

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

---

**Azathioprin und 6-Mercaptopurin in der Therapie chronisch  
entzündlicher Darmerkrankungen - retrospektive Analyse einer  
Korrelation von Metabolitenspiegeln, entzündlicher Aktivität und  
hämatologischen Nebenwirkungen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Anna-Saskia Krieger, geb. Boye  
aus Lüneburg

Lübeck 2011

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. G. Weitz

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Phillip Hildebrand

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 28.11.2011

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1. Definition der Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa.....       | 1         |
| 1.1.1. Colitis ulcerosa .....   | 1         |
| 1.1.2. M. Crohn .....   | 2         |
| 1.2. Extraintestinale Manifestationen .....                                       | 3         |
| 1.3. Epidemiologie.....   | 4         |
| 1.4. Ätiologie .....  | 5         |
| 1.5. Azathioprin und 6-Mercaptopurin .....  | 9         |
| 1.5.1. Historisches .....   | 9         |
| 1.5.2. Pharmakokinetik .....  | 10        |
| 1.5.3. Pharmakodynamik.....   | 12        |
| 1.5.4. Nebenwirkungen von Azathioprin/ 6-MP.....                                  | 13        |
| 1.5.5. Azathioprin und 6-MP bei chronisch entzündlichen<br>Darmerkrankungen ..... | 14        |
| 1.6. Fragestellung dieser Arbeit .....  | 16        |
| <b>2. Material und Methodik</b> .....   | <b>18</b> |
| 2.1. Klinische Indices .....  | 19        |
| 2.2. Statistik.....   | 20        |
| <b>3. Ergebnisse</b> .....  | <b>22</b> |
| 3.1. Patienten mit M. Crohn.....  | 22        |
| 3.1.1. 6-Mercaptopurin Metabolitenspiegel und entzündliche Aktivität .....        | 23        |
| 3.1.2. Blutbild und entzündliche Aktivität .....                                  | 23        |
| 3.1.3. Gruppenvergleiche .....  | 24        |
| 3.2. Colitis ulcerosa.....  | 26        |
| 3.2.1. 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegel und entzündliche<br>Aktivität .....     | 27        |
| 3.2.2. Blutbild und entzündliche Aktivität .....                                  | 27        |
| 3.2.3. Gruppenvergleiche .....  | 27        |
| 3.3. 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegel und Blutbild im Gesamtkollektiv .....     | 28        |
| <b>4. Diskussion</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>5. Zusammenfassung</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>7. Anhang</b> .....  | <b>58</b> |
| 7.1. Abbildungen.....   | 58        |
| 7.2. Auswertungsbogen M. Crohn .....  | 63        |
| 7.3. Auswertungsbogen Colitis ulcerosa.....                                       | 64        |
| 7.4. Tabellen.....  | 65        |
| 7.5. Danksagungen.....  | 70        |
| 7.6. Lebenslauf .....   | 71        |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| AZA            | Azathioprin   |
| BSG            | Blutsenkungsgeschwindigkeit                                       |
| bzw.           | beziehungsweise   |
| CAI            | Clinical activity index   |
| CARD           | Caspase recruitment domain  |
| CDAI           | Crohn´s disease activity index                                    |
| CED            | chronisch entzündliche Darmerkrankung                             |
| DGVS           | Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten |
| EIM            | Extraintestinale Manifestation                                    |
| HBI            | Harvey-Bradshaw-Index   |
| HPRT           | Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase                             |
| IFN            | Interferon  |
| IL             | Interleukin   |
| MCV            | Mean corpuscular volume   |
| MDP            | Muramyldipeptid   |
| MMP            | Methylmercaptapurin   |
| MTG            | Methylthioguanin  |
| n              | Anzahl  |
| NF- $\kappa$ B | Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells  |
| NOD            | Nucleotide-binding oligomerization domain                         |
| OCTN           | Organic cation transporter  |
| PGN            | Peptidoglykan   |
| RAC1           | Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1                        |
| s.o.           | siehe oben  |
| s.u.           | siehe unten   |
| TCF4           | Transkriptionsfaktor 4  |
| TGN            | Thioguanin  |
| Th             | T-Helferzelle   |
| TLR            | Toll-like Rezeptor  |
| TNF- $\alpha$  | Tumornekrosefaktor- $\alpha$                                      |
| TPMT           | Thiopurin-S-Methyltransferase                                     |
| u.a.           | unter anderem   |
| vs.            | versus  |

|         |                                  |
|---------|----------------------------------|
| XO      | Xanthinoxidase                   |
| 6-MP    | 6-Mercaptopurin                  |
| 6-MTIMP | 6-Methyl-Thioinosin-Monophosphat |
| 6-MTIDP | 6-Methyl-Thioinosin-Diphosphat   |
| 6-MTITP | 6-Methyl-Thioinosin-Triphosphat  |
| 6-TGMP  | 6-Thioguanin-Monophosphat        |
| 6-TGDP  | 6-Thioguanin-Diphosphosphat      |
| 6-TGTP  | 6-Thioguanin-Triphosphosphat     |
| 6-TIMP  | 6-Thioinosin-5'-Monophosphat     |

## 1. Einleitung

### 1.1. Definition der Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

Colitis ulcerosa und M. Crohn gehören zu den unspezifischen Formen entzündlicher Darmerkrankungen. Es handelt sich demnach um Entzündungen des Intestinaltraktes unbekannter Ätiologie, die durch einen chronischen und in der Regel schubweisen Verlauf gekennzeichnet sind. Zwischen den beiden Erkrankungen bestehen erhebliche Überschneidungen, beispielsweise bei der Immunregulation und den extraintestinalen Begleiterkrankungen (Matricon et al., 2010). Dennoch sind beide Erkrankungen gut voneinander zu trennen und werden als getrennte Entitäten aufgefasst (Stange, 1999 a). In 10-20% der Fälle gelingt vor allem im Anfangsstadium keine eindeutige Differenzierung (Podolsky, 2002).

#### 1.1.1. Colitis ulcerosa

Bei der Colitis ulcerosa betrifft die Entzündung die Kolonmukosa und -submukosa. Sie beginnt mit wenigen Ausnahmen im Rektum oberhalb des Analrings und kann sich von hier aus unterschiedlich weit kontinuierlich nach kranial im Kolon ausbreiten. Bei etwa 50-70% aller Erkrankten bleibt die Entzündung dauerhaft auf Rektum und Sigma beschränkt (Stange, 1999 a). Je nach Ausbreitung der Krankheit spricht man von Proktitis, Proktosigmoiditis, Linksseitenkolitis oder Pankolitis. Ist bei einer Pankolitis darüber hinaus das terminale Ileum mitbetroffen, wird dieses als „Back-Wash-Ileitis“ bezeichnet (Carter et al., 2004).

Das Leitsymptom der Colitis ulcerosa sind blutige Durchfälle. Im akuten Schub klagen die Patienten über eine hochfrequente Diarrhoe, die mit systemischen Entzündungszeichen verbunden sein kann. Die klinische Präsentation hängt dabei von der Ausdehnung und Ausprägung der Entzündung ab. Bei einer Proktitis oder Proktosigmoiditis stehen neben blutigen Darmentleerungen ein imperativer Stuhldrang und Tenesmen im Vordergrund. Die ausgedehnte Colitis ulcerosa kann mit funktioneller Inkontinenz und subfebrilen bis febrilen Temperaturen einhergehen (Knebel et al., 2004). Bei einem fulminanten Schub treten darüber hinaus Fieber > 38,5 °C, Anämie, Tachykardie, Gewichtsverlust und eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes auf (Hoffmann et al., 2004).

Die Entzündung kann in Schüben auftreten, was bei der Mehrzahl der Patienten der Fall ist, oder einen chronisch-aktiven Verlauf nehmen (Langholz et al., 1994). Hiervon spricht man, wenn trotz adäquater medikamentöser Therapie keine Remission, definiert durch weniger als zwei Schübe pro Jahr, auftritt. Eine erfolglose Therapie mit Glukokortikoiden (steroidrefraktär) oder ein sofortiges Rezidiv nach Dosisreduktion des Glukokortikoids (steroidabhängig) definieren ebenfalls einen chronisch aktiven Verlauf. Auch gibt es fulminante Verlaufsformen, bei denen es aus völliger Gesundheit heraus zu einem schweren Schub mit systemischer Beteiligung kommt (Hoffmann et al., 2004).

Bei langjährigen Krankheitsverläufen ist das kolorektale Karzinomrisiko gegenüber der Normalbevölkerung deutlich gesteigert. In einer Metaanalyse wurden Kolonkarzinominzidenzraten von 2,1% nach einer Erkrankungsdauer von 10 Jahren, 8,5% nach 20 Jahren und 17,8% nach 30 Jahren ermittelt (Soetikno et al., 2002).

### **1.1.2. M. Crohn**

Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa manifestiert sich die Entzündung beim M. Crohn transmural. Weiterhin kann beim M. Crohn der gesamte Gastrointestinaltrakt von der Mundhöhle bis zum Anus befallen sein (Lennard-Jones 1989). Ein isolierter Befall von proximalem Dünndarm, Magen, Ösophagus oder Mund ist mit weniger als 5% selten. Das terminale Ileum ist in 70% der Fälle betroffen (Wehkamp et al., 2005). Darüber hinaus manifestiert sich die Erkrankung diskontinuierlich segmental (Price und Morson, 1975). Wie bei der Colitis ulcerosa werden auch beim M. Crohn rezidivierende Schübe von chronisch-aktiven und fulminanten Verlaufsformen unterschieden.

Hauptsymptome der Erkrankung sind eine chronische wässrige Diarrhö, bei der Crohn-Kolitis mit Blutbeimengungen (Lennard-Jones und Shivananda, 1997), abdominelle Schmerzen und Gewichtsverlust (Farmer et al., 1975). Bei Befall des oberen Gastrointestinaltrakts kann sich der M. Crohn wie ein Ulkusleiden manifestieren, oder es kann sich ein Malassimilations-Syndrom bei ausgedehntem Dünndarmbefall entwickeln. Wie bei der Colitis ulcerosa sind bei jugendlichen Patienten eine verzögerte Größen- und Geschlechtsentwicklung möglich (Stange, 1999 a). Im Verlauf der Erkrankung kann es zu verschiedenen Komplikationen

kommen, die mitunter die individuelle klinische Präsentation dominieren. Eine Vielzahl der Komplikationen lassen sich durch den transmuralen Befall des M. Crohn erklären. Insbesondere sind die Fistel- und Abszessbildung oder die Ausbildung von Stenosen und Obstruktionen zu nennen. Ein paralleles Auftreten verschiedener Komplikationen ist möglich (Stange, 1999 a).

In Abhängigkeit von Krankheitsverlauf und -ausdehnung besteht gegenüber der Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko intestinaler Neoplasien. Das relative Kolonkarzinomrisiko ist insbesondere bei Patienten mit Crohn-Kolitis 2,5 bis 3 fach erhöht (Jess et al., 2006). Auch das Risiko für das Auftreten eines Dünndarmkarzinoms scheint deutlich (bis 30fach) erhöht zu sein, wobei das Auftreten insgesamt als sehr selten eingestuft wird (Jess et al., 2006, Canavan et al., 2006).

## **1.2. Extraintestinale Manifestationen**

Extraintestinale Symptome können bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen fast jedes Organsystem befallen. Besonders häufig sind sie an Gelenken, Haut, Augen und Gallenwegen zu finden (Danese et al., 2005). Herz, Pankreas, Leber, Niere und Gehirn können jedoch ebenfalls betroffen sein (Stange, 1999 b). Grundsätzlich lassen sich extraintestinale Manifestationen (EIM) danach unterscheiden, ob sie mit der Aktivität der intestinalen Entzündung korrelieren (z.B. Arthritiden, Erythema nodosum, Iritis) oder einen eigenständigen Verlauf haben und assoziierte autoimmune Erkrankungen sind. Hier sind beispielsweise die primär sklerosierende Cholangitis, die ankylosierende Spondylitis oder die Alopecia areata (sehr selten) zu nennen (Veloso et al., 1996; Das, 1999).

Bei 20-40% aller Patienten treten im Verlauf einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung eine oder mehrere EIM auf (Bernstein, 2001, Veloso et al., 1996, Greenstein et al., 1976). Die Prävalenz ist beim M. Crohn im Vergleich zur Colitis ulcerosa höher (Veloso et al., 1996). Die Ätiologie extraintestinaler Manifestationen ist noch nicht genau geklärt. Da bei Geschwistern jedoch hohe Konkordanzraten gefunden wurden, wird ein starker genetischer Einfluss angenommen (Satsangi et al., 1996). Eine Assoziation des HLA-Systems zu



chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und EIM erscheint möglich. Beispielsweise zeigen Colitis-ulcerosa-Patienten mit einem HLA-B8 Phänotyp ein zehnfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer primär sklerosierenden Cholangitis (Chapman et al., 1986). Auch andere mit EIM assoziierte HLA Phänotypen wurden identifiziert (Orchard et al., 2000, Orchard et al., 2002). Mögliche EIM bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Extraintestinale Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

| Lokalisation | EIM  |
|--------------|--|
| Haut         | Erythema nodosum<br>Pyoderma gangraenosum<br>Aphthen           |
| Pankreas     | Pankreatitis   |
| Augen        | Konjunktivitis<br>Iritis/ Uveitis                              |
| Niere        | Glomerulonephritis<br>Tubulopathie<br>Interstitielle Nephritis |
| Herz         | Perikarditis   |
| Gefäße       | Vaskulitis   |
| Gelenke      | Arthritis/ Arthralgien   |
| Perianal     | Fisteln/ Fissuren<br>Abzesse                                   |

### 1.3. Epidemiologie

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen kommen weltweit vor, in westlichen, industrialisierten Ländern jedoch weitaus häufiger. Die Inzidenz von M. Crohn und Colitis ulcerosa ist vergleichbar und liegt in Deutschland etwa bei 5-6 pro 100.000

Einwohner pro Jahr (Shivananda et al., 1996). Die Prävalenz der Erkrankungen ist unter Kaukasiern und Ashkenazi-Juden besonders hoch, Afro-Amerikaner und Asiaten haben ein geringeres Erkrankungsrisiko. Jedoch steigt auch in diesen ethnischen Gruppen die Inzidenz kontinuierlich an (Vermeire und Rutgeerts 2005). Die höhere Inzidenz in Industrieländern und höheren sozioökonomischen Klassen, sowie ihr starker Anstieg im Verlauf des 20. Jahrhunderts legt die Vermutung nahe, dass Umweltfaktoren die Krankheitsentwicklung begünstigen (Krishnan und Kurzenik, 2002). Die Manifestation der Erkrankung kann prinzipiell in jedem Alter auftreten, zeigt aber eine bimodale Altersverteilung mit Erkrankungsgipfeln zwischen dem 15. und 30. sowie dem 50. und 70. Lebensjahr. Bei Diagnosestellung sind 10% der Patienten unter 18 Jahren alt (Andres und Friedman, 1999). Im Langzeitverlauf führt die Erkrankung bei 75% der Patienten mit M. Crohn und bei 25-33% der Patienten mit Colitis ulcerosa zu Komplikationen mit der Notwendigkeit einer operativen Sanierung. Die Geschlechtsverteilung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigt, dass Colitis ulcerosa bei Männern, M. Crohn hingegen bei Frauen etwas häufiger aufzutreten scheint (Vermeire et al., 2005).

#### **1.4. Ätiologie**

Die genaue Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist noch unverstanden. Offenbar ist ein Zusammenwirken von genetischen Faktoren, die zu einer Dysfunktion des angeborenen Immunsystems führen, und Umwelteinflüssen ursächlich für die Entstehung von M. Crohn und Colitis ulcerosa (Cho, 2008).

In der aktuellen Diskussion zur Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wird eine nicht funktionierende Interaktion zwischen bakterieller Mikroflora des Darms und dem mukosalen Immunsystem favorisiert. Der Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber bakteriellen Antigenen aus dem Darmlumen mit nachfolgender intestinaler Entzündungsreaktion kann durch eine Imbalance zwischen regulatorischen T-Zellen und Effektorzellen (Th1/Th2/Th17) erklärt werden (Strober et al., 2007 und Asakura et al., 2007). Bei M. Crohn wurde eine gesteigerte Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12/IL-23 und IFN- $\gamma$ /IL-17 gefunden, während die Colitis ulcerosa mit einer gesteigerten IL-13 Produktion assoziiert ist (Fuss et al., 2004). Auch eine

genetische Prädisposition mit resultierender Dysfunktion des angeborenen Immunsystems scheint in Addition zu Umweltfaktoren maßgeblich für das Auftreten der Erkrankungen zu sein (Kucharzik, 2006, Timmer, 2003).

Beleg für einen genetischen Hintergrund bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind u.a. Studien, die eine familiäre Häufung der Erkrankung aufzeigen konnten (Orholm et al., 1991, Satsangi et al., 1994). In 5,5-22,5% der Fälle ist die Erkrankung familiär gebunden (Vermeire et al., 2005). Die Konkordanz monozygoter Zwillinge ist dabei für M. Crohn höher als für Colitis ulcerosa (Tysk et al., 1988, Orholm et al., 2000, Halfvarson et al., 2003). Insgesamt haben die Krankheiten jedoch eine schwache Penetranz und es bestehen auch interfamiliär Unterschiede im jeweiligen Phänotyp, so dass eine zugrunde liegende polygene genetische Ursache zu vermuten ist (Abreu, 2002). Da in Familien jeweils beide Entitäten vorkommen können, wird hypothetisch eine teilweise Überlappung einzelner Krankheitsgene bei M. Crohn und Colitis ulcerosa angenommen.

Zudem wurden zahlreiche Suszeptilitätsgene identifiziert. Über ihre phänotypischen Auswirkungen ist noch nicht viel bekannt. Das derzeit am besten charakterisierte Gen im Zusammenhang mit M. Crohn des terminalen Ileums ist das NOD2/CARD-15 Gen auf Chromosom 16. NOD2 wird in Makrophagen, dendritischen Zellen, Panethzellen und intestinalen Epithelzellen exprimiert. Es ist ein zytoplasmatisches Protein, das der Erkennung von Muramyl-dipeptid (MDP), einem Fragment des Peptidoglykans (PGN) der bakteriellen Zellwand, dient. Der Ligand MDP führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und von Caspasen durch NOD2. Daraus resultiert eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 (Inohara et al., 2003, Girardin et al., 2003). Mutationen von NOD2, die mit M. Crohn assoziiert sind, resultieren in einem Protein, das nicht mehr mit MDP reagiert (Netea et al., 2005). Der Verlust dieser Erkennungsfunktion von NOD2 führt scheinbar zu einer abnormalen Antwort des angeborenen Immunsystems und ist ein wichtiger Schritt bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Die genauen Signalwege sind noch nicht verstanden. Hypothetisch bewirkt die NOD2-Mutation durch eine gestörte Expression von Defensinen (s.u.) im terminalen Ileum einen Defekt in der lokalen Abwehr mit folgender vermehrter bakterieller Invasion der Darmmukosa (Wehkamp et al., 2004). Eine andere Theorie wurde durch die

Beobachtung entwickelt, dass PGN als Ligand über den Toll-like-Rezeptor-2 (TLR-2) eine NFκB-Aktivierung mit nachfolgender Produktion proinflammatorischer Zytokine bewirken kann (Uehara et al., 2005). Dieser Vorgang wird normalerweise durch aktiviertes NOD2 inhibiert. Bei einer NOD2-Mutation resultieren hypothetisch höhere Zytokinspiegel, die zusammen mit einer Tendenz der T-Zellen, auf mukosale Antigene zu reagieren, eine intestinale Entzündung herbeiführen.

Varianten von NOD2/CARD-15 sind bei kaukasischen M.-Crohn-Patienten mit 35-45% häufig zu finden (Esters et al., 2004, Mendoza et al., 2003). Bei schottischen, irischen und skandinavischen Patienten ist die Prävalenz allerdings niedriger (Helio et al., 2003, Arnott et al., 2004) und bei japanischen, chinesischen und afroamerikanischen Patienten konnten keine Mutationen festgestellt werden. Die NOD2/CARD-15 Mutation scheint etwa 20% des genetischen Beitrags zur Entstehung eines M. Crohn zu erklären (Vermeire und Rutgeerts, 2005). Darüber hinaus gibt es eine Assoziation zu verschiedenen Phänotypen der Erkrankung. Strikturen, Dünndarmbefall, Fisteln sowie ein frühes Erkrankungsalter sind bei Patienten mit NOD2/CARD15 Mutationen häufiger (Lesage et al., 2002, Hampe et al., 2002). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurden nur in 12-14% der Fälle NOD2/CARD15 Mutationen gefunden. Somit besteht hier kein Unterschied zur Normalbevölkerung (Hugot et al., 2001). Ebenfalls mit M. Crohn des Ileums, insbesondere mit stenosierenden Verläufen, assoziiert ist eine verminderte Expression des Wnt-Signalwegfaktors TCF4. Dieser spielt eine entscheidende Rolle bei der Paneth-Zell-Differenzierung und Defensinexpression (Wehkamp et al., 2007; Koslowski et al., 2009).

