

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Reiner Benecke

**Untersuchungen
zur Antikörperbildung bei der
Zervikalen Dystonie und zur Effektivität der
Therapie mit einem komplexproteinfreien
Botulinumtoxin A**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von
Ulrike Müller-Rink,
geb. am 18.10.1981 in Rodewisch
aus Rostock

Rostock, 12. August 2011

Verteidigungsdatum: 27. Juni 2012

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Reiner Benecke, Universität Rostock, Klinik für Neurologie und Poliklinik

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Reinhard Dengler, Medizinische Hochschule Hannover, Klinik für Neurologie

3. Gutachter: Prof. Dr. med. Oliver Hakenberg, Universität Rostock, Urologische Klinik und Poliklinik

1. Einleitung.....	7
1.1 Die Zervikale Dystonie	8
1.2 Therapieoptionen der zervikalen Dystonie	10
1.3 Behandlung der zervikalen Dystonie mit BoNT	12
1.4 Struktur und Wirkmechanismus der BoNT	12
1.5 Präparate für die Therapie der zervikalen Dystonie	15
1.6 Dosierung beim Wechsel der Präparate	16
1.7 Xeomin in der Behandlung der zervikalen Dystonie.....	17
1.8 Therapieversagen.....	18
1.8.1 Einteilung und Ursachen.....	18
1.8.2 Antikörperinduziertes Therapieversagen	19
1.8.3 Tests zum Nachweis relevanter Antikörpertiter	21
1.8.4 Bedeutung der Antikörpertiter für die weitere Therapie.....	22
1.8.5 Therapieansätze bei Antikörperinduziertem sekundären Therapieversagen	23
1.9 Fragestellung.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Patienten.....	26
2.1.1 Diagnosen und Therapiemodus	26
2.1.2 Patientencharakteristika und Behandlungsparameter	27
2.1.3 TSUI-Score und Response.....	28
2.2 Materialien und Geräte für den MDT	30
2.2.1 Reagenzien	30
2.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.2.3 Geräte.....	31
2.2.4 Software.....	32
2.3 Der MDT	32
2.3.1 Versuchstiere.....	32
2.3.2 Prinzip des MDT.....	33
2.3.3 Versuchsvorbereitung	33
2.3.4 Diaphragma-Präparation.....	34
2.3.5 Messung der Paralysezeit	35
2.3.6 Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven	39

2.3.7 Erstellen der Ak-Titer- Kalibrierungskurven.....	39
2.3.8 Messung der Patientenproben.....	40
2.4 Statistik.....	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Gliederung der Ergebnisdarstellung.....	43
3.2 Botulinumtoxin A4.....	43
3.2.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve für BoNT A4	43
3.2.2 Bestimmung der Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A4	44
3.3 Botulinumtoxin A5.....	46
3.3.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve für BoNT A5	46
3.3.2 Bestimmung der Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A5	47
3.4 Schweregrad der Erkrankung und Therapie-Response	49
3.4.1 Schweregrad bei vorbehandelten Patienten in den unterschiedlichen Diagnose-Untergruppen.....	49
3.4.2 Schweregrad der Erkrankung in unterschiedlichen Diagnose- Untergruppen bei de novo Xeomin® -behandelten Patienten.....	50
3.4.3 Schweregrad der Erkrankung bei vorbehandelten Patienten mit unterschiedlicher Therapieresponse	51
3.4.4 Therapieresponse in unterschiedlichen Diagnose-Untergruppen	52
3.4.5 Therapieresponse bei vorbehandelten und de novo Xeomin® - behandelten Patienten.....	53
3.5 Ak-positive Patienten	54
3.5.1 Titerverlauf	54
3.5.2 Therapieversager.....	55
3.6 Vergleich vorbehandelter Ak-positiver und -negativer Patienten	56
3.6.1 Schweregrad der Erkrankung.....	56
3.6.2 Therapieresponse.....	57
3.6.3 Alter bei Therapiebeginn.....	58
3.6.4 Behandlungszeitraum	59
3.6.5 Anzahl der Behandlungen	60
3.6.6 Mittleres Behandlungsintervall.....	61
3.6.7 Mittlere BoNT-Einzeldosis	62
3.6.8 Kumulative BoNT-Dosis	63
4. Diskussion	64

4.1	Methodendiskussion	64
4.2	Ergebnisdiskussion	65
4.2.1	Schweregrad und Therapieresponse.....	65
4.2.2	Titerverlauf Ak-positiver Patienten während der einjährigen Therapie mit Xeomin	68
4.2.3	Zusammenhang zwischen Ak-positiven Patienten und sekundärem Therapieversagen.....	69
4.2.4	Schweregrad und Therapieresponse bei Ak+ und Ak-	69
4.2.5	Diskussion der Risikofaktoren für die Entwicklung eines AKTV	70
4.3	Ausblick.....	72
5.	Zusammenfassung	74
6.	Thesen	76
	Literaturverzeichnis	78
	Anhang.....	83

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Ak	Antikörper
AKTV	Antikörperinduziertes Therapieversagen
BoNT	Botulinumneurotoxin
BoNT-A	Botulinumneurotoxin Typ A
BoNT-B	Botulinumneurotoxin Typ B
BoNT-Ak	Botulinumneurotoxin-Antikörper
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BZ	Beobachtungszeitraum
DYT	Dystonie-Gen
EBSS	Earle´s Balanced Salt Solution
EMG	Elektromyographie
MDT	Maus-Diaphragma-Test
MU	Äquivalenz-Mauseinheit
MW	Mittelwert
nAk	neutralisierende Antikörper
PBS	Phosphate-buffered Saline
SD	Standardabweichung
SNAP-25	Synaptosome-associated protein-25
sTV	sekundäres Therapieversagen
$t_{1/2}$	Halbmaximale Paralysezeit
TB	Therapiebeginn
TENS	transkutane elektrische Nervenstimulation
THS	Tiefe Hirnstimulation
TV	Therapieversagen
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membran-Protein

1. Einleitung

Im Zuge des demografischen Wandels kommt in der Medizin, insbesondere in der Neurologie, Bewegungsstörungen eine wachsende Rolle zu. Unter ihnen zeichnen sich Dystonien durch einige Besonderheiten aus. Charakteristisch ist die unwillkürliche Kontraktion von Muskeln, die zu abnormen Haltungen und Bewegungsmustern des gesamten Körpers oder einzelner Körperteile führt. Obwohl die zahlreichen Dystonieformen schon vor vielen Jahrzehnten detailliert beschrieben wurden, existiert bislang keine Klarheit über ihre genauen pathophysiologischen Ursachen (Jankovic 2006). Die Dystonie ist für die meisten Patienten eine seelisch wie körperlich außerordentlich belastende, meist lebenslange, chronische Krankheit, für die es bislang keine kausale Therapie gibt. Eine symptomatische Behandlung mit Botulinumneurotoxinen (BoNT) besitzt unter allen verfügbaren Therapiestrategien das größte Potential, die Situation des Patienten dauerhaft zu verbessern (Velickovic et al. 2001; Schwarz et al. 2009). Auch für zahlreiche weitere Indikationen gewinnt die BoNT-Therapie zunehmend an Bedeutung. Die Ergebnisse sind so überzeugend, dass sie sich für die meisten ihrer Indikationen als Goldstandard durchgesetzt hat.

Gleichzeitig gibt es aber eine Vielzahl von Faktoren, die ihre Effektivität einschränken können. Insbesondere die Bildung neutralisierender Antikörper (nAk) ist hier zu nennen (Dressler 2002). Sie bedeutete für die Patienten bislang häufig die Beendigung der BoNT-Therapie. Es ist daher wichtig, Mechanismen, die zu einem Ak-induzierten Therapieversagen (AKTV) führen, zu verstehen und in ihrer Bedeutung einzuordnen, um künftig eine verbesserte Therapie für betroffene Patienten zu erreichen. Dazu gehören Versuche, ein bestehendes AKTV zu durchbrechen. Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung dieser Aspekte der BoNT-Therapie bei Dystonieklienten beitragen. Sie untersucht den Therapieerfolg und das Ak-Verhalten bei Einsatz des hoch aufgereinigten komplexproteinfreien BoNT vom Serotyp A Xeomin[®], welches aufgrund seiner verminderten Immunogenität eine Ak-Bildung sehr selten oder gar nicht auslösen sollte. Dabei soll auch geklärt werden, ob bei betroffenen Patienten mit dem neuen Präparat eine therapeutische Wirkung erreicht werden kann

1.1 Die Zervikale Dystonie

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der Dystonien (Benecke 1999)

nach Ätiologie

1. idiopathisch-primär	sporadisch hereditär
2. idiopathisch-sekundär	im Rahmen verschiedener hereditärer degenerativer Erkrankungen, teilweise auch als fakultatives Symptom
3. sekundär-symptomatisch	vaskulär, metabolisch, medikamentös, enzephalitisch, tumorinduziert

nach Alter

1. infantile Form	0-12 Jahre
2. juvenile Form	13-20 Jahre
3. adulte Form	>20 Jahre

nach topischer Verteilung

1. fokal	auf einen Körperabschnitt begrenzt (z.B. Blepharospasmus, Zervikale Dystonie, Schreibkrampf)
2. segmental	auf zwei benachbarte Körperabschnitte begrenzt (z.B. zervikale Dystonie in Kombination mit Schreibkrampf)
3. multifokal	mindestens zwei oder mehrere nicht benachbarte Körperabschnitte sind betroffen (z.B. Beindystonie mit zervikaler Dystonie)
4. Hemidystonie	kontralaterales Betroffensein von Arm und Bein, ggf. auch Rumpfbeteiligung
5. generalisierte Dystonie	Betroffensein mehrerer Körperabschnitte beidseitig, meist mit schwerpunktmäßigem Betroffensein eines Körperabschnittes

Zervikale Dystonien treten unter den fokalen Dystonien mit einer Inzidenz zwischen 5,7 bis 8,9/100.000 Menschen am häufigsten auf. Obwohl sie in jedem Alter manifest werden können, liegt der durchschnittliche Erkrankungsbeginn zwischen 40 und 50 Jahren. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (1,2:1). Die zervikale Dystonie ist charakterisiert durch unwillkürliche unkontrollierbare Kontraktionen der Kopf- und Nackenmuskulatur. In der Folge entsteht eine fixierte Zwangshaltung des Kopfes in einer bestimmten Position, wobei die führende Abweichung zur Klassifikation herangezogen wird. Man unterscheidet den am häufigsten vorkommenden rotatorischen Torticollis von den selteneren Formen des Laterocollis, Anterocollis und Retrocollis. Häufig liegen komplexe Mischformen vor, sodass eine exakte Trennung der verschiedenen Formen nicht immer möglich ist. Hier wird die Richtung der größten Abweichung zur Klassifikation herangezogen. In bis zu 60 Prozent der Fälle sind die Patienten zusätzlich von einem Kopftremor betroffen, mehr als 70 Prozent der Patienten geben Schmerzen im Bereich von Nacken und Schultern an, welche dann häufig das Beschwerdebild dominieren (Ferreira et al. 2007).

Ein optimaler Behandlungserfolg hängt von der exakten Identifizierung der betroffenen Muskeln ab. Zu diesem Zweck wird empfohlen, die bisherige Einteilung in 4 Dystonie-Grundformen zugunsten einer detaillierten Klassifikation in 10 Haltungs- und Bewegungsvarianten zu verlassen (Abbildung 1). Der Begriff der zervikalen Dystonie dient als Oberbegriff für die zervikalen Dystonien im engeren Sinne, wie auch für die kranialen Dystonien. Zur sicheren Abgrenzung können moderne bildgebende Verfahren, vorzugsweise die Magnetresonanztomografie, eingesetzt werden. Für die verschiedenen Formen ergeben sich jeweils unterschiedliche Behandlungsmuster (Reichel et al. 2009).

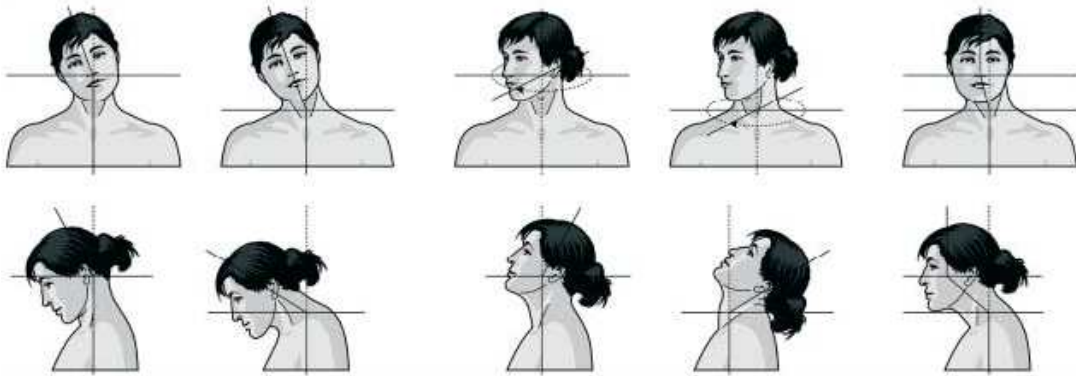


Abbildung 1 Schemata der zervikalen und kranialen Dystonien. Obere Reihe von links: Laterocaput, Laterocollis, Torticaput, Torticollis, seitlicher Shift. Untere Reihe von links: Anterocaput, Anterocollis, Retrocaput, Retrocollis, sagitaler Shift nach vorn. Abbildung aus (Reichel et al. 2009)

Obwohl die genaue Pathophysiologie der Dystonien bis heute nicht vollständig verstanden ist (Jankovic 2006), ergaben sich durch tierexperimentelle und klinische Studien in letzter Zeit einige theoretische Vorstellungen. Die Ursache der Dystonien wurde bislang hauptsächlich in einer Fehlfunktion der Basalganglien gesehen. Neuere Daten legen nahe, dass andere Strukturen, beispielsweise das Kleinhirn, in enger Interaktion zu den Basalganglien stehen und damit die Ausprägung einer Dystonie entscheidend mitbestimmen können (Neychev et al. 2008). Möglicherweise unterscheiden sich die pathophysiologischen Mechanismen zwischen den Subtypen der Dystonie (Shanker et al. 2009). Eine genetische Disposition war bereits seit langem vermutet worden. Für primäre Dystonien mit frühem Beginn wurden bereits mehrere krankheitsassoziierte Genlokationen gefunden (DYT1 bis DYT17) (Schwarz et al. 2009).

1.2 Therapieoptionen der zervikalen Dystonie

Alle verfügbaren Behandlungsmethoden für die zervikale Dystonie sind symptomatischer Natur und haben eine Korrektur der Fehlhaltung, die Linderung der damit verbundenen Symptome wie Schmerzen und Verspannungen sowie das Verhindern nachfolgender degenerativer Schäden am Bewegungsapparat zum Ziel. Daneben sind auch Faktoren wie Arbeitsfähigkeit, Verbesserung der Funktionen der betroffenen Körperregionen sowie das

Vermeiden gesellschaftlicher Stigmata, die sich erheblich auf die Lebensqualität des Patienten auswirken, ein wesentliches Anliegen der Therapie. Eine kausale Therapie existiert bis zum heutigen Tage nicht (Ferreira et al. 2007).

Eine Vielzahl verschiedener Medikamentengruppen wurde zur Behandlung der zervikalen Dystonie vorgeschlagen, darunter Anticholinergika, Dopamin-Rezeptor-Antagonisten, GABA-erge Medikamente, Benzodiazepine und Antiepileptika. Initial wird bislang häufig noch eine systemische Therapie eingesetzt, ebenso wie unterstützend im Krankheitsverlauf. Jedoch ist ihr Nutzen, insbesondere im Hinblick auf die systemischen unerwünschten Wirkungen, fraglich (Ferreira et al. 2007). Die Einführung der lokalen BoNT-Injektionstherapie hat die Behandlung der zervikalen Dystonie geradezu revolutioniert und systemische Therapien weitestgehend in den Hintergrund gedrängt (Adler et al. 2000). Leider sind nicht alle Patienten einer Therapie mit BoNT zugänglich. Als ultima ratio bleiben dann invasive chirurgische Verfahren. Die selektive periphere Denervierung stellt für ausgewählte Patienten mit sekundärem Therapieversagen (sTV) eine mögliche Option dar (Munchau et al. 2001). Die früher durchgeführten läsionellen Verfahren, wie Thalamotomie und Pallidotomie, kommen aufgrund der Häufigkeit neurologischer Komplikationen heutzutage nicht mehr zum Einsatz. Alternativ steht heute bei schweren, generalisierten therapieresistenten und segmentalen Formen der Dystonie das Verfahren der tiefen Hirnstimulation (THS), speziell des Globus pallidus internus, zur Verfügung (Adam et al. 2007). Seine Effektivität ist im Langzeitverlauf gezeigt worden (Kupsch et al. 2006; Vidailhet et al. 2007).

Neben den genannten Behandlungsmöglichkeiten werden Physiotherapie/manuelle Therapie, Iontophorese und Transkutane elektrische Nerven-Stimulation (TENS) zur Linderung der Beschwerden eingesetzt. Allerdings ist die Studienlage hier unbefriedigend, sodass die Effektivität dieser Maßnahmen in weiteren Studien abzuklären bleibt (Crownier 2007).

In Ergänzung zur symptomatischen Therapie ist es sinnvoll, Unterstützung durch Selbsthilfegruppen und Übungsprogramme anzubieten, um die dauerhafte körperliche und mentale Gesundheit der Patienten zu fördern (Adam et al. 2007).

1.3 Behandlung der zervikalen Dystonie mit BoNT

Seit Beginn der 70 er Jahre wird hoch verdünntes BoNT beim Menschen therapeutisch angewandt und hat sich – in den Händen erfahrener Kliniker und bei korrekter Indikationsstellung – als sichere und effektive Therapie der meisten fokalen und segmentalen Dystonien erwiesen (Adam et al. 2007; Dressler 2010).

