und 2. Beobachtungszeitpunkt im Gesamtkollektiv in Abhängigkeit vom Verlauf der MS

MS-Verlauf	n	mean ± SD	Median	Min.	Max.	p-Wert[1)]
EDSS-Score bei 1. Beobachtungszeitpunkt						
RR	16	2,19 ± 0,28	1,5	1	5	0,004
RRSP	7	4,64 ± 0,69	5	2	7	
PP	2	2,75 ± 1,75	2,75	1	4,5	
EDSS-Score bei 2. Beobachtungszeitpunkt						
RR	16	2,28 ± 0,35	2	0	5	0,072
RRSP	7	4,0 ± 0,67	3,5	2	7	
PP	2	3,5 ± 2,0	3,5	5,5	7	
MSFC (Z-Score) bei 1. Beobachtungszeitpunkt						
RR	16	-0,109 ± 0,078	-0,092	-0,601	0,436	0,232
RRSP	7	0,607 ± 0,691	-0,065	-0,596	4,643	
PP	2	-0,470 ± 0,451	-0,470	-0,020	-0,940	
MSFC (Z-Score) bei 2. Beobachtungszeitpunkt						
RR	16	-0,148 ± 0,070	-0,084	-0,614	0,249	0,263
RRSP	7	0,123 ± 0,129	0,034	-0,358	0,709	
PP	2	-0,033 ± 0,451	-0,033	-0,707	-0,066	

[1)] Oneway-Anova-Analyse (Vergleich zwischen den drei MS-Verlaufstypen); RR = Relapsing Remitting; RRSP = Relapsing Remitting Secondary Progression; PP = Primary Progression

3.3. Veränderung der Laborparameter (TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin, 6-Methyl-Mercaptopurin) zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten

Zwischen beiden Beobachtungszeitpunkten kam es zu einer tendenziellen Abnahme der TPMT-Aktivität (43,3 auf 41,9 U/g Hb), einer leichten Zunahme der 6-Thioguanin-Konzentration (458,8 auf 551,4 ng/g Hb) und der 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration (425,8 auf 491 ng/g Hb). Die 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration nahm hingegen ab (16168 auf 12106 ng/g Hb). Die entsprechenden Veränderungen waren jedoch nicht statistisch signifikant (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Veränderung der Laborparameter (TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin, 6-Methyl-Mercaptopurin) zwischen Beobachtungsbeginn und Beobachtungsende im Gesamtkollektiv

Parameter	Beobachtungsbeginn	Beobachtungsende	p-Wert[1)]
TPMT (U/g Hb):			0,202
mean ± SEM	43,4 ± 1,7	41,9 ± 1,34	
Median	43	42	
Minimum	21	23	
Maximum	57	54	
6-TG (ng/g Hb):			0,178
mean ± SEM	458,8 ± 44,6	551,4 ± 79,1	
Median	415	461	
Minimum	192	132	
Maximum	1174	1749	
6-MTG (ng/g Hb):			0,615
mean ± SEM	425,8 ± 39,9	491,0 ± 121,1	
Median	411	389,5	
Minimum	45	62	
Maximum	896	3165	
6-MMP (ng/g Hb):			0,101
mean ± SEM	16168 ± 3636	12106 ± 2499	
Median	9407	7423	
Minimum	904	408	
Maximum	59149	37098	

TPMT = Thiopurin-S-Methyltransferase; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MTG = 6-Methyl-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; Hb = Hämoglobin

Keiner der vier Laborparameter unterschied sich zum 1. Beobachtungszeitpunkt zwischen Patienten mit schubförmig remittierender, primär oder sekundär progredienter MS signifikant (jeweils Oneway-Anova: $p > 0,05$). Ein analoges Ergebnis fand sich auch beim 2 Beobachtungszeitpunkt (jeweils Oneway-Anova: $p > 0,05$). Auf die Darstellung der jeweiligen Ergebnisse wurde deshalb verzichtet.

Eine Korrelation der Parameter Patientenalter bei Studienbeginn, Patientenalter bei MS-Diagnose sowie bisherige Erkrankungsdauer an Multipler Sklerose mit den vier Laborparametern Thiopurin-S-Methyltransferase,6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin ergab weder zum Zeitpunkt der 1. noch der 2. Beobachtung der Patienten einen signifikanten Zusammenhang (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Korrelation von Patientenalter bei MS-Diagnose, MS-Erkrankungsdauer und Dauer der Azathioprintherapie mit den Laborparametern TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin) (Pearson-Korrelation)

Parameter	Patientenalter bei Studienbeginn	Patientenalter bei MS-Diagnose	Erkrankungsdauer an MS
B.-Beginn: TPMT	r = -0,089 p = 0,673	r = -0,255 p = 0,219	r = 0,259 p = 0,211
B.-Beginn: 6-TG	r = -0,300 p = 0,145	r = -0,097 p = 0,645	r = -0,278 p = 0,179
B.-Beginn: 6-MTG	r = -0,362 p = 0,075	r = -0,252 p = 0,223	r = -0,093 p = 0,659
B.-Beginn: 6-MMP	r = 0,221 p = 0,289	r = -0,035 p = 0,868	r = 0,108 p = 0,606
B.-Ende: TPMT	r = -0,101 p = 0,630	r = - 0,132 p = 0,530	r = 0,117 p = 0,578
B.-Ende: 6-TG	r = 0,057 p = 0,785	r = -0,183 p = 0,382	r = 0,182 p = 0,384
B.-Ende: 6-MTG	r = -0,061 p = 0,778	r = -0,266 p = 0,209	r = -0,133 p = 0,534
B.-Ende: 6-MMP	r = -0,061 p = 0,773	r = -0,083 p = 0,694	r = 0,108 p = 0,606

TPMT = Thiopurin-S-Methyltransferase; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MTG = 6-Methyl-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; r = Spearman-Korrelationskoeffizient; p = p-Wert; B.-Beginn = Beobachtungsbeginn; B.-Ende = Beobachtungsende

Relevante Korrelationen zwischen den vier gemessenen Laborparameter TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin fanden sich nur zum 1. Beobachtungszeitpunkt.

Hierbei war festzustellen, dass zwischen der TPMT-Aktivität und der 6-Thioguanin-Konzentration ein negativer, mäßiggradiger und signifikanter Zusammenhang bestand. Dies bedeutete, dass mit sinkender TPMT-Aktivität die 6-Thioguanin-Konzentration in mäßigem Umfange stieg. Ebenfalls fand sich beim 1. Beobachtungszeitpunkt eine Korrelation zwischen der 6-Thioguanin- und der 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration. Der Zusammenhang war positiv, mäßiggradig und signifikant und er bedeutete, dass mit steigender 6-Thioguanin-Konzentration auch die Konzentration von 6-Methyl-Mercaptopurin anstieg. Ansonsten fand sich bei keiner weiteren Konstellation der Laborparameter zum 1. Beobachtungszeitpunkt ein signifikanter Zusammenhang. Dies bedeutet aus pharmakologischer Sicht, dass es beim 1. Beobachtungszeitpunkt bei Vorliegen einer zunehmendem TPMT-Hemmung zu einem verstärkten Abbau von 6-Mercaptopurin über den anabolen Abbauweg zu 6-Thioguanin kommt.

Beim 2. Beobachtungszeitpunkt fand sich bei keiner der möglichen Konstellationen der vier Laborparameter ein signifikanter Zusammenhang. Daraus lässt sich folgern, dass eine mehrmonatige Azathioprintherapie eine leichte Verbesserung der TPMT-Aktivität verursacht, die zu einem verbesserten Abbau des 6-Mercaptopurin über den primär metabolischen Abbauweg führt. Siehe hierzu auch die Daten in Tabelle 13.

Tabelle 13: Korrelation der Laborparameter TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin untereinander zum 1. und 2. Beobachtungszeitpunkt (Pearson-Korrelation)			
Parameter	6-TG	6-MTG	6-MMP
1. Beobachtungszeitpunkt			
TPMT	**r = -0,485; p = 0,014**	r = 0,190; p = 0,364	r = 0,322; p = 0,116
6-MMP	r = -0,054; p = 0,798	r = 0,327; p = 0,111	-
6-MTG	**r = 0,619; p = 0,001**	-	-
2. Beobachtungszeitpunkt			
TPMT	r = -0,190; p = 0,364	r = 0,207; p = 0,332	r = 0,348; p = 0,088
6-MMP	r = 0,017; p = 0,935	r = -0,134; p = 0,534	-
6-MTG	r = 0,204; p = 0,339	-	-

TPMT = Thiopurin-S-Methyltransferase; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MTG = 6-Methyl-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; r = Spearman-Korrelationskoeffizient; p = p-Wert

Die Dauer der bisherigen Azathioprintherapie korrelierte mit keinem der vier untersuchten Laborparameter (Laborparametern TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin). Allerdings korrelierte die tägliche Azathioprindosis in mg signifikant und positiv, jedoch jeweils mäßiggradig mit der TPMT-Aktivität, der 6-MTG- und der 6-MMP-Konzentration. Ein entsprechender positiver, signifikanter und mäßiggradiger Zusammenhang war auch nach Umrechnung der Azathioprindosis pro kg Körpergewicht für die 6-MTG- und 6-MMP-Konzentration feststellbar und fiel dann sogar deutlicher aus. Aus pharmakologischer Sicht ergibt sich daraus folgendes Ergebnis. Mit steigender täglicher Azathioprindosis steigt die TPMT-Aktivität ebenfalls signifikant an. Bei einer auf das Körpergewicht bezogenen Dosis ist dieser Zusammenhang deutlich geringer und ist nicht mehr in signifikantem Umfange vorhanden. Mit steigender Azathioprindosis (sowohl der Tagesdosis als auch der auf das Körpergewicht bezogenen Dosis) kommt es zu einem deutlichen Anstieg der 6-Methyl-Thioguanin- und der 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration. Dies bedeutet eine dosisabhängige Zunahme des aus dem Azathioprin in seine aktive Wirksubstanz umgewandelten 6-Mercaptopurins über den sekundären metabolischen Abbauweg (zu 6-Methyl-Mercaptopurin) und den anabolen Abbauweg (zu 6-Thioguanin) - siehe Tabelle 14.

Tabelle 14: Korrelation der Dauer der bisherigen Azathioprintherapie (Jahre), sowie der Azathioprindosis in mg/Tag bzw. mg/kg Körpergewicht mit den Laborparametern TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin) (Spearman-Korrelation)

Parameter	Dauer der Azathioprintherapie	Azath.-Dosis in mg/d	Azath.-Dosis in mg/kg KG
B.-Beginn: TPMT	r = -0,019 p = 0,927	**r = 0,496** **p = 0,012**	r = 0,288 p = 0,163
B.-Beginn: 6-TG	r = -0,183 p = 0,381	r = -0,073 p = 0,729	r = 0,087 p = 0,678
B.-Beginn: 6-MTG	r = -0,123 p = 0,559	**r = 0,457** **p = 0,021**	**r = 0,510** **p = 0,009**
B.-Beginn: 6-MMP	r = 0,212 p = 0,309	**r = 0,530** **p = 0,006**	**r = 0,601** **p = 0,001**
B.-Ende: TPMT	r = 0,108 p = 0,606	**r = 0,415** **p = 0,039**	r = 0,348 p = 0,088
B.-Ende: 6-TG	r = 0,151 p = 0,470	r = 0,129 p = 0,540	r = 0,323 p = 0,116
B.-Ende: 6-MTG	r = 0,309 p = 0,141	r = -0,026 p = 0,905	r = 0,054 p = 0,803
B.-Ende: 6-MMP	r = 0,168 p = 0,423	**r = 0,525** **p = 0,007**	**r = 0,588** **p = 0,002**

TPMT = Thiopurin-S-Methyltransferase; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MTG = 6-Methyl-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; r = Spearman-Korrelationskoeffizient; p = p-Wert; KG = Körpergewicht; B.-Beginn = Beobachtungsbeginn; B.-Ende = Beobachtungsende

3.4. Zusammenhang zwischen den Laborparametern TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin mit den klinischen MS-Bewertungsschemata EDSS und MSFC zu beiden Beobachtungszeitpunkten

Zum 1. Beobachtungszeitpunkt fand sich zwischen dem EDSS und den vier Laborparametern keine signifikante Korrelation. Die Daten lassen jedoch mit gebotener Vorsicht folgende Aussage zu. Mit steigendem EDSS- bzw. MSFC-Wert kommt es zu einer Verringerung der 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration r im Sinne einer Zunahme der Symptomatik mit Nachlassen des anabolen Abbauwegs von 6-Mercaptopurin. Jedoch besteht gleichzeitig kein signifikanter Zusammenhang zwischen der klinischen Symptomatik und der TPMT-Aktivität bzw. der Effektivität des primär metabolischen Abbaus in Richtung 6-Methyl-Mercaptopurin. Die Verringerung des anabolen Abbauwegs ist jedoch von Relevanz, da von 6-Thioguanosin-Monophosphat aus der Einbau der Thiopurine in die DNA erfolgt. Zum zweiten Beobachtungszeitpunkt fand sich keine entsprechende Korrelation mehr zwischen dem EDSS- und MSFC-Wert und den Laborparametern (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Korrelation des EDSS- und MSFC-Scores mit den Laborparametern TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin zu beiden Beobachtungszeitpunkten (Pearson-Korrelation)

Laborparameter	EDSS-Score	MSFC (Z-Score)
1. Beobachtungszeitpunkt		
TPMT (U/g Hb)	r = -0,089; p = 0,671	r = 0,030; p = 0,887
6-TG (ng/g Hb)	r = -0,238; p = 0,252	r = -0,287; p = 0,164
6-MTG (ng/g Hb)	r = -0,334; p = 0,103	r = -0,338; p = 0,099
6-MMP (ng/g Hb)	r = -0,160; p = 0,446	r = -0,201; p = 0,336
2. Beobachtungszeitpunkt		
TPMT (U/g Hb)	r = -0,082; p = 0,696	r = -0,030; p = 0,885
6-TG (ng/g Hb)	r = -0,252; p = 0,223	r = -0,280; p = 0,176
6-MTG (ng/g Hb)	r = -0,302; p = 0,143	r = -0,307; p = 0,136
6-MMP (ng/g Hb)	r = -0,148; p = 0,480	r = -0,020; p = 0,925

TPMT = Thiopurin-S-Methyltransferase; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MTG = 6-Methyl-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; r = Spearman-Korrelationskoeffizient; p = p-Wert

Obwohl für den EDSS und den MSFC keine typischen Normwerte existieren, wurde der Versuch unternommen, eine entsprechende Grenzwertziehung vorzunehmen.

Diese gelang beim EDSS am einfachsten, da dieser Score auf einer Skala von 0-10 Punkten sich gemäß der üblichen Bewertungssysteme (vgl. Tabelle 2) in drei Bereiche einteilen lässt: Patienten mit normalem neurologischen Befund bzw. keiner relevanten Einschränkung (0-1,5 Punkte), Patienten mit leichten Einschränkungen (2-2,5 Punkte) und Patienten mit mindestens mäßiggradiger Einschränkung ($\geq$ 3.0 Punkte). Gemäß dieser Gruppenzuteilung wurden die Konzentrationen der vier Laborparameter jeweils zum 1. und 2. Beobachtungszeitpunkt zwischen diesen Graduierungen verglichen.

Beim 1. Beobachtungszeitpunkt zeigte sich jedoch weder für die TGMT-Aktivität noch für die 6-Thioguanin- und 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten ohne Einschränkung, mit leichten oder mindestens mäßiggradiger Einschränkung im EDSS-Score. Die 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration hingegen war bei Patienten ohne Einschränkung am höchsten, die sank signifikant bei Patienten mit leichter Einschränkung. Patienten mit mindestens mäßiggradiger Einschränkung wiesen ebenfalls niedrigere 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration auf als Patienten ohne Einschränkung (siehe Tabelle 16).

Beim 2. Beobachtungszeitpunkt gab es bei keinem der vier Laborparameter einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten ohne Einschänkung im EDSS im Vergleich zu Patienten mit leichter oder mindestens mäßiggradiger Einschränkung (siehe Tabelle 16). Es zeigt sich jedoch tendenziell, dass die TPMT-Aktivität mit steigendem EDSS-Score abnahm, die 6-Thioguanin- und die 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration zunahm, während die 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration abnahm.