Weitere Suszeptibilitätsgene, für die eine Assoziation mit M. Crohn vermutet wird, sind die Gene SLC22A4 und SLC22A5 im IBD5-Locus, die für die Expression und Transporterfunktion der Proteine OCTN1 und OCTN2 (organic cation transporter) zuständig sind. Mutationsbedingte Veränderungen in einem der zwei Proteine wurden in einer Studie bei 53% der Patienten mit M. Crohn gefunden (Peltekova et al., 2004). Zusammenhänge mit perianalem und Kolonbefall, sowie einem niedrigeren Erkrankungsalter wurden beschrieben (Libioulle et al., 2005, Torok et al., 2005). Weitere genetische Mutationen konnten identifiziert werden (z.B. IL-23R, ATG16L1) spielen aber eine deutlich geringere Rolle als NOD-2. Das HLA-

System scheint ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu spielen. Die Mitwirkung von MHC-Genen bei steroidrefraktärer und therapieresistenter Colitis ulcerosa, sowie bei Verläufen mit der Notwendigkeit einer Kolektomie ist beschrieben (Satsangi et al., 1996). Eine Assoziation mit verschiedenen Krankheitsverläufen und extraintestinalen Manifestationen, wie Arthritis sowie Augen- und Hautmanifestationen, wurde berichtet (Orchard et al., 2000, Orchard et al., 2002).

Ein weiterer Defekt des angeborenen Immunsystems bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen betrifft die Expression antimikrobieller Peptide, die Bestandteil der angeborenen Immunität sind. Die Defensine umfassen eine Familie kleiner, lokal sezernierter, kationischer Peptidproteine mit antimikrobieller und chemotaktischer Aktivität (Bevins et al., 2006). Sie werden nach der intramolekularen Position von Disulfidbrücken in sechs  $\alpha$ - und vier  $\beta$ -Defensine eingeteilt. Die beiden  $\alpha$ -Defensine HD-5 und -6 werden von Paneth-Zellen des Dünndarms konstitutiv exprimiert und bilden bei gesunden Individuen eine Barriere gegen die luminale Mikroflora. Die restlichen vier (HNP-1 bis -4) kommen hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten vor (Jones 1992).  $\beta$ -Defensine (HBD-1 bis-4) sind epithelialen Ursprungs und werden u.a. von intestinalem Epithel exprimiert (O'Neil et al., 1999, Fahlgren et al., 2004). Das  $\beta$ -Defensin HBD-1 wird bei gesunden Individuen im Kolon dominant konstitutiv exprimiert und bildet den basalen Schutz vor Mikroorganismen des Darms. HBD-2 bis -4 haben dagegen nur eine geringe basale Expression. Ihre Sekretion wird durch eine bakterielle Invasion der Darmmukosa induziert (Wehkamp et al., 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von HD-5 und -6 bei Patienten mit M. Crohn des Dünndarms vermindert ist. Noch stärker reduziert ist die Expression beim Vorliegen einer NOD2-Mutation (Wehkamp et al., 2004). Ursächlich für den Mangel der  $\alpha$ -Defensine ist neben der NOD2-Mutation auch die bereits oben beschriebene Störung des Wnt-Signalwegfaktors TCF4, die zu einer gestörten Differenzierung der Paneth-Zellen führt. Bei Patienten mit Crohn-Kolitis ist die Induktion der  $\beta$ -Defensine HBD-2, -3 und -4 in der Inflammation signifikant niedriger als bei Patienten mit Colitis ulcerosa (Fahlgren et al., 2003). Die Genloci für HBD-3 und -3 liegen benachbart auf dem Chromosom 8p23.1. Im Vergleich zu gesunden Individuen konnte bei Patienten mit M. Crohn des Kolons eine

verminderte Genkopiezahl in diesem polymorphen  $\beta$ -Defensinlocus gefunden werden (Fellermann et al., 2006). Hypothetisch kommt es sowohl beim M. Crohn des Dünndarms als auch des Dickdarms bedingt durch den jeweiligen Mangel der Defensine zu einer Schwächung der Mukosabarriere mit folgender permanenter bakterieller Invasion, die zu einer entzündlichen Reaktion führt (Fellermann et al., 2003).

Der Barrieredefekt bei der Colitis ulcerosa ist weniger verstanden. Bekannt ist eine verminderte Anzahl der Becherzellen bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Becherzellen produzieren Muzine, wichtige Strukturproteine des Mukus. Durch die Reduzierung der Becherzellen ist die schützende Mukusschicht schmäler und fehlt stellenweise gänzlich, so dass es zu einer Invasion intraluminaler Bakterien kommen kann. Durch die fehlende Bindungskapazität könnte es zu einem verminderten Defensingehalt des Mukus kommen. Eine Störung der Becherzellendifferenzierung durch eine ungenügende Induktion der zwei wesentlichen Faktoren Hath1 und KLF4 wurde als mögliche Ursache der Colitis ulcerosa beschrieben (Gersemann et al., 2009). Darüber hinaus enthält der Mukus von Patienten mit Colitis ulcerosa weniger stabilisierende Phospholipide, insbesondere Lecithin (Braun et al., 2009).

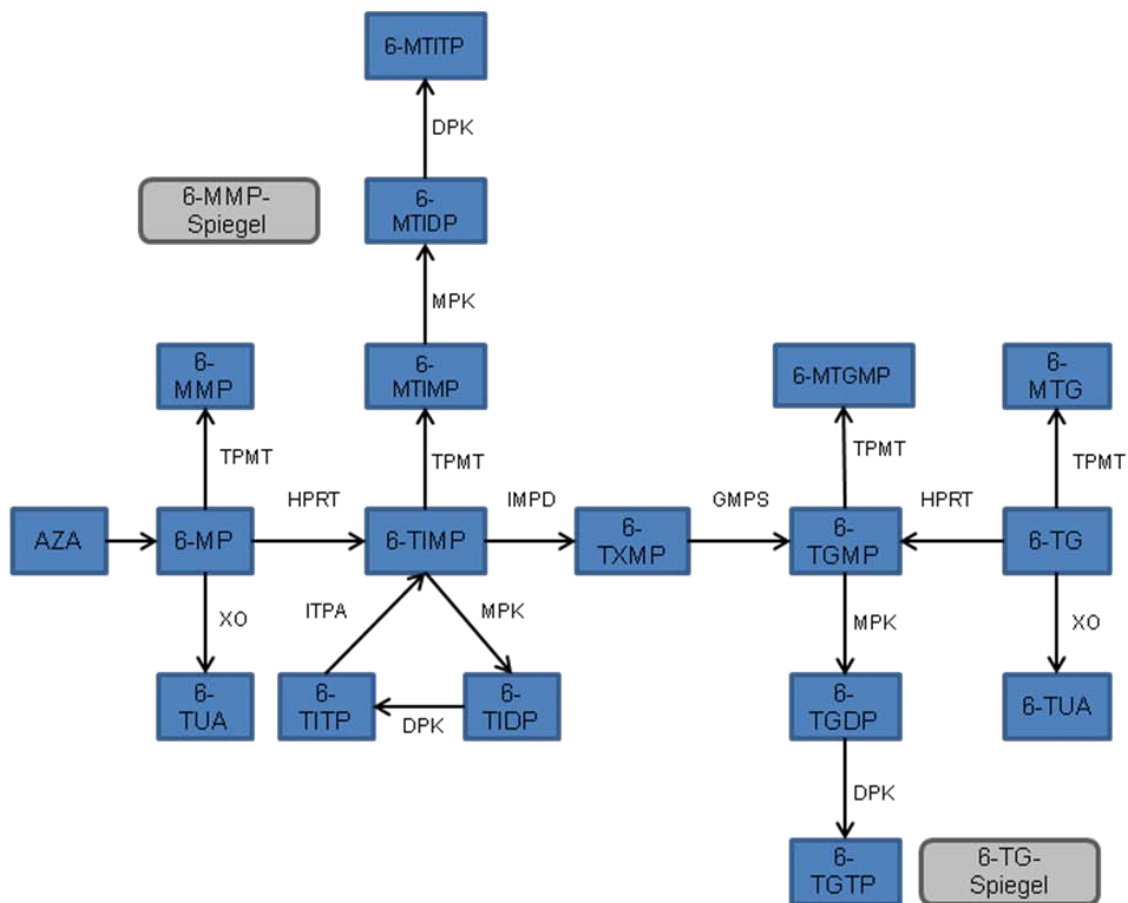
## **1.5. Azathioprin und 6-Mercaptopurin**

### **1.5.1. Historisches**

6-Mercaptopurin wurde in den frühen fünfziger Jahren erstmals in der Behandlung der Leukämie eingesetzt. Die immunsuppressive Wirkung wurde 1958 von Schwartz beschrieben (Schwartz et al., 1958). Azathioprin wurde erstmals 1959 synthetisiert. Es ist ein Nitro-imidazol-Derivat von 6-Mercaptopurin, dessen korrekter chemischer Name 6-(1-methyl-4-nitro-5-imidazol)-Mercaptopurin lautet. Seit den frühen sechziger Jahren wurde Azathioprin vermehrt im Rahmen von Transplantationen eingesetzt.

### 1.5.2. Pharmakokinetik

Azathioprin wird nach Einnahme durch eine Spaltung der Verbindung zwischen Purin und Imidazolring schnell zu 6-Mercaptopurin und einem Methyl-Nitroimidazolrest umgewandelt. Dies ist ein nichtenzymatischer Prozess, der unter anderem von Gluthathion oder anderen sulfhydrylhaltigen Proteinen vermittelt wird. Etwa 88% des aufgenommenen Azathioprins werden in 6-MP umgewandelt (Sandborn 1999). Die orale Bioverfügbarkeit liegt bei 47% (27-83%) und ist proportional zur Dosis. Die maximale Plasmakonzentration wird nach ein bis drei Stunden erreicht (Van Os et al., 1996). 6-Mercaptopurin überwindet die Zellmembran und wird intrazellulär vor allem durch drei Enzyme verstoffwechselt.



**Metabolismus der Thiopurine:** AZA, Azathioprin; 6-MP, 6-Mercaptopurin; 6-MMP, 6-Methylmercaptapurin; 6-TUA, 6-Thiouracil-Säure; 6-MTIMP, 6-Methylthioinosin Monophosphat; 6-MTIDP, 6-Methylthioinosin Diphosphat; 6-MTITP, 6-Methylthioinosin Triphosphat; 6-TIMP, 6-Thioinosin Monophosphat; 6-TIDP, 6-Thioinosin Diphosphat; 6-TITP, 6-Thioinosin Triphosphat; 6-TXMP, 6-Thioxanthosin Monophosphat; 6-TGMP, 6-Thioguanin Monophosphat; 6-TGDP, 6-Thioguanin Diphosphat; 6-TGTP, 6-Thioguanin Triphosphat; 6-MTGMP, 6-Methylthioguanin Monophosphat; 6-TG, 6-Thioguanin; 6-MTG, 6-Methylthioguanin; XO, Xanthinoxidase; TPMT, Thiopurin-S-Methyltransferase; HPRT, Hypoxanthin Phosphoribosyl Transferase; IMPD, Inosin Monophosphat Dehydrogenase; GMPS, Guanidin Monophosphat Synthetase; MPK, Monophosphat Kinase; DPK, Diphosphat Kinase; ITPA, Inosin Triphosphat Pyrophosphatase

**Abbildung 1:** Der Metabolismus der Thiopurine ausgehend von Azathioprin und 6-TG

Die Xantinoxidase (XO) baut 6-MP zu 6-Thiopurinsäure, einem nicht aktiven Metaboliten, ab. Die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) vermittelt die Methylierung von 6-Mercaptopurin (6-MP) zu 6-Methylmercaptapurin (6-MMP), einem ebenfalls nicht immunsuppressiv wirksamen Metaboliten. Die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) bildet aus 6-MP alternativ zunächst 6-Thioinosin-5'-Monophosphat (6-TIMP). Aus letzterem werden nach weiterer Metabolisierung und Phosphorylierung dann die immunsuppressiv wirksamen 6-Thioguanin-Nukleotide (6-TGN), 6-Thioguanin-Monophosphat (6-TGMP), -Diphosphat (6-TGDP) und -Triphosphat (6-TGTP), gebildet (Lennard, 1992). 6-TIMP kann alternativ aber auch durch die TPMT zu den 6-Methylmercaptapurine Ribonukleotiden, 6-Methyl-Thioinosin-Monophosphat (6-MTIMP), -Diphosphat (6-MTIDP) und -Triphosphat (6-MTITP), abgebaut werden (Derjiks et al., 2006).

Je höher die enzymatische Aktivität der TPMT ist, desto weniger 6-MP steht für die Umwandlung in die aktiven 6-Thioguaninmetabolite zur Verfügung. Sie bestimmt folglich die individuelle Sensibilität eines Patienten gegenüber 6-MP und Azathioprin (Lennard et al., 1990). Die TPMT-Aktivität wird von einem einzigen Genlocus mit zwei Allelen (hohe vs. niedrige Aktivität) bestimmt. Die Vererbung folgt dem Mendel'schen Erbgang, so dass die enzymatische Aktivität in der Bevölkerung trimodal verteilt ist. Bei 0,3% aller Patienten besteht eine niedrige oder gar keine, bei 11% eine intermediäre und bei 89% eine hohe enzymatische Aktivität. Zur Bestimmung der individuellen Aktivität wird die erythrozytäre TPMT-Aktivität bestimmt, die mit der in anderen Zellen und Geweben wie Lymphozyten, Niere und Leber korreliert (Weinshilboum et al., 1980). Bei Patienten unter Langzeittherapie mit 6-MP/Azathioprin erfolgt eine Induktion der Enzymsynthese (Lennard et al., 1990). Hingegen gibt es bei der XO-Aktivität kaum interindividuelle Unterschiede (Parks und Granger, 1986). 6-Mercaptopurin und seine Metabolite werden renal eliminiert. Bei Einnahme von Azathioprin werden 10% der Substanz unverändert renal und 12% mit dem Stuhl ausgeschieden (Berlit, 1993).

Während einer immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin und 6-MP können zur Überwachung der Therapie oder zu Studienzwecken Spiegel der aktiven Metabolite bestimmt werden. Hierbei setzt sich der 6-TG-Spiegel aus der Summe der Konzentrationen von 6-TGMP, 6-TGDP und 6-TGTP zusammen. Der 6-MMP-



Spiegel wird durch die Konzentrationen von 6-MMP, 6-MTIMP, 6-MTIDP und 6-MTITP bestimmt (Derjiks et al., 2006).

### 1.5.3. Pharmakodynamik

Die immunsupprimierende Wirkung von 6-Mercaptopurin und Azathioprin wird durch verschiedene Mechanismen vermittelt. Nach Überwindung der Zellmembran agiert 6-MP als Antimetabolit während der Purinsynthese. Die aus 6-TIMP gebildeten 6-TGN werden während der DNA- und RNA-Synthese anstatt der Purinbasen Adenin und Guanin als falsche Nukleotide eingebaut und dadurch die Bildung von Strangbrüchen induziert (Fairchild et al., 1986; Lennard 1992).

Das Enzym TPMT kann aus 6-TIMP jedoch auch 6-Methyl-Thioinosinmonophosphat (6-MTIMP) bilden. 6-MTIMP inhibiert die 5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat-Aminotransferase, das Schlüsselenzym der Purin-de-novo Synthese, so dass es zu einem intrazellulären Defizit an endogenen Nukleotiden kommt (Tay et al., 1969). Die Beeinträchtigung der Nukleotidsynthese und der Einbau falscher Basen in die DNA führt zu einer unspezifisch zytotoxischen Wirkung, einer Hemmung der Proliferation von B- und T-Lymphozyten und einer generalisierten Suppression des spezifischen Immunsystems (Berge et al., 1981). Darüber hinaus scheint 6-Thioguanosin-5'-Triphosphat (6-TGTP) durch spezifische Blockade der Rac1-Aktivierung eine Apoptose von T-Lymphozyten zu bewirken. Rac1 gehört zur Ras-Familie kleiner Guanosin-Triphosphatasen (GTPasen). Es kontrolliert als molekularer Schalter die Reorganisation des Zytoskeletts und das Zellwachstum. 6-TGTP konkurriert mit GTP um die Bindung an Rac1 und verursacht so eine funktionelle Hemmung. Hierdurch kommt es zu einer mitochondrial vermittelten und Caspase 9-abhängigen Apoptose der aktivierten T-Lymphozyten (Thiede et al., 2003).

Bis zum vollen Wirkeintritt benötigen Azathioprin und 6-Mercaptopurin eine Vorlaufzeit von 2-6 Monaten, was aufgrund der Pharmakokinetik und -dynamik nicht plausibel erklärt werden kann (Sandborn et al., 1999).

#### 1.5.4. Nebenwirkungen von Azathioprin / 6-MP

Verglichen mit anderen immunsuppressiven Medikamenten zeigen Azathioprin und 6-MP eine gute Verträglichkeit (Fraser et al., 2002). In einer Metaanalyse zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen mit Azathioprin aus dem Jahr 1999 mussten 9,5% aller Patienten die Therapie aufgrund relevanter Nebenwirkungen beenden (Sandborn et al., 1999). Man unterscheidet zwischen dosisabhängigen (nicht-allergischen) und idiosynkratischen (allergischen) Nebenwirkungen, die eine dosisunabhängige, angeborene Überempfindlichkeit gegenüber Azathioprin darstellen.

Die häufigste dosisabhängige Nebenwirkung unter Azathioprin/6-MP-Therapie ist eine reversible Knochenmarksdepression, die sich als Panzytopenie oder isolierte Suppression einzelner Zellreihen (Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie) zeigen kann. Sie kann zu jedem Zeitpunkt einer Therapie mit Azathioprin/6-MP auftreten. In einer retrospektiven Studie mit 739 Patienten trat in 5% der Fälle eine Knochenmarksdepression auf (Connell et al., 1993). Im Falle einer TPMT-Defizienz ist dieses Risiko noch einmal deutlich gesteigert. Etwa ein Viertel der Leukopenien unter Azathioprin lassen sich durch eine verminderte TPMT Aktivität erklären. Bei gleichzeitiger Einnahme von 5-Aminosalicylaten erhöht sich das Risiko einer Leukopenie ebenfalls, da diese die TPMT in vitro hemmen (Eigler, 1999). Eine gesteigerte Toxizität resultiert auch durch Komedikation mit Allopurinol, einem Hemmstoff der Xanthinoxidase, da dieses die Metabolisierung von Azathioprin unterdrückt. Häufige idiosynkratische Nebenwirkungen sind Unwohlsein, Fieber, Übelkeit, Diarrhoe, Anstieg der Leberenzyme, renale Dysfunktion, Exanthem und akute Pankreatitis. Sie treten meist nach etwa drei bis vier Wochen Therapie auf (Sandborn, 1998).

In der Behandlung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird vor allem in Europa primär ein Therapieversuch mit Azathioprin unternommen. Bei relevanten Nebenwirkungen ist dann ein Präparatwechsel auf 6-MP möglich, der insbesondere bei idiosynkratischen Überempfindlichkeitsreaktionen auf Azathioprin erfolgreich sein kann (Boulten-Jones et al., 2000). Ausnahmen hierbei sind akute Pankreatitis und Leukopenie, die ernste Nebenwirkungen darstellen und auch unter einer Behandlung mit 6-MP auftreten. Während der Therapie mit Azathioprin/6-MP sollte eine Schwangerschaftsverhütung erfolgen, obwohl beiden

Medikamenten bisher keine Teratogenität nachgewiesen werden konnte (Francella et al., 2003). Liegt eine Schwangerschaft vor, wird bei therapeutischer Notwendigkeit die Therapie nicht unterbrochen.

#### **1.5.5. Azathioprin und 6-MP bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Da eine kausale Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach wie vor nicht möglich ist, beruht die medikamentöse Therapie weitestgehend auf einer unspezifischen Hemmung der Entzündung sowie der Wiederherstellung der immunologischen Balance. Definition von Krankheitsaktivität und -verlauf, sowie Behandlungsstrategien sind bei Colitis ulcerosa und M. Crohn ähnlich aber nicht identisch und werden getrennt besprochen.

