

**Einfluss von Methotrexat auf den Homocysteinestoffwechsel:
Untersuchungen an Leukämie- und Lymphompatienten**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

ACHIM BECKER

aus Trier

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/ elektronisch publiziert.

1. Referent: Prof. Dr. U. Jaehde
2. Referent: Prof. Dr. G. Bendas

Tag der Promotion: 16.12.2004

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. Jaehde angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Jaehde danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, sein Vertrauen und für die jederzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft während meiner Promotion.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Bendas für die Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Den Kooperationspartnern in den verschiedenen Kliniken Prof. Dr. Schlegel, Prof. Dr. Bode, Dr. Görtz und Dr. Liebeskind danke ich stellvertretend für alle beteiligten Ärzte, Doktoranden und technischen Assistenten. Die intensiven Zusammenarbeiten und die konstruktiven Diskussionen haben die Arbeit entscheidend bereichert.

Very special thanks to Prof. Dr. Relling of the St. Jude Children' s Research Hospital (Memphis) for providing patients' samples and clinical information on the ALL patients. I was deeply impressed of her way of doing "good research". Her cooperativeness and support is highly appreciated.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Alexandra Binczyk für ihre tatkräftige Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises und den Kollegen des Praktikums „Instrumentelle Analytik“ danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und die überaus gute Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders danke ich Herrn Dr. E. Scheuch, der vor allem zu Beginn der Arbeit stets ein offenes Ohr für alle größeren und kleineren Probleme hatte, der Projektpartnerin Frau S. Vezmar, mit der ich viele Aufgaben und Probleme gemeinsam bearbeitete, Herrn D. Garmann für die freundliche Kooperation im CE-Labor und Frau M. Westfeld für das kritische Korrekturlesen der Arbeit.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin Jutta Schneider für ihre Geduld und ihre Hilfsbereitschaft, vor allem in der Endphase der Arbeit.

Schließlich möchte ich meiner Mutter und meinen Geschwistern danken, die mich immer unterstützten und auch in schwierigen Zeiten stets einen verlässlichen Rückhalt gaben.

Meiner Familie

*„Zweifel ist keine angenehme Voraussetzung,
aber Gewissheit ist eine absurde“.*

Voltaire

1	Einleitung.....	1
1.1	Homocystein	1
1.1.1	Homocysteinstoffwechsel.....	2
1.1.2	Ursachen einer Hyperhomocysteinämie	4
1.1.3	Klinische Symptomatik einer Hyperhomocysteinämie und therapeutische Empfehlungen.....	8
1.1.4	Pathomechanismen	9
1.2	Methotrexat	13
1.2.1	Chemische Struktur.....	13
1.2.2	Pharmakokinetik.....	14
1.2.3	Wirkungsmechanismus.....	17
1.2.4	Klinische Anwendungen.....	20
1.2.5	Neurotoxizität von MTX.....	21
1.3	Problemstellung und Zielsetzung	27
2	Material und Methoden.....	30
2.1	Materialien.....	30
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	30
2.1.2	Verwendete Lösungen und Puffer.....	32
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.4	Geräte	33
2.2	CE-Analytik	35

2.2.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese.....	35
2.2.2	Entwicklung eines Trennsystems zur Bestimmung von schwefelhaltigen exzitatorischen Aminosäuren (SEAA).....	42
2.2.3	Methodenentwicklung	45
2.2.4	Methodenoptimierung für die Bestimmung der SEAA im Liquor	47
2.2.5	Validierung der CE-Methode	48
2.2.6	Vermessung der Liquorproben.....	53
2.3	HPLC-Analytik.....	55
2.3.1	HPLC-System und chromatographische Bedingungen	55
2.3.2	Reduktion und Vorsäulenderivatisierung der Aminothiole.....	55
2.3.3	Methodenentwicklung und -optimierung.....	57
2.3.4	Methodenvalidierung.....	59
2.3.5	Vermessung der Liquorproben.....	61
2.4	Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay	62
2.4.1	Messprinzip des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays	62
2.4.2	Durchführung der Messung.....	64
2.4.3	Spezifikationen des IMx [®] -Systems.....	65
2.4.4	Validierung der FPIA-Methode durch den Hersteller.....	65
2.4.5	Teilvalidierung der FPIA-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Plasma	67
2.5	Klinische Untersuchungen.....	68
2.5.1	Pädiatrische Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie	68

2.5.2	Erwachsene Patienten mit primären Lymphomen des zentralen Nervensystems.....	76
2.5.3	Gesunde Erwachsene (Kontrollgruppe)	79
2.5.4	Fallbericht einer Patientin mit MTX-Überdosierung	81
2.6	Pharmakokinetische Berechnungen.....	83
2.6.1	Clearance.....	84
2.6.2	AUC	84
2.7	Statistische Datenanalyse	85
2.7.1	Deskriptive Statistik.....	85
2.7.2	Statistische Tests zur Prüfung von Unterschiedshypothesen	86
2.7.3	Korrelationsanalyse.....	88
2.7.4	Regressionsanalyse.....	88
3	Ergebnisse	90
3.1	CE-Methode zur Bestimmung von schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren im Liquor	90
3.1.1	Trennung der schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren	90
3.1.2	Optimierung der Derivatisierung.....	93
3.1.3	Vergleich der Empfindlichkeit von UV- und LIF-Detektion.....	96
3.1.4	Methodenoptimierung für die Liquoranalyse	96
3.1.5	Validierung	100
3.2	HPLC-Methode zur Bestimmung von Cystein, Homocystein und Glutathion im Liquor	111

3.2.1	Methodenentwicklung/-optimierung.....	111
3.2.2	Validierung der HPLC-Methode	114
3.3	Ergebnisse der Teilvalidierung des FPIA	122
3.4	Einfluss von hochdosiertem MTX auf den Stoffwechsel des Homocysteins	123
3.4.1	Untersuchungen an pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (Studie „Total XV“)	123
3.4.2	Untersuchungen an PZNSL-Patienten	136
3.4.3	Fallbericht einer Patientin mit MTX-Überdosierung.....	151
4	Diskussion.....	154
4.1	CE-Methode zur Bestimmung von schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren im Liquor	154
4.2	HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein, Cystein und Glutathion im Liquor	161
4.3	Einfluss einer hochdosierten MTX-Chemotherapie auf den Stoffwechsel des Homocysteins.....	165
4.3.1	Untersuchungen an pädiatrischen Patienten mit ALL	165
4.3.2	Untersuchungen an Patienten mit PZNSL	177
4.3.3	Fallstudie einer Patientin mit MTX-Überdosierung	189
4.4	Homocystein — ein Biomarker der MTX-induzierten Neurotoxizität?.....	193
5	Zusammenfassung	197
6	Literatur	203
7	Anhang.....	222

Abkürzungsverzeichnis

ABDF	4-(Aminosulfonyl)-7-Fluor-Benzofurazan
AG	Antigen
AICAR	Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid
AICAR-TF	Aminoimidazol-Carboxamid-Ribonukleotid-Transformylase
AK	Antikörper
AL	Arbeitslösung
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ASP	L-Asparaginsäure (Aspartat)
ATP	Adenosintriphosphat
BHMT	Betain-Homocystein-Methyltransferase
C1(8),(15)	1. (bzw. 8. oder 15.) Tag der Konsolidierung
C1h23(42)	1. Tag der Konsolidierung, 23 (42) Stunden nach Beginn der hochdosierten MTX-Infusion
C15h23(42)	15. Tag der Konsolidierung, 23 (42) Stunden nach Beginn der hochdosierten MTX-Infusion
CA	Cysteinsulfonsäure
CBQCA	4-(2-Formyl-3-chinolincarboxyl)-benzoesäure
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CGL	Cystathionin- γ -Lyase
CFSE	5-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
cp_{ss}	Steady-State-Konzentration im Plasma
CNS	Central nervous system (Zentralnervensystem)
CSA	Cysteinsulfinsäure
CV	Coefficient of variation (Variationskoeffizient)
CYS	Cystein
DAMPA	2,4-Diamino-N ¹⁰ -methyl-pteroidsäure
DHB	Dihydrobiopterin
DHF	Dihydrofolsäure (Dihydrofolat)
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DHP	Dihydropteridin
DHPR	Dihydropteridin-Reduktase

DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
E	Elektrische Feldstärke
ECD	Elektrochemische Detektion
EDTA	Ethylendiammintetraessigsäure
EOF	Elektroosmotischer Fluss
FD	Fluoreszenzdetektion
FDA	Food & Drug Administration
FGAR	Formylglycinamidribonukleotid
FICAR	5-Formamido-imidazol-4-carboxamidribonukleotid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPGS	Folsäure-Polyglutamatsynthetase
FPGH	Folsäure-Polyglutamathydrolase
FPIA	Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay
FQCA	3-(2-Furoyl)-chinolin-2-carbaldehyd
FR	Folatrezeptor
GAR	Glycinamidribonukleotid
GAR-TF	Glycinamidribonukleotid-Transferase
GLU	Glutaminsäure (Glutamat)
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
HCY	Homocystein
HCSA	Homocysteinsulfinsäure
HCA	Homocysteinsulfonsäure
HDMTX	Hochdosis-Therapie mit Methotrexat (intravenös verabreicht)
HR	High-Risk
ICV	Intracerebroventrikulär
ICVMTX	Intracerebroventrikulär verabreichtes Methotrexat
IM	Intramuskulär
IMP	Inosinmonophosphat
IT	Intrathekal
ITMTX	Intrathekal verabreichtes Methotrexat
IV	Intravenös

K	Kontrollgruppe
KPF	Korrigierte Peakfläche
LDL	Low density lipoproteins
LIF(D)	Laser-induzierte Fluoreszenz (-detektion)
LLOQ	Lower limit of quantification (untere Bestimmungsgrenze)
LOD	Limit of detection (Nachweisgrenze)
LR	Low-Risk
MAT	Methionin-Adenosyltransferase
ME	Mercaptoethanol
MP	Mercaptopropanol
MEKC	Micellare elektrokinetische Chromatographie
MeOH	Methanol
mFBP	membrane-associated folate binding protein
MS	Methioninsynthase
MTHFR	N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen tetrahydrofolat-Reduktase
MTX	Methotrexat
MTX	Methotrexat-Polyglutamat(e)
μ_e	Elektrophoretische Mobilität
μ_{eff}	Effektive elektrokinetische Mobilität
μ_{EOF}	Elektrophoretische Mobilität des EOF
NAC	N-Acetylcystein
N ⁵ -FTHF	N ⁵ -Formyltetrahydrofolat
N ¹⁰ -FTHF	N ¹⁰ -Formyltetrahydrofolat
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
N ⁵ ,N ¹⁰ -MTHF	N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen tetrahydrofolat
N ⁵ -MTHF	N ⁵ -Methyltetrahydrofolat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PRPP	α -5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PO	per os (oral)
PZNSL	Primäre Lymphome des zentralen Nervensystems
QC-Probe	Qualitätskontrollprobe
r	Korrelationskoeffizient

RE	Relative error (relativer Fehler)
RFC	Reduced folate carrier
RI	Remission/Induktion
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSD	Relative standard deviation (Variationskoeffizient)
S	Standard
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAHH	S-Adenosylhomocystein-Hydrolase
SAM	S-Adenosylmethionin
SBDF	4-(Sulfo)-7-Fluor-Benzofurazan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAA	Sulphur-containing excitatory amino acids (schwefelhaltige, exzitatorische Aminosäuren)
SHR	Standard/High-Risk
SL	Stammlösung
SR	Standard-Risk
ss	Steady-State
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
TBP	Tributylphosphin
THB	Tetrahydrobiopterin
THF	Tetrahydrofolsäure (Tetrahydrofolat)
TIT	Intrathekale Tripeltherapie
ULOQ	Upper limit of quantification (obere Bestimmungsgrenze)
v	Wanderungsgeschwindigkeit
VK	Variationskoeffizient
\bar{x}	Mittelwert
\tilde{x}	Median
Z	Transformierter Korrelationskoeffizient
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Homocystein

Homocystein (s. Abb. 1-1) ist eine schwefelhaltige, nicht-proteinogene Aminosäure, die als Zwischenprodukt im Rahmen des Methioninabbaus anfällt. Sie besitzt für den menschlichen Organismus keine essentiell wichtige Funktion. Großes Interesse an Homocystein wurde geweckt, als McCully 1969 zeigte, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen und arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen besteht¹. Nachfolgende Forschungen konnten herausstellen, dass Homocystein einen unabhängigen Risikofaktor für arteriosklerotische Gefäßerkrankungen^{2,3}, Herzinfarkt⁴ und Schlaganfälle^{5,6} darstellt. Darüber hinaus verdichten sich mittlerweile auch Hinweise, dass dementive Erkrankungen mit Homocystein assoziiert sind^{7,8}.

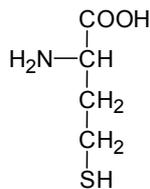


Abb. 1-1: Strukturformel von Homocystein.

Homocystein liegt im Plasma hauptsächlich gebunden an Serumalbumin (bis zu 80 %) oder in Form von Disulfiden vor. Neben Homocystin, dem reinen Disulfid, existieren auch gemischte Disulfide, insbesondere solche mit Cystein und Cysteinylglycin. Nur ein geringer Anteil des Homocysteins kommt in der freien, reduzierten Form vor. Homocystein und Disulfide werden renal eliminiert. Im Falle deutlich erhöhter Homocystein-Plasmakonzentrationen werden größere Mengen an Homocystin im Urin gefunden (Homocystinurie).

Normale Homocystein-Plasmakonzentrationen Erwachsener liegen zwischen 5 und 15 μM , Männer zeigen tendenziell höhere Konzentrationen als Frauen. Kang nahm 1992 basierend auf diesen Werten eine Einteilung in die moderate (16-30 μM), intermediäre (31-100 μM) und schwere Hyperhomocysteinämie (> 100 μM) vor⁹.

Jüngere Studien deuten darauf hin, dass das Risiko für vaskuläre Krankheiten schon unterhalb einer Homocysteinkonzentration von 16 μM signifikant erhöht ist. So kam z.B. eine 1995 veröffentlichte Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass jede Erhöhung der Nüchtern-Homocysteinkonzentration um 5 μM (oberhalb eines Ausgangswerts von 10 μM) mit einem Anstieg des Risikos für koronare Herzerkrankungen um 60 % bei Männern und 80 % bei Frauen verbunden ist³. Die „D.A.CH-Liga Homocystein“ empfiehlt daher eine Homocysteinkonzentration < 10 μM anzustreben. Nach Ansicht der Liga liegt eine moderate Hyperhomocysteinämie bereits bei 12 μM vor¹⁰. Dieser Grenzwert ist heute international anerkannt. Bei Kindern (< 15 Jahre) betragen die Homocysteinkonzentrationen im Plasma zwischen 4 und 8 μM ^{11,12}, Normwerte sind bislang nicht definiert.

1.1.1 Homocysteinestoffwechsel

Die rasche Entfernung des intermediär gebildeten Homocysteins ist aus toxikologischer Sicht außerordentlich wichtig. Neben einer direkten Ausscheidung über die Nieren, kann die Homocysteinkonzentration über zwei Stoffwechselwege reguliert werden, die Remethylierung zu Methionin und die Transsulfurierung zu Cystein (s. hierzu auch Abb. 1-2).

Die Remethylierung erfolgt über die Methioninsynthase (MS) und erfordert die Cofaktoren Vitamin B₁₂ und N⁵-Methyltetrahydrofolat (N⁵-Methyl-THF). N⁵-Methyl-THF wird durch die N⁵,N¹⁰-Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) aus N⁵,N¹⁰-Methylentetrahydrofolat (N⁵,N¹⁰-Methylen-THF) synthetisiert. Die Verfügbarkeit von N⁵,N¹⁰-Methylen-THF ist von der Folsäure-Aufnahme mit der Nahrung abhängig. Neben der Methioninsynthase-Reaktion ist eine Methioninbildung auch durch die Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT) möglich. Bei dieser Variante überträgt nicht N⁵-Methyl-THF, sondern Betain die Methylgruppe auf Homocystein. Die quantitative Gewichtung dieser beiden Remethylierungswege, die insbesondere in der Leber stattfinden, ist wenig erforscht. Zudem ist kaum etwas über die gewebeabhängige Expression der MS und der BHMT bekannt. Neueren Befunden zufolge scheint beim Menschen das Vorkommen der BHMT auf die Leber und die Niere beschränkt zu sein¹³.

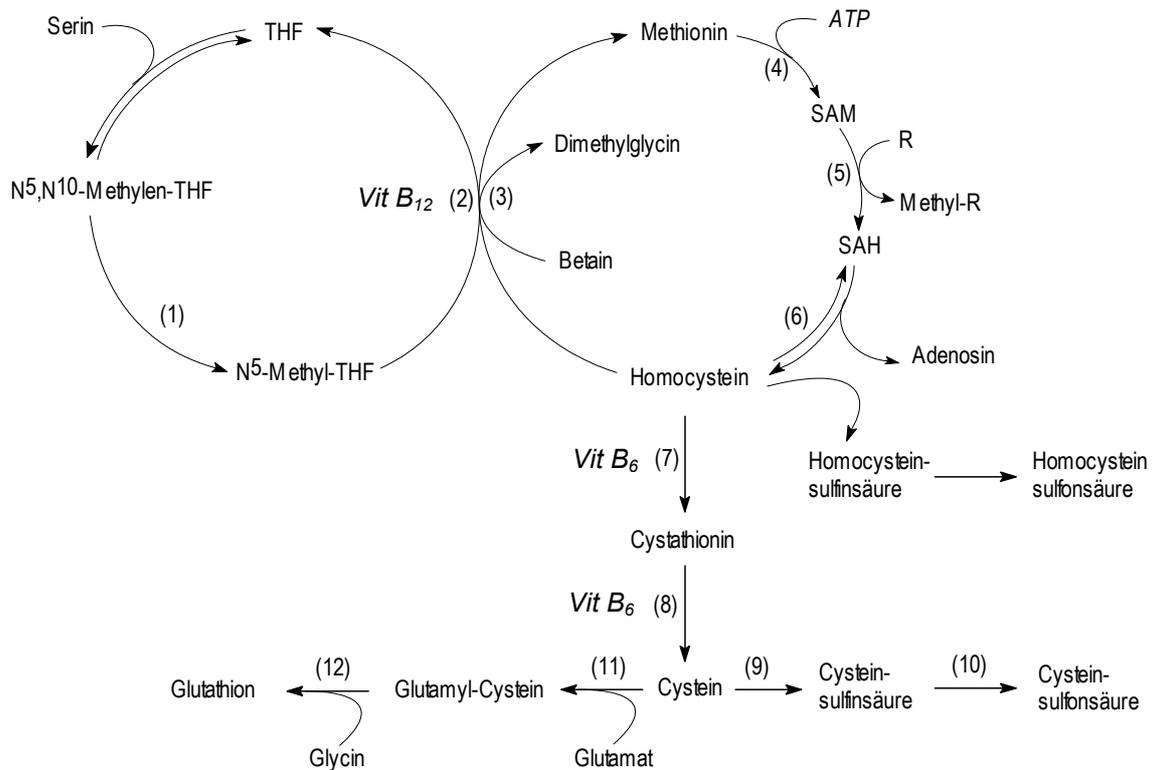


Abb. 1-2: Der humane (Methionin-)Homocystein-Stoffwechsel. Abkürzungen: ATP: Adenosintriphosphat, N⁵-Methyl-THF: N⁵-Methyltetrahydrofolat, N⁵,N¹⁰-Methylen-THF: N⁵,N¹⁰-Methyltetrahydrofolat, SAH: S-Adenosylhomocystein; SAM: S-Adenosylmethionin, THF: Tetrahydrofolat. Enzyme: (1): N⁵,N¹⁰-Methyltetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR), (2): Methioninsynthase (MS), (3): Betain-Homocystein-Methyltransferase (BHMT), (4): Methionin-Adosyltransferase (MAT), (5): R-Methyltransferase (6): S-Adenosylhomocystein-Hydrolase (SAHH), (7): Cystathionin-β-Synthase (CBS), (8): Cystathionin-γ-Lyase (CGL), (9): Cystein-Dioxygenase, (10): Cysteinsulfinsäure-Dehydrogenase, (11): γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase, (12): Glutathion-Synthetase.

Die irreversible Umwandlung zu Cystein (Transsulfurierung) erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird Homocystein mit Serin zu Cystathionin kondensiert. Diese Pyridoxalphosphat (Vitamin B₆)-abhängige Reaktion wird durch die Cystathionin-β-Synthase (CBS) katalysiert, welche beim Menschen insbesondere in Leber, Niere,

Dünndarm und Pankreas exprimiert wird¹⁴. Im zweiten Schritt wird Cystathionin durch die Cystathionin- γ -Lyase (CGL) zu Cystein und α -Ketobutyrat gespalten. Als Cofaktor dient wiederum Vitamin B₆.

Remethylierung und Transsulfurierung stehen ungefähr im gleichen Verhältnis. Dies hängt damit zusammen, dass zum einen CBS und Methyltransferasen (MS und BHMT) vergleichbare Enzymaktivitäten aufweisen¹⁵, zum anderen das Ausmaß der Remethylierung bzw. Transsulfurierung durch S-Adenosylmethionin (SAM), welches beim Abbau von Methionin zu Homocystein entsteht, gesteuert wird. SAM vermag die MS und BHMT zu inhibieren, die CBS hingegen zu aktivieren. Somit wird bei hohen SAM-Konzentrationen Homocystein vermehrt transsulfuriert, während niedrige Konzentrationen an SAM eher die Remethylierung begünstigen¹⁵.

Cystein kann für die Synthese des Radikalfängers Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinylglycin) verwendet oder durch die Cystein-Dioxygenase zu Cysteinsulfinsäure (cysteine sulphinic acid, CSA) und nachfolgend durch die Cysteinsulfinsäure-Dehydrogenase zu Cysteinsulfonsäure (cysteic acid, CA) oxidiert werden¹⁶. Vergleichbare Enzymsysteme, die Homocystein zur Homocysteinsulfinsäure (homocysteine sulphinic acid, HCSA) bzw. Homocysteinsulfonsäure (homocysteic acid, HCA) oxidieren, sind bislang nicht identifiziert worden. Es wurde daher angenommen, dass HCSA und HCA in Abhängigkeit vom Oxidationspotential des Körpers spontan entstehen können^{17,18}. Alle vier Metaboliten – CSA, CA, HCSA und HCA – sind in der Lage, über ionotrope Glutamat-Rezeptoren Neuronen zu erregen¹⁹⁻²² und werden daher zusammen als schwefelhaltige, exzitatorische Aminosäuren („sulphur-containing excitatory amino acids“, SEAA) bezeichnet. Von diesen SEAA wird insbesondere Cysteinsulfinsäure als Neurotransmitter-Kandidat diskutiert^{16,17}.

1.1.2 Ursachen einer Hyperhomocysteinämie

Durch die Vielfalt der am Homocysteinestoffwechsel beteiligten Enzyme und Cofaktoren sind viele genetische und alimentäre Störungen dieses Stoffwechsels möglich (s. Tab. 1-1). Im Folgenden soll auf die häufigsten Ursachen, die zu einer Hyperhomocysteinämie führen, näher eingegangen werden.

1.1.2.1 Genetische Störungen

Recht häufig kommen Punktmutationen der N⁵,N¹⁰-Methylen tetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) vor. Besonders oft wird eine thermolabile Variante der MTHFR mit einer Mutation im Nukleotid 677 (MTHFR 677C→T) identifiziert²³. Man schätzt, dass dieser genetische Defekt in Deutschland bei ca. 5-15 % der Bevölkerung in homozygoter und bei ca. 35 % in heterozygoter Form vorliegt¹⁰. Während heterozygot Betroffene nur geringfügig erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma aufweisen, treten bei homozygot Betroffenen Homocysteinkonzentrationen auf, die bis zu 10 µM höher liegen als bei Gesunden²³. Der Mangel der MTHFR induziert eine schwere Hyperhomocysteinämie mit Homocystinurie und verläuft unbehandelt, bedingt durch eine ausgeprägte Demyelinisierung des Zentralnervensystems, häufig letal²⁴.

Ein ähnliches klinisches Bild und vergleichbar ungünstige Prognosen weisen Patienten mit defekter Methioninsynthase auf²⁵. Von differentialdiagnostischem Interesse ist, dass sowohl der MTHFR- als auch der MS-Mangel von signifikant niedrigeren Methionin-Plasmakonzentrationen begleitet sind. Auch ein Mangel der Cystathionin-β-synthase (CBS), der in Deutschland mit einer Häufigkeit von ca. 1:130.000 vorkommt¹⁴, führt zu einer schweren Hyperhomocysteinämie; Homocystein-Plasmakonzentrationen bis zu 400 µM werden beobachtet und Homocystin wird mit dem Urin ausgeschieden (klassische Homocystinurie). Aufgrund der gestörten Transsulfurierung finden sich im Plasma niedrige Cystein- aber hohe Methioninkonzentrationen.

1.1.2.2 Vitaminmangel

Häufig werden Hyperhomocysteinämien aufgrund alimentärer Mängel (Fehl- oder Mangelernährung) sowie einer Malabsorption oder Maldigestion, die einen Mangel an Vitamin B₆-, Vitamin B₁₂- oder Folsäure nach sich ziehen, beobachtet²⁶⁻²⁸.

In einer Studie von Stabler et al. wiesen sowohl Patienten mit Folsäuremangel als auch solche mit Vitamin B₁₂-Defiziten stark erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma auf, teilweise lagen die Konzentrationen über 100 µM²⁹. Bedingt durch einen

Mangel an frischem Obst und Gemüse ist der Folatmangel das häufigste Vitamindefizit in Europa. Die durchschnittliche tägliche Folataufnahme mit der Nahrung ($\sim 300 \mu\text{g}$)³⁰ liegt deutlich unter den empfohlenen Richtwerten ($400 \mu\text{g}$)¹⁰. Erhebungen in Deutschland offenbarten, dass 50 % der Bevölkerung weniger als $200 \mu\text{g}$ Folsäure täglich zu sich nehmen. In Kanada, Chile, Ungarn und den USA werden Mehlprodukte bereits seit einigen Jahren mit Folsäure versetzt. In den USA z.B. muss Weizenmehl seit Januar 1998 mit $140 \mu\text{g}$ Folsäure je 100g Mehl angereichert sein. Diese Maßnahme erfolgte unter anderem auch deswegen, weil ein Folatmangel zu Neuralrohrdefekten bei Neugeborenen führen kann. Ein Vitamin B₁₂-Mangel kommt seltener vor. Er betrifft insbesondere ältere Menschen (bis zu 40 %), die Vitamin B₁₂ wegen altersbedingter verminderter Magensäuresekretion oder eines Mangels an intrinsischem Faktor nur unzureichend resorbieren¹⁰. Die „Framingham Heart Study“ konnte zeigen, dass Vitamin B₆-Aufnahmen von weniger als $1,4 \text{mg/Tag}$ leicht erhöhte Homocysteinkonzentrationen nach sich ziehen³¹. Im Vergleich zu Vitamin B₁₂ und Folsäure beeinflusst jedoch ein Mangel an Vitamin B₆ die Homocysteinkonzentration weniger stark. Vitamin B₆-Defizite sind vergleichsweise selten, sie können aber durch Arzneistoffe, die Vitamin B₆ komplexieren (Isoniazid) oder dessen Funktionsweise hemmen (Theophyllin, Niacin) hervorgerufen werden.

Tab. 1-1: Häufige Ursachen der Hyperhomocysteinämie/Homocystinurie und deren Auswirkung auf die Plasmakonzentrationen von Methionin und Cystein. Nähere Erläuterungen im Text.

Entität	Hyperhomocysteinämie	Homocystinurie	Methionin	Cystein
MTHFR-Variante*	+	---	---	---
MTHFR-Mangel	+	+	↓	---
MS-Mangel	+	+	↓	---
CBS-Mangel	+	+	↑	↓
Folsäure-Mangel	+	---/+	---	---
Vitamin B ₁₂ -Mangel	+	---/+	---	---
Vitamin B ₆ -Mangel	+	---/---	---	---

* MTHFR 677C→T (thermolabile MTHFR)

1.1.2.3 Sonstige Ursachen

Häufig führen Einschränkungen der Nierenfunktion zu erhöhten Homocystein-konzentrationen. Dies ist unter anderem auch der Grund dafür, dass mit steigendem Alter zunehmend höhere Homocysteinkonzentrationen beobachtet werden¹⁰.

Zahlreiche Arzneistoffe können ebenfalls eine Erhöhung der Homocystein-Plasmakonzentration induzieren. Sie wirken auf direktem oder indirektem Weg antagonistisch zu den Cofaktoren bzw. Enzymen des Homocysteinstoffwechsels oder interferieren mit der renalen Elimination von Homocystein. Eine Auswahl häufig eingesetzter Arzneistoffe, die eine Hyperhomocysteinämie hervorrufen können, beinhaltet Tab. 1-2.

Tab. 1-2: Arzneistoffe, die zu einer Hyperhomocysteinämie führen können¹⁰.

Arzneistoff(gruppe)	Mechanismus
Metformin, Protonenpumpenblocker (z.B. Omeprazol), Colestyramin, Diuretika (z.B. Furosemid, Triamteren, Thiazide)	Verminderte Resorption von Vitamin B ₁₂
Antifolate (z.B. Trimethoprim, Methotrexat)	Hemmung der Dihydrofolatreduktase
Antiepileptika (z.B. Carbamazepin, Phenytoin)	Interaktion mit dem Folatstoffwechsel
Isoniazid	Vitamin B ₆ -Antagonismus (Hydrazonbildung)
Methylxanthine (z.B. Theophyllin, Coffein)	Hemmung der Pyridoxal-Kinase
Lachgas (N ₂ O)	Inaktivierung der Methioninsynthase
Cyclosporin, Fibrate (z.B. Clofibrat)	Verminderte Nierenfunktion

Ferner konnte gezeigt werden, dass Rauchen³², Kaffee³³ und übermäßiger Alkoholgenuss³⁴ zu einer Erhöhung der Homocystein-konzentration führen kann.

1.1.3 Klinische Symptomatik einer Hyperhomocysteinämie und therapeutische Empfehlungen

Das klinische Bild von Patienten mit Hyperhomocyst(e)inämie/Homocystinurie ist von der Art und dem Ausmaß der Störung abhängig, die der Erkrankung zugrunde liegt. Bereits moderat erhöhte Homocystein-Plasmakonzentrationen (D.A.CH-Liga: >12-30 μM) können kardiovaskuläre Erkrankungen^{3,4,35}, osteoporotische Knochenveränderungen mit erhöhter Frakturrate³⁶ und kognitive Störungen^{7,8,37} hervorrufen. Nach metaanalytischen Berechnungen würde eine Homocysteinsenkung um 3-5 μM die Inzidenz von venösen Thrombosen, zerebralen Insulten und Herzinfarkten um bis zu 25 %(!) reduzieren^{38,39}. Die D.A.CH-Liga Homocystein empfiehlt zur Senkung moderat erhöhter Homocysteinkonzentrationen eine Kombinationstherapie bestehend aus Folsäure (0,2-0,8 mg), Vitamin B₁₂ (3-30 μg , > 60 Jahre: 100 μg) und Vitamin B₆ (2-6 mg)¹⁰.

Patienten, die unter einer massiven Störung der Remethylierung von Homocystein leiden (z.B. infolge eines ausgeprägten Mangels an Vitamin B₁₂ oder reduzierten Folaten oder infolge eines Defektes der MS oder MTHFR), weisen im Gegensatz zu

Tab. 1-3: Klinische Symptomatik und Therapie von Störungen im Homocystein-stoffwechsel.

Störung	Klinische Symptome (Auswahl)	Therapie
<i>Remethylierungsstörung</i> (ausgeprägter Folat- und/oder Vitamin B ₁₂ -Mangel, MTHFR-Mangel, MS-Mangel)	Megaloblastäre Anämie, Myelopathien, Neuropathien, Atherosklerose, Thromboembolien, Osteoporose, Ataxie, psychomotorische Retardierung, Demenz, zerebrale Anfallsleiden, Demyelinisierung, zerebrale Atrophie ^{24,40-43}	Gabe von Vitamin B ₆ /B ₁₂ , Folsäure, Methionin, Betain, sowie N ⁵ -Methyl-THF bei MTHFR-Mangel ^{44,45}
<i>Transsulfurierungsstörung</i> (CBS-Mangel)	Atherosklerose, Thromboembolien, Luxation der Augenlinsen, Osteoporose, helle Haare, mentale Retardierung, psychiatrische Störungen ⁴²	Gabe von Vitamin B ₆ und Betain, Methionin-Diät ⁴⁵⁻⁴⁷

Patienten mit Transsulfurierungsdefekt (z.B. bei homozygoten CBS-Mangel) eine schwerwiegende neurologische Symptomatik auf (s. Tab. 1-3). Neben Krampfanfällen steht ein rapider mentaler Abbau im Vordergrund, der unter anderem Folge einer zerebralen, kernspintomographisch gut nachweisbaren Demyelinisierung ist^{40,43}.

1.1.4 Pathomechanismen

Nachfolgend werden die wichtigsten pathologischen Mechanismen diskutiert, die für die Schädigung von Gefäßen, Knochen und Nerven verantwortlich gemacht werden.

Atherogene Mechanismen

Eine vaskuläre Dysfunktion soll insbesondere durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst werden, die bei der Oxidation des Homocysteins freigesetzt werden (Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen, Hydroxylradikale)^{1,48}. Sie wirken direkt toxisch auf das Endothel, inaktivieren vasoprotektives NO („endothelium derived relaxing factor“, EDRF)⁴⁹ und oxidieren Lipide, die reich an ungesättigten Fettsäuren sind. Es konnte In-vitro gezeigt werden, dass auch LDL-Partikel (Low density lipoproteins) durch ROS oxidiert werden⁵⁰. Die LDL-Oxidation wird als Schlüsselschritt der Atherosklerose angesehen.

Neben oxidativen Mechanismen wird ein Methylierungsdefizit für Gefäßschäden verantwortlich gemacht⁵¹. Es tritt insbesondere dann auf, wenn SAM, der wichtigste Überträger von Methylgruppen im Organismus, nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht (z.B. aufgrund einer gestörten Remethylierung). Allerdings können Methylierungsreaktionen trotz suffizienter Mengen an SAM auch dann gestört sein, wenn infolge erhöhter Homocysteinkonzentrationen (z.B. bei CBS-Mangel) die Konzentration des SAH ansteigt^{52,52} (die SAH-Hydrolase begünstigt die Bildung, nicht den Abbau von SAH⁵³). Da SAH von SAM-nutzenden Methyltransferasen mit höherer Affinität gebunden wird als SAM, stellt es einen starken Inhibitor für Methylierungsreaktionen dar⁵⁴. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Zustand der Hypomethylierung auch eine verminderte Methylierung der DNA von Muskelzellen der Intima nach sich zieht und dadurch bedingt Mutationen auftreten,

die zur Proliferation glatter Muskelzellen und nachfolgender Verengung des Gefäßlumens führen⁵⁵.

Aus In-vitro-Studien ist bekannt, dass Homocystein über verschiedene Mechanismen mit dem Gerinnungssystem interferieren kann. Es steigert die Aktivierung des Gerinnungsfaktors V⁵⁶ und fördert die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin⁵⁶, sowie die Bildung der Gewebsthrombokinase („tissue factor“)⁵⁷. Wichtige Hemmstoffe des Gerinnungssystems werden in geringerem Ausmaß gebildet (Heparansulfat⁵⁸) bzw. aktiviert (Thrombomodulin, Antithrombin III, Protein C⁵⁹⁻⁶²). Darüber hinaus beeinträchtigt Homocystein die Bindung des Gewebe-Plasminogen-Aktivators an Endothelzellen und verringert somit die Fibrinolyse⁶³. Alle diese Mechanismen führen zur vermehrten Bildung von Thrombin und schaffen so eine prothrombotische Situation. Es muss einschränkend erwähnt werden, dass in den oben angeführten In-vitro-Studien in der Regel Homocysteinkonzentrationen eingesetzt wurden, die weit über der Plasmakonzentration von Patienten mit moderater Hyperhomocysteinämie lagen und in-vivo oftmals nicht bestätigt werden konnten.

Mechanismen der Knochenschädigung

McKusick konnte bereits 1966 zeigen, dass Homocystein mit der Kollagen-Quervernetzung interferiert und diese Interaktion in einer verminderten Knochenstabilität resultiert⁶⁴. Dieser Mechanismus der Knochenschädigung wurde später durch Kang et al. bestätigt⁶⁵.

Mechanismen der neurotoxischen Wirkung

Auch die neurotoxische Wirkung des Homocysteins wird auf einen erhöhten oxidativen Stress und Methylierungsstörungen zurückgeführt. Ferner sollen NMDA-Rezeptor-vermittelte toxische Reaktionen eine größere Rolle spielen.

ROS stellen für das Gehirn eine besondere Gefahr dar, da es einen hohen Anteil mehrfach ungesättigter Fettsäuren besitzt, die Aktivität ROS-detoxifizierender Enzyme (Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase) im Gehirn vergleichsweise niedrig ist und abgestorbene Neuronen nicht ersetzt werden können⁶⁶. ROS, die im Rahmen der Oxidation von Homocystein anfallen, könnten daher die Entgiftungskapazitäten des Gehirns übersteigen und zu neuronalen

Schäden führen. Von besonderem Interesse ist, dass ROS-induzierte DNA-Strangbrüche und nachfolgende Apoptose bereits bei Homocysteinkonzentrationen von 0,5 µM beobachtet wurden⁶⁷. White et al. konnten zeigen, dass die Oxidation von Homocystein insbesondere durch zweiwertige Kupferionen katalysiert wird und dass Kupfer komplexierende Substanzen (Chelat-Bildner) die neurotoxische Wirkung von Homocystein weitgehend aufheben. Sie zeigten weiterhin, dass auch Katalase, ein Enzym, welches Wasserstoffperoxid entgiftet, in der Lage ist, Homocystein induzierte neurotoxische Effekte zu verhindern und schlossen daraus, dass bei der Oxidation des Homocysteins insbesondere Wasserstoffperoxid freigesetzt wird⁶⁸. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten belegen, dass auch Glutathion aufgrund seiner antioxidativen Wirkung neurotoxische Effekte des Homocysteins deutlich verringern kann^{69,70}.

Methylierungsdefizite können sich auf zerebraler Ebene besonders fatal auswirken, da sie zu einem Mangel an Cholin, einem essentiellen Bestandteil der Myelinscheide von Neuronen, führen. Ein langfristig ausgeprägter Mangel an Cholin wurde für Demyelinisierungen verantwortlich gemacht, welche man bei Patienten mit massiv gestörter Remethylierung beobachtet^{24,40-43}. Ho et al. konnten zeigen, dass SAM die Homocystein induzierte Apoptoserate bei Neuronen signifikant reduzieren kann – ein Indiz dafür, dass Methylierungsdefizite auch zur Einleitung apoptotischer Prozesse führen können⁷¹.

Homocystein, insbesondere aber seine Metaboliten HCSA und HCA und in weiterem Sinn auch CSA, CA, haben eine hohe Affinität zu ionotropen Glutamat-Rezeptoren, vor allem dem NMDA-Rezeptor^{18,19,21,22,72}. Eine intensive Stimulation des Rezeptors mit exzitatorischen Substanzen führt zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration und nachfolgend zur Aktivierung zahlreicher zytotoxischer Enzyme⁷³⁻⁷⁵. Bei massiver Überladung mit Calciumionen geht die Nervenzelle aufgrund osmotischer Lyse oder durch das Einleiten der Apoptose zugrunde (s. Abb. 1-3). Das Konzept der Exzitotoxizität (Kunstwort aus Exzitation und Toxizität) ist für das Entstehen zahlreicher neurodegenerativer Erkrankungen verantwortlich gemacht worden^{74,75}. Homocystein und dessen oxidative Metaboliten wurden in den Liquores von Patienten mit gestörter Homocysteinverstoffwechslung und ausgeprägter Neurotoxizität in zum Teil deutlich erhöhten Konzentrationen nachgewiesen^{52,76}. Anhand von Versuchen mit neuronalen Zellkulturen wurde demonstriert, dass

Homocystein vermittelte neurotoxische Reaktionen durch die Gabe von NMDA-Rezeptorantagonisten signifikant reduziert werden können^{67,71,72}.

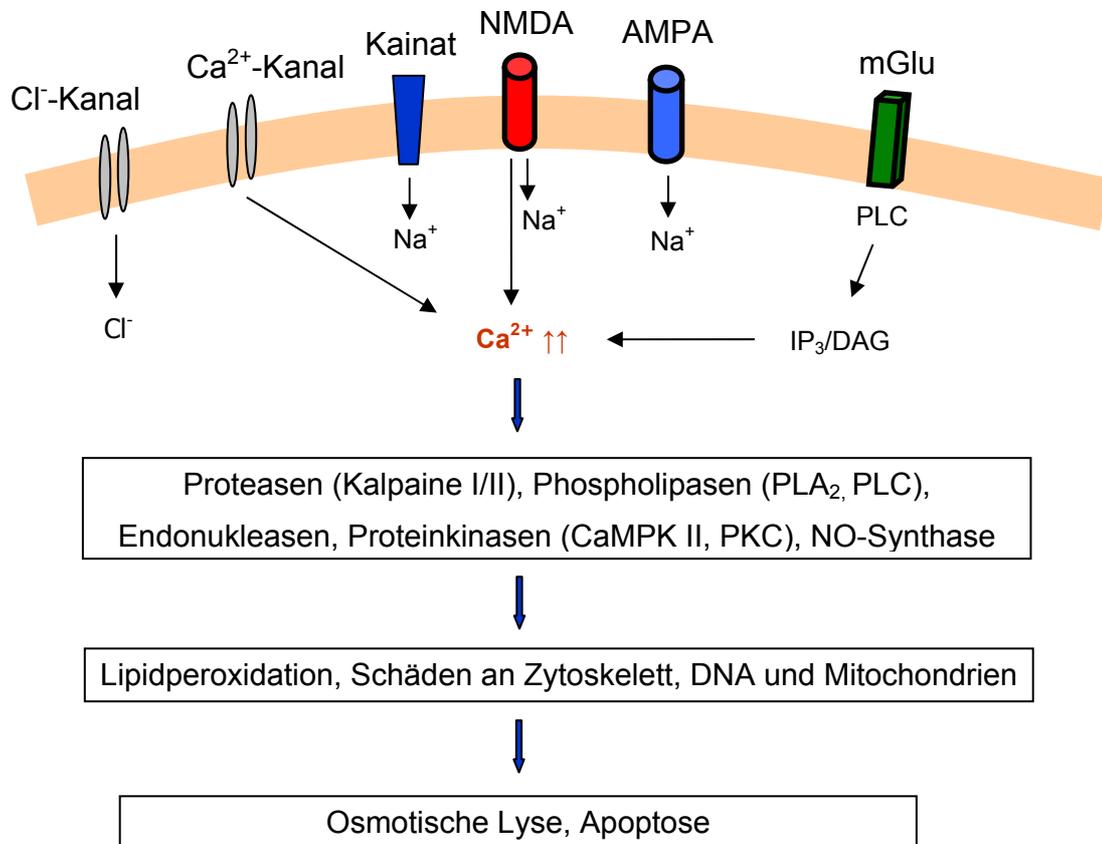


Abb. 1-3: Mechanismus der Exzitotoxizität.

Abkürzungen: Kainat: Kainat-Rezeptor; NMDA: N-Methyl-D-Aspartat(-Rezeptor); AMPA: L- α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure(-Rezeptor); mGLU: metabotroper Glutamatrezeptor; PLC: Phospholipase C; IP₃: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerol

Ferner wird diskutiert, dass Homocystein induzierte atherosklerotische Veränderungen zerebraler Gefäße zu Ischämie und Hypoxie führen könnten, und dadurch bedingt Neuronen zu Schaden kommen⁷⁷.

Auch Cystein steht im Verdacht, in höheren Konzentrationen neurotoxische Wirkungen hervorzurufen⁷⁸⁻⁸⁰. Diese additive Toxizität könnte insbesondere dann zum Tragen kommen, wenn die Blut-Hirn- bzw. Blut-Liquor-Schranke durch eine Infiltration mit Tumoren oder durch Bestrahlungen geschädigt wird und größere Mengen Cystein aus dem Blut ins ZNS gelangen können.

1.2 Methotrexat

Im Jahre 1948 berichtete Farber über den ersten erfolgreichen Einsatz des Folsäureantagonisten Aminopterin in der Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern⁸¹. Kurze Zeit später wurde mit Methotrexat (Amethopterin, MTX) ein weiterer Folsäureantagonist eingeführt. Es verdrängte Aminopterin in der Therapie, da es sich als weniger toxisch erwies. Seitdem wird MTX zur Behandlung verschiedener maligner Erkrankungen, in der Rheumatologie und der Immunologie eingesetzt. Einen bedeutenden Wandel erlebte die MTX-Therapie, als Djerassi 1967 zeigen konnte, dass MTX in potentiell letalen Dosen appliziert werden kann, wenn nach einer MTX-Infusion Calciumfolinat (Leucovorin[®]) zum Schutz normaler Zellen verabreicht wird („Rescue“)⁸². Durch dieses Konzept konnte insbesondere die Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie, der Lymphome und der Osteosarkome entscheidend verbessert werden.

1.2.1 Chemische Struktur

MTX besteht aus einem Pteridinring, p-Aminobenzoessäure und Glutaminsäure (s. Abb. 1-4). Es unterscheidet sich von der natürlich vorkommenden Folsäure durch den Austausch der Hydroxy- gegen die Aminogruppe in Position 4 des Pteridinrings sowie eine N-Methylierung am p-Aminobenzoessäurerest.

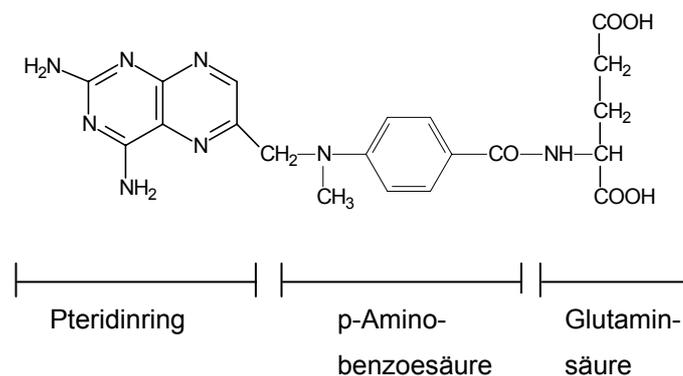


Abb. 1-4: Chemische Struktur von MTX (4-Amino-4-desoxy-N¹⁰-methyl-folsäure).

1.2.2 Pharmakokinetik

Resorption und Verteilung

Methotrexat wird in einer Dosierung bis zu 25 mg/m^2 gut aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert⁸³, höhere Dosen werden unvollständig resorbiert. Nach subkutaner Applikation werden bis zu 40 mg/m^2 ⁸⁴, nach intramuskulärer bis zu 100 mg ⁸⁵ resorbiert. Ungefähr 50 % des MTX sind an Plasmaproteine gebunden⁸³.

Nach erfolgter Resorption verteilt sich MTX rasch im gesamten Körperwasserraum. Aus pathologisch vergrößerten, extravaskulären Räumen (Pleuraerguss, Aszites, Ödeme) wird MTX nur verzögert wieder freigesetzt. Die Folge sind protahiert erhöhte Plasmakonzentrationen und eine deutliche Verlängerung der terminalen Halbwertszeit. Zytotoxische Konzentrationen können unter Umständen noch nach erfolgter Rescue-Therapie vorliegen. Aus diesem Grund müssen vor einer hochdosierten MTX-Gabe (HDMTX) Ergüsse entfernt und Ödeme ausgeschwemmt werden⁸⁵.

MTX gelangt durch passive Diffusion oder Carrier-vermittelte Transportsysteme in den Intrazellularraum. Die zwei wichtigsten Transportsysteme sind der „Reduced Folate Carrier“ (RFC) und ein membranständiger Folatrezeptor (FR), auch „Membrane-Associated Folate Binding Protein“ (mFBP) genannt. Natürliche Substrate für den RFC sind reduzierte Folate, insbesondere N^5 -Methyltetrahydrofolat (N^5 -Methyl-THF). Der bidirektionale RFC-Transport ist pH-abhängig und stellt ein sättigbares System für reduzierte Folate ($K_M = 1\text{-}10 \mu\text{M}$)^{86,87} und MTX ($K_M = 0,8\text{-}26 \mu\text{M}$)⁸⁷ dar. Eine verminderte oder fehlerhafte Expression des RFC-Transporters kann die Zytotoxizität mindern und somit zur Resistenzentwicklung gegen Antifolate führen^{88,89}. Der Folatrezeptor (FR) besitzt eine etwas höhere Affinität zu Folsäure ($K_M = 1\text{-}5 \text{ nM}$) als zu reduzierten Folaten und MTX. Er spielt wegen seiner geringen Kapazität für den MTX-Transport in die Zelle nur eine untergeordnete Rolle⁸⁵.

MTX passiert aufgrund seiner hohen Polarität nur sehr schlecht die Blut-Hirn-Schranke. Unter einer Dauerinfusion erreichen die MTX-Konzentrationen im Liquor nur 1-5 % der Steady-State-Konzentrationen im Serum⁹⁰⁻⁹². Zytotoxische Konzentrationen ($> 1,0 \mu\text{M}$ ⁹³) im Liquor werden daher nur erzielt, wenn MTX in

hohen Dosen infundiert oder intrathekal (intralumbal oder intraventrikulär) verabreicht wird. Da sich MTX nach intralumbaler Applikation schlecht im Ventrikelsystem verteilt und zudem die Konzentration im ventrikulären Liquor nur ca. 10 % der Konzentration im Lumbalsack beträgt⁹⁴, wird MTX alternativ auch direkt in die Seitenventrikel appliziert.

Metabolisierung

Bislang sind drei verschiedene Metaboliten von MTX identifiziert worden (s. Abb. 1-5). Der Hauptmetabolit, 7-OH-Methotrexat (7-OH-MTX), wird durch unspezifische Aldehydoxidasen der Leber gebildet. 7-OH-MTX ist 40-200fach schwächer wirksam als MTX und gilt daher als inaktiver Metabolit⁸⁵. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit trägt 7-OH-MTX entscheidend zur Nephrotoxizität von MTX bei. Es wurde gezeigt, dass ein akutes Nierenversagen nach HDMTX unter anderem durch ausgefallenes 7-OH-MTX in den Nierentubuli zurückzuführen ist⁹⁵. Die renale Toxizität kann weitgehend vermieden werden, wenn man vor Anlegen der MTX-Infusion für eine ausreichende Hydrierung sorgt (Infusion von 0,9 % NaCl-Lösung und 5 % Glucose-Lösung im Wechsel, mindestens 3 L/m²/Tag) und den Urin durch Gabe von Natriumbicarbonat alkalisiert.

Ein weiterer Metabolit, die 2,4-Diamino-N¹⁰-methylpteroinsäure (DAMPA), wird hauptsächlich von intestinalen Darmbakterien gebildet⁹⁶. Klinisch wird DAMPA keine Bedeutung beigemessen, da sie nur zu einem geringen Prozentsatz entsteht (3-5 %) und eine wesentlich niedrigere Affinität zum Zielenzym, der Dihydrofolatreduktase, besitzt als MTX (ca. 1/200 der MTX-Affinität)⁹⁶.

Intrazellulär werden an MTX, wie auch an die natürlich vorkommenden Folate, durch die Folsäure-Polyglutamatsynthetase (FPGS) bis zu sechs Glutaminsäurereste angehängt^{97,98}. Die gebildeten mehrfach negativ geladenen MTX-Polyglutamate (MTX-PG) können weder über den RFC und den FR noch durch passive Diffusion die Zelle verlassen und verbleiben somit länger als MTX in der Zelle. Sie werden, wie die natürlich vorkommenden Folsäurepolyglutamate, aktiv in die Lysosomen der Zelle transportiert und dort gespeichert. Erst nach Abspaltung des Polyglutamatrestes durch die Folsäure-Polyglutamathydrolase (FPGH) kann MTX wieder die Zelle verlassen. Da die MTX-PG eine ähnlich hohe Affinität zur DHFR

haben wie MTX und zudem in der Lage sind, Enzyme der Purinbiosynthese direkt zu hemmen, kommt ihnen eine große Bedeutung für die Zytotoxizität zu (s. 1.2.3).

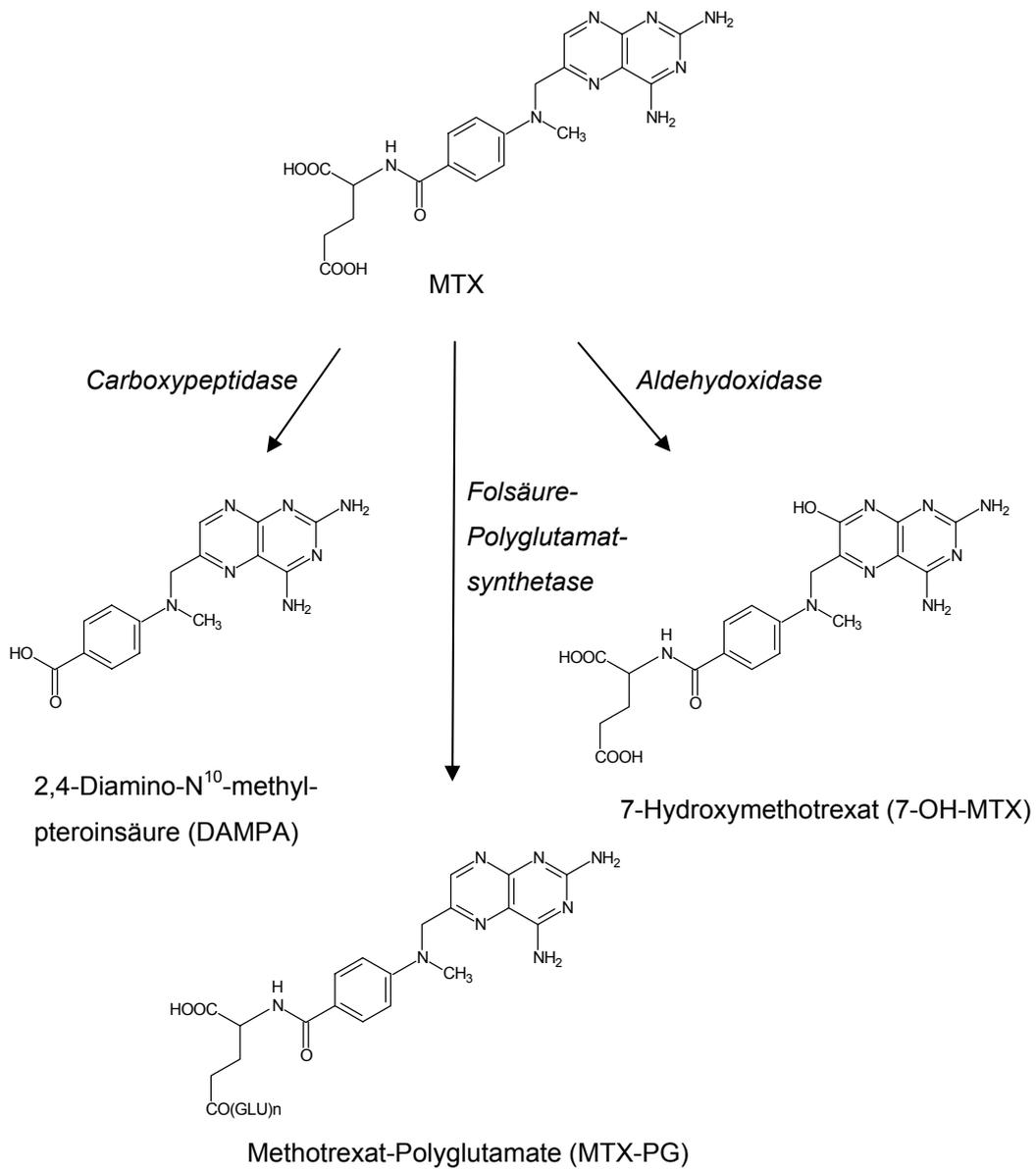


Abb. 1-5: Metabolisierung von MTX.

Elimination

MTX wird hauptsächlich über die Nieren in unveränderter Form ausgeschieden. Die renale Elimination erfolgt zum Teil durch glomeruläre Filtration, zum Teil durch tubuläre Sekretion. Ein gewisser Teil wird auch tubulär rückresorbiert. Insgesamt ist die renale Clearance sehr variabel. Sie ist im Besonderen abhängig von der Hydrierung, dem Urin-Fluss und -pH-Wert, sowie einer eventuell gegebenen Komedikation. Darüber hinaus ist sie aufgrund der sättigbaren tubulären Sekretion abhängig von der verabreichten MTX-Dosis⁸⁵. Kinder (ca. 80 mL/min/m²) zeigen nach einer HDMTX-Infusion allgemein eine höhere Clearance als Erwachsene (ca. 57 mL/min/m²)⁹⁹.

Weniger als 10 % werden über die Galle ausgeschieden. Biliär eliminiertes MTX unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf, so dass nach einer Infusion nur geringe Mengen an MTX (< 2 %) im Stuhl gefunden werden¹⁰⁰.

Nach intravenöser Gabe wird MTX aus dem Plasma biphasisch eliminiert. Auf eine Phase schneller Verteilung ($t_{1/2} = 1,5-3,5$ h) folgt eine Phase, die durch die renale Elimination geprägt ist ($t_{1/2} = 8,0-15,8$ h)^{101,102}. Bei Vorliegen dritter Verteilungsräume (Ödeme, Aszites, Pleuraerguss) kann sich die terminale Halbwertszeit vervierfachen⁸⁵.

Nach intrathekaler Applikation erfolgt die Elimination aus dem zentralen Nervensystem durch Resorption von Liquor und ein unspezifisches aktives Transportsystem, welches im Choroid-Plexus liegt¹⁰³. Die Ausscheidung aus dem lumbalen bzw. ventrikulären Liquor verläuft ebenfalls biphasisch, die Halbwertszeiten betragen 4,5 und 14,0⁹⁴ bzw. 1,7 und 6,6 Stunden¹⁰³. Die Clearance aus dem ZNS-Kompartiment kann bei meningealer Leukämie, Hydrocephalus und dem postpunktionellen Syndrom nach Lumbalpunktion vermindert sein⁹⁴.

1.2.3 Wirkungsmechanismus

MTX ist ein Antimetabolit. Es imitiert das natürliche Substrat der Dihydrofolat-reduktase, die Dihydrofolsäure (DHF), ohne deren Funktion zu übernehmen. Die kompetitive Hemmung der DHFR ($K_i \sim 0,01-0,2$ nM)⁸³ bewirkt einen Mangel an reduzierten Folaten, die der Organismus zur Synthese von Purin- und Pyrimidinbasen benötigt (s. Abb. 1-6). Intrazellulär gebildete MTX-PG hemmen trotz

vergleichbarer Affinität die DHFR stärker als MTX, da sie wesentlich langsamer von der DHFR abdissoziieren⁹⁸.

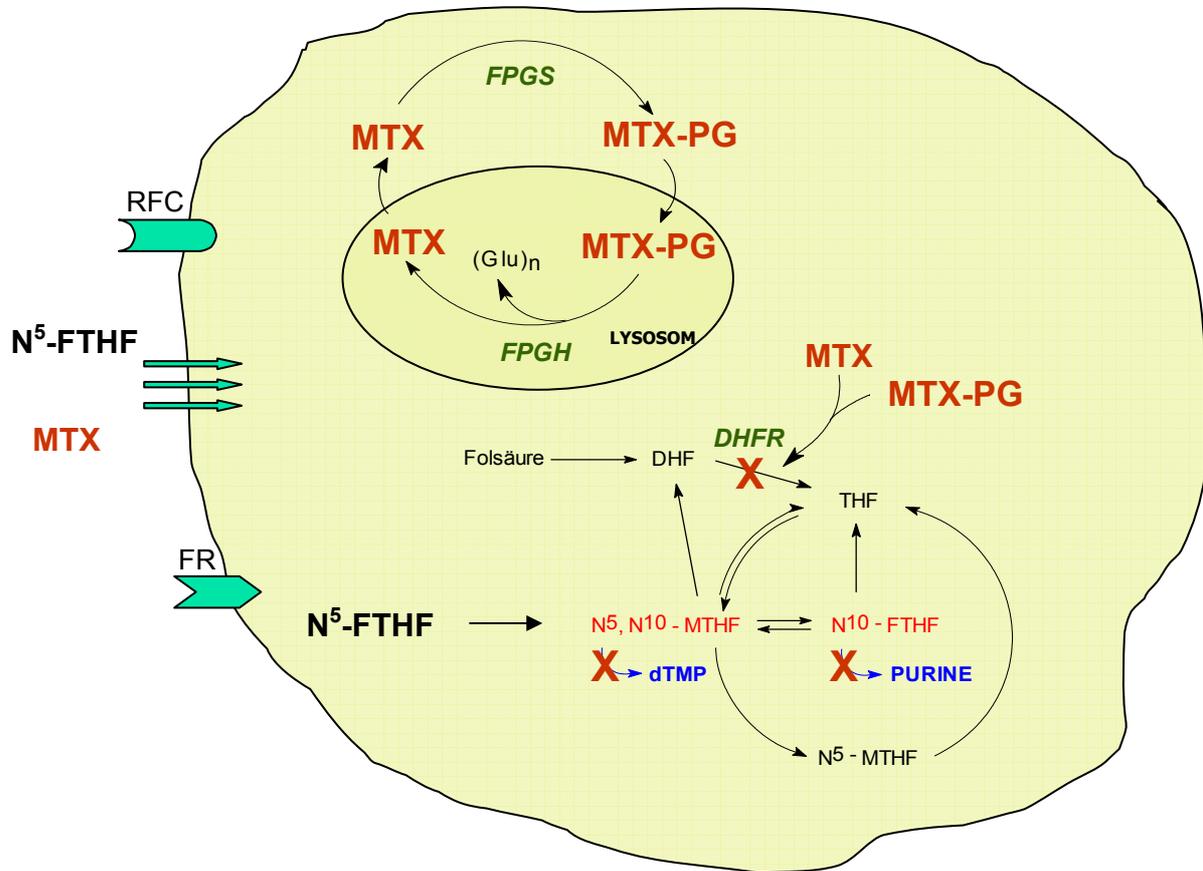


Abb. 1-6: Intrazelluläre Wirkungsmechanismen von MTX und Rescue mit Calciumfolinat (N^5 -Formyltetrahydrofolat, N^5 -FTHF). Abkürzungen: RFC: Reduced Folate Carrier, FR: Folate Receptor, MTX-PG: Methotrexat-Polyglutamate, FPGS: Foly-Polyglutamatsynthetase, FPGH: Foly-Polyglutamathydrolase, DHFR: Dihydrofolatreduktase, N^5 -FTHF: N^5 -Formyltetrahydrofolat, N^{10} -FTHF: N^{10} -Formyltetrahydrofolat, N^5, N^{10} -MTHF: N^5, N^{10} -Methylen tetrahydrofolat, N^5 -MTHF: N^5 -Methyltetrahydrofolat.

Darüber hinaus sind sie in der Lage, die Thymidilatsynthase¹⁰⁴ und Enzyme der Purinbiosynthese, die Glycinamidribonukleotid-Transformylase (GAR-TF) und die 5-Aminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid-Transformylase (AICAR-TF)^{105,106} direkt zu hemmen (s. Abb. 1-7). Die Biosynthese kommt auf der Stufe des

Glycinamidribonukleotids (GAR) bzw. des 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotids zum Stehen.

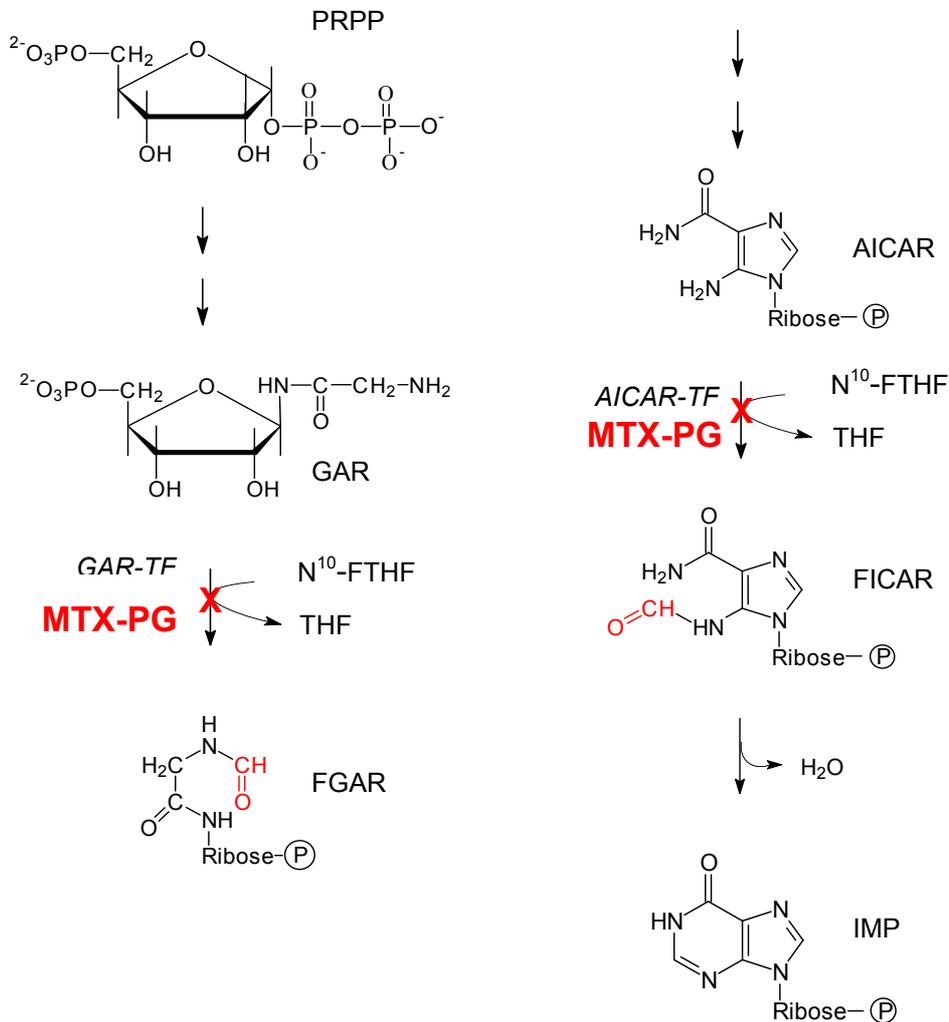


Abb. 1-7: Interaktion von MTX-PG mit der De-Novo-Synthese von Purinbasen (ausgewählte Schritte). Abkürzungen: PRPP: α-5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, GAR: Glycinamidribonukleotid, GAR-TF: GAR-Transformylase, FGAR: Formylglycinamidribonukleotid, N¹⁰-FTHF: N¹⁰-Formyltetrahydrofolat, THF: Tetrahydrofolat, AICAR: 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-ribonukleotid, AICAR-TF: AICAR-Transformylase, FICAR: 5-Formamido-imidazol-4-carboxamidribonukleotid, IMP: Inosinmonophosphat.

Da AICAR ein Hemmstoff der AMP- und Adenosin-Desaminase ist¹⁰⁷, kann nach einer HDMTX-Therapie die Konzentration an Adenosin im Plasma bzw. Liquor erhöht sein^{108,109}. Insgesamt wird den MTX-PG ein großer Stellenwert für die Wirksamkeit von MTX zugeschrieben. Whitehead konnte z.B. zeigen, dass die Überlebensrate nach fünf Jahren bei Kindern, deren Lymphoblasten große Mengen an MTX-PG akkumulierten, deutlich größer war als bei Kindern, deren Lymphoblasten nur in begrenztem Umfang MTX-PG aufnahmen⁸⁹.

1.2.4 Klinische Anwendungen

Zur Therapie maligner Erkrankungen wird MTX in niedriger Dosierung (< 100 mg/m²) bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL), Meningiosis leucaemica, Chorionepitheliom, Mamma-Karzinom, Cervix-Karzinom, Ovarial-Karzinom, kleinzelligem Bronchial-Karzinom, Malignomen im Hals und Kopfbereich und bei ZNS-Tumoren verwendet.

Mittelhohe (MDMTX, 100-1000 mg/m²) und hohe Dosierungen (HDMTX, > 1000 mg/m²) werden immer dann eingesetzt, wenn schlecht perfundierte Tumore (z.B. Osteosarkome) erreicht werden sollen oder zytotoxische Konzentrationen im ZNS erforderlich sind (Malignome im Kopf-Hals-Bereich, ZNS-Tumore, ZNS-Prophylaxe bei der ALL und NHL). Darüber hinaus werden hohe Dosen an MTX eingesetzt, um Resistenzen zu überwinden, die sich durch einen reduzierten MTX-Membrantransport auszeichnen. In solchen Fällen werden rein durch passive Diffusion zytotoxische Konzentrationen in den Zellen aufgebaut. Die Verabreichung mittelhoher und hoher MTX-Dosen erfordert, neben einer ausreichenden Hydrierung und Urin-Alkalisierung, zum Schutz gesunder Wechselgewebe (insbesondere Schleimhäute, gastrointestinale Epithelien, Knochenmark) eine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat (N⁵-Formyltetrahydrofolat). Calciumfolinat wird rasch in N¹⁰-FTHF, und N⁵,N¹⁰-MTHF umgewandelt, so dass eine ausreichende Bereitstellung aktivierter C1-Einheiten für die Purin- und Pyrimidinsynthese gewährleistet ist (s. Abb. 1-6). Die Rescue-Therapie muss spätestens 42-48 h nach Beginn der MTX-Infusion eingeleitet werden. Die zu verabreichende Dosis an Calciumfolinat richtet sich nach den individuell bestimmten MTX-Serumkonzentrationen.

Aufgrund der lymphostatischen Wirkung wird MTX auch zur Therapie der generalisierten Psoriasis vulgaris und der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Bei diesen Krankheitsbildern wird MTX in einer Dosierung von 5-25 mg/Woche gegeben.

1.2.5 Neurotoxizität von MTX

MTX wird bei ordnungsgemäßer Anwendung durch einen erfahrenen Onkologen auch in hohen Dosen relativ gut vertragen. Zwischenzeitlich auftretende Nebenwirkungen betreffen insbesondere schnell proliferierende Gewebe, wie Schleimhäute (Mucositis) und das Knochenmark (Myelosuppression). Gelegentlich kommt es zu Nieren-, Leber- und Hautschädigungen (Erytheme, exfoliative Dermatitis). All diese unerwünschten Wirkungen sind in der Regel reversibel und führen selten zum Abbruch der Therapie.

Die MTX-induzierte Neurotoxizität hingegen stellt, insbesondere dann, wenn sie einen chronischen Verlauf annimmt, eine äußerst ernsthafte Komplikation dar, therapeutische Optionen fehlen bislang. Sie tritt insbesondere nach HDMTX auf, eine gleichzeitige Bestrahlung oder die intrathekale Gabe von MTX (ITMTX) erhöhen das Risiko¹¹⁰. Ferner ist gezeigt worden, dass auch kumulativ hohe Dosen das Entstehen der Neurotoxizität begünstigen¹¹¹⁻¹¹³.

1.2.5.1 Klinische Symptomatik

Die MTX-induzierte Neurotoxizität wird nach ihrem zeitlichen Verlauf in die akute, subakute und chronische Form eingeteilt (s. Tab. 1-4).

Die akute Form tritt ein bis zwei Tage nach HDMTX auf. Die Patienten leiden unter Schläfrigkeit, Verwirrung, Desorientiertheit und Krampfanfällen^{110,114,115}. Insbesondere nach ITMTX findet man eine akute Arachnoiditis, eine Entzündung der Hirn- und Rückenmarkshaut, die mit einer Pleocytose (Erhöhung der Zellzahl im Liquor) verbunden ist^{110,116,117}. Sie ist in aller Regel von Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber begleitet und klingt nach ca. 3 Tagen ab^{110,118}.