Nebenwirkungen der BoNT-Therapie sind selten und ergeben sich aus der Diffusion des Toxins in das umliegende Gewebe (Messner et al. 2009). Sie sind im Allgemeinen lokal begrenzt und von vorübergehender Dauer. Hierzu zählen unter anderem Dysphagie, Mundtrockenheit, Dysphonie, Dyspnoe, Ptosis, Muskelschwäche und Nackenschmerzen. Exakt platzierte intramuskuläre Injektionen minimieren das Auftreten von Nebenwirkungen. Selten wurden systemische Nebenwirkungen beobachtet (Benecke et al. 2007).

Die Therapie mit BoNT wurde in zahlreichen klinischen Studien als effektiv und sicher eingestuft und hat sich weltweit als Goldstandard in der Behandlung der zervikalen Dystonie durchgesetzt (Simpson et al. 2008; Mohammadi et al. 2009).

Dennoch kann auch die BoNT-Therapie versagen. Gründe für ein sTV sind vielfältig, häufig aber auf die Bildung von nAk zurückzuführen. Da diese Problematik im Fokus der vorliegenden Arbeit steht, soll sie später noch etwas ausführlicher besprochen werden.

1.4 Struktur und Wirkmechanismus der Botulinumtoxine

Die für die Produktion des Giftes BoNT verantwortlichen Bakterien sind anaerob und gehören zur Gattung *Clostridium botulinum*. Es werden sieben verschiedene BoNT-Serotypen produziert (A, B, C, D, E, F, G), wobei es sich um Proteinkomplexe aus dem eigentlichen Neurotoxin, sowie aus Hämagglutininen und einem nichthämagglutinierenden nichttoxischen Protein handelt (Brin et al. 2004). Alle diese Proteine wirken als Antigene und sind dabei in der Lage, eine immunologische Reaktion und die Bildung von nAK auszulösen (Critchfield 2002).

Das Neurotoxin, zunächst als einkettiges Protein synthetisiert (inaktive Form), liegt in seiner aktiven Form als zweikettiges Protein mit einer leichten und einer schweren Kette vor, welche durch eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind.

Der molekulare Wirkmechanismus des BoNT besteht in einer Blockierung der cholinergen Signalübertragung durch Hemmung der Acetylcholin (ACh) -Ausschüttung, wobei er grob in drei Schritte unterteilt werden kann: 1. Bindung; 2. Internalisierung; 3. intrazelluläre toxische Wirkung. Der exakte molekulare Wirkmechanismus ist seit 1993 vollständig aufgeklärt (s. Abb. 2) (Brin et al. 2004). Nach oraler Aufnahme oder intramuskulärer Injektion bindet die schwere Kette des Toxins hochselektiv über spezifische Rezeptoren an die Plasmamembran cholinergischer Synapsen. Nach rezeptorvermittelter Endozytose und Konformationsänderung des Neurotoxins erfolgt die Einschleusung in das Zytosol, wo schwere und leichte Kette durch zelleigene Enzyme voneinander getrennt werden (Dong et al. 2006; Mahrhold et al. 2006). Während die schwere Kette in der Zelle abgebaut wird, diffundiert die leichte Kette zu ihrem Wirkungsort - der axonalen Membran - und zerstört hier Teile des für die ACh-Ausschüttung verantwortlichen Vesikel-Fusionskomplexes. Dieser besteht aus den Proteinen VAMP (Vesikel-assoziiertes Membran-Protein), SNAP-25 (Synaptosome-associated protein) und Syntaxin und die Inaktivierung nur eines der drei Proteine vermag die Verschmelzung der ACh-gefüllten Vesikel mit der Plasmamembran zu verhindern, wodurch eine Ausschüttung von ACh in den synaptischen Spalt verhindert wird. Man spricht dann von einer temporären chemischen Denervierung des Zielgewebes (Blasi et al. 1993)

Neben der pareisierenden Wirkung des Toxins auf die Muskulatur ist die Schweißsekretion und das vegetative autonome parasympathische System von der Wirkung betroffen (Adam et al. 2007; Jost et al. 2007).

Das beobachtete Nachlassen der Wirkung der BoNT nach 2-6 Monaten beruht auf einer Regeneration der Synapsenfunktion durch axonales Sprouting (kollaterale Aussprossung von Axonen) und später durch eine Wiederaufnahme der Funktion der ursprünglichen Synapse, die wiederum von einer Degeneration der axonalen Sprouts begleitet wird. In

1.5 Präparate für die Therapie der zervikalen Dystonie

Es befinden sich derzeit 3 Präparate des BoNT Typ A auf dem Markt, die in Deutschland als Dysport® von IPSEN Pharma, als Botox® von der Firma Allergan und als Xeomin® von der Firma Merz zur Behandlung der zervikalen Dystonie zugelassen sind (Dressler 2010). Mit Neurobloc® und dem äquivalenten Myobloc® der Firma Eisai GmbH steht seit 2001 ebenfalls ein zugelassenes Präparat vom Typ B zur Verfügung.

Alle Präparate sind für die intramuskuläre Injektion vorgesehen. Sie sind neben der Behandlung der zervikaler Dystonien für weitere Indikationen zugelassen (s. Tabelle 2) und werden im Rahmen des Off-Label-Use und in klinischen Studien zunehmend auch für Indikationen in anderen Fachrichtungen verwendet.

Für die vorliegende Arbeit ist das Präparat Xeomin® von besonderem Interesse, da es ausschließlich das Neurotoxin in seiner reinen Form beinhaltet und damit das Risiko für das Auftreten von nAk erheblich senken könnte.

Daten über die Anwendung von BoNT-B zeigten in Studien höhere Ak-Frequenzen und eine höhere Rate an Nebenwirkungen, so dass BoNT-B nicht als Therapie der ersten Wahl gilt (Dressler 2006; Adam et al. 2007). In Fällen von AKTV bei Behandlung mit BoNT-A-Präparaten kann ein Therapieversuch mit BoNT-B allerdings gerechtfertigt sein und initial erneut gute Wirkung zeigen. Dennoch stellt BoNT-B keine dauerhafte Therapiealternative für Patienten mit AKTV dar, weil auch gegen BoNT-B innerhalb kurzer Zeit gehäuft nAk auftreten. (Dressler et al. 2003; Dressler 2004; Ferreira et al. 2007).

Tabelle 2: Zugelassene Indikationen der aktuell verfügbaren BoNT-Präparate (Stand April/2010)
(Botox[®]-Fachinformation 2009; Dysport[®]-Fachinformation 2009; Xeomin[®]-Fachinformation 2009; Neurobloc[®]-Fachinformation 2010)

Präparat	Zugelassene Indikationen
Botox [®]	Blepharospasmus / Spasmus hemifacialis Zervikale Dystonie Infantile Cerebralparese Fokale Spastizität der oberen Extremität im Zusammenhang mit Schlaganfall Primäre Hyperhidrosis axillaris
Dysport [®]	Blepharospasmus / Spasmus hemifacialis, koexistente fokale Dystonien Zervikale Dystonie Fokale Spastizität der oberen Extremität im Zusammenhang mit Schlaganfall
MyoBloc [™] / NeuroBloc [®]	Zervikale Dystonie
Xeomin [®]	Blepharospasmus Zervikale Dystonie Fokale Spastizität der oberen Extremität im Zusammenhang mit Schlaganfall

1.5 Dosierung beim Wechsel der Präparate

Zahlreiche Studien hatten zum Ziel verlässliche Umrechnungsfaktoren für die Dosierung der einzelnen BoNT-Präparate anzugeben. Die Ergebnisse stimmten nicht gut genug überein, um verbindliche einheitliche Umrechnungsfaktoren festlegen zu können. Für Botox[®]:Dysport[®] werden in der Literatur Umrechnungsfaktoren zwischen 1:6 und weniger als 1:2 angegeben, wobei am häufigsten ein Verhältnis von Botox[®]: Dysport[®] von 1:3 angenommen wird (Ferreira et al. 2007; Wohlfarth et al. 2008; Hallett et al. 2009). Für Botox[®]:Myobloc[®]/Neurobloc[®] werden in der aktuellen Literatur Umrechnungswerte zwischen 1:40 und 1:66,6 angegeben (Comella et al. 2005; Pappert et al. 2008). Eine Studie

beschreibt den Umrechnungsfaktor zwischen Botox[®] und Xeomin[®] (Benecke et al. 2005). Hier wurde ein optimales Dosierungsverhältnis von 1:1 gefunden. Betrachtet man die erheblichen Unterschiede der einzelnen Präparate hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, des Herstellungsprozesses und der Galenik, so ist es ersichtlich, dass die Dosierung beim Wechsel des Präparates immer auf die individuellen Gegebenheiten des Patienten und die Besonderheiten der jeweiligen Therapie abgestimmt werden muss (Hallett et al. 2009). Gebräuchliche Dosisangaben beruhen auf dem Mausletalitätstest (s.u.) und ergeben für die auf dem Markt befindlichen Präparate folgende Umrechnungsfaktoren (Dressler 2006):

- Botox[®] 1:1
- Dysport[®] 1:3,
- Myobloc[®]/Neurobloc[®] 1:40,
- Xeomin[®] 1:1.

Um Dosisvergleiche zu ermöglichen, wurde hieraus eine Äquivalenz-Mauseinheit (MU) abgeleitet, die eine Korrektur der unterschiedlichen Zusammensetzung der BoNT-Komponenten und biologischen Aktivität der BoNT-Präparate impliziert. Sie wird deshalb auch in der vorliegenden Arbeit durchgehend verwendet.

1.6 Xeomin in der Behandlung der zervikalen Dystonie

Während die BoNT-A Präparate Dysport[®] und Botox[®] neben dem eigentlichen Toxin auch Komplexproteine enthalten, ist es mit der Herstellung des seit 2005 zugelassenen Xeomin[®] erstmalig gelungen, ein hoch aufgereinigtes Präparat ohne Begleitproteine zu produzieren. Bereits seit 1999 war die Proteinlast in Botox[®] von 25 auf 5ng/100U reduziert worden. In diesem Zusammenhang war bereits damals ein Rückgang der Häufigkeit von AKTV beobachtet worden (Jankovic et al. 2003).

Es existieren zahlreiche theoretische Überlegungen darüber, dass die Immunogenität von Xeomin[®] und das damit verbundene Risiko für den Patienten, ein AKTV zu entwickeln, niedriger sein könnte als unter einer Therapie mit den bisherigen Produkten Dysport[®] und Botox[®] (Benecke et al. 2005). Im Tiermodell wurde eine biologisch relevante

Immunogenität von Xeomin[®] nicht gefunden. Während einer bis zu zweijährigen Therapie konnte bislang keine Bildung von nAk beim Menschen beobachtet werden (Jost et al. 2007; Benecke 2009)

Eine Doppelblind-Studie aus dem Jahre 2005 hat die gute Effektivität und Sicherheit von Xeomin[®] im Vergleich zu Botox[®] eindrücklich belegen können (Benecke et al. 2005).

1.7 Therapieversagen

Bis zur Entwicklung des komplexproteinfreien Präparates Xeomin[®] war jede BoNT-Behandlung mit einer hohen Antigen-Last verbunden. Dennoch wurde die Bildung von nAk gegen BoNT zunächst nicht nachgewiesen (Gonnering 1988). Zu Beginn der 90er Jahre wurde jedoch der Zusammenhang zwischen sTV und der Bildung von nAk als häufige Ursache klar erkannt (Jankovic et al. 1995). Heutzutage ist unstrittig, dass therapeutisch angewandte Dosierungen von BoNT zur Bildung von nAk und zum AKTV führen können (Dressler 2003). Mit zunehmendem klinischen Einsatz der BoNT-Präparate für eine steigende Anzahl von Indikationen ist ein Verständnis der Bildungsmechanismen von nAk und ihr Nachweis im Serum von Patienten unabdingbar (Sesardic et al. 2004).

1.6.1 Einteilung und Ursachen

Das Krankheitsbild der zervikalen Dystonie weist eine erhebliche Variation im Ausprägungsgrad auf. Auch die Dokumentation des Behandlungserfolges kann mangels sensitiver objektiver Erfassungsmethoden nicht immer exakt und reproduzierbar erfolgen. Es verwundert daher nicht, dass sich eine weit gefasste Definition des TV durchgesetzt hat. Es wird darunter ein für den Patienten, für den Arzt oder für beide unbefriedigendes Resultat der BoNT-Behandlung verstanden. Ein sTV durch die Bildung von nAk ist dabei nur eine von vielen möglichen Ursachen und tritt bei der zervikalen Dystonie mit einer Häufigkeit von etwa 5-10% auf (Dressler 1997; Kessler et al. 1999).

Zur exakten Beschreibung und weiteren Therapieplanung ist es notwendig, eine Einteilung in Untergruppen vorzunehmen. Ein primäres TV liegt vor, wenn bereits zu Beginn der BoNT-Therapie ein dem Schweregrad und dem Ausprägungsgrad der Erkrankung angemessenes und übliches Therapieergebnis nicht erzielt wird. Ursachen hierfür liegen in fehlerhaft gestellten Diagnosen, suboptimaler Applikationstechnik, ungünstiger Auswahl der Zielmuskeln sowie im Wirkverlust der BoNT-Präparate durch falsche Lagerung. Beim sTV wird ein Verlust der zunächst zufriedenstellenden Wirkung beobachtet. Prinzipiell kommen auch hier die bereits für das primäre TV genannten Ursachen in Frage. Wahrscheinlicher sind jedoch Änderungen der Symptomatik im Sinne eines Auftretens von Komplikationen der Erkrankung, die einer BoNT-Therapie nicht mehr zugänglich sind (Arthrosen, Radikulopathien, Bandscheibenprozesse). Zusätzlich wirken sich äußere Einflüsse wie Stress, körperliche Anstrengung und Medikamentennebenwirkungen auf den Therapieerfolg aus. Auch wurde über erhebliche Schwankungen in der Einschätzung der Therapieergebnisse durch den Patienten berichtet. Häufig werden gerade die ersten Injektionsserien als außergewöhnlich wirkungsvoll eingeschätzt (honeymoon effect). Nachfolgend erleben jedoch zahlreiche Patienten im Laufe der Therapie eine Ermüdung und Ernüchterung. Neben diesen Faktoren liegt eine der Hauptursachen eines sTV in der Bildung von nAk (Dressler 2003). Es existieren weitere TV-Einteilungen, welche die Dauer (transient, permanent) und die Objektivierbarkeit (subjektiv, objektiv) einbeziehen. Von einem partiellen TV spricht man bei einem teilweisen Verlust der Wirkstärke oder einer verkürzten Wirkdauer, während es beim kompletten TV zu einem vollständigen Verlust der Wirkung kommt. Eine Einteilung in permanent und transient lässt Rückschlüsse auf die Ursache des TV zu (Dressler 2004).

1.6.2 Antikörperinduziertes Therapieversagen

Lange bevor der Nachweis von nAk gelang, war bereits über ihre mögliche Existenz spekuliert worden, handelt es sich doch bei der Applikation des Toxins um intramuskuläre

Injektionen in regelmäßigen Abständen, vergleichbar mit aktiven Immunisierungen (Gonnering 1988).

Bei der zervikalen Dystonie ist nach mehreren Studien mit weitgehend übereinstimmenden Ergebnissen von einer Rate des AKTV zwischen 2,5% und etwa 5% auszugehen (Zuber et al. 1993; Kessler et al. 1999; Dressler 2004).

Das AKTV wird durch Ak hervorgerufen, welche sich gegen funktionsrelevante Epitope des Toxins richten und zu einem partiellen oder kompletten Wirkverlust führen. Häufig geht dem kompletten TV eine Phase des partiellen Wirkverlustes voraus, gekennzeichnet durch eine Reduktion der Wirkstärke oder der Wirkdauer (Dressler 2002). Nach Ablauf einer Behandlungszeit von 1500 Tagen tritt ein AKTV ausgesprochen selten auf, während in den ersten vier Jahren nach Therapiebeginn (TB) ein erhöhtes Risiko, insbesondere im ersten und im dritten Jahr, gefunden wurde (Dressler 2002).

Um dem AKTV vorzubeugen, bestanden bereits frühzeitig Bestrebungen, Risikofaktoren für dessen Entstehung zu identifizieren. Dabei konnte auf Erkenntnisse aus der Immunologie und Erfahrungen mit aktiven Immunisierungen gegen BoNT zurückgegriffen werden (Dressler et al. 2000). Während theoretisch vermutete Unterschiede im Immunisierungsrisiko für die verschiedenen BoNT-A-Präparate nicht gefunden wurden, konnten für BoNT-B im Vergleich zu BoNT-A höhere Raten von AKTV nachgewiesen werden (Dressler 2006; Adam et al. 2007).

Die Höhe der Einzeldosis wurde als sicherer Risikofaktor erkannt, wobei erwartungsgemäß mit steigender Dosis das Risiko für eine Ak-Bildung steigt (Greene et al. 1994; Jankovic et al. 1995). Ebenso gilt die Länge der Interinjektionsintervalle als Risikofaktor. Kürzere Intervalle erhöhen das Risiko für AKTV (Zuber et al. 1993; Greene et al. 1994). Welche Rolle die applizierte kumulative Dosis spielt, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden. Es existiert eine Studie, welche die kumulative Dosis als Risikofaktor identifiziert (Jankovic et al. 1995) während diese Beobachtung in anderen Studien nicht bestätigt werden konnte (Dressler et al. 2000). Die Anzahl der Injektionsserien scheint keinen Einfluss auf die Bildung von nAk zu haben (Jankovic et al. 1995). Ebenso wenig das Geschlecht des Patienten und das Vorhandensein immunologischer Vorerkrankungen (Dressler et al. 2000). Über das Alter des Patienten zu TB als Risikofaktor besteht keine

Einigkeit. Berichtet wurde sowohl über einen signifikanten Zusammenhang (Jankovic et al. 1995; Kessler et al. 1999), als auch über eine fehlende Relevanz des Alters für die Entwicklung eines AKTV (Dressler et al. 2000). Diskutiert wird, dass biografische und genetische Dispositionen der Patienten zu einem erhöhten Risiko für AKTV führen (Critchfield 2002).