Tabelle 16: Vergleich der Laborparameter TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin zwischen Patienten unterschiedlichem Schweregrad des EDSS-Scores (unauffällig: 0-1,5 Pkt.; leichte Einschränkung: 2-2,5 Pkt., mindestens mäßiggradige Einschränkung: ≥ 3 Pkt.) zu beiden Beobachtungszeitpunkten

Parameter	EDSS unauffällig	EDSS leichte E.	EDSS mind. mäßige E.	p-Wert[1)]
1. Beobachtungszeitpunkt				
TPMT (U/g Hb):	n=10	n=4	n=11	0,804
mean ± SEM	44,7 ± 3,2	43,3 ± 4,5	42,2 ± 2,2	
Median	44	42,5	43	
Min.-Max.	21 - 57	33 - 55	28 - 52	
6-TG (ng/g Hb):	n=10	n=4	n=11	0,524
mean ± SEM	522,5 ± 89,2	425,8 ± 145,0	413,0 ± 37,5	
Median	506	318	415	
Min.-Max.	221 - 1174	215 - 852	192 - 562	
6-MTG (ng/g Hb):	n=10	n=4	n=11	0,046
mean ± SEM	531,1 ± 62,8	260,5 ± 80,7	390,3 ± 51,4	
Median	580,5	293	402	
Min.-Max.	271 - 896	45 - 411	75 - 720	
6-MMP (ng/g Hb):	n=10	n=4	n=11	0,455
mean ± SEM	18568 ± 6962	5459 ± 2430	17880 ± 5182	
Median	7746,5	4911,5	10840	
Min.-Max.	904 - 56482	1049 - 10966	2494 - 59149	
2. Beobachtungszeitpunkt				
TPMT (U/g Hb):	n=8	n=6	n=11	0,877
mean ± SEM	43,0 ± 2,1	41,2 ± 3,8	41,5 ± 1,9	
Median	43	43,5	40	
Min.-Max.	35 - 52	23 - 48	31 - 54	
6-TG (ng/g Hb):	n=8	n=6	n=11	0,949
mean ± SEM	516,4 ± 135,9	582,5 ± 156,6	559,9 ± 133,8	
Median	421	453,5	475	
Min.-Max.	147 - 1275	287 - 1314	132 - 1749	
6-MTG (ng/g Hb):	n=8	n=6	n=11	0,576
mean ± SEM	385,0 ± 58,9	373,3 ± 45,3	646,5 ± 287,2	
Median	408,5	373,5	364,5	
Min.-Max.	132 - 650	219 - 528	62 - 3165	
6-MMP (ng/g Hb):	n=8	n=6	n=11	0,198
mean ± SEM	15962 ± 5754	15438 ± 5507	7485 ± 2265	
Median	7734,5	10107	5215	
Min.-Max.	726 - 37098	1933 - 34541	408 - 20181	

[1)] Oneway-Anova-Analyse (Vergleich zwischen den drei EDSS-Graduierungen); TPMT = Thiopurin-S-Methyltransferase; 6-TG = 6-Thioguanin; 6-MTG = 6-Methyl-Thioguanin; 6-MMP = 6-Methyl-Mercaptopurin; E. = Einschränkung

Eine Graduierung des Z-Scores des MSFC für eine Prüfung auf Veränderungen der Laborparameter TPMT, &-TG, 6-MTG und 6-MMP war in der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Da der Z-Score die Anzahl von Standardabweichungen angibt, um dies sich das Testergebnis der MS-Patienten von jenem einer Referenzpopulation von Fischer et al. (1999) unterscheidet, liegt es zwar zunächst nahe, ganzzahlige Standardabweichungen als Grenzwerte zu definieren. So wäre eine Abweichung der eigenen Patienten im Vergleich zum Referenzkollektiv um z.B. bis zu einer Standardabweichung nach oben oder unten als erste Graduierung ansetzbar, eine Abweichung um zwei Standardabweichungen nach oben bzw. unten als nächste Graduierung und so fort. Das Problem in der vorliegenden Arbeit bestand jedoch darin, dass kein einziger Patient eine Abweichung von mehr als einer Standardabweichung im Vergleich zum Referenzkollektiv aufwies. Somit konnte keine sinnvolle Klassenbildung aus verschiedenen Graduierungsstufen erfolgen und deshalb konnte auch zwischen diesen Klassenbildungen kein Vergleich der vier Laborparameter erfolgen.

3.5. Regressionsanalysen

Um Zusammenhänge zwischen der Azathioprindosis in mg pro kg Körpergewicht und den Laborparameter TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG), 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) sowie des Quotienten von 6-MMP/6-TG herauszuarbeiten, wurde eine lineare Regressionsanalyse für die entsprechenden Daten zum 1. Beobachtungszeitpunkt vorgenommen. Als abhängige Variable (Zielgröße) wurde jeweils der entsprechende Laborparameter bzw. der Quotient verwendet, als unabhängige Variable (Prädiktorvariable) wurde die Azathioprindosis benutzt. Es wurde die Regressionsgleichung ermittelt, wobei Y den Punkt beschreibt, an dem die Regressionsgerade die Y-Achse schneidet und X die Steigung der Regressionsgraden angibt. Daneben wurde auch das Bestimmtheitsmaß R^2 errechnet. Dieses ist der Quotient aus erklärter Varianz durch die Gesamtvarianz und sagt aus, wieviel Prozent Streuung in der abhängigen Variable (Laborparameter = Zielgröße) sich auf die unabhängige Variable (Azathioprindosis) zurückführen lässt bzw. wieviel Prozent der Laborparameterschwankung sich durch die Azathioprindosis erklären lassen. R^2 schwankt zwischen 1 (100%) und 0 (0%). Zur statistischen Absicherung von R^2 wird ein F-Test (Anova) durchgeführt. Bei der analysierten Varianz handelt es sich um die Summe der quadrierten Abweichungen der einzelnen (n=28) Messwerte des jeweiligen Laborparameters von dem Mittelwert des Laborparameters, wobei diese Summe durch die Anzahl der Messwerte minus 1 geteilt wird.

Zusätzlich wurde bei jeder Testkonstellation noch eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt, um eine Aussage über die Stärke des Zusammenhanges zwischen Azathioprindosis und Laborparameterhöhe zu erhalten. Der Korrelationskoeffizient (r) schwankt zwischen +1 (positive Korrelation) über 0 bis -1 (negative Korrelation). Eine positive Korrelation beschreibt einen gleichsinnigen Anstieg beider Parameter, eine negative Korrelation hingegen einen Anstieg des einen Parameters, während der zweite Parameter absinkt.

TPMT-Aktivität und Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn

Es zeigt sich ein Anstieg der TPMT-Aktivität mit zunehmender Azathioprindosis. Dies zeigt die signifikante, positive und mäßig starke Pearson-Korrelation (r = 0,477; p = 0,01). Die ANOVA-Analyse zeigt aber eine sehr geringe Varianz für die Regressionsgerade (Quadratsumme: 139,315; Residuen: 1673,352; Gesamtvarianz: 1812,667; F = 2,081; p = 0,162), so dass ein sehr geringes R^2 von lediglich 7,7% resultiert. Die Azathioprindosis erklärt demnach lediglich 7,7% der Varianz der TPMT-Aktivität (siehe Abbildung 7), so dass trotz eines positiven Zusammenhangs zwischen TPMT-Aktivität und Azathioprindosis dieser Zusammenhang nur zu einem kleinen prozentualen Teil durch den Anstieg der Azathioprindosis erklärt werden kann.

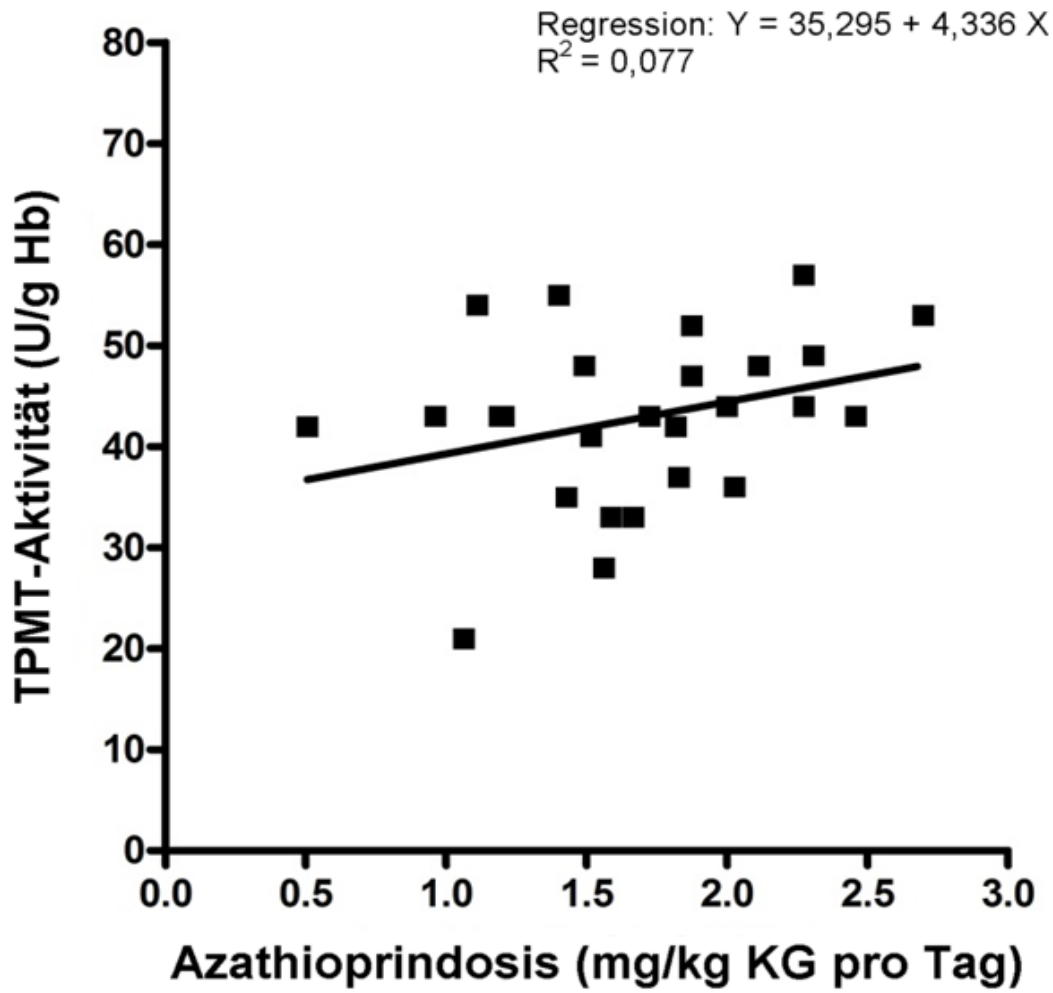

Abbildung 7: Regressionsanalyse zwischen der TPMT-Aktivität und der Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn (27 MS-Patienten)

6-Thioguanin und Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn

Es zeigt sich kein relevanter Anstieg der 6-TG-Konzentration mit zunehmender Azathioprindosis. Dies belegt die durchgeführte Pearson-Korrelation, die nicht signifikant war (r = -0,064; p = 0,747). Die ANOVA-Analyse zeigt zusätzlich eine sehr geringe Varianz für die Regressionsgerade (Quadratsumme: 8132,901; Residuen: 1225937; Gesamtvarianz: 1234070; F = 0,166; p = 0,687) mit einem extrem niedrigen R^2 von lediglich 0,7%. Die Azathioprindosis erklärt demnach lediglich 0,7% der Varianz der 6-TG-Konzentration (siehe Abbildung 8), so kein Zusammenhang zwischen der Azathioprindosis und der 6-TG-Konzentration besteht, obwohl der Verlauf der 6-TG-Ausscheidung linear mir der Azathioprindosis ansteigt.

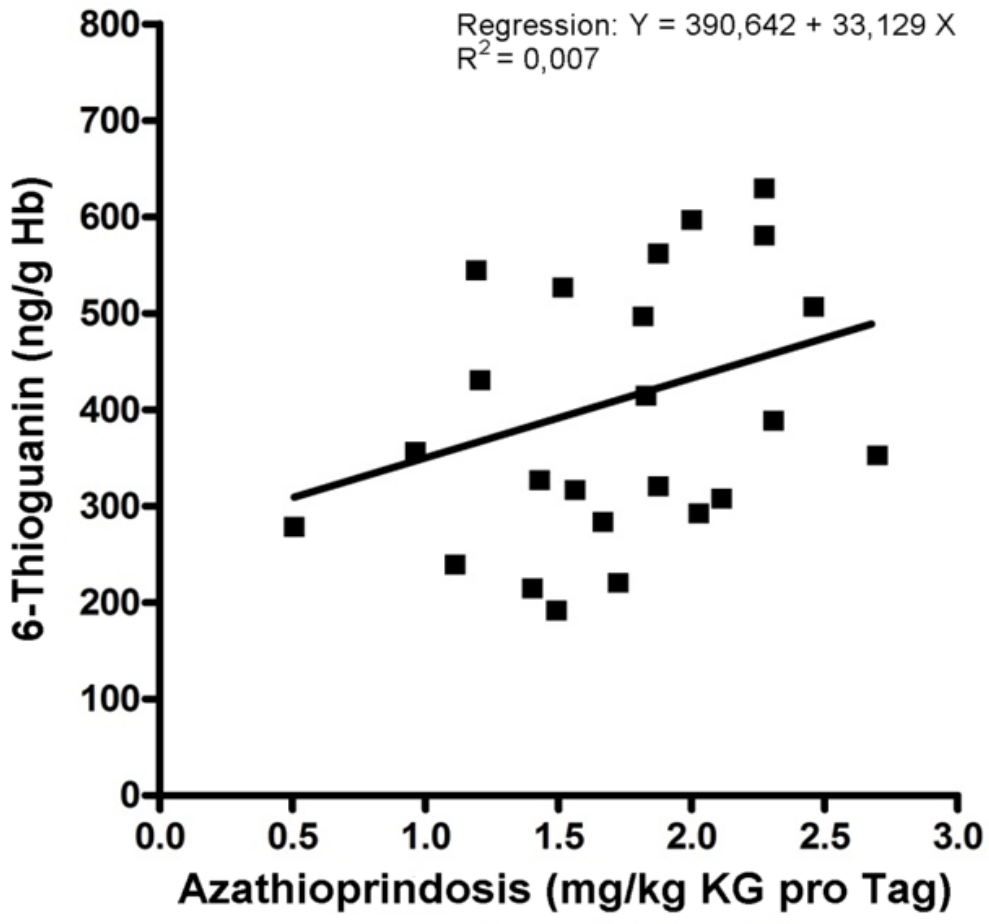

Abbildung 8: Regressionsanalyse zwischen der 6-Thioguanin-Konzentration und der Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn (27 MS-Patienten)

6-Methyl-Thioguanin und Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn

Es zeigt sich ein deutlicher Anstieg der 6-MTG-Konzentration mit zunehmender Azathioprindosis. Dies zeigt die signifikante, positive und mäßiggradige Pearson-Korrelation (r = 0,428; p = 0,023). Die ANOVA-Analyse zeigt eine größere Varianz für die Regressionsgerade (Quadratsumme: 278024,1; Residuen: 775207,9; Gesamtvarianz: 1053232; F = 8,966; p = 0,006) mit einem R^2 von 26,4%. Die Azathioprindosis erklärt demnach 26,4% der Varianz der 6-MTG-Konzentration (siehe Abbildung 9), so dass ein Zusammenhang zwischen der Azathioprindosis und der 6-MTG-Konzentration besteht.

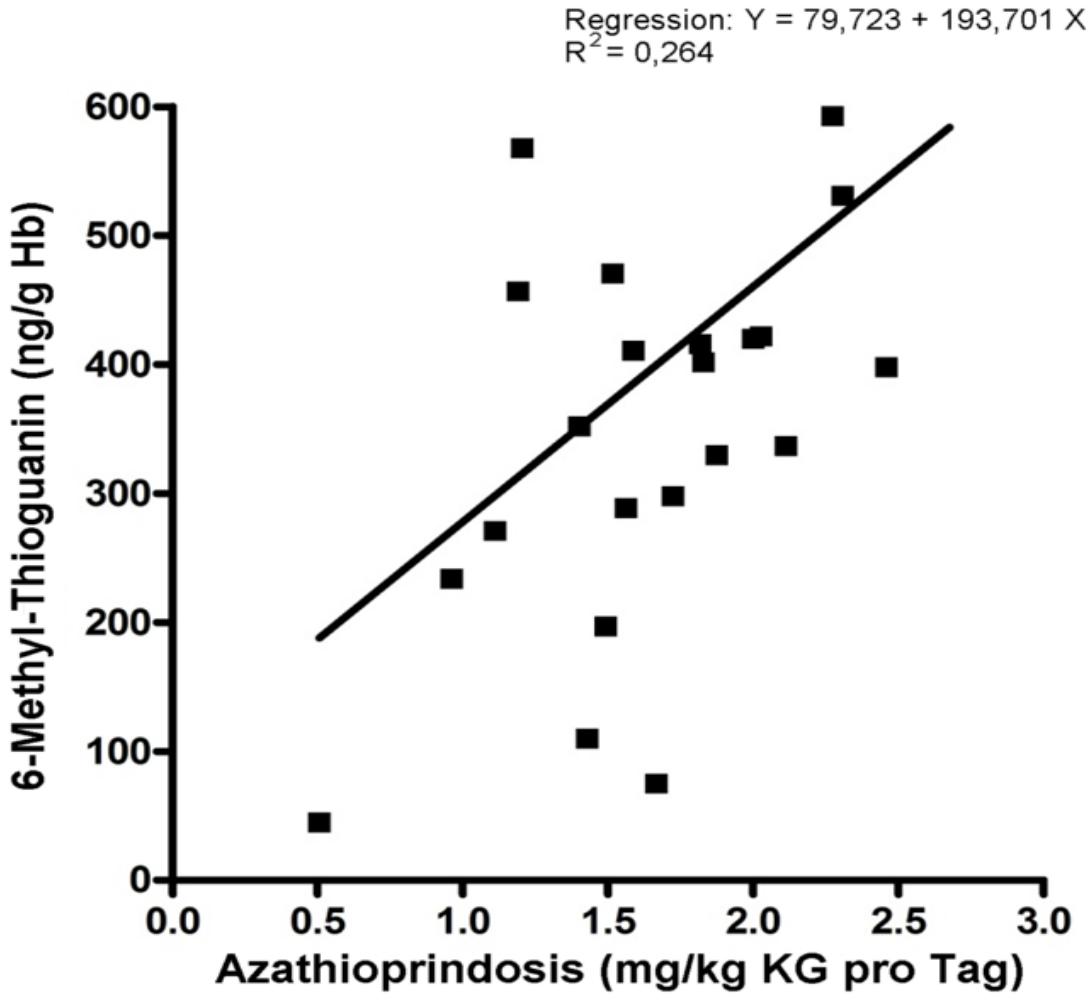

Abbildung 9: Regressionsanalyse zwischen der 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration und der Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn (27 MS-Patienten)

6-Methyl-Mercaptopurin und Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn

Es zeigt sich ein deutlicher und signifikanter Anstieg der 6-MMP-Konzentration mit steigender Azathioprindosis. Dies illustriert die signifikante, positive und deutliche Pearson-Korrelation (r = 0,542; p = 0,003). Die ANOVA-Analyse zeigt zusätzlich eine hohe Varianz der Regressionsgeraden (Quadratsumme: 3,0 x 10^9; Residuen: 5,2 x 10^9; Gesamtvarianz: 8,1 x 10^9; F = 14,302; p = 0,001) mit einem R^2 von 36,4%. Die Azathioprindosis erklärt demnach 36,4% der Varianz der 6-MMP-Konzentration (siehe Abbildung 9), so dass ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Azathioprindosis und der 6-MMP-Konzentration vorhanden ist.