Symptome der subakuten Neurotoxizität zeigen sich mehrere Tage nach der MTX-Initialtherapie. Teilweise können aber auch Wochen verstreichen, bis das Bild der subakuten Form manifest wird¹¹⁹. Im Vordergrund steht eine Enzephalopathie, die

sich klinisch mit affektiven Störungen, Verwirrung, Krämpfen, Lähmungserscheinungen (insbesondere Hemiparesen) und Sprachstörungen (Dysphasie, Dysarthrie) zeigt^{110,115,120-123}. Diese Enzephalopathie ist in aller Regel voll reversibel^{115,119,124}. Sie wird aufgrund des klinischen Bildes auch als „stroke-like-syndrom“ bezeichnet. ITMTX erhöht das Risiko, eine schmerzhafte Myelopathie mit Paraparesen bzw. Paraplegien zu entwickeln^{113,125,126}. Seltener sind sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark betroffen (Myeloenzephalopathie). Diese Variante ist mit schwerwiegenden neurologischen Ausfällen verbunden und besitzt in ausgeprägten Fällen eine infauste Prognose¹²⁷.

Tab. 1-4: Formen der MTX-induzierten Neurotoxizität.

Form	Eintritt nach MTX-Gabe	Klinische Symptome
Akut	Nach 1-2 Tagen	Schläfrigkeit, Verwirrung, Krämpfe, chemische Arachnoiditis mit Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Fieber
Subakut	Nach Tagen bis Wochen	Enzephalopathie mit Hemiparese, Ataxie, Sprachstörungen, Krämpfen, Verwirrung und affektiven Störungen; Myelopathie mit schmerzhaften Empfindlichkeitsstörungen in den Beinen, Paraplegie und Blasenfunktionsstörungen
Chronisch	Nach Monaten, teilweise erst Jahre später	Lern- und Gedächtnisstörungen, Verminderung des Intelligenzquotienten, Leukenzephalopathie mit Verwirrung, Krämpfen, Ataxie, Quadriparese, Dysphasie, Demenz, Koma, Tod

Monate bis Jahre nach einer Behandlung mit MTX kann sich eine chronisch progrediente Form entwickeln, die durch eine Leukenzephalopathie, eine demyelinisierende Enzephalomyelitis, geprägt ist. Diese Form tritt insbesondere dann auf, wenn Patienten MTX sowohl intravenös als auch intrathekal verabreicht bekamen und zusätzlich eine Bestrahlung erhielten¹¹⁰. Charakteristische Symptome einer

Leukenzephalopathie sind Desorientierung, Lähmungserscheinungen, Ataxie, Sprach- und Sehstörungen, Krämpfe sowie dementive Erscheinungen^{124,128-131}. Leichte Formen der Leukenzephalopathie können sich teilweise zurückbilden^{119,128,132-134}, ausgeprägte hingegen verlaufen letal^{128,135}. Patienten, die klinisch asymptomatisch sind, können im Alltag durch Lern- und Gedächtnisstörungen sowie einem verminderten Intelligenzquotienten auffallen. Diese Defizite sind besonders stark ausgeprägt, wenn im Rahmen der Therapie eine Schädelbestrahlung stattgefunden hat¹³⁶⁻¹⁴¹.

1.2.5.2 Genese der Neurotoxizität

Die Genese der Neurotoxizität bleibt, obwohl seit Jahren intensiv beforscht, im Wesentlichen unklar. Neben einer direkt toxischen Wirkung auf das Nervengewebe¹⁴², wird vor allem MTX-induzierten Veränderungen im Adenosin-, Biopterin- und Homocystein-Stoffwechsel ein hoher Stellenwert beigemessen^{142,143}. Die Interaktion des MTX mit diesen Stoffwechselwegen und mögliche Konsequenzen werden nachfolgend erläutert.

Interaktion mit dem Adenosinstoffwechsel

MTX interagiert mit dem Adenosinstoffwechsel über die intermediär gebildeten MTX-PG. Sie bedingen durch Hemmung der AICAR-Transferylase die Anhäufung von AICAR, einem starken Inhibitor der AMP- und Adenosin-Desaminase, und nachfolgend auch von Adenosin (s. Kap. 1.2.3).

Bernini et al. zeigten, dass Patienten, die mit HDMTX therapiert wurden, erhöhte Adenosinkonzentrationen im Liquor aufwiesen und dass Symptome einer akuten Neurotoxizität durch die Gabe von Aminophyllin, einem Adenosin-Rezeptorantagonisten, abgeschwächt werden konnten¹⁴⁴. Auch Peyriere et al. konnten eine ausgeprägte akute Neurotoxizität mit Aminophyllin erfolgreich behandeln¹⁴⁵. Prospektiv angelegte Studien mit einer größeren Fallzahl fehlen bislang, so dass bis dato nicht geklärt ist, welchen Stellenwert die Interaktion mit dem Adenosinstoffwechsel für die Genese früher neurotoxischer Symptome besitzt.

Interaktion mit dem Biopterinstoffwechsel

Tetrahydrobiopterin (THB) ist Cofaktor der Hydroxylierung von Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und somit essentiell für die Biosynthese der Neurotransmitter Dopamin und Serotonin. Die enzymatisch katalysierte Wiedergewinnung von THB (aus Dihydrobiopterin) erfolgt über die Dihydrofolatreduktase, die N⁵,N¹⁰-Methylen-tetrahydrofolatreduktase oder die Dihydropteridinreduktase (DHPR) (s. Abb. 1-8). Methotrexat beeinflusst alle drei Wege der Rückgewinnung von THB: die Enzyme DHFR und DHPR¹⁴⁶ werden direkt, die N⁵,N¹⁰-Methylen-THFR indirekt, bedingt durch einen Mangel an reduzierten Folaten, gehemmt. THB kann bei vollständiger Blockade dieser drei Enzymsysteme nur über die Neusynthese aus Guanosintriphosphat (GTP) geliefert werden.

Abelson et al. stellten bereits 1978 die Hypothese auf, dass ein MTX-induzierter Mangel an THB zur verminderten Synthese von Dopamin und Serotonin führt und die unzureichende Verfügbarkeit dieser Neurotransmitter für das klinische Bild der akuten bzw. subakuten Neurotoxizität verantwortlich ist¹⁴⁷. Diese Theorie konnte bis heute nicht bewiesen werden. Es existieren lediglich zwei Einzelfallberichte, die die Hypothese von Abelson et al. stützen. Aus dem einen geht hervor, dass ein Patient mit subakuter Neurotoxizität eine erniedrigte THB-Konzentration im Liquor besaß und dass die Gabe von DOPA, Carbidopa und 5-Hydroxytryptophan (so genannte Substitutivtherapie bei Patienten mit Biopterinmangel) die Symptomatik des Patienten verbesserte¹⁴⁸. Der andere Fallbericht kam zu dem Ergebnis, dass nach Verabreichung von HDMTX im Liquor eines Patienten weniger Abbauprodukte von Dopamin (Homovanillinsäure) und Serotonin (Hydroxyindolessigsäure) gefunden wurden¹⁴⁹. Zwei größere klinische Studien, durchgeführt jeweils an Kindern mit ALL, offenbarten, dass HDMTX keine signifikante Veränderungen im Stoffwechsel des Dopamins bzw. Serotonins bewirkt^{148,150}. In-vitro-Versuche, einen Mangel an THB durch MTX zu induzieren, scheiterten¹⁵¹⁻¹⁵³; wahrscheinlich liefert die Neusynthese aus GTP ausreichend große Mengen an THB, sodass MTX, in therapeutischen Dosen verabreicht, keine Verarmung des THB-Pools bewirkt¹⁵³.

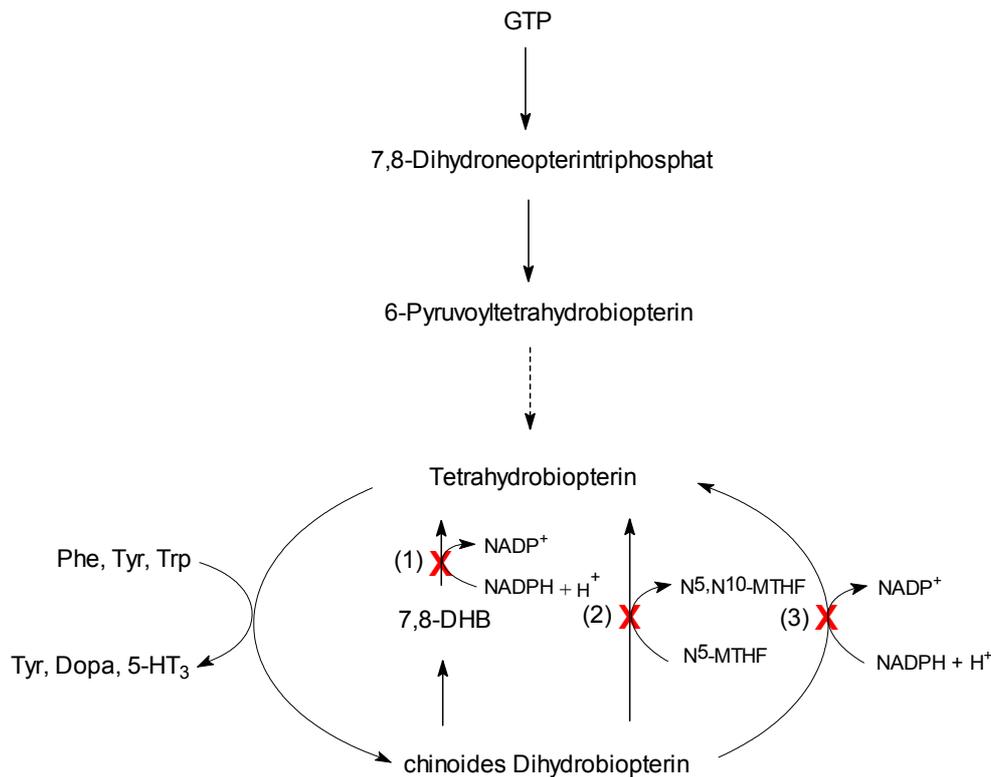


Abb. 1-8: Interaktion von MTX mit dem Biopterinstoffwechsel. Abkürzungen: 7,8-DHB: Dihydrobiopterin, GTP: Guanosintriphosphat, 5-HT₃: Serotonin, Phe: Phenylalanin, Trp: Tryptophan, Tyr: Tyrosin; Enzyme: (1): Dihydrofolatreduktase (DHFR), (2): N⁵,N¹⁰-Methylen tetrahydrofolatreduktase (N⁵,N¹⁰-Methylen-THFR) (3): Dihydropteridinreduktase (DHPR).

Interaktion mit dem Homocysteinestoffwechsel

MTX beeinflusst den Stoffwechsel des Homocysteins, indem es einen Mangel an N⁵-Methyl-THF, dem Cofaktor der Methioninsynthase, induziert^{76,154}. Somit unterdrückt MTX die Remethylierung zu Methionin, welche im Gehirn die wichtigste Abbaureaktion von Homocystein darstellt (s. Kap. 1.1.1).

Erhöhte Homocysteinkonzentrationen wurden sowohl im Plasma¹⁵⁵⁻¹⁵⁹ als auch im Liquor^{76,160,161} von Patienten, die wegen einer onkologischen Erkrankung HDMTX verabreicht bekamen, gefunden. Quinn et al. stellten die Hypothese auf, dass insbesondere Mikroangiopathien und fokale neurologische Ausfälle, welche man bei

Patienten mit MTX-induzierter Neurotoxizität beobachtet, durch die gefäßschädigende Wirkung des Homocysteins verursacht werden⁷⁶. Kishi et al. zeigten, dass Kinder, die im Rahmen einer Hochdosis-Chemotherapie mit MTX unter Krampfanfällen litten, tendenziell höhere Homocysteinkonzentrationen im Plasma besaßen als solche, die keine neurologischen Symptome aufwiesen¹⁵⁶.

Die Arbeitsgruppe um Quinn konnte in retrospektiv untersuchten Liquores von MTX-behandelten Patienten auch die oxidativen Metaboliten des Homocysteins (CSA, CA, HCSA, HCA), zum Teil (insbesondere CSA und HCA) in extrem hohen Konzentrationen^{76,161} nachweisen. In den Liquores einer gleichzeitig untersuchten Kontrollgruppe (gesunde Erwachsene) konnten die exzitatorischen Metaboliten des Homocysteins (SEAA) hingegen nicht detektiert werden⁷⁶. Interessanterweise besaßen diejenigen Patienten, die neurotoxische Symptome aufwiesen, die höchsten SEAA-Konzentrationen.

Surtees et al. zeigten, dass unter einer HDMTX-Therapie die Konzentrationen an SAM und Methionin im Liquor abfallen und dass die gemessenen SAM-Konzentrationen invers mit den Konzentrationen an MBP (Myelin basisches Protein), einem Marker für die Demyelinisierung, korrelierten¹⁵⁴. Kishi et al. zeigten, dass zwei ALL-Patienten mit ausgeprägter Leukenzephalopathie einen deutlich niedrigeren SAM/SAH-Quotienten besaßen, als sieben ALL-Patienten, die klinisch unauffällig waren¹⁶². Beide Studien geben starke Hinweise dafür, dass ein MTX-induziertes Methylierungsdefizit dazu beiträgt, dass sich eine chronische Form der MTX-Neurotoxizität entwickelt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass aufgrund der bisher durchgeführten Studien, nicht zuletzt aber auch wegen der sehr vergleichbaren klinischen Symptomatik von MTX-Neurotoxizität und (ausgeprägtem) Methylierungsdefizit (s. Kap. 1.1.3), vieles dafür spricht, dass als Hauptauslöser der MTX-Neurotoxizität die gestörte Remethylierung des Homocysteins in Frage kommt. Homocystein und seine exzitatorischen Metaboliten sowie eine verringerte Methylierungskapazität sind Mediatoren dieser Toxizität. Ein eindeutiger Beweis dieser These ist allerdings bis heute, nicht zuletzt aufgrund mangelhaften Studiendesigns und zu geringer Fallzahlen, nicht erbracht worden.

1.3 Problemstellung und Zielsetzung

Die neurotoxische Wirkung von Methotrexat wird unter anderem auf Methotrexat-induzierte metabolische Veränderungen zurückgeführt. Es scheint sich herauszukristallisieren, dass insbesondere Veränderungen im Homocystein-stoffwechsel eine Bedeutung für die Genese neurotoxischer Symptome zu haben scheinen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass unter einer Chemotherapie mit hochdosiertem Methotrexat einerseits Homocystein und dessen oxidative Metaboliten im Plasma bzw. Liquor akkumulieren, andererseits Methionin und SAM depletieren.

In der Regel wurden diese Daten punktuell, d.h. oft nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Chemotherapie, erhoben. Die quantitative Beschreibung einer veränderten Verstoffwechslung von Homocystein im Verlauf einer Chemotherapie mit HDMTX fehlt bislang oder ist nur ansatzweise vorhanden.

Besonders spärlich sind die Informationen darüber, wie sich die gestörte Metabolisierung von Homocystein, bedingt durch eine intravenöse oder intrathekale Verabreichung von MTX, auf das zentrale Nervensystem (ZNS) auswirkt. Dies ist von besonderem Interesse, wenn man berücksichtigt, dass im ZNS weder die Betain-Homocystein-Methyltransferase^{13,163} noch die Cystathionin- β -Synthase^{14,164} zur Verstoffwechslung von Homocystein zur Verfügung steht. Aufgrund dieser Tatsache sollte eine Methotrexat-induzierte gestörte Remethylierung zu Methionin, bedingt durch einen Mangel an N⁵-Methyltetrahydrofolat, einen besonders deutlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration im ZNS nach sich ziehen. Darüber hinaus sollten – bedingt durch die Akkumulation des Homocysteins – auch die Konzentrationen an SAH und den oxidativen Metaboliten des Homocysteins im Verlauf der Chemotherapie ansteigen.

Um ein besseres Bild bezüglich MTX-induzierter Veränderungen des Homocystein-stoffwechsels zu gewinnen und um die Bedeutung dieser Veränderungen auf die Genese der Neurotoxizität zu evaluieren, wurde zum Ziel gesetzt, neben Methotrexat gleichzeitig alle Substanzen, die in den Stoffwechsel des Homocysteins involviert sind und denen eine pathophysiologische Rolle bei der Genese der Neurotoxizität

zukommen könnte, in Proben von Tumorpatienten, die eine Hochdosis-Chemotherapie mit Methotrexat erhalten, zu bestimmen. Ausgewählt wurden:

- N⁵-Methyltetrahydrofolat
- Homocystein
- Metaboliten des Homocysteins: HCSA, HCA
- S-Adenosylmethionin/S-Adenosylhomocystein
- Cystein
- Metaboliten des Cysteins: CSA, CA
- Glutathion

Zusätzlich wurde festgelegt, die Konzentrationen von MTX im Liquor zu bestimmen. Die Bestimmung von MTX, N⁵-Methyltetrahydrofolat und SAM/SAH im Liquor wurde von der Projektpartnerin Frau Sandra Vezmar (Dissertation in Vorbereitung) übernommen.

Als Patientenkollektive wurden ALL-Patienten und Patienten mit primären Lymphomen des ZNS ausgewählt, die im Rahmen ihrer Behandlung keine Bestrahlung erhielten. Diese Kollektive stellen ein höchst interessantes Patientengut dar, da sie im Rahmen der Chemotherapie mit HDMTX behandelt werden und daher MTX-induzierte Veränderungen des Homocysteinstoffwechsels besonders stark ausgeprägt sein sollten. Ferner ist die Inzidenz der Neurotoxizität bei diesen Patienten recht hoch, was nicht zuletzt mit den relativ aggressiven Therapieprotokollen zusammen hängt. Bei ALL-Patienten treten beispielsweise Symptome der akuten bzw. subakuten Neurotoxizität in 1-20 %^{112,165} und Symptome der chronischen Neurotoxizität in 5-40 % aller Fälle^{112,132} auf.

Von Vorteil ist des Weiteren, dass Liquorproben bei diesen Patienten leicht erhältlich sind, da die Patienten zur Verabreichung der Zytostatika vergleichsweise häufig lumbal oder intraventrikulär punktiert werden. Da neurotoxische Wirkungen das zentralnervöse Kompartiment betreffen, sollte der Analyse von Liquorproben ein höherer prognostischer Stellenwert zukommen als der Analyse von Plasmaproben. Um die obigen Ziele zu erreichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Schwerpunkte gesetzt:

- Entwicklung und Validierung einer CE-Trennmethode zur simultanen Bestimmung schwefelhaltiger, exzitatorischer Aminosäuren (HCSA, HCA, CSA, und CA) im Liquor
- Entwicklung und Validierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein, Cystein und Glutathion im Liquor
- Entwicklung und Validierung einer HPLC-Methode zur Bestimmung von Methotrexat und 5-Methyltetrahydrofolat (diese Aufgabe wurde von der Projektpartnerin Frau Sandra Vezmar übernommen)
- Untersuchung von Liquores und Plasmaproben von ALL- bzw. Lymphompatienten mittels dieser Methoden
- Beschreibung bzw. Quantifizierung des Einflusses von MTX auf den Stoffwechsel des Homocysteins
- Evaluierung eventuell auftretender neurotoxischer Symptome nach dem Common Toxicity Criteria Katalog (in Kooperation mit den jeweils verantwortlichen Ärzteteam)
- Identifizierung von Risikofaktoren (Biomarkern) für die Neurotoxizität von Methotrexat

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Ein Markenname kann warenrechtlich geschützt sein, auch wenn ein Hinweis darauf fehlt.

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril	Promochem GmbH, Wesel
<i>N</i> -Acetylcystein (NAC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
4-(Aminosulfonyl)-7-Fluor-Benzofurazan (ABDF)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Asparaginsäure (ASP)	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
Borsäure	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm
5-Carboxyfluorescein-succinimidylester (CFSE)	Molecular Probes, Eugene, USA
L-Cystein (CYS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Cysteinsulfinsäure (CSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Cysteinsulfonsäure, Monohydrat (CA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
<i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Dinatriumsalz)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
FPIA-Puffer	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
L-Glutaminsäure (GLU)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
HCl-Lösung (1 M)	Grüssing, Filsum
L-Homocystein (HCY)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Homocysteinsulfinsäure (HCSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
L-Homocysteinsulfonsäure (HCA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
IMx [®] Homocystein-Kalibratoren	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
IMx [®] Homocystein-Kontrollen	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
IMx [®] Probenspüllösung	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden

IMx [®] Reagenzienpackung	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Methanol (MeOH)	Merck, Darmstadt
NaOH-Lösung (0,1 M und 1 M)	Riedel de Haën AG, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Phosphorsäure, 85% (V/V)	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm
Purelab [™] Plus-Wasser	USF, Ransbach-Baumbach
Tributylphosphin (TBP)	Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm

Zusammensetzung der verwendeten Reagenzien:

IMx[®] Homocystein Reagenzienpackung

Die Homocystein-Reagenzienpackung besteht aus insgesamt vier Lösungen folgender Zusammensetzung:

- Lösung A (Vorbehandlungslösung): enthält Dithiothreitol (DTT) und Adenosin; Stabilisator: Zitronensäure
- Lösung B: enthält S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase (Rind) in Phosphat-Puffer; Konservierungsmittel: Natriumcitrat
- Lösung C: enthält Anti-S-Adenosyl-L-Homocystein-Antikörper (Maus, monoklonal) in Phosphat-Puffer; Konservierungsmittel: Natriumcitrat
- Lösung D: enthält S-Adenosyl-L-Cystein-Fluorescein-Tracer in Phosphat-Puffer; Konservierungsmittel: Natriumcitrat

IMx[®] Homocystein-Kalibratoren

S-Adenosyl-L-Homocystein in Phosphat-Puffer in den folgenden Konzentrationen: 0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 μ M.

IMx[®] Homocystein-Kontrollen

L-Homocystein in behandeltem Humanserum in den folgenden Konzentrationen: 7,0; 12,5; 25,0 μ M.

IMx[®] Probennadel-Spüllösung

2 % (V/V) Tetraethylammoniumhydroxid-Lösung (TEAH)

FPIA-Puffer

0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4), 0,1 g/L Rindergammaglobulin und 0,5 g/L Natriumcitrat

2.1.2 Verwendete Lösungen und Puffer

ABDF-Stammlösung

ABDF	4,3 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,0	ad 2,0 mL

NAC-Stammlösung

NAC	8,2 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,0 (+ 2 mM Na ₂ EDTA)	ad 5,0 mL

ASP-Stammlösung (0,01 M)

ASP	6,7 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9	ad 5,0 mL

Boratpuffer (0,1 M, pH 8,0-9,5)

Borsäure	618,3 mg
Purelab™ Plus-Wasser	ad 100,0 mL
(mit 1 M NaOH auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt)	

Boratpuffer (0,1 M, pH 8,0), Na₂EDTA-haltig

EDTA-Stammlösung	1,0 mL
0,1 M Boratpuffer, pH 8,0	ad 100,0 mL

CA-Stammlösung

CA	9,4 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9	ad 5,0 mL

CFSE-Stammlösung (0,01 M)

CFSE	4,7 mg
DMF	ad 1,0 mL

CSA-Stammlösung (0,01 M)

CSA	7,7 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9	ad 5,0 mL

EDTA-Stammlösung (0,2 M)

Na ₂ EDTA	8240 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,0	ad 100,0 mL

HCY-Stammlösung (0,01 M)

HCY	6,8 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9 (+ 2 mM Na ₂ EDTA)	ad 5,0 mL

HCSA-Stammlösung (0,01 M)

HCSA	8,4 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9	ad 5,0 mL

HCA-Stammlösung (0,01 M)

HCA	9,2 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9	ad 5,0 mL

GLU-Stammlösung (0,01 M)

GLU	7,4 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 8,9	ad 5,0 mL

Phosphatpuffer (pH 2,0)

Kaliumdihydrogenphosphat	13,6 g
Purelab™ Plus–Wasser	ad 1000,0 mL
(mit 85%iger Phosphorsäure auf pH-Wert 2,0 eingestellt)	

SDS-Stammlösung (0,1 M)

SDS	2884 mg
0,1 M Boratpuffer, pH 9,0	ad 100,0 mL

Tributylphosphin-Lösung, 20 % (V/V)

TBP	0,2 mL
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	ad 1,0 mL

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Einmalspritzen (10 mL)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
IMx®-Glasküvetten (10 mL)	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
IMx®-Probengefäße	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Kapillaren (fused silica, 75 µm ID, 365 µm OD)	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Membran-Filter (0,22 µm, Celluloseacetat)	Macherey-Nagel, Düren
Pipettenspitzen	Brand GmbH & Co., Wertheim
Probengefäße (2,0 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Probengefäßdeckel	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktiongefäße (0,5 mL)	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.4 Geräte

Analysenwaage Kern 770	Gottlieb Kern & Sohn, Albstadt
Einkanal-Pipetten (10-1000 µL)	Fisher Scientific, Schwerte
Magnetrührer RMH71	Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter

pH-Meter inoLab pH level 2	WTW, Weilheim
Probenmischer	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Reinstwasseranlage Purelab™ Plus	USF, Ransbach–Baumbach
Savant Speed-Vac® (SC 110)	ThermoQuest™ Analytische Systeme GmbH, Egelsbach
Ultraschallbad Sonorex Super RK 103 H	Bandelin, Berlin
Wasserbad MGW Lauda RM 6	Werk Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge (Microfuge® Lite)	Beckman-Coulter, Fullerton, USA

Kapillarelektrophorese

P/ACE® 5510	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Dioden-Array-Detektor,	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
UV-Absorptionsdetektor,	
LIF-Detektor, Argon Ion Laser	
Kapillaren	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
(fused silica, 75 µm ID, 365 µm OD)	
P/ACE Station software (Version 1.21)	Beckman-Coulter, Fullerton, USA

HPLC-System

L-6200 Intelligent Pump	Merck-Hitachi, Darmstadt
L-6000 Pump	Merck-Hitachi, Darmstadt
Interface D-6000	Merck-Hitachi, Darmstadt
Autosampler AS-2000A	Merck-Hitachi, Darmstadt
Fluoreszenzdetektor L-7480	Merck-Hitachi, Darmstadt
Kromasil® 100-5 C 18-Säule (150 x 4,6 mm)	Macherey-Nagel, Düren
Nucleodur® 100-3 C 18-Vorsäule (8 x 3 mm)	Macherey-Nagel, Düren
Model D-7000 Chromatography Station software	Merck-Hitachi, Darmstadt

Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay (FPIA)

IMx®-System	ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
-------------	---------------------------------

TDx[®]-Probenkarussell
Kartusche „Metabolic“

ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden
ABBOTT GmbH & Co. KG, Wiesbaden

2.2 CE-Analytik

2.2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Der prinzipielle Aufbau eines CE-Systems ist in Abb. 2-1 schematisch gezeigt. Die Hauptelemente der Kapillarelektrophorese sind demnach die Kapillare selbst, zwei Puffergefäße, die den so genannten Lauf- oder Trennpuffer beherbergen, eine Hochspannungsquelle, die über zwei Platin-Elektroden mit den beiden Puffergefäßen verbunden ist, ein Detektor und ein System zur Datenerfassung.

Das bei weitem am häufigsten eingesetzte Kapillarmaterial ist *fused-silica* (amorphes Glas), welches sich durch UV-Transparenz auszeichnet. Um die mechanische Stabilität zu erhöhen, ist die *fused-silica* Kapillare mit einer dünnen Polyimidschicht überzogen. In einem bestimmten Abstand zum Ein- bzw. Auslassende der Kapillare (engl. capillary inlet und outlet) wird diese Polyimidschicht mechanisch oder durch Abbrennen entfernt, um ein Detektionsfenster zu schaffen. Üblicherweise ist die Elektrode am Kapillareinlass als Anode, die am Kapillarauslass als Kathode geschaltet. Die Injektion der Probe kann entweder elektrokinetisch, wobei die Probe durch Anlegen einer Hochspannung elektrophoretisch in die Kapillare transportiert wird, oder hydrodynamisch erfolgen.

Die am häufigsten eingesetzte Detektionsmethode ist die Messung der UV-Absorption. Prinzipiell ist dies bei einer fest eingestellten Wellenlänge oder über einen größeren Wellenlängenbereich (Diodenarray-Detektion) möglich. Bedingt durch die kurze optische Weglänge, die durch den Innendurchmesser der Kapillare festgelegt ist, ist die Konzentrationsempfindlichkeit relativ gering; die Detektionsgrenze liegt bei ungefähr 1 µM. Weitere gebräuchliche Detektoren sind der elektrochemische Detektor, der Brechungsindexdetektor, das Massenspektrometer und der Laser-induzierte Fluoreszenz-Detektor (LIF-Detektor). Die LIF-Detektion stellt die zur Zeit empfindlichste Detektionsmethode dar. Nicht selten kann die Empfindlichkeit im Vergleich zur UV-Detektion um den Faktor 1000 erhöht werden.

Kommerziell erhältliche CE-Systeme arbeiten vollautomatisch; Steuerung und Datengewinnung erfolgen EDV gestützt.

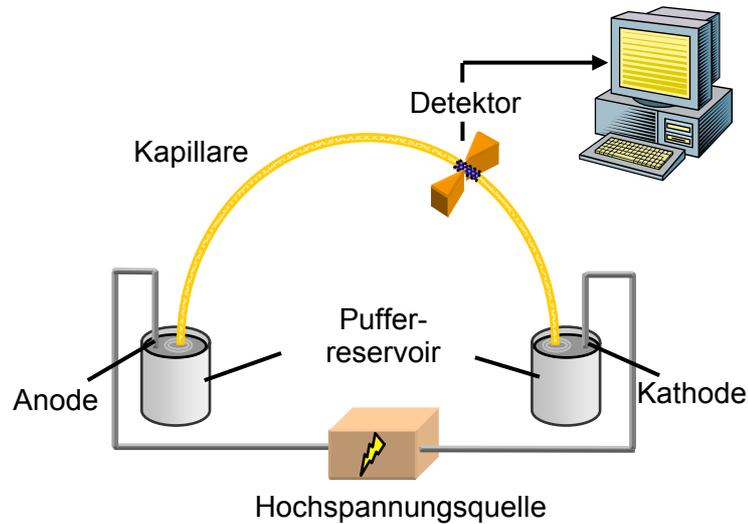


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau eines CE-Systems.

Trennprinzip

Kapillarelektrophoretische Trennungen beruhen auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten (v) geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die Geschwindigkeit der Ionen ist gemäß nachstehender Formel von der elektrophoretischen Mobilität (μ_e) und der elektrischen Feldstärke (E) abhängig:

$$v = \mu_e \cdot E \quad \text{Gl. 2-1}$$

Die elektrophoretische Mobilität eines Teilchens wird nach dem Stokes'schen Gesetz durch den Ladungs-Masse-Quotienten bestimmt:

$$\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad \text{Gl. 2-2}$$

μ_e = elektrophoretische Mobilität

q = Ladung

r = Radius

η = Viskosität

Gl. 2-2 ist zu entnehmen, dass insbesondere kleine, hochgeladene Teilchen eine hohe Mobilität haben. Die Wanderungsrichtung hängt von der Ladung ab; Kationen wandern zur Kathode, Anionen zur Anode.

Die effektive Mobilität lässt sich anhand experimenteller Daten gemäß Gl. 2-3 ermitteln:

$$\mu_{eff} = \frac{L \cdot L_{eff}}{U \cdot t_m} \quad \text{Gl. 2-3}$$

μ_{eff} = effektive elektrophoretische Mobilität

L = Gesamtlänge der Kapillare

L_{eff} = effektive Kapillarlänge (Länge bis zum Detektionsfenster)

U = angelegte Spannung

t_m = Migrationszeit

Elektroendosmotischer Fluss

Die Tatsache, dass bei normaler Polung (Anode am Kapillareinlass, Kathode am Kapillarauslass) auch Neutralteilchen und sogar Anionen detektiert werden können, ist durch den elektroendosmotischen Fluss (EOF) begründet. Voraussetzung für den EOF ist, dass Silanolgruppen der *fused-silica* Kapillare im deprotonierten Zustand vorliegen. Die Deprotonierung der Silanolgruppen (sie setzt bei pH-Werten > 2 ein) führt zu einer negativen Aufladung der Kapillareninnenwand (s. Abb. 2-2). Die Folge ist eine Anlagerung von Kationen und die Bildung einer Ladungsdoppelschicht. Da die negativen Ladungen durch diese fest fixierten Kationen nicht kompensiert werden, lagern sich weitere Kationen an. Es bildet sich eine diffuse Grenzschicht (Sternschicht).

Beim Anlegen einer Spannung wandern die solvatierten Kationen der Sternschicht Richtung Kathode. Aufgrund des geringen Kapillarinneindurchmessers bewegt sich im Prinzip die gesamte Pufferlösung zur Kathode (EOF). Da die treibende Kraft des EOF über die gesamte Kapillare wirkt und Flüssigkeitsschichten mit einem Abstand von 10 nm zur Kapillarwand bereits gleichförmig bewegt werden, entsteht ein flaches, stempelförmiges Strömungsprofil (s. Abb. 2-2).

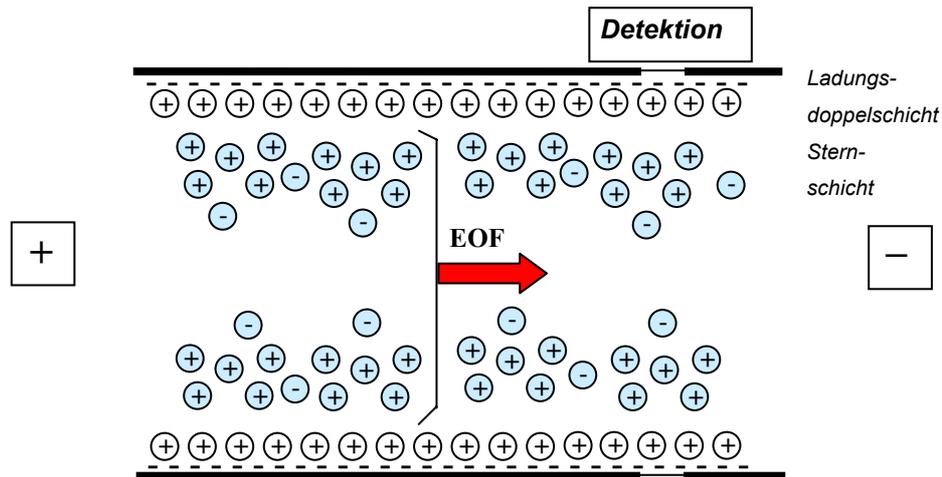


Abb. 2-2: Entstehung des elektroosmotischen Flusses einer Fused-Silica-Kapillare.

Die Mobilität des EOF (μ_{EOF}) ist abhängig vom Zetapotential (ζ), dem Potential in der Scherebene zwischen der fest fixierten Doppelschicht und der Sternschicht, sowie der Dielektrizitätskonstante und Viskosität des Puffers:

$$\mu_{EOF} = \frac{\zeta \cdot \varepsilon}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \quad \text{Gl. 2-4}$$

μ_{EOF} = elektrophoretische Mobilität des EOF

ζ = Zetapotential

ε = Dielektrizitätskonstante

η = Viskosität

Bei normaler Polung trägt der EOF dazu bei, dass die Analyten schneller detektiert werden; er überlagert die elektrophoretische Wanderung der Analyten. Die effektive Mobilität eines Analyten (μ_{eff}) ergibt sich aus der vektoriellen Summe der μ_{EOF} und der μ_e :

$$\mu_{eff} = \mu_{EOF} + \mu_e \quad \text{Gl. 2-5}$$

Der Gleichung ist zu entnehmen, dass Anionen, die gegen den EOF wandern (Kontramigration) nur detektiert werden können, falls die Mobilität des EOF die Mobilität des Anions übersteigt.

Der EOF spielt bei kapillarelektrophoretischen Untersuchungen zur Detektion und Trennung von Substanzen eine entscheidende Rolle. Bei normaler Polung wird die Auflösung durch Erniedrigung des μ_{EOF} verbessert. Prinzipiell kann dies durch eine Änderung der Ladungsverhältnisse an der Kapillaroberfläche oder durch eine Veränderung der Pufferviskosität erzielt werden. Eine Übersicht über Beeinflussungsmöglichkeiten des EOF liefert Tab. 2-1.

Tab. 2-1: Möglichkeiten zur Beeinflussung des EOF.

Parameter	Auswirkung auf den EOF	Bemerkungen
Elektrische Feldstärke (E)	EOF ↑, falls E ↑	Bei höheren E: kürzere Analysenzeiten, gleichzeitig aber auch geringere Auflösung und stärkere Joule'sche Erwärmung
pH-Wert des Laufpuffers	EOF ↑, falls pH ↑	Beeinflusst auch die Ladung der Analyten und somit deren elektrophoret. Mobilität
Pufferkonzentration (Ionenstärke)	EOF ↑, falls Konzentration ↓	Hohe Konzentrationen führen zu hohen Strömen und starker Joule'scher Erwärmung Beeinflusst stark die Peakform
Temperatur	EOF ↑, falls Temperatur ↑	Verändert die Viskosität des Puffers (wie die Feldstärke leicht instrumentell steuerbar)
Organische Lösungsmittel	EOF ↓	Verändern Viskosität, Dielektrizitätskonstante etc.
Tenside	EOF ↑ oder ↓ oder Umkehr (je nach Tensid)	Anionische und neutrale Tenside: zur Erhöhung der Auflösung, kationische Tenside: zur EOF-Umkehr
Kapillarbelegungen (Coatings)	EOF ↓ bzw. völlige Ausschaltung des EOF	Belegte Kapillaren werden insbesondere im Rahmen der Kapillargelelektrophorese (CGE) eingesetzt, reduzieren die Adsorption von Proteinen

Sehr einfach und effektiv kann der EOF durch Veränderung der Ionenstärke oder des pH-Wertes des Trennpuffers modifiziert werden.

Anreicherung bei der Probenaufgabe (sample stacking)

Eine Aufkonzentrierung der Probe in der Kapillare lässt sich erreichen, indem man die Probe in einem Puffer löst, der eine geringere Leitfähigkeit als der Laufpuffer besitzt. Aufgrund der höheren Feldstärke in der Probenlösung – die Feldstärke ist der Leitfähigkeit invers proportional – werden die Analyten der Probe bis zur Grenzfläche zwischen Laufpuffer und Probenlösung beschleunigt. Bei Eintritt in den Laufpuffer werden die Teilchen der Probe abgebremst, so dass die Probe an der Grenze zum Laufpuffer aufkonzentriert vorliegt. Da unterschiedliche elektrische Feldstärken für die Probenanreicherung verantwortlich sind, spricht man auch von „Electro-Stacking“. Das Prinzip des Electro-Stacking ist in Abb. 2-3 dargestellt.

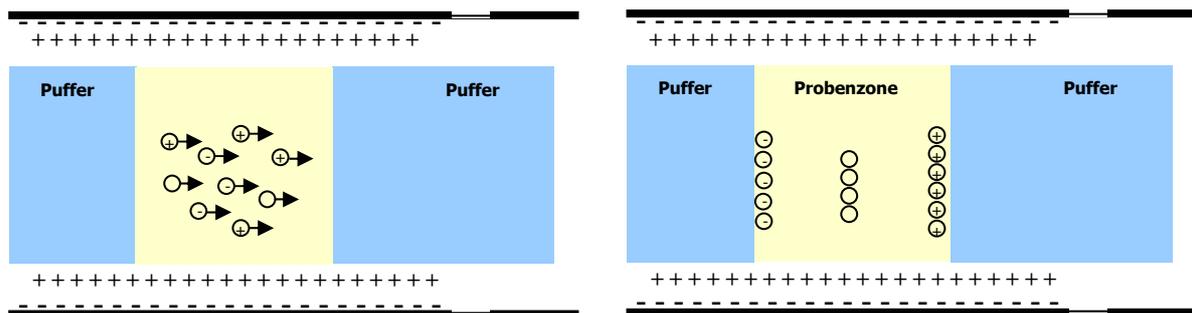


Abb. 2-3: Electro-Stacking bei normaler Polung (Kathode detektorseitig). Linke Abbildung: kurz nach der Injektion der Probe werden die Teilchen der Probe durch die hohe elektrische Feldstärke der Probenzone beschleunigt. Rechte Abbildung: Aufkonzentrierte Banden gegen Ende des Stacking; Kationen konzentrieren sich am vorderen Ende der Probenzone auf, Anionen am hinteren Ende. Neutrale Teilchen reichern sich in der Mitte der Probenzone an.

Rein theoretisch sollte das Stacking umso ausgeprägter sein, je höher der Unterschied der elektrischen Feldstärke ist. In der Praxis wird die Aufkonzentrierung durch laminare Flüsse, die aus lokal unterschiedlichen elektroosmotischen Geschwindigkeiten resultieren, sowie durch eine Temperaturerhöhung in der Probenzone, induziert durch die hohe Feldstärke, begrenzt. Beide Effekte führen zur

Bandenverbreiterung und wirken daher dem Stacking entgegen. In der Regel werden gute Aufkonzentrierungseffekte erzielt, wenn die Probe in einem Puffer gelöst wird, dessen Konzentration zehnfach geringer ist als die des Laufpuffers¹⁶⁶.

Micellare elektrokinetische Chromatographie

Die micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC) stellt eine Hybridtechnik aus Elektrophorese und Chromatographie dar, die Anfang der 80er Jahre durch Terabe et al.¹⁶⁷ entwickelt wurde. Sie erlaubt die Auftrennung von Neutralmolekülen durch unterschiedliche Verteilung zwischen einer wässrigen, mobilen Phase und einer lipophilen, pseudostationären Phase. Die lipophile Phase wird hierbei von Micellen gebildet. Als Micellbildner werden Detergenzien benutzt, die eine hohe UV-Durchlässigkeit besitzen. Sie werden dem Laufpuffer hinzugesetzt und müssen daher eine hinreichende Löslichkeit in diesem besitzen. Weit verbreitet ist der Einsatz anionischer Detergenzien. Am häufigsten wird Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate, SDS) eingesetzt. Die Micellen besitzen im Innern einen hydrophoben Kern und sind nach außen geladen, wodurch eine elektrophoretische Mobilität erzielt wird. Da anionische Micellen eine elektrophoretische Mobilität zur Anode aufweisen, können sie nur bei hinreichend starkem EOF detektiert werden. Die Analyten verteilen sich in Abhängigkeit ihrer Lipophilie zwischen dem Puffer und dem hydrophoben Innern der Micellen, die aufgrund der Eigenmobilität pseudostationäre Phasen darstellen. Das Prinzip der MEKC ist in Abb. 2-4 dargestellt. Polare Analyten (in der Abb. 2-4 A_P genannt) zeigen keine Wechselwirkung mit der Micelle und wandern daher mit der Geschwindigkeit des EOF (t_0). Lipophile Analyten (in der Abb. 2-4 A_L genannt) hingegen werden von den Micellen eingeschlossen und wandern mit deren Geschwindigkeit zum Detektor (t_{mc}). Substanzen, die bezüglich ihrer Lipophilie zwischen A_P und A_L liegen, werden demzufolge im Zeitfenster $t_{mc}-t_0$ detektiert.

Heutzutage beschränkt sich der Einsatzbereich der MEKC nicht nur auf die Trennung neutraler Verbindungen. Sie wird im steigenden Maße auch zur Verbesserung der Auflösung geladener Teilchen mit ähnlichen elektrophoretischen Mobilitäten eingesetzt. Durch den zusätzlichen Trennmechanismus der Verteilung können extrem hohe Trennschärfen erreicht werden.

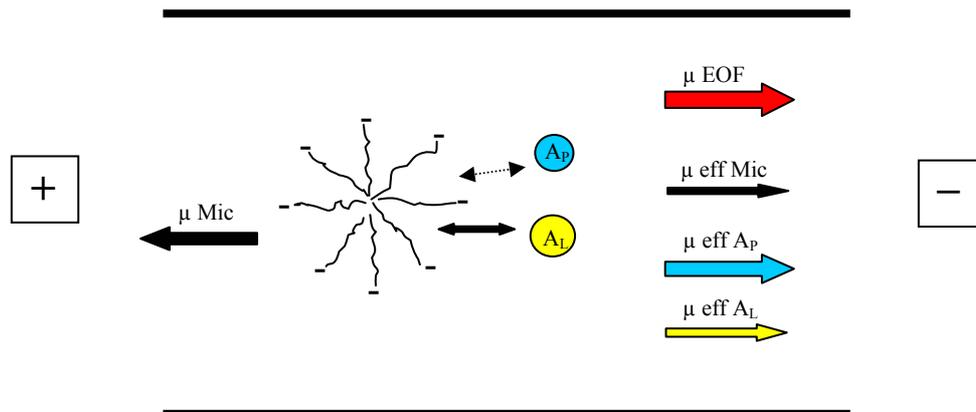


Abb. 2-4: Schematische Darstellung des Trennprinzips der MEKC. A_p : polarer Analyt, A_l : lipophiler Analyt; anionische Micelle (z.B. aus SDS) als pseudostationäre Phase.

2.2.2 Entwicklung eines Trennsystems zur Bestimmung von schwefelhaltigen exzitatorischen Aminosäuren (SEAA)

Zur Klärung der Frage, ob untypische Metaboliten des Homocysteins (bzw. Cysteins) im Liquor von Tumorpatienten, die unter einer hochdosierten Therapie mit MTX stehen, akkumulieren, wurde eine kapillarelektrophoretische Trennmethode entwickelt, die die sensitive Bestimmung der Metaboliten HCSA, HCA, CSA und CA im Liquor erlaubt.

Trennsystem und Detektion

Alle Messungen wurden mit einer 57 cm langen Kapillare (Fused-Silica) durchgeführt. Der Innendurchmesser betrug 75 μm . Die Analysenlösungen wurden am anodischen Ende hydrodynamisch in die Kapillare eingebracht. Hierzu wurde ein Druck von 0,5 psi (= 34,5 mbar) für 5 s angelegt. Das injizierte Volumen ist abhängig von der Temperatur und dem Kapillarinnendurchmesser. Bei einer Temperatur von 19 °C und einem Innendurchmesser von 75 μm werden ca. 23 nL injiziert. Das Probevolumen betrug somit ca. 1 % des Kapillarvolumens bis zum Detektionsfenster (2209 nL).

Zur Trennung der mehrfach negativ geladenen, derivatisierten Aminosäuren wurden nur solche Laufpuffer verwendet, die zu einem starken EOF führen. Die angelegte Trennungsspannung betrug 25 kV.

Die Detektion erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 490 nm (Diodenarray-Detektor) oder der Laser-induzierten Fluoreszenz bei 520 nm. Das Prinzip der LIF-Detektion ist Abb. 2-5 zu entnehmen.

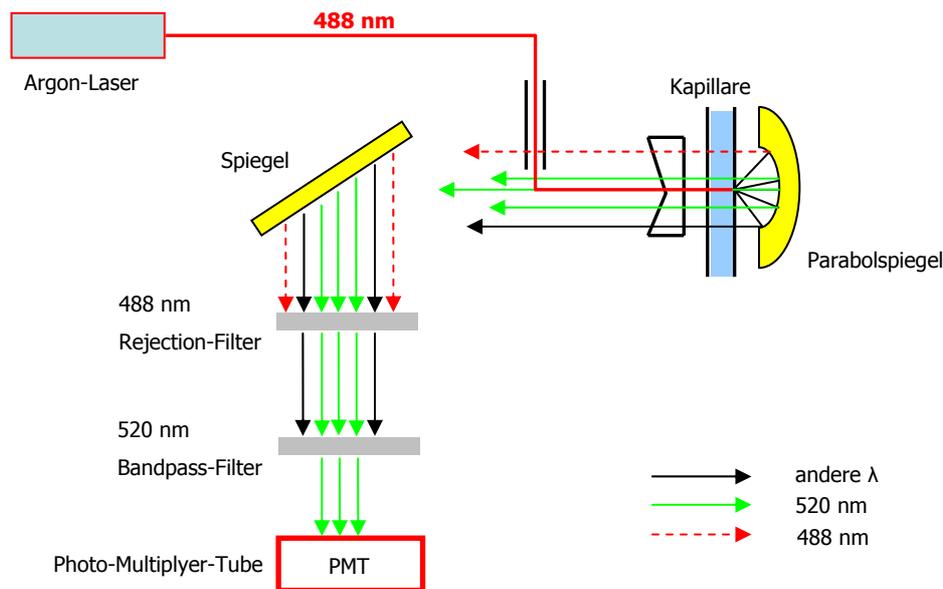


Abb. 2-5: Prinzip der LIF-Detektion.

Derivatisierung

Als Fluoreszenzmarker zur Derivatisierung der SEAA wurde 5-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) ausgewählt. CFSE zeigt ein Absorptionsmaximum bei 494 nm und kann daher effektiv durch die Hauptspektrallinie eines Argon-Lasers (488 nm) angeregt werden. Darüber hinaus zeichnet sich CFSE durch einen hohen molaren, dekadischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 90.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ bei pH 9,0¹⁶⁸) aus, was eine hohe Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes gewährleistet.

Da CFSE im gelösten Zustand selbst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ instabil ist¹⁶⁹, wurden die CFSE-Stammlösungen (0,01 M in DMF) nach der Herstellung aliquotiert und das Lösungsmittel DMF durch Anlegen von Vakuum entfernt (Speed-Vac[®]-System). Die verbliebenen Rückstände wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

In allen Derivatisierungsreaktionen betrug die Konzentration an CFSE 1 mM. Niedrigere Konzentrationen wurden ebenfalls eingesetzt, um Peaks von Verunreinigungen bzw. Abbauprodukten in den Elektropherogrammen zu minimieren, allerdings wurden die höchsten Ausbeuten mit der hoch konzentrierten Lösung erzielt. Als Derivatisierungspuffer wurden 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5-9,4) verwendet. Die Stammlösungen der Aminosäuren wurden ebenfalls in 0,1 M Boratpuffer hergestellt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Derivatisierung wurde, soweit nicht anders erwähnt, 30 min lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Falle der sensitiven LIF-Detektion wurde die Reaktionsmischung vor der Injektion 1:100 mit 0,01 M Boratpuffer (pH 8,9) verdünnt. Die Derivatisierung der SEAA mit CFSE ist in Abb. 2-6 dargestellt.

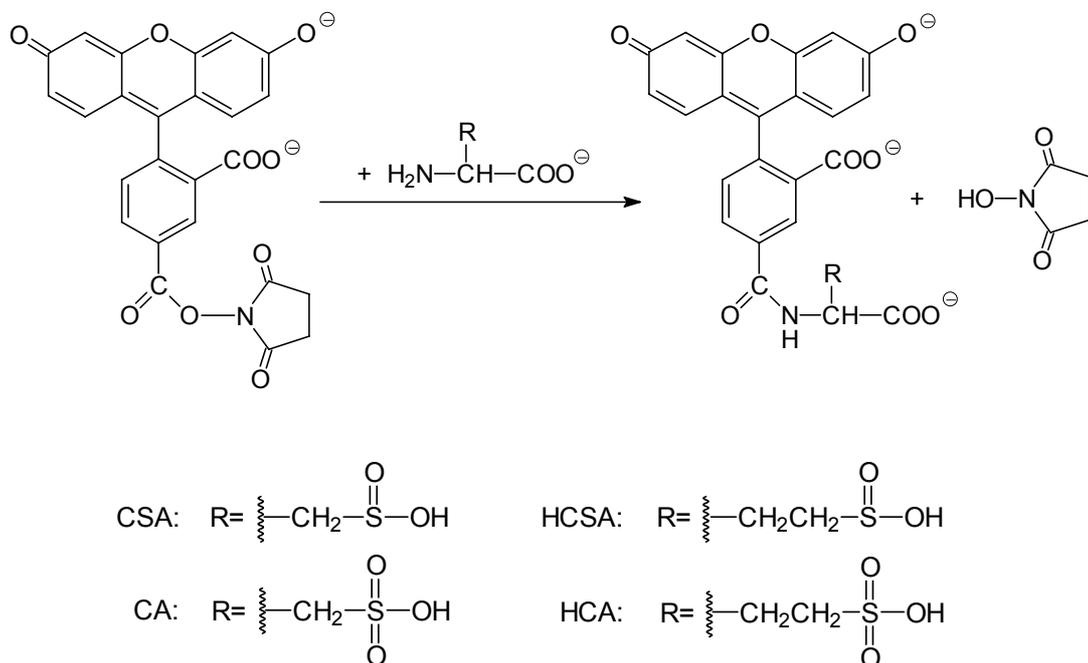


Abb. 2-6: Derivatisierungsreaktion schwefelhaltiger exzitatorischer Aminosäuren mit CFSE. CSA: Cysteinsulfinsäure, CA: Cysteinsulfonsäure, HCSA: Homocysteinsulfinsäure, HCA: Homocysteinsulfonsäure.

2.2.3 Methodenentwicklung

2.2.3.1 Trennung der derivatisierten SEAA

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde zuerst versucht, die markierten SEAA innerhalb möglichst kurzer Zeit in einem Lauf zu trennen. Da die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes bei Fluoresceinverbindungen stark pH-abhängig ist – bei Carboxyfluoresceinderivaten wird ein Maximum ab pH 9 erreicht – wurden nur basische Trennpuffer (pH 9,0) verwendet. Die derivatisierten SEAA lagen bei diesem pH-Wert mehrfach negativ geladen vor, die kathodenseitige Detektion erforderte daher einen relativ starken EOF.

Ausgehend von einem Laufpuffer bestehend aus 0,1 M Borat, pH 9,0 (Puffer A der Tab. 2-2) wurden zur Optimierung der Trennung insbesondere der Effekt des Micellbildners SDS und des organischen Lösungsmittels Methanol (MeOH) untersucht. Die Tab. 2-2 zeigt die im Rahmen der Trennungsoptimierung verwendeten Laufpuffer.

Tab. 2-2: Laufpuffer, die im Rahmen der Trennungsoptimierung verwendet wurden.

Puffer	Puffersystem	Additive	Strom [μA]
A	0,1 M Borat, pH 9,0	---	66,8
B	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (20 mM)	81,0
C	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM)	102,0
D	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (5% V/V)	92,5

2.2.3.2 Optimierung der Derivatisierungsbedingungen

Im zweiten Schritt der Methodenentwicklung wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die Umsetzung der SEAA mit CFSE ermittelt. Hierbei wurden insbesondere der Einfluss des pH-Wertes und der Inkubationsdauer untersucht.

Einfluss des pH-Wertes

Die Reaktivität primärer Amine wird entscheidend von der Basizität der Aminogruppe geprägt. Die Basizität ist abhängig von der Struktur des gesamten Moleküls und des Ionisierungsgrades der Aminogruppe, der wiederum vom pH-Wert der Lösung abhängt. Um aliphatische Amine mit acylierenden Reagenzien (wie z.B. CFSE) umzusetzen, wird ein pH-Wert $> 8,5$ empfohlen¹⁶⁹. Problematisch ist, dass Succinimidylester im Alkalischen hydrolysieren, wobei die Hydrolysegeschwindigkeit umso größer ist, je alkalischer das Reaktionsmilieu ist¹⁷⁰. Der optimale pH-Wert, der eine maximale Reaktionsausbeute garantiert, ist daher für den zu bestimmenden Analyten individuell zu ermitteln.

Die Reaktionsausbeute der Derivatisierung wurde über einen Bereich von pH 8,5 bis 9,3 untersucht. Die Konzentrationen der SEAA betragen jeweils 0,1 mM. Alle Messungen wurden zweifach nach einer 30-minütigen Derivatisierungszeit durchgeführt, da vorläufige Ergebnisse bei einem pH-Wert von 9,3 zeigten, dass die Reaktion nach ca. 30 min abgeschlossen ist.

Einfluss der Inkubationsdauer

Zur Ermittlung der Inkubationsdauer, die mit der maximalen Reaktionsausbeute einhergeht, wurden die korrigierten Peakflächen der Produkte in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit registriert.

Der Derivatisierungspuffer bestand aus 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9), die Konzentration der SEAA in der Reaktionsmischung betrug jeweils 1 mM. Der Versuch wurde zusätzlich unter Verwendung der LIF-Detektion wiederholt. In diesem Fall betrug die Konzentration der Aminosäuren jeweils 0,01 M.

2.2.3.3 Vergleich UV- und LIF-Detektion

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) der Methode wurde unter den optimierten Trennungs- (24 kV, 25 °C, Laufpuffer: 0,1 M Borat, pH 9,0, 50 mM SDS, 5 % (V/V) MeOH) und Derivatisierungsbedingungen (Puffer: 0,1 M Borat, pH 8,9, Konzentration CFSE: 1 mM, Inkubationszeit: 30 min) unter Verwendung der UV- und LIF-Detektion bestimmt.

Die Konzentration der SEAA in der Probe zur Bestimmung des LOD für die UV-Detektion betrug jeweils 50 µM, für die LIF-Detektion jeweils 1 µM (vor Verdünnung).

2.2.4 Methodenoptimierung für die Bestimmung der SEAA im Liquor

Im Anschluss an die Methodenentwicklung wurde überprüft, ob sich die Methode auch zur Bestimmung der SEAA im Liquor eignete. Da Elektropherogramme von Liquorproben, die mit den SEAA versetzt worden waren, zeigten, dass insbesondere der Peak der exzitatorischen Aminosäure Aspartat (ASP) mit den Peaks von CSA und HCA interferierte, mussten die Trennungsbedingungen verändert werden, um eine selektive Bestimmung aller interessierenden Analyten zu gewährleisten.

Ausgehend vom optimierten Laufpuffer der Methodenentwicklung (Puffer A, der Tab. 2-3) wurden die Konzentrationen der Pufferadditiva Methanol und SDS systematisch variiert und der Effekt auf die Trennung der interessierenden Aminosäurederivate verfolgt. Eine Übersicht über die hierbei verwendeten Puffer zeigt Tab. 2-3.

Tab. 2-3: Verwendete Puffersysteme im Rahmen der Methodenoptimierung.

Puffer	Puffersystem	Additive (Konzentration)	Strom [µA]
A	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (5 % V/V)	92,5
B	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (6 % V/V)	90,0
C	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (7 % V/V)	88,0
D	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (8 % V/V)	86,3
E	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (9 % V/V)	84,8
F	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (50 mM), MeOH (10 % V/V)	84,2
G	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (40 mM), MeOH (10 % V/V)	70,1
H	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (30 mM), MeOH (10 % V/V)	64,0
I	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (20 mM), MeOH (10 % V/V)	57,5
J	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (10 mM), MeOH (10 % V/V)	51,5
K	0,1 M Borat, pH 9,0	SDS (5 mM), MeOH (10 % V/V)	48,4
L	0,1 M Borat, pH 9,0	MeOH (10 % V/V)	43,3

Zusätzlich wurde zur Verbesserung der Auflösung die Kapillartemperatur von 25 °C schrittweise reduziert und ebenfalls der Effekt auf die Trennung verfolgt. Für diese Versuche wurde der Puffer verwendet, der die beste Auflösung gewährleistete (Puffer J). Sämtliche Messungen im Rahmen dieser Trennungsoptimierung wurden unter Verwendung der sensitiven LIF-Detektion durchgeführt.

2.2.5 Validierung der CE-Methode

Die Validierung der entwickelten Methode wurde nach den Richtlinien der Food and Drug Administration (Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation) durchgeführt¹⁷¹. Zur Auswertung der Validierungsdaten wurde die Software „Method Validation in Analytics“ (MVA[®]), Version 2.0 (Novia GmbH Saarbrücken) benutzt.

2.2.5.1 Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, alle interessierenden Analyten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten (z.B. Verunreinigungen, Nebenprodukte, Degradationsprodukte, Matrix usw.) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.

Bestimmt wurde die Selektivität durch Vergleich der Elektropherogramme einer Leerprobe (Puffer bzw. Liquor ohne Analyt) und einer Probe, der die vier SEAA zugesetzt wurden.

2.2.5.2 Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit bestimmen die Genauigkeit einer analytischen Methode. Die *Präzision* ist ein Maß für die Übereinstimmung (Streuung) der Messergebnisse bei wiederholter Durchführung des Analysenverfahrens mit einer homogenen Probe und gibt somit Hinweise auf zufällige Fehler. Die statistische Größe der Präzision ist die relative Standardabweichung (RSD), oder synonym der Variationskoeffizient (VK), der wie folgt berechnet wird:

$$VK = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \cdot \frac{100}{\bar{x}} \text{ [%]} \quad \text{Gl. 2-6}$$

VK = Variationskoeffizient

\bar{x} = Mittelwert aus n Einzelmessungen

x_i = Einzelmesswert

n = Anzahl der Messungen

Prinzipiell unterscheidet man zwischen der Wiederholpräzision oder Wiederholbarkeit (repeatability) und der Vergleichspräzision (reproducibility), bei der bestimmte Parameter verändert werden (z.B. Gerät, Probe, Zeit etc.).

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wird eine stabile Probe mindestens fünfmal unter denselben Operationsbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraums vermessen. Da diese Präzision zur Beurteilung der Genauigkeit des analytischen Gerätes dient, nennt man sie auch System- oder Gerätepräzision. Zur Ermittlung der Präzision der gesamten analytischen Methode (Methodenpräzision) wurden drei Messproben mit unterschiedlicher Konzentration fünfmal jeweils unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Hierzu wurden so genannte Qualitätskontrollproben (QC-Proben, s. Kap. 2.2.5.3) verwendet. Die Methodenpräzision ist ein Maß für die Schwankungen, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden. Sie ist innerhalb eines Tages zu bestimmen (Within-day-Präzision).

Die Vergleichspräzision umfasst verschiedene Messserien bei Variation bestimmter Parameter wie Zeit, Bearbeiter, Gerät, Reagenzien etc. Zur Bestimmung der Präzision über einen längeren Zeitraum (Between-day-Präzision) wurden drei QC-Proben unterschiedlicher Konzentration an fünf aufeinander folgenden Tagen vermessen.

Die *Richtigkeit* drückt die Übereinstimmung zwischen dem gefundenen Wert und einem als richtig akzeptierten Wert oder einem akzeptierten Referenzwert aus. Sie ist ein Lageparameter und gibt einen Hinweis auf systematische Fehler.

Sie kann durch Vergleich der über die Kalibrierfunktion errechneten Konzentration und der nominalen Konzentration beschrieben werden. Als Maß für die Abweichung dient der prozentuale relative Fehler (Relative Error, RE), der wie folgt berechnet wird:

$$RE = \frac{(c - c_{nom}) \cdot 100}{c_{nom}} \quad [\%] \quad \text{Gl. 2-7}$$

RE = Relative Error

c = Errechnete Konzentration

c_{nom} = Nominalkonzentration

Die Richtigkeit lässt sich folglich nach folgender Gleichung bestimmen:

$$\text{Richtigkeit} = RE + 100 \quad [\%] \quad \text{Gl. 2-8}$$

Die experimentelle Bestimmung der Richtigkeit erfolgte über die Quantifizierung der drei unterschiedlich konzentrierten QC-Proben an fünf verschiedenen Tagen.

2.2.5.3 QC-Proben

Zur Ermittlung der Präzision und Richtigkeit wurden Lösungen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen der SEAA hergestellt, die den gesamten Arbeitsbereich abdecken:

Niedrige QC-Probe: Konzentration \leq dreimal so hoch wie die Konzentration des niedrigsten Standards (3 μM jeweils)

Mittlere QC-Probe: Konzentration im mittleren Konzentrationsbereich der Kalibriergerade (50 μM jeweils)

Hohe QC-Probe: Konzentration, die 75-90 % der Konzentration des höchsten Standards beträgt (90 μM jeweils)

Die QC-Proben wurden ausgehend von der Stammlösung der Analyten durch entsprechende Verdünnung mit 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9) hergestellt und nach Aliquotierung bei -20 °C gelagert.

2.2.5.4 Wiederfindung

Da Liquor als Matrix für eine Validierung bzw. für die Kalibrationsreihen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, wurde überprüft, ob Puffer als Matrix für die Kalibratoren geeignet ist. Die Ermittlung der Wiederfindungsrate unter Verwendung von Liquor als Probenmatrix erfolgte durch Aufstockungsexperimente (sog. „spiken“). Im Rahmen dieser Versuche wurde sowohl Liquor (Mischung verschiedener Liquores, in der keine der vier SEAA nachzuweisen war) als auch Puffer mit jeweils gleichen Mengen der Analyten versetzt und analysiert. Die absolute Größe der Abweichung wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$W = \frac{\bar{x}_{Liquor}}{\bar{x}_{Puffer}} \cdot 100 \text{ [%]} \quad \text{Gl. 2-9}$$

W = prozentuale Wiederfindungsrate

\bar{x}_{Liquor} = Mittelwert aus n Einzelmessungen (Matrix Liquor)

\bar{x}_{Puffer} = Mittelwert aus n Einzelmessungen (Matrix Puffer)

2.2.5.5 Linearität, Arbeitsbereich

Die Linearität ist die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gewissen Bereichs Testergebnisse zu erzielen, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind.

Die Beziehung zwischen Konzentration und Messsignal wurde mittels Kalibrierfunktion bestimmt. Der Arbeitsbereich, dessen Spanne vom LLOQ (lowest limit of quantification) bis zum ULOQ (upper limit of quantification) reicht, orientierte sich an den zu erwartenden Konzentrationen des Analyten im Liquor⁷⁶. Für jede Kalibrierfunktion wurden jeweils sechs Standards (S) vermessen, die aus drei verschiedenen SEAA-Arbeitslösungen (AL) hergestellt wurden (s. Tab. 2-4).

Tab. 2-4: Pipettierschema zur Herstellung der SEAA-Standards der Kalibriergeraden.

Lösung	S1 (1 µM)	S2 (3 µM)	S3 (10 µM)	S4 (20 µM)	S5 (50 µM)	S6 (100 µM)
AL 1 (10 µM)	10	30				
AL 2 (100 µM)			10	20		
AL 3 (1000 µM)					5	10
0,1 M Borat (pH 8,9)	190 µL	170 µL	190 µL	180 µL	195 µL	190 µL
CFSE	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Anmerkung: Die Konzentrationen der Standards beziehen sich auf 100 µL (Volumen der Messprobe).

Nach abgeschlossener Derivatisierung (30 min lang bei Raumtemperatur, vor Licht geschützt) wurde die Reaktionsmischung 1:100 mit 0,01 M Boratpuffer (pH 8,9) verdünnt. Hierzu wurden 5 µL des jeweiligen Ansatzes entnommen, in ein Safe-Lock Tube (0,5 mL) überführt und mit 495 µL 0,01 M Boratpuffer (pH 8,9) versetzt.

Zur Beurteilung der Regression wurden der Korrelationskoeffizient r (s. auch Kapitel 2.7.4) und die Residuen, die prozentuale Abweichung der experimentellen von den mittels Regressionsgerade berechneten Werten, herangezogen. Ferner wurde getestet, ob eine gewichtete lineare Regression ($1/x$ und $1/x^2$) zu einer besseren Anpassung führt.

Eine Wichtung empfiehlt sich immer dann, falls der Arbeitsbereich relativ groß ist (> Faktor 10). In diesem Fall ist in aller Regel Homoskedastizität (d.h. Varianzenhomogenität der Messwerte) nicht gegeben. Durch die Wichtung wird eine zu starke Beeinflussung der Regression, bedingt durch die relativ größeren Abweichungen der hohen Messwerte, vermieden¹⁷².

2.2.5.6 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Nach den Richtlinien der FDA ist die Bestimmungsgrenze (LLOQ) eines Analysenverfahrens die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die mit hinreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Für die LLOQ wird

hinsichtlich der Präzision ein Variationskoeffizient $\leq 20\%$, hinsichtlich der Richtigkeit ein relativer Fehler bis 20% gefordert¹⁷¹.

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist die geringste Analytmenge, die detektiert, aber nicht exakt quantitativ bestimmt werden kann. Sie wurde basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis (Signal-to-noise ratio) von 3:1 ermittelt.

2.2.5.7 Stabilitätsuntersuchungen

Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen wurden folgende Aspekte untersucht:

- Der Einfluss mehrerer Einfrier-Auftau-Vorgänge auf die Stabilität der SEAA in der Stammlösung („Einfrier-Auftau-Stabilität“)
- Die Stabilität der SEAA in der Arbeitslösung (gelagert bei Raumtemperatur)
- Die Stabilität der SEAA in Liquor (gelagert bei Raumtemperatur)
- Die Stabilität der gebildeten SEAA-Derivate in der Messprobe (gelagert bei Raumtemperatur im Autosampler des CE-Systems)

Zur Berechnung der Stabilität wurden jeweils die korrigierten Peakflächen (KPF) der derivatisierten Aminosäuren zugrunde gelegt:

$$\text{Stabilität} = \frac{KPF_x}{KPF_{REF}} \cdot 100 \text{ [\%]} \quad \text{Gl. 2-10}$$

KPF_x = korrigierte Peakfläche der Probe zur Zeit x.

KPF_{REF} = korrigierte Peakfläche der Referenz

Die Referenz stellte eine frisch hergestellte Probe, die die SEAA in der jeweils gleichen Konzentration enthielt, dar.

2.2.6 Vermessung der Liquorproben

Vor dem Vermessen der Patientenproben wurde zuerst ein Systemeignungstest durchgeführt, der insbesondere zur Beurteilung der Trennleistung des Systems diente. Hierzu wurde eine Mischung CFSE-derivatisierter Aminosäuren (HCSA, CSA,

HCA, CA, ASP und GLU, Konzentration jeweils 10 µM) vermessen. Nur bei Basislinientrennung aller Peaks wurde mit der Kalibrierung begonnen.

Kalibrierung

Vor jeder Messserie wurde eine Kalibrierung analog zur Kalibrierung in Kapitel 2.2.5.5 durchgeführt. Die Kalibrierung wurde akzeptiert, wenn folgende Kriterien erfüllt waren:

- Abweichung der Residuen $\leq 15\%$, LLOQ: $\leq 20\%$
- Mindestens vier von sechs Standards, inklusive des LLOQ- und des ULOQ-Standards mussten vorangehende Kriterien erfüllen
- Korrelationskoeffizient $r \geq 0,99$ (lineare Regression, gewichtet $1/x^2$)

Herstellung der Messprobe

100 µL Liquor wurden mit 80 µL 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9) und 20 µL CFSE (0,01 M) versetzt. Nach 30-minütiger Derivatisierung wurde die Reaktionsmischung 1:100 mit 0,01 M Boratpuffer (pH 8,9) verdünnt.

Konzentrationsberechnung

Die Konzentrationsberechnung erfolgte über die Geradengleichung der jeweiligen Kalibriergeraden (gewichtet $1/x^2$).

Qualitätssicherung während der Messung

Zur Qualitätssicherung der Probenmessung dienten die Qualitätskontrollproben (QC-Proben), die auch im Rahmen der Validierung verwendet wurden (s. Kap. 2.2.5.3). Es wurde gefordert, dass mindestens 67 % der berechneten Konzentrationen innerhalb von $\pm 15\%$ des nominalen Wertes liegen und dass mindestens 5 % der Proben einer Messreihe aus QC-Proben bestehen.

2.3 HPLC-Analytik

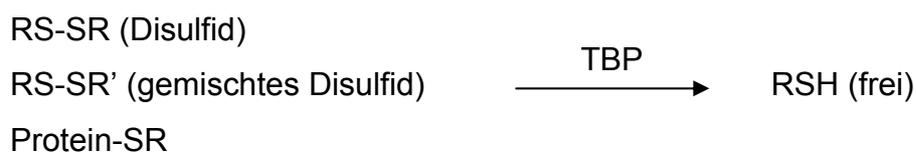
Zur Quantifizierung der Aminothiole Cystein, Homocystein und Glutathion im Liquor von Tumorpatienten wurde eine HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion entwickelt und validiert. Die Entwicklung erfolgte basierend auf einer von Toyo'oka und Imai publizierten HPLC-Methode¹⁷³, bei der Thiole mit dem fluorogenen Reagenz 4-(Aminosulfonyl)-7-Fluor-Benzofurazan (ABDF) umgesetzt und anschließend auf einer Umkehrphase (*Reversed phase, RP*) getrennt wurden.

2.3.1 HPLC-System und chromatographische Bedingungen

Die einzelnen Komponenten des HPLC-Systems sind in Kapitel 2.1.4 aufgeführt. Die Trennung der derivatisierten Aminothiole erfolgte mittels eines binären Gradientensystems, bestehend aus einem 0,1 M Phosphatpuffer, pH 2,0 (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B). Die Flussrate betrug jeweils 0,9 mL/min.