Entsprechend der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) aus dem Jahr 2004 werden Azathioprin und 6-MP bei Colitis ulcerosa zur Therapie chronisch aktiver Verläufe und zur Remissionserhaltung eingesetzt (Reißmann et al., 2004). Bei akuten Schüben mit leichter bis mittlerer Aktivität werden je nach Ausdehnung lokal oder systemisch wirksame Aminosalizylate und Kortikosteroide zur Remissionsinduktion eingesetzt (Reißmann et al., 2004). Fulminante Krankheitsschübe erfordern ggf. eine parenterale Anwendung von Kortikosteroiden. Bei steroidrefraktärem Verlauf wird eine additive immunsuppressive Therapie mit intravenösem Cyclosporin oder Tacrolimus eingeleitet (Hoffmann et al., 2004). Nach Erreichen der Remission werden oral oder rektal verabreichte Aminosalizylate als Mittel der ersten Wahl zur Remissionserhaltung eingesetzt. Kommt es unter dieser Medikation zu einem erneuten Schub, wird nach erneuter Remissionsinduktion eine Immunmodulation mit Azathioprin oder 6-MP empfohlen (Kruis und Schreiber, 2004). Bei einem chronisch aktiven Verlauf ist eine Langzeittherapie mit systemisch wirksamen Kortikosteroiden aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen nicht zu vertreten, so dass zum Erreichen der Remission eine immunsuppressive Therapie eingeleitet wird (Dignass et al., 2004). Die Gabe von Azathioprin und 6-MP ist hierbei etabliert. Bei Ansprechen auf die Therapie sollte eine remissionserhaltende Verabreichung über einen Zeitraum von 3-5 Jahren angestrebt werden (George et al., 1996).

Die Festlegung der medikamentösen Therapie wird beim M. Crohn entsprechend der Leitlinie der DGVS aus dem Jahr 2008 durch Krankheitsaktivität, Befallsmuster, extraintestinale Manifestationen und das Ansprechen auf vorherige Therapieregime beeinflusst. Bei einem isoliert ileozökalem Befall mit mäßiger Aktivität werden Budesonid oder systemisch wirksame Kortikosteroide eingesetzt. Leichte bis mäßige Schübe einer Crohn-Kolitis werden analog zur Colitis ulcerosa mit Aminosalizylaten oder systemischen Kortikosteroiden behandelt. Beim Vorliegen eines ausgedehnten Dünndarmbefalls mit mäßiger Aktivität erfolgt eine Therapie mit systemischen Kortikosteroiden. Bei schweren Schüben ist jeweils die Gabe von systemisch wirksamen Kortikosteroiden in höherer Dosis etabliert. Bei Steroidrefraktärität ist der Einsatz von Azathioprin oder 6-MP zur Remissionsinduktion indiziert. (Hoffmann et al., 2008). Ein neuerer Ansatzpunkt in der Therapie sind Antikörper gegen TNF-alpha, die im Gegensatz zu den klassischen Immunsuppressiva deutlich schneller wirken und generell eine Alternative bei Versagen von Steroiden oder Azathioprin oder 6-MP darstellen.

Der Einsatz von Azathioprin und 6-Mercaptopurin erfolgt auch bei Frührezidiven nach der erfolgreichen Therapie eines akuten Krankheitsschubes, bei häufigen entzündlichen Schüben sowie beim chronisch aktiven Verlauf. Die Wirksamkeit dieser Therapie ist gut belegt (Pearson et al., 2000, Sandborn et al., 2000). Die frühzeitige Verwendung von Azathioprin und 6-Mercaptopurin wird aufgrund der multiplen Komplikationen (z.B. Malassimilationssyndrom) auch bei einem ausgedehnten Dünndarmbefall mit mäßiger bis schwerer Krankheitsaktivität empfohlen. Besonders indiziert ist sie bei Patienten mit steroidabhängigem oder chronisch-aktivem Verlauf, sowie bei Patienten mit Fistelleiden und einem insgesamt komplexen Krankheitsverlauf (Hoffmann et al., 2008). Die Wirksamkeit einer remissionserhaltenden Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin ist gut belegt (Pearson et al., 1995). Es wird empfohlen, die Therapie für mindestens 4 Jahre durchzuführen. Ist in diesem Zeitraum keine zusätzliche Gabe von Kortikosteroiden notwendig, kann hiernach ein Auslassversuch erfolgen. Bei zusätzlichem Steroidbedarf ist eine längere Therapiedauer notwendig (Hoffmann et al., 2008).

Vor dem Beginn einer Therapie mit Azathioprin/6-Mercaptopurin sollte eine Basisdiagnostik erfolgen. Diese umfasst Schwangerschaftsauschluss,

Abdomensonographie, Röntgen-Thorax, sowie die Bestimmung relevanter Laborparameter (Urinstatus, Blutbild, Serum-Kreatinin, Nüchtern-Blutzucker, alkalischer Phosphatase,  $\gamma$ -GT, GPT, Bilirubin und Lipase). Wenn die klinische Situation es erlaubt, sollte die Therapie mit Azathioprin/6-Mercaptopurin einschleichend erfolgen, da bei der selten vorkommenden homozygoten TPMT-Defizienz die Gefahr der Entwicklung einer Agranulozytose besteht. Unter einschleichender Dosierung können eventuell zusätzlich verabreichte Steroide zunächst reduziert und dann abgesetzt werden. Initial werden 50 mg Azathioprin bzw. 25 mg 6-MP verabreicht. Bei normalen Leukozytenwerten erfolgt eine Dosissteigerung auf 2-2,5 mg/kg Körpergewicht (KG) Azathioprin bzw. 1-1,5 mg/kg KG 6-MP (Hoffmann et al., 2008).

### **1.6. Fragestellung dieser Arbeit**

Azathioprin und 6-MP werden seit vielen Jahren in der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt. Die Wirksamkeit beider Medikamente wird durch zahlreiche Studien belegt (u.a. Hawthorne et al., 1992, Pearson et al., 2000, Sandborn et al., 2000). Ein relevanter Teil der Patienten spricht jedoch aus bisher nicht bekannten Gründen nicht auf die immunsuppressive Therapie an. Darüber hinaus entwickeln einige Patienten nach Einnahme von Azathioprin oder 6-MP Nebenwirkungen (dosisabhängig oder ideosynkratisch), die teilweise eine Beendigung der Therapie erfordern.

Eine individuelle Optimierung der medikamentösen Therapie mit dem Ziel, Nebenwirkungen zu vermeiden und die Effektivität bei der Remissionsinduktion und -erhaltung auszuschöpfen, wäre ein deutlicher Gewinn. Darüber, wie eine solche Optimierung der Therapie erreicht werden kann, gibt es diskrepante Ansichten. Bisher konnten Studien keine sicheren Parameter identifizieren, die eine Voraussage der Wirksamkeit der Therapie zulassen oder Auskunft über die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen geben.

Mit dieser Arbeit sollte evaluiert werden, ob zwischen den Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln (6-MMP, 6-MTG, 6-TGN) und der Entzündungsaktivität, sowie der Entwicklung dosisabhängiger hämatologischer Nebenwirkungen ein Zusammenhang besteht. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die

Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen eine Aussage über die Wirksamkeit der Therapie mit Azathioprin/ 6-MP zulässt.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

1. Besteht eine Korrelation zwischen der Höhe der Mercaptopurin-Metabolitenspiegel und der Krankheitsaktivität repräsentiert durch den Crohn's disease activity index (CDAI) oder Clinical activity index (CAI)?
2. Hat die Höhe der Mercaptopurin-Metabolitenspiegel einen Einfluss auf einzelne Größen des Blutbilds (Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , Lymphozyten/ $\mu\text{l}$ , MCV [fl]) und die Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen (Leukopenie, Lymphopenie)?
3. Lässt die Bestimmung der hämatologischen Parameter (Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , Lymphozyten/ $\mu\text{l}$ ) oder die Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen einen Rückschluss auf die Therapieeffektivität zu?

## 2. Material und Methodik

Für die vorliegende Arbeit wurden die Krankenunterlagen von 295 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen retrospektiv ausgewertet, die im Zeitraum zwischen 1999 und 2004 in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein Campus Lübeck mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin behandelt wurden. Vor Beginn der Studie wurde ein Antrag auf berufsethische und berufsrechtliche Beratung und Überprüfung an die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät gestellt. Diese hatte keine Einwände gegen die Arbeit (Aktenzeichen 04-148). Die Diagnosestellung „chronisch entzündliche Darmerkrankung“ erfolgte gemäß den Konsensusempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) durch etablierte klinische, histologische und endoskopische Kriterien (Hoffmann et al., 2004). Die Betreuung der Patienten und die Dokumentation der Daten erfolgte durch die Abteilung für Gastroenterologie der Medizinischen Klinik I. Die ambulanten und stationären Krankenakten konnten im Archiv der Medizinischen Klinik I eingesehen werden.

Eingeschlossen wurden alle Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa, die zum Zeitpunkt der Befunderhebung für mindestens 3 Monate Azathioprin oder 6-MP eingenommen hatten und deren Metabolitenspiegel bestimmt worden waren. Die Einnahme anderer Immunsuppressiva führte zum Ausschluss eines Patienten von der weiteren Auswertung. Eine Komedikation mit Cortison, Antibiotika oder 5-Aminosalicylaten war gestattet. Weiterhin musste die Dokumentation in den Krankenakten so präzise sein, dass die für die spätere Auswertung benötigten klinischen Indices (s.u.) genau zu berechnen waren.

Nach Durchsicht aller Akten konnten 91 Patienten (74 mit M. Crohn und 17 mit Colitis ulcerosa) in die Analyse eingeschlossen werden. Ihre Akten wurden mit Hilfe von standardisierten Bögen (Anhang Seite 63 und 64) ausgewertet. Erfasst wurden Angaben über den individuellen Krankheitsverlaufs (Lokalisation der Erkrankung, Komplikationen, vorausgegangene Operationen), relevante Begleiterkrankungen, die medikamentöse Therapie, sowie Alter, Größe und Gewicht. Darüber hinaus wurden Metabolitenspiegel und Blutbild zum Zeitpunkt der Vorstellung dokumentiert und die unten beschriebenen Aktivitätsindices

bestimmt. Die Gründe für den Ausschluss der übrigen 204 Patienten sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 2:** Gründe für den Ausschluss von 204 Patienten

| Ausschlusskriterium                                   | Anzahl |
|---|--------|
| Mindest-Therapiedauer (3 Monate) nicht erreicht       | 27     |
| Falsche Diagnose                                      | 19     |
| Zusätzliche Einnahme anderer Immunsuppressiva         | 9      |
| Metabolitenbestimmung nicht dokumentiert              | 11     |
| Akte wiederholt nicht auffindbar                      | 11     |
| Unvollständige Dokumentation                          | 127    |
| - Fehlende Variablen bei der Berechnung des CDAI/ CAI | 78     |
| - Blutbild nicht dokumentiert                         | 21     |
| - Therapiedauer nicht dokumentiert                    | 19     |
| - Unvollständige Dokumentation der Medikation         | 9      |

### 2.1. Klinische Indices

Die Aktivität der jeweiligen Erkrankung wurde mit Hilfe klinischer Indices bestimmt. Diese wurden entwickelt, um den Schweregrad chronisch entzündlicher Darmerkrankungen besser einschätzen zu können und ein valides Maß zur Verfügung zu haben. Der CDAI nach Best et al. wird zur Erfassung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit M. Crohn bevorzugt eingesetzt (1976). Er berücksichtigt Stuhlfrequenz, Bauchschmerzen (0=keine, 1=leichte, 2=mäßige, 3=starke), Allgemeinbefinden (0=gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht), die Anzahl extraintestinaler Manifestationen, Einnahme von Antidiarrhotika (0=nein, 1=ja), das Vorhandensein von abdominellen Resistenzen (0=nein, 1=ja), den Hämatokrit in Relation zu einem normalen Hämatokrit (weiblich:  $42 - \text{Hkt} = x$ , männlich  $47 - \text{Hkt} = x$ ) und das Körpergewicht in Relation zum Standardgewicht ( $(1 - \text{Körpergewicht} / \text{Standardgewicht}) * 100$ ). Die Anzahl der Stühle, die Stärke der Bauchschmerzen und das Allgemeinbefinden werden jeweils als Summe der letzten 7 Tage erfragt. Jede erfasste Variable wird mit einem bestimmten Wert multipliziert und die Einzelergebnisse zu einer Summe addiert (siehe Auswertungsbogen Seite 63). CDAI-Werte von <150 Punkten



sprechen für eine Remission, Werte  $>150$  Punkten für Krankheitsaktivität oder einen akuten Schub. CDAI-Werte  $>450$  Punkten zeigen eine sehr schweren Krankheitsschub an (Best et al., 1976). Der CDAI ist ein einfach zu erhebender und aussagekräftiger klinischer Index zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit M. Crohn.

Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde der Clinical Activity Index (CAI) nach Rachmilewitz eingesetzt (1989). Dieser klinische Index, der in vielen Studien der vergangenen Jahre verwendet wurde und gegebenenfalls durch endoskopische Parameter ergänzt werden kann (Naber und de Jong, 2003), ist nicht validiert. In diesen Aktivitätsindex gehen ebenfalls Stuhlfrequenz, Bauchschmerzen (0=keine, 1=leichte, 2=mäßige, 3=starke), Allgemeinbefinden (0=gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht) und extraintestinale Symptome ein. Darüber hinaus werden aber auch Blutauflagerungen auf dem Stuhl (0=kein Blut, 2=wenig Blut, 4=viel Blut), sowie Fieber und Laborwerte (BSG  $>50$  mm (1Std.) =1, BSG  $>100$ mm (1Std.) =2, Hb  $<100$ g/l =4) berücksichtigt. Stuhlfrequenz, Bauchschmerzen und das Allgemeinbefinden werden auch hier als Summe der letzten 7 Tage erfragt. Alle Punkte werden anschließend addiert (siehe Auswertungsbogen Seite 64). CAI-Werte  $\geq 5$  Punkte sprechen für einen akuten Entzündungsschub, ein CAI  $<5$  Punkte für eine Krankheitsremission (Rachmilewitz, 1989).

## 2.2. Statistik

Die erhobenen Daten wurden pseudonomisiert und für die statistische Analyse in das Programm SPSS (Version 12.0) übertragen.

In Bezug auf die hämatologischen Nebenwirkungen wurde als Leukopenie eine Leukozytenzahl unter  $4000/\mu\text{l}$  und als Lymphopenie eine Lymphozytenzahl unter  $1200/\mu\text{l}$  definiert. Als Krankheitsremission wurden für die Patienten mit M. Crohn ein CDAI unter 150 Punkten und für die Patienten mit Colitis ulcerosa ein CAI unter 5 Punkten festgelegt.

Vor der Anwendung parametrischer Tests wurden alle genutzten Variablen mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests für die Güte der Anpassung auf Normalverteilung

untersucht. Im Falle der Signifikanz musste die Hypothese einer Normalverteilung verworfen werden. Bei den Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte der Kolmogorov-Smirnov-Test in keinem Fall eine Signifikanz. Bei den Patienten mit M. Crohn wichen CDAI und 6-MMP-Spiegel von der Normalverteilung ab. Für nicht-normalverteilte Variablen wurden nichtparametrische Testverfahren angewendet. Zur Analyse unverbundener Variablen setzten wir den U-Test von Mann-Whitney ein. Um lineare Zusammenhänge zwischen zwei normalverteilten Variablen darzustellen, wendeten wir den Korrelationskoeffizienten nach Pearson an. Dieser ist ein dimensionsloses Maß zur Graduierung des linearen Zusammenhanges zwischen zwei Merkmalen. Diese Merkmale müssen allerdings mindestens intervallskaliert und annähernd normalverteilt sein, da der Korrelationskoeffizient anfällig gegenüber Ausreißern ist. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman-Pearson wurde für die Darstellung linearer Zusammenhänge zwischen CDAI und 6-MMP-Spiegel und anderen Variablen bei den Patienten mit M. Crohn genutzt, da diese beiden Parameter stark von der Normalverteilung abwichen. Variablen mit kategorischen Messergebnissen wurden durch den Chi-Quadrat-Test untersucht. Dieser ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in sogenannten Kontingenztafeln, in denen absolute oder relative Häufigkeiten von Kombinationen bestimmter Merkmalsausprägungen aufgetragen werden. Als Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) wurde 5% akzeptiert ( $p < 0,05$ ).

Numerische Daten sind als Median ( $\tilde{x}$ ) mit Standardfehler (SEM) dargestellt, nicht-numerische als Aufzählung oder prozentual. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot (Version 10.0) verwendet.

### 3. Ergebnisse

Für den Zeitraum 1999 bis 2004 konnten wir die Daten von 91 Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung vollständig erheben. Hiervon litten 74 Patienten an einem M. Crohn und 17 Patienten an einer Colitis ulcerosa. Die Charakteristika der Patienten werden im Folgenden getrennt nach der jeweiligen Erkrankung dargestellt.

#### 3.1. Patienten mit M. Crohn

Von insgesamt 74 Patienten waren 39 Frauen (52,7%) und 35 Männer (47,3%). Bei 13 Patienten lag ein alleiniger Befall des terminalen Ileums vor, 27 Patienten hatten eine Crohn-Kolitis. Insgesamt 28 Patienten litten unter einer Ileokolitis und bei vier Patienten lag ein isolierter Befall des Dünndarms oder des restlichen Gastrointestinaltraktes (z.B. Magen oder Ösophagus) vor.

Extraintestinale Manifestationen kamen bei 18 Patienten vor. Arthralgien und Fisteln stellten hierbei den größten Anteil. Neunundvierzig Patienten waren aufgrund ihrer Erkrankung schon einmal operiert worden. Lediglich 26 Patienten wurden allein mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin behandelt. Die übrigen 48 erhielten entweder eine Komedikation mit Kortikosteroiden, 5-Aminosalicylaten, Antibiotika oder eine Kombination dieser Medikamente.

Auswirkungen der Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin auf das Blutbild waren relativ häufig zu beobachten. Bei 36 Patienten (48,6%) war es unter der Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zu relevanten Blutbildveränderungen gekommen. Eine absolute Lymphopenie wurde bei insgesamt 36 Patienten (48,6%) beobachtet. Das Minimum lag bei 90 Lymphozyten/ $\mu$ l. Eine Leukopenie wurde bei fünf Patienten beobachtet (6,8%). Nur zwei Patienten hatten Werte von unter 3000 Leukozyten/ $\mu$ l.

Weitere Charakteristika der Patienten mit M. Crohn sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Charakteristika der Patienten mit M. Crohn. CDAI und 6-MMP-Spiegel sind nicht normalverteilt.

|   | $\tilde{x} \pm \text{SEM}$ | Minimum | Maximum |
|---|----------------------------|---------|---------|
| Leukozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]                 | 6475 $\pm$ 346             | 2280    | 15190   |
| Lymphozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]                | 960 $\pm$ 91               | 90      | 3920    |
| MCV [fl]  | 93,1 $\pm$ 1,7             | 61,4    | 117,2   |
| Therapiedauer [Monate]                            | 14,0 $\pm$ 2,9             | 3,0     | 128,0   |
| Azathioprin-Dosis [ $\text{kg KG}^{-1}$ ]         | 2,14 $\pm$ 0,08            | 0,63    | 3,91    |
| 6-MP-Dosis [ $\text{kg KG}^{-1}$ ]                | 1,25 $\pm$ 0,10            | 0,8     | 1,7     |
| 6-MMP [ng/g Hb]                                   | 3094 $\pm$ 1615            | 0       | 85967   |
| 6-MTG [ng/g Hb]                                   | 556 $\pm$ 42               | 0       | 1492    |
| 6-TGN [ $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ Ery}$ ] | 99,0 $\pm$ 7,9             | 5,0     | 341,0   |
| CDAI  | 104 $\pm$ 14               | 0       | 576     |
| Alter [Jahre]                                     | 34,5 $\pm$ 16,6            | 16,0    | 70,0    |

### 3.1.1. 6-Mercaptopurin Metabolitenspiegel und entzündliche Aktivität

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration der 6-Mercaptopurin-Metabolite und der Krankheitsaktivität bei Patienten mit M. Crohn besteht, korrelierten wir die einzelnen Metabolitenspiegel mit dem CDAI, der die Entzündungsaktivität bei jedem Patienten repräsentiert. Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der 6-Mercaptopurin-Metabolite und der Höhe des CDAI bei unseren Patienten mit M. Crohn (siehe Tabelle 7 im Anhang).

### 3.1.2. Blutbild und entzündliche Aktivität

Zur Evaluierung eines Zusammenhangs zwischen Leukozytenzahl oder der Lymphozytenzahl und der entzündlichen Aktivität, repräsentiert durch den CDAI, korrelierten wir die entsprechenden Werte mit dem klinischen Aktivitätsindex. Zwischen Lymphozytenzahl und dem CDAI bestand ein signifikant negativer Zusammenhang ( $r=-0,26$ ;  $p=0,04$ ; Tabelle 8 im Anhang).