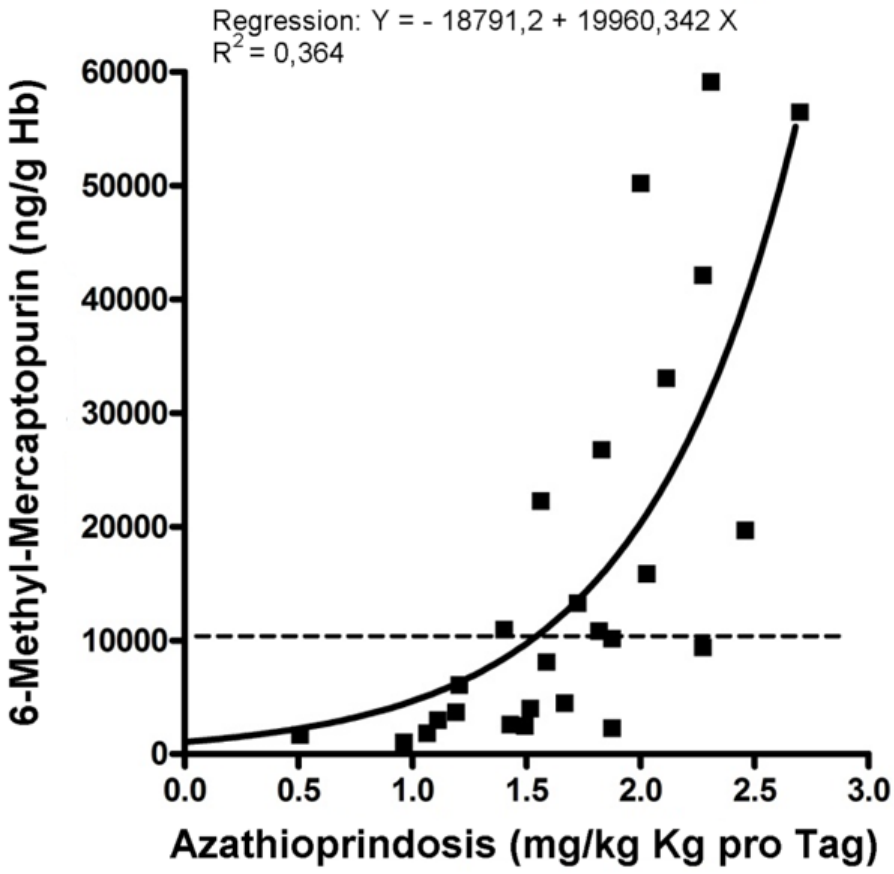

Abbildung 9: Zusammenhang zwischen der 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration und der Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn (27 MS-Patienten); Ab einer Azathioprindosis von 1,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des 6-MMP auf Werte oberhalb von 10.000 ng/g Hb.

6-TG/6-MMP-Quotient und Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn

Es zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Wert des Quotienten aus 6-Thioguanin/6-Methyl-Mercaptopurin (6-TG/6-MMP) mit der steigenden Azathioprindosis (Person: r = -0,142; p = 0,481). Die ANOVA-Analyse zeigt zusätzlich eine niedrige Varianz der Regressionsgeraden (Quadratsumme: 0,00171; Residuen: 0,839; Gesamtvarianz: 0,856; F = 0,512; p = 0,481) mit einem R^2 von lediglich 2%. Die Azathioprindosis erklärt demnach 2% der Varianz des 6-TG/6-MMP-Quotienten (siehe Abbildung 10), so dass kein Zusammenhang zwischen der Azathioprindosis und dem Quotientenwert vorhanden ist.

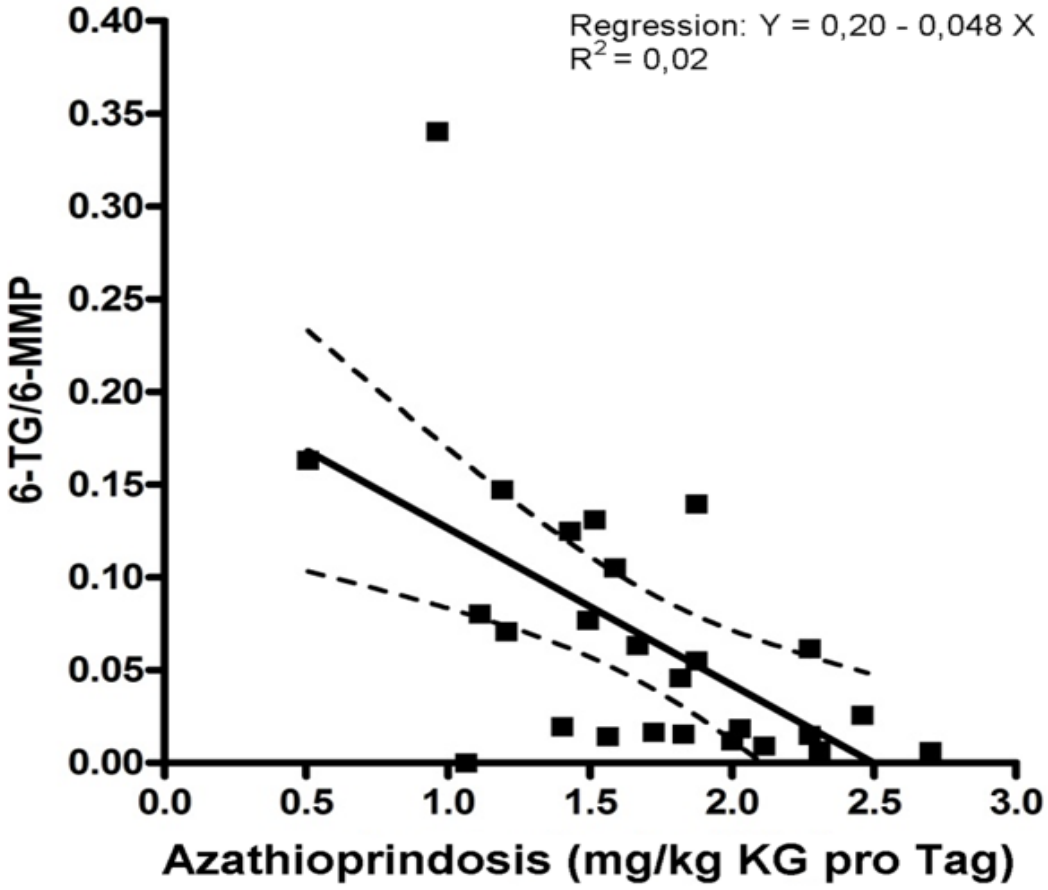

Abbildung 10: Regression zwischen dem 6-Thioguanin/6-Methyl-Mercaptopurin-Quotienten und der Azathioprindosis beim Beobachtungsbeginn (27 MS-Patienten)

3.6. Metabolitenkonzentration in Abhängigkeit von der TPMT-Aktivität und der Azathioprindosierung beim Beobachtungsbeginn

Beim Beobachtungsbeginn betrug die TPMT-Aktivität im Gesamtkollektiv im Median 43 U/g Hb (42,9 ± 1,6 U/g Hb). Teilt man das Kollektiv entlang eines vom TPMT-Median abgeleiteten Wertes in zwei Untergruppen, nämlich in eine mit niedriger (< 45 U/g Hb) und hoher (≥ 45 U/g Hb) TPMT-Aktivität, so resultieren zwei unterschiedlich große Patienten-Subgruppen. Die Gruppe mit niedriger TPMT-Aktivität umfasst 64,3% der Gesamtgruppe; TPMT-Aktivität: 38,4 ± 1,5 U/g Hb; Bereich: 21 - 44 U/g Hb), während die Untergruppe mit hoher TPMT-Aktivität 35,7% der Gesamtgruppe enthielt; TPMT-Aktivität: 51,1 ± 1,1 U/g Hb; Bereich: 47 - 57 U/g Hb).

Ein Vergleich der Metaboliten 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) und 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) zwischen Patienten mit niedriger und hoher TPMT-Aktivität zeigt folgende Resultate. Eine niedrige TPMT-Aktivität führt zu einer deutlich niedrigeren 6-MMP-Konzentration und einer deutlich höheren 6-TG-Konzentration im Vergleich zu Patienten mit hoher TPMT-Aktivität. Allerdings ist der Unterschied der 6-TG-Konzentration zwischen Patienten mit hoher und niedriger TPMT-Aktivität noch nicht statistisch signifikant, während die 6-MMP-Konzentrationsunterschiede die Signifikanzschwelle erreichen. Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität weisen weniger als die Hälfte der durchschnittlichen 6-MMP-Konzentration auf als Patienten mit hoher TPMT-Aktivität - siehe auch Tabelle 17.

Tabelle 17: Vergleich der Metaboliten 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) und 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) zwischen Patienten mit niedriger und hoher TPMT-Aktivität			
Parameter	TPMT-Aktivität niedrig (< 45 U/g Hb)	TPMT-Aktivität hoch (≥ 45 U/g Hb)	p-Wert[1)]
6-TG (ng/g Hb):			0,175
mean ± SEM	493,4 ± 55,4	377,3 ± 49,5	
Median	464	337	
Min.-Max.	221 - 1174	192 - 630	
6-MTG (ng/g Hb):			0,437
mean ± SEM	385,7 ± 43,5	448,4 ± 72,7	
Median	413,5	344,5	
Min.-Max.	45 - 669	197 - 896	
6-MMP (ng/g Hb):			0,045
mean ± SEM	11273,2 ± 2937,0	25034,8 ± 7047,9	
Median	7099	20772,5	
Min.-Max.	904 - 50236	2297 - 59149	

[1)] t-Test für unverbundene Stichproben

Das Gesamtkollektiv kann auch in Bezug auf die Azathioprindosis in zwei Untergruppen geteilt werden. Als Grenzwert (1,5 mg/kg KG pro Tag) wird derjenige Wert verwendet, ab dessen Überschreitung sich eine erhebliche Zunahme der 6-Methyl-Mercaptopurinkonzentration ergeben hat (vgl. Abb.9). Somit ergeben sich neun Patienten mit niedriger Azathioprindosierung (1,2 ± 0,1 mg/kg KG pro Tag; Bereich: 0,5 - 1,49 mg/kg KG pro Tag) sowie 16 Patienten mit hoher Azathioprindosierung (2,0 ± 0,1 mg/kg KG pro Tag; Bereich: 1,52 - 2,69 mg/kg KG pro Tag).

Zwischen beiden Patientengruppen mit niedriger bzw. hoher Azathioprindosis zeigten sich beim Vergleich der Metaboliten 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) und 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) ebenfalls signifikante Unterschiede.

Patienten mit einer unter 1,5 mg/kg KG/Tag liegenden Azathioprindosierung lag die 6-TG-Konzentration und die 6-MTG-Konzentration jeweils etwas niedriger (aber nicht signifikant verschieden) im Vergleich zu Patienten mit einer Azathioprindosis von ≥ 1,5 mg/kg KG/Tag. Patienten mit einer niedrigen Azathioprindosis wiesen jedoch nur 17% der von Patienten mit hoher Azathioprindosis

gezeigten 6-MMP-Konzentration auf. Diese Diskrepanz war statistisch signifikant (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Vergleich der Metaboliten 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) und 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) zwischen Patienten mit niedriger und hoher Azathioprindosis

Parameter	Azathioprindosis niedrig (< 1,5 mg/kg KG/Tag)	Azathioprindosis hoch (≥ 1,5 mg/kg KG/Tag)	p-Wert[1)]
6-TG (ng/g Hb):			0,622
mean ± SEM	417,8 ± 101,6	462,8 ± 39,6	
Median	327	456	
Min.-Max.	192 - 1174	221 - 852	
6-MTG (ng/g Hb):			0,093
mean ± SEM	322,0 ± 69,1	460,0 ± 44,1	
Median	271,0	418	
Min.-Max.	45 - 664	75 - 896	
6-MMP (ng/g Hb):			0,010
mean ± SEM	3718,1 ± 1027,6	21623,6 ± 4469,6	
Median	2615	14578	
Min.-Max.	1049 - 10966	904 - 59149	

[1)] t-Test für unverbundene Stichproben

Da sich im Gesamtkollektiv verschiedene Patienten mit unterschiedlicher TPMT-Aktivität und verschiedenen Azathioprindosierung befanden, war es möglich, insgesamt vier verschiedene Untergruppen im Gesamtkollektiv zu bilden. Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität und niedriger Azathioprindosis (Gruppe A), mit hoher TPMT-Aktivität und niedriger Azathioprindosis (Gruppe B), mit niedriger TPMT-Aktivität und hoher Azathioprindosis (Gruppe C) sowie mit hoher TPMT-Aktivität und hoher Azathioprindosis (Gruppe D) unterschieden sich bei der 6-Thioguanin- und der 6-Methyl-Thioguaninkonzentration nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19: Vergleich der Metaboliten 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) und 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) zwischen Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität und niedriger Azathioprindosis (Gruppe A), mit hoher TPMT-Aktivität und niedriger Azathioprindosis (Gruppe B), mit niedriger TPMT-Aktivität und hoher Azathioprindosis (Gruppe C) sowie mit hoher TPMT-Aktivität und hoher Azathioprindosis (Gruppe D); Grenzwert für TPMT-Aktivität: 45 U/g Hb und für Azathioprindosis: 1,5 mg/g KG/Tag

Gruppenzugehörigkeit	6-TG (ng/g Hb)	6-MTG (ng/g Hb)	6-MMP (ng/g Hb)
Gruppe A (n=6):			
mean ± SEM	518,8 ± 136,4	346,3 ± 103,5	2835,8 ± 747,9
Median	394	345,5	2234
Min.-Max.	279 - 1174	45 - 664	1049 - 6086
Gruppe B (n=3):			
mean ± SEM	215,7 ± 13,9	273,3 ± 44,8	5482,7 ± 2745,4
Median	215	271	2988
Min.-Max.	192 - 240	197 - 352	2494 - 10966
Gruppe C (n=12):			
mean ± SEM	480,7 ± 53,3	405,3 ± 42,9	15491,9 ± 3875,0
Median	502	413,5	12067
Min.-Max.	221 - 852	75 - 669	904 - 50236
Gruppe D (n=6):			
mean ± SEM	427,2 ± 55,3	569,3 ± 90,0	33886,8 ± 9622,1
Median	371	566,5	37608
Min.-Max.	308 - 630	330 - 896	2297 - 59149
p-Wert[1)]	0,229	0,119	0,007

[1)] Oneway-Anova-Analyse (Vergleich zwischen dem vier Gruppen)

Es zeigte sich jedoch beim 6-Methyl-Mercaptopurin, dass Patienten der Gruppe A (niedrige TPMT-Aktivität, niedrige Azathioprindosis) die geringste 6-MMP-Konzentration aufwiesen. Steigerte sich die TPMT-Aktivität bei ansonsten niedriger Azathioprindosis (< 1,5 mg/kg KG/Tag), so nahm die 6-MMP-Konzentration bei diesen Patienten der Gruppe B bereits signifikant zu und verdoppelte sich fast im Vergleich zu Patienten der Gruppe A von ursprünglich 2835,8 ng/g Hb auf 5482,7 ng/g Hb. Lag eine niedrige TPMT-Aktivität (< 45 U/g Hb) vor, wurde aber die Azathioprindosis auf Werte ≥ 1,5 mg/kd KG/Tag gesteigert (Gruppe C), fand eine Verdreifachung der 6-MMP-Konzentration im Vergleich zur Gruppe B bzw. eine Versechsfachung im Vergleich zur Gruppe A statt. Lag sowohl eine hohe TPMT-Aktivität als auch eine hohe Azathioprindosierung vor (Gruppe D), verdoppelte sich die 6-MMP-Konzentration wiederum im Vergleich

zur Gruppe C bzw. versechsfachte sich im Vergleich zur Gruppe B bzw. verzwölffachte sich im Vergleich zur Gruppe A. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant (siehe Tabelle 19 und Abbildung 11).