2.3.2 Reduktion und Vorsäulenderivatisierung der Aminothiole

Soweit nicht anders spezifiziert, wurde zur Reduktion von Disulfiden und zur Freisetzung der proteingebundenen Aminothiole (Liquorproben) die Methode von Araki und Sako verwendet¹⁷⁴. Zu 100 μ L der Messprobe, die mit 100 μ L 0,1 M Boratpuffer (pH 8,0, 2 mM Na₂EDTA) versetzt wurde, wurden 10 μ L einer 20%igen (V/V) Tri-*N*-butylphosphin-Lösung (TBP) hinzu gegeben und die Mischung bei 4 °C für 30 min gelagert. Na₂EDTA wurde dem Derivatisierungspuffer hinzugefügt, um zweiwertige Kupferionen zu komplexieren; sie katalysieren die Oxidation von Thiolen zu den entsprechenden Disulfiden. Das Reaktionsschema ist nachfolgend dargestellt:



Die Derivatisierung erfolgte nach der Methode von Toyo'oka und Imai¹⁷³. Um ein Verdünnen der Messprobe weitestgehend zu vermeiden, wurden möglichst konzentrierte Lösungen an ABDF und HCl eingesetzt.

Nach abgeschlossener Reduktion wurden zur Reaktionsmischung 20 μL einer 0,01 M ABDF-Lösung gegeben und 10 min bei 50 °C inkubiert. Zur Beendigung der Derivatisierung und zur Stabilisierung der gebildeten Produkte wurde der Ansatz anschließend mit 10 μL einer 1 M HCl-Lösung versehen. Von dieser Mischung wurden mittels Autosampler 150 μL in das HPLC-System injiziert.

Die Anregung der derivatisierten Aminothiole erfolgte mit Licht der Wellenlänge 380 nm, das emittierte Fluoreszenzlicht wurde bei einer Wellenlänge von 510 nm aufgenommen.

Die Derivatisierungsreaktion von ABDF mit Cystein, Homocystein und Glutathion zeigt Abb. 2-7.

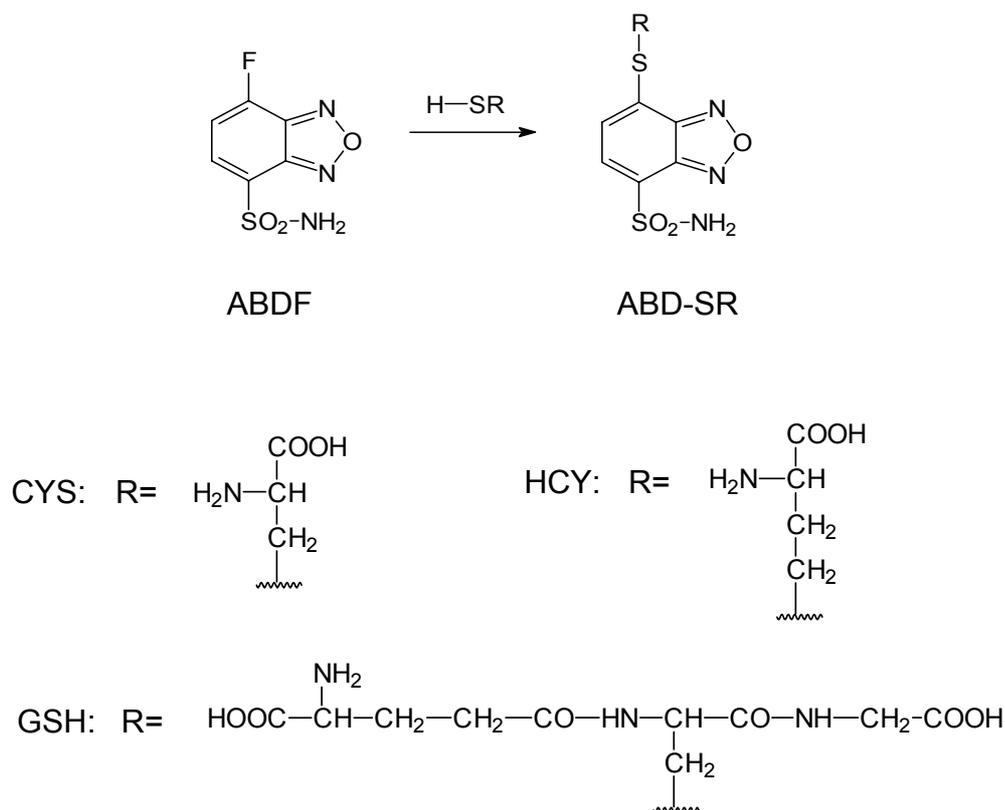


Abb. 2-7: Derivatisierung der Aminothiole Cystein (CYS), Homocystein (HCY) und Glutathion (GSH) mit ABDF.

2.3.3 Methodenentwicklung und -optimierung

Das Ziel der Methodenentwicklung bestand darin, ein chromatographisches Trennsystem aufzubauen, welches die selektive Bestimmung von Cystein, Homocystein und Glutathion im Liquor ermöglichte. Da die Konzentration an Homocystein im Liquor normalerweise im unteren nanomolaren Bereich liegt, wurde angestrebt, für Homocystein eine untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) von mindestens 50 nM zu erreichen.

Trennung der derivatisierten Aminothiole

Die Trennung der derivatisierten Aminothiole, unter Verwendung von Liquor als Probenmatrix, wurde durch schrittweises Verändern der mobilen Phase, die sich aus 0,1 M Phosphatpuffer (pH 2,0) und Acetonitril zusammensetzte, optimiert. Basierend auf dem Trennergebnis einer einfachen isokratischen Elution (10 % Acetonitril, 90 % Phosphatpuffer) wurden drei verschiedene Gradienten (A, B und C) getestet, bei denen die Erhöhung des Acetonitrilanteils von der 5. bis zur 13. Minute variierte (siehe Tab. 2-5).

Tab. 2-5: Gradientenprogramme, die zur Trennung ABDF-derivatisierter Thiole verwendet wurden.

Zeit [min]	Gradient A		Gradient B		Gradient C	
	Eluent A	Eluent B	Eluent A	Eluent B	Eluent A	Eluent B
0	90	10	90	10	90	10
5	90	10	90	10	90	10
13	75	25	70	30	65	35
15	75	25	70	30	65	35
18	90	10	90	10	90	10
20	90	10	90	10	90	10

Eluent A: 0,1 M Phosphatpuffer (pH 2,0); Eluent B: Acetonitril

Von einer Abänderung des pH-Wertes zur Optimierung der Trennung wurde abgesehen, da die maximale Fluoreszenzintensität der Benzofurazanderivate bei pH 2,0 erreicht wird¹⁷³.

Optimierung der Derivatisierungsbedingungen für die Matrix Liquor

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde geprüft, wieviel Derivatisierungspuffer (0,1 M Borat, pH 8,0, 2 mM Na₂EDTA) der Messprobe (Liquor) zuzusetzen ist, um eine maximale Ausbeute an derivatisiertem Homocystein zu erhalten. Diese Untersuchung wurde auf Homocystein beschränkt, da Cystein und Glutathion im Liquor in deutlich höheren Konzentrationen vorliegen.

Ausgehend von 200 µL reinem Liquor wurde das Volumen des Liquors schrittweise reduziert, gleichzeitig das Volumen des Derivatisierungspuffers so erhöht, dass das Gesamtvolumen der Probe jeweils 200 µL betrug (s. Tab. 2-6). Die zugesetzte Menge an TBP, ABDF und HCl wurde bei jedem Ansatz konstant gehalten und entsprach den Derivatisierungsbedingungen unter 2.3.2. Der verwendete Liquor wurde jeweils einer Liquormischung entnommen, die Homocystein in einer Konzentration von ungefähr 1 µM enthielt.

Tab. 2-6: Liquor-Puffer-Mischungen zur Optimierung der Derivatisierung im Liquor.

V (Liquor) [µL]	V (Derivatisierungspuffer) [µL]	Gesamtvolumen der Probe [µL]
200	0	200
180	20	200
160	40	200
140	60	200
120	80	200
110	90	200
100	100	200
90	110	200
80	120	200
60	140	200

2.3.4 Methodenvalidierung

Die Validierung der HPLC-Methode wurde, wie die kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung der SEAA, nach der FDA-Richtlinie „Bioanalytical Method Validation“ durchgeführt. Ausführliche Anmerkungen sowie Berechnungsformeln zu den einzelnen Validierungskriterien finden sich unter Kapitel 2.2.5.

2.3.4.1 Spezifität

Die Spezifität der HPLC-Methode wurde durch den Vergleich der Chromatogramme einer Liquorprobe und einer Liquorprobe, die zusätzlich mit den interessierenden Analyten (Cystein, Homocystein und Glutathion) sowie dem internen Standard N-Acetylcystein versetzt wurde, demonstriert.

2.3.4.2 Präzision und Richtigkeit

Die Bestimmung der Within-day- bzw. Between-day-Präzision sowie der Richtigkeit erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.2 beschrieben. Zur Erhöhung der Präzision wurde der interne Standard NAC der Messprobe zugesetzt (Endkonzentration 4 µM). Die Auswertung erfolgte jeweils über das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard. Zur experimentellen Ermittlung von Präzision und Richtigkeit dienten folgende QC-Proben:

Niedrige QC-Probe:	c (CYS, HCY und GSH) jeweils 130 nM
Mittlere QC-Probe:	c (CYS, HCY und GSH) jeweils 1000 nM
Hohe QC-Probe:	c (CYS, HCY und GSH) jeweils 1800 nM

Die QC-Proben wurden durch Verdünnen einer Stammlösung, die CYS, HCY und GSH in einer Konzentration von jeweils 10 mM enthielt, hergestellt und bei -20 °C eingelagert. Als Lösungsmittel diente 0,1 M Boratpuffer, pH 8,0 (2 mM Na₂EDTA).

2.3.4.3 Wiederfindung

Die Ermittlung der Wiederfindungsrate unter Verwendung von Liquor als Probenmatrix erfolgte auch bei der Validierung der HPLC-Methode durch Aufstockungsexperimente (vgl. Kapitel 2.2.5.4). Da Cystein, Homocystein und Glutathion normalerweise im Liquor präsent sind, wurden die Peakflächen dieser Liquor-assoziierten Aminothiole vor der Aufstockung durch eine Dreifachbestimmung ermittelt.

2.3.4.4 Linearität, Arbeitsbereich

Für jede Kalibrierfunktion wurden jeweils sechs Standards (S) vermessen, die wie folgt hergestellt wurden:

Tab. 2-7: Pipettierschema zur Herstellung der Thiol-Standards für die Kalibrierung.

Lösung	S1 (50 nM)	S2 (150 nM)	S3 (400 nM)	S4 (800 nM)	S5 (1500 nM)	S6 (2000 nM)
AL2 (1 µM)	5 µL	15 µL				
AL1 (10 µM)			4 µL	8 µL	15 µL	20 µL
NAC (100 µM)	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
Borat	191 µL	181 µL	192 µL	188 µL	181 µL	176 µL
TBP (20 %)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
ABDF (10 mM)	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
HCl (1 M)	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Anmerkung: Die Konzentrationen der Standards beziehen sich auf 100 µL (Volumen der Messprobe).

Die Arbeitslösung 1 (AL1) enthielt Cystein, Homocystein und Glutathion in einer Konzentration von jeweils 10 µM, die Arbeitslösung 2 (AL2) in einer Konzentration von jeweils 1 µM.

Die Berechnung der Kalibrierfunktion erfolgte wiederum über das Peakflächenverhältnis von Analyt zu internem Standard (NAC).

Zur Beurteilung der Regression dienten die in Kapitel 2.2.5.5 beschriebenen Kriterien.

Verdünnung hochkonzentrierter Liquorproben

Liquores von Patienten, die Cystein und Glutathion in einer Konzentration jenseits der oberen Bestimmungsgrenze (ULOQ) enthielten, wurden mit 0,1 M Boratpuffer, pH 8,0 (2 mM Na₂EDTA) 1:10 verdünnt und erneut vermessen.

Zur Validierung dieses Verfahrens wurde eine Liquormischung, deren Cystein- und Glutathionkonzentration durch eine Dreifachbestimmung ermittelt wurde, mit Cystein bzw. Glutathion so aufgestockt, dass die Endkonzentrationen jeweils 10 µM betragen. Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben verdünnt und der Gehalt an Cystein bzw. Glutathion mittels der „Standard-Kalibriergeraden“ (Arbeitsbereich: 50-2000 nM) bestimmt.

Es wurde festgelegt, dass der relative Fehler, berechnet durch den Vergleich von Nominal- und berechneter Konzentration, maximal 10 % betragen durfte.

2.3.4.5 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die Bestimmungs- und Nachweisgrenze wurde wie in 2.2.5.6 beschrieben ermittelt.

2.3.4.6 Stabilitätsuntersuchungen

Im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen wurden die Stabilität der Aminothiolen im Liquor und die Stabilität der derivatisierten Aminothiolen in der Messprobe untersucht. Die Stabilität von Cystein, Homocystein und Glutathion in EDTA-haltigem Boratpuffer (pH 8,0) wurde durch Araki und Sako gezeigt¹⁷⁴.

Die Stabilitätsberechnungen wurden gemäß GL. 2-10 durchgeführt, eine Korrektur der Peakflächen wurde nicht vorgenommen, da diese nur bei kapillarelektrophoretischen Prozessen erforderlich ist.

2.3.5 Vermessung der Liquorproben

Herstellung der Messprobe

100 µL Liquor wurden mit 4 µL des Internen Standards (0,1 mM) und 96 µL 0,1 M Boratpuffer, pH 8,0 (2 mM Na₂EDTA) versetzt und anschließend wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben reduziert und derivatisiert.

Konzentrationsberechnung und Qualitätssicherung

Die Quantifizierung von Cystein, Homocystein und Glutathion erfolgte mittels einer 1/x-gewichteten Kalibriergeraden (vgl. Kapitel 2.3.4.4), die jeweils vor dem Vermessen der Proben erstellt wurde. Bezüglich der Kalibriergeraden und der Qualitätskontrolle bei der Vermessung von Patientenproben wurden die in Kapitel 2.2.6 angeführten Anforderungen gestellt.

2.4 Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay

Die Bestimmung von Homocystein (HCY) im Plasma erfolgte anhand eines Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays (FPIA) der Firma Abbott (IMx[®]-System). Diese voll automatisierte Methode erlaubte eine schnelle und präzise Quantifizierung von freiem und gebundenem Homocystein im Plasma.

2.4.1 Messprinzip des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays

Die Bestimmung von Homocystein mittels FPIA besteht im Wesentlichen aus den folgenden drei Schritten:

1. Reduktion

Im Rahmen dieser initial stattfindenden Reaktion werden Homocystin, gemischte Disulfide und proteingebundenes Homocystein durch das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) zu freiem Homocystein reduziert (vergl. hierzu auch 2.3.2).

2. Enzymatische Umwandlung

Im zweiten Schritt wird das gesamte Homocystein durch SAH-Hydrolase und Adenosin, welches im Überschuss zugesetzt wird, zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgewandelt (s. Abb. 2-8).

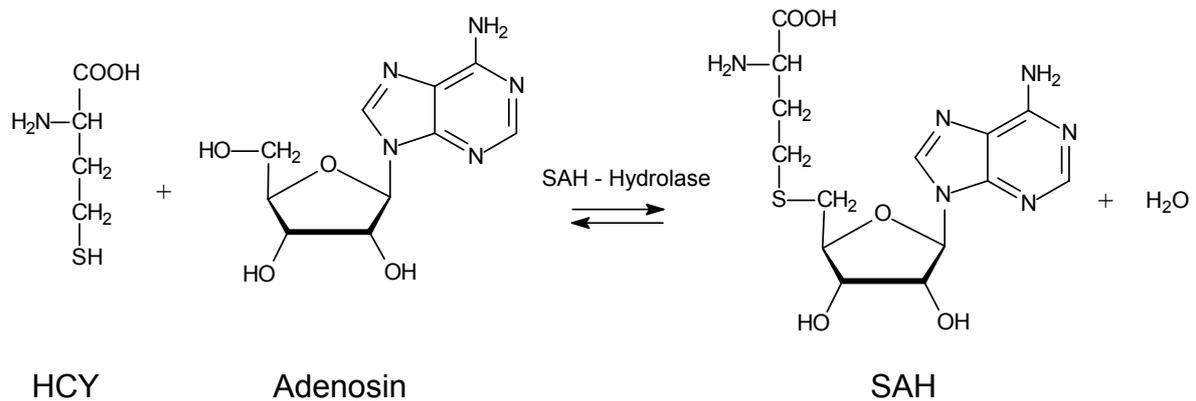


Abb. 2-8: Enzymatisch katalysierte Bildung von SAH aus HCY und Adenosin.

3. Immunoassay

Im letzten Schritt werden zu der Lösung Anti-SAH-Antikörper (AK) und Fluorescein markiertes S-Adenosyl-Cystein (Analyt-Tracer) hinzugefügt. Der Immunoassay basiert auf folgendem Prinzip:

Der zu quantifizierende Analyt (SAH) und der Analyt-Tracer konkurrieren kompetitiv um die Bindungsstellen am Antikörper (siehe Abb. 2-9).

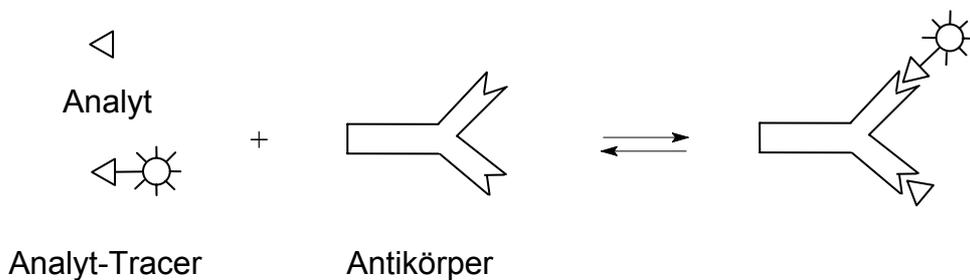


Abb. 2-9: Bindung freier Antigene (Analyt) und Fluorescein-markierter Antigene (Analyt-Tracer) an AK.

Enthält die Patientenprobe eine hohe Konzentration des zu bestimmenden Analyten, wird weniger Analyt-Tracer an den Antikörper gebunden. Wird in diesem Fall die Messlösung mit polarisiertem Licht (Licht einer Schwingungsebene) durchstrahlt, ist der Polarisationsgrad der emittierten Strahlung gering, da sich die relativ kleinen, ungebundenen Fluoreszenzmoleküle schnell drehen und Licht in verschiedenen

Ebenen emittieren. Enthält die Probe hingegen eine geringe Konzentration des Analyten, wird mehr Analyt-Tracer an den Antikörper gebunden. Dieser AG-AK-Komplex bewegt sich aufgrund seiner Größe sehr langsam. Bei Anregung durch polarisiertes Licht wird das Licht in derselben Ebene emittiert – die Fluoreszenzpolarisation (im Vergleich zu einer Blindprobe) bleibt im Wesentlichen erhalten. Die Abhängigkeit des Fluoreszenzpolarisationsgrades des emittierten Lichts von der Molekülgröße ist schematisch in Abb. 2-10 dargestellt.

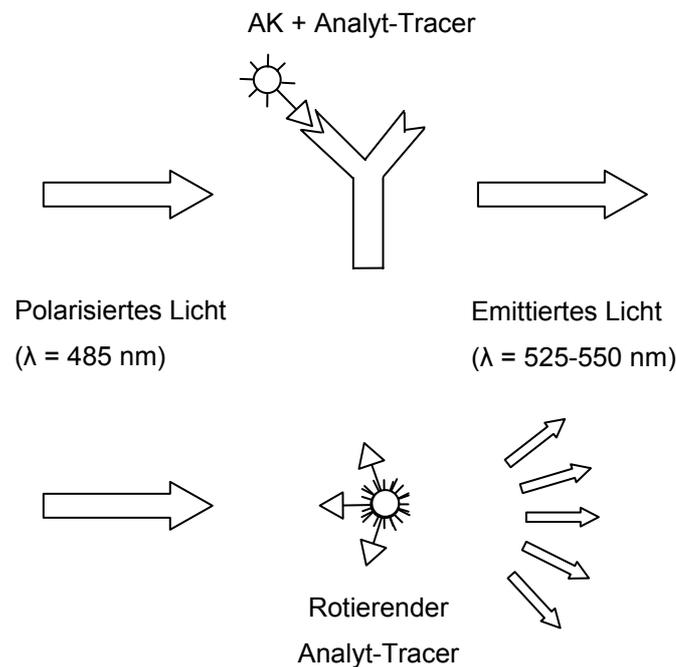


Abb. 2-10: Abhängigkeit des Fluoreszenzpolarisationsgrades von der Molekülgröße des Fluorophors.

Die Quantifizierung des Analyten erfolgt letztendlich anhand der Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes.

2.4.2 Durchführung der Messung

Alle Verdünnungen und Pipettiervorgänge wurden vom IMx[®]-System durchgeführt. Die vollautomatisierte Messung begann mit der Mischung von 50 μL Kalibrator (bzw. Probe), 25 μL 200 μM Adenosinlösung (inklusive 10 mM DTT), 60 μL SAH-Hydrolaselösung und 70 μL FPIA-Puffer. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei

34 °C wurden 23 µL dieser Reaktionsmischung und 65 µL von der Anti-SAH-Antikörper-Lösung in Glasküvetten transferiert und zu 1 mL mit FPIA-Puffer verdünnt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Hintergrundfluoreszenz gemessen. Der S-Adenosyl-L-Cystein-Fluorescein-Tracer (85 µL) und ein zweites Aliquot der Reaktionsmischung (23 µL) wurden hinzugefügt und auf 2 mL verdünnt. Die Fluoreszenz wurde erneut nach 10 Minuten vermessen.

2.4.3 Spezifikationen des IMx[®]-Systems

Im Folgenden sind die Angaben des Herstellers zum IMx[®]-Systems zusammengefasst:

Probenvolumen	25 µL
Untere Bestimmungsgrenze	0,5 µM
Messbereich	0,5-50,0 µM
Konzentrationen der Kalibratoren	0,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 µM
Konzentrationen der QC-Proben	7,0; 12,5; 25,0 µM
Testzeit	54 min
Durchsatz	20 Tests/h

2.4.4 Validierung der FPIA-Methode durch den Hersteller

Spezifität

Die Kreuzreaktivität wurde an Substanzen getestet, deren chemische Struktur zu einer möglichen Interferenz mit dem IMx[®]-Homocystein-Assay führen könnte. Die Ergebnisse sind in Tab. 2-8 dargestellt. Es sei angemerkt, dass die verwendeten Konzentrationen jeweils über dem 20fachen Wert der physiologischen Konzentration lagen.

Tab. 2-8: Kreuzreaktivitäten bei der Bestimmung von Homocystein im Plasma mittels FPIA (IMx[®]-System).

Substanz	Konzentration [mM]	Kreuzreaktivität [%]
S-Adenosyl-L-Methionin	0,50	12,9
L-Cystein	100	< 0,1
L-Cystathionin	0,50	0,1
Adenosin	5,00	0,9
Glutathion	100	< 0,1
DL-Homocystein-Thiolacton	0,25	0,2

Interferenzen

Die Interferenz von Bilirubin, Hämoglobin, Triglyceriden, Erythrozyten, Eiweiß und Natriumfluorid mit dem IMx[®]-Homocystein-Assay wurde untersucht. Hierzu wurden Plasmaproben mit potentiell interferierenden Substanzen angereichert und auf Homocystein getestet. Der IMx[®]-Homocystein-Assay wies die in der Tab. 2-9 aufgeführten Interferenzen auf.

Tab. 2-9: Interferenzen bei der Bestimmung von Homocystein im Plasma mittels FPIA (IMx[®]-System).

Substanz	Konzentration	Interferenz
Bilirubin	20 mg/dL	< 10 %
Hämoglobin	1000 mg/dL	9 %
Triglyceride	1000 mg/dL	< 5 %
Erythrozyten	5 %	< 2 %
Eiweiß	8 g/dL	< 8 %
Natriumfluorid	1000 mg/dL	< 3 %

Präzision und Richtigkeit

Die Präzision wurde ermittelt, indem drei Proben über 5 Tage hinweg zweimal täglich auf 10 Geräten in Doppelbestimmung analysiert wurden. Somit lagen pro Probe insgesamt 200 Messungen vor. Die Ergebnisse sind in Tab. 2-10 dargestellt.

Tab. 2-10: Präzision der Bestimmung von HCY im Plasma mittels FPIA (IMx[®]-System).

Mittelwert der Konzentration [μM]	n	Within-day-Präzision VK [%]	Between-day-Präzision VK [%]
5,9	200	2,2	5,2
10,8	200	1,9	4,1
21,6	200	1,4	3,7

Zur Bewertung der Richtigkeit des FPIA wurde ein Vergleich mit einem automatisierten HPLC-Verfahren durchgeführt¹⁷⁵. 114 Plasmaproben mit einer Gesamt-Homocystein-Konzentration zwischen 3,9 und 40,2 μM wurden jeweils mit HPLC und IMx[®] getestet. Der ermittelte Korrelationskoeffizient betrug 0,989. Detailliertere Angaben zur Richtigkeit (z.B. relativer Fehler) gibt der Hersteller nicht an.

2.4.5 Teilvalidierung der FPIA-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Plasma

Da die FPIA-Methode zur Bestimmung von Homocystein im Plasma ohne Änderungen übernommen wurde, wurde lediglich eine Teilvalidierung durchgeführt. Hierbei wurden die Richtigkeit sowie die Between- und Within-day-Präzision überprüft.

Zur Bestimmung der Within-day-Präzision wurden drei QC-Proben (7 μM , 12,5 μM , 25 μM) an einem Tag jeweils fünfmal vermessen.

Die Between-day-Präzision wurde ermittelt, indem die Konzentration dieser QC-Proben an 5 verschiedenen Tagen mittels *einer* Kalibriergeraden bestimmt wurde. Der Bezug auf eine Kalibriergerade erfolgte vor dem Hintergrund, dass die Kalibriergerade des FPIA laut Hersteller zwei Wochen lang verwendet werden kann.

Als Maß für die Präzision wurde die relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) herangezogen (siehe Gl. 2-6).

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden ebenfalls obige QC-Proben verwendet. Die Richtigkeit wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen gemäß Gl. 2-7 ermittelt.

2.5 Klinische Untersuchungen

2.5.1 Pädiatrische Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie

In Zusammenarbeit mit Prof. M. Relling, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA wurde ein Kollektiv pädiatrischer Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) untersucht, die im Rahmen der Therapie mit hochdosiertem MTX behandelt wurden. Das primäre Ziel der durchgeführten klinischen Untersuchung bestand darin, zu untersuchen, inwiefern eine Therapie mit HDMTX die Verstoffwechslung von Homocystein beeinflusst. Hierzu wurden sowohl Plasma- als auch Liquorproben nach Verabreichung von MTX auf Homocystein analysiert. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Chemotherapie die Liquorkonzentrationen von Cystein, dem Endprodukt der Homocystein-Transsulfurierung, und Glutathion beeinflusst.

2.5.1.1 Patientencharakteristika

Die Patienten wurden aufgrund des Immunophänotyps und -genotyps, des klinischen Bildes und des Ansprechens im Frühstadium der Therapie in drei Risikogruppen unterteilt:

- **LOW-RISK (LR)**
 - Alter: 1-10 Jahre
 - B-Vorläufer ALL
 - Leukozytenzahl $< 50 \times 10^9/L$

- **STANDARD-RISK (SR)**
 - Alter: 1-16 Jahre

- B-Vorläufer ALL (mit der Translokation t(1;19), der E2A-PBXI-Fusion oder dem MLL-Rearrangement), T-Linien ALL, testikuläre Leukämie, hypodiploider Chromosomensatz (< 45 Chromosomen)
 - ZNS-Status 3 (≥ 5 L eukozyten/ μ L Liquor, Nachweis von Blasten im Liquor)
 - ≥ 5 % Blasten im Knochenmark am 19. oder 26. Tag der Remission/Induktion
 - Minimale Resterkrankung ($\geq 0,01$ %) am 46. Tag der Remission/Induktion
- HIGH-RISK (HR)
 - Alter: 1-16 Jahre
 - Patienten mit Philadelphia-Chromosom (Bcr-Abl)
 - ≥ 1 % Blasten im Knochenmark am 46. Tag der Remission/Induktion
 - $\geq 0,1$ % Blasten im Knochenmark 16 Wochen nach Remission/Induktion

Standard- und High-Risk-Patienten erhielten in dieser Studie die gleiche Chemotherapie (s. Kap. 2.5.1.2). Daher wurde bei der Auswertung nur zwischen den Low-Risk- und den Standard-/High-Risk-Patienten (SHR-Patienten) unterschieden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden von insgesamt 116 Patienten 390 Plasma- und 190 Liquorproben untersucht. Von 17 Patienten standen sowohl Plasma- (104) als auch Liquorproben (47) zur Verfügung. Die Charakteristika der untersuchten Patienten sowie Anzahl und Art der untersuchten Proben sind Tab. 2-11 zu entnehmen.

Tab. 2-11: Patientencharakteristika sowie Art und Anzahl der untersuchten Proben.

Kollektiv	Anzahl der Patienten	Median des Alters [Jahre]	Anzahl der LR- bzw. SHR-Patienten	Anzahl der Proben
Patienten mit Plasmaproben	65	7,1 (1,0-18,3)*	28/37	390
Patienten mit Liquorproben	65	5,7 (1,9-16,3)*	33/32	190
Patienten mit Plasma- und Liquorproben	17	7,2 (2,1-15,2)*	7/10	104 bzw. 47

* Minimum und Maximum

2.5.1.2 Therapieplan

Sämtliche ALL-Patienten des St. Jude Children's Research Hospital wurden nach dem Protokoll „Total XV“¹⁷⁶ therapiert, welches im Wesentlichen aus drei Behandlungsblöcken, der Remission/Induktion, der Konsolidierung und der Erhaltungstherapie besteht.

Remission/Induktion (Dauer 6-7 Wochen)

Die Remission/Induktion wurde mit der intrathekalen Gabe von Cytarabin (je nach Alter 20-40 mg) und einer HDMTX-Infusion (1g/m² über 4 bzw. 24 Stunden) eingeleitet (Upfront-HDMTX). MTX-Plasmakonzentrationen wurden nach 1, 4, 23 und 42 Stunden (gerechnet ab Infusionsbeginn) mit einem Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (TDx/TDcFLx[®]) der Firma Abbott bestimmt. 42 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion wurde die Rescue-Therapie mit Calciumfolinat gestartet. Initial wurden 50 mg/m² intravenös (IV) verabreicht, alle 6 Stunden später 15 mg/m² IV. Insgesamt wurden, normale MTX-Plasmakonzentrationen vorausgesetzt, nach der Initialdosis sieben Dosen Calciumfolinat gegeben. Die Rescue-Therapie wurde im Falle erhöhter MTX-Plasmakonzentrationen (> 1 µM 42 Stunden nach Infusionsbeginn) intensiviert.

4 Tage nach der HDMTX-Therapie wurde die Behandlung mit Prednison, Vincristin, Daunorubicin und Asparaginase fortgesetzt. Diese Zytostatika wurden über einen Zeitraum von insgesamt 3,5 Wochen verabreicht. In der zweiten Hälfte der Remission/Induktion wurde die Kombination aus hochdosiertem Cyclophosphamid, Cytarabin und Mercaptopurin eingesetzt. Die Tab. 2-12 zeigt das exakte Dosierungsschema dieser Arzneistoffe während der Remission/Induktion.

Am 19. Tag der Remission/Induktion (Patienten mit ZNS-Status 2 oder 3, sowie Patienten mit Philadelphia-Chromosom: zusätzlich am 8. und 26. Tag) wurde eine intrathekale Tripeltherapie (TIT) bestehend aus MTX, Hydrocortison und Cytarabin verabreicht. Die Dosierung richtete sich nach dem Alter der Patienten (s. Tab. 2-13). Auch nach der intrathekalen MTX-Gabe wurde eine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat (5 mg/m² PO 24 und 30 Stunden nach Gabe der TIT) durchgeführt.

Tab. 2-12: Dosierungsschema der Arzneistoffe in der 2. Phase der Remission/Induktion.

Arzneistoff	Dosierung	Applikationszeitraum	Anzahl der Applikationen
Prednison	40 mg/m ² IV	Tage 5-32	84
Vincristin	1,5 mg/m ² IV	Tage 5, 12, 19, 26	4
Daunorubicin	25 mg/m ² IV	Tage 5, 12	2
L-Asparaginase	10.000 U/m ² IM	Tage 6, 8, 10, 12, 14, 16 (19, 21, 23)*	6-9
Cyclophosphamid	1000 mg/m ² IV	Tag 26	1
Cytarabin	75 mg/m ² IV	Tage 27-30, 34-37	8
Mercaptopurin	60 mg/m ² PO	Tage 26-39	14

* Diese zusätzlichen Applikationen erfolgten, falls am 19. Tag der Remission/Induktion ≥ 5 % Blasten im Knochenmark vorlagen

Tab. 2-13: Dosierung der intrathekalen Tripeltherapie (TIT) in der 3. Phase der Remission/Induktion.

Alter [Monate]	Methotrexat [mg]	Hydrocortison [mg]	Cytarabin [mg]
13-23	8	16	24
24-35	10	20	30
≥ 36	12	24	36

Konsolidierung (Dauer 8 Wochen)

Im Rahmen der Konsolidierung wurde den Patienten täglich Mercaptopurin (50 mg/m² PO) sowie viermal (Tag 1, 15, 29, 43) eine HDMTX-Infusion verabreicht, die mit einer intrathekalen Tripeltherapie (s. Tab. 2-13) kombiniert wurde. Die Dauer der HDMTX-Infusion betrug 24 Stunden, 10 % der Gesamtdosis (loading dose) wurden innerhalb der ersten Stunde gegeben. Die MTX-Dosierung richtete sich nach der Risikoklassifizierung der Patienten und der MTX-Clearance, die nach der ersten Infusion von HDMTX (Upfront-HDMTX) ermittelt wurde. Das Dosierungsschema von Mercaptopurin und MTX ist in Tab. 2-14 aufgeführt.

Tab. 2-14: Dosierungsschema der eingesetzten Arzneistoffe in der Konsolidierung.

Arzneistoff	Dosierung	Applikationszeitraum	Anzahl der Applikationen
Mercaptopurin	50 mg/m ² PO	Tage 1-56	56
Methotrexat	ca. 2,5 g/m ² IV (LR)* ca. 5,0 g/m ² IV (SHR)#	Tage 1, 15, 29, 43	4

* Angestrebte Steady-State-Konzentration im Plasma bei Low-Risk-Patienten: 33 µM

Angestrebte Steady-State-Konzentration im Plasma bei Standard/High-Risk-Patienten: 65 µM

MTX-Plasmakonzentrationen wurden 6, 23 und 42 Stunden nach Infusionsbeginn bestimmt. Die Rescue-Therapie wurde 42 Stunden nach Beginn der HDMTX gestartet und alle sechs Stunden wiederholt, bis insgesamt fünf Dosen Calciumfolinat (SHR-Patienten: 15 mg/m² IV oder PO, LR-Patienten: 10 mg/m² IV oder PO) verabreicht wurden. Wiederum wurde die Rescue-Therapie intensiviert, falls die MTX-Plasmakonzentrationen zur Stunde 42 über 1 µM lagen.

Erhaltungstherapie (Dauer 120-146 Wochen)

Mit der Erhaltungstherapie wurde 7 Tage nach der 4. HDMTX-Infusion der Konsolidierung begonnen. Die Chemotherapie in diesem Therapieabschnitt wurde stark auf das Risikoprofil der Patienten zugeschnitten. Das Therapieschema der Wochen 1-6 (bzw. 11-16) ist in der Tab. 2-15 zusammengefasst.

Tab. 2-15: Therapieschema der Erhaltungstherapie (Woche 1-6 bzw. 11-16).

Arzneistoff	Dosierung		Applikationszeitraum/Woche		Gesamtzahl d. Applikationen	
	LR	SHR	LR	SHR	LR	SHR
Dexamethason	8 mg/m ² PO	12 mg/m ² PO	Tage 1-5*	Tage 1-5*	30	30
Doxorubicin	---	30 mg/m ² IV	---	Tag 1*	---	2
Vincristin	2 mg/m ² IV	2 mg/m ² IV	Tag 1*	Tag 1*	2	2
L-Asparaginase	---	25000 U/m ²	---	Tag 1	---	6
Methotrexat	40 mg/m ² IV	---	Tag 1#	---	4	---
Mercaptopurin	75 mg/m ² PO	50 mg/m ² PO	Tage 1-7	Tage 1-7	42	42

* Nur in der 1. und 4. Woche; # nur in der 2. und 3. sowie 5. und 6. Woche

Die erste Behandlungsphase (Woche 1-20) beinhaltete zusätzlich zwei dreiwöchige Reinduktionen (I und II), die in der Woche 7-9 bzw. 17-19 verabreicht wurden (s. Tab. 2-16).

Tab. 2-16: Therapieschema der Reinduktionstherapie I (Woche 7-9) und II (Woche 17-19).

Reinduktionstherapie I						
Arzneistoff	Dosierung		Applikationszeitraum		Gesamtzahl d. Applikationen	
	LR	SHR	LR	SHR	LR	SHR
Dexamethason	8 mg/m ² PO	8 mg/m ² PO	Tage 1-8, 15-21	Tage 1-8, 15-21	48	48
Doxorubicin	30 mg/m ² IV	30 mg/m ² IV	Tag 1	Tage 1,8	1	2
Vincristin	1,5 mg/m ² IV	1,5 mg/m ² IV	Tage 1, 8, 15	Tage 1, 8, 15	3	3
L-Asparaginase	10000 U/m ²	25000 U/m ²	3x/Woche	Tage 1, 8, 15	9	3
TIT*	altersabh.	altersabh.	Tag 1	Tag 1	1	1
Reinduktionstherapie II						
Arzneistoff	Dosierung		Applikationszeitraum		Gesamtzahl d. Applikationen	
	LR	SHR	LR	SHR	LR	SHR
Dexamethason	8 mg/m ² PO	8 mg/m ² PO	Tage 1-8, 15-21	Tage 1-8, 15-21	48	48
Doxorubicin	30 mg/m ² IV	---	Tag 1	---	1	---
Cytarabin	---	2 g/m ² IV	---	Tage 15, 16	---	4
Vincristin	1,5 mg/m ² IV	1,5 mg/m ² IV	Tage 1, 8, 15	Tage 1, 8, 15	3	3
L-Asparaginase	10000 U/m ²	25000 U/m ²	3x/Woche	Tage 1, 8, 17	9	3
TIT*	altersabh.	altersabh.	Tag 1	Tag 1	1	1

* Intrathekale Tripeltherapie (s. Tab. 2-13)

Ab der 21. Woche wurde die Therapie der Konsolidierung wie in Tab. 2-17 zusammengefasst fortgesetzt.

Tab. 2-17: Therapieschema der Erhaltungstherapie (Woche 21-28).

Arzneistoff	Dosierung		Applikationszeitraum/Woche		Gesamtzahl der Applikationen	
	LR	SHR	LR	SHR	LR	SHR
Dexamethason	8 mg/m ² PO	12 mg/m ² PO	Tage 1-5*	Tage 1-5*	30	30
Cytarabin	---	300 mg/m ² IV	---	Tag 1 [#]	---	2
Cyclophosphamid	---	300 mg/m ² IV	---	Tag 1 [#]	---	2
Vincristin	2 mg/m ² IV	2 mg/m ² IV	Tag 1*	Tag 1*	2	2
Methotrexat	40 mg/m ² IV	40 mg/m ² IV	Tag 1 ^{x1}	Tag 1 ^{x2}	6	4
6-Mercaptopurin	75 mg/m ² PO	75 mg/m ² PO	Tage 1-7	Tage 1-7	56	28

* Nur in der 24. und 28. Woche; # nur in der 23. und 27. Woche; ^{x1} nur in der 21.-23. sowie 25.-27. Woche ^{x2} nur in der 21. und 22. sowie 25. und 26. Woche

Das Therapieschema der Wochen 21-28 wurde fünfmal wiederholt. Anschließend (ab Woche 68) erhielten alle Patienten täglich Mercaptopurin (75 mg/m²), wöchentlich MTX (40 mg/m²) und alle vier Wochen Dexamethason (8 bzw. 12 mg/m²), kombiniert mit Vincristin (2 mg/m²). Ab der 100. Woche wurde nur noch MTX und Mercaptopurin verabreicht. Mädchen wurden 100 Wochen, Jungen 146 Wochen lang therapiert.

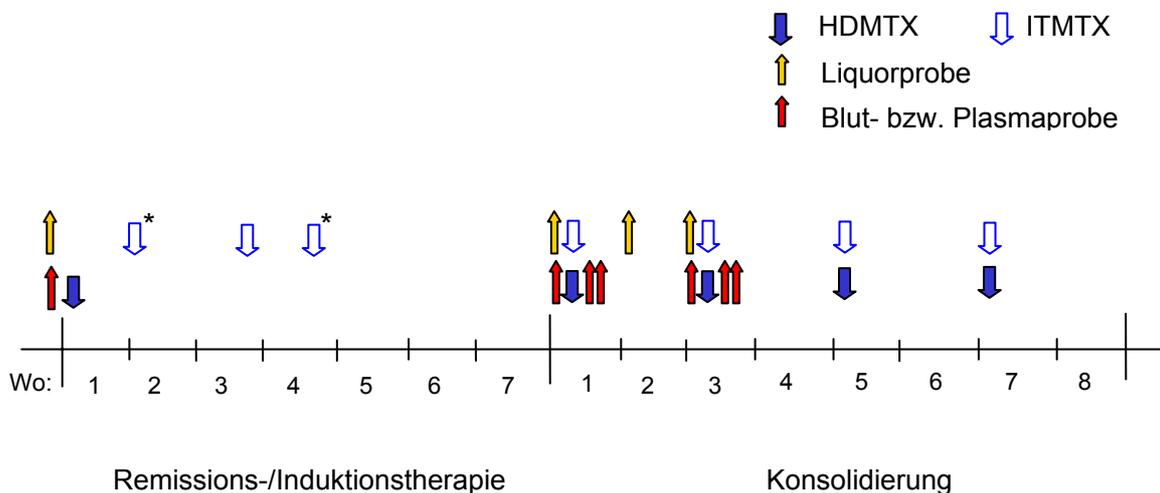
Die intrathekale Tripeltherapie wurde je nach Risikoprofil der Patienten mindestens siebenmal, höchstens jedoch sechzehnmal verabreicht.

2.5.1.3 Probenentnahmen

Zur Bestimmung von Homocystein wurden während der Therapie sowohl Blut- als auch Liquorproben gezogen. Liquor (ca. 2 mL) wurde vor der Remission/Induktion (RI), sowie am ersten (C1) und 15. Tag (C15) der Konsolidierung durch eine Lumbalpunktion entnommen. Zusätzlich wurde zeitweise auch am 8. Tag der

Konsolidierung (C8) eine Liquorprobe gezogen. Die Liquorentnahmen erfolgten jeweils kurz vor der intrathekalen Verabreichung von MTX (ITMTX).

Blutproben (ca. 3-4 mL), die anschließend zu Plasma aufgearbeitet wurden, wurden vor Beginn der Remission/Induktion (RI) – zum Zeitpunkt der Diagnose – und während der Konsolidierung gezogen. In letzterer Therapiephase erfolgte die Blutentnahme jeweils vor sowie 23 und 42 Stunden nach Verabreichung der 1. bzw. 2. HDMTX-Infusion (gerechnet ab Infusionsbeginn). Insgesamt wurden in dieser Therapiephase von jedem Patienten sechs Blutproben entnommen (C1, C1h23 und C1h42, C15, C15h23, C15h42). Das Probenentnahmeschema ist in Abb. 2-11 dargestellt.



* Nur bei Patienten mit besonders ausgeprägtem Risiko

Abb. 2-11: Zeitpunkte der Entnahme von Liquor- bzw. Blutproben.

Sowohl die Liquor- als auch die Plasmaproben wurden nach ihrer Gewinnung sofort bei -80 °C eingefroren. Die Versendung der Proben nach Bonn erfolgte auf Trockeneis, um ein zwischenzeitliches Auftauen der Proben zu vermeiden. Bis zur Untersuchung wurden alle Proben im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn bei -20 °C eingelagert.

2.5.2 Erwachsene Patienten mit primären Lymphomen des zentralen Nervensystems

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schlegel (Klinik für Neurologie, Abteilung Neuroonkologie, Universitätsklinikum der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) wurden vier Patienten mit primären Lymphomen des Zentralnervensystems (PZNSL) untersucht. PZNSL sind definiert als Lymphome, die in Gehirn, Augen, weichen Hirnhäuten und/oder dem Spinalmark entstehen¹⁷⁷.

2.5.2.1 Patientencharakteristika

Die Charakteristika der vier untersuchten Patienten finden sich in Tab. 2-18.

Tab. 2-18: Charakteristika der ZNS-Lymphompatienten.

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Körperoberfläche [m ²]	Erkrankung
1	40	w	1,62	PZNSL (B-Zellreihe)
2	66	w	1,63	PZNSL (B-Zellreihe)
3	64	w	1,79	PZNSL (B-Zellreihe)
4	73	w	1,94	Rezidiv. PZNSL (B-Zellreihe)

2.5.2.2 Therapieplan

Sämtliche Patienten wurden nach dem so genannten „Bonner Protokoll für primäre, zentralnervöse Lymphome“ therapiert. Dieses Protokoll beinhaltet insgesamt sechs Blöcke einer Hochdosis-Chemotherapie (Block AI, BI, CI sowie AII, BII und CII), die im zeitlichen Abstand von zwei Wochen verabreicht werden. Patienten mit rezidivierendem PZNSL wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll behandelt (es beinhaltete lediglich die Blöcke AI, CI sowie AII und CII). Das detaillierte Therapieschema ist in Tab. 2-19 aufgeführt. Die Dosis der MTX-Infusion wurde der Kreatinin-Clearance angepasst, die vor jedem Block bestimmt wurde.

Eine Dosisreduktion wurde bei eingeschränkter Nierenfunktion, sowie bei älteren Patienten (> 65 Jahre) vorgenommen.

Tab. 2-19: Therapieschema zur Behandlung der Patienten mit PZNSL („Bonner Protokoll zur Therapie PZNSL“).

Arzneistoff	Dosierung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Block A								
Methotrexat	5 g/m ² IV*	+						
Vincristin	2 mg/m ² IV	+						
Ifosfamid	800 mg/m ² IV		+	+	+	+		
Dexamethason	10 mg/m ² PO		+	+	+	+		
Methotrexat	3 mg ICV		+	+	+			
Prednisolon	2,5 mg ICV		+	+	+			
Cytarabin	30 mg ICV						+	
Block B								
Methotrexat	5 g/m ² IV*	+						
Vincristin	2 mg/m ² IV	+						
Cyclophosphamid	200 mg/m ² IV		+	+	+	+		
Dexamethason	10 mg/m ² PO		+	+	+	+		
Methotrexat	3 mg ICV		+	+	+			
Prednisolon	2,5 mg ICV		+	+	+			
Cytarabin	30 mg ICV						+	
Block C								
Cytarabin	3 g/m ² IV	+	+					
Vindesin	5 mg/m ² IV	+						
Dexamethason	10 mg/m ² PO			+	+	+	+	+
Methotrexat	3 mg ICV			+	+	+	+	
Prednisolon	2,5 mg ICV			+	+	+	+	
Cytarabin	30 mg ICV							+

* Patienten > 65 Jahre bekamen 3 g/m² infundiert

ICV: intra(cerebro)ventrikulär

Zur Beachtung: Die Blöcke A-C wurden in folgender Reihenfolge verabreicht: AI (Tag 1-5), BI (Tag 22-26), CI (Tag 39-43), AII (Tag 64-68), BII (Tag 85-89), CII (Tag 106-112). Patienten, die aufgrund eines PZNSL-Rezidivs therapiert wurden, bekamen nur Block A (AI, AII) und C (CI, CII) verabreicht.

MTX-Serumkonzentrationen wurden 24, 42, 48 und 54 Stunden nach jeder HDMTX-Infusion (gerechnet ab Infusionsbeginn) mittels Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (TDx/TDcFLx[®]) der Firma Abbott bestimmt.

Calciumfolinat (30 mg/m² IV) wurde 34, 42, 48 und 54 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion verabreicht. Bei erhöhten MTX-Serumkonzentrationen (> 150 µM zur 24., > 1 µM zur 42., > 0,4 µM zur 48. oder > 0,2 µM zur 54. Stunde) wurde eine intensiviertere Rescue-Therapie vorgenommen. In diesem Fall wurde im Abstand von

vier Stunden solange Calciumfolinat ($30 \text{ mg/m}^2 \text{ IV}$) verabreicht, bis die MTX-Serumkonzentration $< 0,2 \mu\text{M}$ betrug. Nach der intraventrikulären Gabe von MTX (ICVMTX) erfolgte keine Rescue-Therapie.

2.5.2.3 Probengewinnung und -aufarbeitung

Die Probenentnahme erfolgte jeweils kurz vor Verabreichung der intraventrikulären MTX- bzw. Cytarabin-Gabe durch Punktion eines Ommaya-Reservoirs (s. Abb. 2-12). Hierbei handelt es sich um einen Silikonport, der subkutan implantiert wird. Von dem Silikonport reicht ein anhängender Katheter durch das Cranium in einen lateralen Ventrikel. Das Reservoir erlaubt die vergleichsweise einfache Entnahme von Liquorproben bzw. Applikation von Arzneistoffen.

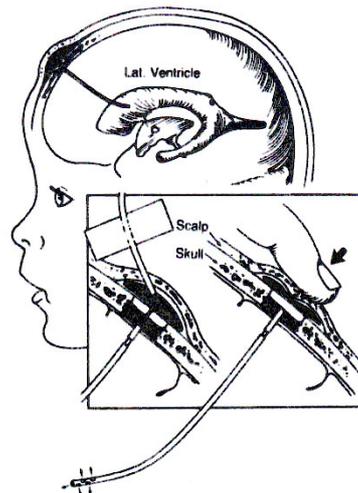


Abb. 2-12: Schematische Darstellung eines intraventrikulären Zugangs mit Ommaya-Reservoir. Die Vergrößerung zeigt den nach Applikation eines Arzneistoffs notwendigen Pumpvorgang⁹⁴.

Abb. 2-13 gibt eine Übersicht darüber, wann MTX infundiert bzw. intraventrikulär verabreicht wurde und zu welchen Zeitpunkten der Therapie Liquorproben entnommen wurden. Darüber hinaus ist der Abbildung das zeitliche Schema der Rescue-Therapie zu entnehmen.

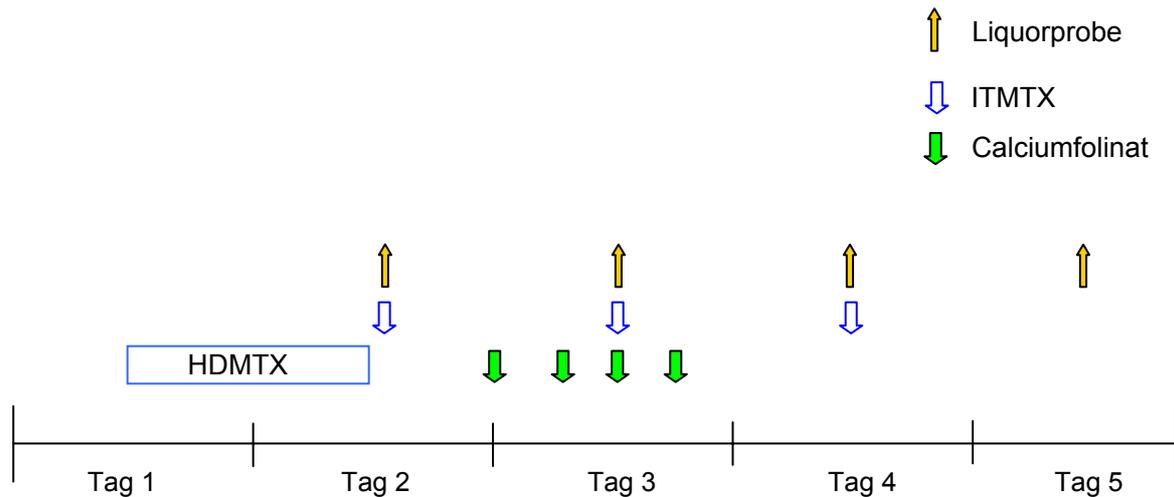


Abb. 2-13: Zeitpunkte der Entnahme von Liquorproben im Block A/B.

Zur Abtrennung zellulärer Bestandteile wurden die Liquorproben 10 min bei Raumtemperatur und 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur quantitativen Analyse bei -24 °C eingelagert.

2.5.3 Gesunde Erwachsene (Kontrollgruppe)

In Zusammenarbeit mit Dr. Görtz (Neurologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde eine Kontrollgruppe für die Lymphompatienten-Studie zusammengestellt. Es wurde gefordert, dass die Personen der Kontrollgruppe

- keine Erkrankung aufwiesen, die in irgendeiner Art und Weise den Homocysteinstoffwechsel hätte beeinflussen können,
- gehobenen Alters waren und
- über eine intakte Blut-Liquor-Schranke verfügten.

Die Liquores dieser Personen wurden hinsichtlich des Gehaltes an schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren (SEAA) sowie Cystein, Homocystein und Glutathion untersucht. Die ermittelten Konzentrationen dieser Substanzen dienten als

Referenzwerte für die Interpretation der Daten, die anhand der Studie mit den Lymphompatienten erhoben wurden.

Die nachfolgende Tab. 2-20 beinhaltet die Charakteristika der Kontrollgruppe. Alle Personen dieser Kontrollgruppe erhielten aus diagnostischen Gründen eine Lumbalpunktion. Die Blut-Liquor-Schrankenfunktion wurde anhand des Albumin-Quotienten beurteilt.

Tab. 2-20: Charakteristika der Kontrollgruppe.

Nr.	Alter [Jahre]	Ge-schlecht	Protein* [g/L]	Albumin-Quotient# (x10 ⁻³)	Drittel-zellen ^x
1	72	m	0,53	5,44	1
2	89	w	0,30	4,33	1
3	69	m	0,59	8,68	2
4	69	m	0,72	7,38	9
5	69	w	0,50	9,17	1
6	65	m	0,43	7,23	1
7	64	m	0,15	4,66	1
8	76	w	0,22	3,20	1
9	69	w	0,20	3,33	1
10	67	w	0,28	4,98	1
11	67	m	0,77	10,22	1
12	59	w	0,33	4,39	1
13	70	w	0,39	6,34	1
\bar{x}	69,6		0,42	6,10	
s	7,09		0,20	2,27	
RSD [%]	10,2		47,3	37,2	
\tilde{x}	69,0		0,39	5,44	

* Normwert des Proteingehalts im Liquor: 0,15-0,45 g/L (erhöht bei Schrankenstörungen und pathologischen Prozessen)

Quotient aus der Albuminkonzentration im Liquor und der Albuminkonzentration im Plasma; altersabhängiger Normwert: bis 15 Jahre: < 5,0x10⁻³, bis 40 Jahre: < 6,5x10⁻³, bis 60 Jahre: < 8,0x10⁻³

^x Drittelzellen: Zellzahl in 3 µL unverdünntem Liquor; Normwerte: 1 bis max. 12 Drittelzellen

Die Albuminquotienten der Tabelle zeigen auf, dass alle Personen über eine intakte Blut-Liquor-Schranke verfügten. Die Albuminquotienten der Personen 3, 5 und 11, welche über dem Grenzwert der Altersklasse „bis 60 Jahre“ lagen, sind normal für Personen, die älter als 60 Jahre sind, und klinisch nicht von Bedeutung¹⁷⁸.

2.5.4 Fallbericht einer Patientin mit MTX-Überdosierung

In Zusammenarbeit mit Dr. Liebeskind (Klinikum Buch, Abteilung Hämatologie und Onkologie, Helios Klinikum Berlin) und Prof. Dr. Bode (Kinderklinik, Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) wurde eine Patientin, die eine 10fach erhöhte MTX-Dosis intraventrikulär verabreicht bekam, untersucht.

2.5.4.1 Fallbeschreibung

Die Patientin wurde aufgrund eines Astrozytoms (WHO-Grad IV) nach dem sogenannten „HIT-SKK 2000-Protokoll“ therapiert. Zum Zeitpunkt der fehlerhaften MTX-Applikation – die Patientin bekam anstatt 2 mg 20 mg MTX intraventrikulär verabreicht – befand sich die Patientin im zweiten Therapiezyklus (1. Tag des Elements E III S1, s. Tab. 2-21) und war ein Jahr alt.

Sechs Stunden nach Applikation dieser hohen MTX-Dosis wurden folgende Notfall-Maßnahmen eingeleitet:

- Abbruch der laufenden MTX-Infusion (5 g/m^2), die kurz vor der intraventrikulären Gabe von MTX gestartet wurde
- Fraktionierte ventrikuläre Liquorspülung mit insgesamt 50 mL 0,9 % Kochsalzlösung, die 16 Stunden nach Überdosierung wiederholt wurde
- Intravenöse Gabe von insgesamt 11 Dosen Calciumfolinat (6 mg/m^2), die im zeitlichen Abstand von jeweils 6 Stunden verabreicht wurden
- Forcierte alkalische Diurese
- Gabe von Dexamethason (3x1 mg IV), Phenobarbital (2x25 mg IV) und Furosemid (5 mg IV)

Nach der fehlerhaften MTX-Gabe wurden keine neurologischen Komplikationen beobachtet¹⁷⁹. Eine Kernspinuntersuchung (MRT), die 4 Monate nach der Überdosierung durchgeführt wurde, offenbarte keine Anzeichen einer Demyelinisierung bzw. Leukenzephalopathie¹⁷⁹.

2.5.4.2 Therapieplan

Nach der operativen Entfernung des Hirntumors erhielt die Patientin eine Chemotherapie, die neben Methotrexat die Zytostatika Vincristin, Cyclophosphamid, Carboplatin und Etoposid beinhaltet. Das genaue Therapieschema zeigt Tab. 2-21.

Tab. 2-21: Therapieschema des „HIT-SKK 2000-Protokolls“.

Arzneistoff	Dosierung	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
Element E II S					
Vincristin	1,5 mg/m ² IV	+			
Cyclophosphamid	800 mg/m ² IV	+	+	+	
Methotrexat*	2 mg ICV	+	+	+	+
Element E III S1					
Vincristin	1,5 mg/m ² IV	+			
Methotrexat	5 g/m ² IV	+			
Methotrexat	2 mg ICV	+	+		
Element E III S2					
Vincristin	1,5 mg/m ² IV	+			
Methotrexat	5 g/m ² IV	+			
Methotrexat	2 mg ICV	+	+		
Element E IV S					
Carboplatin	200 mg/m ² IV	+	+	+	
Etoposid	150 mg/m ² IV	+	+	+	
Methotrexat*	2 mg ICV	+	+	+	+

Zur Beachtung: Die Elemente E II S, E III S1, E III S2 und E IV S stellen zusammen einen Zyklus dar. Dieser Zyklus wurde in der ersten Therapiephase insgesamt dreimal verabreicht (Zyklus 1-3), die Zeitspanne zwischen den einzelnen Zyklen betrug jeweils mindestens zwei Wochen. In einer späteren Therapiephase (nach kompletter Remission) wurden zwei weitere Zyklen (Zyklus 4-5) verabreicht, wobei in diesen Zyklen die Elemente E III S1 und E III S2 ausgelassen wurden.

* Nur Zyklus 1-3

Tab. 2-21 ist zu entnehmen, dass HDMTX insgesamt sechsmal, ICVMTX insgesamt 36-mal verabreicht wurde. Die Rescue-Therapie nach HDMTX wurde 42 Stunden nach MTX-Infusionsbeginn mit der Gabe von Calciumfolinat (15 mg/m² IV) gestartet und alle sechs Stunden solange wiederholt, bis insgesamt sechs Dosen Calciumfolinat verabreicht worden waren. Die letzte Gabe Calciumfolinat erfolgte somit 72 Stunden nach Beginn der MTX-Infusion. Bei erhöhten MTX-

Serumkonzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$ zur Stunde 42, $> 0,4 \mu\text{M}$ zur Stunde 48 oder $> 0,25 \mu\text{M}$ zur Stunde 54) wurde die sechsstündliche Calciumfolinatdosis den MTX-Serumkonzentrationen angepasst und solange fortgesetzt, bis die MTX-Serumkonzentration $< 0,25 \mu\text{M}$ betrug. Nach der intraventrikulären Gabe von MTX (ICVMTX) erfolgte keine Rescue-Therapie.

2.5.4.3 Probenentnahmen

Liquorproben wurden 6, 6 $\frac{1}{4}$ (nach der 1. Spülung), 10, 16 (vor der 2. Spülung), 24, 34, 48, 62 und 66 Stunden nach der fehlerhaften intraventrikulären Instillation von MTX aus dem implantierten Ommaya-Reservoir entnommen. Diese Proben wurden weder zentrifugiert noch anderweitig behandelt.

Im Klinikum Buch wurden in all diesen Proben die Konzentrationen an MTX mit einem Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay (TDx/TDcFLx[®]) der Firma Abbott bestimmt.

Cystein, Homocystein und Glutathion, die Metaboliten des Cysteins (CSA und CA) und Homocysteins (HCSA und HCA) sowie N⁵-Methyl-THF wurden in den Proben, die 10, 16 (vor 2. Spülung), 24, 34, 62 und 66 Stunden nach ICVMTX gezogen wurden, quantifiziert. Die übrigen Proben standen für diese biochemische Analyse nicht zur Verfügung.

2.6 Pharmakokinetische Berechnungen

Die MTX-Clearance und die AUC (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve) der ALL-Patienten nach HDMTX (s. Kapitel 2.5.1) wurden basierend auf den MTX-Steady-State-Konzentrationen, die während der 24-stündigen MTX-Infusion bestimmt wurden, ermittelt.

2.6.1 Clearance

Die Gesamtclearance (CL) von MTX nach Verabreichung der hochdosierten MTX-Infusion wurde aus der verabreichten Dosis und der mittleren Steady-State-Konzentration im Plasma nach folgender Gleichung berechnet:

$$CL = \frac{D}{c_{av}^{ss} \cdot \tau} \quad \text{Gl. 2-11}$$

D = Dosis

c_{av}^{ss} = mittlere Steady-State-Konzentration

τ = Infusionsdauer

Die mittlere Steady-State-Konzentration wurde aus den MTX-Plasmakonzentrationen, die zur 6. und 23. Stunde der insgesamt 24-stündigen MTX-Infusion bestimmt wurden, berechnet.

2.6.2 AUC

Die AUC nach HDMTX wurde nach Ermittlung der jeweiligen MTX-Clearance gemäß folgender Gleichung berechnet:

$$AUC = \frac{D}{CL} \quad \text{Gl. 2-12}$$

D = Dosis

CL = Gesamtclearance

2.7 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software Excel[®] 2002 (Microsoft[®]) und SPSS 11.0 für Windows[®] (SPSS Inc.).

2.7.1 Deskriptive Statistik

Zur zusammenfassenden Darstellung der Daten wurden verschiedene Lage- und Streumaße herangezogen. Dies waren:

Median (\tilde{x}):

Der Wert, über und unter dem jeweils die Hälfte aller Fälle liegt; das 50. Perzentil. Bei einer geraden Anzahl von Fällen ist der Median der Mittelwert der zwei mittleren Fälle, wenn diese auf- oder absteigend sortiert sind

Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gl. 2-13}$$

Standardabweichung (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gl. 2-14}$$

\bar{x} = Mittelwert aus n Einzelmessungen

x_i = Messwert

n = Anzahl der Messungen

Relative Standardabweichung (RSD): siehe Gl. 2-6

Spannweite (Range):

Die Spannweite wird durch den größten (Maximum) und kleinsten Wert (Minimum) der Verteilung terminiert.

Zur graphischen Darstellung der Lage- und Streumaße wurden in aller Regel Boxplots verwendet. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten

Quartil (25. und 75. Perzentil) begrenzt wird. Die innere horizontale Linie repräsentiert den Median, die obere Linie markiert den größten, die untere den kleinsten Wert. Ausreißer sind definiert als Werte, die um mehr als anderthalb Boxlängen außerhalb der Box liegen. Sie sind durch einen Kreis gekennzeichnet. Extremwerte liegen um mehr als drei Boxlängen außerhalb der Box und sind durch ein Sternchen markiert (s. Abb. 2-14).

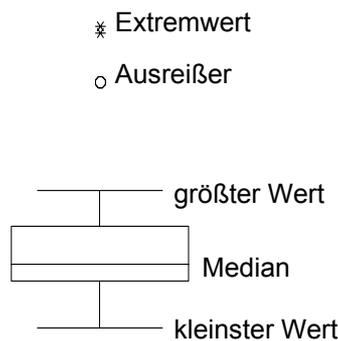


Abb. 2-14: Boxplot zur Darstellung der Lage- und Streumaße.

2.7.2 Statistische Tests zur Prüfung von Unterschiedshypothesen

Mit Hilfe der klassischen Teststatistik wird ermittelt, welche von zwei gegensätzlichen Hypothesen – Nullhypothese oder Alternativhypothese – angenommen werden kann. Die Nullhypothese ist eine Negativhypothese, mit der behauptet wird, dass die zur Alternativhypothese (H_A) komplementäre Aussage richtig ist. Die Entscheidung, ob die Alternativhypothese, die die zu beweisende Theorie beinhaltet, akzeptiert werden kann oder nicht, wird von der Nullhypothese aus getroffen. Ziel der Teststatistik ist es, die Wahrscheinlichkeit (p) zu berechnen, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird (Irrtumswahrscheinlichkeit). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nullhypothese verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich 5 % betrug ($p < 0,05$), das Signifikanzniveau lag somit bei 5 %. Ein hochsignifikantes Ergebnis lag bei $p < 0,01$, ein höchstsignifikantes bei $p < 0,001$ vor. Nachfolgend werden die verwendeten Tests kurz erläutert.

Prüfung auf Normalverteilung

Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde bei Stichprobenumfängen mit bis zu 50 Messwerten der Shapiro-Wilk-Test, bei größeren Stichprobenumfängen der Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Bei beiden Tests stellt die Nullhypothese (die Daten sind normalverteilt) die „Wunschhypothese“ dar, d.h. bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ weicht die gegebene Verteilung signifikant von einer Normalverteilung ab. Die untere Grenze der „echten Signifikanz“ wurde bei $p \geq 0,2$ festgelegt, d.h. bei p -Werten $\geq 0,2$ wurden normalverteilte Daten angenommen.

Gruppenvergleich

Zur Beurteilung, ob sich Gruppen hinsichtlich bestimmter Merkmale signifikant unterscheiden, wurden diverse statistische Tests herangezogen. Die Testauswahl erfolgte in Abhängigkeit von der Skalierung und Verteilung der Daten, der Stichprobengröße und der Anzahl der untersuchten Gruppen. Des Weiteren wurde berücksichtigt, ob die Variablen voneinander abhängig waren oder nicht. Intervallskalierte, nicht-normalverteilte Daten wurden mit nicht-parametrischen Tests analysiert. Die Tab. 2-22 liefert einen Überblick über die verwendeten Testverfahren.

Tab. 2-22: Statistische Tests zur Prüfung von Unterschiedshypothesen.

Test	Skalierung	Anzahl der Stichproben	Abhängigkeit
Mann-Whitney-U-Test	ordinal*	2	unabhängig
Wilcoxon-Test	ordinal*	2	abhängig
Kruskal-Wallis-Test	ordinal*	> 2	unabhängig
Friedman-Test	ordinal*	> 2	abhängig
t-Test nach Student	intervallskaliert	2	unabhängig
Verbundener t-Test	intervallskaliert	2	abhängig
Einfache Varianzanalyse	intervallskaliert	> 2	unabhängig
Varianzanalyse mit Messwiederholungen	intervallskaliert	> 2	abhängig

* oder nicht-normalverteilt, intervallskaliert

2.7.3 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse eignet sich, um die Stärke und die Richtung eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen zu untersuchen. Die Berechnung basiert auf Wertepaaren, die aus den zur Verfügung stehenden Daten gebildet werden. Der Korrelationskoeffizient r gibt die Stärke des Zusammenhangs an. Er kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen. Ein perfekter Zusammenhang liegt bei $r = 1$ vor; fehlt jeglicher Zusammenhang ist $r = 0$. Ein negativer Korrelationskoeffizient signalisiert einen gegenläufigen Zusammenhang. Es ist üblich, das Ausmaß der Korrelation in Abhängigkeit von r näher zu benennen:

Tab. 2-23: Korrelationskoeffizient und Ausmaß des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen.

Korrelationskoeffizient	Ausmaß der Korrelation
$r \geq 0,9$	sehr hoch
$r < 0,9$	hoch
$r < 0,7$	mittel
$r < 0,5$	gering
$r < 0,2$	sehr gering

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten richtet sich nach dem Skalenniveau und der Verteilung der Variablen. Bei intervallskalierten, normalverteilten Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson, bei mindestens einer ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variable wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall berechnet.

2.7.4 Regressionsanalyse

Mit Hilfe der Regressionsanalyse wird der mathematische Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen ermittelt. Bei der einfachen linearen Regression wird nur ein unabhängiger Parameter verwendet, basierend auf dem Prinzip der kleinsten Fehlerquadrate, eine Geradengleichung ermittelt, die den

linearen Zusammenhang der unabhängigen Variablen x von der abhängigen Variablen y beschreibt:

$$y = a \cdot x + b \qquad \text{Gl. 2-15}$$

a = Steigung

b = Ordinatenabschnitt

Auch bei der linearen Regression wird der Korrelationskoeffizient herangezogen, um das Ausmaß des Korrelierens (oder Nicht-Korrelierens) zu beurteilen. Zur Berechnung des mittleren Korrelationskoeffizienten (\bar{r}) wurde zunächst eine Z-Transformation nach Fisher vorgenommen (s. Gl. 2-16) und anschließend das arithmetische Mittel der Z-Werte zurücktransformiert (s. Gl. 2-17).

$$Z = 0,5 \cdot \ln\left(\frac{1+r}{1-r}\right) \qquad \text{Gl. 2-16}$$

$$r = \frac{e^{2Z} - 1}{e^{2Z} + 1} \qquad \text{Gl. 2-17}$$

Z = transformierter Korrelationskoeffizient (nach Fisher)

Diese Umrechnung erfolgte vor dem Hintergrund, dass die Werte für den Korrelationskoeffizienten nicht Maßzahlen einer Kardinalskala sind und somit der Mittelwert der Korrelationskoeffizienten ohne vorherige Z-Transformation nicht interpretierbar ist¹⁸⁰.

3 Ergebnisse

3.1 CE-Methode zur Bestimmung von schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren im Liquor

Um die Liquores von Krebspatienten auf schwefelhaltige, exzitatorische Aminosäuren untersuchen zu können, wurde eine kapillarelektrophoretische Methode entwickelt, die es erlaubt, auch sehr niedrige Konzentrationen der SEAA im Liquor zu detektieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Methodenentwicklung und Validierung aufgeführt.

3.1.1 Trennung der schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren

Die Grundlage der Methodenentwicklung stellte ein von Lau et al. beschriebenes Verfahren dar, bei dem primäre Amine mit CFSE umgesetzt und anschließend kapillarelektrophoretisch getrennt werden¹⁷⁰. Initial wurden sowohl die Derivatisierungs- als auch die Trennbedingungen dieser Methode übernommen und überprüft, ob sich die Methode auch zur Bestimmung der SEAA eignete. Abb. 3-1 zeigt das entsprechende Elektropherogramm einer Lösung derivatisierter SEAA, welches unter den Bedingungen der Methode von Lau et al. erhalten wurde. Sie verdeutlicht, dass sowohl die Trennung als auch die Peakschärfe unzureichend waren.