### 3.1.3. Gruppenvergleiche

Alle bisherigen Ergebnisse bezogen sich auf das gesamte Kollektiv der Patienten mit M. Crohn. Um herausfinden, ob es Variablen gab, die sich zwischen Patienten in Remission und Patienten mit aktiver Erkrankung unterschieden, unterteilten wir die 74 Patienten in zwei Gruppen (A und B). Als Kriterium für die Einteilung diente der jeweilige CDAI. Patienten, die unter der mindestens dreimonatigen Azathioprin- oder 6-Mercaptopurin-Therapie in Remission waren (CDAI <150 Punkte), wurden Gruppe A zugeordnet. Patienten mit weiter bestehender klinischer Beschwerdesymptomatik (CDAI  $\geq$ 150 Punkte) wurden Gruppe B zugeteilt. Gruppe A umfasste 47 Patienten (63,5%), Gruppe B 27 Patienten (36,5%). Wir untersuchten, ob sich die Verteilung von Leukozytenzahl, Lymphozytenzahl, MCV, 6-MMP-, 6-MTG-, 6-TGN-Spiegel oder Azathioprin-Dosis/Körpergewicht zwischen Gruppe A und B signifikant unterschieden. Es zeigte sich, dass die Leukozytenzahl bei den Patienten in Remission signifikant niedriger war als bei Patienten mit weiterhin aktiver Erkrankung (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Vergleich der Mediane verschiedener Variablen von Gruppe A und Gruppe B

| Variable                                 | Gruppe | $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | Vergleich |
|--|--------|--------------------------|-----------|
| Leukozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]        | A      | 5950 $\pm$ 371           | p=0,02    |
|  | B      | 7640 $\pm$ 643           |           |
| Lymphozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]       | A      | 1230 $\pm$ 215           | p=0,23    |
|  | B      | 735 $\pm$ 158            |           |
| MCV [fl]                                 | A      | 93,9 $\pm$ 1,5           | p=0,26    |
|  | B      | 92,0 $\pm$ 2,3           |           |
| 6-MMP [ng/g Hb]                          | A      | 2958 $\pm$ 2385          | p=0,73    |
|  | B      | 3945 $\pm$ 1515          |           |
| 6-MTG [ng/g Hb]                          | A      | 585 $\pm$ 53             | p=0,07    |
|  | B      | 412 $\pm$ 66             |           |
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery]       | A      | 104,0 $\pm$ 11,0         | p=0,27    |
|  | B      | 86,0 $\pm$ 9,9           |           |
| Azathioprin-Dosis [kg KG <sup>-1</sup> ] | A      | 2,1 $\pm$ 0,1            | p=0,43    |
|  | B      | 2,0 $\pm$ 1,2            |           |

Zur weiteren Evaluierung eines Zusammenhanges zwischen Metabolitenspiegeln bzw. hämatologischen Nebenwirkungen und der therapeutischen Effektivität untersuchten wir bei allen Morbus-Crohn-Patienten den Anteil von Patienten in Remission ober- und unterhalb bestimmter cut-off-Werte. Der 6-TGN-Spiegel betrug minimal 5 und maximal  $341 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten. Abhängig von der 6-TGN-Konzentration im Serum wurden zwei etwa gleich große Untergruppen gebildet. In jeder wurde die Effektivität der Therapie mit Azathioprin untersucht, indem der Anteil der Patienten in Remission (CDAI  $<150$  Punkte) ermittelt wurde. Am Median orientiert wurde als cut-off-Wert  $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten festgelegt. Es zeigte sich, dass bei einem 6-TGN-Spiegel unter  $100 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten 22 Patienten in Remission waren, während 16 Patienten weiterhin eine hohe Krankheitsaktivität hatten (Ansprechrate 58%). In der Untergruppe mit 6-TGN-Spiegeln oberhalb dieses Wertes waren 25 Patienten in Remission, während 11 Patienten weiter eine aktive Erkrankung hatten (Ansprechrate 69%; siehe Abbildung 2). Statistisch war dieser Unterschied in der Verteilung zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ( $p=0,30$ , Tabelle 9 im Anhang und Abbildung 2 im Anhang).

Deutlicher fiel das Ergebnis aus, wenn man die 6-MTG-Spiegel betrachtete. Als cut-off-Wert wurden  $550 \text{ ng/g Hb}$  festgelegt. In der Gruppe der 36 Patienten mit einem 6-MTG-Spiegel unterhalb dieser Konzentration waren 19 Patienten in Remission (Ansprechrate 63%). In der Untergruppe mit einem 6-MTG-Spiegel über  $550 \text{ ng/g Hb}$  waren 28 Patienten in Remission und 10 Patienten hatten weiterhin eine aktive Erkrankung (Ansprechrate 74%; siehe Abbildung 3). Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen war statistisch tendenziell, wenn auch nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,06$ , Tabelle 10 im Anhang).

Beim 6-MMP-Spiegel präsentierte sich das Bild einheitlich (Abbildung 4 im Anhang). Als cut-off-Wert wurden  $3000 \text{ ng/g Hb}$  festgelegt. Bei einem Spiegel unterhalb dieses Wertes waren 24 Patienten in Remission und 13 hatten weiterhin eine hohe Krankheitsaktivität (Ansprechrate 65%). Bei einem 6-MMP-Spiegel über  $3000 \text{ ng/g Hb}$  waren 23 von 37 Patienten in Remission (Ansprechrate 63%).

Bei der Lymphozytenzahl lag der definierte cut-off-Wert bei  $950/\mu\text{l}$ . Unterhalb dieses Wertes waren 18 von 31 Patienten in Remission (Ansprechrate 58%). Bei

den Patienten mit einer Lymphozytenzahl über 950/ $\mu$ l waren 23 von 32 Patienten in Remission (Ansprechrate 72%, siehe Abbildung 5 im Anhang). Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,25$ ).

Der Einfluss der Leukozytenzahl unter Einnahme von Azathioprin auf den Therapieerfolg wurde ebenfalls analysiert. Als cut-off-Wert wurden 6500/ $\mu$ l gewählt. Unterhalb dieses Wertes waren 28 Patienten in Remission (Ansprechrate 80%), in der Patientengruppe mit Leukozytenzahlen über 6500/ $\mu$ l waren 17 Patienten in Remission (Ansprechrate 49%; siehe Abbildung 6). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p < 0,01$ , Tabelle 11 im Anhang).

### **3.2. Colitis ulcerosa**

Unter den 17 Patienten mit Colitis ulcerosa waren acht Frauen (47%) und neun Männer (53%). Beim überwiegenden Teil der Patienten lag eine Pankolitis vor, drei Patienten litten unter einer Linksseitenkolitis. Eine Backwash-Ileitis wurde bei keinem unserer Patienten beobachtet. Insgesamt vier Patienten litten unter extraintestinalen Manifestationen im Sinne von Arthralgien. Alle 17 Patienten erhielten zur Immunsuppression Azathioprin. Bei drei Patienten erfolgte eine alleinige Therapie mit diesem Medikament. Die restlichen 14 Patienten erhielten eine Komedikation mit Kortikosteroiden oder 5-Aminosalicylaten. Antibiotika wurden bei keinem Patienten eingesetzt.

Auch in dieser Patientengruppe waren Auswirkungen der Therapie mit Azathioprin auf das Blutbild der Patienten zu beobachten. Bei 12 von 17 Patienten (70%) der Patienten zeigten sich die oben definierten hämatologischen Nebenwirkungen. Insgesamt drei Patienten hatten eine Leukopenie entwickelt. Die minimale Leukozytenzahl lag bei 2800/ $\mu$ l. Bei neun von 17 Patienten (53%) zeigte sich eine absolute Lymphopenie. Der geringste gemessene Lymphozytenwert lag bei 330/ $\mu$ l. Die weiteren Charakteristika dieses Patientenkollektives sind im Folgenden tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 5:** Charakteristika der Patienten mit Colitis ulcerosa

|   | $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | Minimum | Maximum |
|---|--------------------------|---------|---------|
| Leukozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]                 | 4860 $\pm$ 954           | 2800    | 15500   |
| Lymphozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]                | 830 $\pm$ 119            | 330     | 1840    |
| MCV [fl]  | 95,1 $\pm$ 1,8           | 82,9    | 105,5   |
| Therapiedauer [Monate]                            | 8,0 $\pm$ 5,9            | 3,0     | 69,0    |
| Azathioprin-Dosis [ $\text{kg KG}^{-1}$ ]         | 2,2 $\pm$ 0,1            | 1,8     | 3,3     |
| 6-MMP [ng/g Hb]                                   | 5325 $\pm$ 5995          | 0       | 100566  |
| 6-MTG [ng/g Hb]                                   | 416 $\pm$ 70             | 0       | 1148    |
| 6-TGN [ $\text{pmol}/8 \times 10^8 \text{ Ery}$ ] | 104,0 $\pm$ 10,5         | 41,0    | 188,0   |
| CAI   | 1 $\pm$ 1                | 0       | 13      |
| Alter [Jahre]                                     | 47,0 $\pm$ 3,5           | 24,0    | 69,0    |

### 3.2.1. 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegel und entzündliche Aktivität

Zur Evaluierung eines linearen Zusammenhanges zwischen den Serumspiegeln der 6-Mercaptopurin-Metabolite und der entzündlichen Aktivität korrelierten wir die 6-TGN-, 6-MTG- und 6-MMP-Spiegel mit dem CAI. Es zeigte sich kein signifikanter statistischer Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Metabolite und dem CAI (alle  $p > 0,05$ , Tabelle 12 im Anhang).

### 3.2.2. Blutbild und entzündliche Aktivität

Zur Evaluierung linearer Zusammenhänge zwischen der entzündlichen Aktivität, repräsentiert durch den CAI, und der Leukozytenzahl bzw. der Lymphozytenzahl bei den Patienten mit Colitis ulcerosa unter Azathioprintherapie korrelierten wir diese Werte miteinander. Zwischen der Leukozytenzahl und dem CAI konnte kein linearer Zusammenhang gefunden werden ( $p > 0,05$ ). Zwischen der Lymphozytenzahl und dem CAI dagegen zeigte sich ein signifikant linearer Zusammenhang ( $p=0,01$ , Tabelle 13 im Anhang).

### 3.2.3. Gruppenvergleiche

Im Vergleich mit den drei Patienten mit aktiver Erkrankung zeigten sich der mediane 6-TGN- und 6-MMP-Spiegel bei den Patienten in Remission deutlich



höher. Der mediane 6-MTG-Spiegel war bei den Patienten in Remission niedriger. Auch betreffend der hämatologischen Parameter gab es Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Bei den Patienten in Remission war der mediane MCV (fl) höher als bei Patienten mit einem CAI über 5 Punkten, die mediane Lymphozytenzahl jedoch niedriger. Die mediane Leukozytenzahl unterschied sich zwischen den beiden Gruppen kaum (Tabelle 14 im Anhang und siehe Abbildung 7-12 im Anhang).

### **3.3. 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegel und Blutbild im Gesamtkollektiv**

Zur Prüfung des Zusammenhangs zwischen den 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln und den Parametern des Blutbildes wurde das Patientenkollektiv zusammengefasst, da wir davon ausgingen, dass die Entität der chronisch entzündlichen Darmerkrankung die Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen nicht beeinflusst. Die Leukozyten- und Lymphozytenzahlen sowie der MCV-Wert wurden mit den Mercaptopurin-Metabolitenkonzentrationen korreliert.

Zwischen der Lymphozytenzahl und den Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln fand sich kein signifikanter Zusammenhang (Tabelle 16 im Anhang). Es zeigte sich aber eine signifikante Korrelation zwischen MCV und dem 6-TGN-Spiegel ( $r=0,28$ ;  $p=0,01$ ) bzw. dem 6-MMP-Spiegel ( $r=0,26$ ;  $p=0,01$ ). Zwischen MCV und 6-MTG-Spiegel konnte kein Zusammenhang gefunden werden (Tabelle 17 im Anhang). Die Leukozytenzahl war signifikant negativ mit dem 6-MTG-Spiegel korreliert ( $r=-0,26$ ;  $p=0,02$ ). Zwischen 6-MMP- bzw. 6-TGN-Spiegel und der Leukozytenzahl bestand kein signifikanter Zusammenhang (Tabelle 15 im Anhang).

Eine weitere Unterteilung des Patientenkollektives erfolgte hinsichtlich der Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen (Gruppe A: hämatologische Nebenwirkungen, Gruppe B: keine hämatologischen Nebenwirkungen) unter der Therapie mit Azathioprin. Wir verglichen die Verteilung der Serummetabolitenspiegel von 6-MMP, 6-MTG und 6-TGN in den beiden Gruppen (Tabelle 6). Nur der 6-MTG- Spiegel unterschied sich signifikant ( $p=0,04$ ).

**Tabelle 6:** Vergleich der Mediane der Metabolitenspiegel von Gruppe A (Patienten mit hämatologischen Nebenwirkungen) und Gruppe B (Patienten ohne hämatologische Nebenwirkungen)

| Variable                           | Gruppe | $\bar{x} \pm \text{SEM}$ | Vergleich |
|------------------------------------|--------|--------------------------|-----------|
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery] | A      | 104 ±8                   | p=0,33    |
|                                    | B      | 88 ±11                   |           |
| 6-MMP [ng/g Hb]                    | A      | 3229 ±1298               | p=0,12    |
|                                    | B      | 3835 ±3359               |           |
| 6-MTG [ng/g Hb]                    | A      | 603 ±55                  | p=0,04    |
|                                    | B      | 488 ±42                  |           |

## 4. Diskussion

Azathioprin und 6-Mercaptopurin werden seit vielen Jahrzehnten in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen als Goldstandard der immunsuppressiven Therapie eingesetzt. Ihre Wirksamkeit zur Induktion und Konsolidierung einer Krankheitsremission, sowie zur Einsparung von Steroiden wurde in zahlreichen Studien für den M. Crohn belegt (Pearson et al., 1995, Candy et al., 1995, George et al. 1996). Die volle Wirksamkeit einer Therapie mit Purinanaloga wird teilweise erst nach 4 Monaten erreicht. Die Indikation zum Einsatz von Purinanaloga ist bei Patienten mit M. Crohn der steroidabhängige oder -refraktäre Verlauf, sowie der chronisch aktive Krankheitsverlauf mit rezidivierenden Schüben oder ausgedehntem Dünndarmbefall. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa ist die immunsuppressive Therapie mit Azathioprin oder 6-MP insgesamt weniger gut untersucht. Die etablierte Indikation sind chronisch aktive Verläufe und die Erhaltung einer Remission.

Ein zu beachtender Aspekt der immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin und 6-Mercaptopurin ist das Auftreten teilweise schwerer Nebenwirkungen. Zur frühzeitigen Detektion von Unverträglichkeiten und zur Minimierung therapie-assoziiertes allergischer (idiosynkratischer) und nicht-allergischer (dosis-abhängiger) Nebenwirkungen, werden die Purinanaloga einschleichend dosiert. Bei guter Verträglichkeit sind für eine langfristige Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit Azathioprin eine Tagesdosis von 2,0-2,5 mg/kg und mit 6-Mercaptopurin eine Tagesdosis von 1,0-1,5 mg/kg Körpergewicht erforderlich. Die empfohlene Dauer der immunsuppressiven Therapie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankung kann sehr variabel sein, da es eine Vielzahl beeinflussender Faktoren gibt und Schweregrad sowie Prognose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung häufig nicht gut abgeschätzt werden können. Eine Therapiedauer von mindestens vier Jahren wird anhand der bestehenden Datenlage meistens empfohlen. Ein Auslassversuch sollte nach diesem Zeitraum nur bei Rezidivfreiheit und fehlendem Steroidbedarf erfolgen (Hoffman et al., 2008).

Die erreichten Remissionsraten unter der Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin bei CED sind in Studien der vergangenen Jahre sehr

unterschiedlich. Im Mittel erreichten 54% der Patienten mit M. Crohn eine Remission durch die Behandlung mit Purinanaloga (Sandborn et al., 2000). Bei der Colitis ulcerosa ist die Datenlage wie erwähnt insgesamt schlechter. Eine retrospektive Auswertung von 81 Patienten mit Colitis ulcerosa und therapierefraktärem Verlauf unter Sulfasalazin und Steroiden zeigte unter einer Therapie mit 6-MP eine Ansprechrate von 61%. Weiterhin konnte die Steroidbehandlung nach durchschnittlich 10 Wochen ausgeschlichen werden (Adler 1990). Eine zweite retrospektive Analyse von 105 Patienten mit Colitis ulcerosa in Behandlung mit 6-MP, zeigte eine komplette Remission und Steroidfreiheit bei 65% der Patienten (George et al., 1996). Die Behandlung mit Azathioprin in einer Dosierung von 2 mg/kg Körpergewicht erreichte in einem Kollektiv von 56 Patienten mit steroidrefraktärer (n=10) oder steroidabhängiger (n=46) Colitis ulcerosa eine Remission bei 36 Patienten (64%) im ersten Jahr, so dass die Steroide vollständig abgesetzt werden konnten (Ardizzone et al., 1997). Eine signifikante Verbesserung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit Colitis ulcerosa konnte darüber hinaus eine placebokontrollierte Studie für Azathioprin (2-2,5 mg/kg) während einer 6-monatigen Therapiedauer belegen. Desweiteren wurde in dieser Arbeit eine signifikant stärkere Reduktion der Steroiddosis erreicht (Kirk et al., 1992). Eine randomisiert prospektive Studie belegte den Effekt auf die Remissionserhaltung bei Patienten mit Colitis ulcerosa durch die Fortführung einer Behandlung mit Azathioprin über das Erreichen einer Remission hinaus (Hawthorne et al., 1992).

Einige Studien der vergangenen Jahre konnten eine Korrelation zwischen hohen 6-TGN-Spiegeln und dem Erreichen einer Remission bzw. dem Remissionserhalt bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen belegen. Dabei wurden eventuelle Zusammenhänge zwischen der Höhe der Spiegel einzelner Metabolite der Purinanaloga und der entzündlichen Aktivität sowie dem Auftreten von Nebenwirkungen untersucht (Gearry und Barclay, 2005). Die Arbeitsgruppe um Cuffari konnte bei insgesamt 82 Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung einen signifikanten Zusammenhang zwischen 6-TGN-Spiegeln über  $250 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Azathioprin finden (Cuffari et al., 2001). Eine andere Studie aus dem Jahre 2005 evaluierte retrospektiv das Erreichen einer klinischen Remission bei Patienten mit steroidabhängigem M. Crohn (70 Patienten) oder Colitis ulcerosa (36 Patienten)

unter der Therapie mit Azathioprin. Die Dosis für Azathioprin wurde individuell adaptiert um einen Zielwert für 6-TGN-Konzentrationen  $>250 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten zu erreichen. Die Remissionsrate war in der Gruppe der Patienten, die 6-TGN-Konzentrationen über  $250 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten erreicht hatten, signifikant höher als in der Gruppe mit niedrigeren 6-TGN-Spiegeln (86% vs. 0% nach sechs Monaten und 69% vs. 0% zwölf Monaten,  $p < 0,05$ ). Es gab hierbei keinen Unterschied zwischen den Entitäten M. Crohn und Colitis ulcerosa. Die mittlere Azathioprin-Dosis in den jeweiligen Gruppen ist der Arbeit nicht zu entnehmen (Roblin et al., 2005).