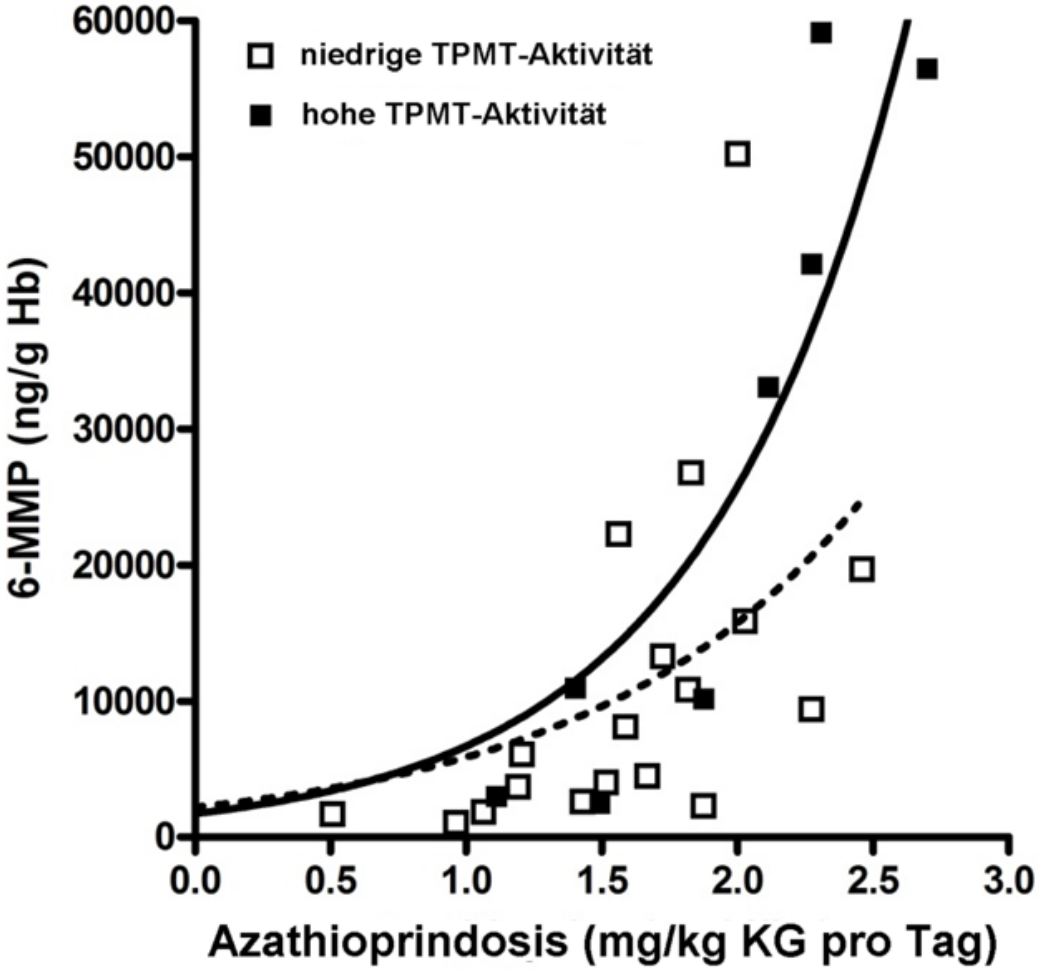

Abbildung 11: 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentration (6-MMP) in Abhängigkeit von der TPMT-Aktivität (niedrig: < 45 U/g Hb; hoch: ≥ 45 U/g Hb) und der Azathioprindosis; mit zunehmender TPMT-Aktivität und steigender Azathioprindosis nimmt die 6-MMP-Konzentration exponentiell zu

3.7. EDSS-Score in Abhängigkeit von der 6-MMP-Konzentration und der

Azathioprindosis

Wie aus der Abbildung 9 hervorgeht, steigt ab einer Azathioprindosis von 1,5 mg/kg KG/Tag die 6-MMP-Konzentration auf Werte über 10.000 ng/g Hb an. Nachfolgend soll nun untersucht werden, ob sich auch die klinische Symptomatik (beschrieben mittels EDSS-Score) bei Patienten mit niedriger bzw. hoher Azathioprindosis (Grenzwert: 1,5 mg/kg KG/Tag) unterscheidet.
Der EDSS-Score (3,4 vs. 2,8 Pkt.) unterschied sich nicht signifikant (t-Test: p = 0,0482) zwischen den Patienten mit hoher Azathioprindosis (≥ 1,5 mg/kg KG/Tag) und jenen mit niedriger Azathioprindosis (< 1,5 mg/kg KG/Tag). Es zeigte sich jedoch tendenziell ein höherer EDSS-Score bei den Patienten mit niedrigerer Azathioprindosis als bei den Patienten mit höherer Azathioprindosis - siehe Abbildung 12.

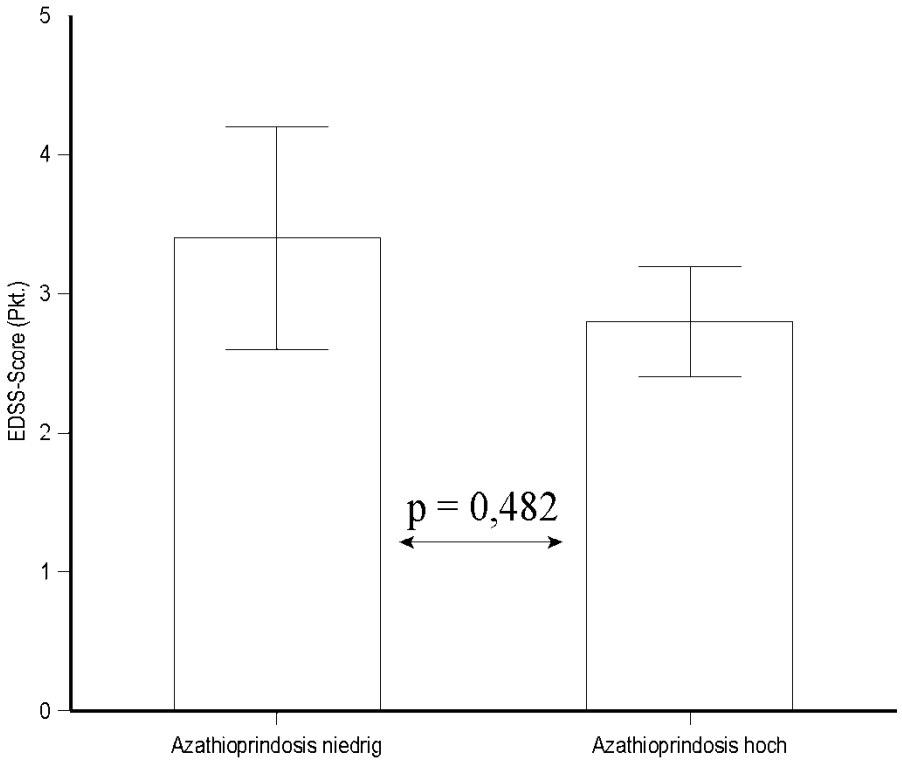

Abbildung 12: Vergleich des EDSS-Scores zwischen Patienten mit niedriger (< 1,5 mg/kg KG/Tag) und hoher (≥ 1,5 mg/kg KG/Tag) Azathioprindosis

Ebenfalls sollte untersucht werden, ob sich der EDSS-Score zwischen Patienten mit niedrigen bzw. hohen 6-Methyl-Mercaptopurin-Konzentrationen (Grenzwert: 10.000 ng/g Hb) unterscheidet. Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied (t-Test: p = 0,963) des EDSS-Scores zwischen den jeweils Patienten mit niedriger (3,2 ± 0,6 Pkt.; Median 2,25 Pkt.; 1,5 - 7 Pkt.) und hoher (3,1 ± 0,5 Pkt.; Median 3 Pkt.; 1 - 7 Pkt.) 6-MMP-Konzentration - siehe auch Abbildung 13.

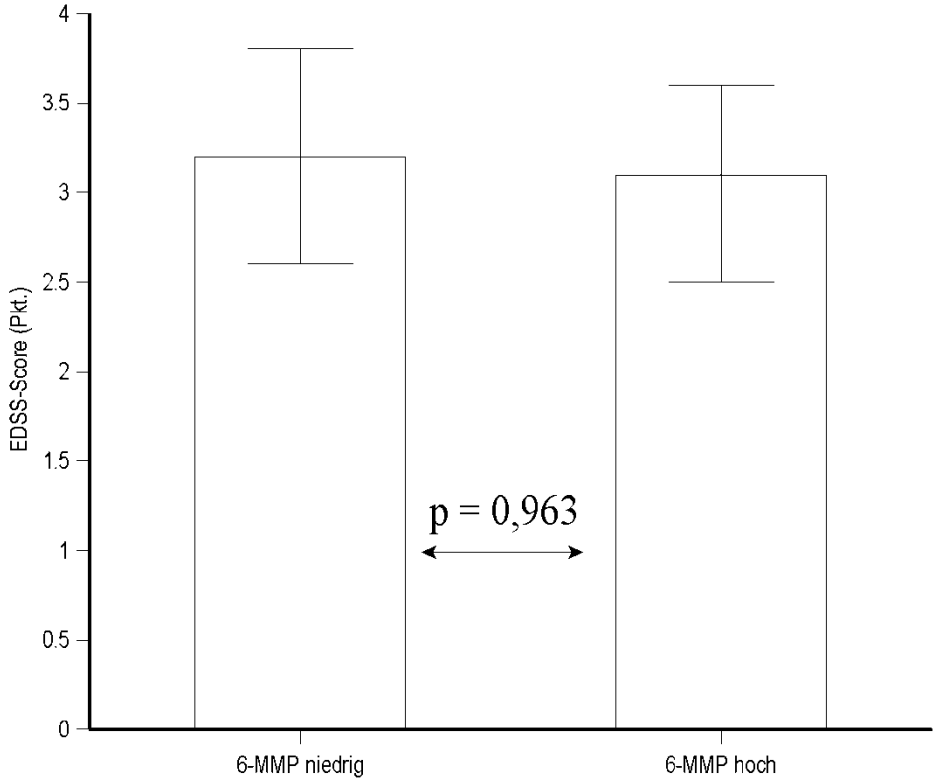

Abbildung 13: Vergleich des EDSS-Scores zwischen Patienten mit niedriger (< 10.000 ng/g Hb) und hoher (≥ 10.000 ng/g Hb) 6-Methyl-Mercaptopurinkonzentration

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, einen Zusammenhang zwischen der klinischen Symptomatik einer Multiplen Sklerose-Erkrankung, die mit standardisierten Instrumenten (EDSS, MSFC) bestimmt worden war, und vier Parametern aus der Labordiagnostik (Thiopurin-S-Methyltransferase-/TPMT-Aktivität, 6-Thioguanin/6-TG-, 6-Methyl-Thioguanin/6-MTG- und 6-Methyl-Mercaptopurin/6-MMP-Konzentration im Serum) herzustellen. Bevor dieses Zusammenhang im Detail diskutiert werden kann, ist es notwendig, über die Art des vorliegenden Studiendesigns methodenkritische Überlegungen anzustellen.

Der Umfang der untersuchten Patientengruppe war mit 25 Personen niedrig. Die Ursache für die niedrige Fallzahl lag an den strengen Ein- bzw. Ausschlusskriterien für die Studienteilnehmer. Aufgrund der Notwendigkeit, Analysen aus Blutproben der Patienten auswerten zu müssen, die nach einem definierten Mindestzeitabstand (6 Monate) abgenommen werden mussten, machte die Auswahl der Patienten problematisch. Zum einen mussten die Patienten vor der ersten Blutabnahme bereits mindestens sechs Monate Azathioprin eingenommen haben, zum zweiten mussten die Patienten mindestens sechs Monate nachbeobachtet worden sein. Es standen im Studienzeitraum nicht ausreichend Fälle zur Verfügung, bei denen entsprechend vollständige Untersuchungen aller in Frage kommenden Laborparameter sowie der MS-Diagnoseinstrumente dokumentiert werden konnten. Dies erklärt die vergleichsweise niedrige Fallzahl. Angesichts des Umstandes, dass die vorliegende Arbeit lediglich eine Voruntersuchung darstellt, die bei einem positiven Resultat die Basis für weitere künftige prospektive Untersuchung darstellt, ist die eingeschränkte Fallzahl von beobachteten Patienten jedoch gerechtfertigt. Methodenkritisch stellt sich dann jedoch die Frage, ob das eigene Patientenkollektiv wegen der geringen Kollektivgröße hinsichtlich der demographischen Struktur wirklich repräsentativ für MS-Patienten ist.

Die Struktur des Patientenkollektivs mit multipler Sklerose in der eigenen Arbeit zeigte ein deutliches Überwiegen des weiblichen Geschlechts gegenüber männlichen Patienten (80% vs. 20%). Diese Diskrepanz wird auch in großen epidemiologischen Studien mit über tausend Studienteilnehmern bestätigt. Flachenecker et al. (2005) geben eine Geschlechtsrelation (w:m) von 72%:28% an, Weinshenker et al. (1989) beschreiben eine Relation von 66%:34%. Auch in kleineren Studien mit Patientenkollektiven unter 1000 Personen fand sich ein deutliches Überwiegen des weiblichen Geschlechts gegenüber dem männlichen Geschlecht. Dies war bei Hass et al. (2003) (76% zu 24%) und Kobelt et al. (2001) (73% zu 27%) sowie bei Pittock et al. (2004) (70% zu 30%) der Fall. Insofern entspricht die eigene Geschlechtsverteilung der Literatur und dies belegt, dass es sich um eine repräsentative MS-Patienten-Stichprobe handelt. Bestärkt wird diese Ansicht auch durch das Erkrankungsalter der Patienten bei Erstdiagnose, die in der eigenen Arbeit bei durchschnittlich 49,1 ± 1,8 Jahren lag. Damit liegen die eigenen Patienten zwar am oberen Ende der Literaturangaben, denn Pittock et al. (2004) geben hier ein Alter von 51,8 Jahren, während Kobelt et al. (2001) ein Durchschnittsalter von 41,9 ± 11,4 Jahren berichten. Allerdings zeigen fallstarke Studien Durchschnittsalter um 42 Jahre (Flachenecker et al., 2005: 42,9 ± 11,2 Jahre; Weinshenker et al. 1989: 42,4 ± 9,9 Jahre), und noch immerhin einige hundert Patienten umfassende Studien wie jene von Haas et al. (2003) mit 47,4 ± 12,3 Jahren bzw. wie jene von Rodriguez et al. (1994) mit 47,5 Jahren ein Durchschnittsalter, was ziemlich genau den eigenen Angaben entspricht. Dies belegt zusätzlich zur Geschlechtsverteilung, dass trotz der niedrigen Fallzahl in der eigenen Studie deren demographische Patientenstruktur den in deutlich fallstärkeren Studien entspricht und deshalb für MS-Patienten als repräsentativ angesehen werden kann.

Da das eigene Kollektiv als repräsentativ für MS-Patienten angesehen werden kann, muss methodenkritisch die Frage diskutiert werden, ob jene Testinstrumente, die für die Beurteilung des Verlaufs der Erkrankung eingesetzt wurden, valide und brauchbar sind. Diesem Problem wird nachfolgend nachgegangen.