Da eine pH-Wert-gesteuerte Trennungsoptimierung nicht in Frage kam (s. Kap. 2.2.3.1), darüber hinaus die Analyten bei pH 9,0 über die gleiche Nettoladung und ähnliche Massen verfügten, wurde versucht, über die micellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC, s. Kapitel 2.2.1) eine ausreichende Trennung der Analyten zu erzielen. Vor diesem Hintergrund wurden dem Laufpuffer (0,1 M Borat, pH 9,0) unterschiedlich große Mengen des Micellbildners SDS zugesetzt und der Effekt auf die Trennung der SEAA-Derivate verfolgt. Die SDS-Konzentration im Laufpuffer lag hierbei jeweils oberhalb der kritischen Micellbildungskonzentration (CMC) von $8,2 \mu\text{M}$ ¹⁸¹. Eine Zusammenstellung der Puffer, die in dieser Studie verwendet wurden, zeigt Tab. 2-2.

Der Abb. 3-2 A ist zu entnehmen, dass die SDS-Zugabe (Endkonzentration 20 mM, s. Puffer B der Tab. 2-2) die Auftrennung der Analyten deutlich verbesserte.

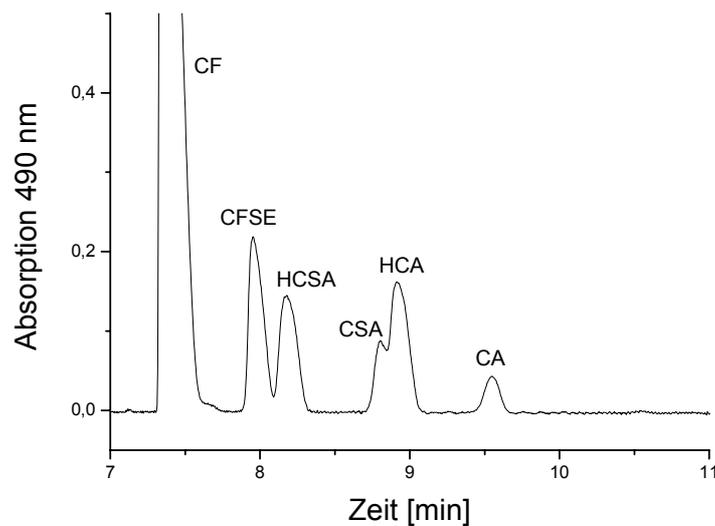


Abb. 3-1: Elektropherogramm einer Lösung derivatisierter SEAA (c: jeweils 0,5 mM). Trennbedingungen: 25 kV, Temperatur 25 °C, hydrodynamische Injektion (5 s), Laufpuffer: 0,1 M Borat (pH 9,0). CF: Carboxyfluorescein.

Die Zunahme der Peakschärfe wurde durch eine Aufkonzentrierung der Probe in der Kapillare bewirkt („stacking“, s. Kapitel 2.2.1), denn der SDS-Zusatz führte zu einer deutlichen Erhöhung der Leitfähigkeit des Laufpuffers (s. Ströme der Laufpuffer in Tab. 2-2). Die Tatsache, dass sich nach Zugabe von SDS die Migrationszeiten aller Analyten verlängerten, ist ein Indiz dafür, dass Interaktionen zwischen den Analyten und den Micellen stattgefunden haben. Eine weitere Verbesserung der Auflösung konnte durch eine höhere Konzentration an SDS (Puffer C der Tab. 2-2) erzielt werden. Allerdings konnte auch mit diesem Trennsystem keine befriedigende Trennung zwischen CSA und HCA (jeweils als Derivat vorliegend) erreicht werden (s. Abb. 3-2 B). Zur weiteren Optimierung der Trennung und zur Senkung des Stromes in der Kapillare – es wird empfohlen mit Strömen unterhalb 100 μA zu arbeiten, um eine zu starke Erwärmung und eventuell nachfolgende Gasentwicklung zu vermeiden¹⁸² – wurde dem Laufpuffer zusätzlich Methanol hinzugesetzt. Organische Lösungsmittel, insbesondere Alkohole, werden recht häufig zur Verbesserung der Auflösung verwendet, da sie in der Lage sind, den EOF zu verringern und somit das Zeitfenster für die Trennung zu vergrößern. Mit einem 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0), der SDS in einer Konzentration von 50 mM und zusätzlich 5 % (V/V) Methanol enthielt, konnte eine vollständige Trennung aller Aminosäuren erzielt werden (Abb. 3-2 C).

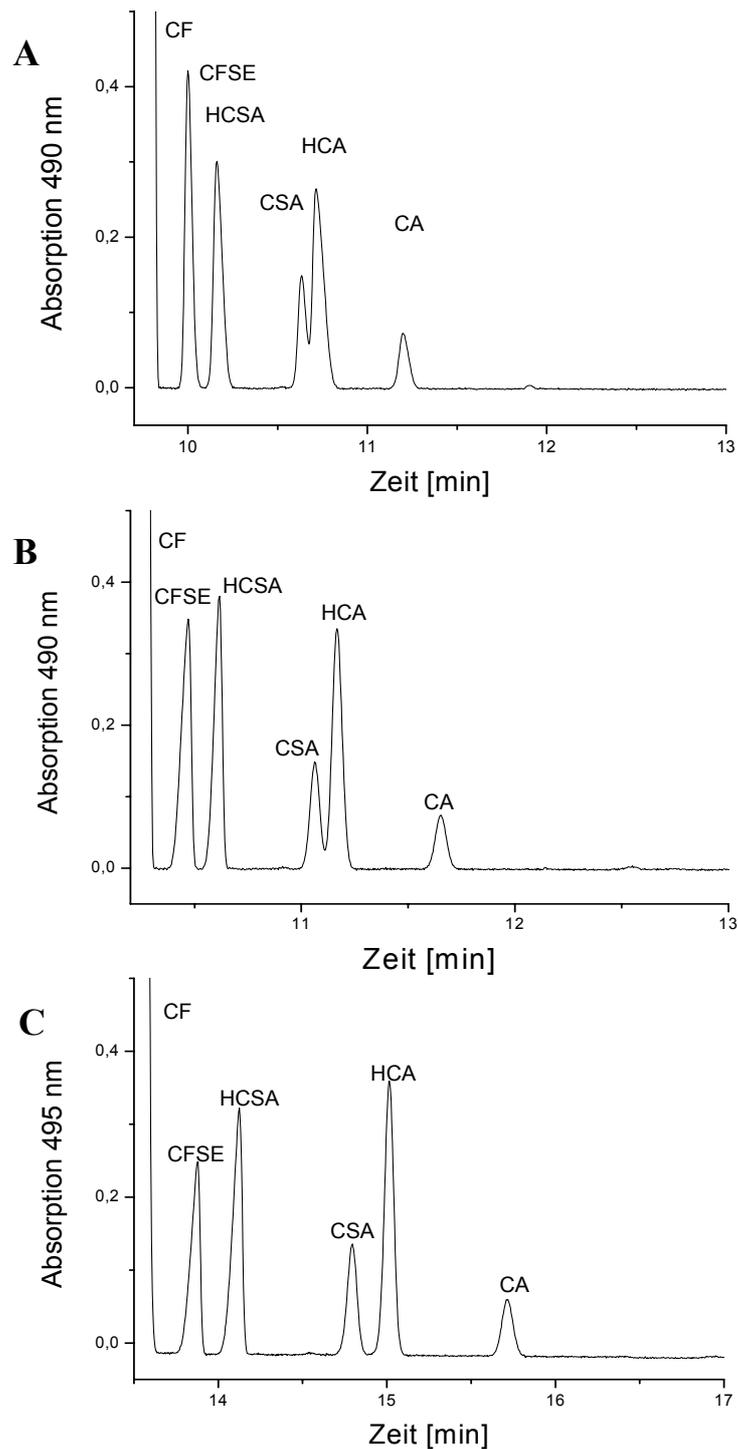


Abb. 3-2: Optimierung der Trennung derivatisierter SEAA (0,5 mM jeweils). Trennbedingungen: 25 kV, 25 °C; Laufpuffer: A: 0,1 M Borat (pH 9,0), 20 mM SDS; B: 0,1 M Borat (pH 9,0), 50 mM SDS; C: 0,1 M Borat (pH 9,0), 50 mM SDS, 5 % (V/V) MeOH.

3.1.2 Optimierung der Derivatisierung

pH-Abhängigkeit

Abb. 3-3 zeigt die Abhängigkeit der korrigierten Peakfläche derivatisierter HCSA vom pH-Wert des Derivatisierungspuffers (0,1 M Borat). Die Kurvenanpassung erfolgte durch polynomische Regression. Vergleichbare Kurven wurden auch für CSA, CA und HCA erhalten. Die Maxima der Kurven lagen bei 8,98 für HCSA, 8,81 für HCA, 8,92 für CSA und 8,73 für CA. Als pH-Optimum für die gemeinsame Derivatisierung der SEAA wurde der Mittelwert dieser Maxima (pH 8,87) definiert.

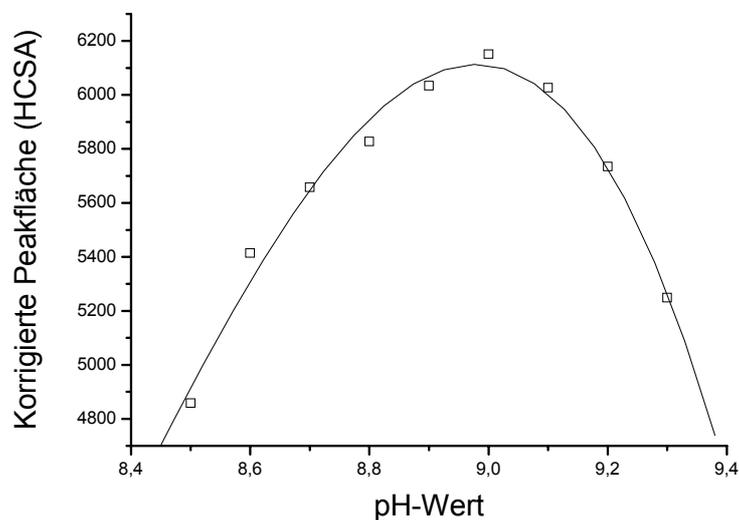


Abb. 3-3: pH-Abhängigkeit der Derivatisierungsreaktion. Korrigierte Peakfläche derivatisierter HCSA in Abhängigkeit vom pH-Wert des Derivatisierungspuffers (0,1 M Borat). Derivatisierungsdauer: 30 min, Konzentration der SEAA jeweils 0,1 mM.

Der Kurvenverlauf in Abb. 3-3 lässt sich dadurch erklären, dass vor dem Maximum die Protonierung der Aminogruppe, nach dem Maximum die Hydrolyse des Fluoreszenzmarkers die Reaktionsausbeute limitierte. Die Hydrolysereaktion von CFSE ist in Abb. 3-4 dargestellt.

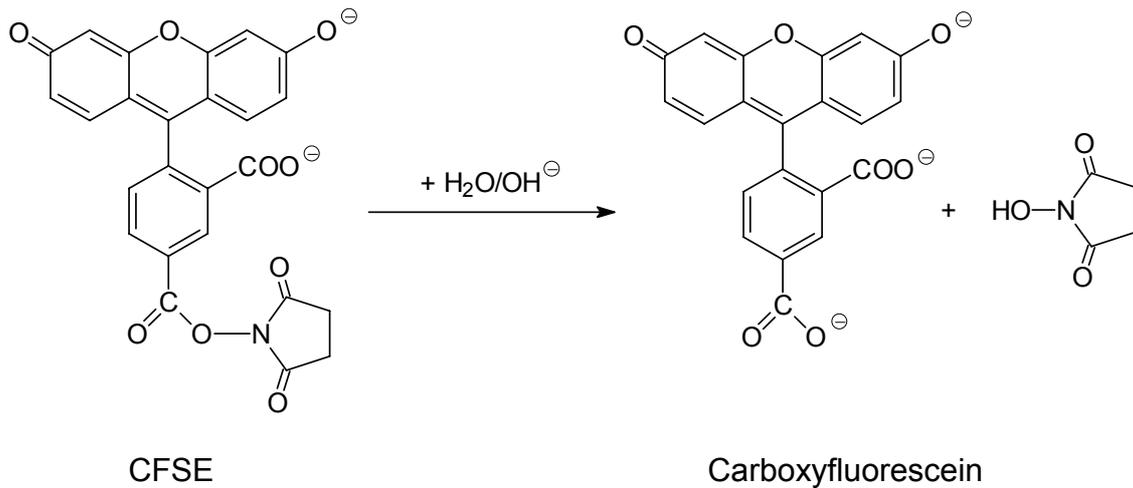


Abb. 3-4: Hydrolysereaktion von CFSE.

Zeitabhängigkeit

Nach der Ermittlung des optimalen pH-Wertes für die Derivatisierung wurde die Derivatisierungszeit bestimmt, die die maximale Ausbeute an Produkten liefert. Abb. 3-5 zeigt die korrigierten Peakflächen der Aminosäurederivate in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit. Abb. 3-5 A zeigt das Ergebnis unter Verwendung der UV-, Abb. 3-5 B unter Verwendung der sensitiven LIF-Detektion.

Bedingt durch die empfindlichere Messtechnik ist der Anstieg der Kurven in Abb. 3-5 B steiler, was zur Folge hat, dass das Maximum deutlicher sichtbar ist. Man sieht, dass sowohl bei Abb. 3-5 A als auch bei Abb. 3-5 B ein Maximum nach ca. 35 min erreicht wird. Diese Zeit entspricht einer 30-minütigen Derivatisierungszeit, da ungefähr 5 min bis zur Vermessung der Probe verstreichen. Im Gegensatz zu Lau et al., die eine wesentlich längere Derivatisierung empfehlen (über Nacht)¹⁷⁰, zeigt diese Studie, dass 30 min ausreichend sind, um eine maximale Ausbeute an Derivaten zu erzielen.

Darüber hinaus lassen die Ergebnisse erkennen, dass die Reaktionsausbeute stark von der Reaktivität der Aminogruppe der jeweiligen Aminosäure beeinflusst wird. Aminosäuren, die eine Sulfinsäuregruppe tragen, zeigen im Vergleich zu den entsprechenden Aminosäuren mit einer Sulfonsäuregruppe gegenüber CFSE eine

höhere Reaktivität. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Basizität der Aminogruppe bei den Sulfinsäuren höher ist als bei den Sulfonsäuren, weil von der Sulfinsäuregruppe ein schwächerer negativer induktiver Effekt ausgeht als von der Sulfonsäuregruppe. Ferner reagieren Aminosäuren, die sich vom Homocystein ableiten lassen, besser als die Abkömmlinge des Cysteins, da die zusätzliche Methylengruppe der Homocysteinderivate den elektronenziehenden Effekt der Sulfin- bzw. Sulfonsäuregruppe reduziert.

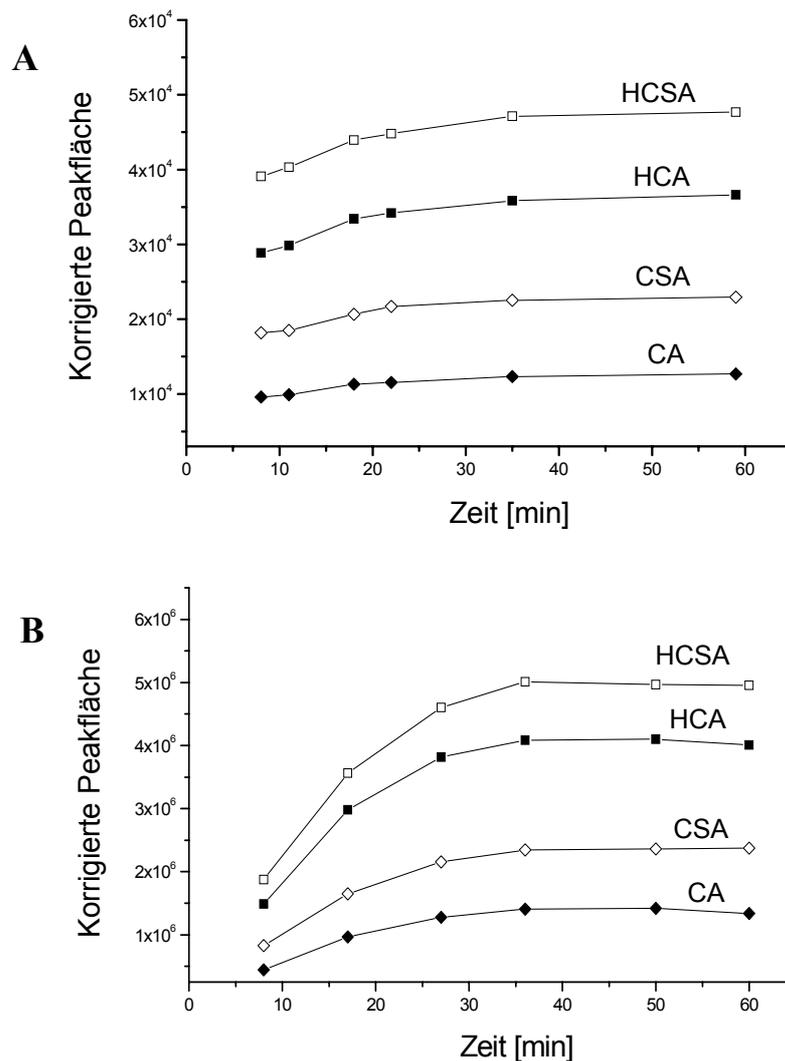


Abb. 3-5: Korrigierte Peakflächen derivatisierter SEAA in Abhängigkeit von der Derivatisierungszeit. Derivatisierungspuffer: 0,1 M Borat (pH 8,9). A: UV-Detektion (490 nm), B: LIF-Detektion.

3.1.3 Vergleich der Empfindlichkeit von UV- und LIF-Detektion

Nach Optimierung der Trenn- und Derivatisierungsbedingungen wurde die Nachweisgrenze (LOD), basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis von drei, unter Verwendung der UV-, sowie der empfindlichen LIF-Detektion bestimmt. Tab. 3-1 sind die ermittelten LODs für beide Detektionsmethoden zu entnehmen.

Tab. 3-1: Limits of Detection der SEAA (UV- und LIF-Detektion).-

Substanz	LOD [μM]	LOD* [μM]	LOD* [#] [amol]
	UV-Detektion (490 nm)	LIF-Detektion	LIF-Detektion
HCSA	5,4	90	2,1
CSA	8,2	170	3,9
HCA	5,6	210	4,6
CA	4,2	600	13,8

* Nach Verdünnung der Probe mit 0,01 M Boratpuffer

[#] Massenempfindlichkeit (Injektionsvolumen: 23 nL)

Für die UV-Detektion lagen die ermittelten LODs im unteren μM -Bereich. Die im Vergleich zu HPLC-Methoden relativ geringe Konzentrationsempfindlichkeit ist durch den geringen Kapillarinne Durchmesser (ID: 75 μm) begründet, der die Schichtdicke der Detektionszelle festlegt. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass die UV-Detektion zur Bestimmung niedriger Konzentrationen (unterer $\mu\text{molarer}$ Bereich) der SEAA nicht ausreicht.

Die Verwendung der LIF-Detektion führte zu einer extrem gesteigerten Empfindlichkeit. Für die 1:100 verdünnte Messprobe lagen die LODs im picomolaren Bereich. Die Massenempfindlichkeit lag zwischen 2,1 und 13,8 amol (10×10^{-18} mol).

3.1.4 Methodenoptimierung für die Liquoranalyse

Erste Elektropherogramme derivatisierter Liquorproben, die mit den SEAA aufgestockt wurden, zeigten, dass unter Verwendung des Laufpuffers, der die Trennung aller interessierenden Analyten in rein wässriger Lösung gewährleistete

(0,1 M Borat (pH 9,0), 50 mM SDS, 5 % (V/V) MeOH), die Aminosäure Aspartat (ASP) nicht von CSA bzw. HCA abgetrennt werden konnte.

Da die Trennung der Analyten im Rahmen der Methodenentwicklung schnell und effizient durch Variation der SDS- und MeOH-Konzentration im Laufpuffer gesteuert werden konnte, wurde dieses Konzept auch für die Trennung im Liquor verfolgt. Die Zusammensetzung der eingesetzten Puffersysteme zeigt Tab. 2-3.

Zunächst wurde die MeOH-Konzentration im Laufpuffer variiert (Puffer A-F der Tab. 2-3). Die Erhöhung des MeOH-Anteils führte schrittweise zu einer besseren Trennung zwischen ASP und HCA (s. Abb. 3-6 A-C). Leider führte diese Maßnahme nicht zu einer befriedigenden Trennung zwischen CSA und ASP – sie wurde tendenziell eher schlechter. Dies war der Grund dafür, dass der MeOH-Anteil nicht über 10 % erhöht wurde. Stattdessen wurde die SDS-Konzentration im Laufpuffer variiert. Interessanterweise bewirkte das Absenken der SDS-Konzentration – trotz kürzerer Migrationszeiten – eine bessere Trennung zwischen CSA und ASP. Ein Optimum wurde bei einer SDS-Konzentration von 10 mM erreicht (s. Abb. 3-7 A). Der völlige Verzicht auf SDS führte zu einer deutlich schlechteren Auflösung – ein Beleg dafür, dass SDS eine tragende Rolle bei der Trennung der Analyten zukam (s. Abb. 3-7 B). Eine Basislinientrennung aller derivatisierten Aminosäuren konnte schließlich durch ein Absenken der Kapillartemperatur von 25 auf 19 °C erzielt werden (Abb. 3-7 C). Bedingt durch den verringerten EOF verlängerten sich die Migrationszeiten der Analyten um knapp sieben Minuten.

Dieses Beispiel der Trennungsoptimierung zeigt, dass die Auftrennung ionischer Substanzen in der MEKC durch viele Faktoren beeinflusst werden kann und dass eine Vorhersage, wie sich die Variation eines Parameters auf die Trennung auswirkt, kaum zu treffen ist. Neben dem zugrunde liegenden elektrophoretischen Trennprinzip spielen Verteilungsprozesse und ionische Wechselwirkungen zwischen den Analyten und den Micellen eine Rolle, so dass insgesamt ein hoch komplexes Trennsystem vorliegt.

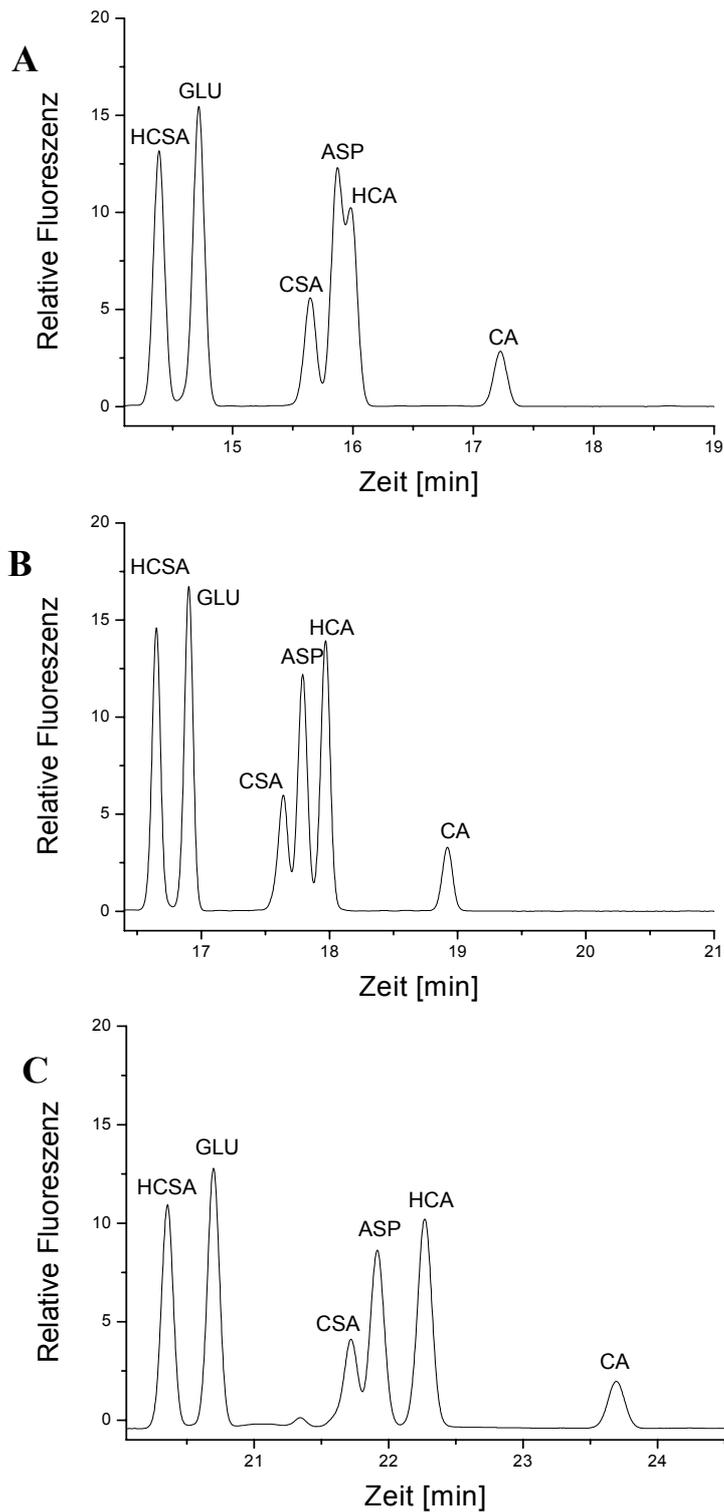


Abb. 3-6: Elektropherogramme einer Liquorprobe, gespikt mit SEAA (10 μ M) sowie GLU und ASP. Laufpuffer: 0,1 M Borat (pH 9,0), 50 mM SDS (25 $^{\circ}$ C); Methanolgehalt: A: 5 %, B: 7 %, C: 10 % MeOH (V/V).

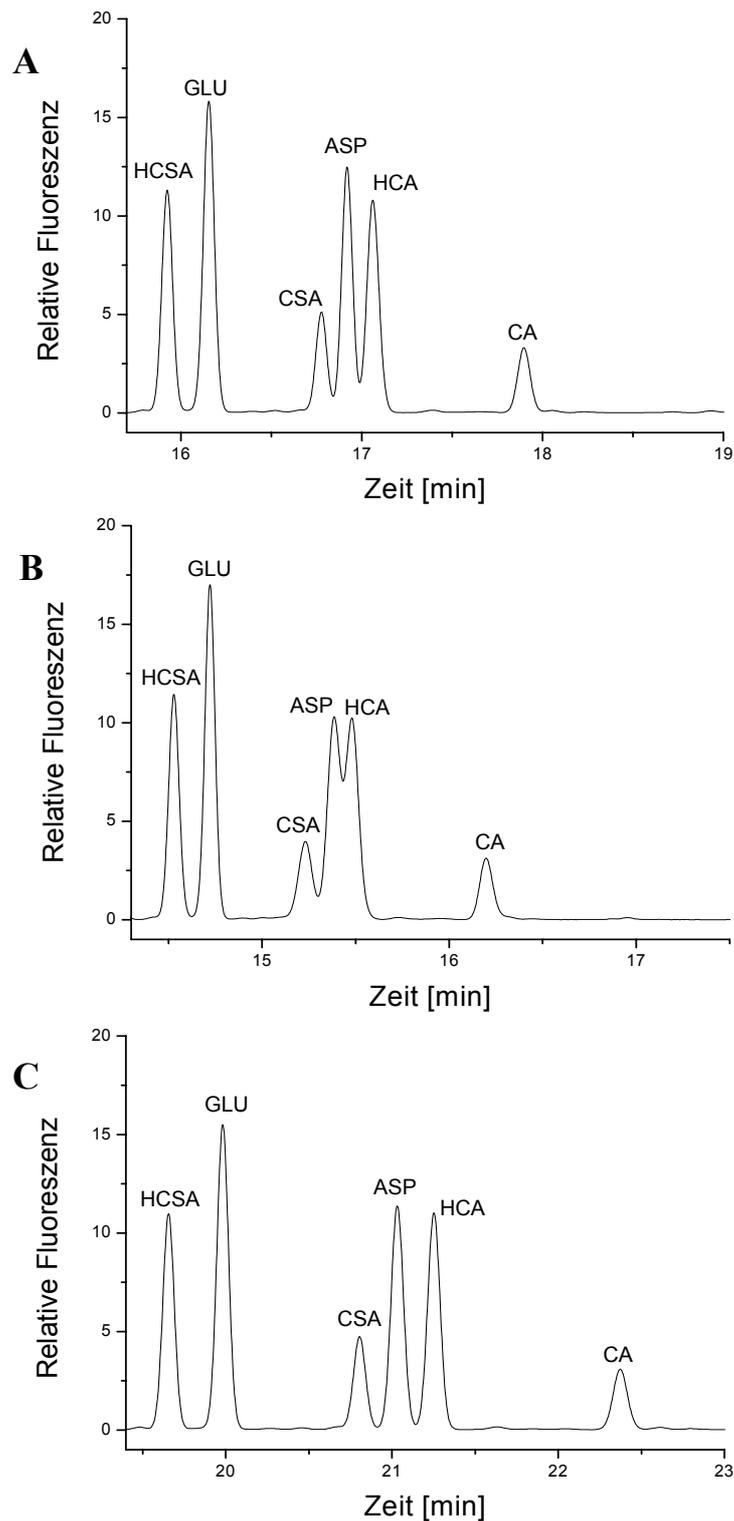


Abb. 3-7: Elektropherogramme einer Liquorprobe, gespikt mit SEAA (10 μ M) sowie GLU und ASP. Laufpuffer: A: 0,1 M Borat (pH 9,0), 10 % MeOH (V/V), 10 mM SDS (25 °C). B: 0,1 M Borat (pH 9,0), 10 % MeOH (V/V), 0 mM SDS (25 °C) C: 0,1 M Borat (pH 9,0), 10 % MeOH (V/V), 10 mM SDS (19 °C).

3.1.5 Validierung

3.1.5.1 Selektivität

Im Rahmen der Selektivitätsuntersuchung wurden die Elektropherogramme fünf verschiedener Liquores vor und nach Zugabe der Analyten untersucht. Abb. 3-8 zeigt ein typisches Elektropherogramm einer Liquorprobe, die nicht mit den SEAA aufgestockt wurde.

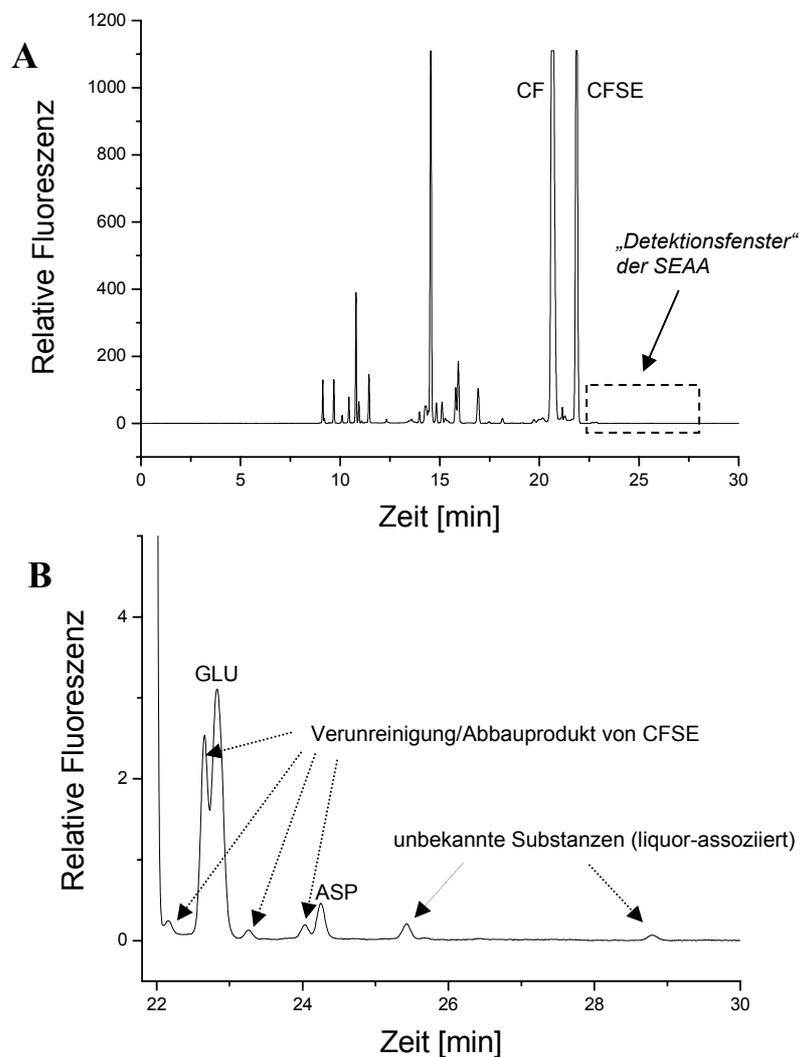


Abb. 3-8: A: Typisches Elektropherogramm einer Liquorprobe. B: Ausschnitt des Elektropherogramms A (gestrichelter Kasten im Elektropherogramm A).

Da der Fluoreszenzmarker CFSE in verhältnismäßig hoher Konzentration eingesetzt wurde, prägten die Peaks von CFSE und dessen Hydrolyseprodukt CF die Elektropherogramme. Das Zeitfenster, in dem die SEAA detektiert wurden, ist durch den gestrichelten Kasten in Abb. 3-8 A angedeutet. In Abb. 3-8 B ist dieser Ausschnitt dargestellt. Neben Glutamat und Aspartat wurden Verunreinigungen (oder Abbauprodukte) des Fluoreszenzmarkers detektiert. Die Substanz, die kurz vor dem Glutamat-Peak detektiert wurde, war nicht in allen Chargen des Fluoreszenzmarkers CFSE vorhanden. An dieser Stelle sei angemerkt, dass für die empfindliche LIF-Detektion ein höherer Reinheitsgrad von CFSE wünschenswert gewesen wäre. Abb. 3-9 zeigt das Elektropherogramm einer Liquorprobe gespikt mit HCSA, CSA, HCA und CA (3 μM jeweils). Der Vergleich der Elektropherogramme in Abb. 3-8 und Abb. 3-9 zeigt, dass HCSA, HCA und CA ohne störende Nebenpeaks detektiert werden konnten. Die Verunreinigung, die mit CSA komigrierte, führte dazu, dass sich der Ordinatenabschnitt der Kalibriergeraden von CSA signifikant von Null unterschied. Da die Fläche der „Störsubstanz“ relativ klein war, konnte CSA trotzdem mit hinreichender Genauigkeit bestimmt werden (siehe Tab. 3-4).

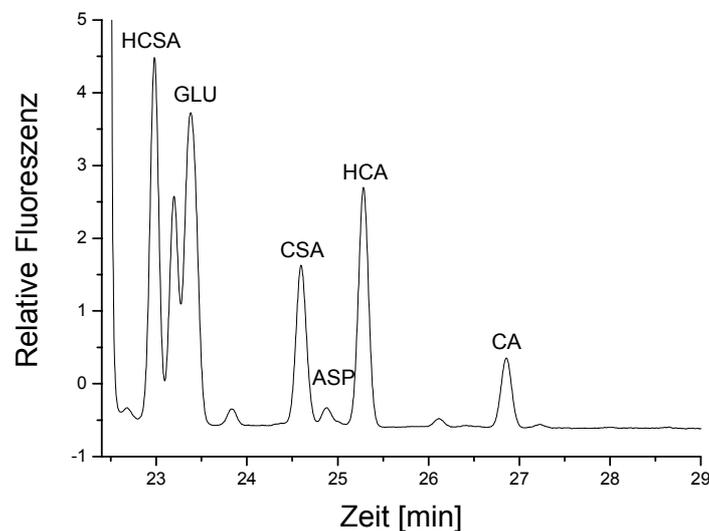


Abb. 3-9: Elektropherogramm einer Liquorprobe, gespikt mit SEAA (3 μM).

3.1.5.2 Wiederfindung im Liquor

Die Wiederfindung im Vergleich zu 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9) wurde anhand einer Liquormischung, die mit sechs verschiedenen Konzentrationen der SEAA (Tab. 3-2) versetzt wurde, bestimmt. Die prozentuale Wiederfindung (W) wurde nach Gl. 2-9 berechnet.

Die mittlere Wiederfindungsrate ($n = 3$) bezüglich der sechs untersuchten SEAA-Konzentrationen lag zwischen 92,6 (HCA, 10 μM) und 106,6 % (CA, 20 μM), die absolute Abweichung (von 100 %) betrug somit in allen Fällen weniger als 7,4 %. Konzentrationsabhängige Effekte konnten nicht beobachtet werden. Die Gesamtwiederfindungsrate (\bar{W}) betrug für HCSA 98,0 %, für CSA 97,7 %, für HCA 97,0 % und für CA 102,9 % (s. Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Wiederfindungsraten (W) der SEAA unter Verwendung von Liquor als Probenmatrix ($n = 3$).

C _{zugesetzt} [μM]	W (HCSA) [%]	W (CSA) [%]	W (HCA) [%]	W (CA) [%]
100	99,0 (98,1-101,7)	101,9 (101,2-104,1)	98,3 (95,6-101,3)	104,6 (99,2-106,0)
50	102,2 (88,2-110,0)	102,5 (89,1-110,6)	99,5 (89,6-109,6)	103,9 (99,2-106,6)
20	95,4 (94,4-96,6)	94,8 (86,3-105,0)	97,2 (93,2-99,5)	106,6 (102,0-110,6)
10	93,8 (89,5-101,4)	93,8 (86,5-101,9)	92,6 (87,5-95,8)	102,7 (97,9-106,3)
3	98,8 (95,2-104,0)	93,2 (88,8-101,1)	95,8 (94,8-97,6)	104,1 (99,6-107,7)
1	98,9 (94,0-107,5)	99,8 (93,3-107,4)	98,9 (96,7-101,1)	95,5 (92,3-97,5)
\bar{W}^* [%]	98,0	97,7	97,0	102,9
s	6,3	7,8	4,8	5,0
VK [%]	6,5	8,0	5,0	4,9

* Gesamtwiederfindungsrate ($n = 18$)

Die Versuche zur Wiederfindung verdeutlichen, dass 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9) ein geeignetes Medium zur Kalibrierung ist.

3.1.5.3 Linearität

Da die Ergebnisse der Wiederfindung zeigten, dass sich Puffer zur Kalibrierung eignet, wurden die Untersuchungen zur Linearität unter Verwendung von 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9) durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden (Arbeitsbereich 1-100 μM , sechs Standards) ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-3 zusammengefasst.

Tab. 3-3: Korrelationskoeffizienten (r) und Residuen der Kalibriergeraden der SEAA in Abhängigkeit vom verwendeten Regressionsmodell.

	HCSA	CSA	HCA	CA
linear (ungewichtet)				
\bar{r}^*	0,99958	0,99953	0,99958	0,99937
Residuen (n = 36)				
Spannweite [%]	-390,9-85,1	-12,6-29,0	-22,5-1104,5	-677,6-3124,2
Mittelwert [#] [%]	50,0	5,9	56,4	167,3
linear (Wichtung 1/x)				
\bar{r}^*		0,99916	0,99908	0,99838
Residuen (n = 36)				
Spannweite [%]	-14,5-34,3	-13,4-11,9	-15,0-22,1	-17,9-40,1
Mittelwert [#] [%]	6,5	3,6	6,9	11,0
linear (Wichtung 1/x²)				
\bar{r}^*	0,99801	0,99777	0,99691	0,99457
Residuen (n = 36)				
Spannweite [%]	-13,2-8,6	-12,8-13,0	-10,1-9,4	-13,9-12,9
Mittelwert [#] [%]	4,6	3,6	5,4	7,6

* Mittelwert des Korrelationskoeffizienten, Berechnung nach Gl. 2-16 bzw. Gl. 2-17 (n = 6)

Die Mittelwerte wurden nach Betragsbildung berechnet

Da Homoskedastizität, Varianzenhomogenität der Messwerte, bei großen Arbeitsbereichen (> Faktor 10) in aller Regel nicht gegeben ist, empfiehlt es sich,

eine Wichtung vorzunehmen, um einen zu starken Einfluss der hohen Messwerte auf die Regression zu vermeiden¹⁷². Die beste Anpassung wurde durch eine lineare Regression (gewichtet $1/x^2$) gefunden. Bei diesem Modell lagen die Residuen zwischen -13,9 und 13,0 %, die Mittelwerte ($n = 36$) zwischen 3,6 und 7,6 %. Ausreißer (Residuen > 15 %, LLOQ > 20 %) wurden unter Verwendung dieses Modells nicht gefunden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde dieses Modell zur Quantifizierung der SEAA gewählt.

Die Abb. 3-10 zeigt eine charakteristische Kalibriergerade (HCSA), die durch eine lineare Regression (gewichtet $1/x^2$) erhalten wurde.

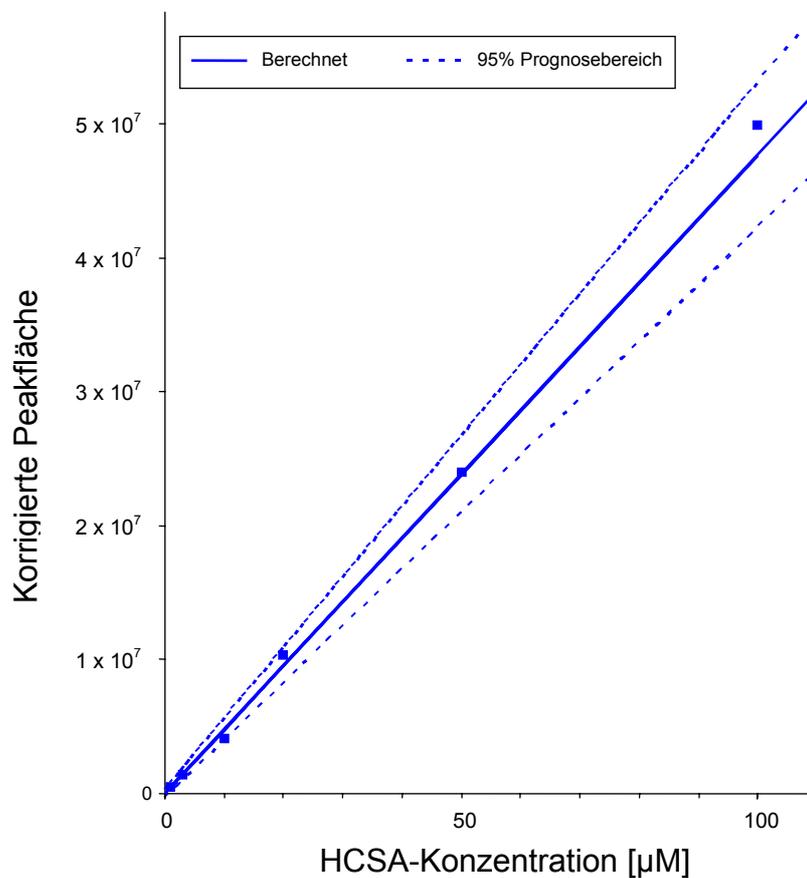


Abb. 3-10: Charakteristische Kalibriergerade der Aminosäure HCSA, Wichtung $1/x^2$.

3.1.5.4 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Als Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLOQ) wurde für alle SEAA eine Konzentration von 1 μM ermittelt. Die Tab. 3-4 zeigt die Daten zur Präzision und Richtigkeit bezüglich des LLOQ. Sie demonstrieren, dass das jeweilige LLOQ mit hinreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden konnte.

Die Nachweisgrenze (LOD) der vier SEAA wurden anhand von drei unterschiedlichen Liquores, die mit den SEAA gespikkt wurden (Endkonzentration 1 μM), bestimmt. Pro Liquor wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die ermittelten LODs lagen im unteren nanomolaren Bereich und waren vergleichbar mit den LODs, die im Rahmen der Methodenentwicklung mit einem anderen Trennpuffer bestimmt wurden (s. Kap. 3.1.3).

Tab. 3-4: LLOQ inklusive Daten zur Präzision und Richtigkeit sowie LODs der vier SEAA.

	HCSA	CSA	HCA	CA
LLOQ [μM] (n = 5)	1,0	1,0	1,0	1,0
Präzision, VK [%]	11,3	11,5	9,1	10,2
Richtigkeit [%]	106,2	102,2	104,4	107,0
LOD [nM] (n = 6)	5,7	13,6	9,1	33,3

3.1.5.5 Präzision und Richtigkeit

Injektionspräzision

Die Injektionspräzision wurde ermittelt, indem dieselbe Probe sechsmal hintereinander injiziert wurde. Sie wurde für drei verschiedene Konzentrationen der SEAA untersucht. Tab. 3-5 zeigt, dass die Variationskoeffizienten der Injektionspräzision für die höheren Konzentrationen (90 und 50 μM) durchweg unter 2 % liegen. Etwas weniger präzise war die Bestimmung der korrigierten Peakfläche der niedrig konzentrierten Probe (3 μM).

Tab. 3-5: Injektionspräzision der entwickelten Methode (n = 6).

Konzentration [μM] (Puffer)	Injektionspräzision, VK [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
90	0,28	0,53	0,47	0,71
50	1,45	1,79	1,18	1,60
3	1,85	1,95	2,35	5,79

Within-day-Präzision

Die Within-day-Präzision wurde sowohl unter Verwendung von Puffer als auch unter Verwendung von Liquor als Matrix untersucht. Der Tab. 3-6 sind die jeweiligen Variationskoeffizienten zu entnehmen.

Tab. 3-6: Within-day-Präzision der entwickelten Methode (n = 5).

Konzentration [μM] (Puffer)	Within-day-Präzision, VK [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
90	3,8	3,6	4,3	4,0
50	2,4	2,2	1,8	1,5
3	2,3	2,5	2,8	3,7

Konzentration [μM] (Liquor)	Within-day-Präzision, VK [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
90	6,2	6,7	7,2	7,8
3	2,5	2,9	2,9	4,3

Alle ermittelten Variationskoeffizienten lagen unter 8 %. Die Ergebnisse zeigen, dass Liquor die Präzision der Methode nur unwesentlich beeinflusst.

Between-day-Präzision

Die Between-day-Präzision gilt als Kriterium der Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum. Die berechneten Variationskoeffizienten der Between-day-Präzision sind in Tab. 3-7 aufgeführt. Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen zur Within-day-Präzision vergleichbar. Erwartungsgemäß war die Streuung der Messergebnisse im Rahmen der Between-day-Präzision etwas größer.

Tab. 3-7: *Between-day-Präzision der entwickelten Methode (n = 5).*

Konzentration [μM] (Puffer)	Between-day-Präzision, VK [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
90	3,1	3,0	2,4	5,0
50	5,1	4,8	8,3	8,7
3	4,5	5,7	11,5	11,6

Konzentration [μM] (Liquor)	Between-day-Präzision, VK [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
90	3,1	3,4	4,9	2,8
3	7,3	5,3	13,7	9,9

Richtigkeit

Zur Untersuchung der Richtigkeit wurden drei QC-Proben (90, 50 und 3 μM) an fünf aufeinander folgenden Tagen vermessen. Die Richtigkeit wurde nach Gl. 2-8 berechnet. In der folgenden Tab. 3-8 sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 3-8: *Richtigkeit der Methode (n = 5).*

Konzentration [μM] (Puffer)	Richtigkeit [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
90	103,7	99,9	93,6	93,3
50	107,3	102,3	98,6	95,8
3	97,5	97,5	103,1	96,7

Die berechneten Konzentrationen wichen in allen Fällen um weniger als $\pm 8\%$ von den Nominalwerten ab.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Methode hinsichtlich Präzision und Richtigkeit die Akzeptanzkriterien der FDA, wonach Variationskoeffizient und relativer Fehler nicht größer als 15 % sein dürfen, erfüllt¹⁷¹.

3.1.5.6 Stabilitätsuntersuchungen

Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität der SEAA in der Stammlösung

Initial wurde die Einfrier-Auftau-Stabilität der SEAA in der Stammlösung (Lösungsmittel: 0,1 M Boratpuffer, pH 8,9) untersucht. Diese Untersuchung erfolgte, um den Einfluss extremer Temperaturschwankungen von -24 °C (Tiefkühlfach) bis 25 °C (Raumtemperatur) zu überprüfen. Die Stabilität wurde nach einem, zwei bzw. drei Einfrier-Auftau-Zyklen nach Gl. 2-10 berechnet. Als Referenz diente jeweils eine frisch hergestellte Lösung, die die SEAA in der gleichen Konzentration enthielt.

Tab. 3-9: Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität der SEAA in der Stammlösung (Konzentration der SEAA: 1 mM jeweils).

Zyklus	Einfrier-Auftau-Stabilität [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
1	97,8	96,4	96,4	94,7
2	98,1	96,4	96,4	97,0
3	96,5	95,2	95,2	95,7
Zeitdauer [Monate]	Langzeitstabilität [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
7	97,9	99,0	98,8	98,6

Die Ergebnisse der Tab. 3-9 zeigen, dass sowohl wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen als auch eine Zeitspanne von sieben Monaten keinen relevanten Einfluss auf die Stabilität der SEAA in der Stammlösung haben.

Stabilität der SEAA in der Arbeitslösung

Die Stabilität der SEAA in der Arbeitslösung (Konzentration der SEAA 0,1 mM jeweils, Lösungsmittel 0,1 M Boratpuffer, pH 8,9), die bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde, wurde nach 2, 4, 6 und 8 Stunden untersucht. Tab. 3-10 legt dar, dass die Stabilität der Sulfin-, als auch die der Sulfonsäuren bis zu 8 Stunden gewährleistet ist. Die prozentualen Abweichungen vom Wert 100 % bewegen sich im Rahmen der Messpräzision (vgl. Tab. 3-6).

Tab. 3-10: Stabilität der SEAA in der Arbeitslösung, gelagert bei Raumtemperatur (Konzentration der SEAA: 0,1 mM jeweils).

Zeitdauer [h]	Stabilität der SEAA in der AL [%]			
	HCSA	CSA	HCA	CA
2	99,8	102,3	103,1	103,5
4	96,5	96,7	101,5	100,5
6	103,1	102,6	104,4	102,9
8	101,1	100,8	103,2	102,8

Stabilität der SEAA im Liquor

Die Stabilität der SEAA im Liquor, aufbewahrt bei Raumtemperatur, wurde anhand einer Mischung fünf verschiedener Liquores, welche mit den SEAA aufgestockt wurde (Endkonzentration im Liquor: 3 bzw. 90 μM) nach einer Lagerungszeit von 9 Stunden untersucht. Diese Untersuchung erfolgte, um zu prüfen, ob eine zwischenzeitliche Lagerung der Liquorproben bei Raumtemperatur eine Veränderung der SEAA-Konzentrationen nach sich zieht (z.B. durch Adsorptionsphänomene, Proteinbindung oder Oxidationsreaktionen). Tab. 3-11 ist zu entnehmen, dass nach einer neunstündigen Lagerungszeit die berechnete prozentuale Stabilität im Bereich von 92,9 % (CA, 3 μM) bis 105,5 % (CSA, 90 μM) lag. Eine zwischenzeitliche Aufbewahrung der Liquorproben bei Raumtemperatur hat somit keine relevante Veränderung der Konzentrationen zur Folge.

Tab. 3-11: Stabilität [%] der SEAA im Liquor.

Zeitdauer [h]	Stabilität der SEAA in Liquor [%]							
	HCSA		CSA		HCA		CA	
	90 μM	3 μM	90 μM	3 μM	90 μM	3 μM	90 μM	3 μM
3,5	108,1	102,8	102,5	102,4	108,3	102,2	106,5	102,2
6	109,5	104,5	106,5	108,9	107,5	104,0	108,9	99,9
9	104,6	97,1	104,6	105,5	104,3	95,7	104,4	92,9

Stabilität der derivatisierten SEAA in der Messprobe

Zusätzlich wurde die Stabilität der derivatisierten SEAA in der Messprobe, aufbewahrt bei Raumtemperatur im Autosampler des CE-Systems, über einen Zeitraum von ca. 10,8 Stunden untersucht (s. Tab. 3-12).

Tab. 3-12: Stabilität der SEAA-Derivate in der Messprobe, gelagert bei Raumtemperatur im Autosampler des CE-Systems.

Zeitdauer [h]	Stabilität der SEAA-Derivate [%]							
	HCSA		CSA		HCA		CA	
	90 µM	3 µM	90 µM	3 µM	90 µM	3 µM	90 µM	3 µM
0,6	99,9	103,0	100,1	100,1	100,3	100,7	100,4	100,2
2,5	96,0	98,9	96,7	97,9	97,5	99,1	96,9	98,9
5,1	94,0	100,0	96,0	97,9	96,9	98,9	96,4	98,5
8,2	96,4	98,8	98,3	95,5	101,9	96,9	100,8	96,6
10,8	97,9	99,4	99,8	95,6	100,2	97,9	98,5	96,7

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Stabilität der Derivatisierungsprodukte über einen Zeitraum von 10,8 Stunden gewährleistet ist.

Aufgrund dieser Stabilitätsdaten konnten somit bis zu 18 Messproben gleichzeitig hergestellt und nacheinander vermessen werden.

3.2 HPLC-Methode zur Bestimmung von Cystein, Homocystein und Glutathion im Liquor

3.2.1 Methodenentwicklung/-optimierung

Optimierung der chromatographischen Trennung

Die Trennung der Analyten wurde durch schrittweises Abändern der Zusammensetzung der mobilen Phase optimiert, die sich aus Acetonitril und 0,1 M Phosphatpuffer (pH 2,0) zusammensetzte. Von einer pH-Wert gesteuerten Trennung wurde abgesehen, da die Fluoreszenzintensität der Benzofurazanderivate bei pH 2,0 maximal ist.

Die isokratische Elution mit 10 % Acetonitril und 90 % 0,1 M Phosphatpuffer (pH 2,0) führte bereits zu einer recht guten Auflösung der derivatisierten Thiole Cystein, Homocystein und Glutathion. Von Nachteil war allerdings, dass der zugesetzte interne Standard (N-Acetylcystein, NAC) erst nach ca. 23 Minuten eluiert wurde (siehe Abb. 3-11).

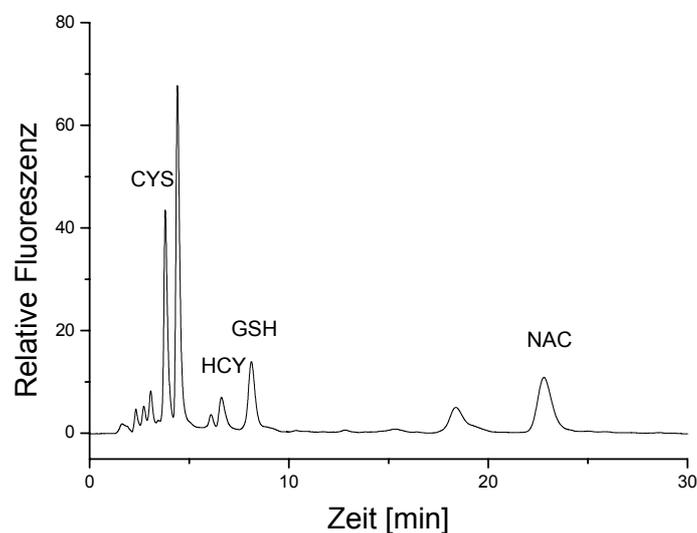


Abb. 3-11: Chromatogramm einer Liquorprobe, gespikt mit HCY (200 nM) und dem internen Standard NAC (1 μ M), nach Derivatisierung mit ABDF. Isokratische Elution (Acetonitril/0,1 M Phosphatpuffer, pH 2,0: 10/90, V/V).

Zur Verkürzung der Retentionszeit des internen Standards wurden insgesamt drei Gradientenprogramme (A-C) getestet, die den Acetonitrilanteil in der mobilen Phase von der 5. zur 13. Minute unterschiedlich stark erhöhten (siehe Tab. 2-5).

Die schnellste Elution des internen Standards – bei gleichzeitiger guter Auflösung aller interessierenden Analyten – konnte mit dem Gradientenprogramm C erreicht werden (s. Abb. 3-12 A und B).

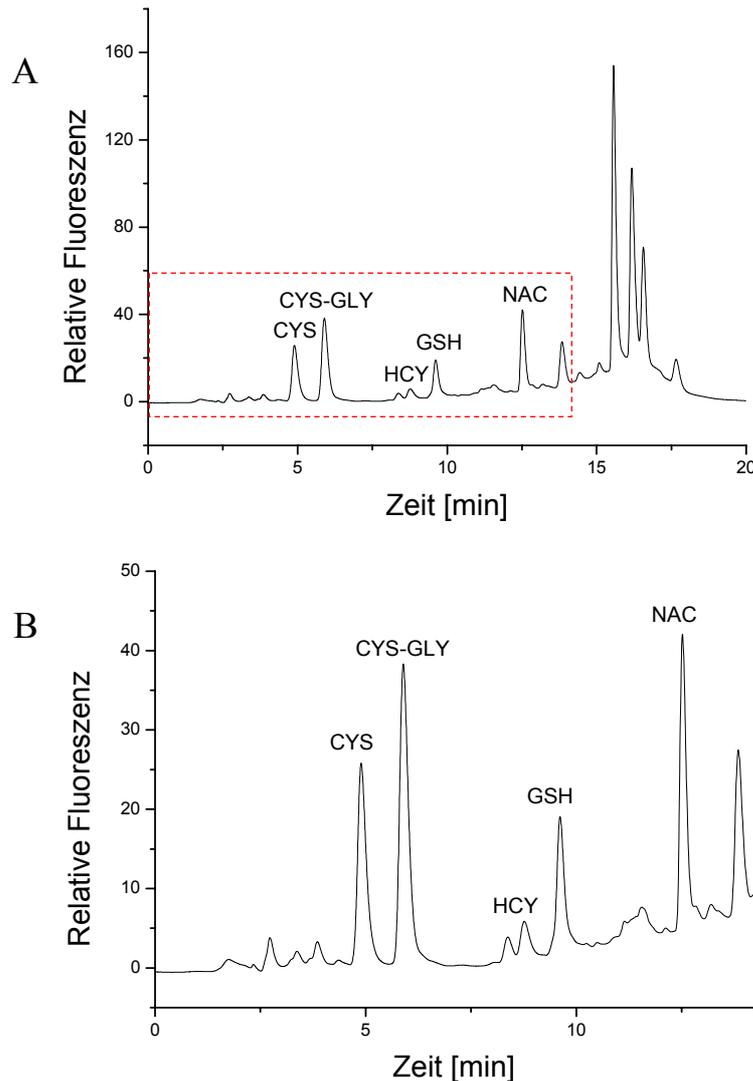


Abb. 3-12: A: Chromatogramm einer Liquorprobe, gespikt mit HCY (200 nM) und dem internen Standard NAC (1 μ M), nach Derivatisierung mit ABDF. Gradientenprogramm C (s. Tab. 2-5). B: Ausschnitt aus dem Chromatogramm aus Abbildung A (gestrichelter Kasten).

Ein weiterer Vorteil dieses Gradienten bestand darin, dass, bedingt durch den zeitweise recht hohen Acetonitrilanteil in der mobilen Phase, weitere lipophile Verbindungen von der Säule eluiert wurden (s. Abb. 3-12 A und Abb. 3-11). Somit konnte auf ein Spülen der Säule zwischen zwei Läufen verzichtet werden.

Optimierung der Derivatisierungsbedingungen

Da der optimale pH-Wert für die Derivatisierung von Thiolen mit ABDF bei 8,0 liegt, Liquor hingegen normalerweise einen pH-Wert von 7,4 besitzt und zudem über Puffersysteme verfügt, wurde untersucht, welches Mischungsverhältnis zwischen Liquor und Boratpuffer (0,1 M Borat, pH 8,0, 2 mM Na₂EDTA) zur maximalen Ausbeute der Derivatisierungsreaktion führt (s. Kapitel 2.3.3).

Vor diesem Hintergrund wurde der Anteil an Boratpuffer in der Messprobe (Liquor) sukzessive erhöht und – nach Derivatisierung mit ABDF – jeweils die Fläche der gebildeten Derivatisierungsprodukte ermittelt. Das Ergebnis dieser Untersuchung, exemplarisch mit dem Aminothiol Homocystein durchgeführt, zeigt Abb. 3-13.

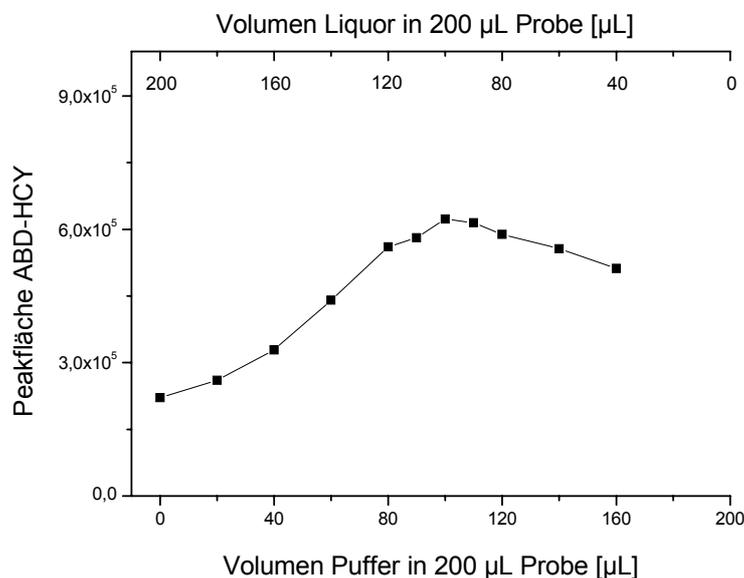


Abb. 3-13: Peakfläche des Homocystein-Derivates (ABD-HCY) in Abhängigkeit vom Volumenverhältnis Liquor zu Derivatisierungspuffer (bezogen auf 200 µL Messprobe).

Die Abbildung verdeutlicht, dass mit steigendem Anteil an Derivatisierungspuffer in der Probe größere Peakflächen für das Homocysteinderivat erhalten wurden. Bei gleichen Volumina von Liquor und Puffer (jeweils 100 µL) war die Ausbeute der Derivatisierungsreaktion maximal. Größere Pufferanteile führten, bedingt durch die Verdünnung der Messprobe, zu einer Abnahme der Peakfläche. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle Liquores vor der Derivatisierung mit ABDF 1:1 mit 0,1 M Boratpuffer verdünnt.

3.2.2 Validierung der HPLC-Methode

3.2.2.1 Selektivität

Die Selektivität der Methode konnte durch den Vergleich der Chromatogramme fünf verschiedener Liquorproben, die jeweils vor und nach Zugabe von Cystein, Homocystein, Glutathion und N-Acetylcystein aufgenommen wurden, demonstriert werden (s. Abb. 3-14).

Der Vergleich der Chromatogramme in Abb. 3-14 zeigt, dass sich durch das Aufstocken der Liquorprobe nur die Peakflächen der Aminothiole vergrößerten, der interne Standard NAC wurde nach ungefähr 12 min eluiert. In keiner der fünf untersuchten Liquorproben wurden störende Substanzen detektiert, d.h. die interessierenden Analyten konnten eindeutig identifiziert werden.

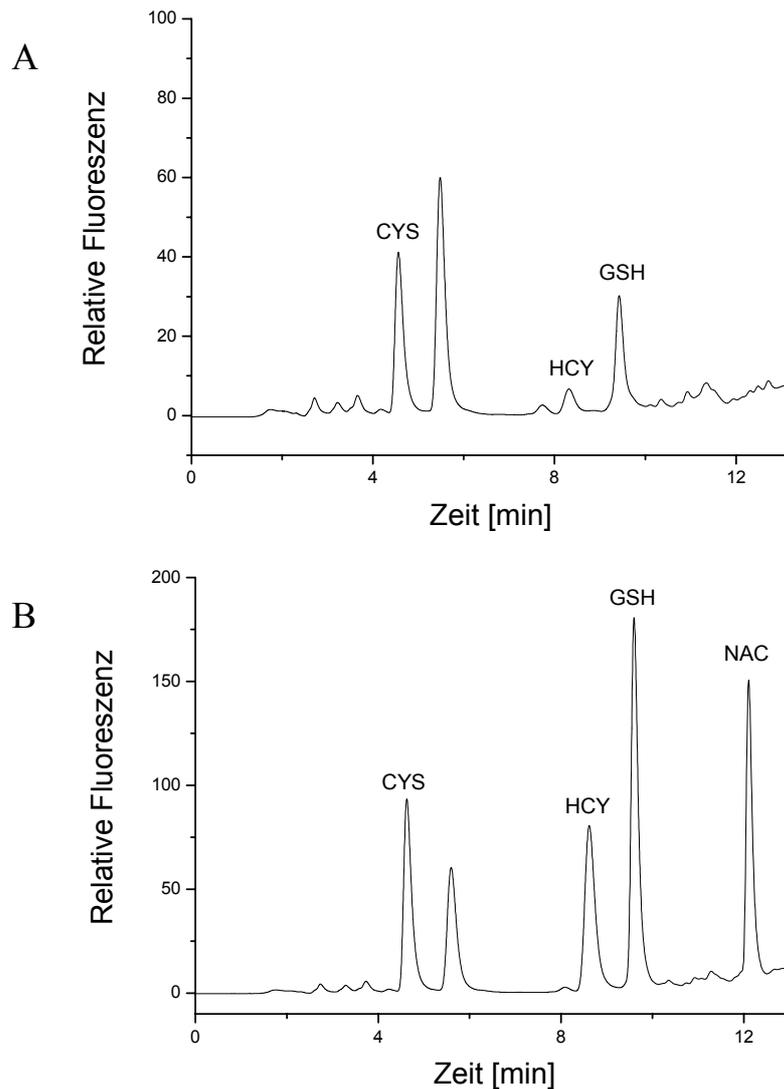


Abb. 3-14: A: Typisches Chromatogramm einer Liquorprobe ohne den internen Standard (NAC). B: Typisches Chromatogramm einer Liquorprobe, die zusätzlich mit CYS, HCY, GSH ($2 \mu\text{M}$) und NAC ($4 \mu\text{M}$) versetzt wurde.

3.2.2.2 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde anhand einer Mischung sechs verschiedener Liquores, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cystein, Homocystein und Glutathion bzw. dem internen Standard NAC gespickt wurden (s. Tab. 3-13), untersucht. Die zugesetzte Menge des internen Standards NAC (Endkonzentration $4 \mu\text{M}$) entsprach derjenigen Menge, die auch den Messproben jeweils zugesetzt wurde. Die jeweilige Wiederfindungsrate wurde nach Gl. 2-9 berechnet.

Tab. 3-13: Wiederfindungsraten (W) der Thiole CYS, HCY, GSH und NAC unter Verwendung von Liquor als Probenmatrix (n = 3).

C _{zugesezt} [nM]	W (CYS) [%]	W (HCY) [%]	W (GSH) [%]	W (NAC) [%]
200	97,4 (96,0-105,0)	102,7 (98,9-106,8)	99,0 (94,4-106,5)	---
600	104,3 (98,3-108,8)	98,6 (95,1-101,3)	99,2 (95,3-105,9)	---
1000	97,2 (91,2-103,7)	103,7 (98,7-108,5)	101,5 (92,3-103,5)	---
4000	---	---	---	103,7 (100,4-107,4)
\bar{W} * [%]	99,6	101,7	98,4	
s	6,5	4,3	5,4	
VK [%]	6,5	4,2	5,4	

* Gesamtwiederfindungsrate (n = 9)

Die Ergebnisse der Tab. 3-13 verdeutlichen, dass die Wiederfindung jeweils reproduzierbar war (die Variationskoeffizienten der Gesamtwiederfindungsrate (\bar{W}) lagen zwischen 4,2 und 6,5 %) und in keinem Fall wesentlich von 100 % abwich. Eine Kalibrierung in der Matrix Liquor war somit nicht von Nöten.

3.2.2.3 Linearität

Im Rahmen der Untersuchungen zur Linearität wurden sechs Kalibriergeraden (Arbeitsbereich 50-2000 nM, sechs Standards) ausgewertet, die Ergebnisse sind in Tab. 3-14 zusammengefasst.

Eine gute Anpassung wurde durch eine lineare Regression (gewichtet 1/x) gefunden. Im Vergleich zur ungewichteten Regression fielen die Spannweiten der Residuen wesentlich geringer aus; die gemittelten Residuen (nach Betragsbildung) lagen zwischen 2,6 (Glutathion) und 5,1 % (Homocystein), ein Indiz für die gute Anpassung.

Tab. 3-14: Korrelationskoeffizienten (r) und Residuen der Kalibriergeraden von CYS, HCY und GSH in Abhängigkeit vom verwendeten Regressionsmodell.

	CYS	HCY	GSH
linear (ungewichtet)			
\bar{r}^*		0,99944	0,99978
Residuen, n = 36			
Spannweite [%]	-20,6-84,8	-49,3-27,1	-17,1-61,4
Mittelwert [#] [%]	7,6	7,7	4,9
linear (Wichtung 1/x)			
\bar{r}^*	0,99951	0,99930	0,99977
Residuen, n = 36			
Spannweite [%]	-14,7-22,4	-16,4-10,5	-11,6-7,2
Mittelwert [#] [%]	3,8	5,1	2,6

* Mittelwert des Korrelationskoeffizienten, Berechnung nach Gl. 2-16 bzw. Gl. 2-17 (n = 6)

Die Mittelwerte wurden nach Betragbildung berechnet

Die Abb. 3-15 zeigt eine charakteristische Kalibriergerade, die durch eine lineare Regression (gewichtet 1/x) erhalten wurde.

Erweiterung des Arbeitsbereichs durch Verdünnung

Da insbesondere die Liquores älterer Lymphompatienten Cystein- und Glutathionkonzentrationen oberhalb der oberen Bestimmungsgrenze (ULOQ) aufwiesen, wurde überprüft, ob höher konzentrierte Proben nach Verdünnung mit 0,1 M Boratpuffer (pH 8,0) exakt quantifiziert werden können.

Vor diesem Hintergrund wurde die Cystein- bzw. Glutathionkonzentration in einer Liquormischung auf 10,0 μM eingestellt und nach einer 1:10-Verdünnung mit 0,1 M Boratpuffer (pH 8,0) die Konzentration an Cystein bzw. Glutathion in den verdünnten Proben durch eine Dreifachbestimmung ermittelt. Durch den Vergleich von berechneter Konzentration und Nominalkonzentration wurde der relative Fehler des Verfahrens berechnet.

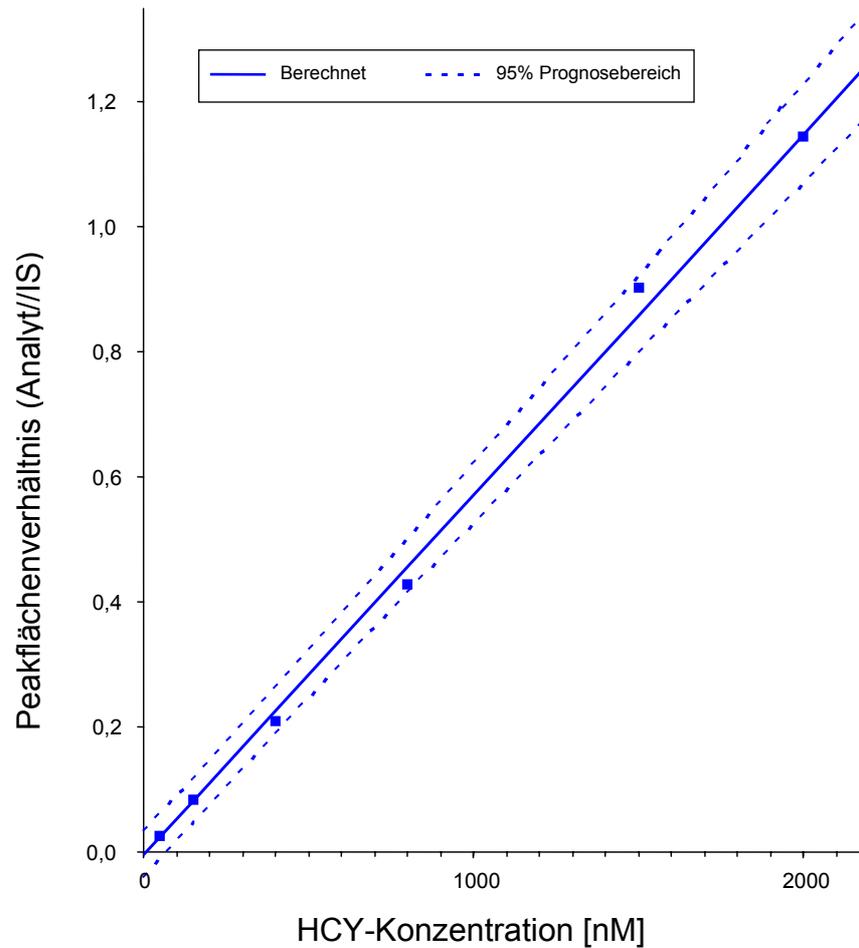


Abb. 3-15: Charakteristische Kalibriergerade der Aminosäure HCY, Wichtung $1/x$.