Solange die Rolle des begleitproteinfreien Präparates Xeomin[®] für die Entwicklung von nAk nicht eindeutig geklärt ist, kann eine sinnvolle Strategie zur Vermeidung von AKTV nur darin bestehen, Einzeldosen so niedrig und Interinjektionsintervalle so groß wie möglich zu halten (Ferreira et al. 2007).

1.6.3 Tests zum Nachweis relevanter Antikörpertiter

Für einen spezifischen und sensitiven Nachweis von nAk im Patientenserum sind verlässliche Tests unabdingbar.

Ak gegen BoNT können gegen zahlreiche verschiedene funktionsrelevante und irrelevante Epitope gerichtet sein, woraus sich die größte Schwierigkeit für die Entwicklung geeigneter Tests ergibt. Ein zuverlässiger Test sollte alle Aspekte einer Intoxikation simulieren (Bindung, Internalisierung, intrazelluläre toxische Wirkung) (Pellett et al. 2007). Bislang ist es nicht gelungen, Ak mit biologischer Aktivität (nAk) mit ausreichend hoher Sensitivität und Spezifität mit ELISA-Techniken nachzuweisen (Goschel et al. 1997). Gleiches gilt für den Nachweis mit Western-Blot-Techniken (Hanna et al. 1998).

Es existieren zahlreiche klinische Tests, deren Aussagekraft durch die fehlende Quantifizierung von Ak-Titern beschränkt bleibt. Hierzu gehören der Sternocleidomastoideus-Test (Dressler et al. 2000), der Extensor-Digitorum-Brevis-Test (Kessler et al. 1997) und der Musculus-frontalis-Test (Borodic et al. 1995). Alle diese Tests arbeiten mit Testinjektionen in einen Indikatormuskel und Auswertung von Muskelaktionspotentialen im Elektromyogramm (EMG). Der Ninhydrin-Schweiß-Test ist ein weiterer Test zum indirekten Nachweis von nAk, wobei nach intradermaler Injektion von BoNT die resultierende schweißfreie Fläche gemessen wird (Voller et al. 2004). Da kommerzielle Tests bislang nicht zur Verfügung stehen, ist die Anwendung dieser

indirekten Nachweismethoden gerechtfertigt für den klinischen Nachweis eines AKTV bei begründetem Verdacht (Pellett et al. 2007).

Dem Anspruch eines quantitativen, sensitiven und spezifischen Nachweises von nAk wird nach dem heutigen Stand des Wissens der Maus-Diaphragma-Test (MDT) am besten gerecht (Goschel et al. 1997). Trotz eines erheblichen zeitlichen und gerätetechnischen Aufwandes und nicht flächendeckender Verfügbarkeit ist der Test insbesondere für den Nachweis niedriger Ak-Titer den In-vivo-Tests (Mausletalitätstest, Mausprotektionstest) überlegen (Pearce et al. 1994; Dressler et al. 2000). Daher wurde der MDT für die vorliegende Studie verwendet.

Zahlreiche weitere Tests sind entwickelt worden, um Kosten und Zeit zu sparen als auch um Tieropfer zu vermeiden. Zudem erreicht kein alternativer Test die Sensitivität und Spezifität des MDT (Dressler et al. 2001; Maruta et al. 2006; Pellett et al. 2007)

1.6.4 Bedeutung der Antikörpertiter für die weitere Therapie

Die Ursache der zunehmenden Anzahl von sTV unter einer Behandlung mit BoNT war bislang hauptsächlich in der Entwicklung von nAk gesehen worden (Critchfield 2002). Obgleich die Entwicklung von Ak unstrittig zu sTV führen kann, ergaben aktuelle Studien, dass bei lediglich 44,5% aller Patienten mit sTV ein positiver Ak-Nachweis geführt werden kann (Lange et al. 2009). Es liegt daher nahe, dass weitere, noch unbekannte Faktoren einen Einfluss auf das Therapieergebnis haben können und so auch in Zukunft die Hauptaufgabe im Verständnis dieser Mechanismen bestehen wird.

Da bisher keine kommerziell verfügbaren für Screening-Untersuchungen geeigneten Tests zum Nachweis von nAk existieren, werden hauptsächlich die Seren von Patienten untersucht, die bereits einen Wirkverlust aufweisen. Auf der anderen Seite wurde in einer im Jahre 2008 durchgeführten Studie an unselektierten BoNT-behandelten Dystonie-Patienten mit guten Therapieergebnissen in über 40 % ein niedriger Ak-Titer gefunden (Kranz et al. 2008). Ob diese Befunde einen prognostischen Wert für die spätere Entwicklung eines kompletten AKTV besitzen, ist bislang nicht geklärt. Klare Empfehlungen für eine weitere Therapie Ak-positiver Patienten bestehen zurzeit nicht.

Unstrittig ist jedoch, dass sich mit der Entwicklung eines AKTV erhebliche Schwierigkeiten für die weitere Therapie ergeben, denn alternative BoNT-Serotypen wirken nur vorübergehend oder sind nicht verfügbar (Dressler et al. 2003).

1.6.5 Therapieansätze bei Antikörper-induziertem sekundären Therapieversagen

Das Auftreten von AKTV ist für die betroffenen Patienten ein einschneidendes schmerzliches Ereignis, beraubt es sie doch der besten zurzeit verfügbaren Therapieoption.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien mit dem Ziel getestet, Patienten mit AKTV eine erneute Wirkung von BoNT zu ermöglichen oder eine weitere ähnlich effektive Therapie zu etablieren. Die Behandlung mit alternativen BoNT-Typen bei AKTV gegen BoNT-A hatte sich als nicht erfolgreich herausgestellt (Houser et al. 1998; Dressler et al. 2003). Ebenso stellten sich Versuche, eine erneute Therapieresponse nach Titerrückgang durch BoNT-Karenz zu erreichen, als wenig Erfolg versprechend heraus. Zwar waren in einer Studie die Titer bei 8 von 13 untersuchten Patienten nach 500-2250 Tagen rückläufig, doch blieb ein dauerhaftes erneutes Ansprechen auf eine BoNT-Therapie aus. Zudem tritt der Titer-Abfall nur langsam ein und ist daher mit einer kontinuierlichen Therapie nicht vereinbar (Dressler 2002). Einzig die Behandlung mit BoNT der neuen Generation ohne immunisierende Begleitproteine könnte für manche dieser Patienten eine Chance darstellen (Dressler et al. 2002). Jedoch ist dies im Langzeitverlauf noch nicht gezeigt worden.

Versuche, einer Depletion von BoNT-Ak durch Plasmaaustausch und anschließender IgG-Immunoabsorption auf einer Protein-A-Säule zeigten zwar Erfolge durch eine erneute Therapieresponse und negativen Ak-Nachweis im Serum des untersuchten Patienten, allerdings handelt es sich um ein derart kompliziertes, invasives und kostenintensives Verfahren, dass ein routinemäßiger Einsatz nicht realistisch ist (Naumann et al. 1998). Weitere Studien befassten sich mit der Möglichkeit, einen erneuten Therapieerfolg durch massiv erhöhte Einzeldosen zu erreichen (Dressler et al. 2002). Ein

Ansprechen ist in einigen Fällen von partiellem TV beobachtet worden, jedoch konnte ein komplettes AKTV nicht aufgehoben werden.

Innovativ ist der Ansatz der THS. Für die Behandlung der generalisierten Dystonie bzw. der Rumpfdystonie liegt bereits eine leitliniengerechte Empfehlung vor, während dieses Verfahren für die Therapie der zervikalen Dystonie aktuell noch nicht allgemein empfohlen wird, da im vorliegenden Datenmaterial ein ausreichend hoher Evidenzgrad nicht nachgewiesen werden konnte (Schrader et al. 2009). Hier bietet sich jedoch ein vielversprechendes Instrument zur weiteren Therapie der zervikalen Dystonie bei Patienten mit AKTV an, wobei jedoch die Problematik des AKTV weiterhin bestehen bleibt.

Da letztlich kein zuverlässiges Verfahren zur Therapie eines AKTV etabliert werden konnte und noch unklar ist, welchen Erfolg eine Therapieumstellung auf Xeomin® bei Patienten mit nAk gegen BoNT haben wird, kann die einzige sinnvolle Strategie nach wie vor nur in der Vermeidung der Ak-Bildung liegen. Dafür ist die primäre Therapie mit Xeomin® viel versprechend. Es wurden weder im Tiermodell, noch in der bisherigen bis zu zweijährigen Beobachtungszeit relevante Immunreaktionen beschrieben, sodass zumindest von einer niedrigeren Rate einer Ak-Bildung gegen BoNT ausgegangen werden kann (Benecke et al. 2005)

1.7 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Auswirkungen einer Umstellung Dysport®- und Botox®-behandelter Patienten auf das neue komplexproteinfreie Präparat Xeomin® im einjährigen Verlauf zu beobachten. Dabei fand die Entwicklung des Ak-Titers bei Ak-positiv getesteten Patienten unter laufender Xeomin®-Behandlung besondere Beachtung, da gerade die Rolle niedriger Ak-Titer für den weiteren Therapieerfolg noch nicht hinreichend geklärt ist.

Zudem bestand besonderes Interesse daran, de novo Xeomin®-behandelte Patienten im einjährigen Verlauf auf eine relevante Ak-Entwicklung zu untersuchen, um erste fundierte

Aussagen über die Immunogenität dieses Präparates treffen zu können. Für die Bestimmung der Ak-Titer wurde der MDT verwendet.

Um bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung eines AKTV zu bewerten, wurden die Ak-positiven Patienten hinsichtlich ihrer demografischen und therapielevanten Merkmale mit den Ak-negativen Patienten verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Diagnosen und Therapiemodus

In der vorliegenden Studie wurden 58 Patienten (35 weiblich, 23 männlich) untersucht. Das Alter zu TB lag zwischen 20 und 78 Jahren (mittleres Alter: 48 Jahre). Alle Patienten litten an einer Form der zervikalen Dystonie und befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in der Sprechstunde für Bewegungsstörungen der Klinik für Neurologie (Direktor: Prof. Dr. Benecke) der Universität Rostock in Behandlung.

Die Diagnosen der Patienten verteilten sich wie folgt:

- 38 Torticollis,
- 8 Laterocollis,
- 12 komplexe Mischformen (dystoner Kopftremor, myoklonische Dystonien, Retrocollis).

Es wurden sowohl neu auf Xeomin[®] eingestellte (de novo) Patienten untersucht, als auch solche, die nach zum Teil jahrelanger Therapie mit einem anderen Präparat auf Xeomin[®] umgestellt worden waren. Eine erste Bestimmung des Ak-Status erfolgte vor der ersten Xeomin[®]-Injektion, um vorbestehende Ak zu detektieren. Die zweite Ak-Bestimmung erfolgte nach einjähriger Xeomin[®]-Behandlung. Bei 3 Patienten mit positivem Ak-Status nach Xeomin[®]-Behandlung war die Bestimmung präexistenter Ak aus organisatorischen Gründen nicht möglich, sodass hier die Frage nach dem Zeitpunkt des ersten Auftretens der Ak nicht beantwortet werden kann.

Insgesamt wurden 20 de novo-Xeomin[®]-Patienten und 38 mit anderen BoNT-Präparaten vorbehandelte Patienten untersucht. 33 der vorbehandelten Patienten erhielten vor Beginn der Xeomin[®]-Therapie nur Dysport[®], 1 Patient nur Botox[®] und 4 Patienten im Verlauf sowohl Botox[®] als auch Dysport[®] und Neurobloc[®].

Der Beobachtungszeitraum (BZ) aller Patienten lag zwischen 9 und 20 Monaten (mittlere Behandlungsdauer: 13,4 Monate).

Alle Patienten gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr Einverständnis zur Durchführung der Serum-Testung.

2.1.2 Patientencharakteristika und Behandlungsparameter

Von allen Patienten wurden jeweils vor Beginn der Xeomin[®]-Behandlung und am Ende des BZ folgende Daten erhoben:

- Patientendaten: Geschlecht, Alter bei TB, Diagnose, Behandlungsstrategie, Schweregrad nach Tsui, Response, Ak-Status
- Therapiebezogene Daten: Behandlungsdauer, Anzahl der Behandlungen, mittleres Injektionsintervall, mittlere Einzeldosis, kumulative Dosis.

Alle Daten wurden in einer Datenbank gespeichert und dienten als Grundlage für die statistische Auswertung. Die Patienten wurden nach verschiedenen Kriterien eingruppiert und auf mögliche Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Parameter untersucht. Nach folgenden Kriterien wurden die Gruppen gebildet:

- Diagnose (Torticollis, Laterocollis, Sonstige)
- Behandlungsstrategie (de novo, vorbehandelt, Therapie bei sTV)
- Ak-Status (positiv, negativ).

Es wurden die Auswirkungen einer einjährigen Therapie mit Xeomin[®] auf folgende Parameter analysiert:

- Schweregrad der Erkrankung,
- Response auf die BoNT-Behandlung,
- Ak-Status.

Zusätzlich wurden zwischen den Ak-positiven und Ak-negativen Patienten die folgenden Behandlungsparameter verglichen:

- Alter bei TB,
- Behandlungszeitraum
- Anzahl der Behandlungen,
- Mittleres Injektionsintervall,
- Mittlere Einzeldosis,
- Kumulative Dosis.

Der Schwerpunkt der Auswertung wurde auf den Vergleich der Parameterwerte vor Xeomin[®]-Therapie und nach einjähriger Behandlung mit Xeomin[®] gelegt.

2.1.3 TSUI-Score und Response

Um den Schweregrad der Erkrankung und seine Änderung unter der Therapie mit Xeomin[®] zu quantifizieren, wurde eine Beurteilung nach der Tsui-Skala (s. Tabelle 3) vorgenommen. Dabei finden die Amplituden der Abweichung der Kopfhaltung von der Normalposition, ihr zeitliche Profil, das Ausmaß der Schulterhebung und das Ausmaß eines begleitenden Tremors Berücksichtigung. Alle Parameter werden getrennt erhoben und zu einem Gesamtscore addiert. Schmerzen werden durch die Tsui-Skala nicht erfasst.

Tabelle 3: Skala nach Tsui (Erbguth 1996)

Wert A = Amplitude der Abweichung (maximal 9 Punkte)

Rotation, Neigung und Ante-bzw. Retroversion (jeweils $0^\circ = 0$ Punkte, $< 15^\circ = 1$ Punkt, $15^\circ-30^\circ = 2$ Punkte, $>30^\circ = 3$ Punkte);

Wert B = Dauer der Kopffehlposition (maximal 2 Punkte)

Intermittierend = 1 Punkt; ständig = 2 Punkte

Wert C = Schulterhebung (maximal 3 Punkte)

Keine = 0 Punkte; leicht und intermittierend = 1 Punkt, leicht und ständig oder schwer und intermittierend = 2 Punkte; schwer und ständig = 3 Punkte

Wert D = Tremor (maximal 4 Punkte)

Schwere x Dauer. Schwere: leicht = 1 Punkt; schwer = 2 Punkte; Dauer: gelegentlich = 1 Punkt; ständig = 2 Punkte

Der Gesamtwert ergibt sich aus $(A \times B) + C + D$. Die Maximalpunktzahl beträgt 25 Punkte.

Alle Patienten wurden vor Beginn und unter laufender Xeomin[®]-Therapie anhand der Skala nach Tsui beurteilt. Die Angaben wurden jeweils dem Krankenblatt entnommen.

Die Frage nach der Wirksamkeit der Therapie mit Xeomin[®], insbesondere im Vergleich mit anderen Präparaten (Dysport[®] /Botox[®]) erforderte neben den objektiven Kriterien der Skala nach Tsui auch eine subjektive Einschätzung der Response (Therapieerfolg) durch den Arzt und den Patienten.

Dazu wurde eine Bewertungsskala von 1-4 benutzt (1=sehr gut, 2=gut, 3=mäßig, 4=keins). Bei Diskrepanz zwischen der Arzt- und Patientenbewertung (zweimal) wurde die Arztbewertung als verbindlich angesehen.

Alle mit Dysport[®] /Botox[®] vorbehandelten Patienten gaben vor Beginn und unter laufender Xeomin[®]-Therapie ihre Einschätzung, sodass ein Vergleich des Respondings im gesamten Verlauf nach der Umstellung möglich wurde. Die de novo-Xeomin[®] Patienten gaben ebenfalls eine Einschätzung während des gesamten Behandlungsverlaufs.

Hier wurde wegen des kurzen BZ nur die Response am letzten Beobachtungstag für die Auswertung herangezogen.

Ein sicheres sTV liegt bei Response-Werten von 4 vor, ein partielles bei Werten von 3. Die Definition sTV setzt eine Wirkungsreduktion bei vorheriger guter Wirkung voraus und kann daher nur im Langzeitverlauf einer BoNT-Therapie beurteilt werden. Die Angaben wurden daher jeweils dem Krankenblatt entnommen.