Besondere Bedeutung bei der Diagnostik einer Multiplen Sklerose hat die Objektivierung der die Erkrankung charakterisierenden klinisch- neurologischer Ausfälle. Diese zeigen zentralnervöse Störungen an und bieten letztlich den klinischen und paraklinischen Nachweis für eine korrekte Diagnose. Die Definition eines Erkrankungsschubes (mindestens 24 Stunden andauernd, Zeitintervall von ≥ 30 zum Beginn vorausgegangener Schübe, Schübe nicht durch eine Änderung der Körpertemperatur oder im Rahmen von Infektionen erklärbar) muss dabei genau beachtet werden, denn sie ist entscheidend für die Indikation einer verlaufsmodifizierenden Behandlung u.a. mit Azathioprin (Gold und Hartung 2008). In der eigenen Studie war dieses Problem nicht gravierend, da die ausführliche Diagnosesicherung bereits im Rahmen des stationären Aufenthaltes der Patienten erfolgt war, deren Daten später durch die Autorin ausgewertet werden konnten. Um jedoch die Erkrankungsschwere der Patienten zu quantifizieren, wurden aus den Unterlagen die Angaben zum Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983) erhoben. Es handelt sich hierbei um ein leitliniengerechtes Verfahren zur Erfassung klinisch-neurologischer Symptome oder Störungen im Bereich der Pyramidenbahn, des Kleinhirns, des Hirnstammes und des Sensoriums und dient auch der Erfassung der Blasen- und Mastdarmfunktion, der Sehfunktion und zerebraler Funktionen. Es ist ein Bewertungsschema, dass häufig in Studien zur Untersuchung von MS-Patienten eingesetzt wird. Nach Daumer et al. (2009) ist der EDSS das am häufigsten verwendete Bewertungsschema in klinischen Studien zur Multiplen Sklerosis, jedoch hat er den Nachteil, Veränderungen der Erkrankung über jene relativ kurzen Beobachtungszeiträume signifikant nachzuweisen, die bei derartigen Studien üblich sind. Dieses Problem ergab sich auch in der eigenen Studie. So konnte zwischen dem ersten und zweiten Beobachtungszeitpunkt, zwischen dem im Mittel 212 Tage verstrichen waren, keine signifikante Veränderung des EDSS-Scores nachgewiesen werden (2,92 auf 2,86 Punkte; $p = 0,737$).

Die motorischen Funktionen des MS-Patienten wurden mit Hilfe des Multiple Sclerosis Functional Composite-(MSFC)-Skala bewertet. Dieses ebenfalls in von einer Leitlinie (Gold und Hartung, 2008) empfohlene Bewertungssystem

erlaubt einen inter- und intraindividuellen Vergleich der Beeinträchtigung des Patienten (Schwid et al., 2002). Der Z-Score des MSFC korreliert nach Polman und Rudick (2010) mit dem EDSS sehr gut und ebenso mit Veränderungen des Patienten im MRT. Da die Anwendung des MSFC bei MS-Patienten sowohl bei Erkrankungsbeginn als auch im jährlichen Abstand empfohlen wird (Gold und Hartung, 2008), handelt es sich also um ein zuverlässiges Verfahren, dass eine Aussage über die Veränderung der Erkrankung zulässt. Dass in der eigenen Untersuchung der MSFC-Score sich analog zum EDSS zwischen dem ersten und zweiten Beobachtungszeitpunkt nicht signifikant verändert hat, dürfte einerseits an der guten Korrelation mit dem EDSS liegen (der sich während der 212tätigen Beobachtungsphase selbst nicht änderte) und andererseits wiederspiegeln, dass der Erkrankungszustand der Patienten sich während der vergleichsweise kurzen Beobachtungsdauer kaum verschlechtert hat.

In Bezug auf die Verwendung des EDSS und des MSFC kann also angenommen werden, dass es sich um häufig verwendete, standardisierte und valide Bewertungsschemata handelt. Der EDSS ist jedoch in Übereinstimmung mit der Literatur nicht geeignet, über einen relativ kurzen Zeitraum nur geringe Venderungen der Symptomatik der MS-Patienten abzubilden. Hinzu kommt das Problem, dass die Multiple Sklerose eine Erkrankung ist, die örtlich und zeitlich disseminiert und mit stark fluktuierenden Symptomen verbunden ist, die sich über eine relativ lange Erkrankungsdauer hinweg konsekutiv verschlechtern. Deshalb ist es für jedes Bewertungsschema eine Herausforderung, den Verlauf der Erkrankung genau abzubilden oder moderate bzw. nur leichte positive Wirkungen einer medikamentösen Therapie bei einer sich ständig verschlechternden Grunderkrankung exakt zu quantifizieren.

Für künftige Studien wäre deshalb eine Verbesserung bzw. Entwicklung neuerer Bewertungsschemata erforderlich. Ausführlich geprüfte Alternativen zu den eingesetzten Bewertungsschematas bei MS-Patienten gibt es jedoch bisher noch nicht, so dass dieses Problem für künftige Forschungsvorhaben bestehen bleibt.

Unter dem Gesichtspunkt der geringen Sensivittät des EDSS für den Nachweis verwundert es also nicht, dass die Antwort auf die erste Forschungsfrage der eigenen Arbeit (= kommt es zu Veränderungen des EDSS-Wertes bei MS-Patienten zwischen den zwei Zeitpunkten einer Azathioprintherapie) klar verneint werden muss. Dieses Ergebnis erscheint in Widerspruch zu Studien wie jener von Etemadifar et al. (2007) zu stehen, die bei MS-Patienten mittels einer 12monatigen Azathioprintherapie eine signifikante Reduktion des EDSS um 0,46 Einheiten nachweisen konnten. Allerdings ist die Beobachtungszeit der eigenen Patienten mit durchschnittlich 212 Tagen erheblich kürzer gewesen. Da die Übersichtsarbeit von Cendrowski (2001) für Azathioprin eine deutliche Zeitverzögerung bis zum Wirkungseintritt sowie einen Wirkverlust im dritten Jahr einer kontinuierlichen Therapie angibt, dürfte die fehlende signifikante Veränderung des EDSS auf eine zu kurze Beobachtungszeit zurückzuführen sein.

Die weitere Frage, ob es zwischen den beiden Beobachtungszeitpunkten zu Veränderungen des MSFC-Scorewertes bei MS-Patienten unter Azathioprintherapie kommt, muss ebenfalls negativ beantwortet werden. Da beim ersten Beobachtungszeitpunkt (+0,063) der Z-Score des MSFC nur geringgradig höher ausfiel als beim zweiten Beobachtungszeitpunkt (-0,063), ist keinerlei relevante Veränderung eingetreten. Zwar spräche der negativere Z-Score beim zweiten Beobachtungszeitpunkt für eine Verschlechterung des Zustandes der Patienten, aber der Unterschied ist zu gering, um klinisch von Bedeutung zu sein. Da Mezei et al. (2006) auf der Basis einer Langzeituntersuchung davon ausgehen, dass der MSFC bei MS-Patienten deutlich sensitiver für den Nachweis klinischer Veränderungen als der EDSS ist, lässt dies bei den eigenen Daten vermuten, dass sich die scheinbar widersprechenden Ergebnisse des EDSS und MSFC (EDSS zeigt eine marginale Verbesserung der Patienten an, der MSFC hingegen eine marginale Verschlechterung) nicht widersprüchlich sind. Da der MSFC nach Cohen (2000) eine hohe interpersonelle Realibilität (0,97) und initerpersonelle Realibilität (0,5) hat, während EDSS-Testresultate stark vom Untersucher abhängig sind, könnte sich die Widersprüche zwischen der Aussage des EDSS und MSFC in der eigenen Studie auf einen leicht

verfälschenden Einfluss von unterschiedlichen Unter-suchern der Patienten zurückführen lassen. Wahrscheinlicher ist jedoch der Umstand, dass der verlässlichere MSFC einfach die besseren Aussagen über Veränderungen des klinischen Zustandsbildes des Patienten liefert und deshalb keine signifikanten Veränderungen vorhanden waren, weil der genauere MSFC keine solchen Veränderungen nachweisen konnte.

Die nächste zu klärende Frage der vorliegenden Studie war, ob der Verlaufstyp der Multiplen Sklerose (Relapsing Remitting/RR; Relapsing Remitting Secondary Progression/RRSP; Primary Progression/PP) einen Einfluss auf den MSFC- bzw. EDSS-Scorewert zu beiden Beobachtungszeitpunkten hat. Diese Frage muss separat für den EDSS und MSFC separat betrachtet werden.
Sowohl beim ersten als auch beim zweiten Beobachtungszeitpunkt zeigten MS-Patienten mit RRSP-Typ deutlich zum Teil auch bereits statistisch signifikant schlechtere EDSS-Werte als Patienten mit PP- und RR-Multipler Sklerose. Am günstigsten hinsichtlich der Symptomatik schnitten die Relapsing Remitting-MS-Patienten ab.
Relapsing-Remitting-MS-Patienten wiesen nach der im Mittel etwa siebenmonatigen Azathioprinbehandlung eine geringgradige Verschlechterung des EDSS auf (2,19 auf 2,28 Punkte; Median 1,5 auf 2,0 Punkte). Milanese et al. (2001) konnten bei 10 RR-MS-Patienten (2 männlich, 8 weiblich) über einen einjährigen Zeitraum eine Verbesserung des EDSS von 2,35 auf 2,1 Punkte feststellen. Diese geringgradigen Diskrepanzen erklären sich möglicherweise primär aus dem Effekt heraus, dass RR-MS-Patienten häufig kurzfristige Veränderungen der klinischen Symptomatik zeigen und diese durchaus auch zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten gerade bei kleinen Kohorten so deutlich sein können, dass sie zu leicht unterschiedlichen Studienaussagen führen. Gemeinsam ist den eigenen Ergebnissen mit jenen von Milanese et al. (2001) jedoch, dass der EDSS kaum Veränderungen anzeigt, da er, wie eine Analyse der Ian McDonald MS Database zeigt (Daumer et al. 2009) nur eingeschränkt tauglich für die Untersuchung von MS-Patienten mit Relapsing

Remitting-Typ und vor allem mit Relapsing Remitting Secondary Progression-Typ ist.
Die Daten der eigenen Studie illustrieren, dass jedoch eine deutliche Tendenz sowohl im EDSS- als auch im MSFC-Bewertungsschema dafür besteht, dass RRSP-Patienten die schlechtesten Werte von allen drei Erkrankungstypen aufweisen. Am günstigen liegen die RR-Patienten und die Primary Progression-Patienten nehmen eine Mittelstellung ein. Dies bildet den hinlänglich bekannten Effekt ab, dass RRSP-Patienten, die etwa 15% aller MS-Fälle stellen, den schlechtesten Erkrankungsverlauf zeigen (Daumer et al., 2009). Dieses spiegelt sich auch in der eigenen Studie wieder, wenngleich der Beobachtungszeitraum zu kurz ist, um signifikante Unterschiede von EDSS und MSFC zwischen dem ersten und zweiten Beobachtungszeitpunkt nachweisen zu können.

Azathioprin ist ein immunsuppressiv wirkendes Medikament, dass zur Behandlung von MS-Patienten mit RR-Verlaufstyp häufig verwendet wird (Terribas und Gonzalez-Guijarro, 2002). Diese Anwendungshäufigkeit ist auch vor dem Hintergrund der hohen Kosten für eine Therapie mit β-Interferonen zu sehen. In vivo wird Azathioprin schnell in 6-Mercaptopurin (6-MP) überführt und danach mit drei unterschiedlichen Stoffwechselwegen abgebaut. Die Thiopurin-methyltransferase (TPMT) katalysiert die S-Methylierung von 6-MP in 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP). Die Xanthinoxidase katalysiert die Oxidation von 6-MP zu biologisch inaktiven Metaboliten. Die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase, gefolgt von der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase und der Guanosin-Monophosphat-Synthetase überführen 6-MP in 6-Thioguanin-Nukleotide (6-TGNs) als aktive Metaboliten, die immunmodulatorische Wirkung entfalten. Es ist schon länger bekannt, dass die 6-TGNs hauptsächlich zur Zytotoxizität des Azathioprins beitragen, da sie letztlich in die DNA und RNA eingebaut werden (Tidd und Paterson, 1974). Die Aktivität der TPMT schwankt interindividuell sehr stark, was auf einen genetischen Polymorphismus zurückzuführen ist (Weinshilboum und Sladek, 1980; Erb et al., 1998). Die Allele $TPMT^{H}$ und $TPMT^{L}$ kodieren für eine hohe bzw. niedrige Enzymaktivität und werden

autosomal kodominant vererbt. Aus dem Wildtyp in homozygoter Form ($TPMT^H/TPMT^H$) resultiert phänotypisch eine normale Enzymaktivität, die mit einer Häufigkeit von 89% anzutreffen ist. Etwa 10-11% der kaukasischen und afro-amerikanischen Bevölkerung weist nach Krynetski und Evans (1999) eine verminderte TPMT-Aktivität auf ($TPMT^H/TPMT^L$) und bei etwa 0,3% der Bevölkerung findet sich eine genetisch bedingte TPMT-Defizienz ($TPMT^L/TPMT^L$). Eine TPMT-Minderaktivität führt zur Akkumulation von 6-Thioguanin-Nukleotiden und erhöhter Toxizitäts- bzw. Nebenwirkungsrate unter Azathiopringabe (Tidd und Paterson, 1974). Bei Unterschreitung eines Grenzwertes von 23,5 U/g Hb ist nach Kröplin et al. (1998) eine intermediäre TPMT-Aktivität ($TPMT^H/TPMT^L$) anzunehmen, oberhalb davon ist von einer hohen TPMT-Aktivität ($TPMT^H/TPMT^H$) auszugehen. Da in der eigenen Studie die mittlere TPMT-Aktivität zwischen 41,9 bis 43,4 U/g Hb lag und nur ein Patient eine TPMT-Aktivität von 21 U/g Hb (erster Beobachtungszeitpunkt) bzw. 23 U/g Hb (zweiter Beobachtungszeitpunkt) aufwies, liegt der Anteil von Patienten mit intermediärer TPMT-Aktivität bei 4%, während jener mit hoher Aktivität bei 96% liegt. Dies unterscheidet sich deutlich von der durch Kröplin et al. (1998) berichteten Häufigkeit von 14,1% intermediärer sowie 83,6% hoher TPMT-Aktivität bei 219 gesunden deutschen Blutspendern.

Allerdings liegt die bei den eigenen Patienten gemessene durchschnittliche TPMT-Aktivität nur ein wenig höher als diejenige von Kröplin et al. (1998), die von 38,8 U/g Hb (1,3 - 68,3 U/g Hb) berichten. Leider konnten in der eigenen Arbeit keine Aussagen über den genetischen TPMT-Typ der Patienten getroffen werden, da entsprechende Untersuchungen nicht vorgenommen wurden.

Es zeigt sich in der Literatur, dass bei MS-Patienten die TPMT-Aktivität generell niedriger ist als bei Patienten mit anderen Erkrankungen, die durch eine genetische Abberation der TPMT-Aktivität nicht zu erklären ist. So berichten Terribas und Gonzalez-Guijarro (2002) auf der Basis von 3640 Blutproben spanischer Patienten, dass die TPMT-Aktivität von Gesunden (19,9 ± 6,3 U/ml Erythrozyten) in etwa jener von Patienten mit M. Crohn (20,0 ± 5,8 U/ml Erythrozyten) und ulcerativer Colitis (19,7 ± 6,1 U/ml Erythrozyten) entspricht, während MS-Patienten eine signifikant niedrigere Aktivität von 17,1 ± 6,1 U/ml

Erythrozyten aufwiesen. Da anzunehmen ist, dass die Verteilung von Personen mit normaler, intermediärer oder defizienter TPMT-Aktivität in allen diesen Erkrankungsgruppen ähnlich hoch sein dürfte, liegt die Vermutung nahe, dass andere Faktoren für die deutlich niedrigere TPMT-Aktivität bei MS-Patienten verantwortlich sein könnten.

Aus diesem Grund ist es für die eigene Arbeit von Bedeutung zu klären, ob ein Zusammenhang zwischen der Thiopurin-S-Methyltransferase-Aktivität und der Konzentration der Metabolite 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin besteht. Zunächst ist zu betonen, dass die eigenen Patienten unter Azathioprintherapie eine im Vergleich zu Terribas und Gonzalez-Guijarro (2002) deutlich höhere TPMT-Aktivität aufwiesen (1. Beobachtungszeitpunkt: 43,4 ± 1,7 U/g Hb; 2. Beobachtungszeitpunkt: 41,9 ± 1,34 U/g Hb), die jedoch über den Beobachtungszeitraum, allerdings nicht statistisch signifikant, leicht abgenommen hatte. Die Reduktion der TPMT-Aktivität, bezogen auf den Mittelwert, betrug etwa 4%. Die TPMT-Aktivität war zwischen Patienten unterschiedlichem MS-Verlaufstyp (Relapsing Remitting; Relapsing Remitting Secondary Progression; Primary Progression) nicht signifikant verschieden und es fand sich keinerlei signifikante Korrelation zwischen TPMT, 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin und dem Patientenalter bei Studienbeginn, dem Patientenalter bei MS-Diagnosestellung oder der Erkrankungsdauer der MS. Diese Einflussfaktoren scheiden demnach als Erklärung für eine möglicherweise unterschiedliche TPMT-Aktivität aus.