Die Tab. 3-15 zeigt, dass die berechneten Konzentrationen um 0,8 bzw. 1,3 % von der Nominalkonzentration abweichen. Somit konnten Cystein- und Glutathion bis zu einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ nach einer 1:10-Verdünnung mit 0,1 M Boratpuffer exakt bestimmt werden.

Tab. 3-15: Relativer Fehler (RE) der Bestimmung einer $10\ \mu\text{M}$ CYS- bzw. GSH-Konzentration ($n = 3$).

	c (Verdünnung) [nM]	c (Liquor) [nM]	c_{nom} [nM]	RE [%]
CYS	1008,2	10082	10000	0,8
GSH	987,3	9873	10000	-1,3

3.2.2.4 Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Die niedrigste Konzentration (LLOQ), die mit hinreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden konnte, betrug jeweils 50 nM. Der Tab. 3-16 sind die Daten zur Präzision und Richtigkeit bezüglich des LLOQ zu entnehmen.

Die Nachweisgrenze (LOD), ermittelt anhand eines Signal-Rausch-Verhältnisses von 3, lagen zwischen 1,2 und 3,8 nM (s. Tab. 3-16).

Tab. 3-16: Ermittelte LLOQs und LODs von CYS, HCY und GSH.

	CYS	HCY	GSH
LLOQ [nM] (n = 6)	50	50	50
Präzision, VK [%]	12,2	12,2	13,6
Richtigkeit [%]	103,5	106,9	105,6
LOD [nM] (n = 3)	3,8	1,9	1,2

3.2.2.5 Präzision und Richtigkeit

Within-day-Präzision

Die Within-day-Präzision wurde durch fünfmalige Bestimmung der QC-Proben ermittelt. Zusätzlich wurde eine Liquorprobe wiederholt analysiert, um zu untersuchen, ob die Matrix Liquor einen Einfluss auf die Präzision der Methode besitzt.

Tab. 3-17: Within-day-Präzision der HPLC-Methode (n = 5). Konzentrationen der Thiole im Liquor: CYS: 1828 nM, HCY: 326 nM, GSH: 1123 nM.

Konzentration [µM] (Puffer)	Within-day-Präzision, VK [%]		
	CYS	HCY	GSH
1800 nM	4,8	5,8	5,9
1000 nM	3,4	2,9	2,2
130 nM	11,4	5,3	5,0
Konzentration [µM] (Liquor)	Within-day-Präzision, VK [%]		
	CYS	HCY	GSH
siehe Legende	4,3	3,5	2,2

Die Ergebnisse der Tab. 3-17 verdeutlichen, dass die Analyten sowohl im Puffer als auch im Liquor mit hoher Präzision bestimmt werden können. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass der Messprobe ein interner Standard zugesetzt wurde. Bei Verzicht auf den internen Standard fiel die Präzision wesentlich schlechter aus und genügte teilweise nicht den gestellten Anforderungen.

Between-day-Präzision

Auch bei dieser Untersuchung wurde zusätzlich eine Liquorprobe analysiert. Die ermittelten Variationskoeffizienten zur Between-day-Präzision (s. Tab. 3-18) lagen durchweg alle unter 10 %.

Da die Liquorprobe zwischen den einzelnen Bestimmungen bei -20 °C eingelagert wurde, zeigt diese Untersuchung auch, dass wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen keinen negativen Einfluss auf die Stabilität der Analyten im Liquor haben.

Tab. 3-18: Between-day-Präzision der Methode (n = 5). Konzentrationen der Thiole im Liquor: CYS: 1752 nM, HCY: 133 nM, GSH: 461 nM.

Konzentration [μ M] (Puffer)	Between-day-Präzision, VK [%]		
	CYS	HCY	GSH
1800 nM	7,8	9,9	6,6
1000 nM	2,2	6,0	4,9
130 nM	8,7	9,5	9,2
Konzentration [μ M] (Liquor)	Between-day-Präzision, VK [%]		
siehe Legende	9,2	6,9	9,7

Richtigkeit

Die Prüfung auf Richtigkeit erfolgte an fünf Tagen für jeweils drei verschiedene Konzentrationen der Amino-thiole. Tab. 3-19 ist zu entnehmen, dass die Richtigkeit der HPLC-Methode den gestellten Anforderungen genügte, wonach die prozentuale Abweichung zwischen der berechneten Konzentration und der Nominalkonzentration maximal 15 % betragen darf.

Tab. 3-19: Richtigkeit der HPLC-Methode ($n = 5$).

Konzentration [μM] (Puffer)	Richtigkeit [%]		
	CYS	HCY	GSH
1800	92,8	98,0	98,7
1000	95,5	98,0	99,7
130	94,2	98,5	94,0

3.2.2.6 Stabilitätsuntersuchungen

Stabilität der Aminothiole im Liquor

Die Stabilität der Aminothiole im Liquor, welcher bei Raumtemperatur gelagert wurde, wurde exemplarisch an einer frisch aufgetauten Liquorprobe, über einen Zeitraum von 6 Stunden untersucht. Die berechnete prozentuale Stabilität (s. Tab. 3-20) verdeutlicht, dass eine zwischenzeitliche Lagerung der Liquorproben bei Raumtemperatur unproblematisch ist. Die Abweichungen vom Wert 100 % (maximale Stabilität) bewegen sich im Rahmen der Präzision der Methode (vgl. 3.2.2.5).

Es sei angemerkt, dass die Liquorproben kurz vor der Bestimmung mit einem Reduktionsmittel (TBP) behandelt wurden; somit ist nicht auszuschließen, dass während der sechsstündigen Lagerungszeit eine Oxidation der Thiolgruppe stattfand.

Tab. 3-20: Stabilität [%] von CYS (1828 nM), HCY (326 nM) und GSH (1123 nM) im Liquor.

Zeitdauer [h]	Stabilität in Liquor [%]		
	CYS	HCY	GSH
2	98,1	101,4	102,8
4	101,0	107,3	99,9
6	95,1	97,8	95,7

Stabilität der Aminothiole in der Messprobe

Die Stabilität der Aminothiole in der Messprobe, welche bei Raumtemperatur im Autosampler des HPLC-Systems gelagert wurde, wurde unter anderem untersucht, um zu klären, über welchen Zeitraum sich Sequenzen von Analysen im Voraus programmieren lassen. Die Untersuchung wurde unter Verwendung von Boratpuffer (0,1 M, pH 8,0) und Liquor als Matrix durchgeführt.

Tab. 3-21. Stabilität der Aminothiole in der Messprobe, gelagert bei Raumtemperatur. Konzentrationen der Thiole: Puffer: CYS, HCY u. GSH: 1000 nM jeweils, NAC 4000 nM; Liquor: CYS: 3699 nM, HCY: 237 nM, GSH: 437 nM, NAC: 4000 nM.

Zeitdauer [h]	Stabilität der Aminothiole [%] (Puffer)			
	CYS	HCY	GSH	NAC
3	100,5	98,1	96,4	95,7
7	101,6	97,4	87,9	92,0
10	102,9	108,3	95,2	96,8
Zeitdauer [h]	Stabilität der Aminothiole [%] (Liquor)			
	CYS	HCY	GSH	NAC
3	98,1	101,4	102,8	99,9
7	101,0	107,3	99,9	100,3
10	95,1	97,8	95,7	102,5

Die Daten der Tab. 3-21 zeigen, dass die Derivate über einen Zeitraum von zehn Stunden stabil sind. Das Vorhandensein von Liquor in der Messprobe (100 µL in insgesamt 240 µL Probe) hatte keinen negativen Effekt auf die Stabilität.

3.3 Ergebnisse der Teilvalidierung des FPIA

Die Ergebnisse, die im Rahmen der Teilvalidierung des Fluoreszenzpolarisations-Immunoassays erhoben wurden, sind in Tab. 3-22 zusammengefasst. Untersucht wurden die Validierungsparameter Präzision und Richtigkeit (s. Kapitel 2.4.5).

Tab. 3-22: Präzision und Richtigkeit der immunologischen Bestimmungsmethode (FPIA); $n = 5$.

c (HCY) [µM]	Within-day-Präzision	Between-day-Präzision	Richtigkeit [%]
	VK [%]	VK [%]	
7,0	4,5	3,1	101,2
12,5	1,1	1,6	100,2
25,0	1,9	4,2	105,1

Sowohl Präzision als auch Richtigkeit genügten in hohem Maße den gestellten Anforderungen an eine bioanalytische Methode¹⁷¹.

3.4 Einfluss von hochdosiertem MTX auf den Stoffwechsel des Homocysteins

Der Einfluss von hochdosiertem MTX auf den Stoffwechsel des Homocysteins wurde an zwei Kollektiven – pädiatrischen Patienten mit ALL und erwachsenen Patienten mit primären, zentralnervösen Lymphomen (PZNSL) – untersucht. Beide Kollektive wurden im Rahmen der Therapie nicht bestrahlt und bekamen MTX sowohl intravenös als auch intrathekal verabreicht.

3.4.1 Untersuchungen an pädiatrischen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (Studie „Total XV“)

Das Ziel der Studie „Total XV“, die voraussichtlich 2006 ausläuft¹⁸³, besteht unter anderem darin, zu evaluieren, ob als Homocystein Biomarker für die MTX-induzierte Neurotoxizität eingesetzt werden kann. Insgesamt sollen mehr als 1000 Patienten in diese Studie eingeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von jeweils 65 Patienten die Homocystein-konzentrationen im Plasma und Liquor untersucht. Die Liquorproben wurden zusätzlich auf Cystein und Glutathion untersucht. Auf die Bestimmung der exzitatorischen Metaboliten (CSA, CA, HCSA und HCA) im Liquor wurde verzichtet, da die Vorläuferstudie „Total XIV“, die an 53 Patienten durchgeführt wurde, offenbarte, dass keiner der vier Metaboliten 7 Tage nach HDMTX/ITMTX im Liquor der Patienten nachzuweisen war¹⁸³. Die Nachweisgrenze der eingesetzten HPLC-Methode betrug 5 nM. Eigene Untersuchungen, die an einem Kollektiv von 13 ALL-Patienten durchgeführt wurden, bestätigten dieses Ergebnis.

Homocysteinkonzentrationen im Plasma

Nachfolgend werden die Homocysteinkonzentrationen aller untersuchten Patienten (n = 65) dargestellt. Das mediane Alter der Patienten betrug 7,1 Jahre (1,0-18,3 Jahre). Die Bestimmung der Homocysteinkonzentration erfolgte, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, mit einem Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay der Firma Abbott. Insgesamt wurden 390 Plasmaproben analysiert. Abb. 3-16 zeigt die Homocysteinkonzentrationen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Therapie.

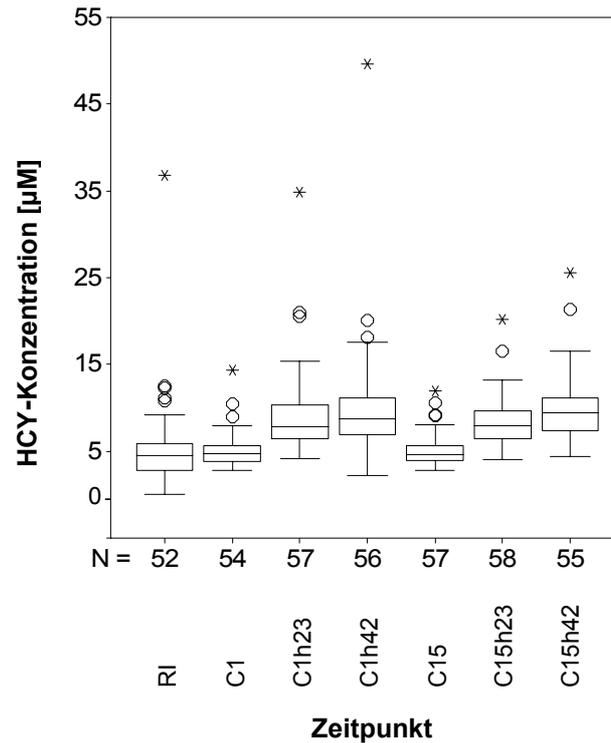


Abb. 3-16: Homocysteinkonzentrationen der ALL-Patienten im Verlauf der Therapie.

Die mediane Homocysteinkonzentration der ALL-Patienten vor der anti-neoplastischen Therapie (Tag 1 der Remission/Induktion) betrug 4,48 µM (s. Tab. 3-23). Eine Korrelation zwischen diesen Homocysteinkonzentrationen und dem Alter der Patienten bestand nicht ($p = 0,931$, Rangkorrelation nach Kendall).

Tab. 3-23: Homocysteinkonzentrationen (Mediane, Minima und Maxima) der ALL-Patienten, bestimmt zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie.

Zeitpunkt	n	HCY-Konzentration [µM]	Kolmogorov-Smirnov-Test
RI	52	4,48 (0,00-36,83)	$p < 0,001$
C1	54	4,68 (2,81-14,31)	$p < 0,001$
C1h23	57	7,83 (4,19-34,80)	$p < 0,001$
C1h42	56	8,73 (2,21-49,60)	$p < 0,001$
C15	57	4,61 (2,79-11,92)	$p < 0,001$
C15h23	58	7,90 (4,02-20,15)	$p = 0,082$
C15h42	55	9,40 (4,43-25,54)	$p = 0,005$

Fünf (Pat. 6, 13, 14, 60 und 63) der insgesamt 65 Patienten zeigten zu diesem Zeitpunkt erhöhte Homocysteinwerte im Plasma ($> 10 \mu\text{M}$), die sich interessanterweise nach der Remission/Induktion normalisierten.

Der Vergleich der HCY-Plasmakonzentrationen vor (C1 bzw. C15), sowie 23 Stunden nach (C1h23 bzw. C15h23) den MTX-Infusionen zeigt, dass MTX bereits nach 23 Stunden zu einer deutlichen Erhöhung des Homocysteins im Plasma führte, der Unterschied war jeweils höchstsignifikant ($p < 0,001$, Wilcoxon). Zu einem weiteren Anstieg der Homocysteinkonzentrationen kam es in den folgenden 19 Stunden (s. Tab. 3-24); die Homocysteinkonzentrationen der Proben, die 18 Stunden nach Ende der 24-stündigen MTX-Infusion gezogen wurden (C1h42 bzw. C15h42), waren im Vergleich zu den 23-Stunden-Konzentrationen signifikant höher ($p = 0,04$ bzw. $p < 0,001$, Wilcoxon) und ungefähr doppelt so hoch wie die Konzentrationen, die vor Verabreichung der MTX-Infusion bestimmt wurden (s. Tab. 3-24). Der Anstieg der Homocysteinkonzentrationen nach der ersten bzw. zweiten MTX-Infusion der Konsolidierung war vergleichbar (s. Abb. 3-16 bzw. Tab. 3-24).

Tab. 3-24: Vergleich der Homocysteinkonzentrationen, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie ermittelt wurden (Nicht-parametrische Testung).

Kollektive	Friedman-Test	Wilcoxon-Test
RI, C1, C1h23, C1h42, C15, C15h23, C15h42	$p < 0,001$ (n = 40)	
RI, C1, C15	$p = 0,397$ (n = 46)	
C1, C1h23		$p < 0,001$ (n = 54)
C1, C1h42		$p < 0,001$ (n = 52)
C1h23, C1h42		$p = 0,04$ (n = 55)
C15, C15h23		$p < 0,001$ (n = 54)
C15, C15h42		$p < 0,001$ (n = 52)
C15h23, C15h42		$p < 0,001$ (n = 52)

Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Homocysteinkonzentrationen des ersten Tages der Remission/Induktion (RI) und des 1. (C1) und 15. Tages (C15) der Konsolidierung festgestellt ($p = 0,397$, Friedman). Der Median der Konzentrationen zum Zeitpunkt C15 war mit dem Median der Konzentrationen zum Zeitpunkt C1 fast identisch ($4,61$ zu $4,68 \mu\text{M}$). Somit wiesen die Patienten 14 Tage nach HDMTX wieder normale Homocysteinwerte im Plasma auf.

Homocystein- und MTX-Konzentrationen im Plasma der Low-Risk- bzw. SHR-Patienten

Neben einer gemeinsamen Auswertung aller Patienten wurden LR- und SHR-Patienten auch getrennt voneinander untersucht, um den Effekt unterschiedlich hoch dosierter MTX-Infusionen beurteilen zu können (LR-Gruppe: $\sim 2,5 \text{ g/m}^2$, SHR-Gruppe: $\sim 5 \text{ g/m}^2$).

Hierzu wurde das gesamte Kollektiv in das Kollektiv der LR- und SHR-Patienten aufgeteilt und beide Gruppen getrennt voneinander ausgewertet.

Nachfolgend werden zuerst die MTX-Plasmakonzentrationen vorgestellt. Sie wurden im St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, USA) mit einem Fluoreszenzpolarisations-Immunoassay bestimmt.

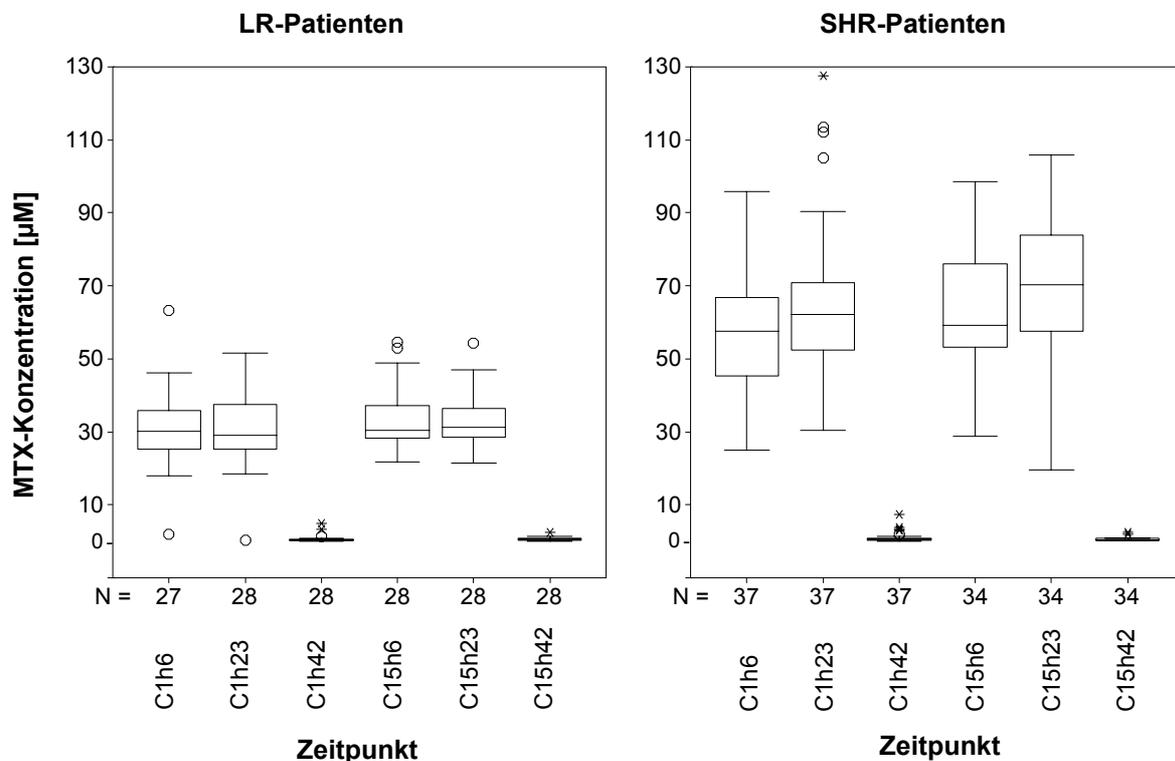


Abb. 3-17: MTX-Plasmakonzentrationen der LR- und SHR-Patienten, die jeweils 6, 23 und 42 Stunden nach Infusionsbeginn bestimmt wurden.

Abb. 3-17 ist zu entnehmen, dass die MTX-Zielkonzentrationen von 33 (LR-Gruppe) bzw. 65 µM (SHR-Gruppe) annähernd erreicht wurden. Bedingt durch die Infusionstechnik (10 % der gesamten Dosis wurden in der ersten Stunde, die

restlichen 90 % wurden in den verbleibenden 23 Stunden der MTX-Infusion verabreicht) wurde relativ rasch ein Steady-State-Zustand erreicht: die MTX-Konzentrationen, die sechs Stunden nach Infusionsbeginn bestimmt wurden, lagen in der gleichen Größenordnung wie die 23-Stunden-Werte (s. Tab. 3-25). Auffallend war jedoch, dass die MTX-Konzentrationen der SHR-Gruppe im Median von der 6. zur 23. Stunde leicht anstiegen und die Werte des SHR-Kollektivs insgesamt eine deutlich größere Streuung aufwiesen als die des LR-Kollektivs.

Tab. 3-25: MTX-Plasmakonzentrationen (Mittelwerte (\bar{x}), Mediane (\tilde{x}), Minima und Maxima) der LR- und SHR-Patienten, bestimmt 6, 23 und 42 Stunden nach Beginn der 24-stündigen MTX-Infusion.

Zeitpunkt	LR-Patienten, c (MTX) [μM]				SHR-Patienten, c (MTX) [μM]			
	\bar{x}	\tilde{x}	Spannweite	n	\bar{x}	\tilde{x}	Spannweite	n
C1h6	30,1	30,2	1,97-63,2	27	57,3	57,6	24,9-95,7	37
C1h23	30,6	29,4	0,36-51,5	28	64,5	62,2	30,4-127,5	37
C1h42	0,71	0,38	0,11-4,91	28	1,0	0,53	0,14-7,4	37
C15h6	33,6	30,6	21,6-54,6	28	63,6	59,2	28,9-98,6	34
C15h23	32,4	31,1	21,4-54,3	28	69,0	70,4	19,5-105,9	34
C15h42	0,59	0,46	0,14-2,56	28	0,61	0,44	0,18-2,56	34

Zwei Patienten der LR- (Pat. 2 und 13) und insgesamt sieben Patienten der SHR-Gruppe (Pat. 31, 34, 42, 44, 46, 57, 59 und 60) besaßen nach der ersten MTX-Infusion der Konsolidierung erhöhte MTX-Plasmakonzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$ 42 h nach Beginn der MTX-Infusion), die einen intensivierten Calciumfolinat-Rescue erforderten. Nach der zweiten MTX-Infusion, die am 15. Tag der Konsolidierung verabreicht wurde, wiesen drei Patienten der LR- (Pat. 10, 17 und 23) und nur noch zwei Patienten der SHR-Gruppe (Pat. 30 und 42) erhöhte MTX-Konzentrationen im Plasma auf ($> 1 \mu\text{M}$ 42 h nach Beginn der MTX-Infusion).

Die getrennte Darstellung der Homocysteinkonzentrationen der LR- bzw. SHR-Patienten zeigt Abb. 3-18. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sowohl in dem LR- als auch in dem SHR-Kollektiv die Verabreichung der 24-stündigen MTX-Infusion zu deutlich erhöhten HCY-Plasmakonzentrationen führte. Ein höchstsignifikanter Unterschied wurde bei beiden Kollektiven bereits nach den ersten 23 Stunden der Infusion festgestellt (s. Tab. 3-27).

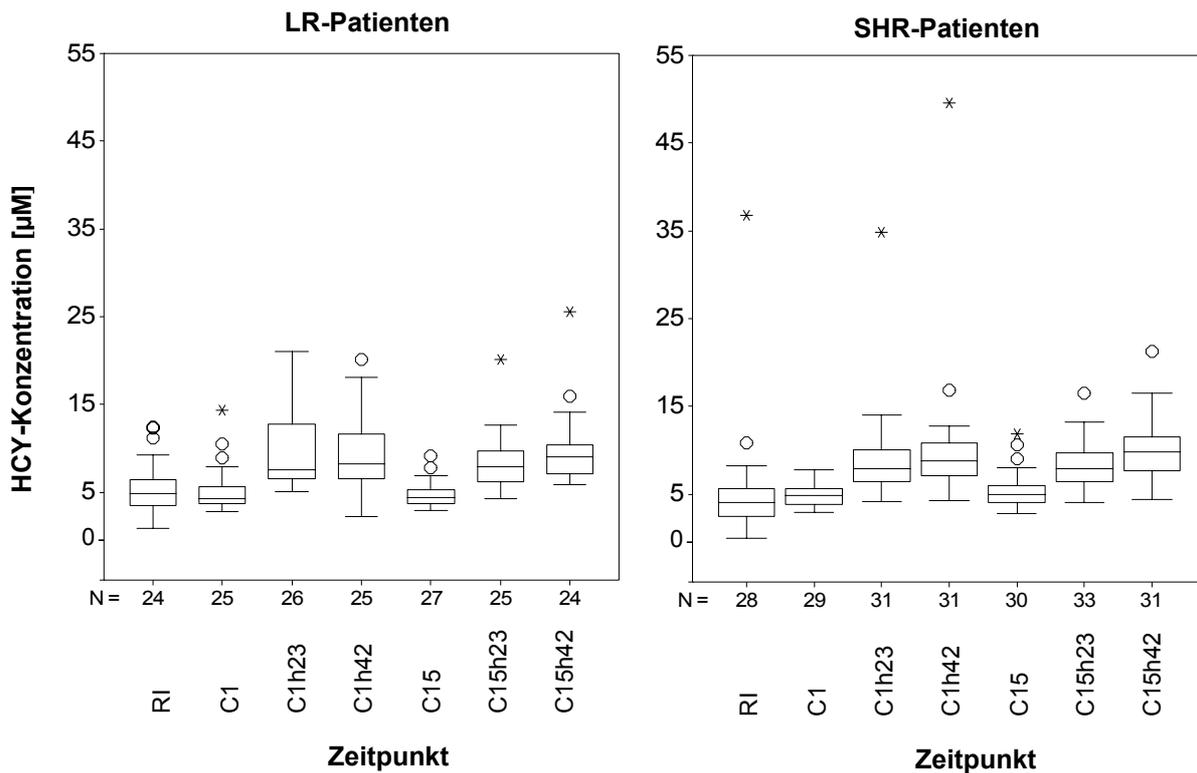


Abb. 3-18: Homocystein-Plasmakonzentrationen der LR- und SHR-Patienten im Verlauf der Therapie.

In beiden Patientengruppen waren die medianen Homocysteinkonzentrationen der Proben, die den Patienten 18 Stunden nach Beendigung der Infusion (C1h42 bzw. C15h42) entnommen wurden, höher als die Homocysteinkonzentrationen der Proben, die zur 23. Stunde der MTX-Infusion (C1h23 bzw. C15h23) gezogen wurden. Die höchste gemessene Homocysteinkonzentration betrug 49,57 µM (Patient 42, Zeitpunkt: C1h42). Tab. 3-26 liefert einen Überblick über die Homocysteinkonzentrationen beider Patientenkollektive.

Tab. 3-26: Homocysteinkonzentrationen (Mediane, Minima und Maxima) der LR- und SHR-Patienten, bestimmt zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie.

Zeitpunkt	LR-Patienten		SHR-Patienten	
	HCY-Konzentration [μM]	n	HCY-Konzentration [μM]	n
RI	4,85 (0,93-12,48)	24	4,05 (< 0,50-36,83)	28
C1	4,24 (2,80-14,30)	25	4,85 (2,90-7,80)	29
C1h23	7,57 (5,00-20,99)	26	7,90 (4,19-34,80)	31
C1h42	8,30 (2,21-20,13)	25	8,76 (4,31-49,60)	31
C15	4,41 (2,91-9,20)	27	4,93 (2,79-11,92)	30
C15h23	7,90 (4,20-20,15)	25	7,90 (4,02-16,50)	33
C15h42	9,09 (5,90-25,54)	24	9,79 (4,43-21,30)	31

Tab. 3-27: Vergleich der Homocysteinkonzentrationen innerhalb der Gruppe LR- bzw. SHR-Patienten (Nicht-parametrische Testung).

Kollektive	LR-Patienten		SHR-Patienten	
	Wilcoxon-Test	n	Wilcoxon-Test	n
C1, C1h23	$p < 0,001$	25	$p < 0,001$	29
C1, C1h42	$p < 0,001$	24	$p < 0,001$	28
C1h23, C1h42	$p = 0,716$	25	$p = 0,02$	30
C15, C15h23	$p < 0,001$	25	$p < 0,001$	29
C15, C15h42	$p < 0,001$	23	$p < 0,001$	29
C15h23, C15h42	$p = 0,014$	21	$p < 0,001$	30

Tab. 3-26 ist zu entnehmen, dass die Homocysteinkonzentrationen nach HDMTX in der SHR-Gruppe tendenziell etwas höher waren, als die der LR-Gruppe. Ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht (LR C1h42 und SHR C1h42: $p = 0,9002$, LR C15h42 und SHR C15h42 $p = 0,387$, Mann-Whitney-Test). Der mediane Anstieg der Homocysteinkonzentration – die Differenz zwischen den Homocysteinkonzentrationen 18 Stunden nach Beendigung der Infusion und den Homocysteinkonzentrationen vor Verabreichung der Infusion – betrug nach der 1. und 2. MTX-Infusion der Konsolidierung in der LR-Gruppe $3,71 \mu\text{M}$ ($n = 48$), in der SHR-Gruppe $4,14 \mu\text{M}$ ($n = 55$).

Korrelation zwischen MTX-Exposition und Homocysteinkonzentration

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen der MTX-Exposition und der gemessenen Homocysteinkonzentration, die 18 Stunden nach Ende der MTX-Infusion bestimmt wurde (C1h42 bzw. C15h42), bestand, wurde die AUC, die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, nach Gl. 2-12 berechnet. Die Gesamtclearance wurde aus den gemittelten Steady-State-Plasmakonzentrationen (6- und 42-Stunden-Werte) nach Gl. 2-11 ermittelt. Die folgende Abbildung verdeutlicht, dass sowohl die MTX-Clearance als auch die AUC bei beiden Patientenkollektiven relativ stark variierte.

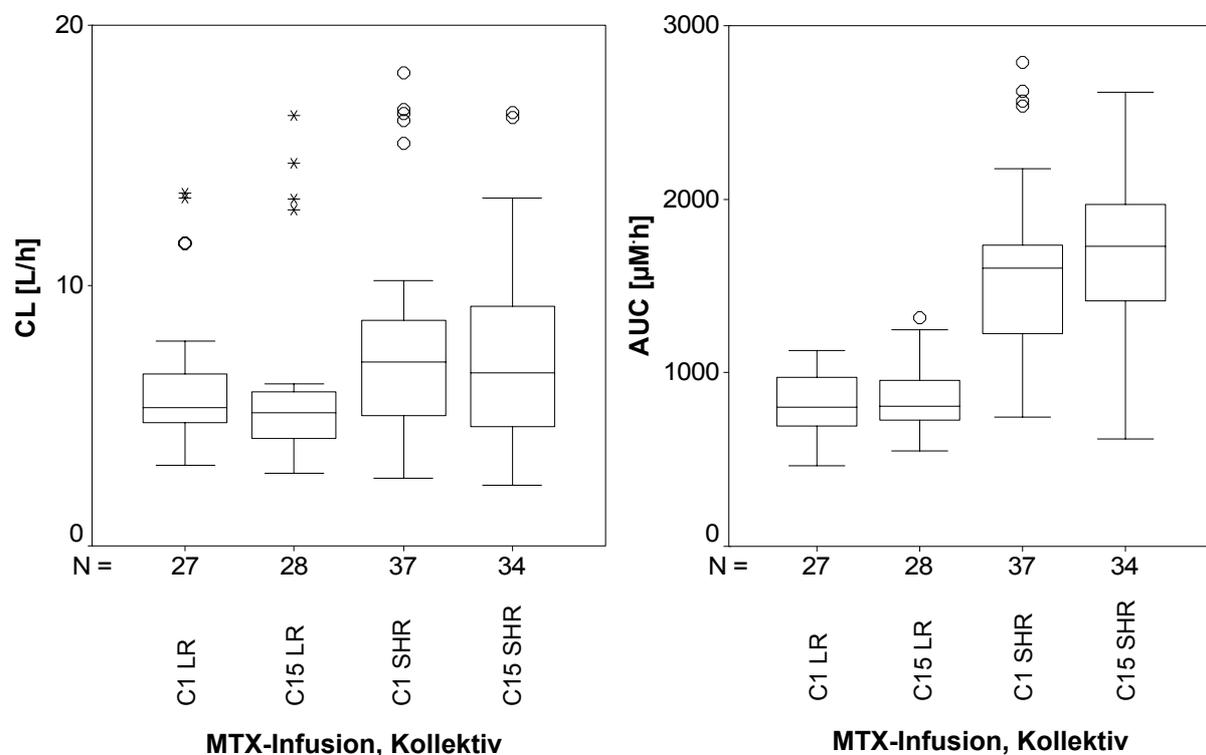


Abb. 3-19: MTX-Clearance der LR- bzw. SHR-Patienten und ermittelte AUCs nach der ersten (Zeitpunkt C1) und zweiten (Zeitpunkt C15) MTX-Infusion der Konsolidierung.

Die Gruppe der SHR-Patienten zeigte eine etwas höhere Clearance als das LR-Kollektiv – der Unterschied war allerdings nicht signifikant (p jeweils $> 0,05$, Mann-Whitney). Die mediane Clearance nach der ersten und zweiten MTX-Infusion betrug 5,32 und 5,13 L/h (LR-Kollektiv) bzw. 7,06 und 6,65 L/h (SHR-Kollektiv). Die Mediane

der AUCs (LR: 803,3 und 809 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, SHR: 1604,9 und 1729,8 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$) spiegeln wieder, dass der SHR-Gruppe eine doppelt so hohe Dosis an MTX verabreicht wurde wie der LR-Gruppe.

Für die Korrelationsanalyse wurden die Kollektive der LR- und SHR-Patienten zusammengefasst. Da eine Normalverteilung der Daten nicht vorlag, wurde eine Rangkorrelation nach Kendall durchgeführt. Abb. 3-20 zeigt, dass eine Korrelation zwischen der AUC von MTX und den Homocysteinkonzentrationen der Proben, die 18 Stunden nach Ende der MTX-Infusion gezogen wurden, nicht bestand ($r = 0,075$, $p = 0,247$, $n = 108$). Offensichtlich bedingten alle verabreichten hochdosierten MTX-Infusionen vergleichbar hohe Anstiege der Homocysteinkonzentration (vgl. hierzu auch Tab. 3-26).

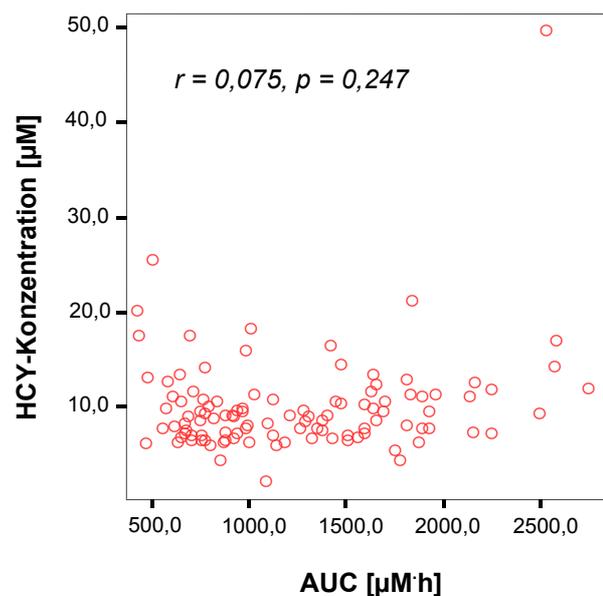


Abb. 3-20: Korrelation zwischen der AUC von MTX und der Homocysteinkonzentration ($n = 108$).

Homocysteinkonzentrationen im Liquor

Zur Bestimmung von Homocystein im Liquor wurde die in Kapitel 2.3 beschriebene HPLC-Methode verwendet. Die Bestimmungsgrenze der Methode lag bei 50 nM. Insgesamt wurden von 65 Patienten 190 Liquorproben, die zu vier verschiedenen Zeitpunkten der Therapie gezogen wurden, analysiert. Die ermittelten Homocysteinkonzentrationen im Liquor sind in Abb. 3-21 dargestellt.

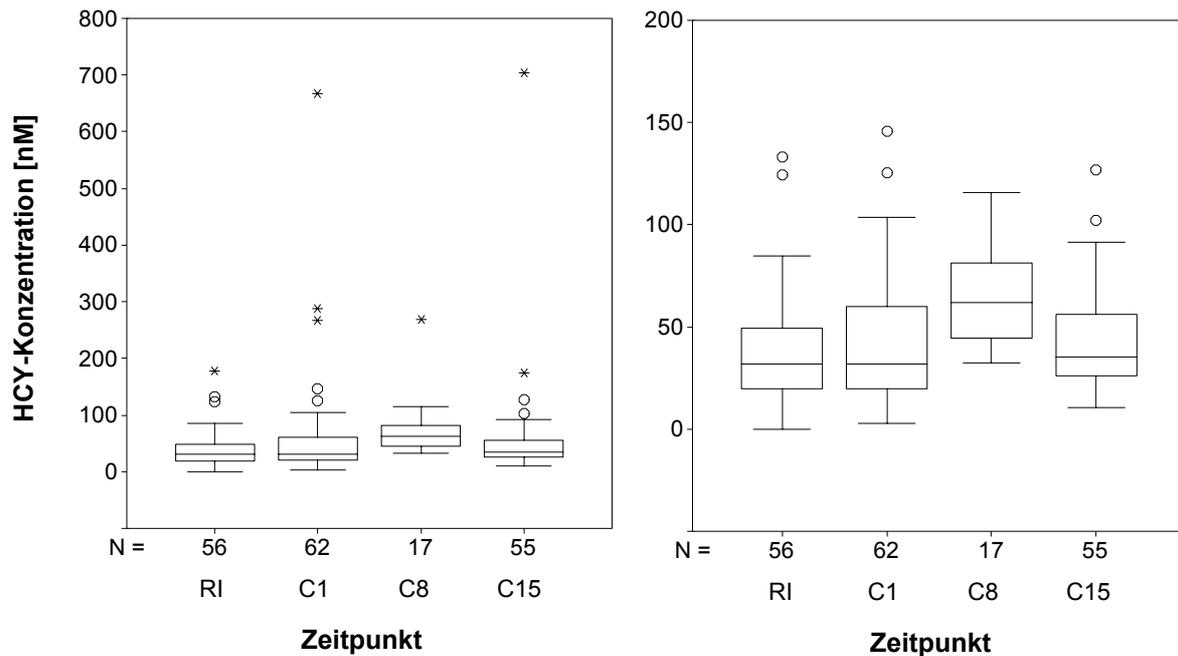


Abb. 3-21: Homocysteinkonzentrationen im Liquor der ALL-Patienten. Linke Abbildung: mit Extremwerten; rechte Abbildung: ohne Extremwerte. Die gestrichelte Linie der rechten Abbildung kennzeichnet das LLOQ (50 nM).

Aus Abb. 3-21 geht hervor, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten sehr niedrige Homocysteinkonzentrationen im Liquor bestimmt wurden. Ein Großteil der analysierten Proben besaß Homocysteinkonzentrationen, die unter der Bestimmungsgrenze von 50 nM lagen. Tendenziell am höchsten waren die Homocysteinkonzentrationen der Proben, die am achten Tag der Konsolidierung gezogen wurden (s. auch Tab. 3-28). Zu allen Probenentnahmezeitpunkten wurden vereinzelt extrem hohe Homocysteinkonzentrationen gefunden (Sternchen in Abb. 3-21). Die höchste Konzentration mit 704,5 nM wurde bei Patient 111, 14 Tage nach Verabreichung der ersten MTX-Infusion der Konsolidierung (C15), gefunden.

Mediane, Minima und Maxima der Homocysteinkonzentrationen sind in der folgenden Tab. 3-28 zusammengefasst. Die medianen Homocysteinkonzentrationen zum Zeitpunkt RI, C1 und C8 waren praktisch identisch. Somit lagen (spätestens) 14 Tage nach der Therapie mit MTX, welches intravenös und intrathekal verabreicht wurde, wieder normale Homocysteinkonzentrationen im Liquor vor.

Tab. 3-28: Homocysteinkonzentrationen (Mediane, Minima und Maxima) im Liquor der ALL-Patienten (LLOQ: 50 nM).

Zeitpunkt	n	HCY-Konzentration [nM]	Kolmogorov-Smirnov-Test
RI	56	~31,9 (0,0-178,3)	p = 0,001
C1	62	~31,9 (3,0-667,8)	p < 0,001
C8	17	~ 62,0 (32,5-268,0)	p < 0,001
C15	55	~35,3 (10,8-704,5)	p < 0,001

Zum Zeitpunkt RI bzw. C1 waren die medianen Homocysteinkonzentrationen im Liquor der ALL-Patienten (~31,9 nM jeweils) mehr als 100-mal niedriger als die Homocysteinkonzentrationen, die zum selben Zeitpunkt im Plasma bestimmt wurden (4,48 µM bzw. 4,68 µM). Auch bei der Untersuchung der Liquorproben wurde die Beobachtung gemacht, dass sich erhöhte Homocysteinwerte nach der Remission/Induktion normalisierten (s. Patient 67, 72 und 75, Anhang A).

Zum Vergleich der Homocysteinkonzentrationen wurde, da ein Großteil der Werte unter der Bestimmungsgrenze lag – und diese Werte folglich mit einem relativ großen Fehler behaftet sind – eine Transformation der Daten vorgenommen.

Tab. 3-29: Einteilung der Homocysteinkonzentration im Liquor in sieben Klassen.

Klasse	Klassenbreite (b) [nM]	Anzahl
1	$b < 50,0$	131
2	$50,0 \leq b < 60,0$	14
3	$60,0 \leq b < 70,0$	8
4	$70,0 \leq b < 80,0$	14
5	$80,0 \leq b < 90,0$	6
6	$90,0 \leq b < 100,0$	1
7	$b \geq 100,0$	16

Die ermittelten Homocysteinkonzentrationen wurden sieben Klassen zugeordnet, wobei der untersten Klasse 1 alle Werte zugeordnet wurden, die unter der Bestimmungsgrenze lagen (s. Tab. 3-29). Die intervallskalierten Daten wurden somit in Ordinaldaten umgewandelt. Der Vergleich der transformierten Homocysteinkonzentrationen offenbarte, dass zwischen den verschiedenen Therapiephasen kein signifikanter Unterschied bestand ($p = 0,771$, $n = 12$, Friedman-Test). Auch der Einzelvergleich der Konzentrationen zum Zeitpunkt C1 und C8 führte zu keinem signifikanten Unterschied ($p = 0,906$, $n = 17$, Wilcoxon). Eine Korrelation zwischen den Plasma- und (transformierten) Liquorkonzentrationen (Zeitpunkt RI, C1 und C14) konnte bei den 17 Patienten, von denen sowohl Liquor- als auch Plasmaproben zur Verfügung standen, nicht gefunden werden ($p = 0,484$, Rangkorrelation nach Kendall).

Cystein- und Glutathionkonzentrationen im Liquor

Die Konzentrationen an Cystein und Glutathion sind in Abb. 3-22 dargestellt. Sie ver-

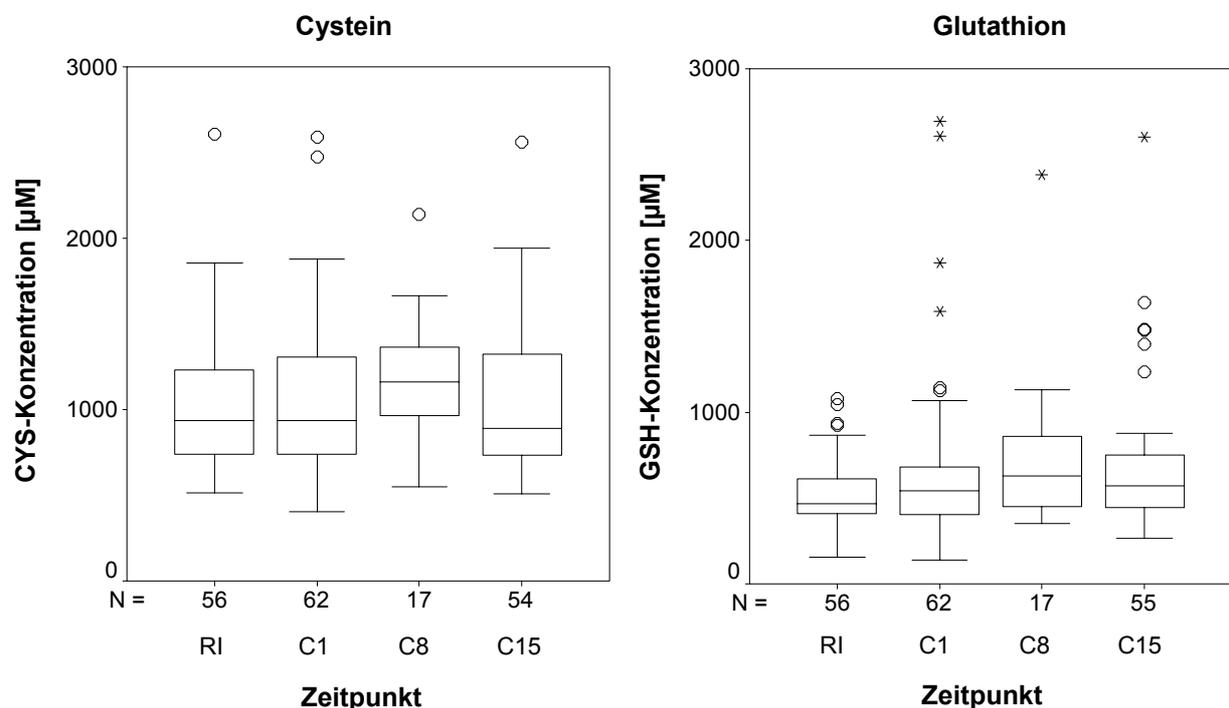


Abb. 3-22: CYS- und GSH-Konzentrationen (Liquor) zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie; aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in der linken Abbildung (CYS-Konzentrationen) die Extremwerte (insgesamt 11 Werte) nicht dargestellt.

deutlich, dass sich die Konzentrationen an Cystein und Glutathion im Verlauf der Therapie nur marginal unterschieden.

Auch die CYS- bzw. GSH-Konzentrationen waren am 8. Tag der Konsolidierung leicht erhöht (s. Tab. 3-30). Ein signifikanter Unterschied zu den Konzentrationen, die zum 1. Tag der Konsolidierung bestimmt wurden (Zeitpunkt C1) bestand nicht (CYS: C8/C1: $p = 0,463$, GSH: C8/C1: $p = 0,435$, Wilcoxon).

Tab. 3-30: CYS- und GSH-Konzentrationen im Liquor (Mediane, Minima und Maxima).

Kollektiv	Cystein- konzentration [μM]	n	Glutathion- konzentration [μM]	n
RI	937,5 (515,5-2992)	56	486,5 (157,7-1078)	56
C1	937,4 (405,0-52419)	62	542,7 (137,3-2696)	62
C8	1161,7 (548,3-19202)	17	627,0 (353,4-2380)	17
C15	887,5 (508,3-10864)	54	573,7 (264,5-2602)	55

Im Rahmen von Korrelationsanalysen wurde zwischen den (transformierten) Homocystein- und den Cysteinkonzentrationen ein geringer ($r = 0,316$, $p < 0,001$, $n = 189$, Rangkorrelation nach Kendall), zwischen den Homocystein- und den Glutathionkonzentrationen ein sehr geringer Zusammenhang ($r = 0,188$, $p = 0,001$, $n = 190$, Rangkorrelation nach Kendall) festgestellt.

Die individuelle Betrachtung der Thiolkonzentrationen ließ erkennen, dass all diejenigen Patienten, die extrem hohe Homocysteinkonzentrationen aufwiesen (Extremwerte der Boxplots in Abb. 3-21), auch extrem hohe Glutathion- und Cysteinkonzentrationen zeigten (Patienten 76, 85, 99, 105 und 111, s. Anhang B). Nur Patient 72 stellte diesbezüglich eine Ausnahme dar. Bei ihm wurde zu Beginn der Remission/Induktion eine deutlich erhöhte Homocysteinkonzentration festgestellt (178 nM), die sich im Verlauf der Therapie weitgehend normalisierte.

3.4.2 Untersuchungen an PZNSL-Patienten

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Schlegel (Neurologie des Universitätsklinikums Bonn) wurde ein Kollektiv von Patienten mit primären Lymphomen des zentralen Nervensystems untersucht. Diese Patientengruppe war äußerst interessant, da sie im Rahmen der zytoreduktiven Therapie intensiv mit MTX behandelt wurde (s. Tab. 2-19 in Kap. 2.5.2) und über das implantierte Ommaya-Reservoir in allen Therapieblöcken mehrere Liquorproben entnommen werden konnten (s. Abb. 2-13). Somit ließen sich MTX-induzierte Veränderungen im Metabolismus des Homocysteins über mehrere Tage hinweg verfolgen. Die (glücklicherweise) niedrige Inzidenz der Erkrankung bedingte, dass trotz einer mehr als zweijährigen Rekrutierungszeit (Juni 2001 und Oktober 2003) insgesamt nur vier Patienten in die Studie eingeschlossen werden konnten. Alle Liquorproben wurden auf Homocystein, Cystein und Glutathion, sowie die exzitatorischen Metaboliten des Homocysteins und Cysteins (SEAA) analysiert. Die Projektpartnerin Sandra Vezmar übernahm die Bestimmung von Methotrexat, N⁵-Methyl-THF, SAM und SAH.

Homocystein-, Cystein- und Glutathionkonzentrationen im Liquor der Lymphompatienten

In den folgenden vier Abbildungen (Abb. 3-23 bis Abb. 3-26) werden jeweils die Konzentrationen an Homocystein, Cystein und Glutathion im Liquor der vier Lymphompatienten vorgestellt. Verspätete Einschlüsse in die Studie (Patient 2 und Patient 3: Studienbeginn ab Tag BI3 bzw. BI2), Komplikationen während der Therapie (Patient 1: Auslassen des Blocks AII), Therapieabbrüche (Patient 3: Abbruch nach Block AII, Patient 4: Abbruch nach CI) und ein modifiziertes Protokoll für ältere Patienten bedingten, dass bei keinem der untersuchten Patienten alle sechs Therapieblöcke (AI bis CII) verfolgt werden konnten. Ferner konnte aus medizinischen Gründen nicht immer ausreichend viel Liquor entnommen werden, so dass teilweise nicht genügend Liquor für eine Untersuchung zur Verfügung stand (Patient 1: Proben AI2, CII6, Patient 2: Probe AII2, Patient 3: Probe AII2). Dennoch konnten von den vier PZNSL-Patienten insgesamt 63 Liquorproben gewonnen und analysiert werden.

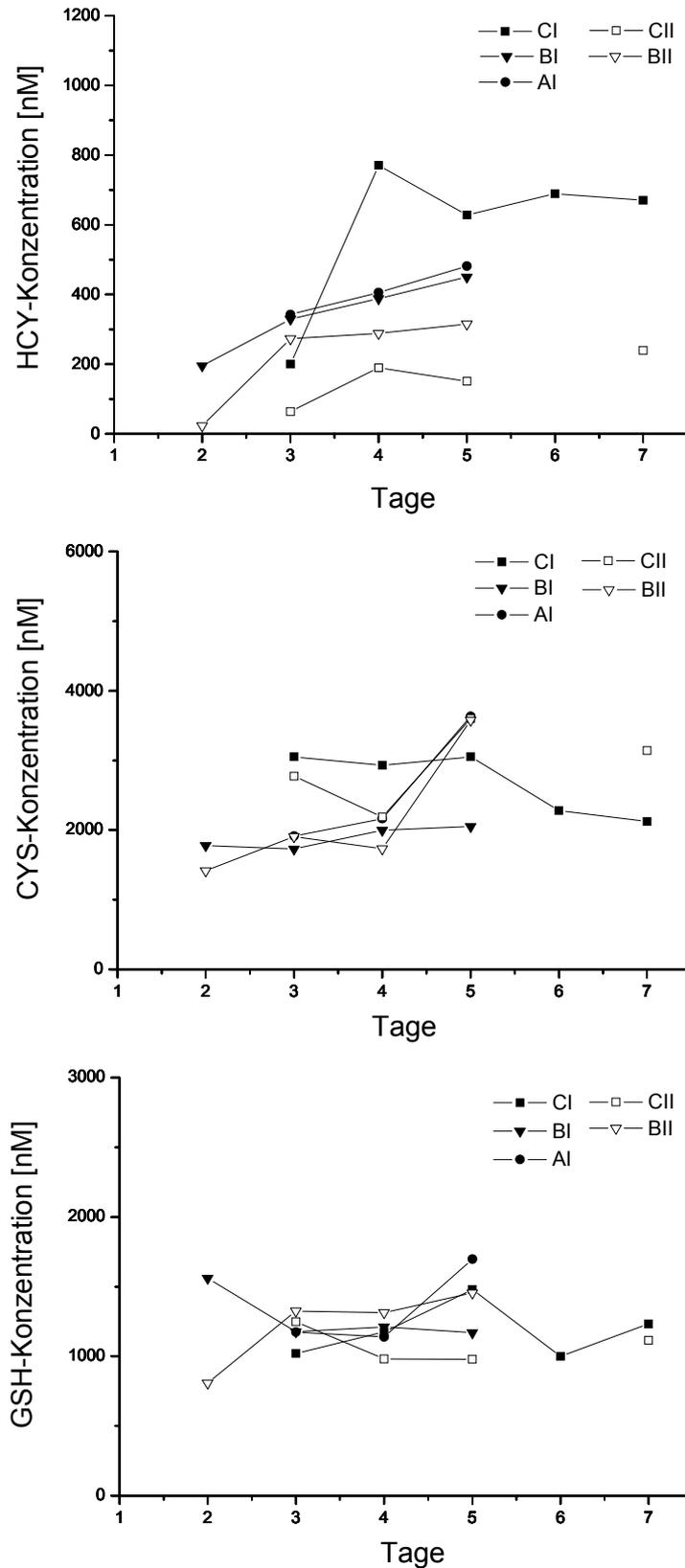


Abb. 3-23: Konzentrations-Zeit-Profile der Thiole HCY, CYS und GSH im Liquor des Patienten 1.

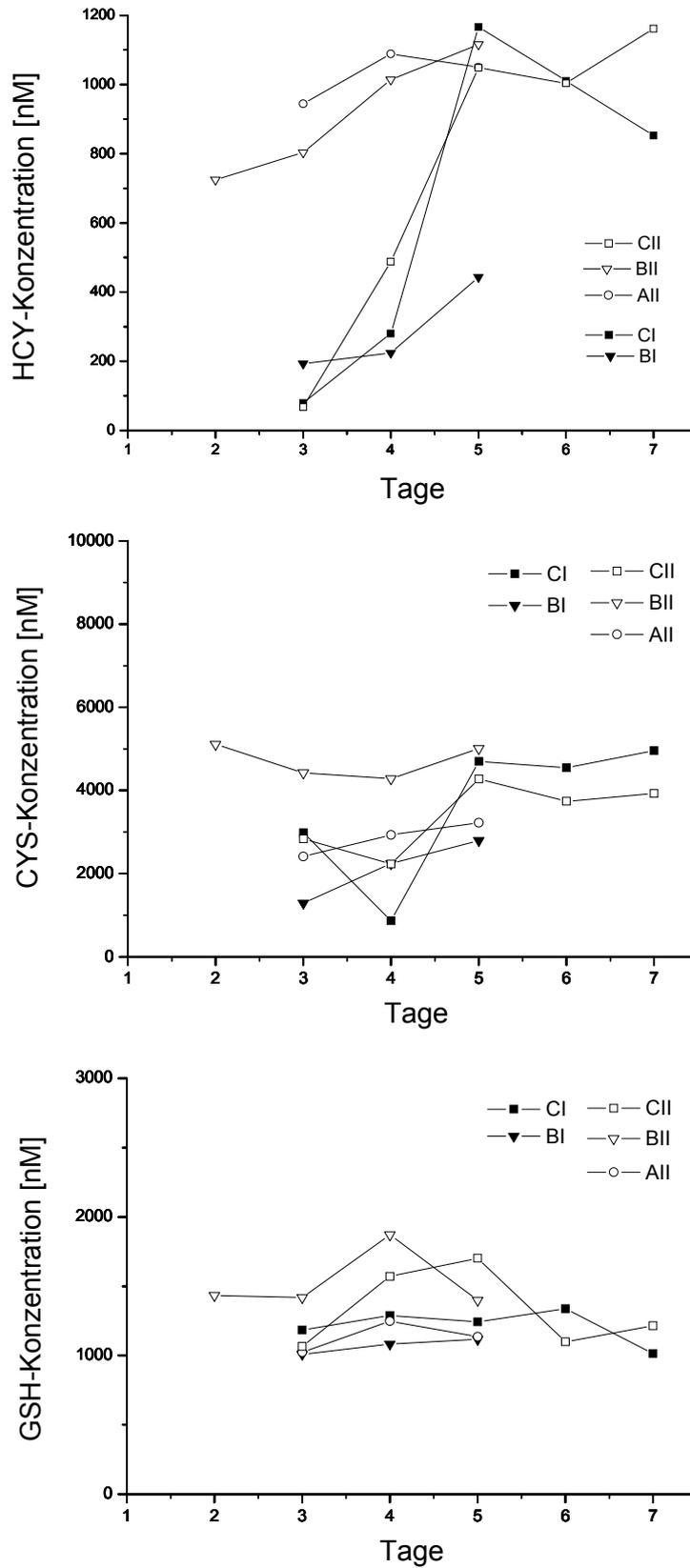


Abb. 3-24: Konzentrations-Zeit-Profile der Thiole HCY, CYS und GSH im Liquor des Patienten 2.

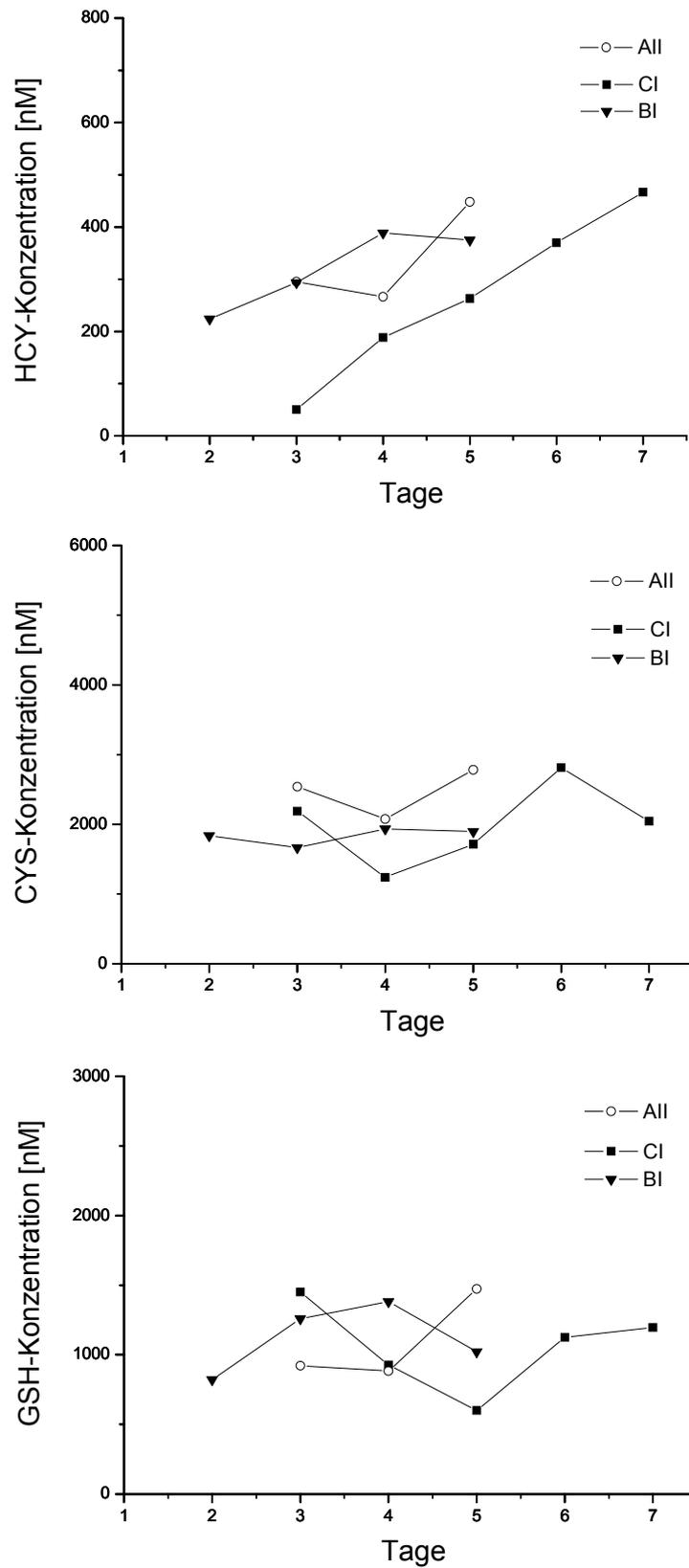


Abb. 3-25: Konzentrations-Zeit-Profile der Thiole HCY, CYS und GSH im Liquor des Patienten 3.

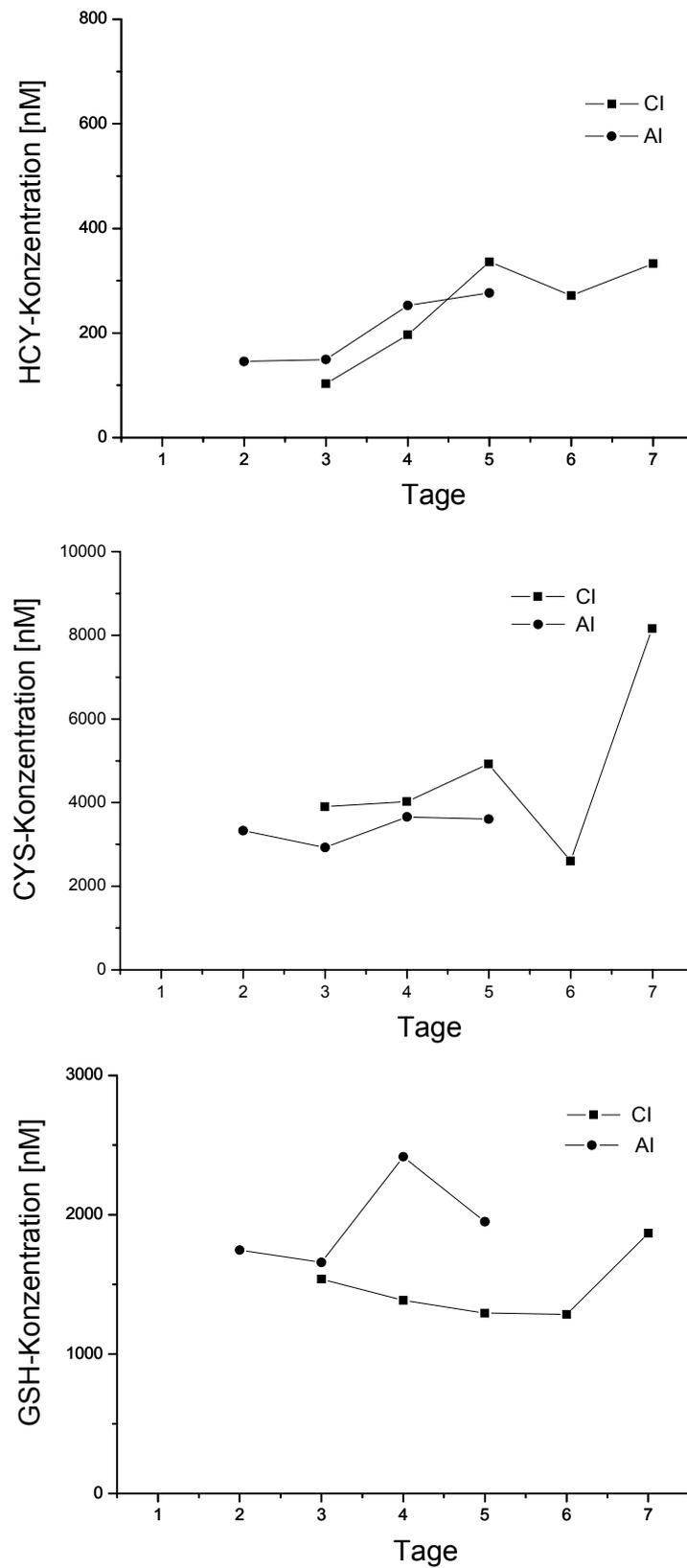


Abb. 3-26: Konzentrations-Zeit-Profile der Thiole HCY, CYS und GSH im Liquor des Patienten 4.

Bei den Cystein- und Glutathionkonzentrationen der vier Patienten konnte im zeitlichen Verlauf eines jeweiligen Therapieblocks kein eindeutiger Trend beobachtet werden. Auch zwischen den Cystein- bzw. Glutathionkonzentrationen der verschiedenen Therapieblöcke konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden.

Abb. 3-27 zeigt, dass die Cystein- und Glutathionkonzentrationen der Patienten sowohl eine hohe intra-, als auch eine hohe interindividuelle Variabilität aufwiesen.

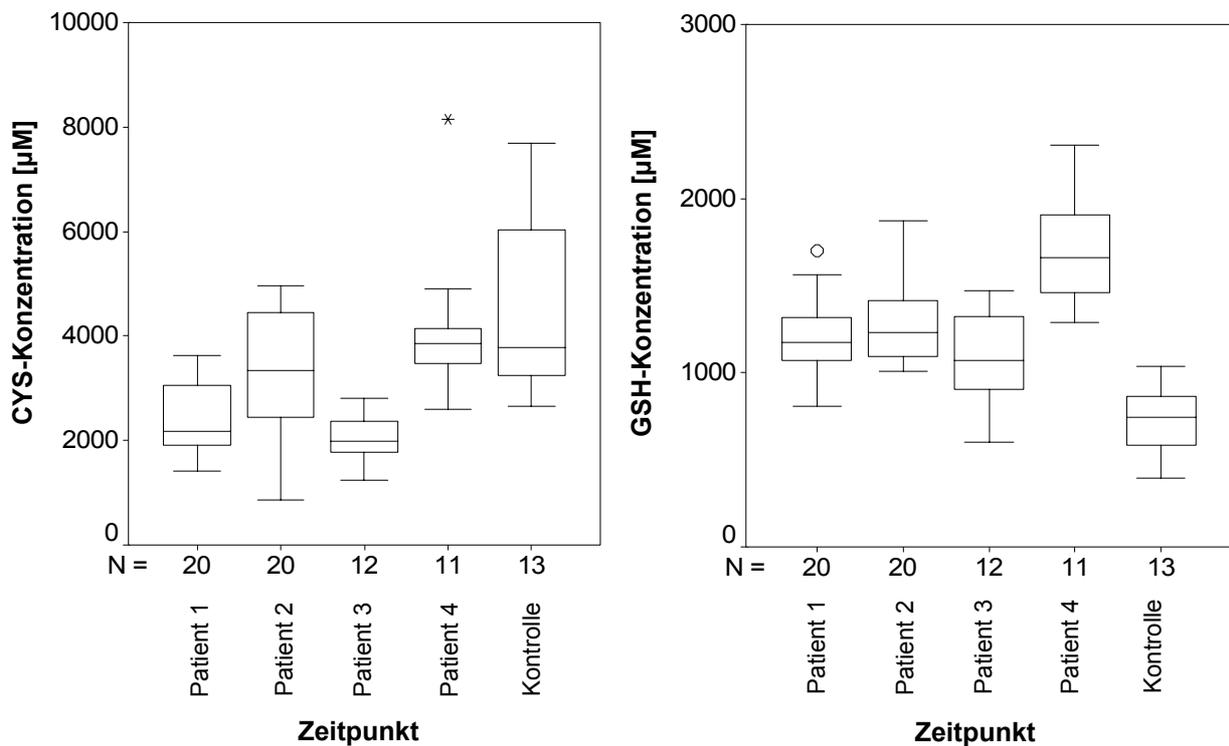


Abb. 3-27: Cystein- und Glutathionkonzentrationen (Liquor) der PZNSL-Patienten und der Kontrollgruppe.

Der Verlauf der Homocysteinkonzentration war im Gegensatz zu den Cystein- und Glutathionkonzentrationen stark von der Therapiephase geprägt. Die niedrigsten Konzentrationen, wurden, abgesehen von der Homocysteinkonzentration des Patienten 1 zum Zeitpunkt BII2, jeweils am dritten Tag des Blocks C, kurz vor Verabreichung der ersten intraventrikulären MTX-Gabe gemessen. Zu diesem Zeitpunkt lag die letzte Applikation von MTX mehr als zwei Wochen zurück (s. Tab. 2-19).

Im Block C ließ die wiederholte intraventrikuläre Verabreichung von MTX (ICVMTX) die Homocysteinkonzentrationen der Patienten stark ansteigen. Bei Patient 2 (Block CII) fiel der Anstieg von Tag 3 zu Tag 7 am größten aus: die Homocysteinkonzentration stieg von 67,6 nM auf 1161 nM, also um mehr als das 17fache (s. Abb. 3-24).

Auch im zeitlichen Verlauf der Blöcke A und B konnte jeweils ein Ansteigen der Homocysteinkonzentrationen beobachtet werden. Mit Ausnahme des ersten Patienten waren die Homocysteinkonzentrationen der Proben, die am zweiten Tag des Blocks A bzw. B – also ein Tag nach Beginn der MTX-Infusion – gezogen wurden, deutlich höher als die Konzentrationen der Proben, die am dritten Tag des Blocks C entnommen wurden. Somit lagen bei diesen Patienten bereits gegen Ende der 24-stündigen MTX-Infusion erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Liquor vor.

Der Anstieg der Homocysteinkonzentrationen in therapiegleichen Behandlungsblöcken (Blöcke AI, AII, BI und BII zum einen sowie CI und CII zum anderen) fiel teilweise recht unterschiedlich aus. Bei Patient 1 waren die Homocysteinkonzentrationen, die am 4.-7. Tag im Block CI bestimmt wurden, wesentlich höher als die entsprechenden Konzentrationen im Block CII (s. Abb. 3-23); Patient 2 zeigte im Verlauf der Blöcke AII und BII deutlich höhere Konzentrationen als im Block BI (s. Abb. 3-24).

In allen Liquores mit sehr hohen Homocysteinkonzentrationen wurden normale Cystein- und Glutathionkonzentrationen ermittelt (s. Anhang B), so dass eine artifizielle Erhöhung der Homocysteinkonzentration durch eine defekte Blut-Liquor-Schranke oder eine Kontamination mit Blut ausgeschlossen werden kann.

Nach der individuellen Betrachtung der einzelnen Konzentrationsverläufe wurde die Gruppe der Lymphompatienten kollektiv ausgewertet. Im Rahmen dieser Auswertung wurden die Blöcke AI, AII, BI und BII zu A/B und die Blöcke CI und CII zu C zusammengefasst, da in diesen jeweils die gleiche Chemotherapie verabreicht wurde. Die folgende Tab. 3-31 liefert einen Überblick über die medianen Konzentrationen von Homocystein, Cystein und Glutathion im Verlauf der Blöcke A/B bzw. C. Zusätzlich finden sich in dieser Tabelle die Referenzwerte der Kontrollgruppe

(s. Kapitel 2.5.3). Die graphische Darstellung der Thiolkonzentrationen in Form von Boxplots zeigt Abb. 3-28 (Homocystein) bzw. Abb. 3-29 (Cystein und Glutathion).

Tab. 3-31: HCY-, CYS- und GSH-Konzentrationen der Lymphompatienten während der Chemotherapie (Mediane, Minima und Maxima).