2.2 Materialien und Geräte für den MDT

2.2.1 Reagenzien

- BoNT A4 (Ampulle zu 10 µg Toxin; 1. Lieferung der Charge #13027A1A List Biological Laboratories, Inc., Campbell, USA),
- BoNT A5 (Ampulle zu 10 µg Toxin; 2. Lieferung der Charge #13027A1A List Biological Laboratories, Inc., Campbell, USA),
- BoNT-A Ak (NIBSC – National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Herfordshire, U.K.; #59/021; 5ml Pferdeserum enthalten 500 IU Ak),
- Carbogengas (Messer Griesheim GmbH, Griesheim, 95% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid),
- EBSS (Earle's Balanced Salt Solution; Invitrogen, GIBCO, Paisley, U.K, #24010-043; physiologische Pufferlösung: CaCl₂, MgSO₄, KCl, NaHCO₃, NaCl, NaH₂PO₄·H₂O, Glucose, pH 7,4),
- PBS (Phosphate Buffered Saline: KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄ 7H₂O, KCl; Invitrogen, GIBCO),
- Rinderserum-Albumin (BSA, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, #8076.2)
- Sevofluran (SEVOrane[®] Abbott, Illinois, USA, #4456)

2.2.2 Verbrauchsmaterialien

- Becherglas mit Deckel, unsteril
- Bechergläser, unsteril
- Dialysemembran (12,0S: 12.000-14.000 MWCO, #E683.1 ZelluTrans, Roth)
- Einwegkanülen 0,80x40 mm (Sterican®, Braun, Melsungen)
- Serologische Pipetten (Techno Plast Products, 8219 Trasadingen, Schweiz, #94010)
- Einwegspritzen 10 ml (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, #BD309110)
- Einwegspritzen 10 ml (Braun Melsungen AG, Melsungen, # 4606728V)
- Eppendorf-Reaktionsröhrchen 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, # Z606340)
- Magnetrührstäbchen (Neolab, Heidelberg, # 6-1999)
- Nähgarn
- Nalgene Spritzflaschen zur Reinigung der Organbäder (Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA)
- Pasteurpipetten PE 3 ml (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Pipettenspitzen (epT.I.P.S., Eppendorf AG)
- Reaktionsröhrchen 0,2 ml (Flat Cap PCR Tubes, Molecular Bio Products, San Diego, USA)
- Serummonovetten®, 9 ml (S-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht)
- Zellkulturschalen 60x15 mm (TPP, Renner, Dannstadt)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Greiner, Bio-One, Frickenhausen)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (Greiner, Bio-One, Frickenhausen)

2.2.3 Geräte

- 4-Kanal PC-Stimulator zur Stimulation von isolierten Organen (FMI Föhr Medical Instruments GmbH, 64342 Seeheim/OB, max. 4x250 mA Konstantstrom-Stimulation, 3V, 1Hz, 1msec, #IBJ-CST-04)
- Externer 4-Kanal Brückenmessverstärker (FMI , #IBJ-AMP-04)

- Präparationspinzette fein, 11,5 cm (A. Dumont & Fils, Schweiz, #103)
- Präparationspinzette grob (Dimeda Instrumente, Tuttlingen, #42.833.10)
- Präparationsschere fein, 12cm (Dimeda Instrumente, #09.110.12)
- Präparationsschere gerade, grob (Dimeda Instrumente, #08.202.10)
- Druckminderer für Carbogengas (FM 62 T, Messer Griesheim GmbH)
- Präparierplatte Styropor[®]
- Isometrische Transducer (Messbereich +/-30g, #TIM-1020 FMI)
- Magnetrührgerät (Mini MR standard, #2677000, IKA Werke GmbH und Co. KG, 79219 Staufen)
- Organbad, doppelwandig, mit Oxygenierungsfritte (#ZUB-8120, FMI)
- Pipettierhilfe (pipetus[®] akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Umwälzthermostat für Organtemperierung (MGW, Typ K2, Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, #718003)

2.2.4 Software

- VitroDatWin, PC-kompatibles Messdaten Akquisitions-, Speicherungs- und Auswertungssystem für 4 Analogspannungs-Kanäle (#VTD-8500-WIN, FMI)
- IBJ-Bemon32/Amon32 (Ingenieurbüro Jäckel, 63454 Hanau)

2.3 Der MDT

2.3.1 Versuchstiere

Für die Durchführung der MDT wurden weibliche Mäuse (16-20 g) aus Inzuchtstämmen mit der Bezeichnung: Hsd:NMRI (Harlan-Winkelmann, Borcheln) verwendet. Jährlich erfolgte die Anzeige über die Organentnahme bei gesunden Tieren beim LAGuS (Landesamt für Gesundheit und Soziales) Rostock. Eine Genehmigungspflicht besteht nicht.

Die artgerechte Unterbringung der Tiere erfolgte in Standard-Käfigen in einem speziellen Versuchstierlabor mit 12 h Hell-Dunkel-Schaltung am Zentrum für Nervenheilkunde der Universität Rostock. Die Tiere erhielten Standardtrockenfutter (Harlan-Winkelmann) und Wasser ad libitum.

2.3.2 Prinzip des MDT

Das Prinzip des MDT beruht auf einer messbaren Inhibition der cholinergen Übertragung am Nerv-Muskel-Präparat durch BoNT. Das Präparat besteht aus einem Hemidiaphragma und dem zugehörigen N. phrenicus.

Als Messparameter dient die Zeit bis zur halbmaximalen Paralyse des Muskels. In Abhängigkeit von der Konzentration des BoNT und der Anwesenheit von Ak ergibt die Messung Paralysezeiten, die Grundlage von Dosis-Wirkungs-Kurven und Ak-Kalibrierungskurven sind. Daraus wurden Ak-Titer der untersuchten Patientenseren errechnet. In unserer Studie wurde der MDT zum selektiven Nachweis von nAk gegen BoNT-A eingesetzt.

2.3.3 Versuchsvorbereitung

Vor Beginn der Diaphragma-Präparation wurden 4 Organbäder mit jeweils 5 ml EBSS aufgefüllt, eine Carbogen-Belüftung angestellt und bei Bedarf mittels eines Nadelventils nachreguliert. Das in dem EBSS enthaltene Phenolrot ermöglicht eine kontinuierliche pH-Wert-Kontrolle. Der pH-Wert stellt sich durch das im Carbogen enthaltene CO₂ auf einen Wert um 7,2-7,4 ein. Zur Temperierung der Organbäder auf 37°C diente ein Umwälzthermostat.

2.3.4 Diaphragma-Präparation

Ziel der Präparation war das Isolieren von zwei Zwerchfellhälften (Hemidiaphragma) mit zugehörigem Nervus phrenicus, die im MDT zum Einsatz kommen sollten. Zur Narkose wurde die Maus in ein Becherglas gesetzt, in dem sich mit Sevofluran getränktes saugfähiges Papier befand. Das Becherglas wurde mit einem Deckel verschlossen bis eine hinreichende Narkosetiefe erreicht war. Daraufhin wurden die Carotiden durchtrennt und das Tier entblutet und dekapitiert. Anschließend wurde das Tier auf einem mit Zellstoff abgedeckten Styropor[®]-Präparationsplatz etwas überstreckt gelagert und mit Einmalkanülen an Vorder- und Hinterläufen fixiert. Nach einem medianen Schnitt vom Hals bis zur Symphyse wurde die Haut stumpf gelöst und mit 2 Einwegkanülen nach links und rechts auf der Unterlage fixiert. Nun erfolgte von kranial her die Eröffnung des Brustkorbes und die Entfernung des Sternums sowie sämtlicher Rippen bis auf den unteren Rippenbogen. Der Entnahme des linken Lungenflügels folgte das vorsichtige Freilegen des Nervus phrenicus mit anschließendem Fixieren an einem $\geq 1,5$ cm langen Faden. Beim Absetzen des Nervs muss auf eine Mindestlänge von 1 cm geachtet werden. Um ein Austrocknen zu verhindern wurde der Nerv mit dem bereits entfernten Lungenflügel abgedeckt. Analog wurde auf der rechten Seite vorgegangen, wobei hier wiederum auf schonende Präparation und die Mindestlänge des Nervs zu achten war.

Danach folgte die Eröffnung des Bauchraumes mit Präparation des Diaphragmas von kaudal. Alle angrenzenden Organe und die das Diaphragma durchziehenden Strukturen wurden scharf abgetrennt, so dass sich das Diaphragma aufspannte (Abbildung 4 A). Eine Teilung des Präparates von ventral nach dorsal ergab dann zwei Hemidiaphragmen mit einem halben Centrum tendineum und einem Nervus phrenicus. Beide Präparate wurden zur weiteren Verwendung in eine mit EBSS gefüllte Zellkulturschale überführt (Abbildung 4 B).

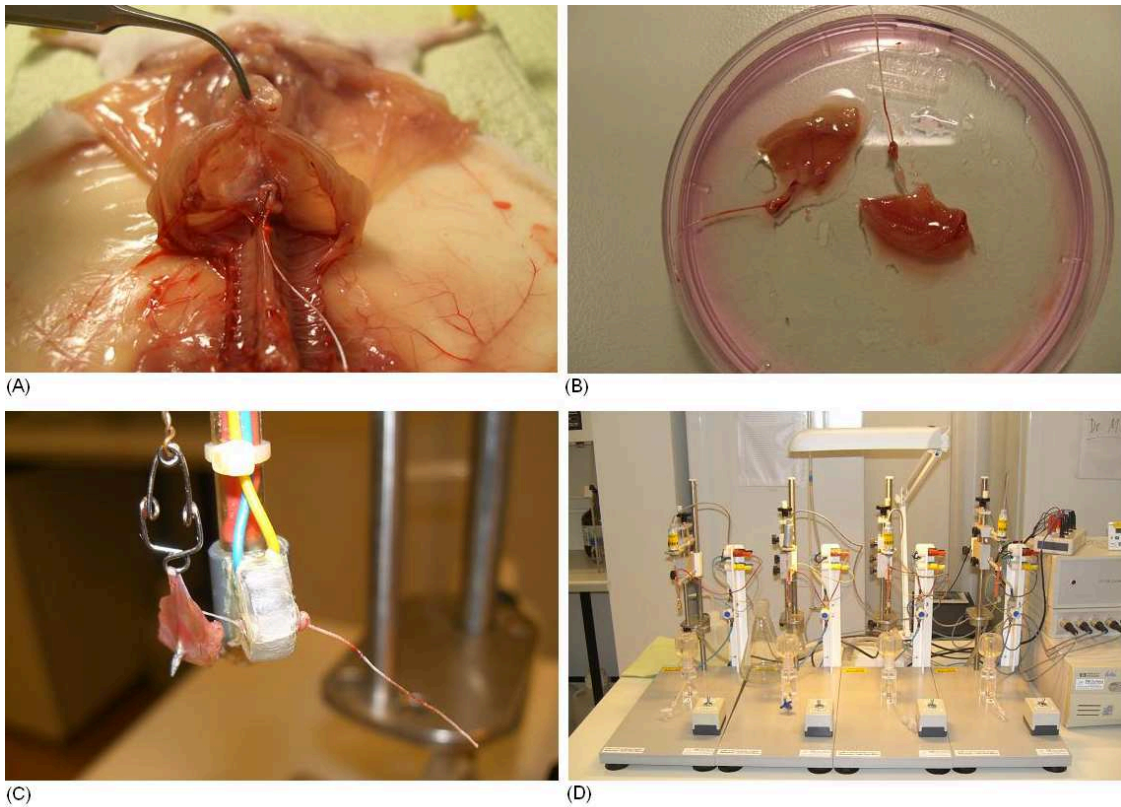


Abbildung 4 MDT. (A) Präpariertes Diaphragma mit Nn. phrenici im Situs der Maus. (B) Rechtes und linkes Hemidiaphragma-Präparat ex situ. (C) Am Organhaltearm eingespanntes Hemidiaphragma mit N. phrenicus. (D) Messsystem in der Übersicht mit 4 Messplätzen (Organbäder und Transducer).

2.3.5 Messung der Paralysezeit

Zur Messung der isometrischen Muskelkontraktion wurde pro Messplatz ein Hemidiaphragma aus der Zellkulturschale entnommen und in eine spezielle Halteapparatur eingespannt (Abbildung 4 C und schematische Darstellung in Abbildung 5). Dazu wurde einerseits das Centrum tendineum über einen Draht und eine Metallklemme mit einem Kraftsensor (Transducer) verbunden. Andererseits wurde der Rippenbogen über einen Metallhaken am Organhaltearm befestigt, so dass sich das Hemidiaphragma keilförmig aufspannte. Der mit dem Faden verbundene Nervus phrenicus wurde nun durch die dem Metallhaken direkt benachbarte Ringelektrode geführt.

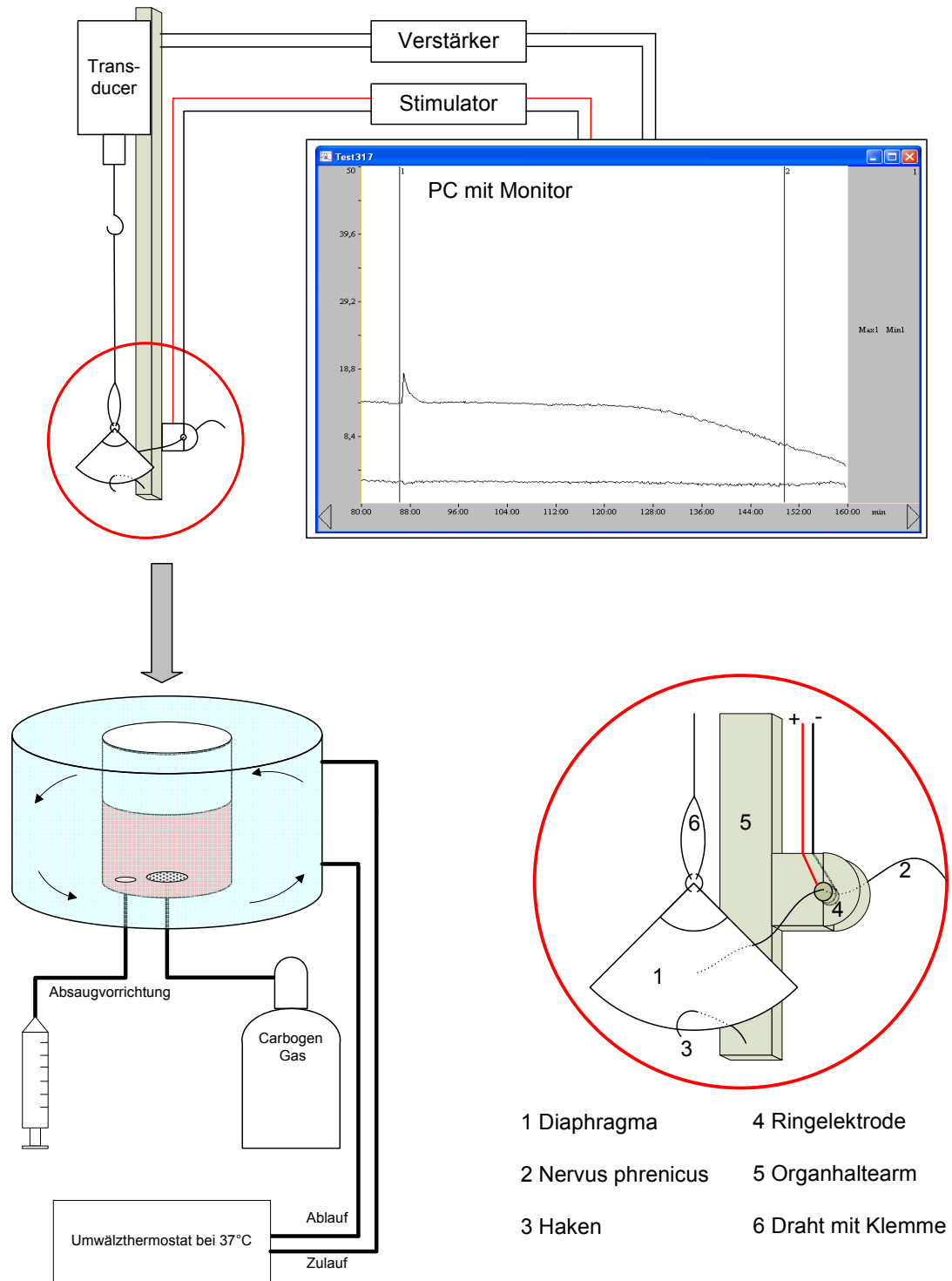


Abbildung 5 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Durchführung des MDT.

Nachdem das Präparat mit der Haltevorrichtung in das 5ml enthaltende Organbad abgesenkt worden war, konnte der Nerv über die Ringelektrode stimuliert werden (5 mV; 1 Hz; 0,1 ms), was zu einer Kontraktion des Hemidiaphragmas führte. Insgesamt standen 4 gleichartige Messplätze zur Verfügung (Abbildung 4 D).

Der Transducer registriert die Kontraktionskraft und wandelt sie in elektrische Spannungsimpulse um. Diese werden über einen Verstärker in den PC übertragen. Aus ihnen resultieren dann zwei Summenkurven im Programm Bemon32, eine Kurve, die die Vorspannung des Präparates (Minimumkurve) repräsentiert und eine zweite, die die maximale Kontraktionskraft (Maximumkurve) anzeigt (Abbildung 6(1) und 6(2)).

Die Differenz der beiden Kurven entspricht der durch die cholinerge Transmission induzierten Kontraktionskraft in mN, die Grundlage der Bestimmung der halbmaximalen Paralysezeit ($t_{1/2}$) ist. Dazu wurde zum Zeitpunkt der Zugabe einer Testlösung ein Cursor über beide Kurven gelegt (Abbildung 6(3)). Durch Verschieben des Cursors von der maximalen Differenz der beiden Kurven (Abbildung 6(4)) bis zur Halbierung der Differenz der beiden Kurven (Abbildung 6(5)) wurde die $t_{1/2}$ bestimmt. Es ist dies die Zeit, die nach Zugabe der Testlösung bis zum Erreichen der halbmaximalen Kontraktionskraft verstreicht (Abbildung 6(6)).

Um isometrische Kontraktionen messen zu können, wurde über einen Regler die Vorspannung des Hemidiaphragmas auf etwa 5 mN eingestellt. Präparate, die eine Kontraktionskraft von weiteren 5 mN nicht erreichten, wurden nicht für Messungen verwendet. Gelegentlich konnte zu Beginn der Anpassungs-Phase ein Ansteigen der Vorspannung ohne äußere Einwirkung beobachtet werden. Durch Erneuerung des EBSS-Puffers im Organbad und Nachregulierung der Carbogen-Zufuhr konnte dieser Prozess häufig aufgehalten werden. Falls der Anstieg der Vorspannung die Kontraktionskraft des Diaphragmas um mehr als 20% verminderte, wurde das Präparat verworfen und nicht für eine Untersuchung verwendet.