Was wir allerdings nachweisen konnten, war eine negative und signifikante Korrelation zwischen TPMT-Aktivität und 6-TG-Konzentration beim ersten Beobachtungszeitpunkt ($r = -0,486$; $p = 0,014$). Dies bedeutet, dass mit sinkender TPMT-Aktivität, also der Einschränkung des primären metabolischen Abbauweges von 6-Mercaptopurin, der anabole Abbauweg des 6-Mercaptopurins an Bedeutung gewinnt. Gleichzeitig konnte beim ersten Beobachtungszeitpunkt festgestellt werden, dass die TPMT-Aktivität nicht mit der 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration zusammenhängt ($r = 0,190$; $p = 0,364$) bzw. dieser Zusammenhang nur marginal ausgeprägt ist. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass unter physiologischen Bedingungen nur sehr wenig 6-Thioguanin durch die TPMT in

6-MTG überführt wird (Kröplin et al., 1998) und der primäre Abbauweg des über Azathioprin eingebrachte 6-Mercaptopurin primär über die TPMT zu 6-Methyl-Mercaptopurin verstoffwechselt wird. Allerdings kann ein widersprüchliches Resultat beim ersten Beobachtungszeitpunkt nicht erklärt werden. Es zeigte sich nämlich, dass die 6-TG- und die 6-MTG-Konzentration positiv, signifikant und ausgeprägt miteinander korrelierten ($r = 0,619$; $p = 0,001$). Da 6-TG durch die TPMT in 6-MTG überführt werden kann, würde die beobachtete starke Korrelation der 6-TG- und 6-MTG-Konzentration bedeuteten, dass beide Sub-stanzen gleichzeitig ansteigen könnten, wenn auf der einen Seite der primäre metabolische Abbauweg von 6-Mercaptopurin via TPMT zu 6-MMP einge-schränkt/blockiert wäre und gleichzeitig der 6-Mercaptopurinabbau verstärkt über den sekundären (anabolen) Abbauweg zu 6-TG erfolgen würde. Da 6-TG nur durch TPMT in 6-MTG überführt werden kann, kann dies aber bei einem für einen 6-TG-Anstieg notwendigen TPMT-Mangel gar nicht möglich sein. Ein TPMT-Mangel bzw. eine Reduktion der TPMT-Aktivität führt zwar zur Erhöhung des 6-TG, aber kann nicht gleichzeitig zur Erhöhung des 6-MTG führen (vgl. Abbildung 3). Dieses widersprüchliche Resultat ergab sich beim zweiten Beobachtungszeitpunkt nicht mehr. Warum dieses Phänomen beim ersten Beobachtungszeitpunkt überhaupt auftrat, kann anhand der eigenen Daten zunächst nicht erklärt werden.

Eine weitere Frage, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung geklärt werden sollte, war ein möglicher Zusammenhang zwischen der klinischen Symptomatik der Patienten (validiert anhand des EDSS bzw. MSFC) und der TPMT-Aktivität bzw. der Konzentration der Azathioprin-Metabolite 6-Thioguanin, 6-Methyl-Thioguanin und 6-Methyl-Mercaptopurin.

Eine Bewertung der klinischen Symptomatik konnte entweder mit dem EDSS oder mit dem mit dem MSFC erfolgen. Das Problem mit der Bewertung durch den Z-Score des MSFC bestand jedoch darin, dass eine Graduierung dieses Scores nicht existiert. Im Gegensatz zum EDSS ist es beim MSFC nicht möglich, eindeutige Grenz-/Normwerte für das Vorliegen einer unauffälligen, leichten, mäßiggradigen oder starken klinischen Symptomatik festzulegen.

Ursächlich dafür ist der Umstand, dass der MSFC-Score als relative Abweichung zu einem Durchschnittswert eines Referenzkollektivs von Fischer et al. (1999) berechnet wird. Es wird bewertet, um wieviele Standardabweichungen der Z-Score des eigenen MS-Kollektivs sich vom durchschnittlichen Z-Score der Referenzpopulation unterscheidet. Man hätte zwar willkürlich festlegen können, dass beispielsweise eine Abweichung des MS-Kollektivs von der Referenzpopulation um keine, eine, zwei oder drei Standardabweichungen einer Bewertung einer unauffälligen (SD = 0), leichten (SD = 1), mäßiggradigen (SD = 2) oder starken (SD = 3) entsprochen hätte. Aber diese Einteilung wäre nicht validiert und damit wertlos gewesen. Zudem tat sich ein weiteres Problem auf. Kein einziger MS-Patient wies eine der Graduierungen von leicht bis stark (SD 1 bis 3) auf. Sämtliche MS-Patienten hatten vielmehr nur Graduierung im Bereich von "unauffällig" (SD = 0), so dass nur eine einzige Bewertungs-Untergruppe vorhanden war. Ein Vergleich der Laborparameter zwischen unauffälligen und auffälligen MS-Patienten wäre mangels auffälliger Fälle einfach nicht möglich gewesen. Deshalb wurde der MSFC Z-Score nicht in Beziehung mit den vier erhobenen Laborparametern gesetzt.

Die Graduierung des EDSS war jedoch im Gegensatz zum MSFC möglich, da sich nach Kurtzke (1983) eindeutige Grenzen auf der 10-Punkte-EDSS-Skala ziehen lassen. Wir bildeten zum Zwecke des Erreichens ausreichender Patientenzahlen insgesamt drei Bewertungsgruppen (unauffällig, leichte Einschränkung sowie mäßige bis stärkere Einschränkung) und verglichen zu beiden Beobachtungszeitpunkten die vier Laborparameter zwischen diesen Untergruppen. Auch wenn überwiegend keine signifikanten Unterschiede der vier Laborparameter zwischen den drei EDSS-Klassen auftraten, kann aus den ermittelten Daten (vgl. Tabelle 16) eine minimale Reduktion der TPMT-Aktivität mit ansteigendem EDSS abgeleitet werden. Dies gilt sowohl für den ersten als auch den zweiten Beobachtungszeitpunkt. Beim Verlauf des 6-Thioguanin hingegen gibt es einen geringgradigen Abfall mit steigendem EDSS beim ersten Beobachtungszeitpunkt, während beim zweiten Beobachtungszeitpunkt ein geringgradiger Anstieg zu erkennen ist. Beim 6-Methylthioguanin weisen die Patienten mit unauffälligem EDSS die höchsten Werte auf, während

Patienten mit leichter bzw. mindestens mäßiggradiger Einschränkung signifikant niedrigere 6-MTG-Werte aufweisen. Beim zweiten Beobachtungszeitpunkt ist diese Veränderung nicht mehr signifikant, es zeigt sich sogar ein marginaler Abfall des 6-MTG-Spiegels von Patienten mit unauffälligen EDSS bis hin zu den Patienten mit mindestens mäßiggradider Einschränkung. Der Verlauf des 6-MMP ist sowohl beim ersten als auch beim zweiten Beobachtungszeitpunkt uneinheitlich und bietet keine signifikante Veränderung. Für die geringen Veränderungen der Laborparameter zwischen den drei EDSS-Stufen dürfte der Effekt der groben Skalierung des EDSS von Bedeutung sein. Offenbar ist dieser nicht in der Lage, geringgradige Veränderungen der klinischen Symptomatik mit ausreichender Trennschärfe abzubilden und dieser Mangel spiegelt sich nun auch bei den Laborparametern wieder. Es wäre auch möglich, dass diese geringe Trennschärfe ursächlich für die zum Teil uneinheitlichen und widersprüchlichen Konzentrationswerte der Laborbefunde ist.

Es wäre naheliegend, anzunehmen, dass mit steigender Azathioprindosis, die zu einem erhöhten Anfall von 6-Mercaptopurin führt, auch die Aktivität des das 6-MP abbauenden TPMT zunehmen müsste. Dies ist aber anhand der eigenen Resultate nicht anzunehmen, denn die Regressionsanalyse (vgl. Abbildung 7) zeigt nur einen marginalen und sehr geringen Zusammenhang zwischen Arzneimitteldosis pro kg Körpergewicht pro Tag und der TPMT-Aktivität. Dies mag darin begründet sein, dass offensichtlich der Zusammenhang zwischen eingenommener Azathioprindosis und 6-Thioguaninkonzentration ebenfalls nur gering ausgeprägt ist (vgl. Abbildung 8). Was jedoch pharmakologisch von Interesse ist, ist der Umstand, dass die Azathioprindosis deutlich und in erheblichem Umfang mit der 6-Methyl-Thioguanin-Konzentration verbunden ist (vgl. Abbildung 9). Daraus lässt sich folgern, dass mit zunehmender Azathioprindosis die TPMT-Aktivität dahingehend gesteigert wird, dass nicht primär der Abbau von 6-Mercaptopurin zu 6-Methyl-Mercaptopurin erfolgt, sondern der sekundäre anabole Abbauweg über eine Erhöhung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGRPT) in Richtung 6-Thioguanin erfolgt, was dann wiederum zu einem Anstieg des 6-Thioguanins führt, welches dann

wiederum durch TPMT in 6-Methyl-Thioguanin überführt wird. Leider wurde in der vorliegenden Studie die Aktivität der HGRPT nicht bestimmt, so dass diese Vermutung nicht belegt werden kann. Anderseits legt der bereits vorhin angedeutete scheinbare Widerspruch (positive Korrelation zwischen 6-TG und 6-MTG beim ersten Beobachtungszeitpunkt, vgl. Tabelle 13) diese Erklärung der selektiven Aktivitäts-erhöhung der HGRPT nahe. Nur so erklärt sich, dass eine verringerte TPMT-Aktivität zu einer erhöhten 6-TG-Konzentration führt und es gleichzeitig der Effekt zu beobachten ist, dass die 6-TG- und die 6-MTG-Konzentration gemeinsam steigen bzw. fallen können. Ob dies jedoch wirklich zutrifft, kann nicht ausgesagt werden.

Von erheblicher Bedeutung ist deshalb die Frage, ab welcher Azathioprindosis eine Steigerung der TPMT-Aktivität im Rahmen des primären metabolischen Abbauweges auftritt, die durch einen verstärkten Abbau von 6-Mercaptopurin via TPMT zu 6-Methyl-Mercaptopurin führen würde. Die eigenen Daten legen nahe (vgl. Abbildung 9), dass dies bei etwa 1,5 mg Azathioprin pro kg Körpergewicht pro Tag der Fall ist. Allerdings ist dies Grenzziehung insofern willkürlich, als dass sie sich am Medianwert des 6-MMP orientiert. Etwa 50% der geprüften Laborproben hatten einen 6-MMP-Wert ober- bzw. unterhalb von 10.000 ng/g Hb. Bei dieser Grenze lag die entsprechende Azathioprindosis in etwa bei 1,5 mg/kg KG/Tag.
Um herauszufinden, was eine niedrige und hohe TPMT-Aktivität für Auswirkungen auf die Metabolisierungswege des Azathioprins (ausgehend vom 6-Thioguanin hat), wurden die Patienten entlang des Medianwertes der TPMT-Aktivität (45 U/g Hb) in zwei Gruppen aufgeteilt. (vgl. Abbildung 11) Kombiniert man beide Kriterien (hohe/niedrige Azathioprindosis bzw. hohe/niedrige TPMT-Aktivität), konnte man vier verschiedene Gruppen bilden, die sich statistisch signifikant unterschieden. Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität und Azathioprindosis (Gruppe A) hatten die geringste 6-MMP-Konzentration. Patienten mit hoher TPMT-Aktivität aber niedriger Azathioprindosis wiesen bereits doppelt so viel 6-MMP auf. War die TPMT-Aktivität niedrig, die Azathioprindosis hingegen hoch, so verdreifachte sich die 6-MMP-Konzentration und waren sowohl die

TPMT-Aktivität als auch die Azathioprindosis hoch, verzwölffachte sich das 6-MMP im Vergleich zur Gruppe A. Dies deutet jedoch wiederum auf eine erhebliche Steigerungsfähigkeit der TPMT-Aktivität hin, wobei mit steigender Azathioprindosis die Aktivität des primären metabolischen Abbaus in Richtung 6-MMP stimuliert wird.

Die Nebenwirkungen von Azathioprin lassen sich in nicht-dosisabhängige (Allergien, Übelkeit/Erbrechen, Fieber, grippeartige Symptome, Arthralgien) und dosisabhängige (Myelosuppression) Effekte unterteilen (Sahasranaman et al., 2008). Die dosisabhängige, meist jedoch reversible Knochenmarkdepression, die häufig als Leukopenie auftritt, gilt dabei als die wichtigste Nebenwirkung (Relling et al., 1999). Eine milde Leukopenie mit Leukozytenwerten von 3000-4000/μl tritt bereits bei einer üblichen Azathioprindosis von 2,0 mg/kg Körpergewicht auf (Connell et al., 1993). Die Myelosuppression hängt primär mit dem Anstieg von 6-Thioguanin zusammen, da eines seiner Vorläuferprodukte (6-Thioxanthosin-Monophosphat) in die DNA eingebaut wird und den genannten Effekt erzeugt. Für MS-Patienten besteht diese Gefährdung unter Azathioprintherapie auch, so dass wünschenswert wäre, abzuklären, ob eine höhere Azathioprindosis wirklich zu einer Erhöhung des 6-TGs bei ihnen führt und ob die Zunahme der Dosis zumindest zu einer Reduktion der klinischen Symptome führt, wenn mit erhöhter Dosierung schon das Risiko von Nebenwirkungen eingegangen werden muss. Das bereits berichtete Ergebnis, dass bei Patienten mit hoher TPMT-Aktivität eine Azathioprindosissteigerung zu einer erheblichen Zunahme des primären metabolischen Abbauwegs führt, der eben nicht zu einer Zunahme des 6-TGs führt, ist hierbei positiv zu bewerten. Allerdings zeigen die eigenen Ergebnisse auch, dass bei Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität, die eine Steigerung der Azathioprindosis erhalten, die Aktivierung des primären metabolischen Abbauwegs deutlich schwächer erfolgt und bei diesen dann folgerichtig der sekundäre anabole Abbau in Richtung 6-Thioguanin mit dem Risiko der Entwicklung einer Myelosuppression besteht. Allerdings, und dies ist positiv zu bewerten, führt eine Erhöhung der Azathioprindosis zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik der MS-Patienten.

Dies ist sogar mit dem vergleichsweise unscharfen EDSS-Score zu belegen, der bei Patienten mit niedriger Dosis deutlich höher und damit schlechter ausfiel als bei Patienten mit hoher Azathioprindosis (3,4 vs. 2,8 Punkte, vgl. Abbildung 12).

Zusammengefasst kann aus den Daten der vorliegenden Untersuchung aus einem hinsichtlich dem Alter und der Geschlechtsverteilung sowie der Verteilung des Erkrankungstyps repräsentativen MS-Patientenkollektivs kann folgendes geschlossen werden.
Bei MS-Patienten mit hoher TPMT-Aktivität führt die Gabe steigender Azathioprindosen nicht zu einer Zunahme des für myelodepressive Nebenwirkungen charaktistischen 6-Thioguanins, sondern vielmehr zu einer fast exponentiellen Steigerung des primären metabolischen Abbaus zu 6-Methyl-Mercaptopurins. Bei MS-Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität ist dieser Anstieg deutlich geringer und es besteht hier die Möglichkeit des verstärkten Abbaus über den sekundären anabolen Abbauweg mit der Gefahr einer Myelodepression. Zwar sind Bewertungssysteme wie der EDSS und der MFSC geeignet, die klinische Symptomatik der Patienten zu beschreiben. In Übereinstimmung mit der Literatur erscheint der EDSS jedoch wenig tauglich, geringgradige Veränderungen über kurze Beobachtungszeiträume ausreichend präzise abbilden zu können. Es lässt sich jedoch mittels des EDSS nach einer mehr als halbjährlichen Beobachtungsdauer eine tendenzielle Verbesserung der klinischen Symptomatik bei hoher Azathioprindosis belegen. Es sind jedoch weitere prospektive Studien nötig, die die Grenzwertziehung für eine optimierte Azathioprindosis, die vermutlich um 1,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag liegen dürfte, bestätigen oder weiter präzisieren können.

5. Zusammenfassung

Fragestellung: Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Zusammenhang der klinischen Symptomatik von Patienten mit Multipler Sklerose und vier Parametern, die den Abbauweg des Arzneimittels Azathioprin im Thiopurin-stoffwechsel beschreiben.

Material und Methoden: Es wurden 25 MS-Patienten (20 Frauen, 5 Männer, Alter 49,1 ± 1,8 Jahre) in eine prospektive Studie eingeschlossen, bei denen zu Studienbeginn bereits eine mindestens sechsmonatige Azathioprintherapie durchgeführt worden war. Die Beobachtungsdauer der Patienten betrug 7 Monate (Durchschnitt: 212 Tage). Die klinische Symptomatik der Patienten wurden mittels des Multiple Sclerosis Functional Composite (MSCF) und dem Expanded Disability Status Scale (EDSS) bewertet. Als Laborparameter wurden die Thiopurin-S-Methyl-Transferase (TPMT)-Aktivität sowie die Konzentration der Metaboliten 6-Thioguanin (6-TG), 6-Methyl-Thioguanin (6-MTG) und 6-Methyl-Mercaptopurin (6-MMP) untersucht. Die Daten wurden bei Beobachtungsbeginn und -ende erhoben.