Kollektiv		c (HCY) [nM] (Median)	c (CYS) [nM] (Median)	c (GSH) [nM] (Median)
Block A/B2	n = 5	195 (23,4-725)	1837 (1414-4965)	1433 (809-1746)
Block A/B3	n = 9	295 (149-944)	2248 (1293-4502)	1177 (921-1658)
Block A/B4	n = 9	389 (224-1088)	2075 (1732-4132)	1248 (882-2307)
Block A/B5	n = 9	448 (277-1116)	2782 (1896-4873)	1399 (1022-1950)
Block C3	n = 6	73,6 (50,6-200)	2804 (2186-3885)	1217 (1022-1539)
Block C4	n = 6	238 (188-771)	2209 (867-4008)	1232 (927-1572)
Block C5	n = 6	482 (151-1167)	3938 (1713-4904)	1268 (600-1703)
Block C6	n = 5	689 (271-1010)	2813 (2279-4410)	1124 (1001-1337)
Block C7	n = 6	569 (239-1162)	3423 (2044-8155)	1205 (1015-1974)
Alle	n = 61		2711 (867-8155)	1233 (600-2307)
Kontrolle	n = 13	71,3 (31,9-161)	3775 (2662-7688)	746 (394-1034)

Weder in den Blöcken A/B noch im Block C wurde eine signifikante Veränderung der Cystein- bzw. Glutathionkonzentration festgestellt (p jeweils $> 0,05$, Wilcoxon). Vor diesem Hintergrund wurden alle ermittelten Konzentrationen dieser Thiole zu einer Gruppe zusammengefasst und der jeweilige Median bestimmt (s. Tab. 3-31). Der Median der Cysteinkonzentrationen (2711 nM) war signifikant niedriger ($p < 0,001$, Mann-Whitney), der Median der Glutathionkonzentrationen (1233 nM) war hingegen signifikant höher als der der Kontrollgruppe ($p < 0,001$, Mann-Whitney).

Tab. 3-31 ist zu entnehmen, dass die medianen Homocysteinkonzentrationen im Block A/B von 195 nM (A/B2) auf 448 nM (A/B5) und im Block C von 73,6 nM (C3) auf 569 nM (C7) stiegen. Homocysteinkonzentrationen, die einen Tag nach der intravenösen bzw. intraventrikulären MTX-Gabe gemessen wurden, waren vergleichbar hoch (Median der Proben A/B2: 195 nM, Median der Proben C4: 238 nM).

Trotz der geringen Fallzahl unterschieden sich die Homocysteinkonzentrationen der Tage A/B3-5 signifikant von den Konzentrationen der Tage A/B2 und die Homo-

cysteinkonzentrationen der Tage C4-7 signifikant von den Konzentrationen des Tages C3 (s. Tab. 3-32).

Tab. 3-31 und Abb. 3-28 zeigen, dass – abgesehen von den Konzentrationen, die am dritten Tag des Blocks C bestimmt wurden (sie waren ähnlich hoch wie die Homocysteinkonzentrationen der Kontrollgruppe) – alle Homocysteinkonzentrationen der Lymphompatienten durchweg deutlich höher waren als die der Kontrollgruppe.

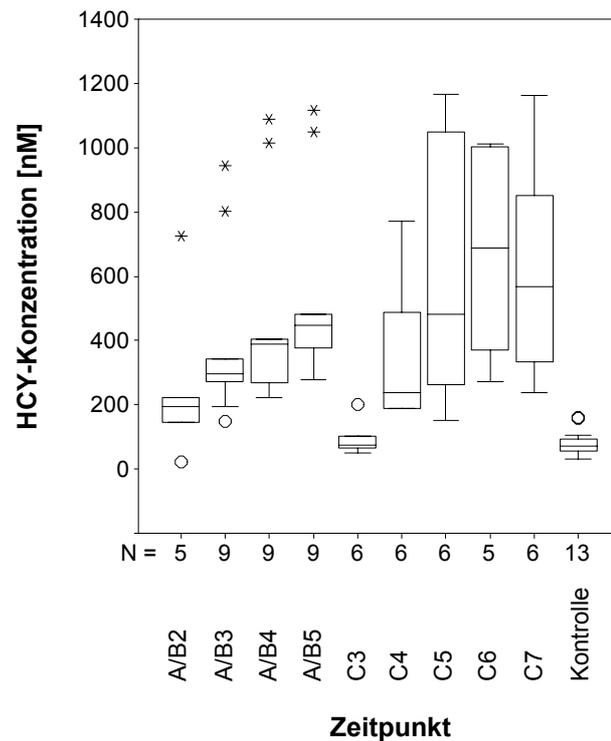


Abb. 3-28: HCY-Konzentrationen der Lymphompatienten im Liquor im Verlauf der Chemotherapie.

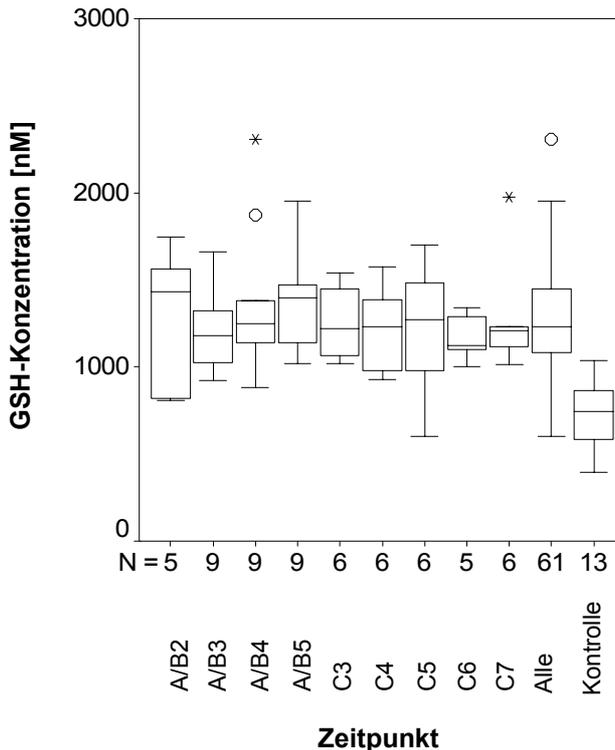
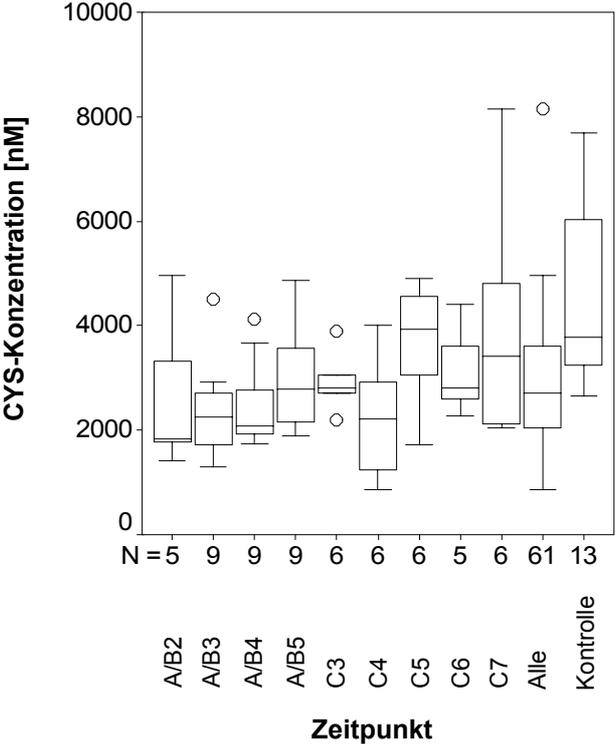


Abb. 3-29: CYS- und GSH-Konzentrationen im Liquor der Lymphompatienten im Verlauf der Chemotherapie.

Tab. 3-32: Vergleich der Homocysteinkonzentrationen.

Intragruppenvergleiche		Intergruppenvergleiche	
Kollektive	Wilcoxon-Test	Kollektive	Mann-Whitney
A/B2, A/B3	p = 0,043 (n = 5)	A/B2, K	p = 0,095 (n = 5/13)
A/B2, A/B4	p = 0,043 (n = 5)	A/B3, K	p < 0,001 (n = 9/13)
A/B2, A/B5	p = 0,043 (n = 5)	A/B4, K	p < 0,001 (n = 9/13)
C3, C4	p = 0,028 (n = 6)	A/B5, K	p < 0,001 (n = 9/13)
C3, C5	p = 0,028 (n = 6)	C3, K	p = 0,639 (n = 6/13)
C3, C6	p = 0,043 (n = 5)	C4, K	p < 0,001 (n = 6/13)
C3, C7	p = 0,028 (n = 6)	C5, K	p < 0,001 (n = 6/13)
		C6, K	p < 0,001 (n = 5/13)
		C7, K	p < 0,001 (n = 6/13)

Der Unterschied zwischen den Homocysteinkonzentrationen der Proben A/B3-5 und C4-7 und den Homocysteinkonzentrationen der Kontrollgruppe war jeweils höchstsignifikant (s. Tab. 3-32).

Auch bei dieser Studie wurde zwischen den Homocystein- und den Cystein-konzentrationen nur eine geringe Korrelation gefunden ($r = 0,269$, $p = 0,002$, Rangkorrelation nach Kendall). Ein Zusammenhang zwischen den Homocystein- und den Glutathionkonzentrationen bestand nicht ($r = 0,110$, $p = 0,211$, Rangkorrelation nach Kendall).

Konzentrationen der SEAA im Liquor der Lymphompatienten

Mittels der validierten kapillarelektrophoretischen Methode wurden sowohl die Liquores der Lymphompatienten als auch die der Kontrollgruppe auf die exzitatorischen Metaboliten des Homocysteins (HCSA, HCA) bzw. Cysteins (CSA, CA) untersucht.

Bei drei der vier Patienten (Patienten 2-4) konnte nach MTX-Gabe die exzitatorische Aminosäure HCSA, nicht aber HCA, CSA und CA, nachgewiesen werden. In den Liquorproben der Kontrollgruppe konnte keine dieser vier Aminosäuren detektiert werden (LOD: 5,7-33,3 nM). Die HCSA-Konzentrations-Zeit-Profile der Patienten 2-4 sind in Abb. 3-30 dargestellt. Ihnen ist zu entnehmen, dass auch die HCSA-Konzentrationen am Tag 3 des Blocks C am niedrigsten waren (sie lagen unter der Nachweisgrenze der Methode). Alle anderen HCSA-Konzentrationen lagen zwischen 1,48 und 2,78 μM .

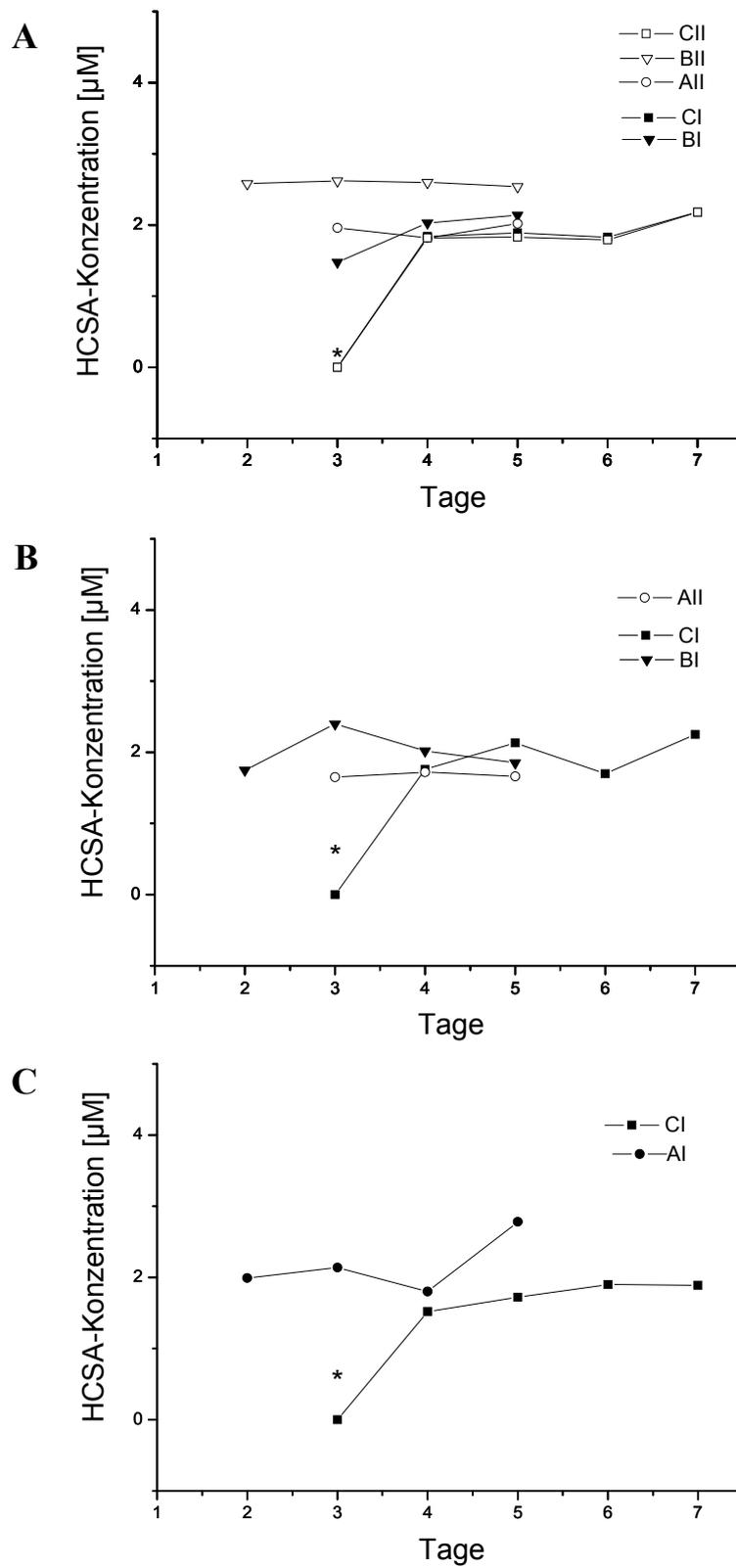


Abb. 3-30: HCSA-Konzentrations-Zeit-Profile im Liquor der Patienten 2 (Abb. A), 3 (Abb. B) und 4 (Abb. C); *: < 5,7 nM (LOD für HCSA)

Zusammenhänge zwischen den MTX- bzw. N⁵-Methyl-THF- und den Homocysteinkonzentrationen

Zwischen den Homocystein- und den MTX-Konzentrationen, die im Liquor der PZNSL-Patienten bestimmt wurden, wurde eine geringe Korrelation ermittelt ($r = 0,354$, $p < 0,001$, $n = 59$, Rangkorrelation nach Kendall). Ließ man in die Korrelationsanalyse nur die Homocystein- und MTX-Konzentrationen, die im Verlauf der Therapieblöcke C (in diesen wurde *kein* Calciumfolinat verabreicht) bestimmt wurden, einfließen, wurde eine geringfügig höhere Korrelation gefunden (s. Abb. 3-31). Diese Korrelation war auch dann hochsignifikant, wenn man die drei Ausreißer (Sternchen in der linken Darstellung der Abb. 3-31) nicht berücksichtigte ($r = 0,407$, $p < 0,005$, $n = 25$, Rangkorrelation nach Kendall).

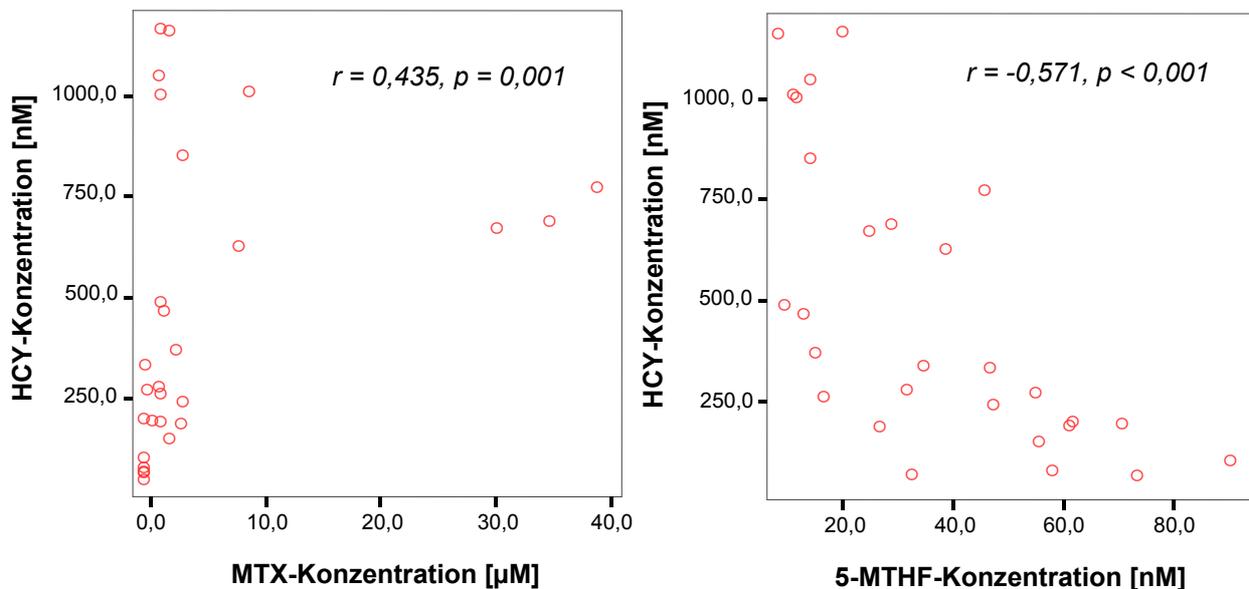


Abb. 3-31: Korrelation zwischen den im Liquor gemessenen MTX-, bzw. N⁵-Methyl-THF-Konzentrationen und den Homocysteinkonzentrationen (Rangkorrelation nach Kendall, $n = 28$). Dargestellt sind nur die Werte aus den Therapieblöcken C. Ausreißer sind durch ein Sternchen gekennzeichnet.

Eine geringe, gegenläufige Korrelation wurde zwischen Homocystein und N⁵-Methyl-THF – dem Cofaktor der Methioninsynthase – ermittelt ($r = -0,217$, $p = 0,019$, $n = 57$, Rangkorrelation nach Kendall). Unter Berücksichtigung der Homocystein- und

N⁵-Methyl-THF-Konzentrationen der C-Blöcke wurde eine mittlere, höchstsignifikante Korrelation gefunden ($r = -0,571$, $p < 0,001$, $n = 28$, Rangkorrelation nach Kendall, s. Abb. 3-31). Die zwischenzeitliche Gabe von Calciumfolinat (in der Regel dreimal 30 mg/m² am dritten, sowie einmal 30 mg/m² am vierten Tag der Blöcke A/B), erwies sich somit als starker Störfaktor dieser Korrelation.

Zusammenhang zwischen den Homocystein- und den HCSA-Konzentrationen

Der Zusammenhang zwischen den Homocystein- und HCSA-Konzentrationen der Patienten 2-4 ist in Abb. 3-32 dargestellt. Sie zeigt, dass bei diesen Patienten HCSA nur dann nachgewiesen wurde, wenn die Homocysteinkonzentration mindestens 146 nM betrug (s. gestrichelte Linie in Abb. 3-32).

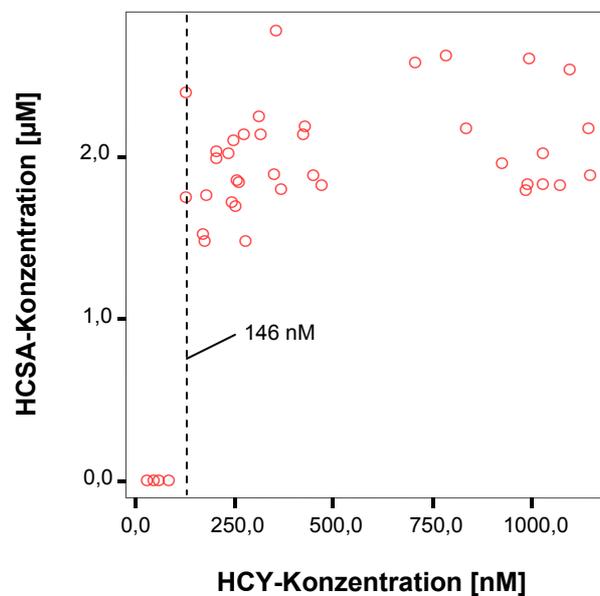


Abb. 3-32: Zusammenhang zwischen den im Liquor gemessenen HCY- und HCSA-Konzentrationen der Patientinnen 2, 3 und 4 ($n = 42$).

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass eine ausführliche Darstellung und Diskussion der MTX- und 5-MTHF-Konzentrationen in der Dissertation der Projektpartnerin S. Vezmar zu finden sein wird.

Ergebnisse der Untersuchungen zur Evaluierung der Neurotoxizität

Alle Untersuchungen zur Evaluierung der Neurotoxizität wurden von Prof. Dr. Schlegel bzw. Dr. Pels (Neuroonkologie des Universitätsklinikums Bonn) durchgeführt und ausgewertet.

Patient 1 klagte im Verlauf des Blocks BI über starke Kopfschmerzen, die höchstwahrscheinlich durch eine Infektion im Bereich des Ommaya-Reservoirs hervorgerufen wurden. MRT-Untersuchungen ergaben keine Anzeichen einer MTX-induzierten Demyelinisierung oder Arachnoiditis.

Die Patienten 2 und 4 waren klinisch unauffällig. Dennoch ließen MRT-Bilder (T2-gewichtet) erkennen, dass sich bei diesen Patienten während der Chemotherapie fokale begrenzte Demyelinisierungen manifestiert hatten.

Patient 3 entwickelte nach dem ersten Zyklus der Chemotherapie (nach Block CI) eine ausgeprägte Leukenzephalopathie. MRT-Bilder (T2-gewichtet) des Patienten zeigten flächig konfluente Signalsteigerungen, die als schwere Demyelinisierungen zu interpretieren sind. Die Leukenzephalopathie und der insgesamt reduzierte Allgemeinzustand bedingten, dass die Chemotherapie nach dem Block All abgebrochen wurde.

Symptome einer akuten bzw. subakuten Neurotoxizität wurden nach Bekunden des jeweils zuständigen Ärzteteams bei keiner der vier Patientinnen beobachtet.

3.4.3 Fallbericht einer Patientin mit MTX-Überdosierung

In Kooperation mit Dr. Liebeskind (Helios Klinikum Berlin, Klinikum Buch, Abteilung Hämatologie und Onkologie) und Prof. Dr. Bode (Kinderklinik des Universitätsklinikums Bonn, Abteilung Hämatologie und Onkologie) wurde eine Patientin, der irrtümlicherweise eine 10fach erhöhte MTX-Dosis (20 mg) intraventrikulär verabreicht wurde, untersucht.

Diese Patientin wies sechs Stunden nach der fehlerhaften, intraventrikulären MTX-Instillation (kurz vor der ersten Liquorspülung) im Liquor eine MTX-Konzentration von 87,20 μM auf. Trotz zweier ventrikulärer Liquorspülungen (6 bzw. 16 Stunden nach Überdosierung) wurde noch 66 Stunden nach ICVMTX eine stark erhöhte MTX-Konzentration (9,46 μM) im Liquor gefunden (s. Abb. 3-33).

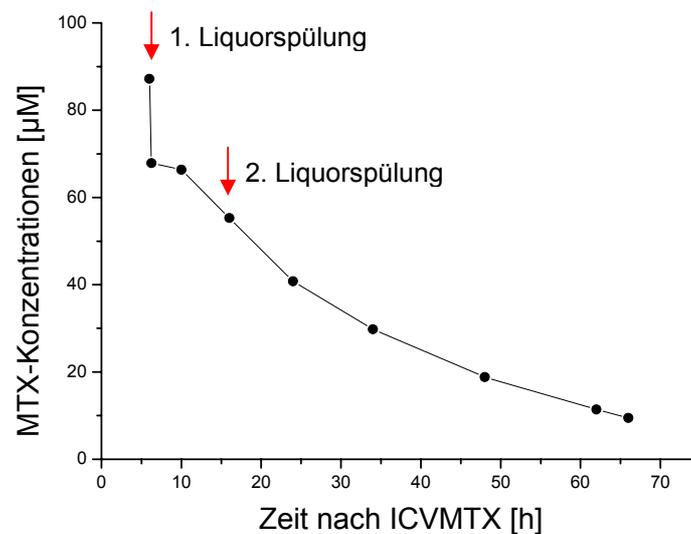


Abb. 3-33: MTX-Konzentrationen im Liquor der Medulloblastom-Patientin.

Die Tab. 3-33 zeigt die Konzentrationen der Substanzen, die in den Liquorproben quantifiziert wurden. Alle gemessenen Homocysteinkonzentrationen waren im Vergleich zu den Homocysteinkonzentrationen der pädiatrischen ALL-Patienten, die in der Regel ungefähr zwischen 30 und 40 nM lagen (s. Tab. 3-28), deutlich erhöht. Bereits 10 Stunden nach intraventrikulärer MTX-Gabe wurde mit 598 nM eine sehr

hohe Homocysteinkonzentration ermittelt, die bis zum Zeitpunkt der letzten Probenentnahme (Stunde 66) weiter anstieg (s. Tab. 3-33 bzw. Abb. 3-34).

Tab. 3-33: Konzentrationen an HCY, CYS, GSH, HCSA, HCA, CA, MTX und 5-MTHF im Liquor der Medulloblastom-Patientin, die 20 mg MTX intraventrikulär verabreicht bekam.

Zeit nach ICVMTX [h]	HCY [nM]	CYS [nM]	GSH [nM]	HCSA [µM]	HCA [µM]	CA [µM]	MTX [µM]	MTHF* [nM]
6	KP	KP	KP	KP	KP	KP	87,20	KP
6,25	KP	KP	KP	KP	KP	KP	67,87	KP
10	598	16950	884	~0,72	~0,50	~0,96	66,38	48,3
16	652	17992	861	~0,96	~0,10	~0,44	55,27	59,0
24	799	19572	1099	1,12	~0,20	~0,40	40,79	59,7
34	NB	NB	NB	NB	NB	NB	29,76	78,5
48	KP	KP	KP	KP	KP	KP	18,82	KP
62	930	18530	895	1,12	~0,32	~0,73	11,42	113,7
66	1028	14222	1032	1,20	~0,32	~0,62	9,46	95,5

* N⁵-Methyltetrahydrofolat

NB: nicht bestimmt (Probe war sehr blutig!); KP: keine Probe verfügbar

Zur Beachtung: Das LLOQ zur Bestimmung von HCSA, HCA und CA betrug 1,0 µM.

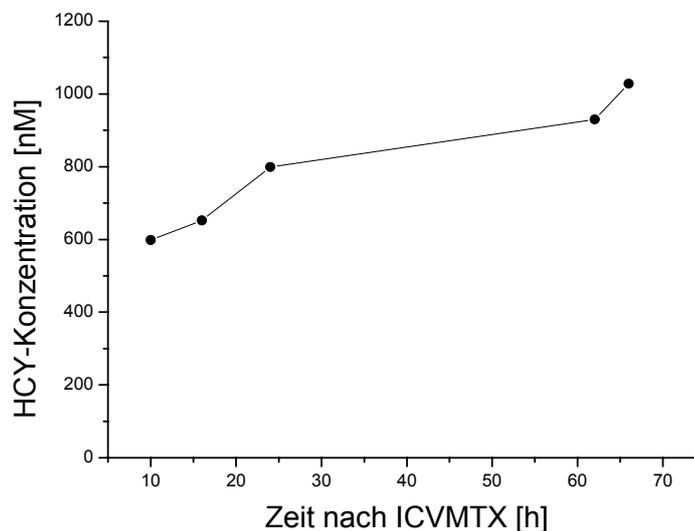


Abb. 3-34: HCY-Konzentrationen im Liquor der Medulloblastom-Patientin.

Auch die Cysteinkonzentrationen (14,2-19,6 μM), nicht aber die Glutathionkonzentrationen (861-1099 nM) der Patientin waren auffallend hoch (s. Tab. 3-33).

In allen Proben wurden die Metaboliten des Homocysteins (HCSA und HCA) sowie Cysteinsulfonsäure (CA) detektiert. Mit Ausnahme der HCSA-Konzentrationen der Proben, die 24, 62 und 66 Stunden nach der intraventrikulären Verabreichung von MTX gezogen wurden, lagen die Konzentrationen der exzitatorischen Aminosäuren unter der unteren Bestimmungsgrenze (1 μM) der kapillarelektrophoretischen Methode. Die Konzentrationen an HCSA stiegen mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur ICVMTX an und lagen in der gleichen Größenordnung wie die Homocysteinkonzentrationen.

Die Konzentrationen an N⁵-Methyl-THF der 10-, 16-, 24- und 34 h-Proben lagen im Normbereich (40-90 nM)^{76,184,185}. Die leicht erhöhten Konzentrationen, die 62 bzw. 66 Stunden nach ICVMTX gemessen wurden, waren sehr wahrscheinlich Folge des intensivierten Rescue mit Calciumfolinat (s. Kapitel 2.5.4.1).

4 Diskussion

Im Folgenden werden die in Kapitel 3 aufgeführten Ergebnisse diskutiert. Die Diskussion folgt dabei prinzipiell der Gliederung des Ergebnisteils. Im abschließenden Kapitel der Diskussion wird erörtert, ob Homocystein einen Biomarker für die MTX-induzierte Neurotoxizität darstellen könnte.

4.1 CE-Methode zur Bestimmung von schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren im Liquor

Sowohl die exzitatorischen Metaboliten des Homocysteins (HCSA und HCA), als auch die des Cysteins (CSA und CA), sind in retrospektiv analysierten Liquorproben von Krebspatienten, die mit hochdosiertem MTX behandelt wurden, nachgewiesen worden. Bislang konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass sich diese Substanzen im Verlauf einer Chemotherapie mit MTX im Liquor anhäufen. Der Stellenwert dieser exzitatorischen Aminosäuren für die MTX-induzierte Neurotoxizität ist, nicht zuletzt aufgrund der spärlichen Datenlage, bis heute weitgehend unklar.

Zur simultanen Bestimmung aller vier SEAA in biologischen Matrices sind bislang fünf verschiedene HPLC-Methoden sowie eine GC-Methode publiziert worden, wobei nur die Arbeitsgruppe um Quinn⁷⁶ die SEAA im Liquor bestimmten (s. Tab. 4-1).

Leider finden sich in den Publikationen, die diese Methoden beschreiben, kaum Informationen zur Validierung. Oftmals werden nur Angaben zur Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und der unteren Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LOQ) gemacht.

Darüber hinaus konnte, mit Ausnahme der GC-Methode, bei allen Methoden die eindeutige, selektive Bestimmung der Analyten nur in wässriger Lösung demonstriert werden. Die Trennleistung der verwendeten HPLC-Systeme reichte nicht aus, die mit *o*-Phtaldialdehyd (OPA) derivatisierten SEAA untereinander bzw. von anderen Aminosäuren oder Bioaminen der biologischen Matrix eindeutig abzutrennen (mit OPA werden alle Substanzen erfasst, die eine primäre Aminogruppe tragen, s. Abb. 4-1).

Tab. 4-1: Analytische Methoden zur simultanen Bestimmung von HCSA, HCA, CSA und CA in biologischen Matrices.

Referenz	Methode	Matrix	LOD bzw. LLOQ	Anmerkungen
Waller et al. (1991) ¹⁸⁶	HPLC-FD (OPA/ME [*])	Mikrodialyseproben (Rattenhirn)	LODs: ~2-3 nM	- Unzureichende chromatographische Trennung - Geringe Stabilität der Produkte - Keine Angaben zur Validierung
Orwar et al. (1991) ¹⁸⁷	HPLC-ECD (nach Derivatisierung mit OPA/ME [*])	Mikrodialyseproben (Rattenhirn)	LOD (HCSA): 1,3 nM LLOQ: 50 nM	- Unzureichende chromatographische Trennung - Geringe Stabilität der Produkte - Keine Angaben zur Validierung - Teure Arbeitselektrode (Hg-Au-Elektrode) mit sehr begrenzter Lebensdauer ¹⁸⁷
Orwar et al. (1994) ¹⁸⁸	HPLC-LIFD (OPA/ME [*])	Mikrodialyseproben (Rattenhirn)	LOD: 35-380 pM LLOQ: 0,3-13,3 nM	- Unzureichende chromatographische Trennung - Geringe Stabilität der Produkte - Keine Angaben zur Richtigkeit und Wiederfindung
Santosh-Kumar et al. (1994) ¹⁸⁹	GC-MS (nach Derivatisierung mit MTBSTFA [#])	Plasma	LOD: 2,5-40 nM LLOQ: 0,3-1,8 µM	- Aufwändige, zeitintensive Probenaufarbeitung - Erfordert Synthese von Isotopen - Sehr kostenintensiv
Quinn et al. (1997) ⁷⁶	HPLC-FD/ECD (OPA/MP ^x)	Liquor	LOD: 50 nM LLOQ: k. A.	- Keine Beurteilung der chromatographischen Trennung im Liquor möglich - Keine Angaben zur Validierung

^{*} *ortho*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol

[#] *N*-Methyl-*N*-*t*-butyldimethylsilyl-trifluoracetamid

^x *ortho*-Phthaldialdehyd/Mercaptopropanol

k. A.: Keine Angaben

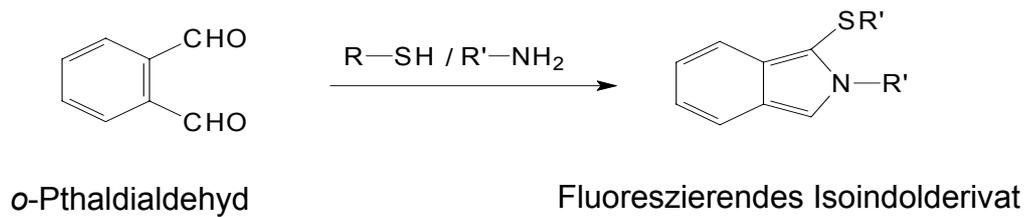


Abb. 4-1: Derivatisierung primärer aromatischer Amine mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptoethanol (Mercaptopropanol).

Die mangelnde Trenneffizienz der HPLC-Methoden ist damit begründet, dass eine Vielzahl von vergleichsweise polaren Substanzen (unter den gegebenen chromatographischen Bedingungen lagen die Derivate der SEAA sogar zweifach negativ geladen vor) auf *Reversed-phase*-Säulen (RP-18) getrennt wurden. Es ist nicht überraschend, dass unter den chromatographischen Bedingungen der oben angeführten HPLC-Methoden Analyten, die sich hinsichtlich ihrer Lipophilie kaum unterscheiden (z.B. Isoindolderivate von CSA, CA und ASP bzw. Isoindolderivate von HCSA, HCA und GLU), nicht ausreichend getrennt werden konnten.

Ein weiterer Nachteil der oben angeführten HPLC-Methoden liegt darin, dass der eingesetzte Fluoreszenzmarker OPA, insbesondere aber die Produkte der Derivatisierungsreaktion, die fluoreszierenden Isoindolverbindungen (s. Abb. 4-1), sehr instabil sind. Dieser Umstand bedingt, dass Derivatisierungszeiten auf die Sekunde genau eingehalten werden müssen und dass Methoden, bei denen OPA als Derivatisierungsreagenz verwendet wird, kaum zu automatisieren sind^{169,190}.

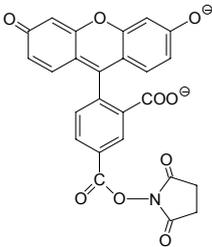
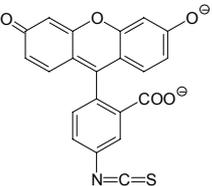
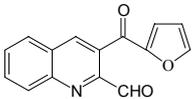
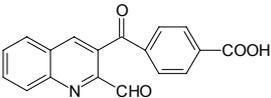
Da sich – wie oben erläutert – HPLC-Methoden nur in begrenztem Umfang eignen, SEAA selektiv in einer komplexen biologischen Matrix zu bestimmen und die GC-MS-Methode sehr kostenintensiv ist, wurde zur quantitativen Analyse der SEAA in Liquor die Kapillarelektrophorese (CE) ausgewählt. Im Gegensatz zur HPLC werden bei kapillarelektrophoretischen Methoden die Analyten nicht nach Lipophilie, sondern nach Größe und Ladung getrennt (s. Gl. 2-2). Daher ist diese Methode prinzipiell besser geeignet, geladene Aminosäuren, die sich hinsichtlich der Lipophilie teilweise nur geringfügig unterscheiden, zu trennen. Die Trennleistung der CE ist im Allgemeinen deutlich höher als die der HPLC, da keine Bandenverbreiterungen durch

laminare Flussprofile entstehen¹⁹¹. Des Weiteren besitzt die Kapillarelektrophorese im Vergleich zur HPLC den Vorteil, dass man mit kleineren Probenvolumina auskommt (teilweise reichen schon wenige nL aus), die Analysenzeiten in der Regel deutlich kürzer und die Kosten generell niedriger sind, da größere Mengen an hochreinen Lösungsmitteln nicht benötigt werden.

Um auch sehr niedrige Konzentrationen der Metaboliten im Liquor nachzuweisen, wurden die SEAA mit einem Fluoreszenzfarbstoff (CFSE) markiert und die Derivate durch die energiereiche Hauptspektrallinie (488 nm) eines Argon-Lasers angeregt (Konzept der Laser-induzierten Fluoreszenz (LIFD, s. Abb. 2-5). Als Fluoreszenzmarker wurde CFSE eingesetzt, da das Absorptionsmaximum der Derivate nahe der Anregungswellenlänge des Argon-Lasers liegt, es gegenüber primären Aminen eine hohe Reaktivität und Selektivität aufweist und die gebildeten Produkte über eine hohe Stabilität verfügen. Aufgrund dieser Eigenschaften zeigt CFSE gegenüber Fluoresceinisothiocyanat (FITC), welches in großem Maßstab zur Derivatisierung von primären Aminen, im Besonderen Aminosäuren, verwendet wird, deutliche Vorteile (s. Tab. 4-2).

Die eigenen Ergebnisse bestätigten, dass CFSE zur Derivatisierung primärer Amine hervorragend geeignet ist. Die hohe Stabilität der Derivatisierungsprodukte (s. Kapitel 3.1.5.6) trug dazu bei, dass die Analyten präzise bestimmt werden konnten und ermöglichte, dass bis zu 18 Liquorproben gleichzeitig derivatisiert und anschließend der Reihe nach vermessen werden konnten. Unter Verwendung der LIFD lagen die LODs zwischen 5,7 und 33,3 nM. Somit ist die Methode vergleichbar empfindlich wie die Methode von Quinn et al. (1997), nach der die SEAA (ebenfalls im Liquor vorliegend) zuerst mit OPA derivatisiert und anschließend coulometrisch detektiert werden (s. Tab. 4-1). Die hohe Empfindlichkeit der LIFD bedingte leider auch, dass selbst Spuren von Verunreinigungen bzw. Abbauprodukten von CFSE, welches eine intrinsische Fluoreszenz (Autofluoreszenz) aufweist, detektiert wurden (s. hierzu Abb. 3-8). Dieser Umstand erforderte eine 1:100-Verdünnung der Messprobe, brachte aber gleichzeitig den Vorteil mit sich, dass die Liquorprobe ohne weitere Aufarbeitung (z.B. Proteinfällung) problemlos in das CE-System injiziert werden konnte.

Tab. 4-2: Fluoreszenzmarker, die im Rahmen kapillarelektrophoretischer Verfahren mit LIFD zur Derivatisierung primärer Amine eingesetzt werden.

Fluoreszenzmarker	λ_{ex} [nm]	λ_{em} [nm]	Vorteile	Nachteile
<p>CFSE</p> 	494	520	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe Reaktivität und Selektivität¹⁷⁰ - Hohe Stabilität der Produkte^{192,193} - Hohe Empfindlichkeit^{170,193} 	<ul style="list-style-type: none"> - Intrins. Fluoreszenz
<p>FITC*¹</p> 	490	519	<ul style="list-style-type: none"> - Hohe Empfindlichkeit¹⁹⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> - Intrins. Fluoreszenz - Mäßige Reaktivität¹⁷⁰ - Geringe Selektivität^{169,195} - FITC und Derivate sind relativ instabil¹⁶⁹
<p>FQCA^{#1}</p> 	486 ^{*2}	591 ^{*2}	<ul style="list-style-type: none"> - Keine intrins. Fluoreszenz - Gute Reaktivität¹⁹⁶ - Hohe Selektivität - Hohe Empfindlichkeit^{196,197} 	<ul style="list-style-type: none"> - Derivatisierung erfordert tox. KCN - Begrenzte Stabilität der Produkte¹⁹⁶ - Spezieller Bandpass-Filter erforderlich^{#2}
<p>CBQCA^{X1}</p> 	456 ^{*2}	552 ^{*2}	<ul style="list-style-type: none"> - Keine intrins. Fluoreszenz - Gute Reaktivität¹⁹⁸ - Hohe Selektivität - Hohe Empfindlichkeit¹⁹⁸ 	<ul style="list-style-type: none"> - Derivatisierung erfordert tox. KCN - Begrenzte Stabilität der Produkte - Teurer He-Cd-Laser erforderlich

Anmerkung: Absorptions- und Emissionsmaximum wurden unter Verwendung des Lösungsmittels MeOH bestimmt¹⁶⁹.

*¹ Fluoresceinisothiocyanat; #¹ 3-(2-Furoyl)-chinolin-2-carbaldehyd; X¹ 4-(2-Formyl-3-chinolincarbonyl)-benzoesäure;

*² Bezogen auf das Derivatisierungsprodukt aus CBQCA bzw. FQCA, CN⁻ und Glycin;

#² Kommerziell erhältliche LIF-Detektionssysteme, die Argonlaser als Anregungsquelle nutzen, sind mit einem 520 nm Bandpass-Filter ausgestattet

Da verschiedene Chargen des Fluoreszenzmarkers unterschiedliche Verunreinigungen beinhalteten (sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht), wurde vor einer Probenmessung immer zuerst das Elektropherogramm einer Leerprobe (CFSE gelöst in 0,1 M Boratpuffer, pH 9,0) aufgezeichnet.

Vor diesem Hintergrund mögen die Fluoreszenzmarker CBQCA (4-(2-Formyl-3-chinolincarboxyl)-benzoesäure) und FQCA (3-(2-Furoyl)-chinolin-2-carbaldehyd), speziell entwickelt zur Derivatisierung von primären Aminen mit anschließender LIFD, vorteilhaft sein, da sie wie OPA selbst keine Fluoreszenz zeigen (s. Tab. 4-2). Allerdings erfordert FQCA einen Umbau kommerziell erhältlicher LIF-Detektionssysteme, die mit einem 520 nm Bandpass-Filter ausgestattet sind und CBQCA einen Helium-Cadmium-Laser, der im Vergleich zu einem Argon-Laser erheblich teurer ist und nur eine sehr begrenzte Lebensdauer besitzt. Darüber hinaus ist zur Umsetzung von primären Aminen bei beiden Substanzen hochtoxisches Kaliumcyanid erforderlich.

Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte die Trennung der derivatisierten SEAA vergleichsweise einfach und effizient durch Variation des SDS- bzw. MeOH-Gehalts im Laufpuffer (0,1 M Borat, pH 9,0) optimiert werden. Für die Trennung war von Vorteil, dass die SEAA-Derivate, aufgrund der sauren Sulfin- bzw. Sulfonsäuregruppe, nicht drei – wie die meisten Aminosäurederivate – sondern vier negative Ladungen trugen. Die zusätzliche negative Ladung bedingte, dass die CFSE-markierten Analyten eine relativ niedrige effektive Mobilität (s. Gl. 2-5) besaßen und erst nach ca. 20 min detektiert wurden (s. „Detektionsfenster der SEAA“ in Abb. 3-8). Nur die sauren Aminosäuren Glutamat und Aspartat, die nach Umsetzung mit CFSE auch über vier negative Ladungen verfügten, wurden ebenfalls in diesem Zeitfenster detektiert. Die selektive Bestimmung aller interessierenden Analyten konnte mit einem 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0), der 10 mM SDS sowie 10 % MeOH enthielt, bei einer Kapillartemperatur von 19°C erzielt werden.

Waller et al. wiesen darauf hin, dass starke Säuren (z.B. Trichloressigsäure in Kombination mit Ether oder Perchlorsäure), die häufig im Rahmen von Proteinfällungen eingesetzt werden, Homocystein und Cystein zur entsprechenden Sulfin- bzw. Sulfonsäure oxidieren können¹⁸⁶. Aufgrund dieser Tatsache sind SEAA-

Konzentrationen, die in biologischen Matrices bestimmt wurden, immer dann kritisch zu bewerten, wenn im Rahmen der Probenaufarbeitung eine Proteinfällung mit starken Säuren vorgenommen wurde. Bei der entwickelten CE-Methode ist, aufgrund der 100fachen Verdünnung der Liquorprobe mit 0,1 M Boratpuffer (pH 8,9), eine Proteinfällung nicht notwendig.

Die Thiolgruppe des Homocysteins bzw. Cysteins wird auch im Alkalischen oxidiert, wenn ausreichend Sauerstoff und zweiwertige Kupferionen zu gegen sind⁸⁰. Da Cu(II)-Ionen obligat im Liquor vorkommen ($\sim 0,13\text{-}0,75\ \mu\text{M}^{80}$) und die Derivatisierung der Liquorproben im alkalischen Milieu durchgeführt wurde, wurde getestet, ob im Rahmen der 30-minütigen Derivatisierungszeit aus Homocystein bzw. Cystein die entsprechenden Sulfoxinsäuren entstehen. Hierzu wurde einer Liquormischung, in der keine der vier SEAA detektiert werden konnte, größere Mengen Homocystein bzw. Cystein zugesetzt (jeweils $10\ \mu\text{M}$) und überprüft, ob nach der 30-minütigen Derivatisierung (pH 8,9) HCSA bzw. CSA gebildet wurden. Da weder HCSA noch CSA in den anschließend aufgezeichneten Elektropherogrammen detektiert wurden, kann ausgeschlossen werden, dass im Rahmen der Derivatisierung größere Mengen an HCSA bzw. CSA entstehen, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine einfache kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung von schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren entwickelt und nach international anerkannten Kriterien validiert wurde. Sie zeichnet sich im Besonderen durch eine hohe Empfindlichkeit, kurze Analysenzeiten und niedrige Kosten aus.

4.2 HPLC-Methode zur Bestimmung von Homocystein, Cystein und Glutathion im Liquor

Aufgrund des ständig wachsenden Interesses an Homocystein, welches insbesondere darauf zurückzuführen ist, dass Homocystein eine größere Rolle in der Genese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen zukommt (s. Kapitel 1), sind eine Vielzahl an analytischen Methoden entwickelt worden, die die Bestimmung von Homocystein im Plasma erlauben. Übersichtsarbeiten zu diesem Thema finden sich unter Ueland et al.¹⁹⁹ und Bayle et al.²⁰⁰. In der Regel sind diese Methoden allerdings nicht empfindlich genug, die geringen Mengen an Homocystein, die im Liquor vorkommen, exakt zu quantifizieren. Bei gesunden Menschen, insbesondere bei Kindern, liegen die Homocysteinkonzentrationen im Liquor oftmals deutlich unter 100 nM^{52,201,202}.

Die erste Methode, die die Bestimmung von Homocystein in Liquor erlaubte, wurde 1992 von Hyland et al. veröffentlicht²⁰³ (s. Tab. 4-3). Sie setzt, da OPA als Derivatisierungsreagenz verwendet wird, eine Maskierung der Thiolgruppe mit Iodessigsäure voraus. Das LOD (80 nM) der Methode – Angaben zur Bestimmungsgrenze werden nicht gemacht – deutet darauf hin, dass Konzentrationen unter 100 nM nicht mit ausreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden können. Somit ist die Methode nur geeignet, Homocystein in Liquores von Patienten zu bestimmen, die aufgrund einer Störung im Homocysteinstoffwechsel deutlich erhöhte Liquor-Homocysteinkonzentrationen aufweisen.

Wesentlich empfindlicher ist die Methode nach Quinn et al.⁷⁶, nach der Homocystein mit dem Fluoreszenzmarker SBDF (4-Sulfo-7-Fluor-Benzofurazan) umgesetzt und anschließend auf einer Microbore-Säule (Säule mit einem Innendurchmesser von ca. 1 mm) von anderen Thiolen getrennt wird (s. Tab. 4-3). Leider liegen auch zu dieser Methode nur wenige Informationen zur Validierung vor, so dass auch sie nur in begrenztem Umfang beurteilt werden kann.

Nach der bis dato wohl empfindlichsten Methode wird Homocystein elektrochemisch (coulometrisch) detektiert²⁰⁴ (s. Tab. 4-3). Obwohl zur Bestimmung von Homocystein (und anderer Aminothiolen) im Plasma entwickelt und validiert, wird diese Methode mittlerweile auch zur Quantifizierung von Homocystein in Liquor eingesetzt²⁰⁵.

Tab. 4-3: Analytische Bestimmungsmethoden, die die Bestimmung von Homocystein in Liquor erlauben.

Referenz	Methode	LOD bzw. LLOQ	Anmerkungen
Hyland et al. (1992) ²⁰³	HPLC-FD (ME/OPA/IES*)	LOD: 80 nM LLOQ: ?	<ul style="list-style-type: none"> - Zeitintensive Probenvorbereitung - Fluoreszenzmarker ist nicht spezifisch für Thiole - Methode ist nicht empfindlich genug, HCY-Konzentrationen von Gesunden exakt zu quantifizieren - Keine Angaben zur Richtigkeit, Wiederfindung und Bestimmungsgrenze
Quinn et al. (1997) ⁷⁶	HPLC-FD (TBP/SBDF#)	LOD: ? LLOQ: 5 nM	<ul style="list-style-type: none"> - Keine Beurteilung der chromatographischen Trennung in der Matrix Liquor möglich - Sehr zeitintensive Probenvorbereitung - Keine Angaben zur Selektivität, Richtigkeit und Wiederfindung
Melnyk et al. (1999) ²⁰⁴	HPLC-ECD (NaBH ^x)	LOD: 5 pM LLOQ: ?	<ul style="list-style-type: none"> - Proteinfällung notwendig - Daten zur Validierung in Liquor sind nicht bekannt - ECD ist relativ teuer und störanfällig²⁰⁴

* Reduktionsmittel: Mercaptoethanol (ME), Derivatisierungsreagenz: *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA), Reagenz zur Maskierung der Thiolgruppe: Iodessigsäure (IES)

Reduktionsmittel: Tributylphosphin, Derivatisierungsreagenz: 4-Sulfo-7-Fluor-Benzofurazan (SBDF)

x Reduktionsmittel: Natriumborhydrid (NBH)

Von Nachteil ist bei diesem Bestimmungsverfahren, dass auch bei der Analyse von Liquorproben eine zeit- und kostenintensive Proteinfällung notwendig ist, um eine Schädigung der coulometrischen Messzelle zu vermeiden²⁰⁵. Um die oben erwähnte Empfindlichkeit zu erreichen, sind absolut hochreine Lösungsmittel, ein kontinuierliches Entgasen der mobilen Phase mit Helium, äußerst pulsationsarme Pumpen sowie ein Pulsdämpfer notwendig²⁰⁴.

Von den drei aufgeführten Methoden besteht die Methode nach Quinn et al., die eine leicht abgeänderte Variante der Methode von Araki et al.¹⁷⁴ darstellt, durch ihre

Einfachheit bei gleichzeitig guter Empfindlichkeit und niedrigen Kosten. Dies war der Grund dafür, eine vergleichbare Methode zur simultanen Bestimmung von Homocystein, Cystein und Glutathion im Liquor aufzubauen.

Für die Derivatisierung wurde nicht SBDF, sondern das Benzofurazanderivat ABDF (4-(Aminosulfonyl)-7-Fluor-Benzofurazan) verwendet, das wie SBDF keine Eigenfluoreszenz zeigt. ABDF besitzt eine hohe Selektivität gegenüber Thiolen, aber im Vergleich zu SBDF eine deutlich höhere Reaktivität: während zur Derivatisierung von Thiolverbindungen mit SBDF eine 60-minütige Inkubationszeit bei 60 °C und pH 9,5 von Nöten ist²⁰⁶, reichen im Falle von ABDF bereits 10 min bei 50 °C und pH 8,0¹⁷³. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass bei Verwendung von ABDF die Empfindlichkeit höher^{207,208} und die Produkte stabiler sind als im Falle von SBDF²⁰⁹.

Die Trennung der Aminothiolderivate wurde durch einen binären Gradienten (0,1 M Phosphatpuffer, pH 2,0 und Acetonitril) optimiert. Aufgrund der hohen Selektivität des eingesetzten Fluoreszenzmarkers wurden, trotz der hohen Empfindlichkeit, vergleichsweise wenige Substanzen detektiert (s. Abb. 3-12), wodurch sich die Trennung der Aminothiolderivate als recht unkompliziert erwies. Erwartungsgemäß ließen sich die Retentionszeiten leicht anhand des Acetonitrilanteils in der mobilen Phase steuern, wobei ein höherer Acetonitrilanteil die Retentionszeiten verkürzte. Das Gradientenprogramm C (s. Tab. 2-5) erlaubte die selektive Bestimmung von Homocystein, Cystein, Glutathion und *N*-Acetylcystein (interner Standard) in einer Zeit von 20 min (s. Abb. 3-12 und Abb. 3-14).

Um die Methode so empfindlich wie möglich zu gestalten, wurden

- die optimalen Derivatisierungsbedingungen für die Matrix Liquor ermittelt (s. Kap. 3.2.1)
- möglichst konzentrierte Lösungen verwendet, um eine Verdünnen der Messprobe weitestgehend zu vermeiden (s. Kap. 2.3.2)
- ein möglichst großes Injektionsvolumen gewählt (150 µL)
- der pH-Wert der mobilen Phase auf pH 2,0 eingestellt, weil bei diesem pH-Wert die Fluoreszenz der gebildeten Aminothiolderivate maximal groß ist¹⁷³

- und ein sehr empfindlicher Fluoreszenzdetektor verwendet (FL-7480, Merck-Hitachi).

Mit diesen Maßnahmen wurde, für Homocystein, ein LOD von 1,9 nM erzielt. Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde bei 50 nM festgelegt. Die entwickelte Methode ist somit empfindlicher als die Methode von Hyland et al., aber weniger empfindlich als die Methode nach Quinn et al., bei der anstatt ABDF das Benzofurazan SBDF zur Derivatisierung eingesetzt wird.

Es wurde gezeigt, dass der Arbeitsbereich durch einfaches Verdünnen konzentrierter Liquorproben erweitert werden kann. Dieses Vorgehen war notwendig, um die zum Teil deutlich erhöhten Cystein- bzw. Glutathionkonzentrationen einiger Patienten zu bestimmen.

Die gute Within- bzw. Between-day-Präzision der Methode (s. Kap. 3.2.2.5) ist auf die hohe Stabilität der derivatisierten Aminothiole und den internen Standard zurückzuführen. Er kompensiert Fehler, die beim Pipettieren oder bei der Injektion auftreten können, sowie Fehler, die durch nicht exakt eingehaltene Zeiten im Rahmen der Reduktion und Derivatisierung entstehen können.

Insgesamt ist die Methode hinreichend empfindlich, um Homocystein im Liquor von Erwachsenen zu bestimmen und – wie die kapillarelektrophoretische Methode – nach international anerkannten Kriterien vollständig validiert. Alle untersuchten Validierungsparameter genügten den Anforderungen, die an eine bioanalytische Methode gestellt werden¹⁷¹.

Um die sehr niedrigen Homocysteinkonzentrationen im Liquor gesunder Kinder, die nach eigenen Untersuchungen nur ungefähr halb so hoch sind wie die von Erwachsenen, exakt zu bestimmen, wäre eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit notwendig. Sie ließe sich bei dieser Methode nur mit einem noch empfindlicheren Fluoreszenzdetektor realisieren.

4.3 Einfluss einer hochdosierten MTX-Chemotherapie auf den Stoffwechsel des Homocysteins

4.3.1 Untersuchungen an pädiatrischen Patienten mit ALL

Die Studie „Total XV“ geht unter anderem der Fragestellung nach, ob Homocystein einen Biomarker für die MTX-induzierte Neurotoxizität darstellt oder nicht. Die Vorläuferstudie („Total XIV“), die an 53 pädiatrischen ALL-Patienten durchgeführt wurde, ließ erkennen, dass Kinder, die unter einer akuten Neurotoxizität litten, tendentiell höhere Homocysteinkonzentrationen im Plasma besaßen als Kinder ohne neurotoxische Symptome¹⁵⁶. Da die Inzidenz der Neurotoxizität unter „Total XIV“ relativ niedrig war, sollen in die laufende Studie „Total XV“ mindestens 1000 Patienten eingeschlossen werden. Sie wird voraussichtlich Ende 2006 abgeschlossen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von insgesamt 116 Patienten der „Total XV-Studie“ Plasma- und Liquorproben analysiert; die Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert. Aus statistischen Gründen wurde davon Abstand genommen, bei dieser Zwischenauswertung Zusammenhänge zwischen erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Plasma- bzw. Liquor und neurotoxischen Symptomen zu untersuchen. Diese Evaluation wird erst nach Beendigung der Studie in Kooperation mit Prof. M. Relling durchgeführt werden.

Homocysteinkonzentrationen im Plasma der ALL-Patienten

Die Plasma-Homocysteinkonzentrationen der ALL-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose (Median: 4,48 μM) lagen in einem Bereich, der als normal anzusehen ist^{11,12}. Allerdings wiesen fünf der 65 untersuchten Patienten (Pat. 6, 13, 14, 60 und 63, s. Anhang A) zu Beginn der Chemotherapie erhöhte Homocysteinkonzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) auf, die sich nach der Remission/Induktion normalisierten. Vermutlich hatten diese Patienten zu Beginn der Therapie eine besonders hohe Tumorlast. Kishi et al. zeigten, dass die Plasma-Homocysteinkonzentration von ALL-Patienten mit der Zahl der weißen Blutkörperchen korreliert und stellten die Hypothese auf, dass ein tumorinduzierter Mangel an reduzierten Folaten das Ansteigen der Homocysteinkonzentration bedingte¹⁵⁶.

Die Plasma-Homocysteinkonzentrationen, die am ersten Tag der Konsolidierung (Zeitpunkt C1), also nach der Phase der Remission/Induktion, gemessen wurden, lagen in der gleichen Größenordnung wie die Konzentrationen vor der Chemotherapie. Somit wurden – im Gegensatz zur Vorläuferstudie „Total XIV“ – nach dem ersten Therapieabschnitt keine signifikanten Änderungen der Homocysteinkonzentration beobachtet. Aufgrund voranstehender Erläuterungen scheint es plausibel, dass die ALL-Patienten dieser Studie zu Beginn der Therapie eine niedrigere Tumorlast hatten. Informationen zur Leukozytenzahl lagen leider nicht vor.

Die hochdosierten MTX-Infusionen der Konsolidierung führten zu einem deutlichen Anstieg des Homocysteins im Plasma. Bereits 23 Stunden nach Beginn der 24-stündigen MTX-Infusionen waren die Homocysteinkonzentrationen im Plasma signifikant erhöht. Ein weiterer Anstieg der Homocysteinkonzentrationen wurde über die folgenden 19 Stunden beobachtet: die 42-Stunden-Werte waren signifikant höher als die, die zur 23. Stunde der MTX-Infusion ermittelt wurden. Die prozentuale Erhöhung der Homocysteinkonzentration zur Stunde 23 betrug 67,3 bzw. 71,3 % (C1h23, C15h23) und 86,5 bzw. 103,9 % (C1h42, C15h42) zur Stunde 42. Da die Rescue-Therapie erst 42 Stunden nach Beginn der MTX-Infusionen eingeleitet wurde, wurde der Anstieg der Homocysteinkonzentration in Abwesenheit von Calciumfolinat verfolgt.

Studien mit kleineren, zum Teil recht heterogenen Patientenkollektiven führten zu ähnlichen Ergebnissen (s. Tab. 4-4). Auffällig ist allerdings, dass bereits 10-25 mg MTX (oral oder intramuskulär verabreicht) ähnlich hohe Homocysteinkonzentrationen induzierten wie HDMTX ($1-33,6 \text{ g/m}^2$)¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Die offensichtlich fehlende Dosisabhängigkeit wurde von Refsum et al. darauf zurückgeführt, dass die Dauer der MTX-Exposition (bis zur Rescue-Therapie mit Calciumfolinat) unterschiedlich war, Homocystein auch über folatunabhängige Enzymsysteme verstoffwechselt werden kann (Betain-Homocystein-Methyltransferase, Cystathionin- β -Synthase), zytotoxische MTX-Konzentrationen den Efflux von Homocystein aus Zellen inhibieren und die renale Elimination des Homocysteins durch MTX beeinflusst wird^{158,210}. Letzterer Aspekt konnte von Guttormsen et al. widerlegt werden²¹¹.

Tab. 4-4: Homocysteinkonzentrationen im Plasma von Patienten, die mit MTX behandelt wurden.

Referenz	Patienten	Dosis der MTX-Infusion	Beginn des Rescue	Zeitpunkt d. Probenentnahme nach MTX	HCY-Konz. [μM]	Veränderung [%]	Analyt. Methode
Refsum et al. (1986) ¹⁵⁷	5 NHL-Pat. ; 1 Pat. mit Ewing-sarkom	1-13,6 g/m ² über 2-4 h	24 h nach HDMTX	vor HDMTX 24 h 48 h	6,4* 9,1* 6,1*	42,2 -4,7	Radio-Immuno-Assay ²¹²
Refsum et al. (1989) ¹⁵⁸	13 Psoriasis-Pat.	25 mg IM/ 10 mg PO (wöchentl.)	---	vor LDMTX 1-3 Tage nach LDMTX ^x	14,7 [#] 20,1 [#]	36,7	Radio-Immuno-Assay ²¹²
Broxson et al. (1989) ²¹³	6 ALL-Patienten	33,6 g/m ² über 24 h	36 h nach HDMTX	vor HDMTX	5,2 [#]		GC-MS ²¹⁴
				6 h	5,3 [#]	1,9	
				24 h	6,6 [#]	26,9	
				36 h	7,8 [#]	50,0	
				48 h	6,9 [#]	32,6	
				72 h	5,6 [#]	7,7	
	5 Osteosarkom-Pat.	8 g/m ² über 4 h	24 h nach HDMTX	vor HDMTX	9,9 [#]		
				4,5 h	11,9 [#]	20,2	
				24 h	15,2 [#]	53,5	
				48 h	12,3 [#]	24,2	
Refsum et al. (1991) ¹⁵⁹	12 ALL-Pat.	8 g/m ² über 24 h/ 3-6 mg IT	36 h nach HDMTX	vor HDMTX	5,8 [#]		HPLC-FD ²¹⁵
				24 h	7,4 [#]	27,6	
				36 h	8,3 [#]	43,1	
				48 h	7,1 [#]	22,4	
				72 h	6,4 [#]	10,3	
Kishi et al. (2003) ¹⁵⁶	53 ALL-Pat.	2,5-5 g/m ² über 24 h/ 8-12 mg IT	44 h nach HDMTX	vor HDMTX	5,8*		HPLC-FD ¹⁷⁴
				23 h	9,0*	55,2	
				44 h	10,1*	74,1	
Diese Studie	65 ALL-Pat.	2,5-5 g/m ² über 24 h/ 8-12 mg IT	42 h nach HDMTX	vor HDMTX (Konsolid. 1)	4,7*		FPIA
				23 h	7,8*	65,9	
				42 h	8,7*	85,1	
				vor HDMTX (Konsolid. 2)	4,6*		
				23 h	7,9*	71,7	
				42 h	9,4*	104,3	

* Median; # Mittelwert

^x Für die Auswertung wurden nur die jeweils höchsten Homocysteinkonzentration, die 1-3 Tage nach LDMTX gemessen wurden, berücksichtigt

Vor dem Hintergrund der fehlenden Dosisabhängigkeit ist auch erwähnenswert, dass Psoriasis-Patienten, die *keinen* Calciumfolinat-Rescue verabreicht bekamen, recht unterschiedlich auf MTX reagierten. Während bei einigen dieser Patienten bereits innerhalb von 24 Stunden maximal hohe Plasma-Homocysteinkonzentrationen beobachtet wurden (schnelle Responder) wurden bei anderen erst nach ca. drei Tagen Homocystein-Spitzenkonzentrationen registriert (langsame Responder)¹⁵⁸. Aufgrund dieser Tatsache ist plausibel, dass auch Patienten, die unter einer Hochdosis-Chemotherapie mit MTX stehen, erst mehrere Tage nach der Gabe von MTX maximal hohe Homocysteinkonzentrationen im Plasma aufweisen würden, wenn nicht Calciumfolinat, welches rasch den Mangel an N⁵-Methyl-THF ausgleicht, verabreicht werden würde. Unter den Gegebenheiten der bisherigen Studien sind somit dosisabhängige Effekte kaum herauszuarbeiten. Die Frage, wann maximal hohe Homocysteinkonzentrationen nach HDMTX erreicht werden, kann nur anhand von Therapieprotokollen beantwortet werden, die nicht Calciumfolinat, sondern Thymidin zur Rescuebehandlung vorsehen²¹⁶.

Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass bei den meisten Patienten die Homocysteinkonzentrationen 42 Stunden nach HDMTX deutlich höher waren als 23 Stunden nach HDMTX, was die Vermutung zulässt, dass bei diesen Personen die maximale Response zur Zeit der zweiten Probenentnahme noch nicht erreicht wurde. Allerdings wurden bei fünf der 65 Patienten bei beiden MTX-Infusionen der Konsolidierung zur Zeit der ersten Probenentnahme (23-Stunden-Wert) höhere Homocysteinkonzentrationen gemessen als zur Zeit der zweiten (42-Stunden-Wert). Diese – nach Refsum – schnellen Responder müssen in der Lage sein, Homocystein effizienter zu metabolisieren bzw. auszuscheiden als die langsamen Responder.

Bislang undiskutiert ist auch die Frage, ob niedrige MTX-Dosen (10-100 mg) bezüglich der Homocystein-Plasmakonzentration ähnliche Veränderungen hervorrufen können wie hohe (> 1 g/m²). Die Frage ist nicht unberechtigt, wenn man bedenkt, dass MTX-Konzentrationen von ~0,01-0,1 nM eine 50%ige Hemmung der Dihydrofolatreduktase bewirken⁸³ und Kesavan et al. belegen konnte, dass bereits LDMTX (10-100 mg) rasch einen intrazellulären Mangel an N⁵-Methyl-THF hervorruft²¹⁷.

Nach vorhergehender Diskussion ist es nicht überraschend, dass auch im Rahmen der „Total XV-Studie“ LR- und SHR-Patienten, trotz unterschiedlich hoch dosierter

MTX-Infusionen ($2,5 \text{ g/m}^2$ bzw. 5 g/m^2), vergleichbare Anstiege der Homocystein-konzentration im Plasma zeigten und auch keine Korrelation zwischen der Exposition mit MTX (AUC) und den Homocysteinkonzentrationen der Proben, die 42 Stunden nach der MTX-Infusion gezogen wurden, ermittelt wurde. An dieser Stelle sei angemerkt, dass eine Korrelation zwischen der MTX-Exposition und der Homocysteinkonzentration wesentlich aussagekräftiger ist als eine Korrelation zwischen der MTX-Dosis und der Homocysteinkonzentration, da gleiche MTX-Dosen selbst bei dem gleichen Patienten zu stark unterschiedlichen Plasmakonzentrationen führen können.

Erwartungsgemäß wurden zwei Wochen nach der ersten MTX-Infusion der Konsolidierung vergleichbar hohe Homocysteinkonzentrationen bestimmt wie vor der MTX-Infusion, da 18 Stunden nach Ende der MTX-Infusion eine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat eingeleitet wurde. Sowohl Broxson et al.¹⁵⁵, als auch Refsum et al.^{157,159} konnten herausstellen, dass die Gabe von Calciumfolinat eine rasche Normalisierung der Plasma-Homocysteinkonzentration bewirkt (s. Tab. 4-4).

Die zweite MTX-Infusion der Konsolidierung führte zu einem ähnlich ausgeprägten Response (Anstieg der Homocysteinkonzentration) wie die vorausgehende MTX-Infusion. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Beobachtungen von Refsum et al., die bei acht hochdosierten MTX-Infusionen jeweils vergleichbar hohe Anstiege der Homocysteinkonzentration im Plasma registrierten¹⁵⁹. Beide Untersuchungen sprechen dafür, dass nach wiederholter MTX-Gabe keine adaptiven Mechanismen zum Tragen kommen, die die (indirekt) hemmende Wirkung von MTX auf die Methioninsynthase abschwächen oder die (folatunabhängige) Verstoffwechslung oder Ausscheidung von Homocystein erhöhen.

Bei einigen Patienten (z.B. Pat. 2, 6, 12 und 42) wurde nach HDMTX ein besonders drastischer Anstieg der Homocysteinkonzentration beobachtet. Diese Patienten hatten auch vor Verabreichung der MTX-Infusion deutlich höhere Homocysteinkonzentrationen als die anderen Patienten. Möglicherweise besaßen diese Patienten angeborene Störungen im Bereich des Homocysteinstoffwechsels und/oder einen ausgeprägten Mangel an B-Vitaminen (s. hierzu auch Kap. 1.1.2).

Homocysteinkonzentrationen im Liquor der ALL-Patienten

Zur Zeit der Diagnose wurden im Liquor der ALL-Patienten sehr niedrige Homocysteinkonzentrationen gemessen. Sie lagen in der Regel unter der Bestimmungsgrenze der entwickelten HPLC-Methode (50 nM). Ob diese Werte Normwerte darstellen, lässt sich bei dem heutigen Kenntnisstand nur schwer abschätzen, da „normale“ Liquor-Homocysteinkonzentrationen bislang kaum publiziert wurden. Dies hängt zum einen damit zusammen, dass aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen im Liquor nur wenige analytische Methoden zur Verfügung stehen, die die Bestimmung im Liquor erlauben und zum anderen Liquor – abgesehen von wenigen Ausnahmen – aus ethischen Gründen nur zu diagnostischen Zwecken entnommen werden darf (jede Lumbalpunktion ist mit Risiken verbunden und erfordert einen stationären Aufenthalt). Eine Zusammenfassung der bis dato veröffentlichten Liquor-Homocysteinkonzentrationen zeigt Tab. 4-5. Diese Daten sind durchaus kritisch zu hinterfragen, da die eingesetzten analytischen Methoden oftmals nur in begrenztem Ausmaß geeignet waren, die niedrigen Homocysteinkonzentrationen im Liquor exakt zu quantifizieren (s. hierzu auch Kapitel 4.2). Den bisher veröffentlichten Daten zufolge, scheinen Erwachsene tendenziell etwas höhere Homocysteinkonzentrationen zu besitzen als Kinder. Ausgeprägter Folat- bzw. Vitamin B₁₂-Mangel^{184,218}, sowie ein Mangel der Cystathionin-β-Synthase⁵² kann mit deutlich erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Liquor verbunden sein.

Die ermittelten Homocysteinkonzentrationen der ALL-Patienten, die zwischen 1,9 und 16,3 Jahren alt waren, liegen in der gleichen Größenordnung wie die Liquor-Homocysteinkonzentrationen, die van Hove et al.²⁰¹ bei Kindern bestimmte, die sich aus diagnostischen Gründen einer Lumbalpunktion unterziehen mussten (20-80 nM). Auch Surtees et al. zeigten, dass die Homocysteinkonzentrationen von Kindern, die weder eine Störung im Bereich des Homocysteinstoffwechsels noch einen Mangel an B-Vitaminen hatten, durchweg unter 100 nM liegen⁵². Der recht hohe Referenzwert (210 nM), den Quinn et al.⁷⁶ publizierten, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ein Großteil der untersuchten Liquores von Kindern stammte, bei denen eine Leukämie diagnostiziert wurde. Da diese Kinder – wie erwähnt – häufig erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma aufweisen, ist nicht auszuschließen, dass auch in dem von Quinn et al. untersuchten Kollektiv viele Kinder anormal hohe

Tab. 4-5: Bislang publizierte Homocysteinkonzentrationen im Liquor von Kindern und Erwachsenen.