Nach einer Anpassungsphase von mindestens 10 Minuten und Stabilisierung der Kontraktionskurve konnte der EBSS-Puffer im Organbad durch eine Testlösung ersetzt werden. Auf diese Weise wurden folgende Lösungen getestet:

- Lösungen mit BoNT zur Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurve (Bestimmung der BoNT-Konzentration, die eine $t_{1/2}$ von ca. 60 min auslöste)
- Lösungen mit Standard-BoNT-Ak zur Erstellung der Eichkurve (Bestimmung der Ak-Konzentration)
- Patientenserren-Dialysate, die mit BoNT inkubiert wurden zur Bestimmung nAk in Patientenserren

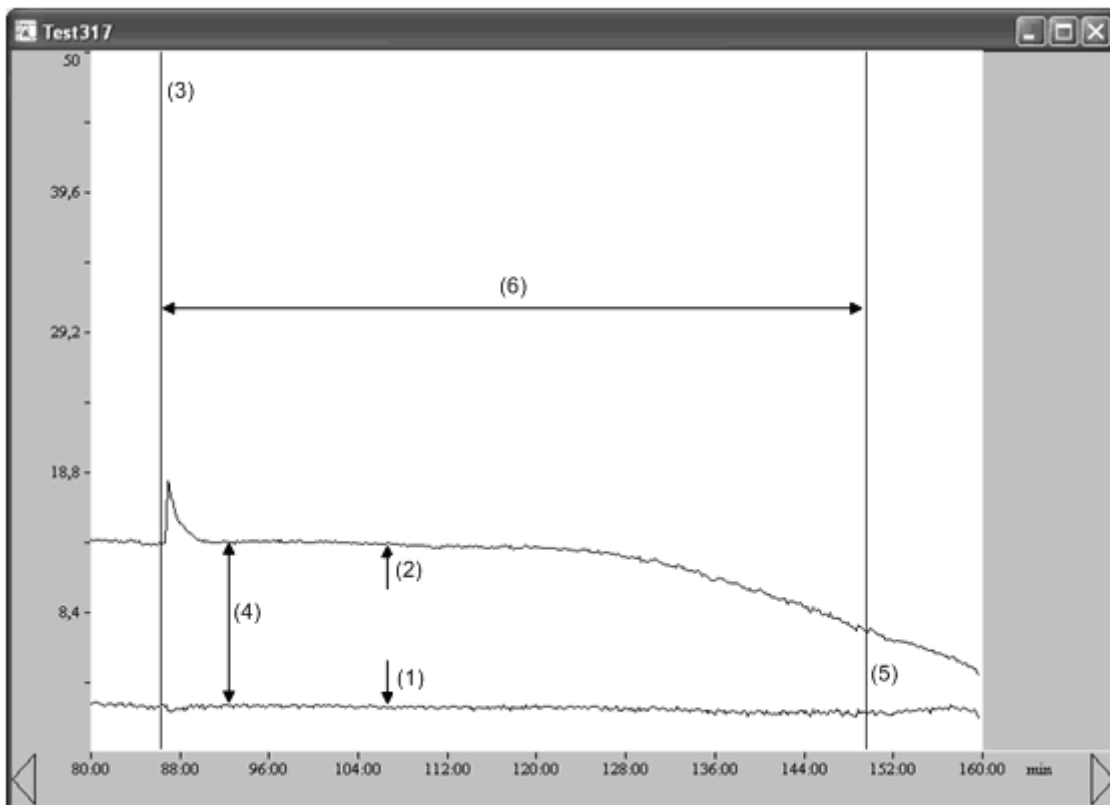


Abbildung 6 Diaphragma-Kontraktionskurve (1) Vorspannungskurve (keine Kontraktion). (2) Kurve der maximalen Kontraktion nach elektrischer Stimulation. (3) Zeitpunkt der Zugabe der Testlösung. (4) Maximale Differenz zwischen Vorspannung und Kontraktion. (5) Halbmaximale Differenz zwischen Vorspannung und Kontraktion. (6) Zeitspanne bis zur halbmaximalen Paralyse des Diaphragmas ($t_{1/2}$).

2.3.6 Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven

Das Erstellen der Dosis-Wirkungs-Kurven diente der Ermittlung der BoNT-Konzentrationen, bei denen $t_{1/2}$ von ca. 60 Minuten auftreten.

Die von List Biological Laboratories gelieferten Ampullen enthielten jeweils 10 µg BoNT-A. Sie wurden in 100 µl Aqua bidest. rekonstituiert und in 50 Portionen zu je 2µl in 0,2 ml PCR-Reaktionsröhrchen bei -20°C gelagert. Für die Untersuchungen wurde jeweils ein Reaktionsröhrchen aufgetaut und mit Verdünnungslösung auf 200µl aufgefüllt.

Um einen Wirkungsverlust durch Adhäsion des BoNT an Grenzflächen (Glas oder Plastik) zu vermeiden und die Potenz des Giftes um den Faktor 2-3 zu steigern, wird empfohlen In-vitro-Tests unter Zugabe von Albumin durchzuführen (Rosales et al. 2006). Deshalb enthielt die PBS-Verdünnungslösung 0,1% BSA. Für die Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche BoNT-A-Lieferungen (A4 und A5) verwendet, die eine unterschiedliche Wirksamkeit aufwiesen. Daher wurden folgende unterschiedliche Konzentrationsreihen für die Erstellung von zwei Dosis-Wirkungs-Kurven hergestellt: für die Lieferung A4 1; 0,5; 0,25 und 0,125 ng/ml und für die Lieferung A5 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 ng/ml in jeweils 5 ml EBSS-Badlösung. Die Kurvendarstellungen und die daraus für die Ak-Bestimmungen ausgewählten BoNT-Konzentrationen finden sich im Ergebnisteil (Abschnitte 3.2.1 und 3.3.1)

2.3.7 Erstellen der Ak-Titer- Kalibrierungskurven

Die Ak-Titer-Kalibrierungskurven wurden erstellt, um quantitative Angaben über den Ak-Gehalt von Patientenseren machen zu können. Dazu wurde als Referenz ein Standard-Pferde-Serum, das eine bekannte Ak-Konzentration enthielt mit der zuvor bestimmten optimalen BoNT-Dosis vorinkubiert.

Die von dem britischen Serum-Institut NIBSC gelieferten Ampullen mit 5 ml Pferdeserum-Lyophilisat entsprechend 500 IU BoNT-Ak (100 IU/ml) wurden zunächst

mit Aqua bidest. rekonstituiert und das Antiserum anschließend in Portionen zu 0,5 ml auf Eppendorf-Röhrchen verteilt und bei -20°C gelagert. Für eine Messserie wurde aus einer Portion mit PBS-BSA (0,1%) eine Verdünnungsreihe hergestellt, die nach Zugabe zu 5 ml EBSS-Badlösung die unten genannten End-Konzentrationen ergab. Anschließend wurde der Badlösung BoNT mit einer Endkonzentration hinzugefügt, die der zuvor ermittelten optimalen BoNT-A-Konzentration entsprach. Dann wurde die Lösung inkubiert. Dadurch wurde die Bindung der Ak an das BoNT gewährleistet. Für die beiden unterschiedlichen BoNT-Lieferungen A4 und A5 wurden folgende Ak-Konzentrationen gemessen: A4: 10, 5, 2,5; 1,25; 0,625 und 0,3125 mU/ml; A5: 10, 5, 2,5; 1,25; 0,625 0,3125 und 0,15625 mU/ml. Die resultierenden Ak-Kalibrierungskurven sowie die Kurvengleichungen sind im Ergebnisteil (Abschnitte 3.2.2 und 3.3.2) wiedergegeben.

2.3.8 Messung der Patientenproben

Die Entnahme der Blutproben in Serum-Monovetten wurde in der Poliklinik für Neurologie der Universität Rostock durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von ca. einer Stunde zur Gewährleistung einer kompletten Koagulation wurde das Probenröhrchen 10 Minuten bei 1000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Serum-Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. In der Regel konnte ein Serum-Volumen über 10 ml gewonnen werden, was spätere Doppelbestimmungen ermöglichte.

Zur Elimination von Hemmstoffen im Serum, die das Ergebnis beeinflussen könnten, wurden alle Patientenproben einem Dialyse-Prozess unterworfen. Hierzu wurden die Proben über eine Dialysemembran gegen das Puffermedium EBSS äquilibriert. Nach der Befüllung und dem Verschluss spezieller Dialyseschläuche wurden diese in einen Erlenmeyerkolben mit EBSS gegeben. Das Volumenverhältnis betrug 1:10 (Serum:EBSS). Nach einstündiger Dialyse bei Raumtemperatur wurde der EBSS-Puffer ausgetauscht und der Vorgang für weitere 12 Stunden bei +4°C fortgesetzt. Während des gesamten Dialysevorgangs wurde das Dialysemedium mittels eines Minirührers bewegt. Nach

Abschluss der Dialyse stand das Serum für die Ak-Bestimmung zur Verfügung. Die Proben wurden, sofern nicht eine sofortige Analyse erfolgte, bei -20°C gelagert.

Für die Messung wurden die dialysierten Proben schonend auf Raumtemperatur erwärmt und es wurden 5 ml entnommen. Der verbleibende Rest wurde wieder bei -20°C eingefroren. Der Messprobe wurde so viel BoNT hinzu gegeben, dass die ermittelte optimale Konzentration erreicht wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C um die Bindung potentieller Ak an das Toxin zu gewährleisten. Da Serum bereits ausreichend Protein enthält, konnte auf einen zusätzlichen Proteinschutz durch BSA verzichtet werden.

Nach Überführung des Inkubates in das Organbad der Messapparatur schloss sich der MDT an. Dabei kam es durch den hohen Proteingehalt des Serums häufig zu einer starken Schaumbildung im Organbad, die eine besonders sorgfältige Beobachtung der Oxygenierung notwendig machte. Um eine unzureichende Sauerstoffversorgung des Präparates und damit verbundene Messfehler zu vermeiden, musste die Oxygenierung auf ein Mindestmaß eingestellt sein. In der Praxis erwies sich diese genaue Einstellung gelegentlich als schwierig, sie wurde insbesondere während der Einarbeitungsphase häufig zu großzügig gewählt und führte dann zur Schaumbildung. Durch Absaugen des Schaums und Rückführung des durch forciertes Schütteln zurück gewonnenen Inkubates konnte die Messung fortgesetzt werden. Es mussten Kurvenunregelmäßigkeiten, die durch Störung der empfindlichen Präparateaufhängung beim Absaugen des Schaums entstehen konnten, vermieden werden. Die Durchführung des MDT erfordert eine längere Einarbeitungszeit unter Anleitung durch erfahrene Experimentatoren.

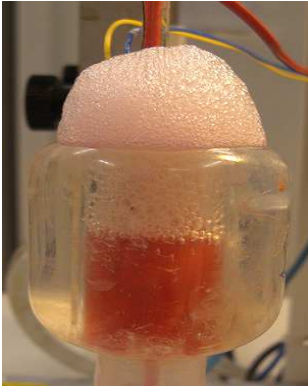


Abbildung 7 Schaumbildung während der Serum-Messungen

2.4 Statistik

Alle Patientenparameter und Messwerte wurden in den grafischen Darstellungen als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die MW-Vergleiche erfolgten mit dem t-Test nach Student für gepaarte Beobachtungen (vor und nach Xeomin[®]-Behandlung) bzw. als ungepaarte Beobachtungen (Gruppenvergleiche).

Die Signifikanzschwelle wurde mit $p=0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Gliederung der Ergebnisdarstellung

Die erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, mittels MDT für zwei unterschiedliche BoNT-Lieferungen (BoNT A4 und BoNT A5) Dosis-Wirkungs-Kurven zur Ermittlung der optimal wirksamen Konzentration und Eichkurven für die Bestimmung der Ak-Titer in Patientenseren zu erstellen. Die Ergebnisse der entsprechenden Messungen und Kurvenberechnungen werden zuerst dargestellt. Es folgt die Analyse von Schweregrad und BoNT-Therapieresponse bei 58 Dystoniepatienten vor und nach Therapieumstellung auf Xeomin® bzw. bei de novo-Xeomin® Patienten, um die Effektivität der neuen Behandlung einzuschätzen.

Schließlich werden Ak-positive und Ak-negative Patienten hinsichtlich Therapieresponse und bekannter Risikofaktoren für die Ak-Bildung verglichen.

3.2 BoNT A4

3.2.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve für BoNT A4

Für die Ermittlung einer optimal wirksamen Konzentration von BoNT A4 wurden insgesamt 25 Messungen durchgeführt (Tabelle 4), aus denen durch nichtlineare Regression eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt wurde (Abbildung 8).

Die BoNT-Konzentration von 0,5 ng/ml ergab einen $t_{1/2}$ -Wert von $58,4 \pm 7,5$ min (MW und SD), der nach Literaturangaben optimal für die Ak-Bestimmung ist (Goschel et al. 1997; Lange et al. 2009). Diese Konzentration diente daher sowohl für die Erstellung der Ak-Kalibrierungskurve als auch zur Ak-Bestimmung in Patientenseren als Standardkonzentration.

Tabelle 4: Wertebereich der $t_{1/2}$ -Messungen im MDT für BoNT A4

Konzentration (ng/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Anzahl (n)	3	14	15	3	2
MW (min)	41,3	58,4	73,3	91,0	97,5
SD (min)	4,0	7,5	10,8	13,7	9,2

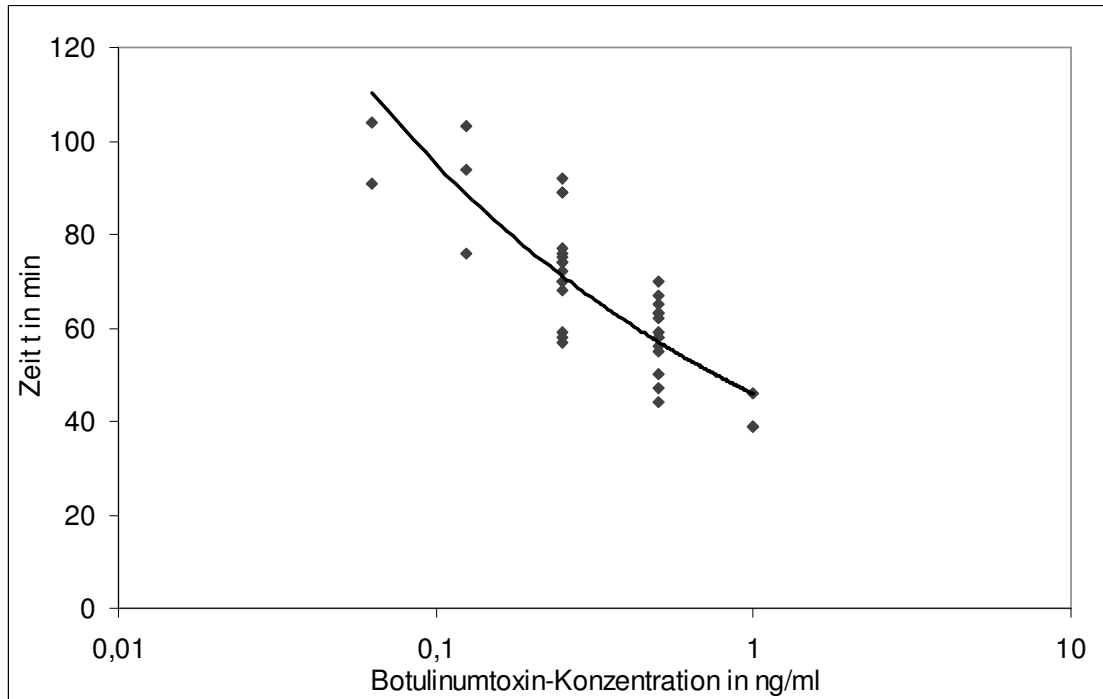


Abbildung 8 Dosis-Wirkungs-Kurve für BoNT A4 in logarithmischer Darstellung

3.2.2 Bestimmung der Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A4

Für die Erstellung der Ak-Titer-Kalibrierungskurve bei Verwendung von BoNT A4 wurden 29 Messungen mit verschiedenen Konzentrationen des Ak-Standardserums vom Pferd (NIBSC) durchgeführt, wobei nur die optimale A4 Konzentration von 0,5 ng/ml eingesetzt wurde (Tabelle 5).

Tabelle 5: Wertebereich der $t_{1/2}$ -Messungen für die Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A4

Konzentration (mU/ml)	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10
Anzahl (n)	5	6	6	5	4	3
MW (min)	71,2	79,4	107,2	117,8	158,3	200,3
SD (min)	9,1	12,4	26,9	20,1	39,7	38,1

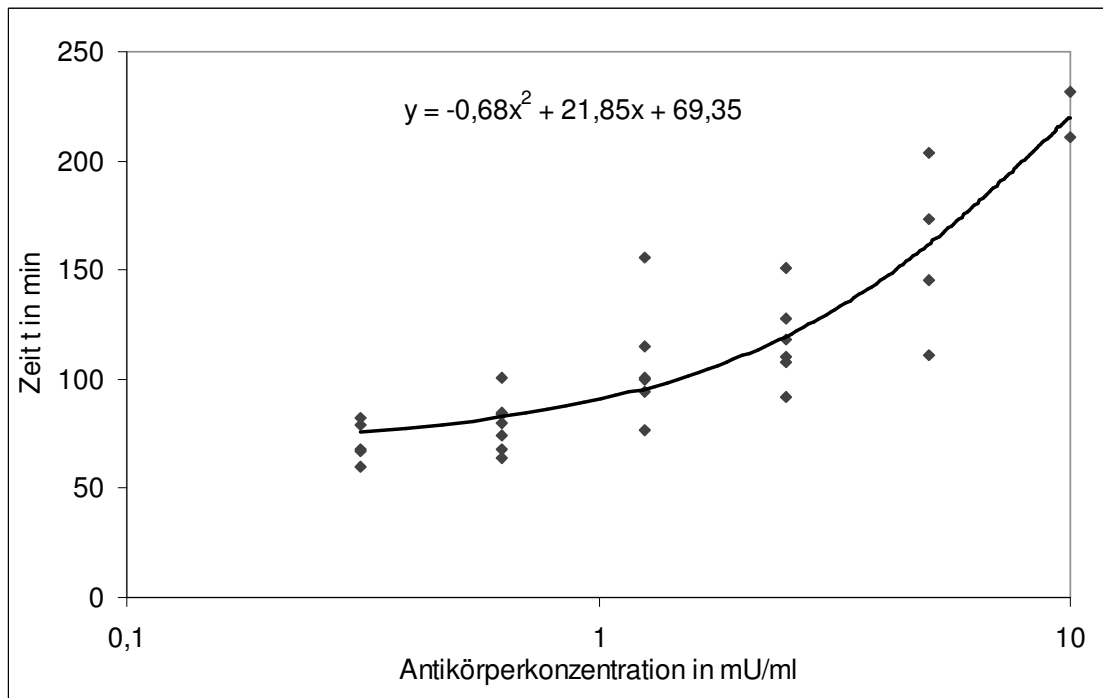


Abbildung 9 Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A4 in logarithmischer Darstellung

Aus den $t^{1/2}$ -Werten der Ak-Konzentrationsreihe wurde mit Hilfe der nichtlinearen Regressionsanalyse die Kalibrierungskurve für BoNT A4 erstellt (Abbildung 9). Das Bestimmtheitsmaß des Kurvenfitting beträgt $R^2=0,79$.