Ergebnisse: Das Alter der Patienten bei MS-Beginn betrug 32,8 ± 1,6 Jahre, die Erkrankungsdauer bis Studienbegin lag bei 16,2 ± 1,5 Jahren und die tägliche Azathioprindosis betrug 120 ± 8 mg bzw. 1,7 ± 0,1 mg/kg Körpergewicht. 64% der Patienten wiesen eine schubförmig remittierende (RR), 28% eine sekundär progrediente (RRSP) und 8% eine primär progrediente (RP) Verlaufsform der Multiplen Sklerose auf. Zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten kam es zu keinen signifikanten Veränderungen des EDSS und MSFC. RRSP-Patienten wiesen aber deutlich höhere und damit schlechtere EDSS-Werte als auf RR- und PP-Patienten. Analoges galt für den Z-Score des MSFC. Signifikante Veränderungen der vier Metaboliten zwischen dem ersten und zweiten Beobachtungszeitpunkt ergaben sich nicht und die Konzentration der vier Metaboliten korrelierte jeweils nicht mit dem Patientenalter bei Studienbeginn, dem Patientenalter bei MS-Diagnose oder der Erkrankungsdauer der MS. Bei MS-Patienten mit hoher TPMT-Aktivität kommt es bei steigenden Azathio prindosis zu einer fast exponentiellen Steigerung des primären metabolischen Abbaus zu

6-Methyl-Mercaptopurins. Bei MS-Patienten mit niedriger TPMT-Aktivität ist dieser Anstieg deutlich geringer, so dass hier ein verstärkter Abbaus über den sekundären anabolen Abbauweg mit der Gefahr einer Myelodepression gegeben scheint.

Diskussion: Die klinischen Bewertungssysteme EDSS und MFSC sind zwar geeignet, die klinische Symptomatik der Patienten zu beschreiben. Sie erscheinen aber wenig tauglich, um geringgradige Veränderungen über kurze Beobachtungszeiträume ausreichend präzise abzubilden. Allerdings konnte über die etwas mehr als halbjährliche Beobachtungsdauer unserer MS-Patienten eine tendenzielle Verbesserung der klinischen Symptomatik bei hoher Azathioprindosis gezeigt werden, auch wenn diese nicht signifikant ausfällt. Es sind weitere prospektive Studien nötig, die die Grenzwertziehung für eine optimierte Azathioprindosis von etwa 1,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag bestätigen oder präzisieren können.

6. Literaturverzeichnis

1. Albrecht H, Wötzel C, Erasmus LP, Kleinpeter M, König N, Pöllmann W: Day-to-day variability of maximum walking distance in MS patients can mislead to relevant changes in the Expanded Disability Status Scale (EDSS): average walking speed is a more constant parameter. Mult Scler 7, 105-109 (2001)

2. Anstey A, Lear JT: Azathioprine. Clinical pharmacology and current indications in autoimmune disorders. BioDrugs 9, 33-47 (1998)

3. Anstey A, Lennard L, Mayou SC, Kirby JD: (1992) Pancytopenia related to azathioprine – an enzyme deficiency caused by a common genetic polymorphism: a review. J R Soc Med 85, 752-756 (1992)

4. Bach JF, Dardenne M, Fournier C: In vitro evaluation of immunsuppressive drugs. Nature 222, 998-999 (1969)

5. Barkhof F, Rocca M, Francis G: Validation of diagnostic magnetic resonance imaging criteria for multiple sclerosis and response to interferon beta1a. Ann Neurol 53, 718-724 (2003)

6. Bassetti C, Beer K, Beer S: Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006). Nervenarzt 77, 1506-1518 (2006)

7. Bayas A, Rieckmann P: Managing the adverse effects of interferon-beta therapy in multiple sclerosis. Drug Saf 22, 149-159 (2000)

8. Beck RW, Cleary PA, Anderson MMJ: A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The Optic Neuritis Study Group. N Engl J Med 326, 581-588 (1992)

9. Berlit P, Gretz N: Azathioprin (Imurek). Internist 34, 788-793 (1993)

10. Blumhardt LD, Vermeij BJ, Amato M, Andersen O, Edan G, Fernandez O, Filippi M, Haas J, Hommes OR, Rieckmann P: A quality net-work model for the daily care of multiple sclerosis. Mult Scler 6, 231-236 (2000)

11. Bourahoui A, De Seze J, Guittierez R, Onraed B, Hennache B, Ferriby D, Stojkovic T, Vermersch P: CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. Eur J Neurol 11, 525-529 (2004)

12. Bremer J, Wiendl H, Cho EN, Thieme H, Kollenbaum V: Neurologie, Psychiatrie, Psychosomatik. Springer Verlag, Stuttgart, 53-55 (2007)

13. Broadley SA, Deans J, Sawcer SJ, Clayton D, Compston DAS: Autoimmune disease in first-degree relatives of patients with multiple sclerosis - a UK survey. Brain 123, 1102-1111 (2000)

14. Calne RY: Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogous. Transpl Bull 28, 445-461 (1961)

15. Calne RY, Alexandre GPJ, Murray JE: A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologus renal transplants in dogs. Ann N Y Acad Sci 99, 743-761 (1962)

16. Chalmers AH, Knight PR, Atkinson MR: Conversion of azathioprine into mercaptopurine and mercaptoimidazole derivates in-vitro and during immunosuppressive therapy. Aust J Exp Biol Med Sci 45, 681-691 (1967)

17. Chan A, Weilbach FX, Toyka KV, Gold R: Mitoxantrone induces cell death in peripheral blood leucocytes of multiple sclerosis patients. Clin Exp Immunol 139, 152-158 (2005)

18. Chan A, Gold R, Kieseiere BC, Rieckmann P: Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl., 654-675 (2008)

19. Charcot JM: Sclérose du cordons lateraux del la moelle épiniere chez une femme hysterique atteinte de contracture permaneste des quatres membres. L' Union Med 25, 451–457 und 467–472 (1865)

20. Charcot JM: Seance du 14 mars. Comptes rendus des seances et memoires lus a la societe de Biologie 20, 13–14 (1968a)

21. Charcot JM: Histologie de la sclérose en plaques. Gazette Hôpitaux 41, 554, 557–558 und 566 (1868b)

22. Charcot JM: Leçons sur les maladies chroniques du système nerveux. I: Des scléroses de la moelle épinière. Gazette Hôpitaux 41, 405-406 und 409 (1868c)

23. Charcot JM : Leçons sur les Maladies du Systeme Nerveux faites a la Salpétrière. Paris: A. Delahaye and E. Lecrosnier, Progres Medicale, 1–495 und 1–504 (1872)

24. Charcot JM: Leçons sur les maladies du système nerveux faites a la Salpétrière. Paris: A. Delahaye (1875)

25. Charcot JM: Lectures on Diseases of the Nervous System. London: New Sydenham Society (1877)

26. Charcot JM: Leçons du mardi a la Salpétrière. Professeur Charcot. Polycliniques. Paris: Bureaux du Progres Medical and A Delahaye, 398-422 (1887)

27. Chendrowski W: Therapeutic potential of interferon beta-1b and related drugs in multiple sclerosis: comparative meta-analysis. Neurol Neurochir Pol 35 (Suppl. 4), 125-138 (2001)

28. Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS: Thiopurine-Methyltransferase activity and efficacy of azathioprine immunosuppression in transplant recipients. Adv Exp Med Biol 309A, 61-64 (1991)

29. Chocair PR, Duley JA, Sabbaga E, Arap S, Simmonds HA, Cameron JS: Fast and slow methylators: do racial differences influence risk of allograft rejection? Q J Med 86, 359-363 (1993)

30. Christensen F: Human Hervesviruses in MS. Int MS Journal 14: 41-47 (2007)

31. Cohen JA, Fischer JS, Bolibrush DM, Jak AJ: Interater and interrater reliability of the MS functional composite outcome measure. Neurology 54, 802-806 (2000)

32. Compston A: Jean-Martin Charcot on 'Sclérose en plaques' (Multiple Sclerosis). Adv Clin Neurol Rehabil 5, 28-29 (2005)

33. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE: Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease: 27 years of experience. Gut 34, 1081-1085 (1993)

34. Comi G, Filippi M, Barkhof F: Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. Lancet 357, 1576-1582 (2001a)

35. Comi G, Filippi M, Wolinsky JS: European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiraameracetate on magnetic resonance imaging-measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis. Ann Neurol 49, 290-297 (2001b)

36. Compston A, Coles A: Multiple sclerosis. Lancet 359: 1221-1231 (2002)

37. Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cockfair DL, Fischer JS, Petkau J, Syndulko K, Weinshenker BG, Antel JP, Confavreux C, Ellison GW, Lublin F, Miller AE, Rao SM, Reingold S, Thompson A, Willoughby E: Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. Brain 122, 871-882 (2002)

38. Daumer M, Neuhaus A, Herbert J, Ebers G: Prognosis of the individual course of disease: the elements of time, heterogenity and precision. J Neurol Sci 287 (Suppl.1), 50-55 (2009)

39. De Abreu RA: Nucleotide metabolism: mode of action of thiopurines in leukaemia. Adv Exp Med Biol 370, 195-200 (1994)

40. Dean G, Elian M: Age at immigration to England of Asian and Carribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatr 63, 565-568 (1997)

41. Dean G, Elian M, Galea de Bono A, Pace Asciak R, Vella N, Mifsud V, Aquilina J: Multiple sclerosis in Malta in 1999: an update. J Neurol Neurosurg Psychiatry 73, 256-260 (2002)

42. Deininger M, Szumlanski CL, Otterness DM, van Loon J, Ferber W, Weinshilboum RM: Purine substrates for human thioprurine methyltransferase. Biochem Pharmacol 48, 2135-2138 (1994)

43. DeMiranda P, Beacham LM, Creagh TH, Elion GB: The metabolic fate of the methylnitroimidazole moiety in the rat. J Pharm Exp Ther 187, 588-601 (1973)

44. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, Hommes DW (2006) Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 24, 715-729 (2006)

45. Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Behandlungsleitlinie Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. http://www.dgn.de 2008, (Zugriff am 28.02.2009)

46. Dubinsky MC, Feldman EJ, Abreu MT, Targan SR, Vasiliauskas EA: Thioguanine: a potential alternate thiopurine for IBD patients allergic to 6-mercaptopurine or azathioprine. Am J Gastroenterol 98, 1058-1063 (2003)

47. Ebers GC, Rice G, Lesaux J: Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon b-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. Lancet 352, 1498-1504 (1998)

48. Edan G, Morrissey S, Le PE: Rationale for the use of mitoxantrone in multiple sclerosis. J Neurol Sci 223, 35-39 (2004)

49. Eklund BI, Moberg M, Bergquist J: Divergent activities of human glutathione transferase in the bioactivation of azathioprine. Mol Pharmacol 70, 747-754 (2006)

50. Elion GB: The purine path to chemotherapy. Science 244, 41-47 (1989)

51. Elion GB, Callahan GH, Hitchings GH, Rundles RW, Laszio J: Experimental, clinical and metabolic studies of thiopurines. Cancer Chemother Rep 16, 197-202 (1962)

52. Ellison GW, Myers LW, Leake BD: Design strategies in multiple sclerosis clinical trials. The Cyclosporine Multiple Sclerosis Study Group. Ann Neurol 36 (Suppl.), 108-112 (1994)

53. Erb N, Harms DO, Janka-Schaub G (1998) Pharmacokinetics and metabolism of thiopurines in children with acute lymphoblatic leukemia receiving 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine. Cancer Chemother Pharmacol 42, 266-272 (1998)

54. Escousse A, Mousson C, Santona L, Zanetta G, Mounier J, Tanter Y, Duperray F, Rifle G, Chevet D: Azathioprine-induced pancytopenia in homozygous thiopurine methyltransferase – deficient renal transplant recipients: a family study. Transplant Proc 27, 1739-1742 (1995)

55. Etemadifar M, Janghorbani M, Shaygannejad V: Comparison of interferon beta products and azathioprine in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. J Neurol 254, 1723-1738 (2007)

56. Evans WE, Horner M, Chu YQ, Kalwinsky D, Roberts WM: Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphoblastic leukaemia. J Pediatr 119, 985-989 (1991)

57. Farina C, Weber MS, Meinl E, Wekerle H, Hohlfeld R: Glatiramer acetate in multiple sclerosis: update on potential mechanisms of action. Lancet Neurol 4, 567-575 (2005)

58. Fazekas F, Barkhof F, Filippi M: The contribution of magnetic resonance imaging to diagnosis of multiple sclerosis. Neurology 53, 448-456 (1999)

59. Ferroni MA, Marchi G, Sansone E, Romeo P, Giulianotti PC, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM: Variability in the rate of 6-mercaptopurine methylation in the erythrocytes, liver and kidney in an Italian population. Eur J Clin Pharmacol 51, 23-29 (1996)

60. Filippi M, Rovaris M, Inglese M: Interferon beta-1a for brain tissue loss in patients at presentation with syndromes suggestive of multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 364, 1489-1496 (2004)

61. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC: The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcome Assessment Task Force. Mult Scler 5, 244-250 (1999)

62. Fischer JS, Jak AJ, Kniker JE, Rudick RA, Cutter G: Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC). Administration and Scoring Manual. http://www.nationalmssociety.org/for-professionals/researchers/clinical-study-measures/msfc/index.aspx 2001, (Zugriff am 02.03.2009)

63. Flachenecker P, Zettl UK, Götze U, Haas J, Schimrigk S, Elias W, Pette M, Eulitz M, Henning M, Bertram J, Hollweck R, Neiss A, Daumer M, Pitschnau-Michel D, Rieckmann P (2005) MS-Register in Deutschland. 1. Design und erste Ergebnisse der Pilotphase. http://www.sclmsr.net/download/publikationen/12MS-Register_in_Deutschland-Nervenarzt-Flachenecker.pdf, 2005

64. Fowler TJ: Demyelinating disease of the central nervous system.In: Marsden CD, Fowler TJ (Eds.) Clinical Neurology, London: Edward Arnold: 344-352 (1989)

65. Gass A, Moseley IF: The contribution of magnetic resonance imaging in the differential diagnosis of optiv nerve damage. J Neurol Sci 172 (Suppl.1), 17-22 (2000)

66. Gass A, Radu EW, Filippi M, Kappos L: MRI follow-up in multiple sclerosis. A guideline for quality assurance. RöFo 170: 581-586 (1999)

67. Ganiere-Monteil C, Medard Y, Lejus C, Bruneau B, Pineau A, Fenneteau O, Bourin M, Jacqz-Aigrain E: Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucasian population: impact of age. Eur J Clin Pharmacol 60, 89-96 (2004)

68. Ghalie RG, Edan G, Laurent M: Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (novantrone) therapy in patients with MS. Neurology 59, 909-913 (2002a)

69. Ghalie RG, Mauch E, Edan G: A study of therapy-related acute leukaemia after mitoxantrone therapy for multiple sclerosis. Mult Scler 8, 441-445 (2002b)

70. Glaxo-Wellcome: Fachinformation 6-Mercaptopurin, 1997

71. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP: Disease modifying therapies in multiple sclerosis - Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. Neurology 58, 169-178 (2002)

72. Goodkin D, Hertsgaard D, Seminary J: Upper extremity function in multiple sclerosis: improving assessment sensitivity with Box-and-Block and 9-Hole Peg Test. Arch Phys Med Rehabil 69, 850-854 (1988)

73. Gold R, Hartung HP: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl., 654ff; http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll/030-050.htm (2008)

74. Grauer O, Offenhausser M, Schmidt J, Toyka KV, Gold R: Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis: evidence from clinical studies and practical recommendations. Nervenarzt 72, 577-589 (2001)

75. Gummert JF, Schutz E, Oellerich M, Mohr FW, Dalichau H: Monitoring of TPMT in heart transplant recipients under immunosuppressive therapy with azathioprine. Artif Organs 19, 918-920 (1995)

76. Haas J, Kugler J, Nippert I, Pöhlau D, Scherer P: Lebensqualität bei Multipler Sklerose. Berliner DMSG-Studie, de Gruyter Verlag, Stuttgart (2003)

77. Hadjimichael O, Vollmer T, Oleen-Burkey M: Fatigue characteristics in multiple sclerosis: the North American Research Committee on Multiple Sclerosis (NARCOMS) survey. Health Quality Life Outcomes 6, 100-110 (2008)

78. Hartung HP, Gonsette R, Konig N: Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. Lancet 360, 2018-2025 (2002)

79. Hein T, Hopfenmüller W: Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. Nervenarzt 71, 288-294 (2000)

80. Hobart J, Freeman J, Thompson A (2000) Kurtzke scales revisited: the application of psychometric methods to clinical intuition. Brain 123, 1027-1040 (2000)

81. Honchel R, Aksoy IA, Szumlanski C, Wood TC, Otterness DM, Wieben ED, Weinshilboum RM: Human thiopurine methyltransferase: molecular cloning and expression of T84 colon carcinoma cell cDNA. Mol Pharmacol 43, 878-887 (1993)

82. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH: Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. N Engl J Med 343, 898-904 (2000)

83. Jacqz-Aigrain E, Bessa E, Medard Y, Mircheva Y, Vilmer E: Thiopurine methyltransferase activity in a french population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. Br J Clin Pharmacol 38, 1-8 (1994)

84. Jang IJ, Shin SG, Lee KH, Yim DS, Koo HH, Kim HK, Sohn DR: Erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a Korean population. Br J Clin Pharmacol 42, 638-641 (1996)

85. Jones CD, Smart C, Titus A, Blyden G, Dorvil M, Nwadike N: Thiopurine methyltransferase activity in a sample population of black subjects in Florida. Clin Pharmacol Ther 53, 348-353 (1993)