Referenz	Patienten	Erkrankung	HCY-Konz. [nM]	Analyt. Methode
Stabler et al. (1991) ²¹⁸	4 Erwachsene	Spinocerebellare Degeneration (Vit. B ₁₂ -Mangel)	500-3000	GC-MS ^{214, *1}
Hyland et al. (1992) ²⁰³	9 Erwachsene	Neurologische Erkrankung ^{#3}	280-660 (Median: 460)	HPLC-FD ^{203, #1}
Blom et al. (1993) ²⁰²	6 Erwachsene	Neurologische Erkrankung ^{#3}	7-20	HPLC-FD ^{215, X1}
Castagna et al. (1995) ²¹⁹	18 Erwachsene	Neurologische Erkrankung ^{#3}	Median: 88	HPLC-FD ^{220, *2}
	18 Erwachsene	Neurologische Erkrankung ^{#3}	15-140	
Bottiglieri et al. (1996) ¹⁸⁴	1 Erwachsener	Folatmangel	493	Keine Angaben
	4 Erwachsene	Spinocerebellare Degeneration (Vit. B ₁₂ -Mangel)	1377-4732	
Surtees et al. (1997) ^{52,52}	5 Kinder	Klassische Homocystinurie	Median: 1180 (Median:320) ^{#2}	Radioenzymatische Methode (RIA) ^{X2}
	27 Kinder	Neurologische Erkrankung ^{#3}	< 100	
Quinn et al. (1997) ⁷⁶	34 Kinder	ALL ^{X3} /Neurologische Erkrankung	3-700 (Median: 210)	HPLC-FD ^{76, *3}
van Hove et al. (1998) ²⁰¹	13 Kinder	Neurologische Erkrankung ^{#3}	20-80	HPLC-FD ^{220, *2}

*1 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie, LOD der Methode: 200 nM;

#1 Reduktionsmittel: Mercaptoethanol, Derivatisierungsreagenz: o-Phthaldialdehyd/Iodessigsäure; LOD der Methode: 80 nM (s. Tab. 4-3)

X1 Reduktionsmittel: Natriumborhydrid, Derivatisierungsreagenz: Monobrombiman; keine Angaben zur Validierung der Methode

*2 Reduktionsmittel: Tributylphosphin, Derivatisierungsreagenz: SBDF; keine Angaben zur Validierung der Methode

#2 nach Betainbehandlung

X2 LOD der Methode: 100 nM

*3 Reduktionsmittel: Tributylphosphin, Derivatisierungsreagenz: SBDF (s. hierzu auch Tab. 4-3)

#3 Keine mit dem Homocysteinestoffwechsel assoziierte Erkrankung; ^{X3} Zur Zeit der Diagnose

Liquor-Homocysteinkonzentrationen besaßen. Die eigenen Untersuchungen geben hierfür ebenfalls Hinweise, denn bei drei der insgesamt 65 untersuchten ALL-Patienten wurden zur Zeit der Diagnose auch im Liquor deutlich erhöhte Homocysteinkonzentrationen (> 125 nM) gemessen, die sich nach der zytoreduktiven Remission/Induktion normalisierten.

Bei den 17 Patienten, von denen sowohl Plasma- als auch Liquorproben zur Verfügung standen, wurde keine Korrelation zwischen den Homocysteinkonzentrationen im Plasma und Liquor (Untersuchungszeitpunkte RI, C1 und C15) ermittelt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis von Kishi et al., die diesbezüglich bei insgesamt 53 ALL-Patienten ebenfalls keinen Zusammenhang finden konnten¹⁵⁶.

Zwischen den Homocysteinkonzentrationen der vier Untersuchungszeitpunkte (s. Abb. 2-11) wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Höchst wahrscheinlich bedingten der Calciumfolinat-Rescue, sowie die relativ großen Zeitabstände zwischen HDMTX bzw. ITMTX und Probenziehung, dass zu den Zeitpunkten C1, C8 und C15 keine erhöhten Homocysteinkonzentrationen gemessen wurden. Die Daten, die im Rahmen der Untersuchung der Lymphompatienten gewonnen wurden (s. Kap. 4.3.2) bekräftigen diese Vermutung. Zum Untersuchungszeitpunkt C1 lag die letzte intrathekale MTX-Gabe mindestens 3 Wochen, die letzte intravenöse Gabe (Upfront-HDMTX) etwa sieben Wochen zurück; bezogen auf die Zeitpunkte C8 und C15 lag die letzte MTX-Gabe (HDMTX/ITMTX) ein bzw. zwei Wochen zurück. Tendenziell wurden in den 17 Proben, die eine Woche nach der ersten MTX-Infusion der Konsolidierung gezogen wurden, leicht erhöhte Homocysteinkonzentrationen gefunden. Leider war es aus ethischen Gründen nicht möglich, weitere Liquorproben zu entnehmen, die zeitlich gesehen näher an vorausgehenden HDMTX-Infusionen gelegen hätten²²¹.

Auch Kishi et al. konnten in der Vorläuferstudie „Total XIV“ keine signifikanten Unterschiede der Homocysteinkonzentration während der Therapie mit MTX beobachten. Die gemessenen Homocysteinkonzentrationen waren – eventuell durch die andere analytische Bestimmungsmethode bedingt – durchweg höher als die, die im Rahmen der eigenen Studie bestimmt wurden (s. Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Homocysteinkonzentrationen im Liquor von Patienten, die zur Therapie onkologischer Erkrankungen mit MTX behandelt wurden.

Referenz	Patienten	Dosierung/ Applikation von MTX	Rescue nach MTX	Zeitpunkt d. Proben- entnahme	Mediane HCY- Konz. [nM]	Analyt. Methode
Quinn et al. (1997) ⁷⁶	23 ALL-Patienten/ 1 Pat. mit Neuroblastom	100 mg/m ² IV bis 2 g/m ² IV	k.A.	In der Regel 1 Woche nach MTX-Gabe	567 (8-3862)	HPLC-FD ⁷⁶
Drachtman et al. (2002) ¹⁶⁰	9 Pat. mit akuter/ subakuter Neurotoxizität (13-32 Jahre)	12 g/m ² IV (2 Osteosarkom-Pat.) 12 mg IT (NHL-Pat.) 100 mg/m ² / 12 mg IT bzw. 1 g/m ² / 7,5 mg ICV (2 ALL-Pat.)	k.A.	2-12 Tage nach MTX-Gabe	925 (340-4710)	HPLC-ECD ²⁰⁴
	10 asymptomatische Patienten	k.A.	k.A.	k.A.	201 (170-980)	
Kishi et al. (2003) ¹⁶²	53 ALL-Patienten (0-18 Jahre)	2,5-5 g/m ² IV über 24 h/ 8-12 mg IT	5 Dosen Calciumfolinat à 10 bzw. 15 mg/m ²	vor HDMTX 7 Tage u. 14 Tage nach HDMTX	~98* ~100* ~104*	HPLC-FD ⁷⁶
Quinn et al. (2004) ²²²	1 ALL-Patient (4 Jahre)	2 mg/Tag ICV an drei aufeinanderfolgenden Tagen (2 Zyklen)	---	vor 1. ICVMTX vor 2. ICVMTX vor 3. ICVMTX	~240* (~250*) ^x ~700* (~850*) ^x ~800* (~900*) ^x	HPLC-FD ⁷⁶
Diese Studie	65 ALL-Patienten	2,5-5 g/m ² IV über 24h/ 8-12 mg IT	5 Dosen Calciumfolinat à 10 bzw. 15 mg/m ²	vor HDMTX 7 Tage u. 14 Tage nach HDMTX	~32# 62# ~35#	HPLC-FD

* Exakte Konzentrationen wurden nicht angegeben, die aufgeführten Konzentrationen wurden graphischen Darstellungen entnommen; # LLOQ: 50 nM; ^x zweiter Zyklus

In der Tab. 4-6 finden sich auch die Ergebnisse weiterer Untersuchungen, die ebenfalls der Frage nachgingen, ob MTX die Homocysteinkonzentration im Liquor ansteigen lässt.

Quinn et al. (1997) zeigten, dass Kinder ein bis sieben Tage nach einer Therapie mit MTX höhere Homocysteinkonzentrationen im Liquor aufwiesen (Median: 567 nM) als Kinder einer Kontrollgruppe, die nicht mit MTX behandelt wurden (Median: 210 nM)⁷⁶. Leider gibt die Studie wenig Aufschluss darüber, ob MTX oder andere Parameter für die erhöhten Homocysteinkonzentrationen verantwortlich waren, da vor der Chemotherapie mit MTX keine Liquoranalysen durchgeführt wurden und zudem weder die genauen Zeitpunkte der Probenentnahme im Hinblick auf die vorausgehende MTX-Gabe noch Informationen zum Calciumfolinat-Rescue berichtet wurden.

Aus selbigen Gründen erlaubt auch die retrospektive Untersuchung nach Drachtman et al.¹⁶⁰ keine Aussage darüber, ob MTX einen Anstieg der Homocysteinkonzentration im Liquor induziert. Das Hauptergebnis der Studie, Patienten mit akuter bzw. subakuter Neurotoxizität zeigen höhere Liquor-Homocysteinkonzentrationen als asymptotische Patienten, ist kritisch zu hinterfragen, da zum zeitlichen Bezug zwischen Liquoranalyse und dem Auftreten der neurotoxischen Symptome keine näheren Angaben gemacht werden und Informationen zur Kontrollgruppe völlig fehlen (s. hierzu auch Kapitel 4.4).

Lediglich der Fallbericht von Quinn et al. (2004)²²² konnte Hinweise darauf geben, dass MTX (intraventriculär verabreicht) zu einem Anstieg der Homocysteinkonzentration im Liquor führt. Bei zwei Behandlungszyklen wurden jeweils einen Tag nach ICVMTX ungefähr dreimal so hohe Homocysteinkonzentrationen gemessen wie vor MTX-Gabe.

Bei der Interpretation von Homocysteinkonzentrationen im Liquor muss erwähnt werden, dass eine Kontamination der Liquorprobe mit Blut zu beträchtlichen Fehlern führen kann. Bedenkt man, dass die Homocysteinkonzentrationen im Plasma mehr als 100-mal höher sind als im Liquor, so können schon wenige μL Blut große Mengen an Homocystein in die Liquorprobe eintragen. Um diesen Fehler zu minimieren sollten Liquorproben nach der Gewinnung *sofort* zentrifugiert werden, um eventuell vorhandene Erythrocyten, die besonders viel Homocystein enthalten²²³,

abzutrennen. Des Weiteren ist zu bedenken, dass leichte Schrankenstörungen, die nicht selten bei cerebrospinaler Aussaat von Tumorzellen vorkommen, ebenfalls erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Liquor bedingen können. Daher sollte idealerweise zu jedem Zeitpunkt der Liquorentnahme auch die Schrankenfunktion charakterisiert sein (z.B. anhand des Albuminquotienten).

Die extrem hohen Homocysteinkonzentrationen, die in den Liquorproben der Patienten 76, 85, 99, 105 und 111 gemessen wurden, sind höchstwahrscheinlich auf eine dieser beiden (oder beide) Fehlerquellen und nicht auf die Wirkung von MTX zurückzuführen, denn in den entsprechenden Liquorproben wurden gleichzeitig auch extrem hohe Cystein- und Glutathionkonzentrationen gemessen (s. Anhang A). Auch bezüglich dieser Substanzen werden bei Kindern im Plasma wesentlich höhere Konzentrationen gefunden als im Liquor: für Cystein beträgt der Quotient aus Plasma- und Liquorkonzentration ~ 100 , für Glutathion $\sim 40^{204,224}$. Leider lagen keine Informationen vor, anhand derer man die Blut-Hirn-Schranke hätte charakterisieren können. Die Tatsache, dass die Liquorproben, die sehr hohe Homocysteinkonzentrationen aufwiesen, leicht rötlich gefärbt waren und eine Zentrifugation der Proben nicht erfolgte, spricht dafür, dass diese Proben mit Blut kontaminiert waren. Da bei keinem der oben aufgeführten Patienten in durchweg allen Proben erhöhte Homocysteinkonzentrationen vorgefunden wurden, kann ausgeschlossen werden, dass genetische Defekte die hohen Homocysteinkonzentrationen bedingten.

Cystein- und Glutathionkonzentrationen im Liquor der ALL-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Daten zu Cystein- bzw. Glutathionkonzentrationen im Liquor von Kindern erhoben, die aufgrund einer onkologischen Erkrankung mit HDMTX therapiert wurden.

Die Quantifizierung dieser Substanzen erfolgte aus verschiedenen Gesichtspunkten. Cystein wurde bestimmt, um zu prüfen, ob eine MTX-induzierte Störung der Remethylierung mit einer gesteigerten Transsulfurierung einhergeht. In diesem Fall sollten nach HDMTX die Konzentrationen von Cystein, welches das Endprodukt der Transsulfurierung darstellt, zunächst im Plasma und anschließend auch im Liquor ansteigen. Da Cystein potentiell neurotoxisch ist⁷⁸⁻⁸⁰, könnten eventuell auch erhöhte Cysteinkonzentrationen neurologische Symptome hervorrufen, die man bei der Neurotoxizität von MTX beobachtet.

Glutathion wurde in die Liquoruntersuchungen einbezogen, da gezeigt wurde, dass neurotoxische Wirkungen des Homocysteins durch Glutathion deutlich abgeschwächt werden können^{69,70}. Es ist denkbar, dass bereits leicht erhöhte Homocystein-konzentrationen toxische Wirkungen hervorrufen, wenn gleichzeitig ein Mangel an Glutathion vorliegt.

Bei den 65 untersuchten Patienten der Studie „Total XV“ wurden weder bei den Cystein- noch bei den Glutathionkonzentrationen signifikante Änderungen beobachtet (s. Kap. 3.4.1). Die zum Teil deutlich erhöhten Cystein- und Glutathionkonzentrationen einiger Proben sind – wie bereits erläutert – vermutlich auf eine Kontamination mit Blut zurückzuführen. Abgesehen von diesen Ausreißern, lagen alle ermittelten Cystein- und Glutathionkonzentrationen in einem Bereich, der für Kinder als normal anzusehen ist²⁰¹.

Aufgrund der Tatsache, dass unter dem gegebenen Probenentnahmeschema der Studie „Total XV“ keine biochemischen Veränderungen bei der Analyse der Liquorproben beobachtet werden konnten, wurde in Absprache mit der Studienleitung beschlossen, auf weitere Liquoruntersuchungen zu verzichten.

Die Daten, die an insgesamt 65 ALL-Patienten erhoben wurden, zeigen, dass eine Woche nach Verabreichung einer hochdosierten MTX-Infusion (und anschließendem Calciumfolinat-Rescue) Homocystein und dessen Abbauprodukt Cystein im Liquor in normalen Konzentrationen vorliegen.

Um anhand von Liquorproben biochemische Veränderungen im Homocysteinstoffwechsel nach HDMTX untersuchen zu können, wäre ein engmaschigeres Probenentnahmeschema von Nöten. Da nach einer hochdosierten MTX-Therapie obligat eine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat eingeleitet wird und gezeigt wurde, dass Calciumfolinat schnell eine Senkung der erhöhten Homocysteinkonzentrationen bewirkt^{155,157,159}, sollte nach Möglichkeit vor Beginn der Rescue-Therapie eine Liquorprobe untersucht werden. Dieser Aspekt sollte bei zukünftigen Liquoranalysen berücksichtigt werden.

Es bleibt abzuwarten, ob diejenigen Patienten, die deutlich erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma aufwiesen, auch neurologische Komplikationen hatten.

4.3.2 Untersuchungen an Patienten mit PZNSL

Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, die Liquores der PZNSL-Patienten auf Substanzen des Homocysteinstoffwechsels zu untersuchen, die eine Rolle bei der Genese der MTX-induzierten Neurotoxizität spielen könnten (s. Kap. 1.3). Im Vordergrund stand hierbei die Frage, ob und in welchem Ausmaß MTX (intravenös oder intraventrikulär verabreicht) die Konzentrationen dieser Substanzen im Liquor beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf Homocystein und Cystein, sowie die oxidativen Metaboliten dieser beiden Aminosäuren gerichtet.

Da bezüglich Homocystein, aber auch bezüglich der schwefelhaltigen exzitatorischen Metaboliten (SEAA), kaum valide Daten zu „normalen“ Konzentrationen im Liquor existieren und von den untersuchten PZNSL-Patienten leider keine Liquorproben vor Therapiebeginn untersucht werden konnten (und somit keine Referenzwerte für dieses Kollektiv zur Verfügung standen), wurden zusätzlich die Liquores von Erwachsenen, die aus diagnostischen Gründen eine Lumbalpunktion erhielten, auf die oben genannten Substanzen untersucht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Liquoranalysen, die bei den Lymphompatienten vorgenommen wurden, diskutiert. Eine ausführliche Diskussion zum Verlauf der Methotrexat-, N⁵-Methyl-THF-, SAM- und SAH-Konzentrationen wird in der Dissertation von Frau S. Vezmar zu finden sein.

Homocysteinkonzentrationen im Liquor der PZNSL-Patienten

Anhand des Kollektivs der PZNSL-Patienten konnte erstmalig gezeigt werden, dass sowohl intravenös (3-5 g/m²) als auch intraventrikulär verabreichtes MTX (3 mg) einen deutlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration im Liquor bewirkt (s. Kap. 3.4.2).

Zieht man den Median der Homocysteinkonzentrationen, die jeweils am dritten Tag des Blocks C, also mindestens 14 Tage nach der letzten Applikation von MTX, gemessen wurden, als Referenzwert heran – er war mit 73,6 nM fast identisch mit dem Median der Homocysteinkonzentrationen der Kontrollgruppe (71,3 nM) – so

bedingte sowohl die intravenöse als auch die intraventrikuläre Gabe von MTX ungefähr eine Verdreifachung der Homocysteinkonzentrationen im Liquor.

Einen vergleichbar hohen Anstieg beobachteten Quinn et al. bei einem vier Jahre alten Kind, das 2 mg MTX intraventrikulär verabreicht bekam²²² (s. Tab. 4-6).

Die eigenen Untersuchungen, die an den PZNSL- und den ALL-Patienten (Studie „Total XV“) durchgeführt wurden, geben Hinweise darauf, dass HDMTX die Homocysteinkonzentration im Liquor stärker beeinflusst als die im Blut (bzw. Plasma), obwohl MTX nur in begrenztem Maße die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (im Steady-State betragen die MTX-Konzentrationen im Liquor in der Regel nur 1-5 % der Konzentrationen, die man im Plasma misst⁹⁰⁻⁹²). Während bei dem Kollektiv der ALL-Patienten 23 Stunden nach Beginn der 24-stündigen MTX-Infusion die Homocysteinkonzentrationen im Plasma nur moderat erhöht waren (65,9 bzw. 71,7 %, s. Tab. 4-4), führte – wie bereits erwähnt – die MTX-Infusion, die den PZNSL-Patienten verabreicht wurde, nach ca. 24 Stunden annähernd zu einer Verdreifachung der Homocysteinkonzentration im Liquor. Bei Patient 2 wurde einen Tag nach der MTX-Infusion des Blocks BII mit 725 nM eine Homocysteinkonzentration bestimmt, die sogar ca. 10-mal höher war als die „Referenzkonzentrationen“ zum Zeitpunkt CI3 (79,5 nM) bzw. CII3 (67,6 nM).

Der Grund für diesen unterschiedlich ausfallende Response liegt höchstwahrscheinlich darin, dass in neuronalen Geweben nur die Methioninsynthase zur Verstoffwechslung von Homocystein zur Verfügung steht^{13,14}. Wird dieses Enzym durch MTX inaktiviert, kann Homocystein nur noch im Rahmen der Liquorresorption, die hauptsächlich im Subarachnoidealraum des Rückenmarks stattfindet, aus dem zentralen Nervensystem entfernt werden. Für diese Theorie spricht auch die Tatsache, dass man bei Patienten mit ausgeprägtem Vitamin B₁₂-Mangel – Vitamin B₁₂ ist Cofaktor der Methioninsynthase – extrem hohe Homocysteinkonzentrationen im Liquor gefunden hat^{184,218} (s. Tab. 4-5).

Vermutlich waren limitierte Verstoffwechslungskapazitäten auch der Grund dafür, dass wiederholte intraventrikuläre Verabreichungen von MTX zu einer Akkumulation von Homocystein im Liquor führten (s. Abb. 3-28).

Erwartungsgemäß war der Anstieg der Homocysteinkonzentration im Block C besonders ausgeprägt, da in diesem kein Rescue mit Calciumfolinat erfolgte. Einen Tag nach der dritten intraventrikulären Gabe von MTX (Zeitpunkt C6) waren die

Homocysteinkonzentrationen 9,4-mal so hoch wie zu Beginn des Blocks C (Zeitpunkt C3). Die höchstsignifikante (gegenläufige) Korrelation, die zwischen den Homocystein- und den N⁵-Methyl-THF-Konzentrationen des Blocks C bestimmt wurde (s. Abb. 3-31), ist ein starkes Indiz, dass ein MTX-induzierter Mangel an N⁵-Methyl-THF die hohen Homocysteinkonzentrationen bedingte.

Überraschend war, dass die Lymphompatienten auch am dritten, vierten und fünften Tag der Blöcke A und B sehr hohe Homocysteinkonzentrationen im Liquor zeigten (s. Tab. 3-31), obwohl in diesen Blöcken aufgrund der initialen MTX-Infusion mit Beginn des dritten Tages eine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat eingeleitet wurde und dieser Rescue – wie in Anhang B ersichtlich – in aller Regel zu einer raschen Normalisierung der N⁵-Methyl-THF-Konzentrationen im Liquor führte. Noch überraschender war die Tatsache, dass die höchsten Homocysteinkonzentrationen der Blöcke A/B bei Patient 2 im Verlauf der Blöcke AII und BII beobachtet wurden. In diesen Therapieblöcken erhielt dieser Patient ab der 42. Stunde nach HDMTX (ca. 6 Stunden vor Ziehung der Probe AII3 bzw. BII3) einen intensivierten Calciumfolinat-Rescue, der bis zur 72. Stunde (kurz vor Ziehung der Probe AII4 bzw. BII4) fortgesetzt wurde. Diese Gegebenheiten bedingten, dass nur ein geringer Zusammenhang zwischen den N⁵-Methyl-THF- und den Homocysteinkonzentrationen gefunden wurde, ließ man auch die Daten der Therapieblöcke A und B in die Korrelationsanalyse einfließen (s. Kap. 3.4.2).

Dass größere Mengen an Homocystein trotz ausreichender Verfügbarkeit von N⁵-Methyl-THF offensichtlich nur in begrenztem Ausmaß metabolisiert werden können, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Methioninsynthase eine vergleichsweise niedrige Kapazität besitzt (sie ist ungefähr 200-mal niedriger als die mer Cystathionin- β -Synthase¹⁵) und deren Aktivität durch SAH, welches bei erhöhten Homocysteinkonzentrationen vermutlich ebenfalls vermehrt vorliegt (leider lagen die Ergebnisse der SAH-Analysen bei Fertigstellung der Arbeit noch nicht vor), gehemmt werden kann. Kishi et al. konnten anhand von ALL-Patienten zeigen, dass unter einer Chemotherapie mit MTX die SAH-Konzentrationen im Liquor ansteigen¹⁶².

Wahrscheinlicher ist, dass Homocystein aufgrund eines intrazellulären Mangels an N⁵-Methyl-THF nur unzureichend verstoffwechselt werden konnte. Vermutlich hatten die hohen extrazellulären MTX-Konzentrationen zur Folge, dass nur geringe Mengen

an N⁵-Methyl-THF in das Zellinnere gelangen konnten (MTX und reduzierte Folate konkurrieren um den gleichen Transporter (RFC) an der Zellmembran, s. Abb. 1-6). Eine direkte Hemmung der Methioninsynthase durch MTX oder MTX-PG kann ausgeschlossen werden, da Broxson et al. anhand von In-vitro-Versuchen zeigten, dass die humane Methioninsynthase weder durch MTX (10 µM) noch durch MTX-Heptaglutamat (10 µM), welches hauptsächlich im Rahmen der Polyglutamierung gebildet wird, gehemmt wird¹⁵⁵.

Die individuelle Analyse offenbarte, dass selbst in therapiegleichen Behandlungsblöcken (AI, AII, BI und BII sowie CI und CII) die Konzentrationsverläufe von Homocystein zum Teil recht unterschiedlich ausfielen. Bei Patient 1 wurden beispielsweise im Block CI wesentlich höhere Homocysteinkonzentrationen bestimmt als im Block CII und die Homocysteinkonzentrationen, die bei Patient 2 im Block AII und BII gemessen wurden, waren um ein Vielfaches höher als die des Blocks BI. Die Gründe hierfür mögen in einer unterschiedlichen Exposition mit MTX (Patient 1 wies im Block CI deutlich höhere MTX-Konzentrationen im Liquor auf als im Block CII), unterschiedlichen Aktivitäten der Methioninsynthase, einer unterschiedlichen Tumorlast (Informationen zur Anzahl der Leukozyten im Liquor lagen nicht vor) oder tumorbedingten Störungen der Liquorzirkulation liegen – um nur die wichtigsten zu nennen. Unwahrscheinlich ist, dass eine Kontamination mit Blut die differierenden Konzentrations-Zeit-Profile bedingte, da keine der analysierten Proben sichtbar kontaminiert war, alle Proben zur Abtrennung von Erythrocyten zentrifugiert wurden und auch die Cysteinkonzentrationen der Proben, die extrem hohe Homocysteinkonzentrationen besaßen, keine extrem hohen Cysteinkonzentrationen auswiesen (s. Anhang B). Den Befunden von MRT-Untersuchungen zufolge, wies nur Patient 3 während der Chemotherapie eine Störung der Blut-Liquor-Schranke auf. Da allerdings in allen Liquorproben dieses Patienten sowohl ein normaler Proteingehalt (0,14-0,31 g/L), als auch normale Cystein- und Glutathionkonzentrationen vorgefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die diagnostizierte Schrankenstörung nur schwach ausgeprägt war und keine klinische Relevanz besaß.

Die Homocysteinkonzentrationen, die im Liquor der PZNSL-Patienten im Verlauf der Therapieblöcke A/B, insbesondere aber im Block C, bestimmt wurden, liegen in der gleichen Größenordnung wie die Homocysteinkonzentrationen von Patienten mit Vitamin B₁₂- bzw. Folsäuremangel und ausgeprägten neurologischen Symptomen^{184,218} (s. Tab. 4-5). Wie lange die Patienten den hohen Homocysteinkonzentrationen exponiert waren, kann nicht beantwortet werden, da ethische Gründe weitere Liquorentnahmen nicht zuließen. Die Tatsache, dass zu Beginn der C-Blöcke Homocysteinkonzentrationen bestimmt wurden, die ähnlich hoch waren wie die der Kontrollgruppe (s. Tab. 3-31), lässt den Schluss zu, dass spätestens zwei Wochen nach Block B (und somit vermutlich auch nach Block A) die Homocysteinkonzentrationen wieder im Normbereich lagen. Höchstwahrscheinlich waren die Patienten in den C-Blöcken länger hohen Homocysteinkonzentrationen ausgesetzt als in den Blöcken A/B, da das Therapieprotokoll für die C-Blöcke keine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat vorsah.

Dass zwischen den im *Liquor* gemessenen MTX- und Homocysteinkonzentrationen ein geringer Zusammenhang gefunden wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Korrelation über einen recht großen Konzentrationsbereich von MTX untersucht wurde (0-10 µM) und Homocystein im ZNS nur durch die Methioninsynthase verstoffwechselt werden kann. Wie bereits mehrfach erläutert, steht zur Verstoffwechslung von Homocystein im ZNS weder die Cystathionin-β-Synthase noch die Betain-Homocystein-Methyltransferase zur Verfügung, so dass weder eine Betain-vermittelte Remethylierung noch eine Transsulfurierung im ZNS stattfinden kann.

Cystein- und Glutathionkonzentrationen im Liquor der PZNSL-Patienten

Bei den PZNSL-Patienten konnten trotz des engmaschigen Probenentnahmeschemas im Verlauf der Blöcke A/B, die eine hochdosierte MTX-Infusion beinhalteten, keine signifikanten Änderungen bezüglich der Cysteinkonzentrationen im Liquor festgestellt werden. Die Hypothese, dass eine MTX-induzierte Hemmung der Remethylierung mit einer gesteigerten Transsulfurierung in der Leber einhergeht und diese gesteigerte Transsulfurierung sich auch in erhöhten Liquor-Cysteinkonzentrationen niederschlägt⁷⁶, konnte anhand der Untersuchungen an den Lymphompatienten somit nicht bestätigt werden. Die Cysteinkonzentrationen der Liquorproben, die einen Tag nach HDMTX gezogen wurden (Proben A/B2) – sie hätten nach der Hypothese von Quinn et al.⁷⁶ besonders hoch sein müssen – waren sogar niedriger als die Cysteinkonzentrationen der übrigen Untersuchungszeitpunkte (s. Tab. 3-31).

Leider standen von den PZNSL-Patienten keine Plasmaproben nach HDMTX zur Verfügung, so dass nicht völlig auszuschließen ist, dass in den Blöcken A/B zeitweise erhöhte Cysteinkonzentrationen im Plasma der PZNSL-Patienten vorlagen. Da die Aktivität der CBS insbesondere durch SAM reguliert wird (hohe Konzentrationen an SAM steigern, niedrige Konzentrationen hingegen senken die Aktivität der CBS¹⁵) und nach Verabreichung von MTX SAM nur noch in begrenztem Ausmaß zur Verfügung steht^{154,162}, ist es unwahrscheinlich, dass HDMTX die Transsulfurierung induziert. Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass Broxson et al. bei einem Kollektiv von ALL- und Osteosarkompatienten 6, 24, 36, 48 und 72 Stunden nach Beginn einer 24-stündigen, hochdosierten MTX-Infusion keine Veränderungen bei den Cysteinkonzentrationen (Plasma) der Patienten beobachten konnte¹⁵⁵.

Erwartungsgemäß wurden auch im Verlauf der C-Blöcke keine signifikanten Veränderungen der Cysteinkonzentrationen beobachtet, da in diesen Behandlungsblöcken MTX ausschließlich intraventrikulär verabreicht wurde und daher hohe MTX-Konzentrationen nur im ZNS nicht aber im Blut erzielt wurden (nach ITMTX werden im Plasma MTX-Konzentrationen gemessen, die um mehr als das 100fache niedriger sind als die MTX-Konzentrationen im Liquor⁹⁴). Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass Homocystein im ZNS nicht transsulfuriert

werden kann, sollten die Cysteinkonzentration im Liquor nach intraventrikulärer Gabe nicht ansteigen.

Insgesamt gesehen lagen die Cysteinkonzentrationen der PZNSL-Patienten (der Median aller Cysteinkonzentrationen betrug $2,71 \mu\text{M}$) im Normbereich. Er liegt bei Erwachsenen ungefähr zwischen $1,5$ und $4,0 \mu\text{M}$ ²¹⁹. Unklar ist, warum mehrere Personen der Kontrollgruppe leicht erhöhte Cysteinkonzentrationen zeigten (s. Anhang C). Sowohl die Albuminquotienten als auch die ermittelten Zellzahlen in den Liquorproben dieser Personen lagen im Normbereich (s. Tab. 2-20). Eine Störung der Blut-Liquor-Schranke oder eine Kontamination der Liquorproben mit Blut kommt daher für die erhöhten Cysteinkonzentrationen nicht in Frage.

Auch bei den Glutathionkonzentrationen der PZNSL-Patienten konnten keine eindeutigen Veränderungen während der Chemotherapie registriert werden (s. Abb. 3-29). Interessanterweise besaßen alle vier PZNSL-Patienten signifikant höhere Glutathionkonzentrationen als die Personen der Kontrollgruppe (s. Kap. 3.4.2), die ihrerseits normale Glutathionkonzentrationen zeigten (Normbereich: $300-900 \text{ nM}$ ²¹⁹). Die Glutathionkonzentration des Liquors wird im Wesentlichen durch die Freisetzung von Glutathion aus Gliazellen (insbesondere den Astrocyten) und die Aktivität des Glutathion-abbauenden Enzyms γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GT), welches im ZNS in hohem Maße in den Endothelzellen des Choroid-Plexus und zerebraler Blutgefäße vorkommt, bestimmt²²⁵.

Erhöhte Glutathionkonzentrationen im Liquor werden insbesondere bei gesteigertem oxidativen Stress gefunden. Sagara et al. konnten zeigen, dass oxidativer Stress die Aufnahme von Cystein in Gliazellen erhöht und hierdurch bedingt die Biosynthese von Glutathion gesteigert wird²²⁵ (Cystein stellt in aller Regel den limitierenden Faktor der Glutathionsynthese dar). Da im Rahmen der Oxidation von Homocystein reaktive Sauerstoffspezies (ROS) anfallen^{68,70,71}, könnte eventuell die Akkumulation von Homocystein die erhöhten Glutathionkonzentrationen der PZNSL-Patienten bedingt haben. Eine gesteigerte Glutathionsynthese könnte somit einen adaptiven Mechanismus darstellen, neurotoxische Effekte des Homocysteins, die teilweise über ROS vermittelt werden (s. Kap. 1.1.4), abzufangen. Ein Zusammenhang zwischen den im Liquor gemessenen Homocystein- und Glutathionkonzentrationen konnte allerdings nicht gefunden werden (s. Kap. 3.4.2).

Die Abb. 4-2 zeigt die Entgiftung von Radikalen und Peroxiden durch Glutathion.

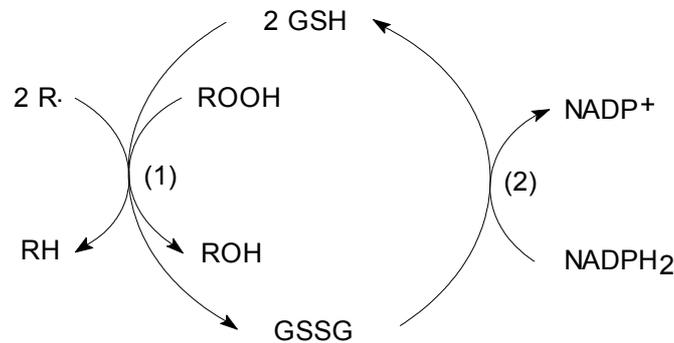


Abb. 4-2: Entgiftung von Radikalen (R) und Peroxiden ($ROOH$) durch Glutathion (GSH). Enzyme: (1): Glutathionperoxidase (GP), (2): Glutathionreduktase (GR).

Möglicherweise führte auch die intensive intraventrikuläre Chemotherapie mit Cytarabin, die den PZNSL-Patienten verabreicht wurde, zu einer höheren Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies und folglich zu einer verstärkten Glutathionsynthese. Geller et al. konnte anhand von In-vitro-Versuchen zeigen, dass unter Cytarabin vermehrt ROS gebildet werden und diese dazu beitragen, dass Cytarabin auch apoptotische Vorgänge induziert²²⁶.

SEAA im Liquor der PZNSL-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eindeutig gezeigt werden, dass MTX eine Anhäufung von Homocysteinsulfinsäure (HCSA) im Liquor von Krebspatienten verursachen kann.

Leider konnte aufgrund des Probenentnahmeschemas keine Aussage darüber gemacht werden, über welchen Zeitraum die Patienten mit dieser exzitatorischen Aminosäure exponiert waren. Dass HCSA in keiner Probe, die zum Zeitpunkt C3 gezogen wurde, detektiert wurde (s. Abb. 3-30), lässt lediglich den Schluss zu, dass nach einer Zeitspanne von zwei Wochen HCSA mehr oder weniger vollständig aus dem Liquor eliminiert wurde.

Unklar ist, warum HCSA nicht im Liquor des Patienten 1 nachgewiesen werden konnte, obwohl auch dieser Patient unter der Therapie mit MTX deutlich erhöhte Homocysteinkonzentrationen zeigte. Da HCSA *nicht* auf enzymatischem Weg

entsteht (bis dato wurde zumindest kein Enzym gefunden, welches die Bildung von HCSA katalysieren könnte), kann nur geschlussfolgert werden, dass bei diesem Patienten Bedingungen vorlagen, die die Oxidation von Homocystein zu HCSA unterdrückten. Möglicherweise besaß dieser Patient im Liquor eine besonders niedrige Konzentration an zweiwertigen Kupferionen (Kupfer(II)-Ionen katalysieren die Oxidation von Homocystein zu HCSA¹⁸⁹) und/oder einen sehr hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Biomolekülen. Neben Glutathion (die Glutathionkonzentrationen des Patienten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht, s. Abb. 3-27) stellen die Vitamine E und C, sowie Flavonoide die wichtigsten Antioxidantien im Liquor dar²²⁷. Dass bei den Patienten 2, 3 und 4 – trotz hoher Glutathionkonzentrationen (sie waren ebenfalls signifikant höher als die Glutathionkonzentrationen der Kontrollgruppe) – HCSA nachgewiesen wurde, lässt vermuten, dass allein hohe Glutathionkonzentrationen nicht ausreichen, die Bildung von HCSA zu vermeiden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Cysteinkonzentrationen der PZNSL-Patienten im Normbereich lagen und in der Kontrollgruppe kein Metabolit des Cysteins nachgewiesen werden konnte (obwohl mehrere Personen der Kontrollgruppe sogar leicht erhöhte Cysteinkonzentrationen zeigten), überraschte es nicht, dass auch in den Liquores der PZNSL-Patienten weder CSA noch CA detektiert wurde.

Quinn et al. konnte in retrospektiv untersuchten Liquorproben von Kindern, die mehrheitlich eine Woche nach der vorangegangenen MTX-Gabe gezogen wurden, ebenfalls HCSA nachweisen⁷⁶ (s. Tab. 4-7). Die ermittelten HCSA-Konzentrationen lagen in der gleichen Größenordnung wie die, die bei den PZNSL-Patienten bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen konnten Quinn et al. in den Liquores dieser Kinder jedoch auch HCA (Median: 96,0 µM) und die oxidativen Metaboliten des Cysteins, CSA (Median: 24,9 µM) und CA (Median: 0,2 µM) nachweisen. Keine der SEAA wurde hingegen in den Liquores einer Kontrollgruppe, die aus 29 Kindern bestand, detektiert (s. Tab. 4-7).

Da die Untersuchungen an den Lymphompatienten zeigten, dass weder die intravenöse noch die intraventrikuläre Gabe von MTX die Cysteinkonzentrationen im Liquor beeinflusst, ist überraschend, dass Quinn et al. bei den Patienten solch hohe Konzentrationen der Cysteinmetaboliten ermittelte. Noch überraschender ist aber die

Tatsache, dass HCA in Konzentrationen von bis zu 416 μM (!) vorgefunden wurde. Leider gibt die Studie keinen Aufschluss darüber, ob diejenigen Patienten, die extrem hohe HCA-Konzentrationen aufwiesen, auch stark erhöhte Homocysteinkonzentrationen besaßen.

Tab. 4-7: SEAA-Konzentrationen im Liquor von Kindern, die zur Therapie onkologischer Erkrankungen mit MTX behandelt wurden.

Referenz	Patienten	Dosierung/ Applikation von MTX	Rescue nach MTX	Zeitpunkt d. Proben- entnahme	SEAA- Konz. [μM]	Analyt. Methode
Quinn et al. (1997) ⁷⁶	23 ALL- Patienten/ 1 Pat. mit Neuro- blastom	4 x 25 mg/m ² /Tag PO bzw. 2 g/m ² über 4 h IV	k.A.	In der Regel 1 Woche nach MTX- Gabe	HCSA: 1,3* HCA: 96,0* CSA: 24,9* CA: 0,2*	HPLC- ECD ⁷⁶
	29 Kinder (neurolog. Erkran- kung)	---	---	---	HCSA: ND HCA: ND CSA: ND CA: ND	

* Median

k.A.: Keine Angaben

Die Ergebnisse bezüglich der HCA-Konzentrationen müssen angezweifelt werden, da (1) die extrem hohen HCA-Konzentrationen durch eine länger andauernde, intensive enzymatische Verstoffwechslung, nicht aber durch eine spontan ablaufende Oxidation von Homocystein erklärbar wären (die bisherigen Forschungsergebnisse sprechen dagegen, dass ein Enzym, welches die Bildung von HCA katalysieren könnte, existiert^{17,18}), (2) Relling im Liquor von insgesamt 53 ALL-Patienten eine Woche nach HDMTX (2,5-5 g/m²) weder die Metaboliten des Homocysteins noch die des Cysteins nachweisen konnten (die Nachweisgrenze bezüglich der SEAA lag zwischen 5 und 50 nM²²¹), (3) die Patienten, trotz extrem hoher Konzentrationen an HCA keine Anzeichen von Krämpfen zeigten – HCA stellt ein stark wirksames Convulsivum dar^{228,229} und (4) es fraglich ist, ob die eingesetzte analytische Methode die exakte Bestimmung von HCA im Liquor gewährleisten konnte (s. hierzu auch Kap. 4.1). Nicht beantwortet werden kann die Frage, ob HCA (und die anderen

Metaboliten) eventuell im Rahmen der Probenaufarbeitung gebildet wurden, da nähere Informationen zur Methode nicht publiziert wurden⁷⁶.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass MTX zu einer Anhäufung von HCSA im Liquor führen kann. Welche Faktoren die Bildung dieser exzitatorischen Aminosäure fördern bzw. unterdrücken ist unbekannt. Unbekannt ist auch, wie lange (nach Applikation von MTX) erhöhte HCSA-Konzentrationen im Liquor vorliegen. HCSA kann aufgrund fehlender Enzymsysteme nicht enzymatisch abgebaut werden. Somit kommt der Liquorresorption und -neubildung eine entscheidende Rolle bei der Elimination von HCSA aus dem Liquor/ZNS zu. Aufgrund der Tatsache, dass pro Stunde ungefähr 20 mL Liquor produziert werden und somit der gesamte Liquor (beim Erwachsenen beträgt das Liquorvolumen ungefähr 130-150 mL) mehrmals täglich erneuert wird, kann man annehmen, dass HCSA vermutlich nur für begrenzte Zeit in deutlich erhöhten Konzentrationen im Liquor vorliegt. Diese Annahme setzt natürlich voraus, dass sich nach MTX auch die Homocysteinkonzentrationen rasch normalisieren und dass keine Liquorzirkulationsstörungen vorliegen. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass PZNSL-Patienten, die nach Gabe von MTX stark erhöhte HCSA-Konzentrationen im Liquor aufwiesen, innerhalb von zwei Wochen soviel HCSA aus dem Liquor eliminierten, dass die HCSA-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze lagen.

Ob unter MTX auch die Konzentrationen der Cysteinmetaboliten (CSA und CA) ansteigen, ist ungewiss. Da – wie bereits erläutert – die bislang durchgeführten Untersuchungen keinen Anlass dazu geben, dass die MTX-induzierte Hemmung der Remethylierung mit einer gesteigerten Transsulfurierung in der Leber einhergeht, und Homocystein im ZNS *nicht* transsulfuriert werden kann, sollte MTX keinen Einfluss auf die Cysteinkonzentrationen im Liquor haben. Somit ist es auch unwahrscheinlich, dass MTX die Konzentrationen von CSA und CA beeinflusst, da beide aus Cystein hervorgehen.

Deutlich erhöhte Cysteinkonzentrationen im Liquor werden bei einer Störung der Blut-Hirn-Schranke oder bei blutkontaminierten Liquorproben gefunden. Es ist denkbar, dass in diesen Fällen auch größere Mengen der Cysteinmetaboliten im Liquor vorkommen. Prinzipiell könnten erhöhte Konzentrationen der Cystein-

metaboliten auch infolge einer gesteigerten Biosynthese oder infolge eines gehemmten Abbaus beobachtet werden (s. hierzu Abb. 4-3).

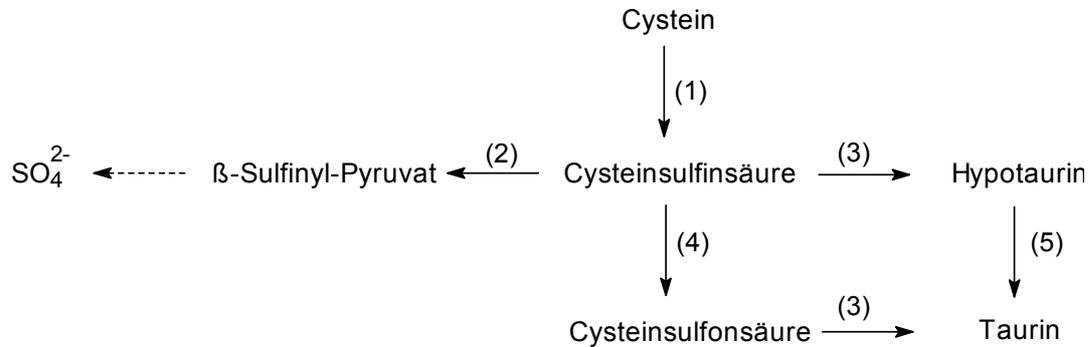


Abb. 4-3: Biosynthese und Abbau der exzitatorischen Aminosäuren CSA und CA (nach Griffiths¹⁶). Enzyme: (1): Cystein-Dioxygenase, (2): Cysteinsulfinsäure-(β-Sulfinyl-Pyruvat)-Transaminase, (3): Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase (CSD), (4): Cysteinsulfinsäure-Dehydrogenase, (5): Hypotaurinoxidase.

Welche Faktoren die Aktivität der einzelnen Enzyme, die Biosynthese und Abbau regeln, beeinflussen, ist kaum erforscht. Bekannt ist lediglich, dass HCA die Cysteinsulfinsäure-Decarboxylase (CSD) inhibieren kann und dass HCSA weder ein Substrat noch ein Hemmstoff der CSD darstellt²³⁰.

4.3.3 Fallstudie einer Patientin mit MTX-Überdosierung

In dieser Arbeit wurde eine einjährige Medulloblastom-Patientin, der anstatt 2 mg 20 mg MTX intraventrikulär verabreicht wurden, untersucht. Diese Patientin zeigte trotz der stark überhöhten MTX-Dosis keine neurotoxischen Symptome.

Hohe Dosen an intrathekal appliziertem MTX führen häufig zu Kopfschmerzen und Krämpfen. In besonders ausgeprägten Fällen wird eine toxische Enzephalopathie beobachtet, die mit schwerwiegenden Komplikationen – unter Umständen auch dem Tod des Patienten – verbunden sein kann^{231,232}. Eine Übersicht über die bislang publizierten Fälle von MTX-Überdosierungen liefert Tab. 4-8. Ihr ist zu entnehmen, dass selbst bei extrem hohen MTX-Dosen (> 100 mg IT) neurologische Störungen auch völlig ausbleiben können.

Notfall-Maßnahmen nach intrathekaler MTX-Überdosierung schließen – neben einer sofortigen Liquorspülung – einen intensiven Rescue mit Calciumfolinat (*nicht* IT oder ICV, da Calciumfolinat nach diesen Applikationsarten epileptogen wirken kann²³³), sowie die Gabe von Phenobarbital und Dexamethason ein. Phenobarbital wird zur Erhöhung der Krampfschwelle, Dexamethason zur Vermeidung einer Arachnoiditis gegeben. Bei massiver Überdosierung (> 100 mg IT bzw. ICV) wird eine lumbale Liquorspülung über zwei implantierte Katheter sowie die Verabreichung von Carboxypeptidase, einem Enzym, welches MTX inaktiviert (s. hierzu auch Abb. 1-5), empfohlen^{233,234}. Letztere Maßnahmen sollten auch bei mäßiger Überdosierung und ausgeprägter Toxizität in Erwägung gezogen werden²³³.

Im Falle der Medulloblastom-Patientin beschränkte man sich aufgrund der vergleichsweise moderaten Überdosierung und der Tatsache, dass neurotoxische Symptome nicht beobachtet wurden, auf zwei fraktionierte Liquorspülungen (sechs bzw. 16 Stunden nach Überdosierung), um die MTX-Konzentrationen im Liquor zu senken. Im Rahmen der ersten Liquorspülung wurden ungefähr 20 % des im Liquor vorliegenden MTX entfernt (die MTX-Konzentration sank von 87,2 auf 67,9 µM).

Tab. 4-8: Übersicht über bislang publizierte Fälle von MTX-Überdosierungen (intrathekale Applikation jeweils).

Referenz	Patient (Alter, Geschlecht)	MTX-Dosis [mg]	Neurotoxische Symptome	Maßnahmen zur MTX-Elimination	Spätfolgen
Lampkin et al. ²³⁵	4 Jahre	52 mg IT	Nein	Keine	Nein
Ettinger et al. ²³⁶	2 Jahre	85 mg IT	Milde Enzephalopathie	Keine	Nein
	12 Jahre	50 mg IT	Milde Enzephalopathie	Lumbal-drainage	Nein
Addiego et al. ²³¹	4 Jahre	50 mg IT	Nein	Lumbal-drainage	Nein
	9 Jahre	650 mg IT	Ausgeprägte Enzephalopathie	Lumbal-drainage	Schwere Hirn-schäden
Ettinger et al. ²³²	9 Jahre, m	650 mg IT	Ausgeprägte Enzephalopathie	Liquor-spülung [#]	Tod (1 Monat später)
Spiegel et al. ²³⁷	26 Jahre, m	625 mg IT	Ausgeprägte Enzephalopathie	Ventrikulo-lumbale Liquor-Spülung [#]	Nein
Jacobsen et al. ²³⁴	11 Jahre, m	120 mg IT	Nein	Liquor-spülung [#]	Nein
	4 Jahre, m	100 mg IT	Nein	Liquor-spülung [#]	Nein
O'Marcaigh et al. ²³³	6 Jahre, m	600 mg IT	Ausgeprägte Enzephalopathie	Ventrikulo-lumbale Liquor-Spülung [#] , CPG ₂ (IT)	Nein
Lee et al. ²³⁸	3 Jahre, w	125 mg IT	Krämpfe	Keine	Nein
	4 Jahre, m	125 mg IT	Krämpfe	Keine	Nein
Riva et al. ²³⁹	7 Jahre, m	300 mg IT	Starke Kopfschmerzen	Keine	Nein
Finkelstein et al. ²⁴⁰	34 Jahre, m	1200 mg IT	Starke Rücken-schmerzen, Krämpfe	Ventrikulo-lumbale Liquor-Spülung [#]	Nein

* CGG₂:Carboxypeptidase G2, spaltet von MTX den Glutamatrest ab, so dass ein unwirksamer Metabolit (DAMPA) entsteht (s. hierzu auch Abb. 1-5)

[#] 30-50 mL Liquor wurden durch physiologische Kochsalzlösung ersetzt

Warum die zweite Spülung (zumindest dem Verlauf der MTX-Konzentrationen nach zu urteilen, s. Abb. 3-33) keinen bzw. nur einen unwesentlichen Einfluss auf die MTX-Konzentrationen ausübte, ist unklar. Nach Bekunden der verantwortlichen Ärztin wurden beide Spülungen in der gleichen Art und Weise durchgeführt¹⁷⁹.

Plausibel wäre, dass durch die MTX-Infusion (5 g/m^2), die kurz vor der intraventrikulären MTX-Gabe gestartet und sechs Stunden später abgebrochen wurde (dies war der Zeitpunkt, an dem man feststellte, dass eine zu hohe Dosis an MTX intraventrikulär appliziert wurde), nach der zweiten Spülung größere Mengen an MTX in den Liquor gelangten und hierdurch der Effekt der Liquorspülung mehr oder weniger kompensiert wurde.

Von besonderem Interesse war, wie sich die hohen Liquor-MTX-Konzentrationen auf den Stoffwechsel des Homocysteins im ZNS auswirkten. Daher wurden die zur Verfügung stehenden Liquorproben auf Homocystein, Cystein und Glutathion sowie die Metaboliten des Homocysteins bzw. Cysteins untersucht. Zusätzlich wurden die Konzentrationen an N⁵-Methyl-THF bestimmt (diese Analyse wurde wiederum von Frau S. Vezmar durchgeführt). Eine solche biochemische Liquoranalyse nach MTX-Überdosierung existiert bislang nicht.

Die Homocysteinkonzentration, die 24 Stunden nach der intraventrikulären Gabe von MTX bestimmt wurde (799 nM), war vergleichbar hoch wie die Homocysteinkonzentrationen, die bei einem vierjährigen Kind einen Tag nach ICVMTX (2 mg) ermittelt wurden ($700\text{-}850 \text{ nM}$)²²², aber deutlich höher als die Homocysteinkonzentrationen, die im Liquor der PZNSL-Patienten, ebenfalls einen Tag nach ICVMTX (3 mg), gefunden wurden (Median: 238 nM). Im weiteren Verlauf stieg die Homocysteinkonzentration leicht an; 66 Stunden nach der intraventrikulären MTX-Gabe betrug die Homocysteinkonzentration 1028 nM. Da der Patientin vor der fehlerhaften MTX-Applikation keine Liquorprobe entnommen wurde, kann nicht beurteilt werden, in welchem Ausmaß die Liquor-Homocysteinkonzentration von der überhöhten MTX-Dosis beeinflusst wurde. Geht man davon aus, dass die Homocysteinkonzentration der Patientin vor der intraventrikulären MTX-Gabe *nicht* erhöht war (die letzte Verabreichung von MTX lag mehr als zwei Wochen zurück, s. Kap. 2.5.4.2) und in der gleichen Größenordnung lag, wie die Homocysteinkonzentrationen, die bei den pädiatrischen ALL-Patienten im Rahmen der Total XV-

Studie bestimmt wurden (~30-40 nM), so hätte die MTX-Überdosierung die Liquor-Homocysteinkonzentration innerhalb von 24 Stunden um mehr als das 20fache ansteigen lassen – obwohl innerhalb dieses Zeitraums zwei Liquorspülungen vorgenommen wurden. Die sehr hohen Cysteinkonzentrationen (16,95-19,95 μM) – sie waren um ein Vielfaches höher als die der ALL- und PZNSL-Patienten – sowie die leicht erhöhten Glutathionkonzentrationen (861-1099 nM), die in den Liquorproben der Medulloblastompatientin bestimmt wurden, lassen allerdings vermuten, dass im Rahmen der Probengewinnung jeweils geringe Blutmengen in die Liquorproben gelangten (optisch konnte allerdings keine rötliche Verfärbung der Proben festgestellt werden) und/oder eine Schrankenstörung bei der Patientin vorlag. Die hohen Homocysteinkonzentrationen sind daher höchstwahrscheinlich nicht allein auf die intraventrikuläre Instillation von MTX zurückzuführen.

Wiederum wurde (wie auch bei dem Kollektiv der PZNSL-Patienten) die Beobachtung gemacht, dass der Calciumfolinat-Rescue keine Senkung der Liquor-Homocysteinkonzentration bewirkt, wenn zeitgleich hohe MTX-Konzentrationen im Liquor präsent sind.

Dass mit CA auch ein Metabolit des Cysteins im Liquor nachgewiesen wurde, mag an den hohen Cysteinkonzentrationen gelegen haben. Neben CA wurden in allen Proben auch geringe Mengen an HCA sowie HCSA detektiert. Die Konzentrationen der letztgenannten Aminosäure waren ähnlich hoch wie die, die bei den PZNSL-Patienten nach intravenöser bzw. intraventrikulärer Gabe von MTX ermittelt wurden.

Insgesamt zeigt die biochemische Analyse der Liquorproben, dass nach der hohen intraventrikulär verabreichten MTX-Dosis (20 mg) vermutlich ähnlich ausgeprägte Veränderungen im Homocysteinstoffwechsel induziert wurden wie nach zehnfach niedrigeren, therapeutisch angewendeten Dosierungen (2-3 mg). Dieses Ergebnis ist nicht überraschend. Bereits die Daten, die im Rahmen der Bonner Lymphomstudie erhoben wurden, zeigten, dass sehr hohe MTX-Konzentrationen im Liquor (30-40 μM) mit vergleichbar hohen Homocystein- und HCSA-Konzentrationen assoziiert waren wie MTX-Konzentrationen, die im therapeutischen Bereich von ungefähr 1 μM lagen (s. Kap. 3.4.2).

Trotz der spärlichen Datenlage kann daher angenommen werden, dass bereits therapeutische Dosen an intraventrikulär verabreichtem MTX zu einem maximalen

Anstieg des Homocysteins im Liquor führen. Wie stark die Erhöhung der Homocysteinkonzentrationen im Liquor letzten Endes ausfällt und wie lange (nach erfolgter Verabreichung von MTX) Patienten erhöhten Homocysteinkonzentrationen im Liquor ausgesetzt sind, hängt von weiteren Faktoren ab, die ebenfalls die Liquor-Homocysteinkonzentration beeinflussen. Hierunter fallen insbesondere die Aktivität der im ZNS lokalisierten Methioninsynthase (bei reduzierter, intrazellulärer N⁵-Methyl-THF-Konzentration), die Intensität der Rescue-Therapie mit Calciumfolinat und die Geschwindigkeit der Elimination von Homocystein aus dem Liquor bzw. ZNS. Diese Faktoren tragen vermutlich auch dazu bei, ob nach massiver, intrathekaler MTX-Überdosierung neurologische Komplikationen auftreten oder nicht.

4.4 Homocystein — ein Biomarker der MTX-induzierten Neurotoxizität?

Patienten, die aufgrund einer Störung im Homocysteinstoffwechsel deutlich erhöhte Homocysteinkonzentrationen im Plasma aufweisen, zeigen neben atherosklerotischen Gefäßerkrankungen auch neurologische Störungen (Krampfanfälle, psychomotorische Retardierung, Demenz). Die neurologische Symptomatik ist – wie eingangs erläutert – besonders ausgeprägt, wenn hohe Homocysteinkonzentrationen Folge einer massiv beeinträchtigten Remethylierung sind⁴⁰⁻⁴³. Da auch Methotrexat die Remethylierung des Homocysteins inhibiert und gezeigt wurde, dass nach einer Therapie mit MTX sowohl im Plasma als auch im Liquor erhöhte Homocysteinkonzentrationen vorliegen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Homocystein und dessen Metaboliten (HCSA und HCA) auch Symptome der MTX-induzierten Neurotoxizität hervorrufen können⁷⁶.

Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden bislang lediglich drei kleinere Studien durchgeführt (alle drei wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits mehrfach erwähnt, an dieser Stelle soll nur der Aspekt, ob Homocystein und dessen Metaboliten Mediatoren der MTX-induzierten Neurotoxizität darstellen, näher beleuchtet werden). Quinn et al. beobachteten, dass Kinder nach einer Therapie mit MTX höhere Homocysteinkonzentrationen im Liquor aufwiesen als Kinder einer unbehandelten Kontrollgruppe und dass bei denjenigen Patienten, die unter neurotoxischen

Symptomen litten, im Liquor besonders hohe Konzentrationen an Homocystein und dessen Metaboliten vorlagen⁷⁶.

Drachtman et al. analysierten die Liquores von Patienten mit subakuter Neurotoxizität auf Homocystein und bestimmten in diesen Liquores signifikant höhere Homocysteinkonzentrationen als in den Liquores einer Kontrollgruppe, bei der keine neurologischen Komplikationen beobachtet wurden¹⁶⁰.

Der Evidenzgrad beider Studien ist jedoch gering, da sie retrospektiv durchgeführt wurden und sowohl die Untersuchungs-, als auch die Kontrollgruppen sehr heterogen waren. Somit konnten weder Beobachtungs- noch Strukturgleichheit – wichtige Qualitätsstandards klinischer Studien – gewährleistet werden. Beide Untersuchungen geben daher bestenfalls Hinweise darauf, dass Homocystein in die Pathogenese der MTX-induzierten Neurotoxizität involviert ist.

Die bis dato größte und methodisch beste Studie zu dieser Thematik wurde von Kishi et al. durchgeführt (Studie „Total XIV“)¹⁵⁶. Sie analysierten prospektiv von insgesamt 53 pädiatrischen ALL-Patienten, die mit hochdosiertem MTX behandelt wurden, sowohl Plasma- als auch Liquorproben auf Homocystein und konnten herausstellen, dass diejenigen Patienten, die Symptome einer akuten Neurotoxizität entwickelten (insbesondere Krampfanfälle), tendenziell höhere Homocysteinkonzentrationen im Plasma besaßen als solche, die neurologisch unauffällig waren. Die Kontrollgruppe wurde – zur Gewährleistung maximaler Strukturgleichheit – so zusammengestellt, dass jedem Patienten der Untersuchungsgruppe ein sogenannter statistischer Zwilling zugeordnet wurde, der eine möglichst große Ähnlichkeit mit dem neurologisch auffälligen Patienten aufwies („paarweises matching“). Zwischen den Liquor-Homocysteinkonzentrationen und dem Auftreten neurotoxischer Symptome konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Dies wurde im Wesentlichen darauf zurückgeführt, dass die Liquorproben zu Zeitpunkten gezogen wurden, an denen keiner der Patienten durch neurologische Ausfälle auffiel.

Es bleibt abzuwarten, ob die Nachfolgestudie („Total XV“), die momentan in Kooperation mit Prof. M. Relling durchgeführt wird, zeigen kann, ob Patienten mit MTX-induzierter Neurotoxizität signifikant höheren Homocysteinkonzentrationen exponiert waren als symptomfreie. Wie bereits zuvor erläutert, wurde aus statistischen Gründen davon abgesehen, dies im Rahmen einer Zwischenauswertung zu überprüfen.

Die Untersuchungen an den PZNSL-Patienten und der Medulloblastompatientin (Fall der MTX-Überdosierung) zeigen, dass selbst hohe Homocystein- und HCSA-Konzentrationen im Liquor nicht zwangsläufig mit akut/subakut neurotoxischen Reaktionen verbunden sein müssen. Welche weiteren Faktoren die Entstehung neurotoxischer Symptome fördern bzw. abschwächen, ist weitgehend unklar. Glutathion mag aufgrund seiner neuroprotektiven Eigenschaften in der Lage sein, Homocystein-vermittelte toxische Wirkungen abzumildern. Möglicherweise wurden bei den PZNSL-Patienten keine Symptome einer akuten/subakuten Toxizität beobachtet, da deren Glutathionkonzentrationen im Liquor deutlich erhöht waren (sie waren signifikant höher als die der Kontrollgruppe).

Die Tatsache, dass bei zwei der vier untersuchten Lymphompatienten leichte und bei einem Patienten stark ausgeprägte Demyelinisierungen auftraten, lässt vermuten, dass Homocystein und dessen exzitatorische Metaboliten (insbesondere HCSA) prädisponierend für die chronische Toxizität sein können. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass die Homocysteinkonzentrationen, die nach wiederholter intraventrikulärer Gabe von MTX im Liquor der PZNSL-Patienten gemessen wurden, in einem Bereich lagen, der für Neurone als zytotoxisch angesehen wird. Kruman et al. konnten anhand von Zellversuchen demonstrieren, dass bereits Homocysteinkonzentrationen von $0,5 \mu\text{M}$ innerhalb weniger Tage zur Apoptose von Neuronen führen können⁶⁷.

Die Ergebnisse der PZNSL-Studie bieten einen Erklärungsansatz, warum Chemotherapieprotokolle, die eine intensive intraventrikuläre oder intrathekale MTX-Therapie vorsehen, insbesondere dann mit einem hohen Maß an Toxizität verbunden sind, wenn auf IT-/ICVMTX kein oder nur ein gering dosiertes Calciumfolinat-Rescue folgt^{112,241-243}. Es liegt auf der Hand, dass diese Patienten über einen besonders langen Zeitraum schädlichen Homocysteinkonzentrationen ausgesetzt sind und dadurch bedingt neurotoxische Wirkungen verstärkt auftreten.

Vor diesem Hintergrund erfordert der Einsatz einer solch intensiven, ZNS-gerichteten Chemotherapie eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abschätzung. PZNSL-Patienten, die oftmals einer besonders aggressiven Behandlung mit ITMTX unterzogen werden, scheinen neueren Studien zufolge *nicht* von der intrathekalen MTX-Instillation zu profitieren, wenn sie auch mit HDMTX behandelt werden^{244,245}. Bei ihnen ist daher

eine häufige intrathekale bzw. intraventrikuläre MTX-Gabe vermutlich mit mehr Nach- als Vorteilen behaftet.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass insbesondere die Untersuchungen an den PZNSL-Patienten weitere Hinweise darauf geben, dass Homocystein (und dessen oxidativen Metaboliten) eine Schlüsselrolle bei der Genese der MTX-induzierten Neurotoxizität zukommen könnte.

Weitere prospektiv angelegte Studien müssen zeigen, ob zwischenzeitlich stark erhöhte Homocysteinkonzentrationen, die man insbesondere im *Liquor* von MTX-behandelten Patienten nachweisen kann, mit akuten/subakuten toxischen Symptomen korrelieren oder einen prädiktiven Parameter für die besonders gefürchtete chronische Neurotoxizität darstellen. Diese Untersuchungen sollten auch weitere Erkenntnisse darüber liefern, ob ein zwischenzeitliches Methylierungsdefizit ebenfalls das Entstehen der chronischen Neurotoxizität begünstigen kann.

Genetische Defekte, die einen negativen Einfluss auf die Aktivität Homocystein-verstoffwechelnder Enzymsysteme (MTHFR, MS, BHMT, CBS) besitzen, sowie ein ausgeprägter Mangel an Folsäure, Vitamin B₆ und/oder Vitamin B₁₂ (sie stellen die Cofaktoren der MS bzw. der CBS dar) könnten ein besonderes Risikopotential für die MTX-induzierte Neurotoxizität darstellen. Es wäre daher sinnvoll, bei zukünftigen Studien auch diese Aspekte zu berücksichtigen.

Erhöhte Homocysteinkonzentrationen, die im Rahmen von Remethylierungsstörungen auftreten, können durch die kombinierte Gabe von Vitamin B₁₂, Vitamin B₆ und Betain effektiv gesenkt werden⁴⁴. Diese Substanzen interferieren im Gegensatz zur Folsäure *nicht* mit der Wirkung von MTX, so dass sie unbedenklich zusammen mit der MTX-haltigen Chemotherapie gegeben werden können. Da eine solche Komedikation kostengünstig und praktisch ohne unerwünschte Wirkungen ist, sollte eher früher als später evaluiert werden, ob Patienten, die einer intensiven Chemotherapie mit MTX unterzogen werden müssen, von einer solchen Begleitmedikation profitieren.

5 Zusammenfassung

Der Folsäureantagonist Methotrexat (MTX) wird zur Behandlung rheumatoider und onkologischer Erkrankungen eingesetzt. Hochdosiertes MTX ($> 1 \text{ g/m}^2$, HDMTX) mit anschließendem Calciumfolinat-Rescue wird heute insbesondere zur Therapie von Osteosarkomen, primären Lymphomen des zentralen Nervensystems (PZNSL) und der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) verabreicht. Die Hochdosis-Chemotherapie mit MTX konnte die Prognosen dieser malignen Erkrankungen entscheidend verbessern, brachte andererseits aber auch ein hohes Maß an akut und chronisch auftretenden neurotoxischen Symptomen mit sich. Letztere sind besonders gefürchtet, da sie Ausdruck einer Leukenzephalopathie – einer demyelinisierenden Enzephalopathie – sind. Ausgeprägte Formen der chronischen Neurotoxizität verlaufen nicht selten letal.

Die Genese der MTX-induzierten Neurotoxizität ist im Wesentlichen unklar. Es gibt allerdings Hinweise, dass der Interaktion von MTX mit dem Homocysteinstoffwechsel eine größere Rolle bei der Entstehung der Neurotoxizität zukommen könnte. MTX ist in der Lage, die Umwandlung von Homocystein zu Methionin (Remethylierung) zu unterdrücken, indem es einen Mangel an N^5 -Methyltetrahydrofolat hervorruft; N^5 -Methyltetrahydrofolat ist Cofaktor der Methioninsynthase, die die Remethylierung des Homocysteins katalysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss intravenös bzw. intraventrikulär verabreichtes MTX auf den Homocysteinstoffwechsel ausübt und ob Veränderungen im Stoffwechsel des Homocysteins eine Rolle bei der Genese der MTX-induzierten Neurotoxizität spielen könnten. Hierzu wurden Homocystein und Cystein, sowie deren exzitatorischen Metaboliten – Homocysteinsulfinsäure (HCSA) und Homocysteinsulfonsäure (HCA) bzw. Cysteinsulfinsäure (CSA) und Cysteinsulfonsäure (CA) – insbesondere in Liquorproben von ALL- und PZNSL-Patienten bestimmt, die unter einer Chemotherapie mit hochdosiertem MTX standen. All diese genannten Substanzen sind potentiell neurotoxisch und daher als Auslöser für MTX-induzierte neurologische Komplikationen diskutiert worden. Zusätzlich wurden die zur Verfügung stehenden Liquorproben auch auf Glutathion, welches neuroprotektive Effekte entfalten kann, analysiert.

Der erste Teil der Arbeit bestand darin, analytische Methoden zu entwickeln und nach international anerkannten Kriterien zu validieren, um die oben erwähnten Substanzen auch im Liquor von Krebspatienten exakt bestimmen zu können. Bislang existierten weder für Homocystein noch für die schwefelhaltigen, exzitatorischen Aminosäuren (HCSA, HCA, CSA und CA) solche Methoden. Dies hängt nicht zuletzt damit zusammen, dass diese Biomoleküle – Cystein und Glutathion ausgenommen – im Liquor nur in Spuren vorkommen und die Abtrennung von anderen Liquor-assoziierten Substanzen eine extrem hohe Trennleistung des analytischen Verfahrens voraussetzt.

Zum Nachweis von HCSA, HCA, CSA und CA wurde eine spezielle kapillarelektrophoretische Methode (micellare, elektrokinetische Chromatographie, MEKC) aufgebaut. Sie erlaubt die selektive und empfindliche Bestimmung der Homocystein- bzw. Cysteinmetaboliten im Liquor. Die hohe Empfindlichkeit der Methode – die Nachweisgrenze der exzitatorischen Aminosäuren liegt im unteren nanomolaren Bereich – wurde durch den Detektionsmodus der Laser-induzierten Fluoreszenz (LIFD) erzielt. Als Fluoreszenzmarker wurde 5-Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) eingesetzt. Die Methode wurde nach den Richtlinien der Food and Drug Administration (Guidance for Industry: „Bioanalytical Method Validation“) vollständig validiert und zeichnet sich im Besonderen dadurch aus, dass sie einfach anzuwenden und mit geringen Kosten verbunden ist.

Zur simultanen Bestimmung der Aminothiole Homocystein, Cystein und Glutathion wurde eine HPLC-Methode entwickelt. Auch sie wurde nach den international anerkannten Richtlinien der Food and Drug Administration validiert. Die selektive und hinreichend empfindliche Bestimmung von Homocystein im Liquor (die Liquor-Homocysteinkonzentrationen gesunder Menschen liegen in der Regel unter 100 nM), konnte durch den Thiol-selektiven Fluoreszenzmarker ABDF (4-(Aminosulfonyl)-7-Fluor-Benzofurazan) gewährleistet werden.

Im weiteren Fortgang der Arbeit wurden beide Methoden eingesetzt, um Liquorproben von Tumorpatienten zu analysieren. Zur Bestimmung von Homocystein im Plasma wurde ein vollautomatischer (und ebenfalls validierter) Fluoreszenz-polarisations-Immunoassay der Firma Abbott verwendet.

Ein wesentlicher Teil der klinischen Untersuchungen erfolgte an pädiatrischen ALL-Patienten, die im St. Jude Children's Research Hospital in Memphis (USA) nach dem Protokoll der gegenwärtig noch laufenden Studie „Total XV“ behandelt wurden. Diese Studie geht unter anderem der Frage nach, ob Homocystein einen Biomarker für die MTX-induzierte Neurotoxizität darstellt.