Nach Umstellung der quadratischen Kurvengleichung ergab sich für die Berechnung von Ak-Konzentrationen folgende Formel:

$$x = 16,07 - \sqrt{360,11 - \frac{y}{0,68}} \quad [\text{mU/ml}]$$

Dabei entspricht x dem zu berechnenden Ak-Titer und y dem gemessenen $t^{1/2}$ -Wert. Die Festlegung des unteren Schwellwertes für den Ak-Nachweis erfolgte anhand der angepassten Kalibrierungskurve unter Berücksichtigung der bisher mitgeteilten Literaturangaben (Sesardic et al. 2004; Kranz et al. 2008; Lange et al. 2009), die als

Minimalwert 0,3 mU/ml annehmen. Um keine niedrigen Ak-Titer zu übersehen, wurde das Detektionslevel möglichst wenig restriktiv mit 0,2 mU/ml festgelegt. An ihn schloss sich ein Graubereich („borderline titer“) bis 0,8 mU/ml an (Kranz et al. 2008), der in der Diskussion näher erläutert wird. Der $t_{1/2}$ -Schwellwert von 74 min ergab sich aus der angepassten Kurve.

3.3 BoNT A5

3.3.1 Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurve für BoNT A5

Analog zum Vorgehen bei BoNT A4 wurden für die Ermittlung der optimal wirksamen Konzentration der zweiten BoNT-Lieferung (A5) insgesamt 50 Untersuchungen durchgeführt (Tabelle 6). Die höhere Test-Anzahl wurde wegen einer höheren Messwert-Streuung bei einer etwas geringeren Wirksamkeit von BoNT A5 gegenüber BoNT A4 nötig. Dennoch lag im Endergebnis die optimal wirksame Konzentration bei 0,5 ng/ml. Sie lieferte einen $t_{1/2}$ -MW von $64,6 \pm 14,4$ min. Entsprechend der Vorgehensweise bei BoNT A4 wurde mit den Messwerten eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt, woraus sich eine Dosis-Wirkungs-Kurve ergab (Abbildung 10).

Tabelle 6: Wertebereich der $t_{1/2}$ -Messungen im MDT für BoNT A5

Konzentration (ng/ml)	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
Anzahl (n)	4	8	10	8	12	8
MW (min)	44,8	52,5	64,6	79,6	106,5	112,1
SD (min)	3,6	11,1	14,4	11,6	32,7	14,2

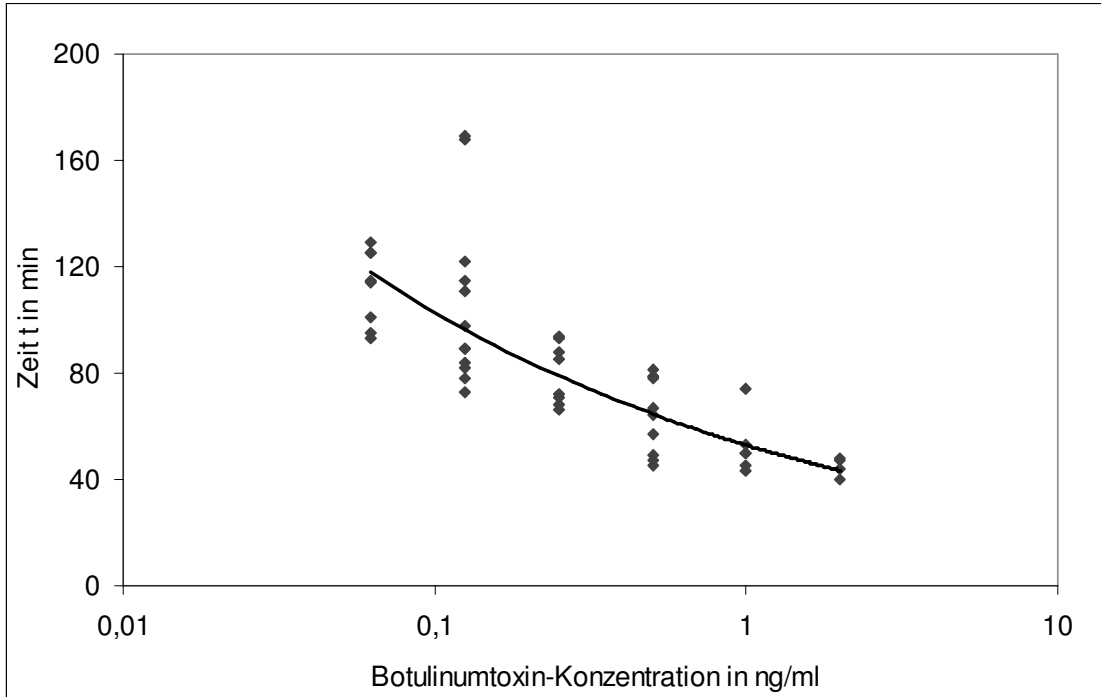


Abb. 10 Dosis-Wirkungs-Kurve für BoNT A5 in logarithmischer Darstellung

3.3.2 Bestimmung der Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A5

Für die Erstellung der Ak-Kalibrierungskurve bei Verwendung von BoNT A5 erfolgten 57 Messungen mit 0,5 ng/ml (Tabelle 7). Die beiden niedrigsten getesteten Konzentrationen von 0,15625 mU/ml und 0,3125 mU/ml ließen mit Werten von $60,5 \pm 13,3$ min und $66,2 \pm 13,7$ min keine Ak-Wirkung mehr erkennen.

Tabelle 7 Wertebereich der $t_{1/2}$ -Messungen für die Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A5

Konzentration (mU/ml)	0,15625	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10
Anzahl (n)	6	10	14	12	10	3	2
MW (min)	60,5	66,2	72,2	79,6	100,5	118,7	213,5
SD (min)	13,3	13,7	12,1	22,5	27,8	15,5	47,4

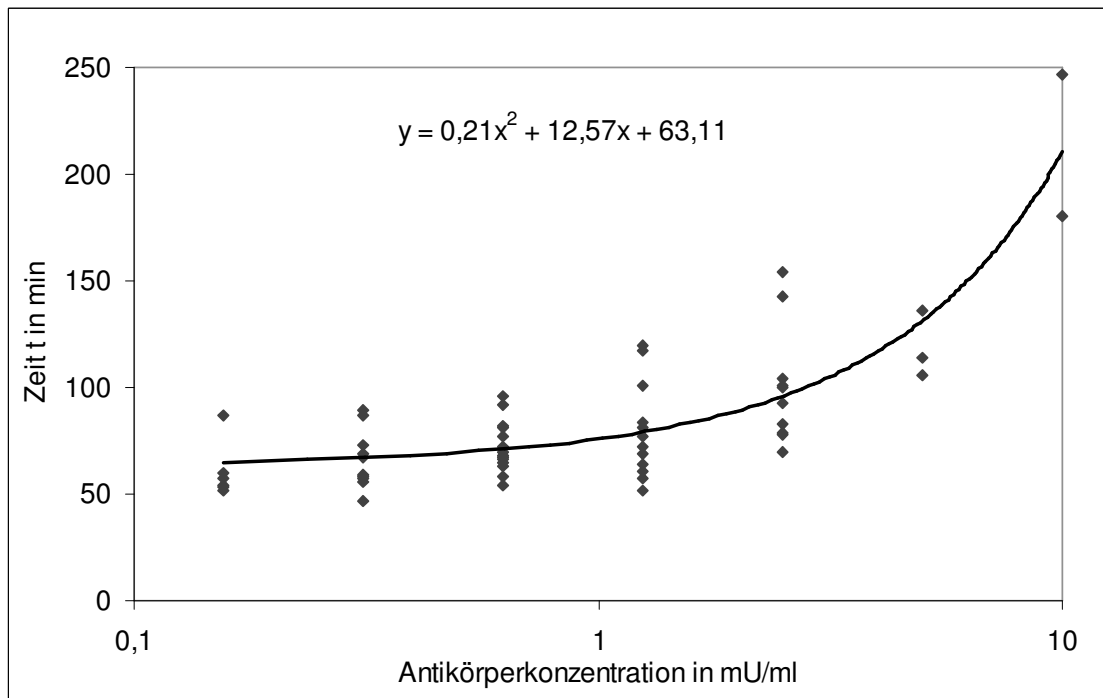


Abb. 11 Ak-Titer-Kalibrierungskurve für BoNT A5 in logarithmischer Darstellung

Die Kalibrierungskurve (Abbildung 11) und das Bestimmtheitsmaß $R^2=0,70$ wurden analog dem Vorgehen bei BoNT A4 mittels nichtlinearer Regressionsanalyse ermittelt.

Für die Berechnung der Ak-Konzentration ergab sich die Formel:

$$x = -29,93 + \sqrt{\frac{y}{0,21} + 595,2} \text{ [mU/ml]}$$

für $x = \text{Ak-Titer}$ und $y = t^{1/2}$.

Aus der gefitteten Ak-Kalibrierungskurve ergab sich bei einem nicht restriktiven Vorgehen ab dem Ak-Konzentrationswert von 0,6 mU/ml die Möglichkeit eines Ak-Nachweises. Deshalb wurde für BoNT A5 diese Konzentration als Detektionslevel festgelegt. Der sich daran anschließende Grenzbereich („borderline titer“) (Kranz et al. 2008) für den Ak-Nachweis wird in der Diskussion näher erläutert.

3.4 Schweregrad der Erkrankung und Therapie-Response

3.4.1 Schweregrad bei vorbehandelten Patienten in den unterschiedlichen Diagnose-Untergruppen

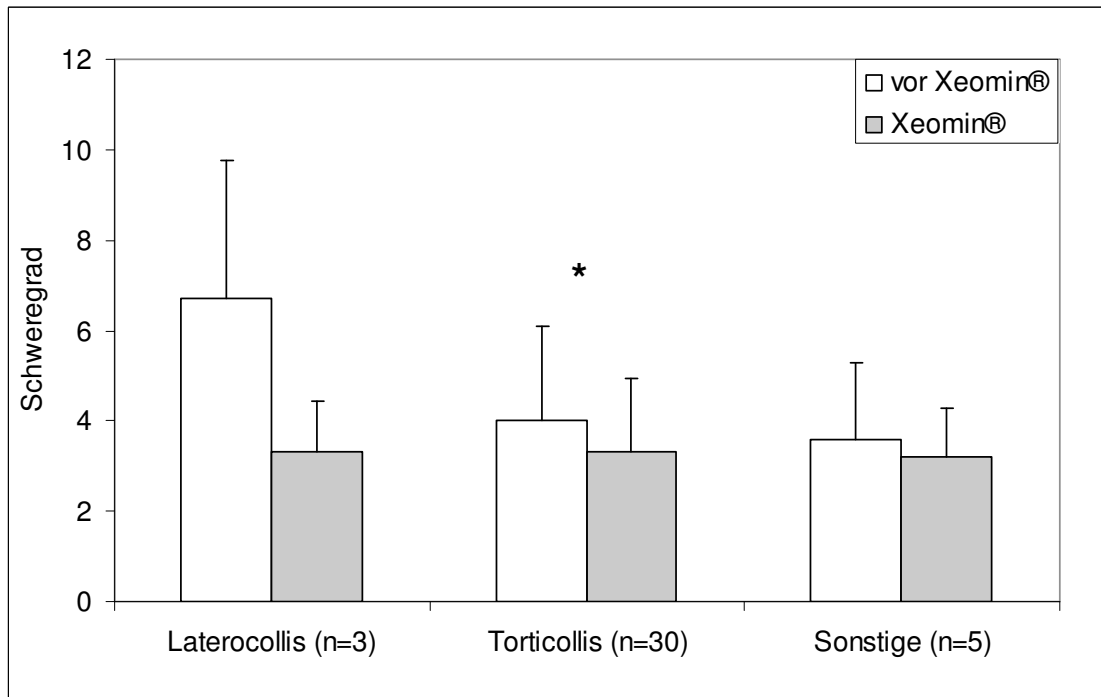


Abbildung 12 Schweregradänderung der Dystonie nach Tsui in den Diagnoseuntergruppen von vorbehandelten Patienten im Verlauf der einjährigen Xeomin® -Therapie (* $p < 0,05$).

Um den Einfluss einer einjährigen Xeomin® -Therapie auf den Schweregrad der Erkrankung bei vorbehandelten Patienten einschätzen zu können, wurde der Ausgangswert vom Ende der vorangegangenen Behandlung mit dem Wert nach einjähriger Xeomin® -Behandlung verglichen. Zusätzlich wurden die insgesamt 38 vorbehandelten Patienten nach ihrer Diagnose in 3 Gruppen eingeordnet: 1. Laterocollis, 2. Torticollis, 3. Sonstige (Abbildung 12).

Eine signifikante Reduktion des Schweregrades ließ sich im Gesamtkollektiv der vorbehandelten Patienten nachweisen. Für die einzelnen Gruppen ergab sich eine signifikante Verbesserung des Schweregrades nur in der größten Diagnosegruppe Torticollis, obwohl hier die Differenz des MW wesentlich geringer war, als in der Laterocollis-Gruppe.

3.4.2 Schweregrad der Erkrankung in unterschiedlichen Diagnose-Untergruppen bei de novo Xeomin®-behandelten Patienten

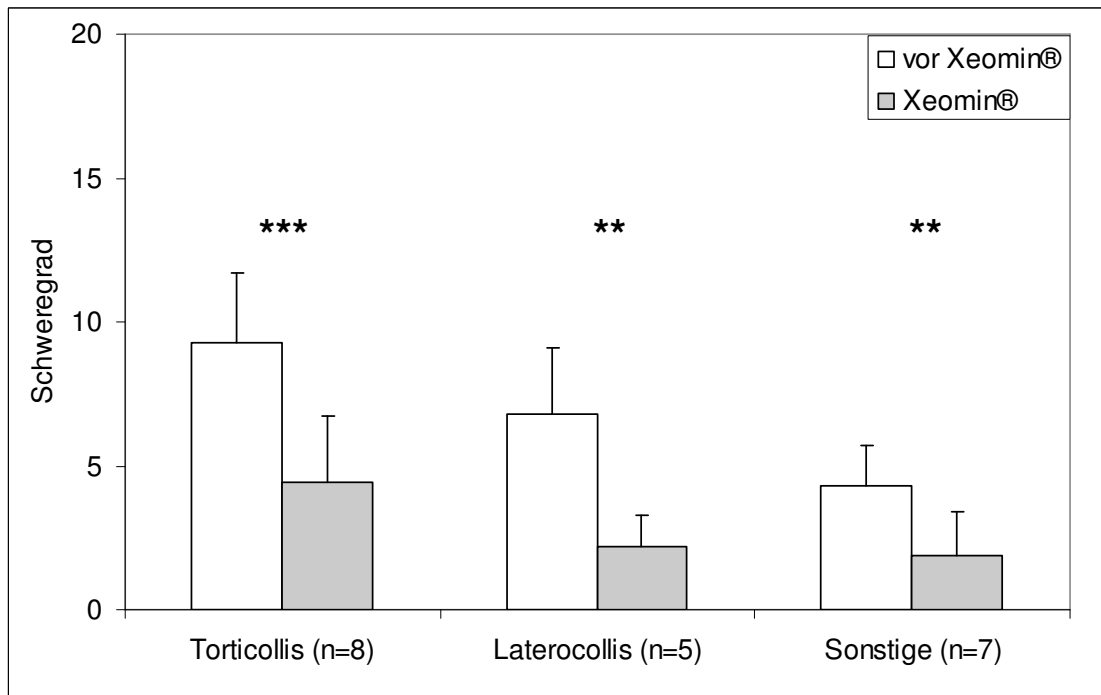


Abbildung 13 Schweregradänderung der Dystonie nach Tsui in den Diagnoseuntergruppen von de novo Xeomin®-behandelten Patienten zu Beginn und im Verlauf der einjährigen Xeomin®-Therapie (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Bei den de novo Xeomin®-behandelten Patienten wurde die Änderung des Schweregrades der Erkrankung ebenfalls in den 3 Diagnosegruppen untersucht (Abbildung 13).

Es ergab sich in allen 3 Gruppen eine hochsignifikante Verringerung des Schweregrades durch die Xeomin®-Behandlung, wobei das Signifikanzniveau in der Torticollis-Gruppe am höchsten war.