Eine Auswertung von 25 Patienten mit M. Crohn zeigte eine Korrelation zwischen dem Erreichen einer Remission und den 6-TGN-Konzentrationen in den Erythrozyten, allerdings keine Korrelation zu den 6-MMP-Konzentrationen (Cuffari et al., 1996). Im Kontext hierzu stehen die Ergebnisse in einer Studie an 92 Kindern und Jugendlichen mit M. Crohn, die auch einen signifikanten Zusammenhang zwischen den 6-TGN-Spiegeln und dem Erreichen der klinischen Remission zeigen: Bei Patienten mit einem 6-TGN-Spiegel von über  $235 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten war der Anteil einer Remission signifikant höher als bei Patienten mit niedrigeren 6-TGN-Spiegeln. Eine Korrelation der 6-MMP-Konzentration zur Krankheitsaktivität konnte auch in dieser Untersuchung nicht gezeigt werden (Dubinsky et al., 2000). Eine weitere Arbeit von Dubinsky untersuchte an 51 therapierefraktären Patienten unter der Behandlung mit Azathioprin oder 6-MP, inwieweit durch eine Steigerung der Tagesdosis ein Anstieg der 6-TGN-Spiegel und eine verbesserte Remissionsrate zu erzielen sei. Lediglich 14 Patienten erreichten eine Remission verbunden mit einem signifikanten Anstieg der 6-TGN-Spiegel. Bei den weiterhin therapierefraktären Patienten zeigte sich ein signifikanter Anstieg der 6-MMP-Spiegel und bei 24% (12 Patienten) eine dosisabhängige Hepatotoxizität (Dubinsky et al., 2002).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten mehrere Studien den Zusammenhang zwischen den 6-TGN-Spiegeln und der Remissionsrate nicht bestätigen. Eine Arbeit aus dem Jahr 2003 konnte bei 71 Patienten mit M. Crohn keinen signifikanten Unterschied zwischen den 6-TGN-Spiegeln bei Patienten in Remission und mit aktiver Erkrankung detektieren (Reuther et al., 2003). Gleiches gilt für eine prospektive Studie an 28 Patienten mit M. Crohn, die mindestens drei

Monate vor Studienbeginn mit Azathioprin oder 6-MP behandelt waren. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen den gemessenen 6-TGN-Konzentrationen und der Krankheitsaktivität, definiert als Remission oder aktive Erkrankung. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen mit 6-TGN-Spiegeln oberhalb oder unterhalb der in der Literatur als Trennwert angegebener Konzentrationen ( $230\text{-}250\text{ pmol}/8\times 10^8$  Erythrozyten) (Belaiche et al., 2001). In einer 2007 durchgeführten prospektiven Studie wurden 71 Patienten mit aktivem M. Crohn nach zwei Wochen gewichtsadaptierter Behandlung mit Azathioprin ( $2,5\text{ mg/kg}$  Körpergewicht) in zwei Gruppen aufgeteilt. Entweder wurde die Therapie gewichtsadaptiert fortgeführt oder es wurde eine 6-TGN-adaptierte Therapie mit angestrebten Spiegeln zwischen 200 und  $400\text{ pmol}/8\times 10^8$  Erythrozyten begonnen. Nach 24 Wochen Therapie zeigte sich in der 6-TGN-adaptierten Gruppe eine steroidfreie Remissionsrate von 40% im Vergleich zu 43,8% in der gewichtsadaptierten Gruppe. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (Reinshagen et al., 2007). Vergleichbare Mittelwerte der 6-TGN-Spiegel bei Patienten in Remission und aktiver Erkrankung erbrachte die Untersuchung von 170 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unter einer immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin ( $131\text{ pmol}/8\times 10^8$  Erythrozyten vs.  $139\text{ pmol}/8\times 10^8$  Erythrozyten) (Lowry et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte bei Patienten mit M. Crohn kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem erythrozytären 6-TGN-Spiegel und der Krankheitsaktivität, repräsentiert durch die Höhe des CDAI, gefunden werden. Von insgesamt 74 Patienten mit M. Crohn wiesen 47 unter einer mindestens dreimonatigen Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin einen CDAI  $<150$  Punkte auf und hatten damit eine Remission erreicht (63,5%). Dieser Remissionswert ist vergleichbar mit anderen Studien, die Remissionsraten von 59%, 67% und 69% dokumentieren konnten (Roblin et al., 2005, Lowry et al., 2001, Dubinsky et al., 2000). Der mediane 6-TGN-Spiegel war bei den Patienten in Remission tendenziell höher als bei Patienten mit persistierender aktiver Erkrankung ( $104,0\text{ pmol}/8\times 10^8$  Erythrozyten vs.  $86,0\text{ pmol}/8\times 10^8$  Erythrozyten), dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant.

Auffallend bei der Analyse unserer Daten waren die im Vergleich zu vielen Publikationen durchweg niedrigeren 6-TGN-Spiegel. Prof. H. Iven (Institut für

Pharmakologie), der die Bestimmung der Mercaptopurin-Metabolite seinerzeit durchführte, erklärte dazu, dass diese Unterschiede methodisch bedingt seien. Bei dem im Institut für Pharmakologie etablierten Nachweisverfahren werde auf die Zugabe von Dithiotreiol (DTT) als Antioxidans zum Vollblut verzichtet und die vor der Bestimmung der Metabolite nötige Säurehydrolyse falle kurz aus. Die gemessenen 6-TGN-Konzentrationen nähmen jedoch bekanntermaßen mit der Menge an zugesetztem DTT und der Dauer der Säurehydrolyse zu, so dass die vergleichsweise niedrigen 6-TGN-Spiegel plausibel seien.

Demnach ist die Datenlage zur klinischen Relevanz der erythrozytären 6-TGN-Spiegel widersprüchlich. Mehrere Erklärungsansätze sind möglich: Ein wesentlicher Faktor sind unterschiedliche Studiendesigns oder zu geringe Fallzahlen. Desweiteren beziehen sich einige Studien nur auf pädiatrische Patienten (Dubinsky et al., 2000, Gupta et al., 2001), was eine Übertragung auf Erwachsene nicht unbedingt zulässt. Von großer Relevanz für die Interpretation der Remissionsraten erscheint die jeweilige Definition der Krankheitsaktivität beziehungsweise des klinischen Ansprechens. So verwendeten Dubinsky und Cuffari für ihre Patienten mit M. Crohn den Harvey-Bradshaw Index (HBI), Reinshagen und Belaiche den CDAI und Lowry den „Inflammatory bowel disease questionnaire“. Die verschiedenen Indices lassen sich nicht miteinander vergleichen. Nach Harvey, der bei der Entwicklung des HBI einen Vergleich mit dem CDAI durchführte, zeige sich zwar eine gute Korrelation zwischen dem HBI und dem CDAI (HBI <5 Punkten entsprechen einem CDAI <150 Punkte, 93%), wodurch eine gewisse Vergleichbarkeit der Studienergebnisse möglich erscheint (Harvey et al., 1980), problematisch bleibt jedoch die Festlegung der Cut-off-Werte zur Remissionsdefinition. So fordert Cuffari einen HBI unter 4 Punkten, während andere Autoren die Remission bei einem HBI unter 5 Punkten postulieren (Dubinsky et al., 2000, Reuther et al. 2003). Fraser sprach von einer Remission, wenn für 3 Monate kein Bedarf an oralen Steroiden bestand (Fraser et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Remission für Patienten mit M. Crohn als ein CDAI <150 Punkten definiert. Wir entschieden uns für den CDAI als klinischen Index, da er ein einfach zu erhebender, etablierter klinischer Index ist und eine gute individuelle Verlaufsbeurteilung und Vergleichbarkeit zulässt (Yoshida, 1999).

Ein weiterer Faktor erschwert den Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien: In einigen Studien wurde die Wirksamkeit von Azathioprin zur Remissionsinduktion untersucht, während in anderen Untersuchungen nur eine bereits bestehende Therapie mit Azathioprin beobachtet wurde. Der größtmögliche Effekt der Therapie mit Azathioprin oder 6-MP wird erst nach ca. vier Monaten erreicht. Unterschiedliche Therapiedauern können insofern diskrepante Ergebnisse bezüglich des Zusammenhanges von 6-TGN-Spiegeln und der Entzündungsaktivität erklären. So wurden von Sandborn und Mitarbeitern Patienten in den ersten vier Monaten ihrer Therapie untersucht (Sandborn, 1999). Dies ist aus unserer Sicht eine zu kurze Therapiedauer, um eine valide Korrelation von Krankheitsaktivität und Metabolitenspiegeln zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit, analog zu vielen anderen Studien, nur Patienten eingeschlossen, bei denen die Medikation mindestens seit drei Monaten bestand (Belaiche et al., 2001, Cuffari et al., 2001, Dubinsky et al., 2000). Die Einhaltung der empfohlenen Dosierung für Azathioprin und 6-MP erscheint weiterhin sehr wichtig zur Erzielung möglicher Korrelationen und führt bei Nichtbeachtung zu verfälschten Ergebnissen. In der vorliegenden Arbeit lag die mediane Dosis pro kg Körpergewicht mit 2,14 mg für Azathioprin und 1,25 mg für 6-Mercaptopurin im empfohlenen Bereich (Hoffmann et al., 2008).

Für Patienten mit Colitis ulcerosa konnten wir in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen 6-TGN-Spiegel und der Krankheitsaktivität, dargestellt durch den CAI, finden. Dieses Resultat stimmt mit den Studien von Gupta und Lowry überein, die allerdings auch bei Patienten mit M. Crohn keine Korrelation zwischen 6-TGN-Spiegel und Entzündungsaktivität gefunden hatten (Gupta et al., 2001, Lowry et al., 2001). Cuffari und Roblin berichteten bei Patienten mit Colitis ulcerosa eine höhere Remissionsrate unter Azathioprin-Therapie, wenn die 6-TGN-Spiegel oberhalb von  $250 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten lagen (Roblin et al., 2005, Cuffari et al., 2001). In unserer Studie hatten von insgesamt 17 eingeschlossenen Patienten 13 nach einer mindestens dreimonatigen Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin eine Remission, definiert durch einen CAI  $< 5$  Punkten, erreicht (76,5%). Grundsätzlich gelten die gleichen Gründe für diskrepante Studienergebnisse wie bei den Patienten mit M. Crohn. Da in dieser Arbeit jedoch nur 17 Patienten mit Colitis ulcerosa ausgewertet werden



konnten, sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eher als Trends betrachtet werden.

Die fehlende Korrelation zwischen 6-TGN-Spiegeln und der Effektivität der medikamentösen Therapie könnte weiterhin nahelegen, dass 6-TGN nicht der einzige aktive Metabolit der Purinanaloga ist. Diese Hypothese wird unter anderem durch eine Arbeit unterstützt, in der Patienten mit M. Crohn zur Immunsuppression Thioguanin erhielten. Durch diese Therapie konnten im Vergleich zur Verabreichung von Azathioprin/6-Mercaptopurin 4-6fach höhere 6-TGN-Spiegel erreicht werden, ohne dass die Therapie hierdurch effektiver war. Nach sechs Monaten Behandlung waren 58,3% der Patienten in Remission und die mittleren 6-TGN-Spiegel von Patienten in Remission und weiterhin aktiver Erkrankung unterschieden sich nicht wesentlich ( $1077 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten vs.  $1210 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  Erythrozyten, Herrlinger et al., 2004).

Als weitere Metabolite der Purinanaloga wurden in der vorliegenden Arbeit die Konzentrationen der 6-MMP und 6-MTG gemessen. Eine Korrelation zur Krankheitsaktivität konnte auch für 6-MMP nicht hergestellt werden. Basierend auf den bestehenden Erkenntnissen war dies auch nicht zu erwarten, da dieser Metabolit primär für die hepatotoxischen Effekte der Purinanaloga verantwortlich zu sein scheint (Dubinsky et al., 2000). Interessant waren jedoch die Ergebnisse bezüglich der 6-MTG-Spiegel: Eine lineare Korrelation zwischen 6-MTG-Konzentration und Krankheitsaktivität war nicht gegeben. Oberhalb eines 6-MTG-Spiegels von  $550 \text{ ng/g Hb}$  war die Ansprechrate jedoch deutlich, wenn auch nicht signifikant höher ( $p=0,06$ ). Ein solcher Trend ist bisher noch nicht beschrieben worden, zumal 6-MTG in den meisten Studien nicht Gegenstand der Untersuchung war. Die 6-MTG-Metabolite scheinen jedoch den ersten Schritt der Purin-de-novo Synthese zu hemmen. Ein Mechanismus der bisher auch den 6-MMP-Metaboliten zugeschrieben wurde (Dervieux et al., 2001). Lediglich in einer Arbeit aus dem Jahr 2004 wurden die Spiegel für 6-TGN und auch 6-MTG bei 26 Patienten mit chronisch aktivem M. Crohn unter der Therapie mit Thioguanin gemessen und ein möglicher Einfluss auf Effektivität und Sicherheit der Behandlung untersucht. Es zeigte sich keine Korrelation von Metabolitenspiegel zur Therapieeffektivität (Remission vs. Nichtansprechen) und die Autoren die

Autoren schlussfolgerten, dass durch ein Monitoring der Metabolite keine prädiktive Aussagekraft abgeleitet werden kann (Herrlinger et al., 2004).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung eines möglichen Zusammenhanges zwischen den Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln und hämatologischen Nebenwirkungen. Die häufigste hämatologische Nebenwirkung unter einer Therapie mit Azathioprin oder 6-MP ist die Leukopenie. Sie entsteht wahrscheinlich auf Basis einer Akkumulation von 6-TGN in neutrophilen Granulozyten (Bergan et al., 1997, Herrlinger et al., 2004). Bei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) unter der Therapie mit Azathioprin wurde eine positive Korrelation zwischen dem 6-TGN-Spiegel und dem Risiko eine Leukopenie zu entwickeln beschrieben (Lennard et al., 1983). Dieser Zusammenhang wurde in mehreren Studien auch bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen reproduziert (u.a. D'Halluin et al., 2005, Dubinsky et al., 2000, Lennard et al., 1996).

Andere Studien konnten wiederum keinen entsprechenden Zusammenhang finden. Die Arbeitsgruppe um Sandborn fand bei Morbus-Crohn-Patienten, bei denen die Zeit bis zum Ansprechen auf intravenös verabreichtes Azathioprin untersucht wurde, keine Korrelation zwischen 6-TGN-Spiegel und dem Risiko, eine Leukopenie zu entwickeln (Sandborn et al., 1999). Auch Lowry und Belaiche konnten diesbezüglich keine Assoziation aufzeigen (Lowry et al., 2001, Belaiche et al., 2001). Der Einfluss des 6-MMP-Spiegels auf die Leukozyten war durch die Arbeitsgruppe um Dubinsky untersucht worden, die keinen Zusammenhang zwischen dem 6-MMP-Spiegel und dem Auftreten einer Leukopenie belegen konnte (Dubinsky et al., 2000). Ein weiterer relevanter hämatologischer Parameter während der Behandlung mit Purinanaloga ist das mittlere korpuskuläre Volumen der Erythrozyten (MCV). Eine Erhöhung des MCV-Wertes unter Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin wurde in einigen Studien beschrieben (Decaux et al., 2000; Belaiche et al., 2001; Fraser et al., 2002). Belaiche fand hierbei eine signifikante Korrelation zwischen 6-TGN-Spiegel und dem MCV (Belaiche et al., 2001). Auch Decaux belegte bei 43 Patienten, die aufgrund verschiedener Autoimmunerkrankungen Azathioprin erhielten, einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem 6-TGN-Spiegel und dem Anstieg des MCV-Wert unter der Therapie (Decaux et al., 2000). Der Einfluss einer Azathioprintherapie

auf die Lymphozytenzahl wurde von Belaiche sowie D´Halluin und Mitarbeitern untersucht, die keine signifikante Korrelation zwischen dem 6-TGN-Spiegel und der Lymphozytenzahl finden konnten (Belaiche et al., 2001; D´Halluin et al., 2005).

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit den Einfluss der Mercaptopurin-Metabolite auf das Blutbild. Hierbei wurden Leukozytenzahl, MCV und Lymphozytenzahl berücksichtigt. Eine negative Korrelation zwischen dem 6-TGN-Spiegel und der Leukozytenzahl, wie sie Dubinsky, Lennard und D´Halluin gefunden hatten, konnten wir nicht darstellen. Der Vergleich der Ergebnisse wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass in die Arbeit von D´Halluin auch Patienten eingeschlossen wurden, die Azathioprin für weniger als drei Monate eingenommen hatten. Erstmals konnten wir mit der vorliegenden Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen dem 6-MTG-Spiegel und der Leukozytenzahl aufzeigen. Weiterhin war der mediane 6-MTG-Spiegel bei Patienten mit hämatologischen Nebenwirkungen signifikant höher als bei Patienten ohne hämatologische Nebenwirkungen. Die Bedeutung dieser Ergebnisse ist schwer einzuordnen, da es über den Zusammenhang zwischen 6-MTG-Spiegel und Blutbild bisher keine weiteren Arbeiten gibt.

Bezüglich des MCV-Wertes fanden wir in Übereinstimmung mit der oben zitierten Arbeit eine signifikante lineare Korrelation zwischen dem 6-TGN-Spiegel und dem MCV in unserem Patientenkollektiv. Interessanterweise konnten wir auch eine signifikante Korrelation zwischen dem 6-MMP-Spiegel und dem MCV nachweisen. Dieser Zusammenhang ist bisher noch nicht beschrieben worden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass 6-MMP bisher vor allem für die hepatotoxischen Nebenwirkungen von Azathioprin und 6-MP verantwortlich gemacht wird und ein Zusammenhang mit hämatologischen Nebenwirkungen noch nicht untersucht wurde (Dubinsky et al., 2000 und Dubinsky et al., 2002).

Eine Verbindung zwischen Lymphozytenzahl und den Mercaptopurin-Metaboliten konnten wir in Übereinstimmung mit den Arbeiten von D´Halluin und Belaiche, nicht finden (Belaiche et al., 2001 und D´Halluin et al., 2005).

Die genannten Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen des Blutbildes Rückschlüsse auf die Konzentration einzelner Mercaptopurinmetabolite zulassen. So kann das Ausbleiben eines MCV-Anstieges nach 3 Monaten Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin auf einen niedrigen 6-TGN-Spiegel hinweisen, wie er bei fehlender oder unregelmäßiger Einnahme der Medikamente auftritt. Dieser Parameter wäre zur Klärung der Patientencompliance vielversprechend und leicht zu erheben.

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der Suche nach Parametern zur Therapieoptimierung ist die Korrelation von hämatologischen Nebenwirkungen (Leukopenie, Lymphopenie) oder anderen Parametern des Blutbildes (MCV) mit der Krankheitsaktivität. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Induktion einer Leukopenie, als Zeichen einer messbaren Hemmung der Lymphozytenproliferation, und der klinischen Effektivität der Therapie mit Purinanaloga (Decaux et al., 2000, Belaiche et al., 2001). Fraser und Mitarbeiter fanden bei der retrospektiven Auswertung von Daten von 622 Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine signifikante Korrelation zwischen erniedrigten Leukozytenwerten und dem Erreichen und Aufrechterhalten der Remission. Weiterhin konnten sie einen Zusammenhang zur Erhöhung des MCV aufzeigen, eine Korrelation von Lymphozytenzahl und entzündlicher Aktivität fand sich hingegen nicht (Fraser et al., 2002). In einer Arbeit von Candy zeigte sich nach 15 Monaten Therapie mit Azathioprin für die mittlere Zahl der Leukozyten ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten in Remission und Patienten mit aktiver Erkrankung (4,9/nl vs. 6,8/nl,  $p < 0,01$ ; Candy et al., 1995). Die Arbeitsgruppe um Colonna untersuchte den Zusammenhang einer durch Azathioprin induzierten Leukopenie mit dem Erreichen einer Krankheitsremission bei 98 Patienten mit steroidrefraktärem M. Crohn. Patienten mit einer Leukopenie unter Azathioprintherapie erreichten eine schnellere und länger anhaltende Krankheitsremission (Colonna und Korelitz, 1994). Keinen Zusammenhang zwischen der Entzündungsaktivität und Leukozytenwerten konnte Lowry bei 170 Patienten mit M. Crohn oder Colitis ulcerosa unter der Behandlung mit Azathioprin finden (Lowry et al., 2001). Darüber hinaus war in einer Studie an 92 pädiatrischen Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung bei eingetretener Krankheitsremission unter Purinanaloga nur in 8% der Fälle eine Leukopenie aufgetreten (Dubinsky et al., 2000). In einigen Arbeiten war auch eine Erhöhung

des MCV mit dem Erreichen der Remission assoziiert (Fraser et al., 2002, Roblin et al., 2005).

Für die Patienten mit M. Crohn konnten wir in der vorliegenden Arbeit einen negativen linearen Zusammenhang zwischen der Lymphozytenzahl und der entzündlichen Aktivität belegen. Bei der Leukozytenzahl und dem MCV gelang dieser Nachweis nicht. Beim Vergleich der Mediane von Lymphozytenzahl, Leukozytenzahl und MCV von Patienten in Remission und Patienten mit aktiver Erkrankung ergab sich analog zu einigen der oben genannten Studien ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Leukozytenzahl zwischen den Gruppen (5950/ $\mu$ l vs. 7640/ $\mu$ l,  $p=0,02$ ). Patienten, deren Leukozytenwert im Blutbild unter 6500/ $\mu$ l lag, hatten in dieser Arbeit darüber hinaus signifikant häufiger eine Krankheitsremission erreicht ( $p < 0,01$ ). Bei unseren Patienten mit Colitis ulcerosa zeigte sich analog zu den Patienten mit M. Crohn ein negativ linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Lymphozyten und der entzündlichen Krankheitsaktivität (CAI). Bei diesen Patienten bestand ebenfalls keine Korrelation zwischen der entzündlichen Aktivität und der Gesamtanzahl der Leukozyten oder dem MCV. Bei den Patienten in Remission war die mediane Lymphozytenzahl niedriger als bei Patienten mit aktiver Erkrankung (745/ $\mu$ l vs. 1490/ $\mu$ l), der mediane MCV-Wert war in dieser Gruppe jedoch höher (95,3 fl vs. 88,0 fl).

Die Widersprüche zwischen den Studien lassen sich wie bereits oben diskutiert am ehesten durch unterschiedliche Studiendesigns erklären. Darüber hinaus hat die Dauer der Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zum Zeitpunkt der Blutentnahme einen wichtigen Einfluss auf die Ergebnisse. In den ersten Monaten der Therapie kommt es nicht immer zu wesentlichen Veränderungen des Blutbildes. Ein deutlicher Abfall der Leukozyten bleibt zu Beginn der immunsupprimierenden Therapie oft aus, da häufig noch wesentliche entzündliche Aktivität seitens der chronisch entzündlichen Darmerkrankung besteht oder aufgrund der Einnahme systemischer Kortikosteroide ein Anstieg der Leukozyten folgt.