86. Kaplowitz N: Enzymatic thiolysis of azathioprine in vitro. Biochem Pharmacol 25: 2421-2426 (1976)

87. Kappos L, Polman CH, Freedman MS: Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. Neurology 67, 1242-1249 (2006)

88. Kaufman DI, Trobe JD, Eggenberger ER, Whitaker JN: Practice parameter: the role of corticosteroids in the management of acute monosymptomatic optic neuritis. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 54, 2039-2044 (2000)

89. Keegan M, Konig F, McClelland R: Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. Lancet 366, 579-582 (2005)

90. Kennedy J, O'Connor P, Sadovnick AD, Perara M, Yee I, Banwell B: Age of onset of multiple sclerosis may be influenced by place of residence during childhood rather than ancestry. Neuroepidemiology 26, 162-167 (2006)

91. Kerstens PJ, Stolk JN, De Abreu RA, Lambooy LH, van de Putte LB, Boerbooms AA: Azathioprine-related bone marrow toxicity and low activities of purine enzymes in patinets with rheumatoide arthritis. Arthritis Rheum 38, 142-145 (1995)

92. Klemetsdal B, Straume B, Wist E, Aarbakke J: Identification of factors regulating Thiopurine Methyltransferase activity in a Norwegian population. Eur J Clin Pharmacol 44, 147-152 (1993)

93. Kobelt G, Lindgren P, Smala A, Bitsch A, Haupts M, Kölmel HW, König N, Rieckmann P, Zettl UK, German Cost of MS Study Group: Cost and quality of life in multiple sclerosis. An observational study in Germany. Health Econom Prevent Care 2, 60-68 (2001)

94. Kragt JJ, Hoobervorst EL, Uitdehaag BM, Polman CH: Relation between objective and subjective measures of bladder dysfunction in multiple sclerosis. Neurology 63, 1716-1718 (2004)

95. Kristjansdottir G, Sandling JK, Bonetti A, Roos IM, Milani L, Wang C, Gustafsdottir SM, Sigurdsson S, Lundmark A, Tienari PJ, Koivisto K, Elovaara I, Pirttilä T, Reunanen M, Peltonen L, Saarela J, Hillert J, Olsson T, Landegren U, Alcina A, Fernandez O, Leyva L, Guerrero M, Lucas M, Izquierdo G, Matesanz F, Syvänen AC: Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. J Med Genet 45, 362-369 (2009)

96. Kröplin T, Weyer N, Gutsche S, Iven H: Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as a substrate. Eur J Clin Pharmacol 54, 265-271 (1988)

97. Krynetski EY, Schuetz JD, Galphin AJ, Pui CH, Relling MV, Evans WE: A single point mutation leading to loss of catalytic activity in human Thiopurine S-Methyltransferase. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 949-953 (1995)

98. Krynetski EY, Tai HL, Yates CR, Fessing MY, Loennechen T, Schuetz JD, Relling MV, Evans WE: Genetic polymorphism of Thiopurine S-Methyltransferase:m clinical importance and molecular mechanisms. Pharmacogenetics 6, 279-290 (1996)

99. Krynetski EY, Evans WE: Pharmacogenetics as a molecular basis for individualized drug therapy: the thiopurine S-methyltransferase paradigm. Pharm Res 16, 342-349 (1999)

100. Kurowski V, Iven H: Plasma concentrations and organ distribution of thiopurines after oral application of azathioprine in mice. Cancer Chemother Pharmacol 28, 7-14 (1991)

101. Kurtzke JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology 33, 1444-1452 (1983)

102. Lee EJ, Kalow W: Thiopurine S.methyltransferase activity in a Chinese population. Clin Pharmacol Ther 54: 28-33 (1993)

103. Lee D, Szumlanski C, Houtman J, Honchel R, Rojas K, Overhaus J, Wieben ED, Weinshilboum RM: Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics. Cloning of human liver cDNA and a processed pseudogene on human chromosome 18q21.1. Drug Metab Dispos 23, 398-405 (1995)

104. Leipold G, Schutz E, Haas JP, Oellerich JM: Azathioprine-induced severe pancytopenia due to a homozygous two-point mutation of the thiopurine methyltransferase gene in a patient with juvenile HLA-B27-associated spondylarthritis. Arthritis Rheum 40, 1896-1898 (1997)

105. Lennard L, Lilleymann JS: Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. Ther. Drug Monit 18, 328-334 (1996)

106. Lennard L, Singleton HJ: High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. J Chromatogr B Biomed Appl 661, 25-33 (1994)

107. Lennard L, van Loon JA, Weinshilboum RM: Pharmakogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. Clin Pharmacol Ther 46, 149-154 (1989)

108. Lennard L, Lilleymann JS, van Loon J, Weinshilboum RM: Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 336, 225-229 (1990)

109. Lennard L, Gibson BE, Nicole T, Lilleymann JS: Congenital thiopurine methyltransferase defiency and 6-mercaptopurine toxicity during treatment for a acute lymphoblastic leukaemia. Arch Dis Child 69, 577-579 (1993)

110. Leuscher U: Immunsuppressive Therapie mit Azathioprin bei chronischen Lebererkrankungen. Dr. Falk Pharma, Freiburg (2006)

111. Lewis LD, Benin A, Szumlanski CL, Otterness DM, Lennard L, Weinshilboum RM, Nierenberg DW: Olsalazine and 6.mercaptopurine-related bone marrow suppression: a possible drug-drug interaction. Clin Pharmacol Ther 62, 464-475 (1997)

112. Lobentanz IS, Asenbaum S, Vass K: Factors influencing quality of life in multiple sclerosis patients: disability, depressive mood, fatigue and sleep quality. Acta Neurol Scand 110, 6-13 (2004)

113. Lysaa RA, Giverhaug T, Wold HL, Aarbakke J: Inhibition of human thiopurine methyltransferase by furosemide, bendroflumethiazide and trichlormethiazide. Eur J Clin Pharmacol 49, 393-396 (1996)

114. Maybaum J, Mandel HG: Unilateral chromatid damage: a new basis for 6-thioguanine cytotoxicity. Cancer Res 43, 3852-3856 (1983)

115. 116. McDonald WI, Compston A, Edan G: Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. Ann Neurol 50, 121-127 (2001)

116. McGuigan C, McCarthy A, Quigley C, Bannan L, Hawkins SA, Hutchinson M: Latitudinal variation in the prevalence of multiple sclerosis in Ireland, an effect of genetic diversity. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75: 572-576 (2004)

117. McLeod HL, Lin JS, Scott EP, Pui CH, Evans WE: Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. Clin Pharmacol Ther 55, 15-20 (1994)

118. McLeod HL, Relling MV, Liu Q, Pui CH, Evans WE: Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic from chidren with acute lymphoblastic leukemia. Blood 85, 1897-1902 (1995)

119. Mezei Z, Bereczki D, Csiba L, Csepany T: Long-term application of the multiple sclerosis functional composite test in Debrecen, Hungary. Ideggyogy Sz 59, 442-447 (2006)

120. Milanese C, La Mantia L, Salmaggi A, Caputo D: Azathioprine and interferon b-1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 70, 406-425 (2001)

121. Milligan NM, Newcombe R, Compston DAS: A double-blind trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. clinical effects. J Neurol Neurosurg Psychiatry 50, 511-516 (1987)

122. Nicoletti A, Patti, Lo Fermo S, Sorbello V, Reggio E, Maimone D: Possible increasing risk of multiple sclerosis in Catania, Sicily. Neurology 65, 1259-1263 (2005)

123. Noseworthy JH, Vandervoort MK, Wong CJ, Ebers GC: Interrater variability with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and Functional Systems (FS) in a multiple sclerosis clinical trial. The Canadian Cooperation MS Study Group. Neurology 40, 971-975 (1990)

124. O'Connor P: The effects of intramuscular interferon beta-Ia in patients at high risk for development of multiple sclerosis: a post hoc analysis of data from CHAMPS. Clin Ther 25, 2865-2874 (2003)

125. Otternes D, Szumlanski C, Lennard L, Klemetsdal B, Aarbakke J, Park-Hah JO, Iven H, Schmiegelow K, Branum E, O'Brien J, Weinshilboum R: Human thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: gene sequence polymorphismus. Clin Pharmacol Ther 62, 60-73 (1997)

126. Park-Hah JO, Klemetsal B, Lyssa R, Choi KH, Aarbakke J: Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. Clin Pharmacol Ther 60, 68-74 (1996)

127. Pittock SJ, Mayr WT, McClelland RL, Jorgensen NW, Weigand SD, Noseworthy JH, Weinshenker BG, Rodriguez M: Change in MS-related disability in a population-based cohort: a 10-year follow-up study. Neurology 62, 51-59 (2004)

128. Poeck K, Hacke W: Neurologie. Springer Verlag, Stuttgart, 12. Aufl., 490-508 (2006)

129. Polman CH, Rudick RA: The multiple sclerosis functional composite: a clinically meaningful measure of disability. Neurology 74 (Suppl.3), 8-15 (2010)

130. Polman CH, Reingold SC, Edan G: Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revision of the "McDonald Criteria". Ann Neurol 58: 840-846 (2005)

131. Poser CM, Brinar VV: The nature of multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg 106, 159-171 (2004)

132. Prinz M, Schmidt H, Mildner A: Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. Immunity 28, 675-686 (2008)

133. Rao SM: Neuropsychology of multiple sclerosis. Curr Opin Neurol 8, 216-220 (1995)

134. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, Evans WE: Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-Methyltransferase gene locus. J Natl Cancer Inst 91, 2001-2008 (1999)

135. Renoux C, Vukusic S, Mikaeloff Y, Edan G, Clanet M, Dubois B, Debouviere M, Brochet B, Lebrun-Frenay C, Pelletier J, Moreau T, Lubetzki C, Vermersch P, Roullet E, Magy L, Tardieu M, Suissa S, Confavreux L:
136. Natural history of multiple sclerosis with childhood onset. N Engl J Med 356, 2603-2613 (2007)

137. Remy CN: Metabolism of thiopyrimidines and thiopurines. J Biol Chem 238, 1078-1084 (1963)

138. Rieckmann P, Toyka KV, Bassetti C, Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (2004) Escalating immunotherapy of multiple sclerosis - new aspects and practical application. J Neurol 251, 1329-1339 (2004)

139. Rodriguez M, Siva A, Ward J, Stolp-Smith K, O'Brien P, Kurland L: Impairment, disability, and handicap in multiple sclerosis: a population based study in Olmsted County, Minnesota. Neurology 44, 28-33 (1994)

140. Rosati G: The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. Neurol Sci 22, 117-139 (2001)

141. Ruprecht K, Klinker E, Dintelmann T, Rieckmann P, Gold R: Plasma exchange for severe optic neuritis - Treatment of 10 patients. Neurology 63, 1081-1083 (2004)

142. Sawcer S: The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. Brain 13, 3118-3131 (2008)

143. Sahasranaman S, Howard D, Roy S (2008) Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. Eur J Clin Pharmacol 64, 753-767 (2008)

144. Schilling S, Linker R, Konig F: Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses. Clinical experience with 16 patients. Nervenarzt 77, 430-432 (2006)

145. Schütz E, Gummert J, Armstrong VW, Mohr FW, Oellerich M: Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. Eur J Clin Chem Clin Biochem 34, 199-205 (1996)

146. Schütz J, Waldemar G, Olsen JH, Johansen C: Risks for central nervous system diseases among mobile phone subscribers: a danish retrospective cohort study. PlOS One 4: e4389. doi: 10.1371/journal. pone.0004389 (2009)

147. Schwid SR, Goodman AD, McDermott MP, Bever CF, Cook SD: Quantitative functional measures in MS: what is a reliable change? Neurology 58, 1294-1296 (2002)

148. Sellebjerg F, Frederiksen JL, Nielsen PM, Olesen P: Double-blind, randomized, placebo-controlled study of oral, high-dose methylprednisolone in attacks of MS. Neurology 51, 529-534 (1998)

149. Simmonds HA: Purine and Pyrimidine disorders. In: Holten JB (Ed.) The inherited metabolic diseases. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 215 (1987)

150. Szumlanski CL, Honchel R, Scott MC, Weinshilboum RM: Human liver thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: biochemical properties, liver-erythrocyte correlation and presence of isozyme. Pharmacogenetics 2, 148-159 (1992)

151. Tai HL, Krynetski EY, Schütz JD, Yanishevski Y, Evans WE: Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. Proc Natl Acad Sci USA 94, 6444-6449

152. Terribas CJC, Gonzalez-Guijarro L: Hypomethylation and multiple slerosis, the susceptibility factor? Neurologia 17, 132-135 (2002)

153. Tidd DM, Patterson AR: A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. Cancer Res 34, 738-746 (1974)

154. Tinel M, Berson A, Pessayre D, Letteron P, Cattoni MP, Horsmans Y, Larrery D: Pharmacogenetics of human erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a French population. Br J Clin Pharmacol 32, 729-734 (1991)

155. Tintore M, Rovira A, Rio J: New diagnostic criteria for multiple sclerosis - application in first demyelinating episode. Neurology 60, 27-30 (2003)

156. van Loon JA, Weinshilboum RM: Thiopurine methyltransferase biochemical genetics: human lymphocyte activity. Biochem Genet 20: 637-658 (1982)

157. van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ, Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Lipsky JJ: Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed relased oral and rectal foam administration. Gut 39, 63-68 (1996)

156. Vouchetich JP, Weinshilboum RM, Price RA: Segregation analysis of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. Genetic Epidemiol 12, 1-11 (1995)

157. Watanabe A, Hobara N, Nagashima H: Demonstration of enzymatic activity converting azathioprine to 6-mercaptopurine. Acta Med Okoyama 32, 173-179 (1978)

158. Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS: Mechanism of action of glatiramer acetate in treatment of multiple sclerosis. Neurotherapeutics 4, 647-653 (2007)

159. Weinshenker BG, Ebers Bass B, Rice GP, Noseworthy JH, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC: The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 1. Clinical course and disability. Brain 112, 133-146 (1989)

160. Weinshilboum RM, Sladeck SL: Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. Am J Hum Genet 32, 651-662 (1980)

161. Weinshilboum RM, Raymond FA, Pazimo PA: Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. Clin Chim Acta 85, 323-333 (1978)

162. Whitaker JN, McFarland HF, Rudge P, Reingold SC: Outcomes assessment in multiple sclerosis clinical trials: a critical analysis. Mult Scler 1, 37-47 (1995)

163. Wolinsky JS: Glatiramer acetate for the treatment of multiple sclerosis. Exp Opin Pharmacother 5, 875-891 (2004)

164. Woodsen LC, Weinshilboum RM: Human kidney thiopurine methyltransferase. Purification and biochemical properties. Biochem Pharmacol 32, 819-826 (1983)

165. Yates CR, Krynetski EY, Loennechen T, Fessing MY, Pui CH, Relling MV, Evans WE: Molecular diagnosis of thiopurine S-methyltransferase deficiency: genetic basis for azathioprine and mercaptopurine intolerance. Ann Intern Med 126, 608-614 (1997)

166. Zingler VC, Strupp M, Jahn K, Gross A, Hohlfeld R, Brandt T: The effect of combined mitoxantrone and methylprednisolone therapy in primary and secondary progressive multiple sclerosis. Nervenarzt 76, 740-742 (2005)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. A. Moser für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation, die Betreuung und freundliche und stets konstruktive wissenschaftliche Kritik während der Erstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch meinem Betreuer Herrn Dr. P. Albrecht, der mir dabei geholfen hat, die klinischen Daten der Patienten zu sammeln und mich in die wissenschaftlichen Arbeitsmethoden einzuführen.

Dem Team der MS-Ambulanz gilt mein herzlicher Dank für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Iven und Frau Stolte vom Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck möchte für die Unterstützung bei der Durchführung der Laboruntersuchungen danken.

Meinen lieben Eltern und Schwestern möchte ich ebenfalls danken, dass Sie mir das Studium ermöglichten bzw. mich dabei unterstützten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem lieben Ehemann für seine tatkräftige Unterstützung, liebevolle Betreuung und ständige Aufmunterung während der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Lebenslauf

Name:	Tafazzoli-Lari
Vorname:	Julia Frederike
Geburtsdatum:	17. September 1975
Geburtsort:	Osterholz-Scharmbeck

Schulischer Werdegang:

1982-1986	Grundschule in Wallhöfen
1986-1988	Orientierungsstufe in Hambergen
1988-1995	Gymnasium in Osterholz-Scharmbeck
1995	Abitur

Berufsausbildung

1995-1997	Ausbildung zur Arzthelferin in Allgemeinmedizinischer Arztpraxis

Studium:

10.1998 - 05.2005	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
22.Mai 2005	Erhalt der Approbation
2003	Beginn der Dissertation in der Klinik für Neurologie an der Universität zu Lübeck

Berufliche Tätigkeit:

06.2005 - 02.2006	Assistenzärztin in der Abteilung Innere Medizin, Marienkrankenhaus Lübeck
03.2006 - 02.2007	Assistenzärztin in der Kinderchirurgie, Universität zu Lübeck
seit März 2007	Assistenzärztin in der Inneren Medizinischen Klinik I, Universität zu Lübeck