3.4.3 Schweregrad der Erkrankung bei vorbehandelten Patienten mit unterschiedlicher Therapieresponse

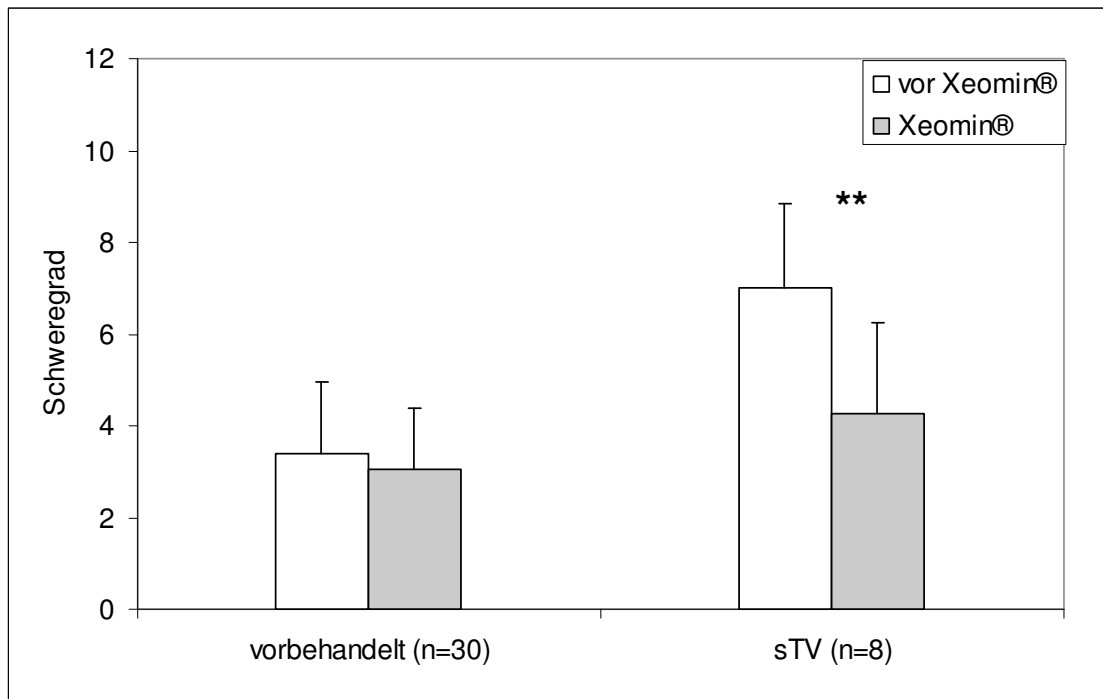


Abbildung 14 Schweregradänderung der Dystonie nach Tsui bei vorbehandelten Patienten mit Therapie-Response im Vergleich zu vorbehandelten Patienten mit sTV im Verlauf der einjährigen Xeomin® -Therapie (** $p < 0,01$)

Um beurteilen zu können, ob Patienten mit sTV von der Therapie mit Xeomin® profitieren, wurde die Gruppe der vorbehandelten Patienten in Patienten mit guter Therapieresponse und in Patienten mit sTV unterteilt (Abbildung 14).

Es zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion des Schweregrades in der sTV-Gruppe, während sich der Schweregrad bei den Patienten mit guter Therapieresponse nicht signifikant änderte. Im Mittel lag der Schweregrad der Patienten mit sTV nach Xeomin® -Therapie noch geringfügig über dem Wert der Patienten mit guter Response.

3.4.4 Therapieresponse in unterschiedlichen Diagnose-Untergruppen

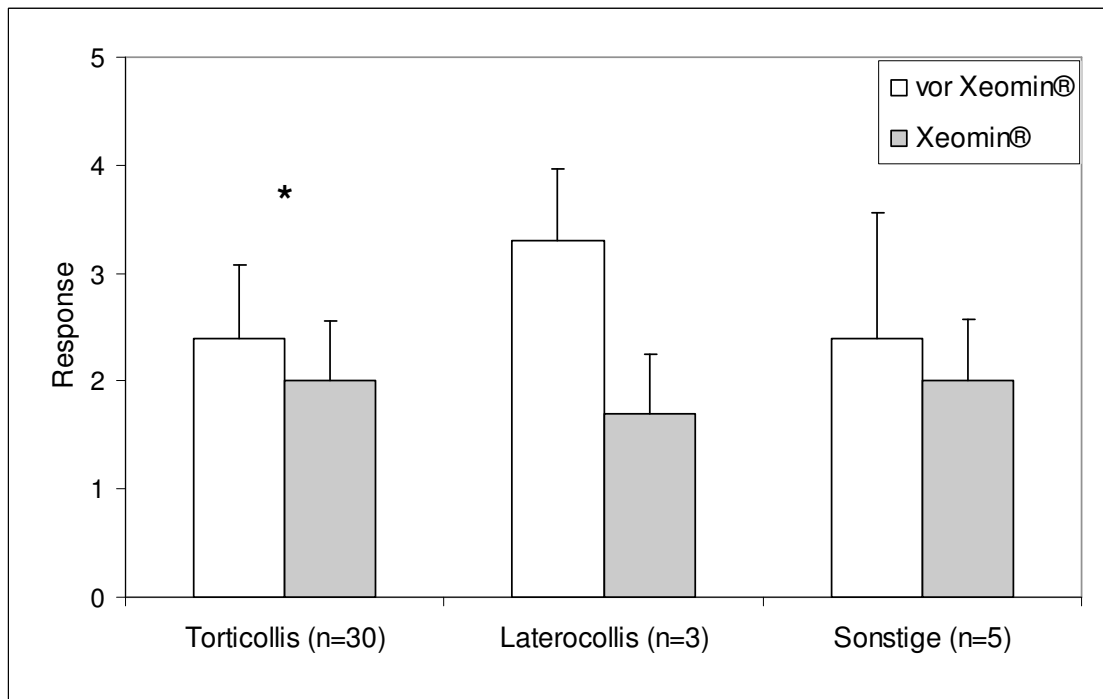


Abbildung 15 Änderung der Therapieresponse im Verlauf der einjährigen Xeomin® -Therapie in den Diagnoseuntergruppen bei vorbehandelten Patienten (* $p < 0,05$), Einschätzung der Therapieresponse in Übereinstimmung durch Arzt und Patient: 1=sehr gut; 2=gut; 3=mäßig; 4=keine.

Die Therapieresponse der vorbehandelten Patienten wurde ebenfalls separat in den 3 Diagnosegruppen analysiert (Abbildung 15). Den Ausgangswert bildete die Einschätzung der Response am Ende der vorhergehenden Behandlung.

Tendenziell ergab sich in allen 3 Gruppen eine Besserung der Response. Sie war jedoch nur in der Torticollis-Gruppe signifikant.

3.4.5 Therapieresponse bei vorbehandelten und de novo Xeomin® - behandelten Patienten

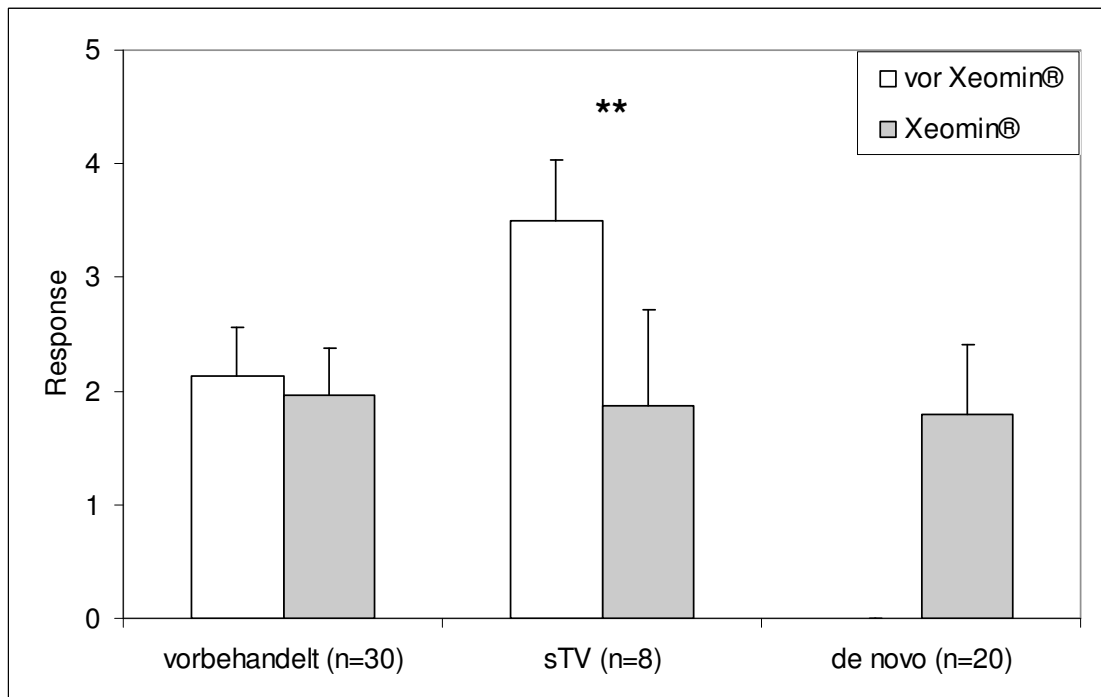


Abbildung 16 Änderung der Therapieresponse im Verlauf der einjährigen Xeomin® -Therapie bei vorbehandelten Patienten im Vergleich zu Patienten mit sTV und de novo Xeomin® - behandelten Patienten (** p<0,01), Score: siehe Abbildung 15.

Die getrennte Analyse der vorbehandelten Patienten mit guter Response und mit sTV ergab eine signifikante Besserung der Therapieresponse bei den sTV-Patienten (Abbildung 16). Bei den vorbehandelten Patienten mit guter Response war keine Veränderung im Vergleich zum Ausgangswert zu verzeichnen. Auch die de novo Xeomin® -behandelten Patienten zeigten eine gute Therapieresponse in gleicher Höhe.

3.5 Ak-positive Patienten

3.5.1 Titerverlauf

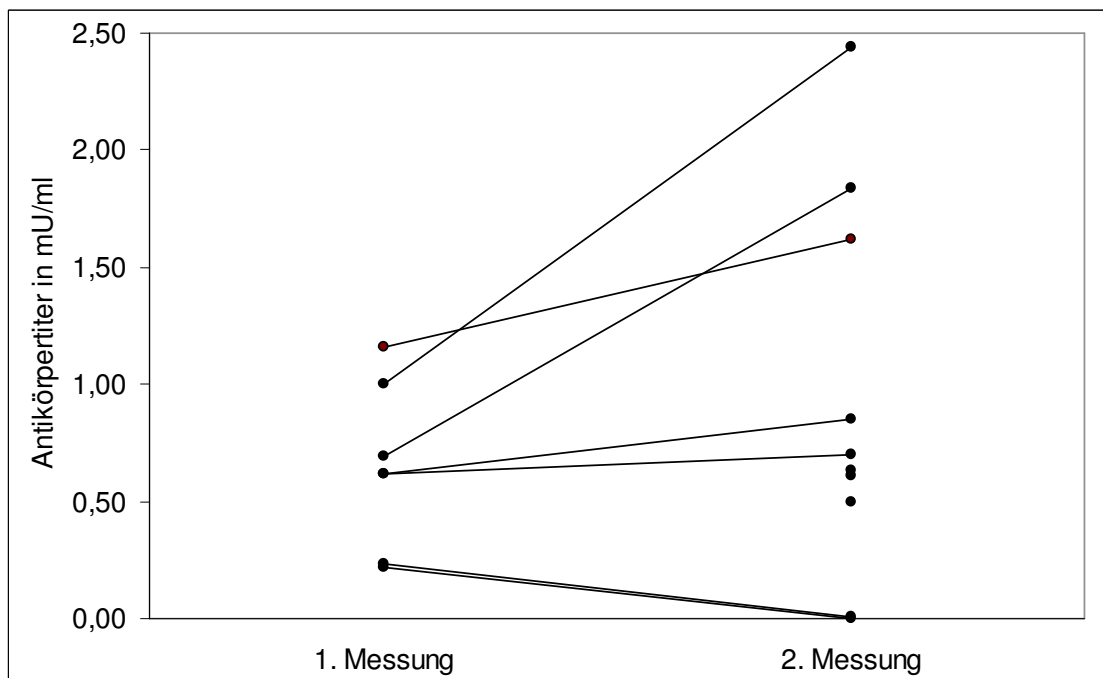


Abbildung 17 Entwicklung der Ak-Titer im Verlauf der einjährigen Xeomin®-Behandlung bei Ak-positiven Patienten, bei 3 Patienten konnte kein Ausgangswert bestimmt werden

Tabelle 5 Übersicht über den Verlauf der Ak-Titer bei Ak-positiven Patienten während der einjährigen Xeomin®-Behandlung

Ak-Titer zu Beginn der Xeomin®-Therapie	Ak-Titer nach einjähriger Beobachtung
-	0,62
-	0,62
0,62	0,70
0,62	0,85
-	0,50
1,16	1,62
0,69	1,84
1,00	2,44
0,22	0,00
0,22	0,00

Von den 58 im MDT untersuchten Patientenseren wiesen 7 Patienten vor Umstellung auf Xeomin® einen positiven Ak-Titer auf (Abbildung 17, Tabelle 5). Weitere 3 Patienten hatten 1 Jahr nach Xeomin®-Umstellung Ak im Serum. Bei ihnen konnte aus

organisatorischen Gründen kein Ausgangswert vor Beginn der Behandlung bestimmt werden. 2 der vor Xeomin® -Umstellung Ak-positiven Patienten hatten einen grenzwertigen Titer von 0,22 mU/ml, der nach einjähriger Xeomin® -Behandlung nicht mehr nachweisbar war. Die verbleibenden 5 Patienten zeigten im Verlauf einen nicht signifikanten Titer-Anstieg. Keiner der 20 de novo Xeomin® -behandelten Patienten entwickelte im Verlauf der einjährigen Beobachtungszeit einen nachweisbaren Ak-Titer.

3.5.2 Therapieversager

Um die Auswirkung eines positiven Ak-Nachweises auf den Therapieerfolg beurteilen zu können, wurden die Patienten hinsichtlich dieses Zusammenhanges untersucht.

Von den 10 positiv auf Ak getesteten Patienten waren lediglich 4 von einem sTV betroffen, während 6 dieser Patienten am Ende des BZ zufrieden stellende Therapieergebnisse zeigten.

Die insgesamt 8 Patienten mit sTV waren in 4 Fällen Ak-negativ, während bei 4 dieser Patienten ein positiver Ak-Titer nachgewiesen wurde.

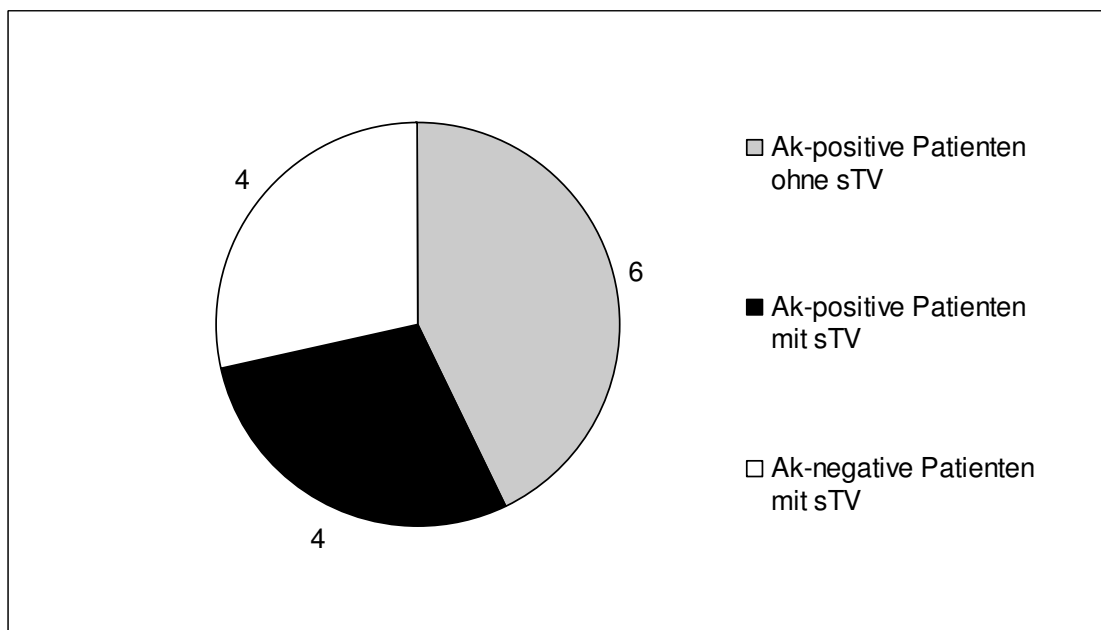


Abbildung 18 Therapieversager bei Ak-positiven und -negativen Patienten

3.6 Vergleich vorbehandelter Ak-positiver und -negativer Patienten

3.6.1 Schweregrad der Erkrankung

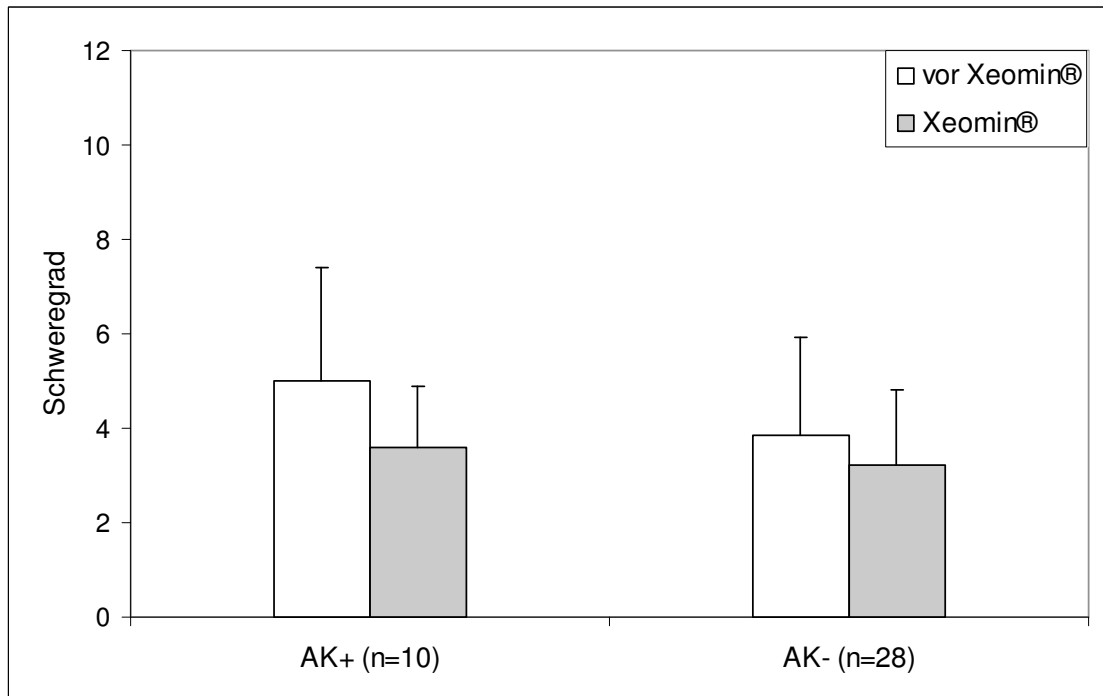


Abbildung 19 Schweregradänderung der Dystonie nach Tsui bei BoNT-Ak-positiven und BoNT-Ak-negativen Patienten im Verlauf der einjährigen Xeomin® -Therapie

Der Vergleich der Schweregrade vor und nach Beginn der Xeomin® -Therapie ergab weder in der Gruppe der BoNT-Ak-positiven noch der BoNT-Ak-negativen Patienten eine signifikante Änderung, obwohl sich ein Trend zur Krankheitsbesserung in beiden Gruppen andeutete (Abbildung 19). Auch der Ausgangswert lag in der Ak-positiven Gruppe nur tendenziell, aber nicht signifikant über dem Ausgangswert der Ak-negativen Gruppe.