Die Erhöhung des MCV unter einer Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin scheint durch die Akkumulation aktiver Metabolite in den Erythrozyten verursacht

zu sein (Decaux et al., 2000). Im Gegensatz zu Roblin und Belaiche konnten wir keinen Zusammenhang zwischen erhöhten MCV-Werten und einer Remission finden. Um den Einfluss des MCV auf das Erreichen und Aufrechterhalten einer Krankheitsremission beurteilen zu können, sollte in zukünftigen Arbeiten zu diesem Thema unter anderem der Vitamin-B12- und Folsäurestoffwechsel berücksichtigt werden, da ein Mangel an diesen beiden Vitaminen zu einer Zunahme des korpuskulären Erythrozytenvolumens führt. Im Rahmen einer Crohn-Erkrankung kann es beispielsweise durch Resektion oder Befall des terminalen Ileums zu einem Vitamin B12-Mangel kommen. Auch ein gastroduodenaler Befall mit nachfolgendem Mangel an Intrinsic-Faktor ist möglich. Folsäuremangel kann durch eine Malabsorption nach Resektion oder Befall des Jejunums verursacht werden. Darüber hinaus verursacht eine hohe entzündliche Aktivität einen erhöhten Folsäurebedarf.

Der Einfluss einer Lymphopenie auf das Erreichen einer Krankheitsremission wurde nur durch wenige Studien untersucht. Durch den zytotoxischen Effekt der aktiven Metabolite auf proliferierende B- und T-Lymphozyten gilt, dass eine Lymphopenie unter der Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin ein erwünschter Effekt ist und die Hemmung der Proliferation widerspiegelt (Hoffmann et al., 2008). Analog hierzu konnte durch die vorliegende Arbeit sowohl für Patienten mit M. Crohn als auch für solche mit Colitis ulcerosa ein positiv linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Lymphozyten und der entzündlichen Aktivität gezeigt werden.

Zusammenfassend bestätigt sich an unserem Patientenkollektiv die Eignung von Azathioprin und 6-Mercaptopurin zur Induktion und Aufrechterhaltung einer Remission bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Eine generelle Bestimmung der Metabolitenspiegel zur Abschätzung eines Therapieerfolges und des Risikos für die Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen erscheint angesichts der Ergebnisse dieser Arbeit und der insgesamt diskrepanten Studienlage jedoch nicht sinnvoll. Wir konnten in Übereinstimmung zu vielen Studien der letzten Jahre keine signifikante Korrelation zwischen der Aktivität der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und jeglichen 6-MP-Metabolitenspiegel feststellen. Allenfalls der 6-MTG-Spiegel könnte als Marker eine Rolle spielen. Eine körperrgewichtsadaptierte Dosierung ist im Vergleich zu

einer metabolitengesteuerten Therapie kostengünstiger und laut neuerer Studien ebenso effektiv (Reinshagen et al., 2007). Bezüglich der Entwicklung hämatologischer Nebenwirkungen zeigte sich sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Studien eine Assoziation zu einzelnen Metabolitenspiegeln der Purinanaloga. Therapieassoziierte Veränderungen des Differentialblutbildes treten häufig auf, ernsthafte hämatologische Nebenwirkungen mit der Notwendigkeit einer Dosisreduktion oder eines Therapieabbruchs sind unter der Einnahme von Azathioprin/6-MP jedoch sehr selten (Connell et al., 1993, Fraser et al., 2002). Eine einmalige Bestimmung der TPMT-Aktivität zur Identifizierung von Patienten mit homozygot niedriger Aktivität und einem entsprechend hohem Risiko für die Entwicklung toxischer Metabolitenspiegel kann vor Therapiebeginn erfolgen und eine regelmäßige Metabolitenspiegel-Messung ersparen. Andererseits kann auch die Bestimmung der TPMT-Aktivität nicht regelmäßige Kontrollen des Blutbildes ersetzen, so dass sie nicht generell empfohlen werden kann (Hoffmann 2008).

Dass Blutbildveränderungen unter einer immunsupprimierenden Therapie mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin mit einem größeren Therapieerfolg assoziiert sind, konnte durch unsere Ergebnisse und andere Studien gezeigt werden. Die Trennschärfe dieser Parameter ist aber äußerst gering, so dass hieraus nicht abgeleitet werden kann, danach die Dosis anzupassen. Das Ausbleiben entsprechender Blutbildveränderungen kann allerdings auf eine fehlende Einnahme des verschriebenen Medikamentes hinweisen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist bei der Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine einschleichende und im Verlauf körperrgewichtsadaptierte Dosierung von Azathioprin und 6-Mercaptopurin unter regelmäßigen Blutbildkontrollen zu empfehlen. Veränderungen des Differentialblutbildes sind zu erwarten und können Hinweis auf ein gutes Ansprechen der Therapie sein. Beim Auftreten von ernsthaften hämatologischen oder anderen Nebenwirkungen sowie bei Therapieversagen erscheint eine Bestimmung der Mercaptopurin-Metabolite sinnvoll, um toxische Spiegel oder eine mangelnde Compliance bzw. Adhärenz nachzuweisen.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Einsatz von Azathioprin und 6-Mercaptopurin (6-MP) in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untersucht. Es sollte evaluiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Metabolitenspiegeln beider Medikamente und der Entzündungsaktivität sowie dem Auftreten hämatologischer Nebenwirkungen besteht. Zur Messung der Entzündungsaktivität wurden der Crohn's Disease Activity Index (CDAI) und der Clinical Activity Index (CAI) verwendet. Als hämatologische Nebenwirkungen wurden eine Leukopenie (Leukozytenzahl unter 4000/ $\mu$ l) und eine Lymphopenie (Lymphozytenzahl unter 1200/ $\mu$ l) definiert.

Ausgewertet wurden die Krankenunterlagen von insgesamt 295 Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung, die im Zeitraum zwischen 1999 und 2004 in der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein/Campus Lübeck mit Azathioprin/6-MP behandelt worden waren. In die Analyse eingeschlossen wurden 74 Patienten mit M. Crohn und 17 Patienten mit Colitis ulcerosa.

Nach einer mindestens dreimonatigen immunsuppressiven Therapie mit einem der beiden Medikamente waren 63,5% der Patienten mit M. Crohn und 76,5% der Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission. Die Wirksamkeit von Azathioprin und 6-MP beim Erreichen und Aufrechterhalten einer Krankheitsremission entsprach den Angaben zahlreicher vergangener Arbeiten zu dieser Thematik.

Es zeigte sich sowohl bei Patienten mit M. Crohn als auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa keine signifikante Korrelation zwischen den Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln und der entzündlichen Krankheitsaktivität. Die Steuerung der immunsuppressiven Therapie durch das Messen der Metabolitenspiegel erscheint nicht sinnvoll.

Hinsichtlich eines Zusammenhanges zwischen den Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln und hämatologischen Nebenwirkungen konnte für alle Patienten eine negative Korrelation zwischen dem 6-Methylthioguanin-Spiegel (6-MTG) und der Leukozytenzahl gezeigt werden. Zwischen dem



6-Methylmercaptapurin-Spiegel (6-MMP), sowie dem 6-Thioguanin-Spiegel (6-TGN) und dem MCV-Wert konnte ein signifikant linearer Zusammenhang gefunden werden. Bei Patienten, die unter der Azathioprintherapie hämatologische Nebenwirkungen entwickelt hatten, war der 6-MTG-Spiegel signifikant höher. Keiner der in diese Studie eingeschlossenen Patienten entwickelte schwerwiegende hämatologische Nebenwirkungen, die einen Abbruch der Therapie notwendig gemacht hätten. Die Messung der Metabolitenspiegel zur Risikoabschätzung kann bei regelmäßiger Blutbildkontrolle unterbleiben. Da bestimmte Blutbildveränderungen mit der Höhe einzelner Metabolitenspiegel assoziiert sind, sind Rückschlüsse auf die Compliance der Patienten bei der Einnahme der Medikamente auch durch Blutbildkontrollen möglich.

Durch die vorliegende Arbeit sollte weiterhin untersucht werden, ob das Auftreten der oben aufgeführten hämatologischen Nebenwirkungen mit einem besseren Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie assoziiert ist. Sowohl bei den Patienten mit M. Crohn als auch bei den Patienten mit Colitis ulcerosa konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lymphozytenzahl und der entzündlichen Aktivität gefunden werden. Patienten mit M. Crohn erreichten bei Leukozytenwerten unter 6500/ $\mu$ l signifikant häufiger eine Krankheitsremission.

Zum Teil sind Veränderungen des Blutbildes also mit einem Therapieerfolg assoziiert. Jedoch kann hieraus keine Empfehlung abgeleitet werden, diese Blutbildveränderungen durch Dosiserhöhungen herbeizuführen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abreu MT: The pathogenesis of inflammatory bowel disease: translational implications for clinicians. *Curr Gastroenterol Rep* 4, 481-489 (2002)
2. Adler DJ, Korelitz BI: The therapeutic efficacy of 6-mercaptopurine in refractory ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 85, 717-722 (1990)
3. Andres PG, Friedman LS: Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28, 255-281 (1999)
4. Ardizzone S, Molteni P, Imbesi V, Bollani S, Bianchi Porro G: Azathioprine in steroid-resistant and steroid-dependent ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 25, 330-333 (1997)
5. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J: NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes and Immunity* 5, 417-425 (2004)
6. Asakura H, Suzuki K, Honma T: Recent advances in basic and clinical aspects of inflammatory bowel disease: which steps in the mucosal inflammation should we block for the treatment of inflammatory bowel disease? *World J Gastroenterol* 13, 2145-2149 (2007)
7. Belaiche J, Desager JP, Horsmans Y, Louis E: Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-Mercaptopurine Metabolites in Crohn Disease. *Scand J Gastroenterol* 36, 71-76 (2001)
8. Bergan S, Bentsdal O, Sodal G, Brun A, Rugstad HE, Stokke O: Patterns of azathioprine metabolites in neutrophils, lymphocytes, reticulocytes, and erythrocytes: relevance to toxicity and monitoring in recipients of renal allografts. *Ther Drug Monit* 19, 502-509 (1997)
9. Berge RJ, Schellekens PT, Surachno S, The TH, ten Veen JH, Wilmink JM: The influence of therapy with azathioprine and prednisone on the immune system of kidney transplant recipients. *Clin Immunol Immunopathol* 21, 20-32 (1981)
10. Berlit P, Gretz N: Azathioprin (Imurek). *Internist* 34, 788-793 (1993)
11. Bernstein CN: Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep* 3, 477-483 (2001)

12. Best WR, Bechtel JM, Singleton JW, Kern F: Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70, 439-444 (1976)
13. Bevins CL: Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochem Soc Trans* 34, 263-266 (2006)
14. Boulton-Jones JR, Pritchard K, Mahmoud AA: The use of 6-mercaptopurine in patients with inflammatory bowel disease after failure of azathioprine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 1561–1565 (2000)
15. Braun A, Treede I, Gotthardt D, Tietje A, Zahn A, Ruhwald R, Schoenfeld U, Welsch T, Kienle P, Erben G, Lehmann WD, Fuellekrug J, Stremmel W, Eehalt R: Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: A clue to pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1705-1720 (2009)
16. Carne RY, Alexandre GPJ, Murray JE: A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplantation in dogs. *Ann NY Acad Sci* 99, 743-61 (1962)
17. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J: Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 23, 1097-1104 (2006)
18. Candy S, Wright J, Gerber M, Adams G, Goodman R: A controlled double blind study of azathioprine in the management of Crohn's disease. *Gut* 37,674-678 (1995)
19. Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP: Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 53 Suppl 5, V1-16 (2004)
20. Chapman RW, Cottone M; Selby WS, Shepherd HA, Sherlock S, Jewell DP: Serum autoantibodies, ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 27, 86-91 (1986)
21. Cho JH: Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World Journal of Gastroenterology* 14, 338-347 (2008)
22. Colonna T, Korelitz BI: The role of leukopenia in the 6-mercaptopurine-induced remission of refractory Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 89, 362-366 (1994)
23. Connell WR, Kamm MA, Ritchie JK, Lennard-Jones JE: Bone marrow toxicity caused by azathioprine in inflammatory bowel disease – 27 years of experience. *Gut* 34, 1249-1253 (1993)

24. Cuffari C, Hunt S, Bayless T: Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimise azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 48, 591-592 (2001)
25. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A: Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 46, 7227-7236 (2005)
26. Das KM: Relationship of extraintestinal involvements in inflammatory bowel disease: new insights into autoimmune pathogenesis. *Dig Dis Sci* 44, 1-13 (1999)
27. Decaux G, Prosperit F, Horsmans Y, Desager JP: Relationship between red cell mean corpuscular volume and 6-thioguanine nucleotides in patients treated with azathioprine. *J Lab Clin Med* 135, 256-262 (2000)
28. Derjiks LJJ, Glissen LPL, Hooyman PM, Hommes DW: Review article: Thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24, 715-729 (2006)
29. Dervieux T, Blanco JG, Krynetski EY, Vanin EF, Roussel MF, Relling MV: Differing contribution of thiopurine methyl transferase to mercaptopurine versus thioguanine effects in human leukemic cells. *Cancer Res* 61, 5810-5816 (2001)
30. Dignass AU, Herrlinger A, Schölmerich J: Chronisch aktiver Verlauf in Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 42, 979-983 (2004)
31. D'Halluin PN, Tribut O, Branger B, Lebreton C, Bretagne JF, Bentue-Ferrer D, Heresbach D: RBC 6-TGN and hematological parameters in patients with Crohn's disease treated by azathioprine. *Gastroenterol Clin Biol* 29, 1264-1269 (2005)
32. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnott D, Théorêt Y, Seidman EG: Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118, 705-713 (2000)

33. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV: 6-MP metabolite profiles provide a biochemical Explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122, 904-915 (2002)
34. Dubinsky MC: Optimizing immunomodulator therapy for inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterol Rep* 5, 506-511 (2003)
35. Ekbom A, Helmick C, Zack M: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta analysis. *Gut* 48, 526-535 (2001)
36. Esters N, Pierik M, van Steen K: Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. *American J Gastroenterol* 99, 299-305 (2004)
37. Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML: Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 131, 90-101 (2003)
38. Fahlgren A, Hammarstrom S, Danielsson A, Hammarstrom ML: Beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 137, 379-385 (2004)
39. Fairchild CR, Maybaum J, Kennedy KA: Concurrent unilateral chromatid damage and DNA strand breakage in response to 6-thioguanine treatment. *Biochem Pharmacol* 35, 3533–3541 (1986)
40. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr: Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* 68, 627-635 (1975)
41. Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF: Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 15, 627-634 (2003)
42. Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B, Stange EF: A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 79, 439-448 (2006)
43. Francella A, Dyan A, Bodian C: The safety of 6-mercaptopurine for childbearing patients with inflammatory bowel disease: a retrospective cohort study. *Gastroenterology* 124, 9–17 (2003)
44. Fraser AG, Orchard TR, Robinson EM, Jewell DP: Long-term risk of malignancy after treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1225-1232 (2002)

45. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical: CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest* 113, 1490–1497 (2004)
46. Geary RB, Barclay ML: Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 20, 1149-1157 (2005)
47. George J, Present DH, Pou RI: The long-term outcome of ulcerative colitis treated with 6-mercaptopurine. *Am J Gastroenterol* 91, 1711–1714 (1996)
48. Gersemann M, Becker S, Kübler I: Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation* 77, 84-94 (2009)
49. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ: NOD2 is a general sensor of peptidoglykan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872 (2003)
50. Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB: The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine* 55, 401-412 (1976)
51. Gupta P, Gokhale R, Kirschner BS: 6-mercaptopurine metabolite levels in children with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 33, 450-4 (2001)
52. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Järnerot G: Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* 124, 1767-1773 (2003)
53. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S: Association of NOD2 (Card15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 359:1661-1665 (2002)
54. Harvey RF, Bradshaw JM: A simple index of Crohn's disease activity. *Lancet* 1, 514 (1980)
55. Hawthorne AB, Logan RF, Hawkey CJ: Randomised controlled trial of azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *BMJ* 305, 20–22 (1992)

56. Helio T, Halme L, Lappalainen M: CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 52, 558-62 (2003)
57. Hoffmann JC, Zeitz M, Bischoff C, Brambus HJ, Bruch HP, Buhr HJ, Dignass A, Fleig W, Fölsch UR, Höhne W, Jantschek G, Kaltz B, Kedl KM, Knebel U, Kroesen AJ, Kruis W, Matthes A, Moser G, Mundt S, Pox C; Riesshagen M, Reissmann A, Riemann J, Rogler G, Schmiegel W, Schreiber S, Schwander O, Selbmann HK, Stange EF, Utzig M, Wittekind C: Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 42, 979–1032 (2004)
58. Hoffmann JC, Preiß JC, Autschbach J, Buhr HJ, Huser W., Herrlinger K, Hçhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G, Schreiber S, Schreyer AG: S3-Leitlinie: Ergebnisse einer Evidenz-basierten Konsensuskonferenz der DGVS zusammen mit dem Kompetenznetz Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 46, 1094–1146 (2008)
59. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603 (2001)
60. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278, 5509-5512 (2003)
61. Jess T, Loftus EV Jr, Velayos FS, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Smyrk TC, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Munkholm P, Sandborn WJ: Incidence and prognosis of colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease: a population-based study from Olmsted County, Minnesota. *Inflamm Bowel Dis* 12, 669-76 (2006)
62. Kirk AB, Logan RF, Hawkey CJ: Randomised controlled trial of Azathioprine withdrawal in ulcerative colitis. *Brit Med J* 305:20-22 (1992)
63. Knebel U, Brambs HJ, Riemann JF: Klinische Diagnostik in Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und

- Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 42, 988-993 (2004)
64. Koslowski MJ, Kübler I, Chamailard M: Genetic variations of Wnt transcription factor TCF4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One* 4, e4496 (2009)
65. Krishnan A, Korzenik JR: Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am* 31, 21-39 (2002)
66. Kruis W, Schreiber S: Remissionserhaltung in Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 42: 988-993 (2004)
67. Kucharzik T: Recent understanding of IBD Pathogenesis: Implications for future therapies. *Inflammatory Bowel Diseases* 12, 1068-1083 (2006)
68. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V: Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology* 107, 3-11 (1994)
69. Lennard L, Rees CA, Lilleyman JS: Childhood leukemia: a relationship between intracellular 6-mercaptopurine metabolites and neutropenia. *Br J Clin Pharmacol* 16, 359-63 (1983)
70. Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon JA, Weinshilboum RM: Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336, 225-229 (1990)
71. Lennard L: The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *European J Clin Pharmacol* 43, 329-339 (1992)
72. Lennard L, Welch J, Lilleyman JS: Mercaptopurine in childhood leukaemia: the effects of dose escalation on thioguanine nucleotide metabolites. *Br J Clin Pharmacol* 42, 525-527 (1996)
73. Lennard-Jones JE: Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 24, 16-19 (1989)
74. Lennard-Jones JE, Shivananda S: Clinical uniformity of inflammatory bowel disease at presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9, 353-259 (1997)



75. Lesage S, Zouali H, Cezard JP: CARD15/NOD2 matationel analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 70, 845-857 (2002)
76. Libioulle C, Thys J, Farnir F: Functionel variants of OCTN cation transporter gene are associated with perianal Crohn's disease. *Gastroenterology* 129, 256-260 (2005)
77. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ: Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 51, 141-142 (2002)
78. Matricon J, Barnich N, Ardid D: Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010 1, 299-309 (2010)
79. Mendoza JL, Murillo LS, Fernández L, Peña AS, Lana R, Urcelay E, Cruz-Santamaría DM, de la Concha EG, Díaz-Rubio M, García-Paredes J: Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 38, 1235-1240 (2003)
80. Naber AH, de Jong DJ: Assessment of disease activity in inflammatory bowel disease; relevance for clinical trials. *Neth J Med* 61, 105-110 (2003)
81. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Werts C, Boneca IG, Jéhanno M, Van Der Meer JW, Mengin-Lecreulx D, Sansonetti PJ, Philpott DJ, Dharancy S, Girardin SE: The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to Nod2- but also Nod1-activating peptidoglycan agonists. *J Biol Chem* 280, 35859-35867 (2005)
82. O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D: Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 163, 6718-24 (1999)
83. Orchard TR, Thayagaraja S, Welsh KI: Clinical phenotype is related to HLA genotype in the peripheral arthropathies of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118, 274-278 (2000)
84. Orchard TR, Chua CN, Ahmad T, Cheng H, Welsh KI, Jewell DP: Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: Clinical features and the role of HLA genes. *Gastroenterology* 123, 714-718 (2002)
85. Orholm M, Munkholm P, Langholz E: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 324, 84-88 (1991)

86. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO: Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 35, 1075-1081 (2000)
87. Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acata Physiol Scand Suppl* 548, 89-99 (1986)
88. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR: Azathioprin for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2), CD000067 (2000)
89. Pearson DC, May GR, Fick, Sutherland LR: Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. A metaanalysis. *Ann Intern Med* 123, 132-142 (1995)
90. Peltekova V, Wintle R, Rubin L: Functional variants of OCTN cation transporters genes are associated with Crohn's disease. *Nat Genet* 36, 471-475 (2004)
91. Podolsky DK: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429 (2002)
92. Price AB, Morson BC: Inflammatory bowel disease: the surgical pathology of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Pathol* 6, 7-9 (1975)
93. Rachmilewitz D: Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* 289,82-86 (1989)
94. Raj PA, Dentino AR: Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol Lett* 206, 9-18 (2002)
95. Reinshagen M, Schütz E, Armstrong V: 6-thioguanine nucleotide adapted azathiopine therapy does not lead to higher remission rates than standard therapy in chronic active crohn's disease: results from a randomized controlled, open trial. *Clinical Chemistry* 53: 1306-1314 (2007)
96. Reißmann A, Bischoff SC, Fleig W: Akuter Schub in DGVS Leitlinien: Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa: Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen zusammen mit dem Kompetenznetz chronisch entzündliche Darmerkrankungen. *Z Gastroenterol* 42: 988-993 (2004)
97. Reuther LO, Sonne J, Larsen NE: Pharmacological monitoring of azathioprine therapy. *Scandinavian J Gastroenterol* 38: 972-7 (2003)

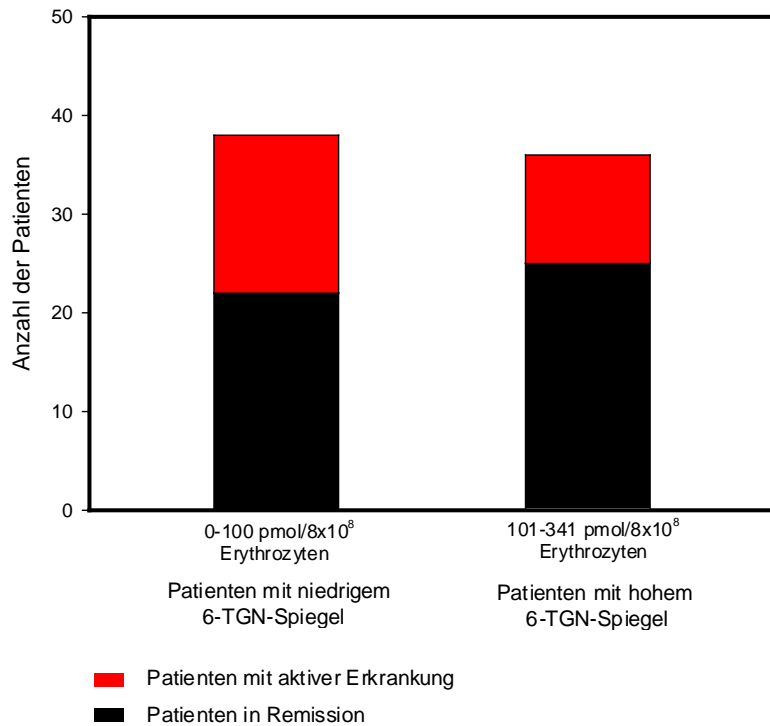
98. Roblin X, Serre-Debeauvais F, Phelip JM: 6-Thioguanine monitoring in patients with inflammatory bowel diseases receiving azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 21, 829-839 (2005)
99. Sandborn WJ. Azathioprine: State of the art in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 225: 92-99 (1998)
100. Sandborn WJ, Tremaine WJ, Wolf D: Lack of effect of intravenous administration on time to respond to azathioprine for steroid-treated Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 117, 527–535 (1999)
101. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D: Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD000545 (2000)
102. Satsangi J, Rosenberg W, Jewell DP: The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 6, 413-416 (1994)
103. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M: Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* 347, 1212-1217 (1996)
104. Schwartz RS, Stack J, Dameshek W: Effect of 6-mercaptopurine on antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med* 99, 164-167 (1958)
105. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R: Incidence of inflammatory bowel disease across Europe. Is there a difference between north and south? *Gut* 39, 690-97 (1996)
106. Soetikno RM, Lin OS, Heidenreich PA: Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 56: 48–54 (2002)
107. Stange EF. Krankheitsbild. In: Stange EF: *Colitis ulcerosa – Morbus Crohn*. 1.Auflage, 34-48, UNI-MED, Bremen (1999 a)
108. Stange EF. Extraintestinale Symptome und deren Therapie. In: Stange EF: *Colitis ulcerosa – Morbus Crohn*. 1.Auflage, 72-90, UNI-MED, Bremen (1999 b)
109. Strober W, Fuss I, Mannon P: The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 117, 514-521 (2007)
110. Tay BS, Lilley RM, Murray AW, Atkinson MR: Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem Pharmacol* 18, 936–938 (1969)

111. Thiede I, Fritz G, Strand S: CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 111, 1133-1145 (2003)
112. Timmer A: Environmental influences on inflammatory bowel disease manifestation. Lessons from epidemiology. *Dig Dis* 21, 91-104 (2003)
113. Torok HP, Glas J, Tonechi L: Polymorphismus in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 54, 1421-1427 (2005)
114. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B: Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29, 990-996 (1988)
115. Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, Sugawara S, Takada H: Muramyldipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramylpeptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2 and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell. Microbiol* 7, 53–61 (2005)
116. Van Os EC, Zins BJ, Sandborn WJ; Mays DC, Tremaine WJ, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Lipsky JJ: Azathioprine pharmacokinetics after intravenous, oral, delayed release oral and rectal foam administration. *Gut* 39, 63-68 (1996)
117. Veloso FT, Carvalho J, Magro F: Immune-related systemic manifestations of inflammatory bowel disease. A prospective study of 792 patients. *J Clin Gastroenterol* 23, 29-34 (1996)
118. Vermeire S, Rutgeerts P: Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes and Immunity* 8, 637-645 (2005)
119. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schroeder JM, Stange EF: Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 9, 215-223 (2003)
120. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF: NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658-1664 (2004)

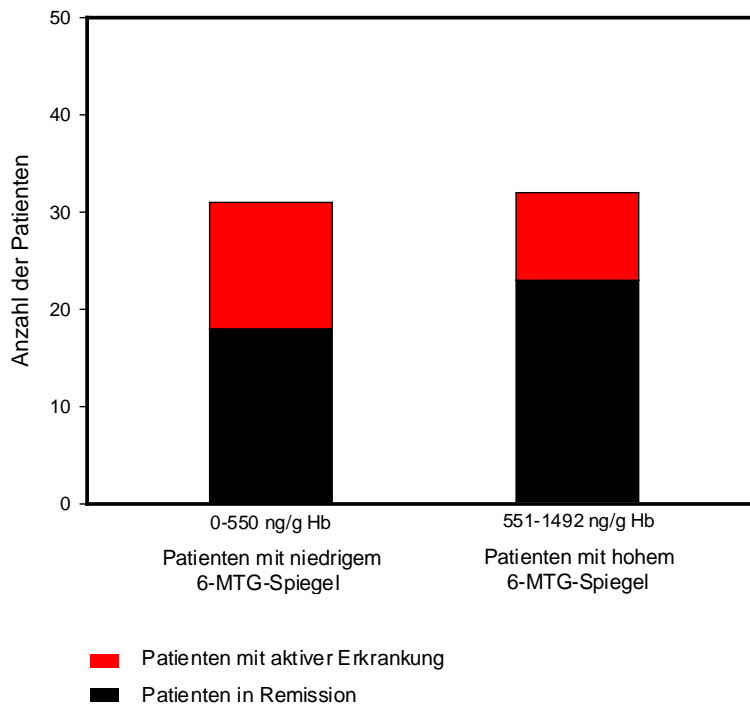
121. Wehkamp J, Schmid M, Fellermann K, Stange EF: Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 77, 460-465 (2005)
122. Wehkamp J, Wang G, Kübler I, Nuding S, Gregorieff A,: The Paneth Cell  $\alpha$ -Defensin Deficiency of Ileal Crohn's disease is Linked to Wnt/Tcfr-4. *J Immunol* 179, 3109-3118 (2007)
123. Weinshilboum RM, Sladek SL: Mercaptopurine Pharmacogenetics: monogetic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Gen* 32, 651-662 (1980)
124. Yoshida EM: The Crohn's disease activity index, its derivatives and the inflammatory bowel questionnaire: a review of instruments to assess Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 13, 65-73 (1999)

## 7. Anhang

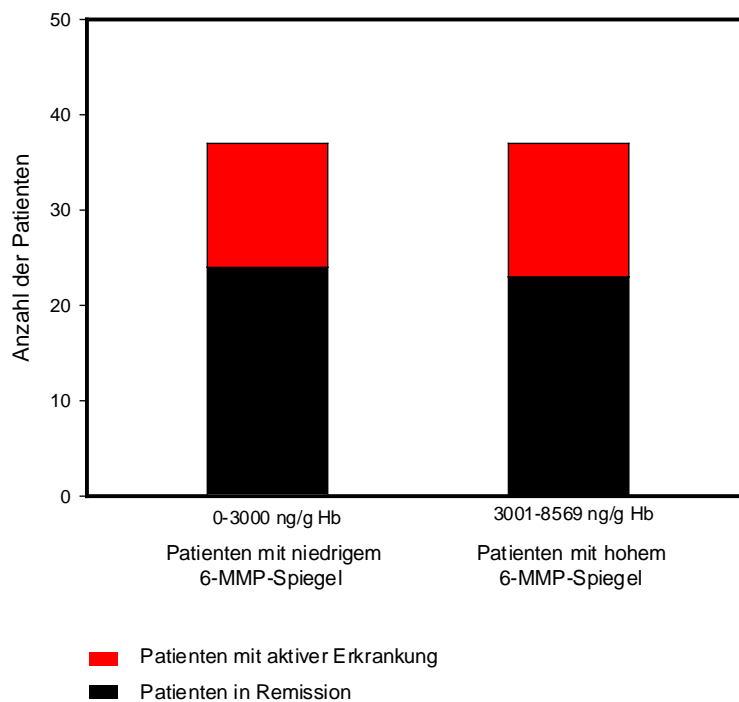
### 7.1. Abbildungen



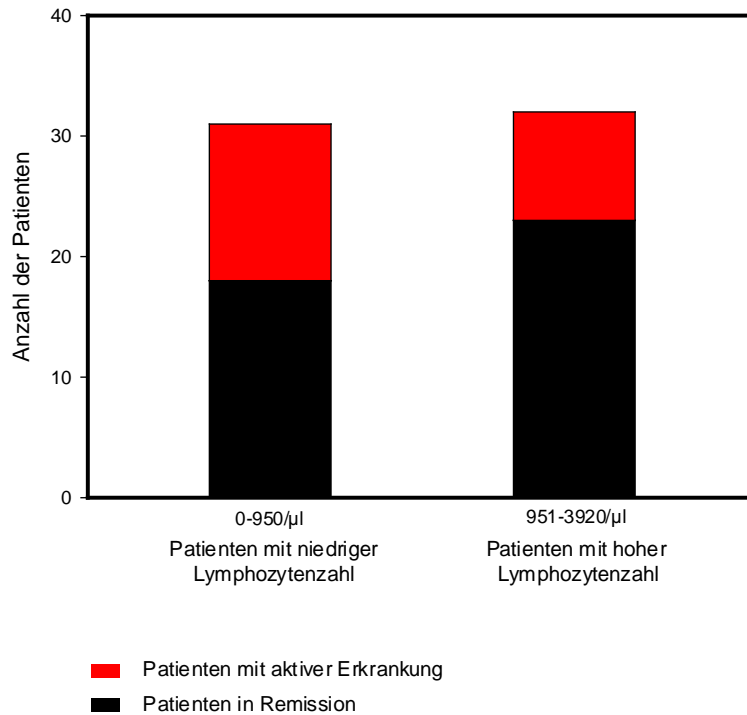
**Abbildung 2:** Verteilung von Patienten mit aktiver Erkrankung und in Remission ober- und unterhalb eines 6-TGN-Wertes von 100 pmol/8x10<sup>8</sup> Erythrozyten. Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant.



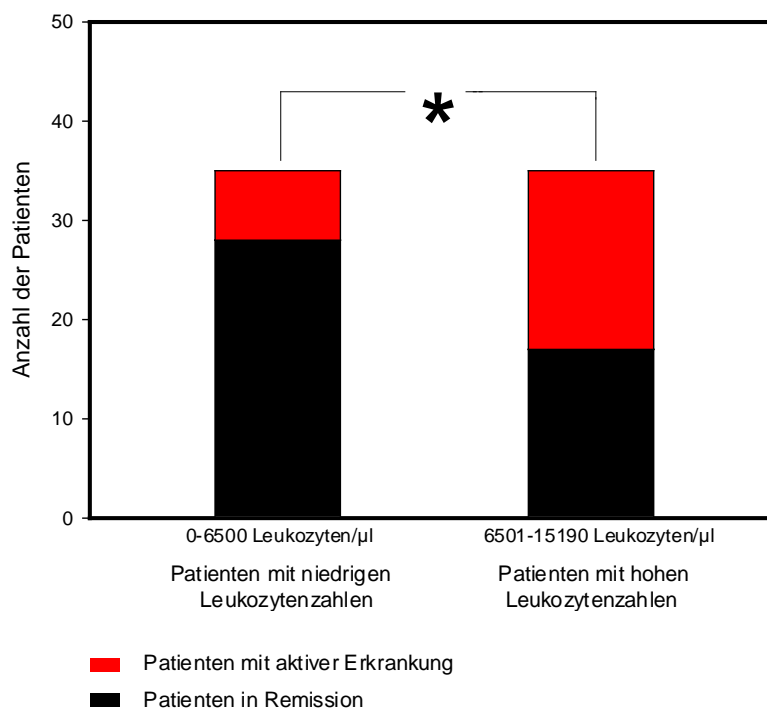
**Abbildung 3:** Verteilung von Patienten mit aktiver Erkrankung und in Remission ober- und unterhalb eines 6-MTG-Wertes von 550 ng/g Hb. Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen unterschied sich tendenziell, aber nicht signifikant.



**Abbildung 4:** Verteilung von Patienten mit aktiver Erkrankung und in Remission ober- und unterhalb eines 6-MMP-Spiegels von 3000 ng/g Hb. Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant.

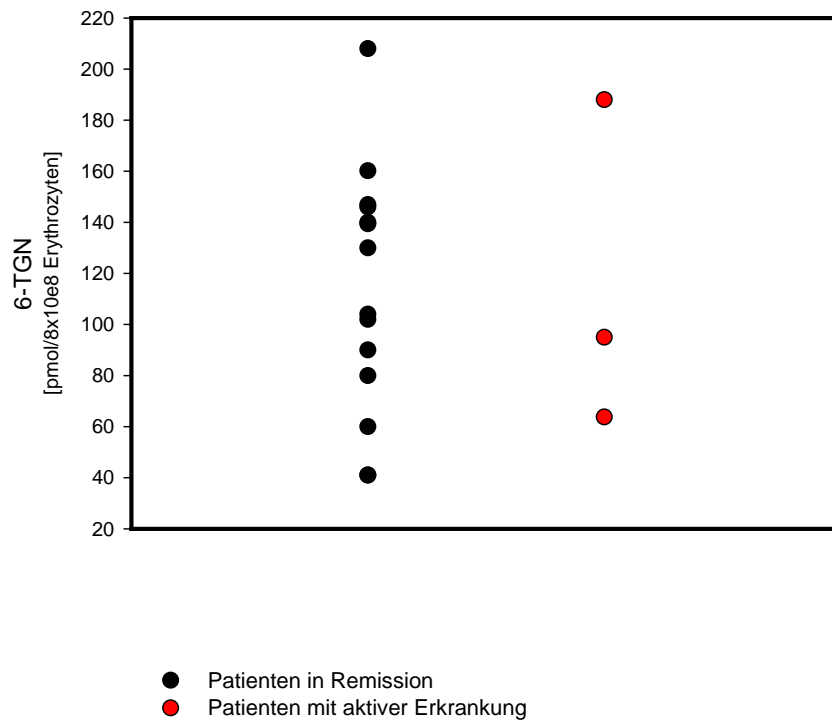


**Abbildung 5:** Verteilung von Patienten mit aktiver Erkrankung und in Remission ober- und unterhalb einer Lymphozytenzahl von 950/μl. Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen unterschied sich nicht signifikant.

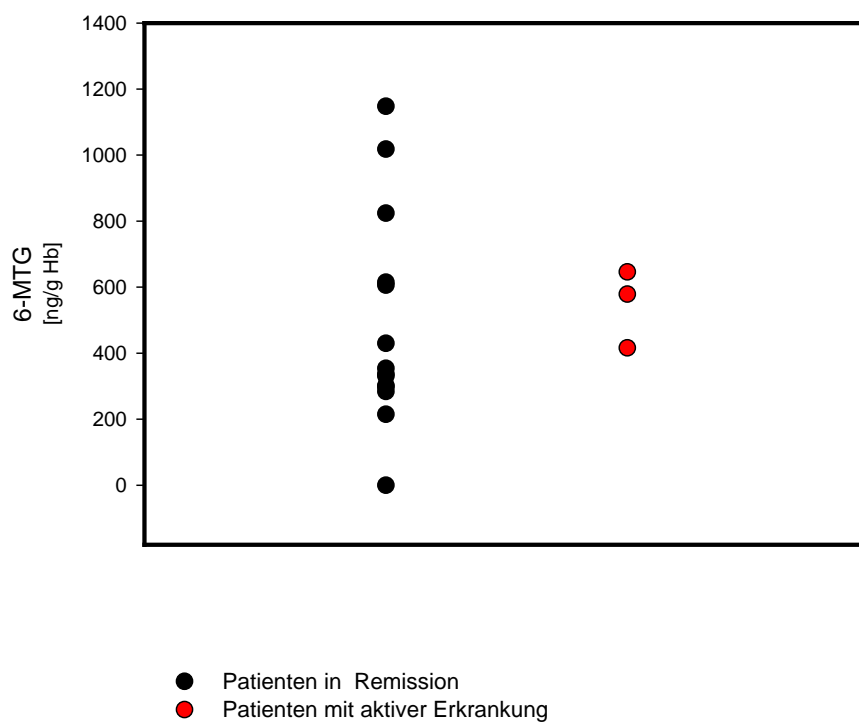


**Abbildung 6:** Verteilung von Patienten mit aktiver Erkrankung und in Remission ober- und unterhalb einer Leukozytenzahl von 6500/μl. Die Verteilung zwischen den beiden Gruppen unterschied sich signifikant ( $p < 0,01$ ).

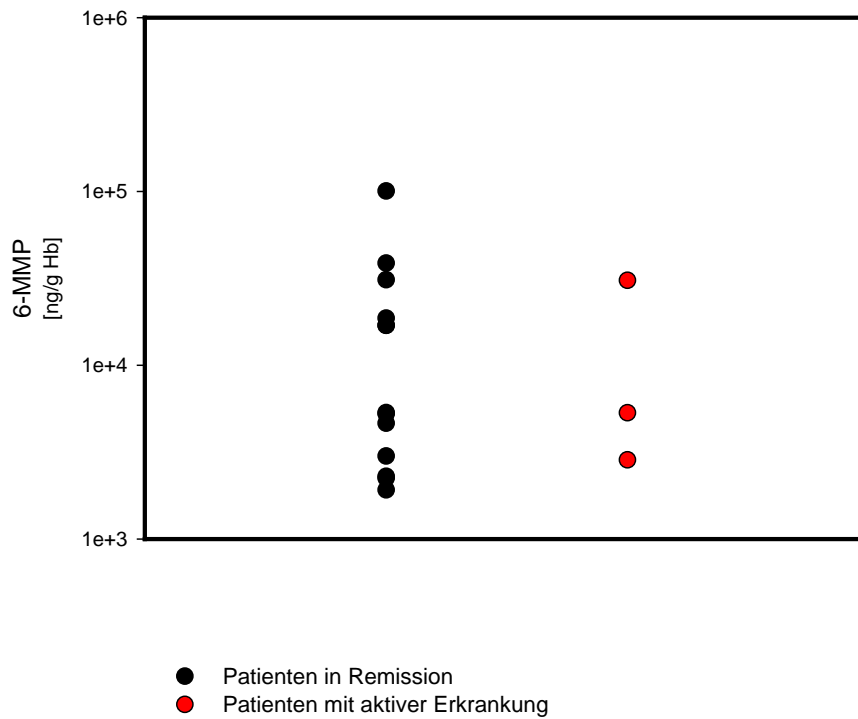




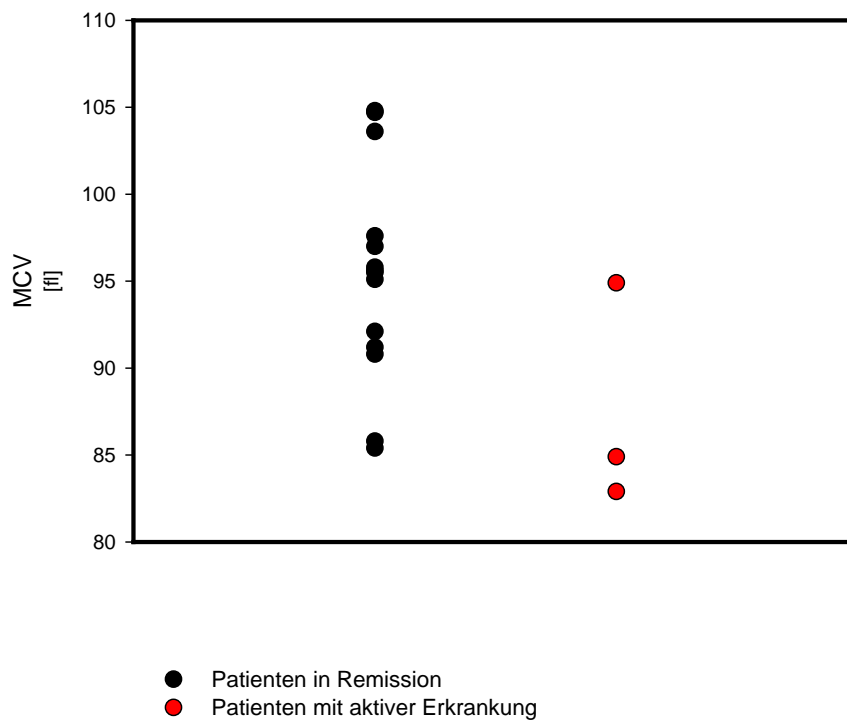
**Abbildung 7:** Verteilung des 6-TGN-Spiegels bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission und mit aktiver Erkrankung.