Im Rahmen einer Zwischenauswertung, bei der die Daten von insgesamt 116 ALL-Patienten analysiert wurden, konnte gezeigt werden, dass die häufig angewendete Kombination aus intravenös ($2,5\text{-}5\text{ g/m}^2$, HDMTX) und intrathekal verabreichtem MTX (8-12 mg, ITMTX) einen raschen Anstieg der Plasma-Homocysteinkonzentrationen hervorruft. 18 Stunden nach Ende der 24-stündigen MTX-Infusionen (kurz vor Beginn der Rescue-Therapie mit Calciumfolinat) wurden annähernd doppelt so hohe Homocysteinkonzentrationen im Plasma ermittelt wie vor MTX-Gabe, der Unterschied war höchstsignifikant. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die wiederholte Exposition mit MTX die Plasma-Homocysteinkonzentrationen ähnlich stark ansteigen lässt und – entgegen bisheriger Vermutungen – keine adaptiven Mechanismen zum Tragen kommen, die diesen unerwünschten Nebeneffekt einer hochdosierten MTX-Therapie abschwächen könnten. Ferner konnte demonstriert werden, dass (spätestens) zwei Wochen nach HDMTX und anschließendem Calciumfolinat-Rescue wieder normale Homocysteinkonzentrationen im Plasma vorliegen. Ähnlich umfassende Untersuchungen zu dieser Thematik sind bislang nicht durchgeführt worden. Die bisherigen Studien beschränkten sich in der Regel auf Einzelfälle oder wurden nur punktuell, d.h. zu einem bestimmten Zeitpunkt der Chemotherapie, durchgeführt.

Die Homocysteinkonzentrationen der Liquorproben, die eine bzw. zwei Wochen nach HDMTX/ITMTX gezogen wurden, waren nicht signifikant höher als die Homocysteinkonzentrationen, die kurz vor Beginn der MTX-Infusion bestimmt wurden. Sie lagen in der Regel unter 50 nM, einem Bereich, der für Kinder als normal angesehen wird. Vermutlich bedingten der relativ große Zeitabstand zwischen der Chemotherapie mit MTX und der Probenziehung sowie die Rescue-Therapie mit Calciumfolinat (sie gleicht einen MTX-induzierten Mangel an reduzierten Folaten rasch aus), dass im Liquor keine erhöhten Homocysteinkonzentrationen gefunden wurden. Dieser Aspekt sollte bei zukünftigen Liquoranalysen berücksichtigt werden.

Auch bezüglich der im Liquor bestimmten Cystein- und Glutathionkonzentrationen konnten keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Therapie festgestellt werden. Alle ermittelten Cystein- und Glutathionkonzentrationen der ALL-Patienten lagen – von einigen Ausnahmen abgesehen – im Normbereich.

Aus statistischen Gründen wurde im Rahmen der Zwischenauswertung davon abgesehen, zu überprüfen, ob Patienten mit neurologischen Komplikationen höhere Homocysteinkonzentrationen nach HDMTX aufwiesen als symptomfreie. Diese Analyse wird in Kooperation mit einem Ärzteteam des St. Jude Children's Research Hospital erst nach Abschluss der Studie (vermutlich im Jahr 2006) durchgeführt werden.

Untersuchungen, die an vier erwachsenen PZNSL-Patienten durchgeführt wurden, lieferten weitere Informationen darüber, welche biochemischen Veränderungen im Liquor durch MTX hervorgerufen werden können. Diese Patienten wurden nach dem so genannten „Bonner Protokoll zur Therapie von primären Lymphomen des ZNS“ therapiert, welches eine besonders aggressive, ZNS-gerichtete Chemotherapie vorsieht. MTX wurde unter anderem über ein implantiertes Ommaya-Reservoir direkt in die Hirnkammern (intracerebroventrikulär, ICV) der Patienten instilliert. Das Ommaya-Reservoir ermöglichte, dass in allen sechs Behandlungsblöcken mehrere Liquorproben vergleichsweise problemlos entnommen und somit MTX-induzierte biochemische Veränderungen im Liquor besonders engmaschig untersucht werden konnten. Insgesamt wurden von den PZNSL-Patienten 63 Liquorproben analysiert.

Anhand des Kollektivs der PZNSL-Patienten wurde erstmals gezeigt, dass eine einzige Gabe von intravenös (HDMTX) oder intraventrikulär appliziertem MTX (ICVMTX) einen deutlichen Anstieg der Homocysteinkonzentration im *Liquor* bewirken kann. 24 Stunden nach HDMTX ($3\text{-}5\text{ g/m}^2$) bzw. ICVMTX (3 mg) wurden ungefähr dreifach erhöhte Homocysteinkonzentrationen ermittelt. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass drei – im zeitlichen Abstand von jeweils einem Tag – aufeinander folgende intraventrikuläre Instillationen von MTX mit einer besonders ausgeprägten Erhöhung der Liquor-Homocysteinkonzentrationen einhergingen. Dieser Anstieg wurde überraschenderweise auch dann beobachtet, wenn zeitgleich eine Rescue-Therapie mit Calciumfolinat durchgeführt wurde. Die Homocysteinkonzentrationen, die nach wiederholter intraventrikulärer MTX-Gabe im

Liquor der PZNSL-Patienten gemessen wurden, waren ähnlich hoch wie die, die bei Patienten mit Vitamin B₁₂- bzw. Folsäuremangel und ausgeprägten neurologischen Symptomen vorgefunden werden und bis zu 16fach höher als die Homocystein-konzentrationen, die im Liquor gesunder Erwachsener bestimmt wurden.

Weiterhin wurde erstmals eindeutig gezeigt, dass HDMTX bzw. ICVMTX auch eine Akkumulation von HCSA im Liquor bedingen kann. HCSA stellt einen oxidativen Metaboliten des Homocysteins dar, der normalerweise nicht im Liquor präsent ist; er steht im Verdacht, an der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt zu sein.

Weder die Cystein- noch die Glutathionkonzentrationen im Liquor der PZNSL-Patienten wurden durch die intensive Chemotherapie mit MTX beeinflusst. Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die durch MTX gehemmte Remethylierung die Aktivität der in der Leber lokalisierten Cystathionin- β -Synthase (sie katalysiert den Abbau von Homocystein zu Cystein) erhöht und dadurch bedingt auch die Cystein-konzentrationen im Liquor ansteigen, konnte somit nicht bestätigt werden. Da alle gemessenen Cysteinkonzentrationen im Normbereich lagen und die oxidativen Metaboliten des Cysteins im Liquor gesunder Erwachsener nicht detektiert werden konnten, überraschte es nicht, dass auch bei den PZNSL-Patienten weder CSA noch CA nachgewiesen wurden.

Bei der Liquoranalyse einer einjährigen Medulloblastompatientin, die fälschlicherweise anstatt 2 mg 20 mg MTX intraventrikulär verabreicht bekam, wurden ähnliche biochemische Veränderungen festgestellt wie bei den PZNSL-Patienten, so dass die Vermutung nahe liegt, dass auch Dosierungen, die oberhalb des therapeutischen Dosierungsbereichs liegen, den Stoffwechsel des Homocysteins nicht stärker beeinflussen als solche, die normalerweise im Rahmen onkologischer Therapiekonzepte verabreicht werden.

Die Untersuchungen an den PZNSL- und der Medulloblastompatientin offenbarten, dass stark erhöhte Homocystein- und HCSA-Konzentrationen im Liquor nicht zwangsläufig mit akut/subakut neurotoxischen Symptomen verbunden sein müssen. Sie geben andererseits weitere Hinweise dafür, dass stark erhöhte Homocystein- und HCSA-Konzentrationen neurodegenerative Prozesse der chronischen

Neurotoxizität auslösen können, da bei zwei der vier PZNSL-Patienten im Verlauf der Chemotherapie leichte und bei einem Patienten stark ausgeprägte Demyelinisierungen beobachtet wurden.

Ob Homocystein und HCSA Biomarker für akut bzw. subakut auftretende Symptome der MTX-induzierten Neurotoxizität darstellen und/oder prädiktiv für neurologische Spätfolgen einer MTX-haltigen Chemotherapie sind, müssen weitere prospektiv angelegte Studien an großen Patientenkollektiven zeigen.

Diese Studien sollten auch der Frage nachgehen, ob genetische Störungen, die mit einer verminderten Aktivität von Homocystein-verstoffwechelnden Enzymen (N^5, N^{10} -Methyltetrahydrofolatreduktase, Methioninsynthase, Cystathionin- β -Synthase, Betain-Homocystein-Methyltransferase) einhergehen, das Entstehen der MTX-induzierten Neurotoxizität begünstigen.

6 Literatur

1. McCully KS. *Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis*. Am J Pathol 1969; 56: 111-128
2. Graham I, Daly L, Refsum H. *Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease*. J Amer Med Ass 1997; 277: 1775-1781
3. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease*. JAMA 1995; 274: 1049-1057
4. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC. *A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US Physicians*. JAMA 1992; 268: 877-881
5. Coull BM, Malinow MR, Beamer N, Sexton G, Nordt F et al. *Elevated plasma homocyst(e)ine concentration as a possible independent risk factor for stroke*. Stroke 1990; 21: 572-576
6. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM et al. *Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men*. Lancet 1995; 346: 1395-1398
7. McCaddon A, Hudson P, Davies G, Hughes A, Williams JH et al. *Homocysteine and cognitive decline in healthy elderly*. Dement Geriatr Cogn Disord 2001; 12: 309-313
8. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH et al. *Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease*. N Engl J Med 2002; 346: 476-483
9. Kang SS, Wong PW, Malinow MR. *Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for occlusive vascular disease*. Ann Rev Nutr 1992; 12: 279-298
10. D.A.CH.-Liga Homocystein. *Consensus paper on the rational use of homocysteine, folic acid and B-vitamins in cardiovascular and thrombotic diseases. Guidelines and recommendations*. www.dach-liga-homocystein.org/Konsensus.htm 2003
11. Reddy MN. *Reference ranges for total homocysteine in children*. Clin Chim Acta 1997; 262: 153-155
12. Refsum H, Fiskerstrand T, Guttormsen AB, Ueland PM. *Assessment of homocysteine status*. J Inher Metab Dis 1997; 20: 286-294
13. McKeecer MP, Weir DG, Molloy A., Scott J.M. *Betaine-homocysteine methyltransferase: organ ditribution in man, pig and rat and subcellular distribution in the rat*. Department of Biochemistry 1991; 81: 551-556

14. Linnebank, M. *Molekulargenetische Untersuchungen zur Prävalenz und zum genetischen Hintergrund der klassischen Homocystinurie*. Diss. med. Westfälische Wilhelms-Universität Münster 2002
15. Finkelstein JD. *The metabolism of homocysteine: pathways and regulation*. Eur J Pediatr 1998; 157 Suppl 2: 40-44
16. Griffiths R. *Cysteine sulphinate (CSA) as an excitatory amino acid transmitter candidate in the mammalian central nervous system*. Prog Neurobiol 1990; 35: 313-323
17. Cuenod M, Grandes P, Zangerle L, Streit P, Do KQ. *Sulphur-containing excitatory amino acids in intercellular communication*. Biochem Soc Trans 1993; 21: 72-77
18. Thompson GA, Kilpatrick IC. *The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system*. Pharmacol Ther 1996; 72: 25-36
19. Curtis D, Watkins J. *Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones*. J Physiol 1963; 166: 1-14
20. Mewett KN, Oakes DJ, Olverman HJ, Smith DA, Watkins JC. *Pharmacology of the excitatory actions of sulphonic and sulphinic amino acids*. Adv Biochem Psychopharmacol 1983; 37: 163-174
21. Pullan LM, Olney JW, Price MT, Compton RP, Hood WF et al. *Excitatory amino acid receptor potency and subclass specificity of sulfur-containing amino acids*. J Neurochem 1987; 49: 1301-1307
22. Curras MC, Dingledine R. *Selectivity of amino acid transmitters acting at N-methyl-D-aspartate and amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors*. Mol Pharmacol 1992; 41: 520-526
23. Kang SS, Wong PW, Susmano A, Sora J, Norusis M et al. *Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease*. Am J Hum Genet 1991; 48: 536-545
24. Surtees R. *Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathway*. Eur J Pediatr 1998; 157 Suppl 2: 118-121
25. Watkins D, Rosenblatt DS. *Functional methionine synthase deficiency (cblE and cblG): clinical and biochemical heterogeneity*. Am J Med Genet 1989; 34: 427-434
26. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S et al. *Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease*. N Engl J Med 1991; 324: 1149-1155

27. Shimakawa T, Nieto FJ, Malinow MR, Chambless LE, Schreiner PJ et al. *Vitamin intake: a possible determinant of plasma homocyst(e)ine among middle-aged adults*. *Ann Epidemiol* 1997; 7: 285-293
28. Ubbink JB, Vermaak WJ, van der MA, Becker PJ. *Vitamin B-12, vitamin B-6, and folate nutritional status in men with hyperhomocysteinemia*. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 47-53
29. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG et al. *Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry*. *J Clin Invest* 1988; 81: 466-477
30. De Bree A, van Dusseldorp M, Brouwer IA, van het Hof KH, Steegers-Theunissen R-P. *Folate intake in Europe: recommended, actual and desired intake*. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51: 643-660
31. Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, Rush D, Rosenberg IH. *Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population*. *J Am Med Assoc* 1993; 270: 2693-2698
32. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Richards EW, Krumdieck CL. *Local and systemic effects of cigarette smoking on folate and vitamin B-12*. *Am J Clin Nutr* 1994; 60: 559-566
33. Nygard O, Refsum H, Ueland PM, Stensvold I, Nordrehaug JE et al. *Coffee consumption and plasma total homocysteine: The Hordaland Homocysteine Study*. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 136-143
34. Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME et al. *Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status*. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 220-224
35. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout DKLA, Blom HJ. *Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease*. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 599-618
36. van Meurs JBJ, Dhonukshe-Rutten RAM, Pluijm SFM, van der Klift M, de Jonge R et al. *Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture*. *N Engl J Med* 2004; 20: 2033-2041
37. Leblhuber F, Walli J, Widner B, rtner-Dworzak E, Fuchs D et al. *Homocysteine and B vitamins in dementia*. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 127-128
38. Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. *The controversy over homocysteine and cardiovascular risk*. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 324-332
39. Wald DS, Law M, Morris JK. *Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a metaanalysis*. *Br Med J* 2002; 325: 1202-1208

40. Hyland K, Smith I, Bottiglieri T, Perry J, Wendel U et al. *Demyelination and decreased S-adenosylmethionine in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency*. Neurology 1988; 38: 459-462
41. Scott JM, Dinn JJ, Wilson P, Weir DG. *Pathogenesis of subacute combined degeneration: a result of methyl group deficiency*. Lancet 1981; 2: 334-337
42. Surtees R, Leonard J, Austin S. *Association of demyelination with deficiency of cerebrospinal-fluid S-adenosylmethionine in inborn errors of methyl-transfer pathway*. Lancet 1991; 338: 1550-1554
43. Surtees R. *Biochemical pathogenesis of subacute combined degeneration of the spinal cord and brain*. J Inher Metab Dis 1993; 16: 762-770
44. Ogier de Baulny H, Gerard M, Saudubray JM, Zittoun J. *Remethylation defects: guidelines for clinical diagnosis and treatment*. Eur J Pediatr 1998; 157 Suppl 2: 77-83
45. van Guldener C, Stehouwer CD. *Homocysteine-lowering treatment: an overview*. Expert Opin Pharmacother 2001; 2: 1449-1460
46. Brattstrom LE, Israelsson B, Jeppsson JO, Hultberg BL. *Folic acid - an innocuous means to reduce plasma homocysteine*. Scand J Clin Lab Invest 1988; 48: 215-221
47. Smolin LA, Benevenga NJ, Berlow S. *The use of betaine for the treatment of homocystinuria*. J Pediatr 1981; 99: 467-472
48. Wall RT, Harlan JM, Harker LA, Striker GE. *Homocysteine-induced endothelial cell injury in vitro: a model for the study of vascular injury*. Thromb Res 1980; 18: 113-121
49. Loscalzo J. *The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia*. J Clin Invest 1996; 98: 5-7
50. Heinecke JW, Kawamura M, Suzuki L, Chait A. *Oxidation of low density lipoprotein by thiols: superoxide-dependent and -independent mechanisms*. J Lipid Res 1993; 34: 2051-2061
51. Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, Haefeli WE, Fowler B. *Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions?* Nephrol Dial Transplant 1998; 13: 656-661
52. Surtees R, Bowron A, Leonard J. *Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment*. Pediatr Res 1997; 42: 577-582
53. Perna AF, De Santo NG, Ingrosso D. *Adverse effects of hyperhomocysteinemia and their management by folic acid*. Miner Electrolyte Metab 1997; 23: 174-178

54. Chiang PK, Richards HH, Cantoni GL. *S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase: analogues of S-adenosyl-L-homocysteine as potential inhibitors*. Mol Pharmacol 1977; 13: 939-947
55. Newman PE. *Can reduced folic acid and vitamin B12 levels cause deficient DNA methylation producing mutations which initiate atherosclerosis?* Med Hypotheses 1999; 53: 421-424
56. Rodgers GM, Kane WH. *Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator*. J Clin Invest 1986; 77: 1909-1916
57. Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM. *Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells*. Arterioscler Thromb 1993; 13: 1327-1333
58. Nishinaga M, Ozawa T, Shimada K. *Homocysteine, a thrombogenic agent, suppresses anticoagulant heparan sulfate expression in cultured porcine aortic endothelial cells*. J Clin Invest 1993; 92: 1381-1386
59. Giannini MJ, Coleman M, Innerfield I. *Letter: Antithrombin activity in homocystinuria*. Lancet 1975; 1: 1094-
60. Hayashi T, Honda G, Suzuki K. *An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells*. Blood 1992; 79: 2930-2936
61. Lentz SR, Sadler JE. *Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine*. J Clin Invest 1991; 88: 1906-1914
62. Rodgers GM, Conn MT. *Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells*. Blood 1990; 75: 895-901
63. Hajjar KA. *Homocysteine-induced modulation of tissue plasminogen activator binding to its endothelial cell membrane receptor*. J Clin Invest 1993; 91: 2873-2879
64. McKusick VA. *Heritable disorders of connective tissue*. 3 ed. Louis: C.V.Mosby, 1966
65. Kang AH, Trelstad RL. *A collagen defect in homocystinuria*. J Clin Invest 1973; 52: 2571-2578
66. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. *Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species*. Eur J Biochem 2000; 267: 4912-4916

67. Kruman II, Culmsee C, Chan SL, Kruman Y, Guo Z et al. *Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity.* J Neurosci 2000; 20: 6920-6926
68. White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K et al. *Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways.* J Neurochem 2001; 76: 1509-1520
69. Ho PI, Collins SC, Dhitavat S, Ortiz D, Ashline D et al. *Homocysteine potentiates beta-amyloid neurotoxicity: role of oxidative stress.* J Neurochem 2001; 78: 249-253
70. Ho PI, Ashline D, Dhitavat S, Ortiz D, Collins SC et al. *Folate deprivation induces neurodegeneration: roles of oxidative stress and increased homocysteine.* Neurobiol Dis 2003; 14: 32-42
71. Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB. *Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage.* J Neurosci Res 2002; 70: 694-702
72. Lipton SA, Kim WK, Choi YB, Kumar S, D'Emilia DM et al. *Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 5923-5928
73. Choi DW. *Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.* Neuron 1988; 1: 623-634
74. Lipton SA, Rosenberg PA. *Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders.* N Engl J Med 1994; 330: 613-622
75. Meldrum B, Garthwaite J. *Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease.* Trends Pharmacol Sci 1990; 11: 379-387
76. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Hyland K, Farrow A et al. *Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF of children who receive methotrexate for the treatment of cancer.* J Clin Oncol 1997; 15: 2800-2806
77. Bertsch T, Mielke O, Holy S, Zimmer W, Casarin W et al. *Homocysteine in cerebrovascular disease: an independent risk factor for subcortical vascular encephalopathy.* Clin Chem Lab Med 2001; 39: 721-724
78. Olney JW, Zorumski C, Price MT, Labruyere J. *L-cysteine, a bicarbonate-sensitive endogenous excitotoxin.* Science 1990; 248: 596-599
79. Sawamoto O, Kyo S, Kaneda S, Harada M, Kishimoto S et al. *Four-week intravenous repeated dose toxicity study of L-cysteine in male rats.* J Toxicol Sci 2003; 28: 95-107

80. Wang XF, Cynader MS. *Pyruvate released by astrocytes protects neurons from copper-catalyzed cysteine neurotoxicity*. J Neurosci 2001; 21: 3322-3331
81. Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF, Wolf VA. *Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist 4-amethopteroylglutamic acid (aminopterin)*. N Engl J Med 1948; 238: 787-793
82. Djerassi I, Farber S, Abir E, Neikirik W. *Continuous infusion of methotrexate in children with acute leukemia*. Cancer 1967; 20: 233-242
83. Hardmann JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 ed. New York: The Mc Graw-Hill Companies Inc., 1999
84. Balis FM, Mirro J, Reaman GH, Evans WE, McCully C et al. *Pharmacokinetics of subcutaneous methotrexate*. J Clin Oncol 1988; 6: 1882-1886
85. Crom WR, Evans WE. *Methotrexate*. In: Evans WE, Schentag JJ, Jusko WJ. *Applied Pharmacokinetics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. Vancouver: Applied Therapeutics Inc., 1992: 29-1-29-42
86. Kamen BA. *Folate and antifolate pharmacology*. Semin Oncol 1997; 24: 18-30
87. Moscow JA. *Methotrexate transport and resistance*. Leuk Lymphoma 1998; 30: 215-224
88. Trippett T, Schlemmer S, Elisseyeff Y, Goker E, Wachter M et al. *Defective transport as a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphocytic leukemia*. Blood 1992; 80: 1158-1162
89. Whitehead VM, Rosenblatt DS, Vuchich MJ, Shuster JJ, Witte A et al. *Accumulation of methotrexate and methotrexate polyglutamates in lymphoblasts at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: a pilot prognostic factor analysis*. Blood 1990; 76: 44-49
90. Lippens RJ, Winograd B. *Methotrexate concentration levels in the cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: An unreliable prediction*. Pediatr Hematol Oncol 1988; 5: 115-124
91. Millot F, Rubie H, Mazingue F, Mechinaud F, Thyss A. *Cerebrospinal fluid drug levels of leukemic children receiving intravenous 5 g/m² methotrexate*. Leuk Lymphoma 1994; 14: 141-144
92. Seidel H, Andersen A, Kvaloy JT, Nygaard R, Moe PJ et al. *Variability in methotrexate serum and cerebrospinal fluid pharmacokinetics in children with acute lymphocytic leukemia: relation to assay methodology and physiological variables*. Leuk Res 2000; 24: 193-199
93. Hryniuk WM, Bertino JR. *Treatment of leukemia with large doses of methotrexate and folinic acid: Clinical-biochemical correlates*. J Clin Invest 1969; 48: 2140-2155

94. Balis FM, Poplack DG. *Central nervous system pharmacology of antileukemic drugs*. Am J Pediatr Hematol Oncol 1989; 11: 74-86
95. Jacobs SA, Stoller RG, Chabner BA, Johns DG. *7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate*. J Clin Invest 1976; 57: 534-538
96. Valerino DM, Johns DG, Zaharko DS, Oliverio VT. *Studies of the metabolism of methotrexate by intestinal flora. I. Identification and study of biological properties of the metabolite 4-amino-4-deoxy-N¹⁰-methylpteronic acid*. Biochem Pharmacol 1972; 21: 821-831
97. Fry DW, Yalowich JC, Goldman ID. *Rapid formation of poly-gamma-glutamyl derivatives of methotrexate and their association with dihydrofolate reductase as assessed by high pressure liquid chromatography in the Ehrlich ascites tumor cell in vitro*. J Biol Chem 1982; 257: 1890-1896
98. Jolivet J, Chabner BA. *Intracellular pharmacokinetics of methotrexate polyglutamates in human breast cancer cells. Selective retention and less dissociable binding of 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₄ and 4-NH₂-10-CH₃-pteroylglutamate₅ to dihydrofolate reductase*. J Clin Invest 1983; 72: 773-778
99. Teresi ME, Rodman JH. *Methotrexate*. In: Murphy JE. *Clinical Pharmacokinetics, Pocket Reference*. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists, 1993: 157-177
100. Josting A, Diehl V, Engert A. *Methotrexat Pharmakologie, Toxizität und Rescuemaßnahmen bei hochdosierter Behandlung*. Der Onkologe 1998; 4: 974-985
101. Huffman DH, Wan SH, Azarnoff DL, Hogstraten B. *Pharmacokinetics of methotrexate*. Clin Pharmacol Ther 1973; 14: 572-579
102. Pratt CB, Roberts D, Shanks EC, Warmath EL. *Clinical trials and pharmacokinetics of intermittent high-dose methotrexate-"leucovorin rescue" for children with malignant tumors*. Cancer Res 1974; 34: 3326-3331
103. Bode U, Magrath IT, Bleyer WA, Poplack DG, Glaubiger DL. *Active transport of methotrexate from cerebrospinal fluid in humans*. Cancer Res 1980; 40: 2184-2187
104. Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D et al. *Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates*. J Biol Chem 1985; 260: 9720-9726
105. Allegra CJ, Fine RL, Drake JC, Chabner BA. *The effect of methotrexate on intracellular folate pools in human MCF-7 breast cancer cells. Evidence for direct inhibition of purine synthesis*. J Biol Chem 1986; 261: 6478-6485
106. Allegra CJ, Hoang K, Yeh GC, Drake JC, Baram J. *Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cancer cells as*

- a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate.* J Biol Chem 1987; 262: 13520-13526
107. Baggott J, Vaughn W, Hudson B. *Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide.* Biochem J 1986; 236: 193-200
 108. Bernini JC, Fort DW, Griener JC, Kane BJ, Chappell WB et al. *Aminophylline for methotrexate-induced neurotoxicity.* Lancet 1995; 345: 544-547
 109. Peyriere H, Poiree M, Cociglio M, Margueritte G, Hansel S et al. *Reversal of neurologic disturbances related to high-dose methotrexate by aminophylline.* Med Pediatr Oncol 2001; 36: 662-664
 110. Bleyer WA. *Neurologic sequelae of methotrexate and ionizing radiation: a new classification.* Cancer Treat Rep 1981; 65 Suppl 1: 89-98
 111. Bleyer WA. *Central nervous system leukemia.* Pediatr Clin North Am 1988; 35: 789-814
 112. Mahoney DH, Jr., Shuster JJ, Nitschke R, Lauer SJ, Steuber CP et al. *Acute neurotoxicity in children with B-precursor acute lymphoid leukemia: an association with intermediate-dose intravenous methotrexate and intrathecal triple therapy - a Pediatric Oncology Group study.* J Clin Oncol 1998; 16: 1712-1722
 113. Watterson J, Toogood I, Nieder M, Morse M, Frierdich S et al. *Excessive spinal cord toxicity from intensive central nervous system-directed therapies.* Cancer 1994; 74: 3034-3041
 114. Shuper A, Stark B, Kornreich L, Cohen IJ, Aviner S et al. *Methotrexate treatment protocols and the central nervous system: significant cure with significant neurotoxicity.* J Child Neurol 2000; 15: 573-580
 115. Walker RW, Allen JC, Rosen G, Caparros B. *Transient cerebral dysfunction secondary to high-dose methotrexate.* J Clin Oncol 1986; 4: 1845-1850
 116. Mott MG, Stevenson P, Wood CB. *Methotrexate meningitis.* Lancet 1972; 2: 656-657
 117. Nelson RW, Frank JT. *Intrathecal methotrexate-induced neurotoxicities.* Am J Hosp Pharm 1981; 38: 65-68
 118. Weiss HD, Walker MD, Wiernik PH. *Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents.* N Engl J Med 1974; 291: 127-133
 119. Tuxen MK, Hansen SW. *Neurotoxicity secondary to antineoplastic drugs.* Cancer Treat Rev 1994; 20: 191-214

120. Allen JC, Rosen G. *Transient cerebral dysfunction following chemotherapy for osteogenic sarcoma*. Ann Neurol 1978; 3: 441-444
121. Kubo M, Azuma E, Arai S, Komada Y, Ito M et al. *Transient encephalopathy following a single exposure of high-dose methotrexate in a child with acute lymphoblastic leukemia*. Pediatr Hematol Oncol 1992; 9: 157-165
122. Packer RJ, Grossman RI, Belasco JB. *High dose systemic methotrexate-associated acute neurologic dysfunction*. Med Pediatr Oncol 1983; 11: 159-161
123. Yim YS, Mahoney DH, Jr., Oshman DG. *Hemiparesis and ischemic changes of the white matter after intrathecal therapy for children with acute lymphocytic leukemia*. Cancer 1991; 67: 2058-2061
124. Keime-Guibert F, Napolitano M, Delattre JY. *Neurological complications of radiotherapy and chemotherapy*. J Neurol 1998; 245: 695-708
125. Clark AW, Cohen SR, Nissenblatt MJ, Wilson SK. *Paraplegia following intrathecal chemotherapy: neuropathologic findings and elevation of myelin basic protein*. Cancer 1982; 50: 42-47
126. Gagliano RG, Costanzi JJ. *Paraplegia following intrathecal methotrexate: report of a case and review of the literature*. Cancer 1976; 37: 1663-1668
127. der Weid NX, de Crousaz H, Beck D, Deonna T, Miklossy J et al. *Acute fatal myeloencephalopathy after combined intrathecal chemotherapy in a child with acute lymphoblastic leukemia*. Med Pediatr Oncol 1991; 19: 192-198
128. Allen JC, Rosen G, Mehta BM, Horten B. *Leukoencephalopathy following high-dose iv methotrexate chemotherapy with leucovorin rescue*. Cancer Treat Rep 1980; 64: 1261-1273
129. Norrell H, Wilson CB, Slagel DE, Clark DB. *Leukoencephalopathy following the administration of methotrexate into the cerebrospinal fluid in the treatment of primary brain tumors*. Cancer 1974; 33: 923-932
130. Price RA, Jamieson PA. *The central nervous system in childhood leukemia. II. Subacute leukoencephalopathy*. Cancer 1975; 35: 306-318
131. Rubinstein LJ, Herman MM, Long TF, Wilbur JR. *Disseminated necrotizing leukoencephalopathy: a complication of treated central nervous system leukemia and lymphoma*. Cancer 1975; 35: 291-305
132. Asato R, Akiyama Y, Ito M, Kubota M, Okumura R et al. *Nuclear magnetic resonance abnormalities of the cerebral white matter in children with acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma during and after central nervous system prophylactic treatment with intrathecal methotrexate*. Cancer 1992; 70: 1997-2004

133. Colamaria V, Caraballo R, Borgna-Pignatti C, Marradi P, Balter R et al. *Transient focal leukoencephalopathy following intraventricular methotrexate and cytarabine. A complication of the Ommaya reservoir: case report and review of the literature.* Childs Nerv Syst 1990; 6: 231-235
134. Kay HE, Knapton PJ, O'Sullivan JP, Wells DG, Harris RF et al. *Encephalopathy in acute leukaemia associated with methotrexate therapy.* Arch Dis Child 1972; 47: 344-354
135. Kaplan RS, Wiernik PH. *Neurotoxicity of antineoplastic drugs.* Semin Oncol 1982; 9: 103-130
136. Bode U, Oliff A. *The effects of antineoplastic therapy on growth and development in children.* Adv Pharmacol Chemother 1982; 19: 207-247
137. Copeland DR, Fletcher JM, Pfefferbaum-Levine B, Jaffe N, Ried H et al. *Neuropsychological sequelae of childhood cancer in long-term survivors.* Pediatrics 1985; 75: 745-753
138. Copeland DR, Dowell RE, Jr., Fletcher JM, Bordeaux JD, Sullivan MP et al. *Neuropsychological effects of childhood cancer treatment.* J Child Neurol 1988; 3: 53-62
139. Mulhern RK, Ochs J, Fairclough D, Wasserman AL, Davis KS et al. *Intellectual and academic achievement status after CNS relapse: a retrospective analysis of 40 children treated for acute lymphoblastic leukemia.* J Clin Oncol 1987; 5: 933-940
140. Blay JY, Conroy T, Chevreau C, Thyss A, Quesnel N et al. *High-dose methotrexate for the treatment of primary cerebral lymphomas: analysis of survival and late neurologic toxicity in a retrospective series.* J Clin Oncol 1998; 16: 864-871
141. Pels H, Deckert-Schluter M, Glasmacher A, Kleinschmidt R, Oehring R et al. *Primary central nervous system lymphoma: a clinicopathological study of 28 cases.* Hematol Oncol 2000; 18: 21-32
142. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U. *Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity.* Chemotherapy 2003; 49: 92-104
143. Quinn CT, Kamen BA. *A biochemical perspective of methotrexate neurotoxicity with insight on nonfolate rescue modalities.* J Investig Med 1996; 44: 522-530
144. Bernini JC, Fort DW, Griener JC, Kane BJ, Chappell WB et al. *Aminophylline for methotrexate-induced neurotoxicity.* Lancet 1995; 345: 544-547
145. Peyriere H, Poiree M, Cociglio M, Margueritte G, Hansel S et al. *Reversal of neurologic disturbances related to high-dose methotrexate by aminophylline.* Med Pediatr Oncol 2001; 36: 662-664

146. Craine J, Hall E, Kaufman S. *The isolation and characterization of dihydropteridine reductase from sheep liver.* J Biol Chem 1972; 247: 6082-6091
147. Abelson HT. *Methotrexate and central nervous system toxicity.* Cancer Treat Rep 1978; 62: 1999-2001
148. Millot F, Dhondt JL, Hayte JM, Bauters F. *Impairment of cerebral biogenic amine synthesis in a patient receiving high-dose methotrexate.* Am J Pediatr Hematol Oncol 1992; 14: 276-278
149. Millot F, Chastagner P, Dhondt J, Sommelet D. *Substitutive therapy in a case of methotrexate neurotoxicity [letter].* Eur J Cancer 1992; 28A: 1935-1936
150. Silverstein FS, Hutchinson RJ, Johnston MV. *Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in children during treatment for acute lymphocytic leukemia.* Pediatr Res 1986; 20: 285-291
151. Nichol CA, Lee CL, Edelstein MP, Chao JY, Duch DS. *Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by de novo and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A 1983; 80: 1546-1550
152. Culvenor AJ, Miller LP, Levine RA, Lovenberg W. *Effects of methotrexate on biopterin levels and synthesis in rat cultured pineal glands.* J Neurochem 1984; 42: 1707-1714
153. Duch DS, Lee CL, Edelstein MP, Nichol CA. *Biosynthesis of tetrahydrobiopterin in the presence of dihydrofolate reductase inhibitors.* Mol Pharmacol 1983; 24: 103-108
154. Surtees R, Clelland J, Hann I. *Demyelination and single-carbon transfer pathway metabolites during the treatment of acute lymphoblastic leukemia: CSF studies.* J Clin Oncol 1998; 16: 1505-1511
155. Broxson EH, Jr., Stork LC, Allen RH, Stabler SP, Kolhouse JF. *Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusions.* Cancer Res 1989; 49: 5879-5883
156. Kishi S, Griener J, Cheng C, Das S, Cook EH et al. *Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia.* J Clin Oncol 2003; 21: 3084-3091
157. Refsum H, Ueland PM, Kvinnsland S. *Acute and long-term effects of high-dose methotrexate treatment on homocysteine in plasma and urine.* Cancer Res 1986; 46: 5385-5391
158. Refsum H, Helland S, Ueland PM. *Fasting plasma homocysteine as a sensitive parameter of antifolate effect: a study of psoriasis patients receiving low-dose methotrexate treatment.* Clin Pharmacol Ther 1989; 46: 510-520

159. Refsum H, Wesenberg F, Ueland PM. *Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate*. *Cancer Res* 1991; 51: 828-835
160. Drachtman RA, Cole PD, Golden CB, James SJ, Melnyk S et al. *Dextromethorphan is effective in the treatment of subacute methotrexate neurotoxicity*. *Pediatr Hematol Oncol* 2002; 19: 319-327
161. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Kamen BA. *Methotrexate, homocysteine, and seizures*. *J Clin Oncol* 1998; 16: 393-394
162. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. *Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy*. *Cancer* 2000; 89: 925-931
163. Suleiman SA, Spector R. *Methionine synthetase in mammalian brain: function, development and distribution*. *Life Sci* 1980; 27: 2427-2432
164. Abe K, Kimura H. *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator*. *J Neurosci* 1996; 16: 1066-1071
165. Maytal J, Grossman R, Yusuf FH, Shende AC, Karayalycin G et al. *Prognosis and treatment of seizures in children with acute lymphoblastic leukemia*. *Epilepsia* 1995; 36: 831-836
166. Burgi DS, Chien R-L. *Application and Limits of Sample Stacking in Capillary Electrophoresis*. In: Altria KD. *Capillary Electrophoresis Guidebook*. Totowa: Humana Press, 1996: 211-226
167. Terabe S, Otsuka K, Ando T. *Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary*. *Anal Chem* 1985; 57: 834-841
168. Banks PR, Paquette DM. *Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis*. *Bioconj Chem* 1995; 6: 447-458
169. Gregory J. *The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 9 ed. Eugene: Molecular Probes, 2001
170. Lau SK, Zaccardo F, Little M, Banks P. *Nanomolar derivatizations with 5-carboxyfluorescein succinimidylester for fluorescence detection in capillary electrophoresis*. *J Chromatogr A* 1998; 809: 203-210
171. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm 2001
172. Almeida AM, Castel-Branco MM, Falcao AC. *Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002; 774: 215-222

173. Toyo'oka T, Imai K. *New fluorogenic reagent having benzofurazan structure for thiols: 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole*. *Anal Chem* 1984; 56: 2461-2464
174. Araki A, Sako Y. *Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. *J Chromatogr* 1987; 422: 43-52
175. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. *Homocysteine and other thiols in plasma and urine: automated determination and sample stability*. *Clin Chem* 1993; 39: 263-271
176. Pui CH, Sandlund JT. *Total therapy study XV for newly diagnosed patients with acute lymphoblastic leukemia*. Study protocol, St. Jude Children's Research Hospital Memphis 2001
177. Trümper L, Möller P, Neubauer A. *Maligne Lymphome*. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram C. *Die Onkologie*. Berlin: Springer-Verlag, 2004: 1712-1774
178. Görtz P. Persönliche Mitteilung. 2004
179. Liebeskind A-K. Persönliche Mitteilung. 2004
180. Bortz J. *Statistik für Sozialwissenschaftler*. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag, 1999
181. Engelhardt H, Beck W, Schmitt T. *Kapillarelektrophorese*. Braunschweig: Vieweg, 1994
182. Altria KD. *Capillary Electrophoresis Guidebook*. Totowa: Humana Press, 1996
183. Relling M. Persönliche Mitteilung. 2004
184. Bottiglieri T. *Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders*. *Nutr Rev* 1996; 54: 382-390
185. Surtees R, Hyland K. *Cerebrospinal fluid concentrations of S-adenosylmethionine, methionine, and 5-methyltetrahydrofolate in a reference population: cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine declines with age in humans*. *Biochem Med Metab Biol* 1990; 44: 192-199
186. Waller SJ, Kilpatrick IC, Chan MW, Evans RH. *The influence of assay conditions on measurement of excitatory dibasic sulphinic and sulphonic alpha-amino acids in nervous tissue*. *J Neurosci Methods* 1991; 36: 167-176
187. Orwar O, Folestad S, Einarsson S, Andine P, Sandberg M. *Automated determination of neuroactive acidic sulphur-containing amino acids and gamma-glutamyl peptides using liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection*. *J Chromatogr* 1991; 566: 39-55
188. Orwar O. *Photochemical characterization and optimization of argon ion laser-induced fluorescence detection of o-phthalaldehyde/ β -mercaptoethanol-*

- labeled amino acids and γ -glutamyl peptides in liquid chromatography: Ultratrace analysis with neurobiological samples.* Anal Chem 1994; 66: 4471-4482
189. Santhosh-Kumar CR, Deutsch JC, Kolhouse JC, Hassell KL, Kolhouse JF. *Measurement of excitatory sulfur amino acids, cysteine sulfinic acid, cysteic acid, homocysteine sulfinic acid, and homocysteic acid in serum by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry and selected ion monitoring.* Anal Biochem 1994; 220: 249-256
 190. Issaq HJ, Chan KC. *Separation and detection of amino acids and their enantiomers by capillary electrophoresis: a review.* Electrophoresis 1995; 16: 467-480
 191. Altria KD. *Capillary Electrophoresis Guidebook.* Totowa: Humana Press, 1996
 192. Banks PR, Paquette DM. *Comparison of three common amine reactive fluorescent probes used for conjugation to biomolecules by capillary zone electrophoresis.* Bioconjug Chem 1995; 6: 447-458
 193. Becker A, Scheuch E, Bode U, Jaehde U. *Simultaneous analysis of sulfur-containing excitatory amino acids using micellar electrokinetic chromatography with diode array and laser-induced fluorescence detection.* Electrophoresis 2002; 23: 2457-2464
 194. Cheng YF, Dovichi NJ. *Subattomole amino acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence.* Science 1988; 242: 562-564
 195. Causse E, Terrier R, Champagne S, Nertz M, Valdiguie P et al. *Quantitation of homocysteine in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection.* J Chromatogr A 1998; 817: 181-185
 196. Beale SC, Hsieh YZ, Wiesler D, Novotny M. *Application of 3-(2-furoyl)quinoline-2-carbaldehyde as a fluorogenic reagent for the analysis of primary amines by liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection.* J Chromatogr 1990; 499: 579-587
 197. Pinto DM, Arriaga EA, Craig D, Angelova J, Sharma N et al. *Picomolar assay of native proteins by capillary electrophoresis precolumn labeling, submicellar separation, and laser-induced fluorescence detection.* Anal Chem 1997; 69: 3015-3021
 198. Bergquist J, Gilman SD, Ewing AG, Ekman R. *Analysis of human cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection.* Anal Chem 1994; 66: 3512-3518
 199. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A et al. *Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications.* Clin Chem 1993; 39: 1764-1779

200. Bayle C, Causse E, Couderc F. *Determination of aminothiols in body fluids, cells, and tissues by capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* 2004; 25: 1457-1472
201. Van Hove JL, Lazeyras F, Zeisel SH, Bottiglieri T, Hyland K et al. *One-methyl group metabolism in non-ketotic hyperglycinaemia: mildly elevated cerebrospinal fluid homocysteine levels*. *J Inherit Metab Dis* 1998; 21: 799-811
202. Blom HJ, Wevers RA, Verrips A, TePoele-Pothoff MT, Trijbels JM. *Cerebrospinal fluid homocysteine and the cobalamin status of the brain*. *J Inherit Metab Dis* 1993; 16: 517-519
203. Hyland K, Bottiglieri T. *Measurement of total plasma and cerebrospinal fluid homocysteine by fluorescence following high-performance liquid chromatography and precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde*. *J Chromatogr B* 1992; 579: 55-62
204. Melnyk S, Pogribna M, Pogribny I, Hine RJ, James SJ. *A new HPLC method for the simultaneous determination of oxidized and reduced aminothiols using coulometric electrochemical detection*. *J Nutr Biochem* 1999; 10: 490-497
205. Melnyk S, James SJ. *Persönliche Mitteilung*. 2003
206. Imai K, Toyo'oka T, Watanabe Y. *A novel fluorogenic reagent for thiols: ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate*. *Anal Biochem* 1983; 128: 471-473
207. Imai K, Toyo'oka T. *Fluorometric assay of thiols with fluorobenzoxadiazoles*. *Methods Enzymol* 1987; 143: 67-75
208. Ling BL, Dewaele C, Baeyens WR. *Application of micro-scale liquid chromatography with fluorescence detection to the determination of thiols*. *J Chromatogr* 1990; 514: 189-198
209. Dudman NP, Guo XW, Crooks R, Xie L, Silberberg JS. *Assay of plasma homocysteine: light sensitivity of the fluorescent 7-benzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid derivative, and use of appropriate calibrators*. *Clin Chem* 1996; 42: 2028-2032
210. Refsum H, Christensen B, Djurhuus R, Ueland PM. *Interaction between methotrexate, "rescue" agents and cell proliferation as modulators of homocysteine export from cells in culture*. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 258: 559-566
211. Guttormsen AB, Ueland PM, Lonning PE, Mella O, Refsum H. *Kinetics of plasma total homocysteine in patients receiving high-dose methotrexate therapy*. *Clin Chem* 1998; 44: 1987-1989
212. Refsum H, Helland S, Ueland PM. *Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine*. *Clin Chem* 1985; 31: 624-628

213. Broxson EH, Jr., Stork LC, Allen RH, Stabler SP, Kolhouse JF. *Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusions.* Cancer Res 1989; 49: 5879-5883
214. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH. *Quantitation of total homocysteine, total cysteine, and methionine in normal serum and urine using capillary gas chromatography-mass spectrometry.* Anal Biochem 1987; 162: 185-196
215. Refsum H, Ueland PM, Svardal AM. *Fully automated fluorescence assay for determining total homocysteine in plasma.* Clin Chem 1989; 35: 1921-1927
216. Howell SB, Ensminger WD, Krishan A, Frei E. *Thymidine rescue of high-dose methotrexate in humans.* Cancer Res 1978; 38: 325-330
217. Kesavan V, Sur P, Doig MT, Scanlon KJ, Priest DG. *Effects of methotrexate on folates in Krebs ascites and L1210 murine leukemia cells.* Cancer Lett 1986; 30: 55-59
218. Stabler SP, Allen RH, Barrett RE, Savage DG, Lindenbaum J. *Cerebrospinal fluid methylmalonic acid levels in normal subjects and patients with cobalamin deficiency.* Neurology 1991; 41: 1627-1632
219. Castagna A, Le Grazie C, Accordini A, Giulidori P, Cavalli G et al. *Cerebrospinal fluid S-adenosylmethionine (SAME) and glutathione concentrations in HIV infection: effect of parenteral treatment with SAME.* Neurology 1995; 45: 1678-1683
220. Ubbink JB, Hayward Vermaak WJ, Bissbort S. *Rapid high-performance liquid chromatographic assay for total homocysteine levels in human serum.* J Chromatogr 1991; 565: 441-446
221. Relling M. Persönliche Mitteilung. 2003
222. Quinn CT, Griener JC, Bottiglieri T, Arning E, Winick NJ. *Effects of intraventricular methotrexate on folate, adenosine, and homocysteine metabolism in cerebrospinal fluid.* J Pediatr Hematol Oncol 2004; 26: 386-388
223. Andersson A, Isaksson A, Hultberg B. *Homocysteine export from erythrocytes and its implications for plasma sampling.* Clin Chem 1992; 38: 1311-1315
224. Pastore A, Massoud R, Motti C, Lo RA, Fucci G et al. *Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopyruvate in plasma and urine.* Clin Chem 1998; 44: 825-832
225. Sagara J, Makino N, Bannai S. *Glutathione efflux from cultured astrocytes.* J Neurochem 1996; 66: 1876-1881

226. Geller HM, Cheng KY, Goldsmith NK, Romero AA, Zhang AL et al. *Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside*. J Neurochem 2001; 78: 265-275
227. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. *Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration*. Eur J Biochem 2000; 267: 4904-4911
228. Turski WA. *Homocysteic acid: convulsant action of stereoisomers in mice*. Brain Res 1989; 479: 371-373
229. Folbergrova J, Haugvicova R, Mares P. *Attenuation of seizures induced by homocysteic acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists*. Brain Res 2001; 908: 120-129
230. Do KQ, Tappaz ML. *Specificity of cysteine sulfinate decarboxylase (CSD) for sulfur-containing amino-acids*. Neurochem Int 1996; 28: 363-371
231. Addiego JE, Jr., Ridgway D, Bleyer WA. *The acute management of intrathecal methotrexate overdose: pharmacologic rationale and guidelines*. J Pediatr 1981; 98: 825-828
232. Ettinger LJ. *Pharmacokinetics and biochemical effects of a fatal intrathecal methotrexate overdose*. Cancer 1982; 50: 444-450
233. O'Marcaigh AS, Johnson CM, Smithson WA, Patterson MC, Widemann BC et al. *Successful treatment of intrathecal methotrexate overdose by using ventriculolumbar perfusion and intrathecal instillation of carboxypeptidase G2*. Mayo Clin Proc 1996; 71: 161-165
234. Jakobson AM, Kreuger A, Mortimer O, Henningsson S, Seidel H et al. *Cerebrospinal fluid exchange after intrathecal methotrexate overdose. A report of two cases*. Acta Paediatr 1992; 81: 359-361
235. Lampkin BC, Higgins GR, Hammond D. *Absence of neurotoxicity following massive intrathecal administration of methotrexate. Case report*. Cancer 1967; 20: 1780-1781
236. Ettinger LJ, Freeman AI, Creaven PJ. *Intrathecal methotrexate overdose without neurotoxicity: case report and literature review*. Cancer 1978; 41: 1270-1273
237. Spiegel RJ, Cooper PR, Blum RH, Speyer JL, McBride D et al. *Treatment of massive intrathecal methotrexate overdose by ventriculolumbar perfusion*. N Engl J Med 1984; 311: 386-388
238. Lee AC, Wong KW, Fong KW, So KT. *Intrathecal methotrexate overdose*. Acta Paediatr 1997; 86: 434-437
239. Riva L, Conter V, Rizzari C, Jankovic M, Sla A et al. *Successful treatment of intrathecal methotrexate overdose with folinic acid rescue: a case report*. Acta Paediatr 1999; 88: 780-785

240. Finkelstein Y, Zevin S, Heyd J, Bentur Y, Zigelman Y et al. *Emergency treatment of life-threatening intrathecal methotrexate overdose.* Neurotoxicology 2004; 25: 407-410
241. Winick NJ, Bowman WP, Kamen BA, Roach ES, Rollins N et al. *Unexpected acute neurologic toxicity in the treatment of children with acute lymphoblastic leukemia.* J Natl Cancer Inst 1992; 84: 252-256
242. Fliessbach K, Urbach H, Helmstaedter C, Pels H, Glasmacher A et al. *Cognitive performance and magnetic resonance imaging findings after high-dose systemic and intraventricular chemotherapy for primary central nervous system lymphoma.* Arch Neurol 2003; 60: 563-568
243. Pels H, Schmidt-Wolf IG, Glasmacher A, Schulz H, Engert A et al. *Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy.* J Clin Oncol 2003; 21: 4489-4495
244. Khan RB, Shi W, Thaler HT, DeAngelis LM, Abrey LE. *Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma?* J Neurooncol 2002; 58: 175-178
245. Ferreri AJ, Reni M, Pasini F, Calderoni A, Tirelli U et al. *A multicenter study of treatment of primary CNS lymphoma.* Neurology 2002; 58: 1513-1520

7 Anhang

ANHANG A

Einzelergebnisse der Plasma- und Liquoranalysen der ALL-Patienten, die im St. Jude Children's Research Hospital (Memphis) behandelt wurden:

- (1) Homocysteinkonzentrationen im Plasma der LR-Patienten
- (2) Homocysteinkonzentrationen im Plasma der SHR-Patienten
- (3) Homocystein-, Cystein- und Glutathionkonzentrationen im Liquor

(1) Homocysteinkonzentrationen der LR-Patienten.

Patient	Homocysteinkonzentration im Plasma [μM]						
	RI	C1	C1h23	C1h42	C15	C15h23	C15h42
1	KP	KP	KP	KP	2,91	5,44	6,91
2	KP	KP	KP	KP	7,78	20,15	25,54
3	KP	4,81	10,45	7,56	4,40	9,38	KP
4	KP	7,02	14,74	13,09	5,66	10,74	12,69
5	5,88	3,33	5,05	6,55	4,05	6,99	6,58
6	12,48	8,92	12,72	20,13	KP	KP	KP
7*	5,24	3,88	6,08	7,01	4,02	6,24	7,44
8*	4,91	3,71	7,24	8,29	3,89	7,16	8,93
9*	4,83	3,95	6,58	6,36	3,71	5,36	5,91
10*	1,07	3,03	5,03	6,40	4,62	7,90	10,10
11*	4,46	3,83	8,54	10,64	3,18	KP	9,40
12*	8,58	14,31	20,54	17,48	3,36	8,84	KP
13*	11,17	7,59	14,02	18,13	6,90	12,37	15,89
14	12,27	7,92	15,39	11,59	9,15	11,57	11,17
15	6,49	3,87	7,54	8,89	4,69	10,56	7,26
16	1,00	2,81	6,79	6,39	4,63	6,61	6,31
17	3,79	4,45	5,34	7,27	3,19	4,24	KP
18	0,93	5,66	7,64	5,53	3,77	5,8	9,52
19	5,44	3,41	7,49	9,10	3,70	4,97	6,55
20	5,38	10,47	20,99	17,50	5,66	8,27	10,74
21	2,95	KP	5,10	9,45	3,45	5,47	6,95
22	6,34	3,95	8,36	7,69	4,57	7,71	7,75
23	4,39	4,66	10,17	10,56	4,97	9,68	9,73
24	3,59	5,51	13,23	13,47	5,67	8,52	9,08
25	3,28	4,71	7,14	6,16	4,43	7,06	8,09
26	2,48	4,24	9,13	KP	4,24	KP	14,10
27	4,15	3,48	7,04	7,94	4,41	9,57	9,84
28	9,25	3,30	5,11	2,21	5,83	12,69	9,09

* Von diesen Patienten standen zusätzlich Liquorproben zur Verfügung

KP: keine Probe verfügbar

(2) Homocysteinkonzentrationen der SHR-Patienten.

Patient	Homocysteinkonzentration im Plasma [μM]						
	RI	C1	C1h23	C1h42	C15	C15h23	C15h42
29	KP	KP	KP	5,44	KP	KP	KP
30	KP	KP	KP	KP	KP	13,26	KP
31	KP	7,73	12,30	11,13	5,75	9,09	11,20
32	KP	3,12	6,91	6,24	3,05	4,02	4,43
33	KP	KP	KP	KP	6,03	9,76	9,42
34	KP	5,61	7,83	7,10	KP	KP	9,79
35*	5,94	4,92	10,40	KP	4,63	10,16	14,3
36*	2,38	4,42	8,88	6,04	4,06	5,52	8,25
37*	0,15	5,80	11,06	9,44	4,19	7,23	7,40
38*	4,95	4,70	8,12	6,89	3,85	6,52	6,73
39*	0,00	7,60	10,59	12,26	6,65	9,34	10,72
40*	5,53	3,79	6,05	6,53	5,02	7,85	8,58
41*	3,96	3,39	6,35	8,66	4,81	7,13	16,46
42*	4,07	7,83	34,79	49,57	10,58	16,48	21,34
43	4,77	5,46	9,45	7,66	7,95	KP	KP
44	8,33	6,76	12,36	16,92	6,63	10,80	14,39
45	8,10	KP	KP	KP	KP	KP	KP
46	6,30	2,92	7,92	8,12	KP	7,16	7,12
47	0,53	5,24	6,48	7,16	4,38	6,26	6,35
48	2,58	3,93	6,12	6,73	5,07	6,42	7,59
49	1,67	3,05	4,98	7,70	2,79	9,03	10,29
50	3,02	5,64	6,25	9,54	4,09	8,15	8,51
51	3,87	3,02	5,23	4,31	3,12	6,67	7,06
52	2,97	4,11	4,19	7,80	3,55	5,77	7,69
53	5,31	2,93	5,64	8,65	3,75	5,16	7,70
54	0,00	5,28	8,79	9,91	5,52	9,41	13,43
55	2,73	4,77	9,89	9,11	4,86	9,68	11,78
56	0,00	4,66	10,22	10,21	5,51	11,69	11,09
57	5,67	KP	7,22	11,95	6,82	9,36	11,29
58	4,49	3,81	6,67	11,22	4,61	5,98	8,91
59	0,00	4,94	14,00	12,79	5,79	9,82	10,33
60	36,83	7,03	6,42	10,51	9,06	7,72	12,57
61	5,67	KP	9,36	11,68	5,05	10,96	12,44
62	3,35	4,85	6,62	8,76	4,18	5,04	6,47
63	10,83	5,33	8,01	9,75	11,92	9,67	10,48
64*	KP	KP	KP	KP	KP	6,49	KP
65*	KP	KP	KP	KP	KP	7,69	KP

* Von diesen Patienten standen zusätzlich Liquorproben zur Verfügung

KP: keine Probe verfügbar

(3) Konzentrationen an HCY, CYS und GSH im Liquor der ALL-Patienten.

Pat.	Konzentration im Liquor [nM]											
	RI			C1			C8			C15		
	HCY	CYS	GSH	HCY	CYS	GSH	HCY	CYS	GSH	HCY	CYS	GSH
7	21,3	735	431	73,9	612	470	KP	KP	KP	17,8	517	450
8	23,1	934	441	19,6	716	495	KP	KP	KP	14,3	749	583
9	19,6	680	467	KP	KP	KP	KP	KP	KP	47,6	3625	816
10	47,6	853	733	42,3	741	710	KP	KP	KP	30,1	775	384
11	KP	KP	KP	24,8	856	491	KP	KP	KP	10,8	626	426
12	31,8	609	455	24,8	654	570	KP	KP	KP	23,1	685	618
13	77,4	758	547	63,4	803	583	KP	KP	KP	28,3	789	560
35	2,0	542	480	26,6	758	687	KP	KP	KP	24,8	710	746
36	0,0	528	232	9,0	803	624	KP	KP	KP	35,3	1097	879
37	9,0	741	491	24,8	789	556	KP	KP	KP	16,1	738	546
38	44,1	578	615	14,3	705	858	KP	KP	KP	10,8	508	667
39	KP	KP	KP	10,8	696	431	KP	KP	KP	16,1	831	547
40	19,6	1033	353	24,8	912	542	KP	KP	KP	KP	KP	KP
41	26,6	696	291	33,6	957	378	KP	KP	KP	58,1	1602	622
42	35,3	1019	449	16,1	1005	496	KP	KP	KP	24,8	1579	710
64	35,3	1394	808	31,8	1672	1066	KP	KP	KP	30,1	1537	759
65	47,6	1243	326	49,3	1100	444	KP	KP	KP	72,1	864	804
66	29,0	980	641	51,6	1017	543	KP	KP	KP	81,1	1102	549
67	124,5	2992	375	44,6	1877	322	KP	KP	KP	KP	KP	KP
68	84,6	1096	449	56,8	619	567	72,4	966	714,3	77,6	957	740
69	56,8	1724	866	75,9	73	453	32,5	602	866,1	34,2	651	322
70	58,5	736	1044	46,4	892	1587	49,8	548	792,3	34,2	1088	1640
71	63,7	540	650	60,2	972	680	116	1540	979,6	74,1	1511	753
72	178,3	1380	472	89,8	1204	662	44,6	588	353,4	55,0	747	337
73	74,1	900	415	82,8	943	411	77,6	1162	446,3	32,5	577	265
74	KP	KP	KP	72,4	1000	308	65,5	1162	451,8	51,6	679	415
75	133,2	1670	426	44,6	554	137	111	886	457,3	KP	KP	KP
76	0,0	2606	574	49,8	1304	401	56,8	1338	416,3	175	4679	1398
77	46,4	1838	662	74,1	1088	408	62,0	1048	529,8	KP	KP	KP
78	KP	KP	KP	104	2475	1125	81,1	1366	583,1	79,3	1542	776
79	35,9	1488	1078	37,7	932	631	48,1	1664	1131,4	102	1650	828
80	KP	KP	KP	20,0	1343	689	86,3	2137	723,3	26,8	1000	576
81	48,9	1577	822	40,4	762	928	38,7	1324	858,3	47,2	648	647
82	74,4	861	463	125	1096	340	33,6	1105	429,1	13,2	1247	492
83	30,2	1025	448	35,3	1179	575	KP	KP	KP	47,2	1176	511
84	KP	KP	KP	59,1	1244	386	KP	KP	KP	KP	KP	KP
85	26,8	812	416	288	28620	2606	268	19201	2379,9	127	10863	1483
86	64,2	889	932	21,7	771	600	42,1	1185	627,0	38,7	1266	447
87	3,0	515	182	18,3	688	325	KP	KP	KP	25,1	707	394
88	13,2	518	158	21,7	901	223	KP	KP	KP	31,9	1284	451
89	23,4	753	297	13,2	728	376	KP	KP	KP	57,4	907	491
90	38,7	1750	520	18,3	873	558	KP	KP	KP	30,2	802	443
91	60,8	1340	361	31,9	1046	353	KP	KP	KP	33,6	1250	398
92	11,5	991	603	8,1	537	311	KP	KP	KP	11,5	673	447
93	31,9	1207	575	20,0	1139	433	KP	KP	KP	57,4	4997	639
94	25,1	858	320	3,0	407	320	KP	KP	KP	38,7	883	580

95	21,7	935	484	25,1	592	421	KP	KP	KP	KP	KP	KP
96	40,4	1377	559	61,6	1299	1143	KP	KP	KP	51,1	2559	1476
97	44,1	1854	470	12,6	1462	360	KP	KP	KP	51,1	1324	554
98	19,6	940	629	31,8	1591	657	KP	KP	KP	26,6	892	532
99	KP	KP	KP	267	24470	1866	KP	KP	KP	KP	KP	KP
100	19,6	1103	406	31,8	867	495	KP	KP	KP	40,6	730	574
101	16,1	696	232	21,3	1391	457	KP	KP	KP	23,1	786	383
102	14,3	679	696	28,3	1610	909	KP	KP	KP	38,8	735	1232
103	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	91,4	1450	359
104	19,6	836	922	30,1	845	608	KP	KP	KP	37,1	881	823
105	79,1	1215	560	147	17531	1048	KP	KP	KP	KP	KP	KP
106	14,3	1195	493	17,8	1363	578	KP	KP	KP	59,9	1941	696
107	17,8	1038	507	52,8	1579	597	KP	KP	KP	17,8	1016	286
108	49,3	1100	444	30,1	876	378	KP	KP	KP	28,3	735	335
109	35,3	1077	387	66,9	2587	830	KP	KP	KP	42,3	578	308
110	KP	KP	KP	17,8	707	452	KP	KP	KP	33,6	859	624
111	37,1	548	409	668	53419	2696	KP	KP	KP	704	NB	2602
112	5,5	766	275	10,8	693	373	KP	KP	KP	KP	KP	KP
113	31,8	870	423	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP	KP

NB: nicht bestimmt

KP: keine Probe verfügbar

ANHANG B

Einzelerggebnisse der Liquor- und Serumanalysen der Lymphompatienten, die in der Neurologie des Universitätsklinikums Bonn therapiert wurden:

- (1) Konzentrationen an Homocystein, Cystein, Glutathion, HCSA, MTX und N⁵-Methyl-THF im Liquor der Lymphompatienten.
- (2) MTX-Konzentrationen im Serum der Lymphompatienten nach HDMTX (1,5-5 g/m²).

(1) Konzentrationen an Homocystein, Cystein, Glutathion, HCSA, MTX und N⁵-Methyl-THF im Liquor der Lymphompatienten.

Pat.	Zeitpunkt	HCY [nM]	CYS [nM]	GSH [nM]	HCSA [µM]	MTX [µM]	MTHF* [nM]
1	AI 2	KP	KP	KP	KP	KP	KP
1	AI 3	343	1914	1174	ND	2,61	32,4
1	AI 4	406	2162	1139	ND	6,65	22,7
1	AI 5	482	3632	1698	ND	1,57	27,1
1	BI 2	195	1775	1560	ND	0,68	ND
1	BI 3	329	1726	1177	ND	5,47	65,6
1	BI 4	389	1997	1211	ND	18,67	55,1
1	BI 5	450	2050	1169	ND	9,17	44,2
1	CI 3	200	3051	1021	ND	0,00	63,0
1	CI 4	771	2927	1175	ND	39,43	47,2
1	CI 5	628	3051	1480	ND	8,33	40,0
1	CI 6	689	2279	1001	ND	35,34	NB
1	CI 7	671	2125	1233	ND	30,76	26,0
1	BII 2	23	1414	809	ND	0,91	9,6
1	BII 3	273	1908	1325	ND	1,54	44,4
1	BII 4	288	1732	1313	ND	2,54	50,7
1	BII 5	316	3576	1456	ND	15,07	82,2
1	CII 3	64,2	2773	1249	ND	0,00	75,0
1	CII 4	190	2186	981	ND	1,46	62,5
1	CII 5	151	3599	980	ND	2,13	56,8
1	CII 6	KP	KP	KP	KP	KP	KP
1	CII 7	239	3144	1115	ND	3,37	48,5
2	BI 2	KP	KP	KP	KP	KP	KP
2	BI 3	193	1293	1009	1,48	5,60	97,9
2	BI 4	224	2094	1083	2,03	2,24	35,9
2	BI 5	443	2649	1116	2,14	1,60	71,3
2	CI 3	79,5	2835	1185	ND	ND	59,5
2	CI 4	280	867	1289	1,84	1,27	32,8
2	CI 5	1167	4564	1242	1,89	1,42	21,0
2	CI 6	1010	4410	1337	1,83	9,11	12,0
2	CI 7	852	4811	1015	2,18	3,35	15,3
2	AII 2	KP	KP	KP	KP	KP	KP
2	AII 3	944	2248	1024	1,96	20,34	48,3
2	AII 4	1088	2773	1247	1,82	3,54	90,9
2	AII 5	1049	3082	1136	2,02	2,25	75,4
2	BII 2	725	4965	1433	2,58	2,00	8,7
2	BII 3	803	4502	1495	2,62	1,25	63,8
2	BII 4	1014	4132	1871	2,60	2,06	84,8
2	BII 5	1116	4873	1399	2,54	0,00	NB
2	CII 3	67,6	2711	1066	ND	ND	74,1
2	CII 4	488	2231	1572	1,82	1,51	23,4
2	CII 5	1048	4277	1702	1,83	1,28	33,2
2	CII 6	1004	3607	1099	1,79	1,49	28,2
2	CII 7	1161	3702	1215	2,18	2,18	20,6

Pat.	Zeitpunkt	HCY [nM]	CYS [nM]	GSH [nM]	HCSA [μM]	MTX [μM]	5-MTHF [nM]
3	BI 2	224	1837	821	1,99	1,08	13,3
3	BI 3	293	1664	1259	2,14	1,91	57,5
3	BI 4	389	1936	1381	1,80	1,34	41,8
3	BI 5	375	1896	1021	2,78	2,57	23,0
3	CI 3	50,6	2186	1451	ND	ND	NB
3	CI 4	188	1241	927	1,52	3,19	27,9
3	CI 5	263	1713	600	1,72	1,39	17,8
3	CI 6	370	2813	1124	1,90	2,80	16,2
3	CI 7	467	2044	1195	1,89	1,79	14,0
3	All 2	KP	KP	KP	KP	KP	KP
3	All 3	295	2538	921	1,48	1,39	18,8
3	All 4	268	2075	882	2,10	3,80	27,8
3	All 5	448	2782	1473	2,19	1,87	7,9
4	AI 2	146	3329	1746	1,75	1,59	ND
4	AI 3	149	2927	1658	2,40	0,79	122,4
4	AI 4	253	3655	2307	2,02	0,33	75,9
4	AI 5	277	3607	1949	1,85	0,40	30,0
4	CI 3	103	3885	1539	ND	0,00	91,8
4	CI 4	197	4008	1387	1,76	0,74	72,1
4	CI 5	336	4904	1294	2,13	NB	35,9
4	CI 6	271	2588	1286	1,70	0,33	56,2
4	CI 7	333	8155	1868	2,25	0,16	48,1

* N⁵-Methyltetrahydrofolat

ND: nicht detektierbar

NB: nicht bestimmt

KP: keine Probe verfügbar

(2) MTX-Konzentrationen, die im Serum der Lymphompatienten nach HDMTX bestimmt wurden.

Pat.	Infusionsbeginn	MTX-Dosis*	MTX-Konzentrationen im Serum [μM]						
			24 h	42 h	48 h	54 h	60 h	66 h	72 h
1	AI2	5 g/m ²	25,73	0,36	0,17	k.A.	NB	NB	NB
1	BI2	5 g/m ²	78,00	0,29	k.A.	k.A.	NB	NB	NB
1	AII2	5 g/m ²	33,60	0,44	0,31	k.A.	NB	NB	NB
1	BII2	5 g/m ²	104,00	0,48	0,22	k.A.	NB	NB	NB
2	BI	3 g/m ²	21,5	0,84	0,39	0,32	k.A.	0,23	k.A.
2	AII	3 g/m ²	59,1	1,90	1,19	0,99	k.A.	0,28	0,21
2	BII	3 g/m ²	43,79	1,02	0,33	0,14	k.A.	0,13	0,08
3	BI	3 g/m ²	33,46	0,77	0,19	NB	NB	NB	NB
3	AII	1,5 g/m ²⁺	NB	0,73	0,38	0,12	NB	NB	NB
3	BII	entfiel	---	---	---	---	---	---	---
4	AI	3 g/m ²	59,47	0,57	0,24	k.A.	NB	NB	NB
4	BI	entfiel [#]	---	---	---	---	---	---	---

* Die Dosis wurde an das Alter angepasst; Patienten, die älter als 65 Jahre waren, bekamen anstatt 5 g/m² nur 3 g/m² verabreicht

[#] Patient 4 wurde nach einem modifizierten Protokoll therapiert, da er wegen eines Rezidivs therapiert wurde

⁺ Patient 3 bekam im Block AII – vermutlich aufgrund einer sich manifestierenden Leukenzephalopathie – eine reduzierte MTX-Dosis

Erläuterungen:

NB: nicht bestimmt, k.A.: keine Angaben in den Patientenakten, vermutlich wurden diese Werte zum Teil nicht bestimmt

Ein intensivierter Rescue mit Calciumfolinat wurde eingeleitet, falls die MTX-Serumkonzentrationen zur Stunde 42 oberhalb 1 μM , zur Stunde 48 oberhalb 0,4 μM oder zur Stunde 54 oberhalb 0,2 μM lagen. In diesen Fällen wurden weitere Messungen bezüglich der MTX-Serumkonzentrationen vorgenommen.

ANHANG C

Einzelergebnisse der Liquoranalyse der Kontrollgruppe, die in der Neurologie des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf) untersucht wurden:

HCY-, CYS- und GSH-Konzentrationen im Liquor (lumbal) der Kontrollgruppe.

Nr.	HCY [nM]	CYS [nM]	GSH [nM]	HCSA [μM]	HCA [μM]	CSA [μM]	CA [μM]
1	54,7	5533	799	ND	ND	ND	ND
2	73,3	3236	898	ND	ND	ND	ND
3	65,1	3236	544	ND	ND	ND	ND
4	71,3	3775	637	ND	ND	ND	ND
5	~44,3	6037	820	ND	ND	ND	ND
6	92,0	5390	865	ND	ND	ND	ND
7	160	6611	925	ND	ND	ND	ND
8	107	7688	1034	ND	ND	ND	ND
9	~31,9	6360	746	ND	ND	ND	ND
10	158	3488	586	ND	ND	ND	ND
11	87,9	3667	394	ND	ND	ND	ND
12	~46,4	2662	524	ND	ND	ND	ND
13	56,8	3164	591	ND	ND	ND	ND
\bar{x}	80,7	4681	720				
s	40,6	1645	189				
RSD [%]	50,3	35,2	26,2				
\tilde{x}	71,3	3775	746				

ND: nicht detektierbar

Lebenslauf

Promotion

Seit Januar 2000 Anfertigung einer Dissertation im Fach Klinische Pharmazie unter der Leitung von Prof. Dr. U. Jaehde; Thema: „Einfluss von Methotrexat auf den Homocysteinstoffwechsel“

Weiterbildung

Oktober 2000-
Januar 2004 Weiterbildung zum Fachapotheker für Arzneimittelinformation

Berufliche Tätigkeit

Seit Oktober 2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn

Seit Februar 2000 Vertretungen/Notdienste in diversen Apotheken

Seit Januar 2000 Wissenschaftliche Hilfskraft im Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn

Zivildienst

Juli 1992-
Oktober 1993 Haus auf dem Wehrborn, Mädchenerziehungsheim, Aach (bei Trier)

Ausbildung

Dezember 1999 Erteilung der Approbation als Apotheker

November 1999 3. Staatsexamen

Mai 1999-
November 1999 2. Halbjahr des praktischen Jahres in der Apotheke der Rheinischen Kliniken, Bonn

November 1998-
Mai 1998 1. Halbjahres des praktischen Jahres in der Adler-Apotheke, Trier und der Schiller-Apotheke, Konz

Oktober 1998 2. Staatsexamen

März 1996 1. Staatsexamen

Oktober 1993-
November 1998 Studium der Pharmazie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Famulaturen

- Spitzweg-Apotheke in Mülheim/Ruhr (12.09.-15.10.1994)

- Schiller-Apotheke in Konz (15.08.-09.09.1994)

Juni 1992 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1983-1992 Gymnasium Konz

1979-1983 Grundschule Konz-Könen

Bonn, den 15.11.2004