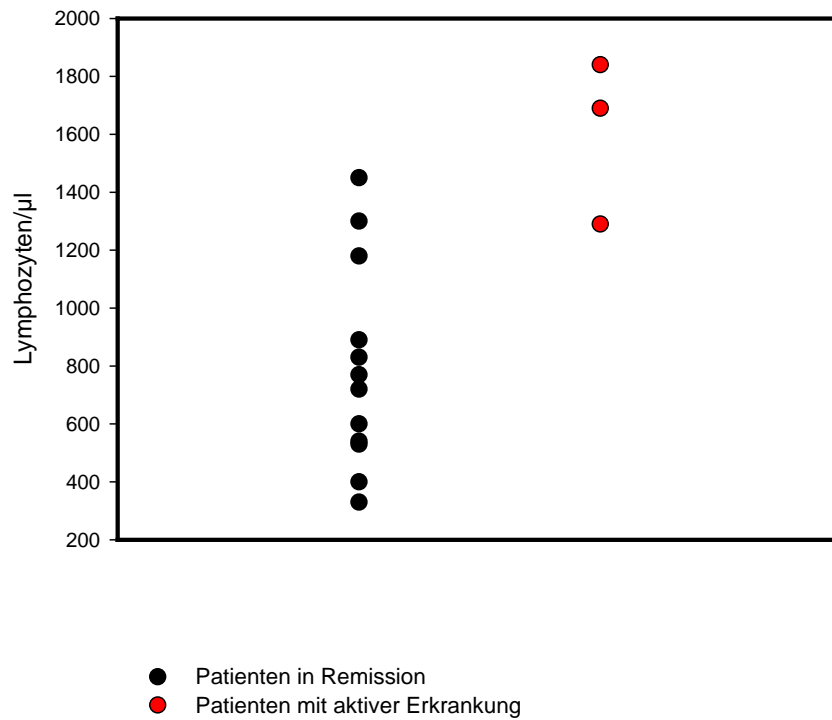
**Abbildung 8:** Verteilung des 6-MTG-Spiegels bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission und mit aktiver Erkrankung.



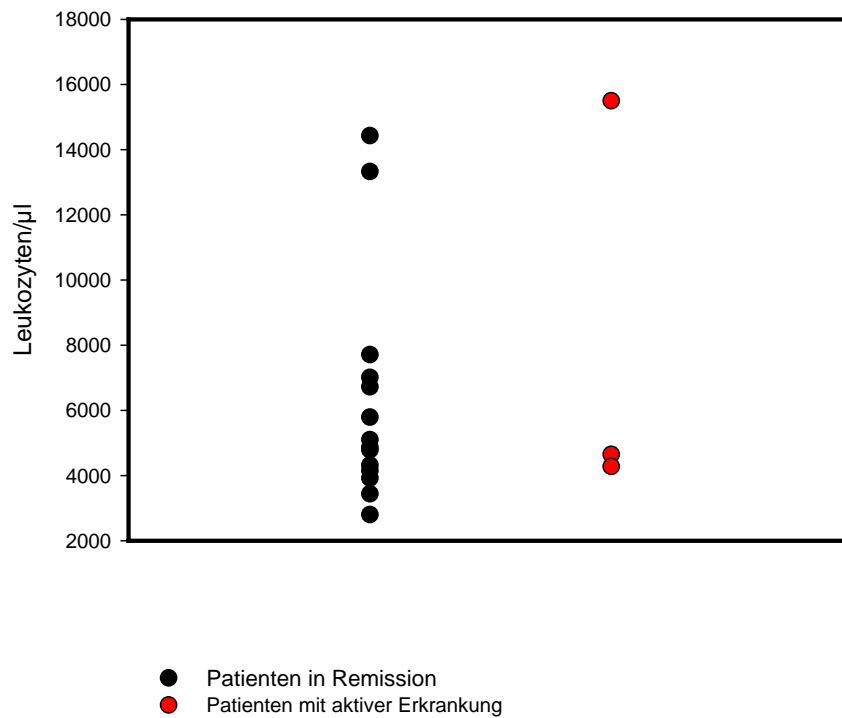
**Abbildung 9:** Verteilung des 6-MMP-Spiegels bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission und mit aktiver Erkrankung.



**Abbildung 10:** Verteilung des MCV bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission und mit aktiver Erkrankung.



**Abbildung 11:** Verteilung der Lymphozytenzahl bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission und mit aktiver Erkrankung.



**Abbildung 12:** Verteilung der Leukozytenzahl bei Patienten mit Colitis ulcerosa in Remission und mit aktiver Erkrankung

**7.2. Auswertungsbogen M. Crohn**

Datum: \_\_\_\_\_ Name: \_\_\_\_\_ Geburtsdatum: \_\_\_\_\_

Größe: \_\_\_\_\_ Gewicht: \_\_\_\_\_ ED: \_\_\_\_\_

Lokalisation: terminales Ileum  C. descendens   
 C. ascendens  Rektum/ Sigma   
 C. transversum  And. Lokalisation

Extraintestinale Manifestation:

Operationen:

Weitere Erkrankungen (ED):

Medikamente: Immunsuppression : Antibiotika :  
 Steroide : Klysmen :  
 Mesalazin/5-ASA :

Blutbild: Leukozyten : MCV :  
 Thrombozyten: MCH :  
 Erythrozyten : CRP :  
 Lymphozyten : Temp. :

Mesenterial-Duplex: PIAMS: PIAMI :  
 RIAMS: RIAMI:

Azathioprin: seit \_\_\_\_\_  
 Dosis in mg : 6-TG (ng/g Hb) :  
 6-MMP (ng/g Hb) : 6-TG (Pmol/8\*10e8 Erys) :  
 6-MTG (ng/g Hb) : TPMT (U/g Hb) :

| Kriterium                              | Punktwert | Multiplikator | Produkt |
|--|-----------|---------------|---------|
| 1. Anzahl weicher/<br>flüssiger Stühle |           | <b>x 2</b>    |         |
| 2. Bauchschmerzen                      |           | <b>x 5</b>    |         |
| 3. Wohlbefinden                        |           | <b>x 7</b>    |         |
| 4. EIM                                 |           | <b>x 20</b>   |         |
| 5. Einnahme von<br>Antidiarrhoika      |           | <b>x 30</b>   |         |
| 6. Tastbarer<br>Konglomerattumor       |           | <b>x 10</b>   |         |
| 7. (1 – K/S) x 100                     |           | <b>x 6</b>    |         |
| 8. Hämatokrit                          |           | <b>x 6</b>    |         |
|  |           | <b>CDAI</b>   |         |

- |                                |                                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1. Summe der letzten 7 Tage    | 5. 0= nein, 1= ja                 |
| 2. 0= keine, 3= schwere        | 6. 0=nein, 2= fraglich, 5= sicher |
| 3. 0= gut, 4= unerträglich     | 8. m: 47 - x, w: 42 - x           |
| 4. je 1 Punkt                  |                                   |
| - Arthritis/Arthralgien        | - Analfissur, -fistel, -abzeß     |
| - Erythema nodosum/ Stomatitis | - sonstige Fistel                 |
| - Iritis/ Uveitis              | - Temperatur > 37,8°C             |

### 7.3. Auswertungsbogen Colitis ulcerosa

Datum: Name: Geburtsdatum:  
 Größe: Gewicht: ED:  
 Lokalisation: terminales Ileum  C. descendens   
 C. ascendens  Rektum/ Sigma   
 C. transversum  And. Lokalisation

Extraintestinale Manifestation:

Operationen:

Weitere Erkrankungen (ED):

Medikamente: Immunsuppression : Antibiotika :  
 Steroide : Klysmen :  
 Mesalazin/5-ASA :

Blutbild: Leukozyten : MCV :  
 Thrombozyten: MCH :  
 Erythrozyten : CRP :  
 Lymphozyten : Temp. :

Mesenterial-Duplex: PIAMS: PIAMI :  
 RIAMS: RIAMI:

Azathioprin: seit  
 Dosis in mg : 6-TG (ng/g Hb) :  
 6-MMP (ng/g Hb) : 6-TG (Pmol/8\*10e8 Erys) :  
 6-MTG (ng/g Hb) : TPMT (U/g Hb) :

| Kriterium                                  |  | Punktwert |  |
|--|--|-----------|--|
| Anzahl d. Stühle letzte Woche              |  |           | Summe<18=0, 18-35=1, 36-60=2, >60=3                      |
| Blut im Stuhl (wöchentl. Durchschnitt)     |  |           | 0= keines, 2=wenig, 4=viel                               |
| Allgemeinbefinden (wöchentl. Durchschnitt) |  |           | 0= gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3= sehr schlecht   |
| Bauchschmerzen (wöchentl. Durchschnitt)    |  |           | 0= keine, 1= leichte, 2=mäßige, 3=starke                 |
| Temperatur/Fieber                          |  |           | 37-38°C=0, >38°C=1                                       |
| EIM  |  |           | Iritis/ Uveitis =3, Erythema nodosum=3, Arthritis=3      |
| Laborbefunde                               |  |           | BSG>50mm (1.Std.)=1, BSG>100mm (1.Std.)=2, Hb<100 g/l =4 |
| <b>CAI=</b>                                |  |           |  |

#### 7.4. Tabellen

**Tabelle 7:** Korrelation zwischen den 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln und dem CDAI bei Patienten mit M. Crohn.

|                                    | r     | n  | Signifikanzniveau |
|------------------------------------|-------|----|-------------------|
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery] |       |    |                   |
| CDAI                               | 0,04  | 74 | p=0,72            |
| 6-MMP [ng/g Hb]                    |       |    |                   |
| CDAI                               | -0,06 | 74 | p=0,60            |
| 6-MTG [ng/g Hb]                    |       |    |                   |
| CDAI                               | -0,09 | 74 | p=0,45            |

**Tabelle 8:** Korrelation zwischen Leukozyten- bzw. Lymphozytenzahl und dem CDAI bei Patienten mit M. Crohn.

|                      | r     | n  | Signifikanzniveau |
|----------------------|-------|----|-------------------|
| Leukozyten/ $\mu$ l  |       |    |                   |
| CDAI                 | 0,21  | 74 | p=0,08            |
| Lymphozyten/ $\mu$ l |       |    |                   |
| CDAI                 | -0,26 | 63 | p=0,04            |

**Tabelle 9:** 6-TGN: Vergleich der Remissionsraten ober- und unterhalb eines cut-off-Werts von 100 pmol/8x10<sup>8</sup> Erythrozyten unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests bei Patienten mit M. Crohn.

|                                    | CDAI <150 (n) | CDAI >150 (n) |
|------------------------------------|---------------|---------------|
| 0-100 pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery   | 22            | 16            |
| 101-341 pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery | 25            | 11            |

p=0,30

**Tabelle 10:** 6-MTG: Vergleich der Remissionsraten ober- und unterhalb eines cut-off-Werts von 550 ng/g Hb Verwendung des Chi-Quadrat-Tests bei Patienten mit M. Crohn.

|                  | CDAI <150 (n) | CDAI >150 (n) |
|------------------|---------------|---------------|
| 0-550 ng/g Hb    | 19            | 17            |
| 551-1492 ng/g Hb | 28            | 10            |

p=0,06

**Tabelle 11:** Leukozytenkonzentration: Vergleich der Remissionsraten ober und unterhalb eines cut-off-Werts von 6500/ $\mu$ l unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests bei Patienten mit M. Crohn. In der Gruppe mit der niedrigeren Leukozytenzahl war der Anteil der Patienten in Remission (CDAI <150) signifikant höher.

|                     | CDAI <150 (n) | CDAI >150 (n) |
|---------------------|---------------|---------------|
| 0-6500/ $\mu$ l     | 28            | 7             |
| 6501-15190/ $\mu$ l | 17            | 18            |

p <0,01

**Tabelle 12:** Korrelation zwischen den 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln und dem CAI bei Patienten bei Patienten mit Colitis ulcerosa.

|                                    | r     | n  | Signifikanzniveau |
|------------------------------------|-------|----|-------------------|
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery] |       |    |                   |
| CAI                                | 0,17  | 17 | p=0,52            |
| 6-MMP [ng/g Hb]                    |       |    |                   |
| CAI                                | -0,14 | 17 | p=0,60            |
| 6-MTG [ng/g Hb]                    |       |    |                   |
| CAI                                | 0,26  | 17 | p= 0,32           |

**Tabelle 13:** Korrelation zwischen Leukozyten- bzw. Lymphozytenzahl und dem CAI bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Zwischen der Lymphozytenzahl und dem CAI bestand ein signifikanter linearer Zusammenhang.

|                      | r    | n  | Signifikanzniveau |
|----------------------|------|----|-------------------|
| Leukozyten/ $\mu$ l  |      |    |                   |
| CAI                  | 0,16 | 17 | p=0,52            |
| Lymphozyten/ $\mu$ l |      |    |                   |
| CDAI                 | 0,70 | 15 | p=0,01            |



**Tabelle 14:** Vergleich der Mediane verschiedener Variablen zwischen Gruppe A (CAI <5 ) und Gruppe B (CAI >5) bei Patienten mit Colitis ulcerosa

| Variable                                 | Gruppe | $\tilde{x} \pm \text{SEM}$ |
|--|--------|----------------------------|
| Leukozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]        | A      | 4890 $\pm$ 934             |
|  | B      | 4645 $\pm$ 2745            |
| Lymphozyten [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]       | A      | 745 $\pm$ 103              |
|  | B      | 1490 $\pm$ 151             |
| MCV [fl]                                 | A      | 95,3 $\pm$ 14,6            |
|  | B      | 88,0 $\pm$ 2,8             |
| 6-MMP [ng/g Hb]                          | A      | 5292 $\pm$ 7117            |
|  | B      | 4088 $\pm$ 7097            |
| 6-MTG [ng/g Hb]                          | A      | 346 $\pm$ 86               |
|  | B      | 498 $\pm$ 123              |
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery]       | A      | 117 $\pm$ 12,9             |
|  | B      | 79 $\pm$ 32                |
| Azathioprin-Dosis [kg KG <sup>-1</sup> ] | A      | 2,1 $\pm$ 0,1              |
|  | B      | 2,0 $\pm$ 1,2              |

**Tabelle 15:** Alle Patienten: Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und den 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln. Zwischen 6-MTG-Spiegel und der Leukozytenzahl besteht ein signifikant negativ linearer Zusammenhang.

|                                    | r     | n  | Signifikanzniveau |
|------------------------------------|-------|----|-------------------|
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery] |       |    |                   |
| Leukozyten/ $\mu\text{l}$          | -0,20 | 91 | p=0,06            |
| 6-MMP [ng/g Hb]                    |       |    |                   |
| Leukozyten/ $\mu\text{l}$          | -0,07 | 91 | p=0,53            |
| 6-MTG [ng/g Hb]                    |       |    |                   |
| Leukozyten/ $\mu\text{l}$          | -0,26 | 91 | p=0,02            |

**Tabelle 16:** Alle Patienten: Korrelation zwischen der Lymphozytenzahl und den 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln.

|   | r     | n  | Signifikanzniveau |
|---|-------|----|-------------------|
| 6-TGN [(pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery]<br>Lymphozyten/μl | -0,10 | 78 | p=0,40            |
| 6-MMP [ng/g Hb]<br>Lymphozyten/μl                     | 0,17  | 78 | p=0,13            |
| 6-MTG [ng/g Hb]<br>Lymphozyten/μl                     | -0,20 | 78 | p=0,08            |

**Tabelle 17:** Alle Patienten: Korrelation zwischen dem MCV und den 6-Mercaptopurin-Metabolitenspiegeln. Zwischen 6-MMP-Spiegel sowie dem 6-TGN-Spiegel und dem MCV besteht ein signifikant linearer Zusammenhang.

|  | r    | n  | Signifikanzniveau |
|--|------|----|-------------------|
| 6-TGN [pmol/8x10 <sup>8</sup> Ery]<br>MCV [fl] | 0,28 | 91 | p=0,01            |
| 6-MMP [ng/g Hb]<br>MCV [fl]                    | 0,26 | 91 | p=0,01            |
| 6-MTG [ng/g Hb]<br>MCV [fl]                    | 0,20 | 91 | p=0,07            |

### 7.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zur Entstehung und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. med. Gunther Weitz, der mir die Durchführung der vorliegenden Dissertation ermöglichte. Insbesondere möchte ich seinen großen Einsatz, seine Geduld und seine hilfreichen Anregungen während des Abschlusses dieser Arbeit erwähnen. Professor Dr. med. Diether Ludwig danke ich für die Überlassung des Themas. Außerdem danke ich Herrn Dr. med. Klaus Schmidt sowie Herrn Professor Dr. med. Klaus Fellermann für Ihre Unterstützung.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeitern des Archives der Medizinischen Klinik I, insbesondere Frau Büniger und Frau Clausen, für das unermüdliche Suchen der benötigten Krankenakten und ihre Gesellschaft während der vielen Stunden der Auswertung danken.

Ohne die Unterstützung und Liebe meiner Eltern wären mein Studium und die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen. Ich möchte ihnen dafür danken, dass sie immer an meine Ziele geglaubt haben und mich nie an meinen Möglichkeiten zweifeln ließen. Ebenso danke ich meinen Schwiegereltern, die mir in vielerlei Hinsicht Vorbilder sind, für Ihre Unterstützung. Insbesondere mein Schwiegervater, Herr Dr. med. Eckhardt Krieger, hat durch seine fortwährende Motivation dazu beigetragen, dass diese Arbeit fertig geworden ist. Meiner Freundin Julika danke ich dafür, dass sie mir mit ihren eigenen „Leidensgeschichten“ zum Thema Dissertation immer wieder Mut gemacht hat und mir beim Layout zur Seite stand.

Zum Abschluss möchte ich meinem Mann, Dr. med. Henrik Krieger, danken, der nun schon seit 10 Jahren mein Leben bereichert und es hoffentlich noch viele Jahre tun wird. Durch ihn und unseren Sohn Jannis werde ich täglich daran erinnert, was wirklich wichtig im Leben ist.

## 7.6. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Anna-Saskia Krieger, geb. Boye  
geboren am: 10.05.1982 in Lüneburg  
Familienstand: verheiratet, 1 Sohn

### Schulbildung:

1988-1992 Grundschule Amelinghausen  
1992-1994 Orientierungsstufe Embsen  
1994-2001 Gymnasium Oedeme, Lüneburg

### Studium:

2001-2007 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck

8/2003 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

8/2006-7/2007 Praktisches Jahr

1. Tertial: Klinik für Chirurgie und Klinik für  
Kinderchirurgie des UKSH Campus  
Lübeck

2. Tertial: Medizinische Klinik I des UKSH Campus  
Lübeck

3. Tertial: Praxis für Allgemeinmedizin, Bernd  
Purschke

10/2007 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Beruf:

seit 2/2008 Assistenzärztin für Innere Medizin, Medizinische Klinik I  
des UK-SH Campus Lübeck