3.6.2 Therapieresponse

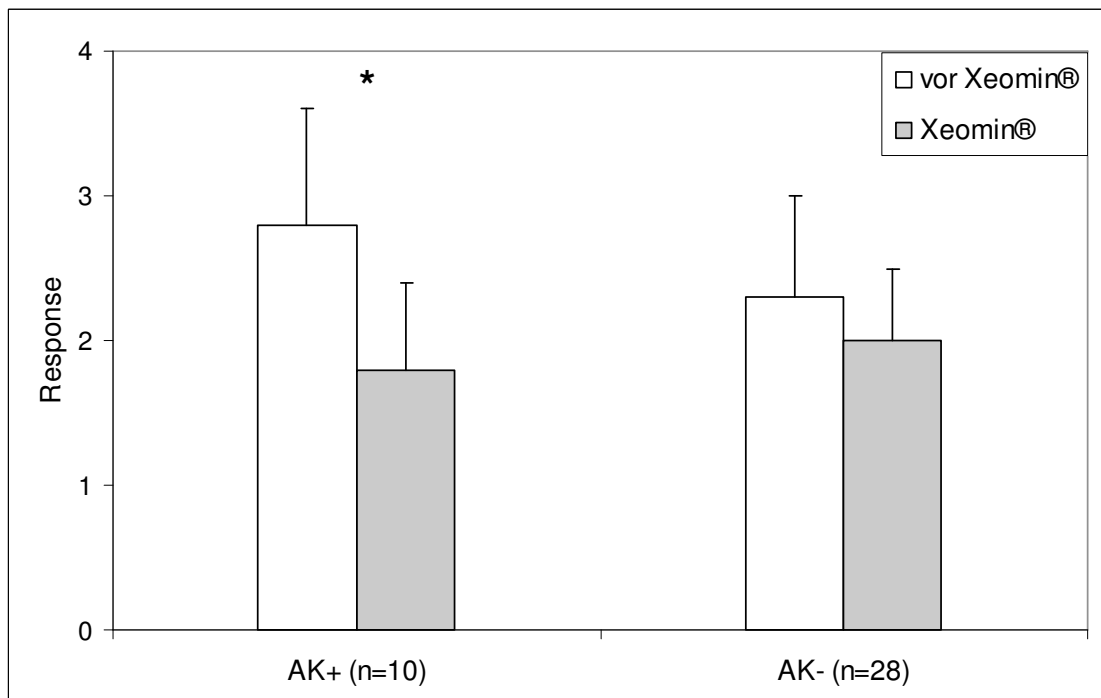


Abbildung 20 Einfluß einer einjährigen Xeomin® -Therapie auf die Therapieresponse bei Patienten mit positivem und Patienten mit negativem Ak-Status (* $p < 0,05$). Score siehe Abbildung 15

Die Therapieresponse war zwischen den Ak-positiven und -negativen Patienten weder vor noch nach Therapieumstellung auf Xeomin® signifikant verschieden. Es entwickelte sich aber innerhalb der Gruppe der BoNT-Ak-positiven Patienten eine Verbesserung der Therapieresponse durch die Xeomin® -Behandlung (Abbildung 20). Bei den Ak-negativen Patienten war diese Verbesserung lediglich tendenziell.

3.6.3 Alter bei Therapiebeginn

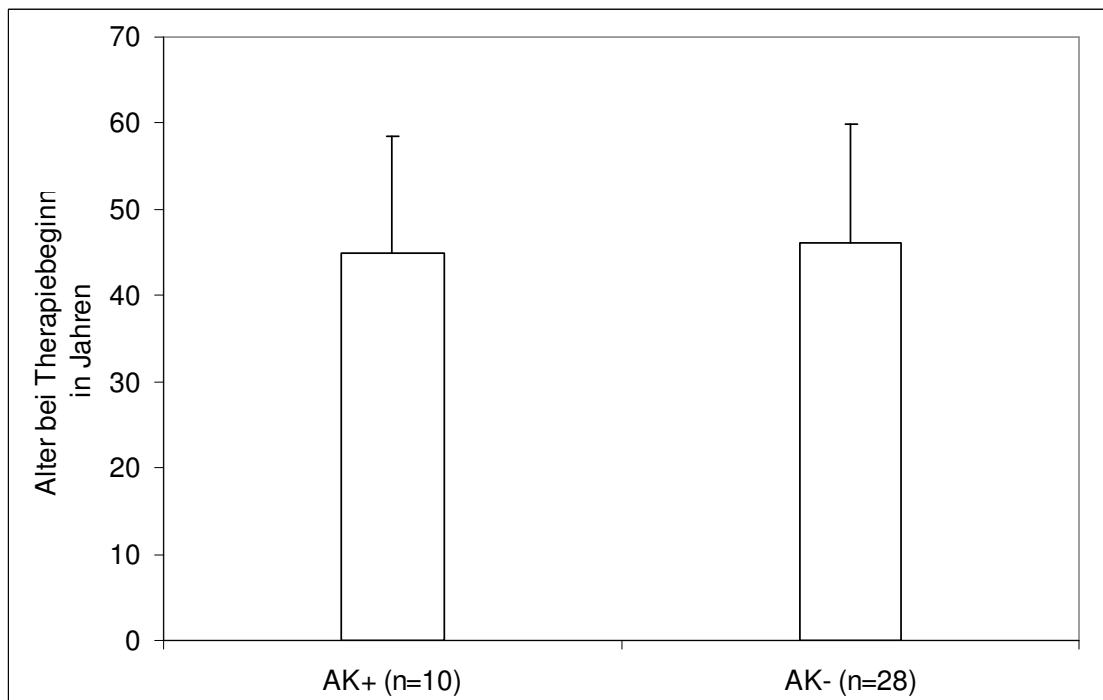


Abbildung 21 Alter bei TB von Ak-positiven und Ak-negativen Dystonie-Patienten, die mit anderen BoNT-Präparaten vorbehandelt wurden

Um den Einfluss potentieller Risikofaktoren für die Ak-Bildung beurteilen zu können, wurden die wesentlichen bekannten Einflussfaktoren zwischen der Gruppe der Ak-negativen und der Ak-positiven Patienten verglichen.

Das Alter zu TB lag mit $44,9 \pm 13,6$ Jahren bei den Patienten mit positivem Ak-Status im Mittel nur geringfügig und nicht signifikant unter dem Alter der BoNT-Ak-negativen Patienten mit $46,2 \pm 13,2$ Jahren (Abbildung 21).

3.6.4 Behandlungszeitraum

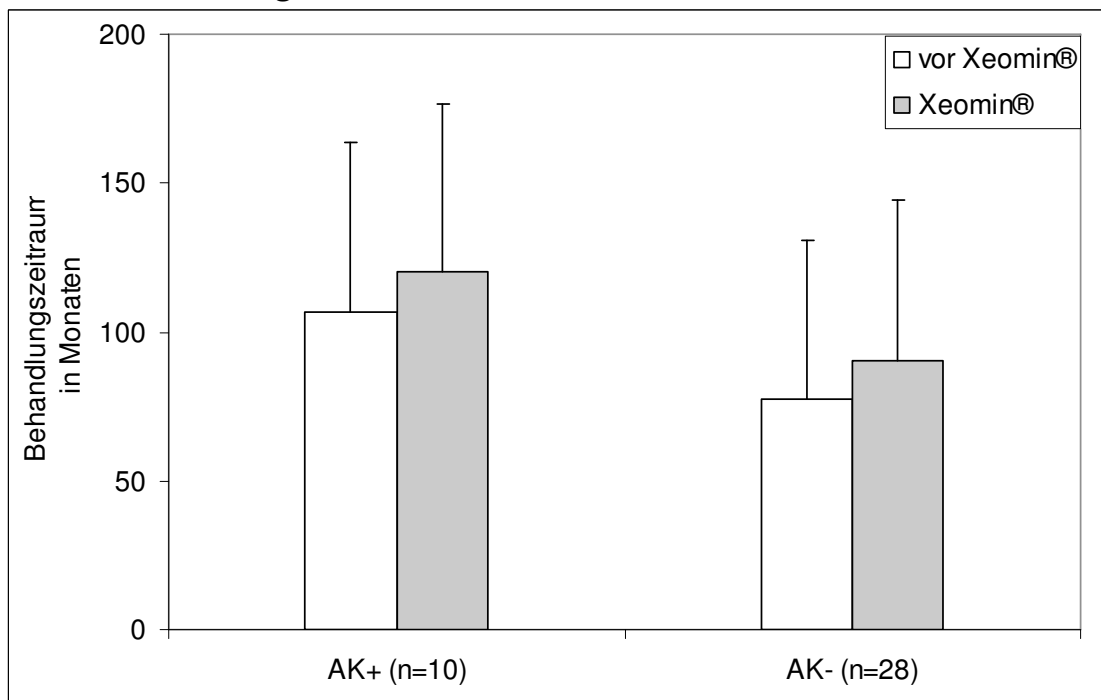


Abbildung 22 Behandlungszeiträume von Ak-positiven und Ak-negativen Dystonie-Patienten, die mit anderen BoNT-Präparaten vorbehandelt wurden

Der Vergleich des Behandlungszeitraums vor Beginn der Therapie mit Xeomin[®] ergab aufgrund der hohen Streuung keinen signifikanten Unterschied zwischen Ak-positiven und -negativen Patienten (Abbildung 22). Tendenziell war die Behandlungszeit jedoch bei Patienten mit positivem Ak-Nachweis ($106,8 \pm 56,9$ Monaten) länger als bei den Ak-negativ getesteten Patienten ($80,1 \pm 52,5$ Monaten).

3.6.5 Anzahl der Behandlungen

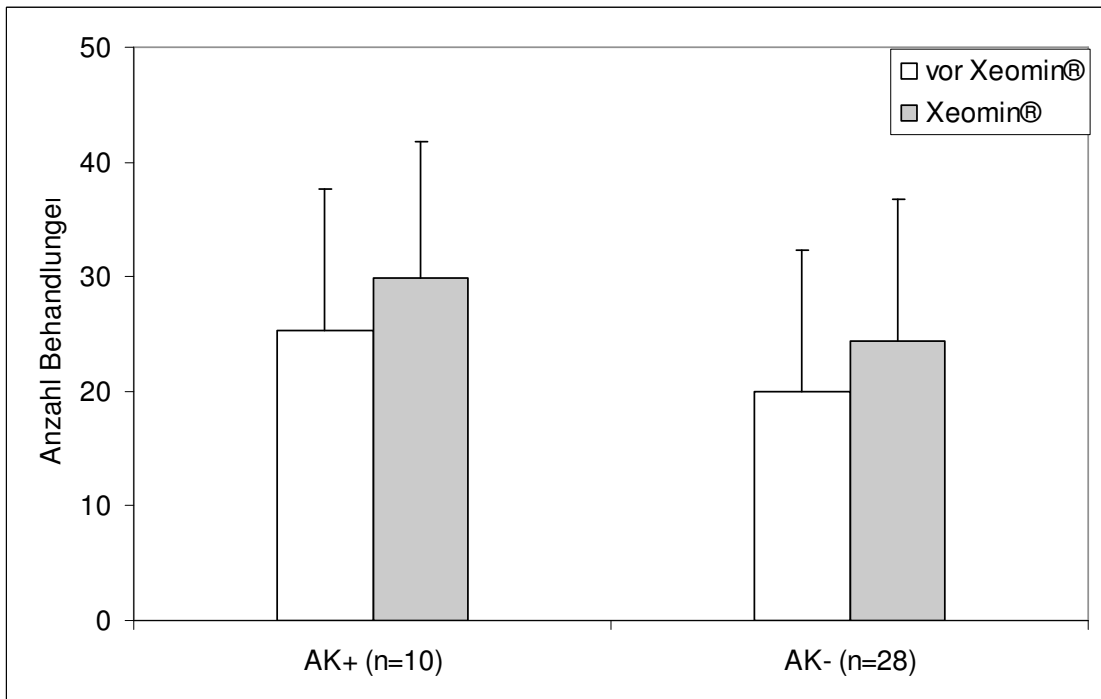


Abbildung 23 Anzahl der Behandlungen von BoNT-Ak-positiven und BoNT-Ak-negativen Dystonie-Patienten, die mit anderen Präparaten vorbehandelt wurden

Die Anzahl der Behandlungen vor Beginn der Xeomin® -Therapie wurde ebenfalls hinsichtlich ihres Einflusses auf den Ak-Status analysiert (Abbildung 23).

Im Mittel wiesen die BoNT-Ak-positiven Patienten mit $25,3 \pm 12,4$ Behandlungen eine geringfügig höhere Behandlungsanzahl auf als die Ak-negativen Patienten ($20,0 \pm 12,3$). In beiden Gruppen schwankten die Einzelwerte aber so stark, dass der Unterschied nicht signifikant war.

3.6.6 Mittleres Behandlungsintervall

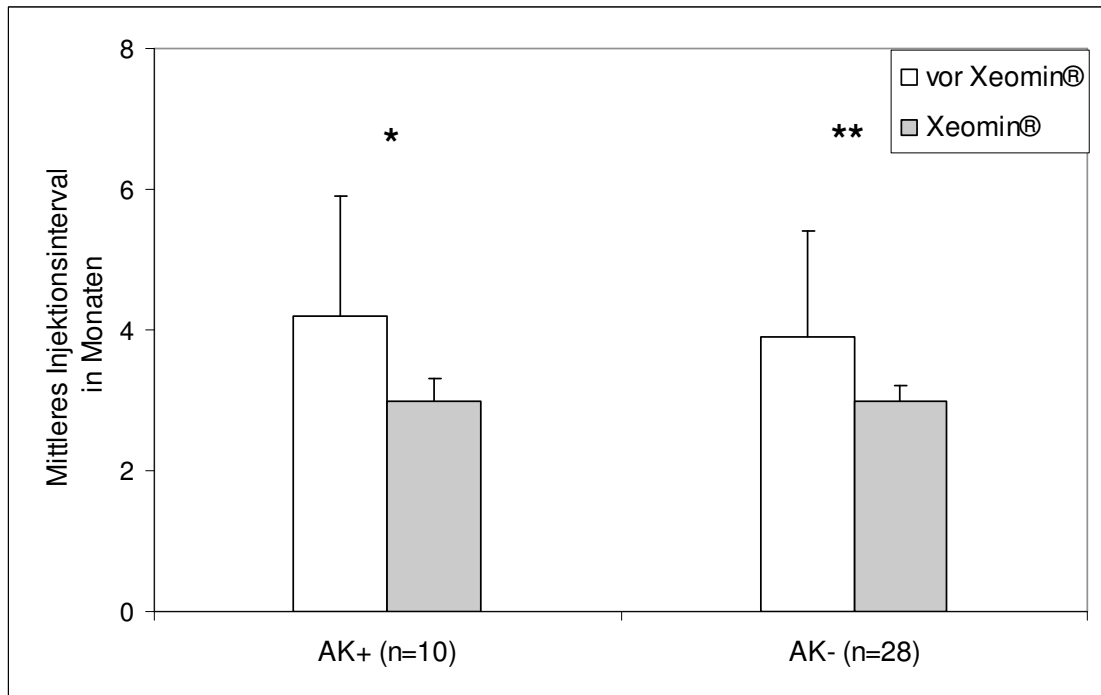


Abbildung 24 Mittleres Behandlungsintervall von Ak-positiven und Ak-negativen Dystonie-Patienten, die mit anderen BoNT-Präparaten vorbehandelt wurden (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Auch das mittlere Behandlungsintervall vor Umstellung auf die Xeomin® -Therapie war zwischen den Ak-positiven und -negativen Patienten nicht signifikant verschieden (Abbildung 24). Nach Umstellung auf die Xeomin® -Therapie fällt jedoch in beiden Gruppen eine Reduktion der Behandlungsintervalle auf. Für die Gruppe der Ak-negativen Patienten bestand eine hochsignifikante Verkürzung von $3,9 \pm 1,5$ Monaten auf $3,0 \pm 0,2$ Monate. Bei den Ak-positiven Patienten trat eine signifikante Reduktion der Intervalle von $4,2 \pm 1,7$ Monaten auf ebenfalls $3,0 \pm 0,3$ Monate ein.

3.6.7 Mittlere BoNT-Einzeldosis

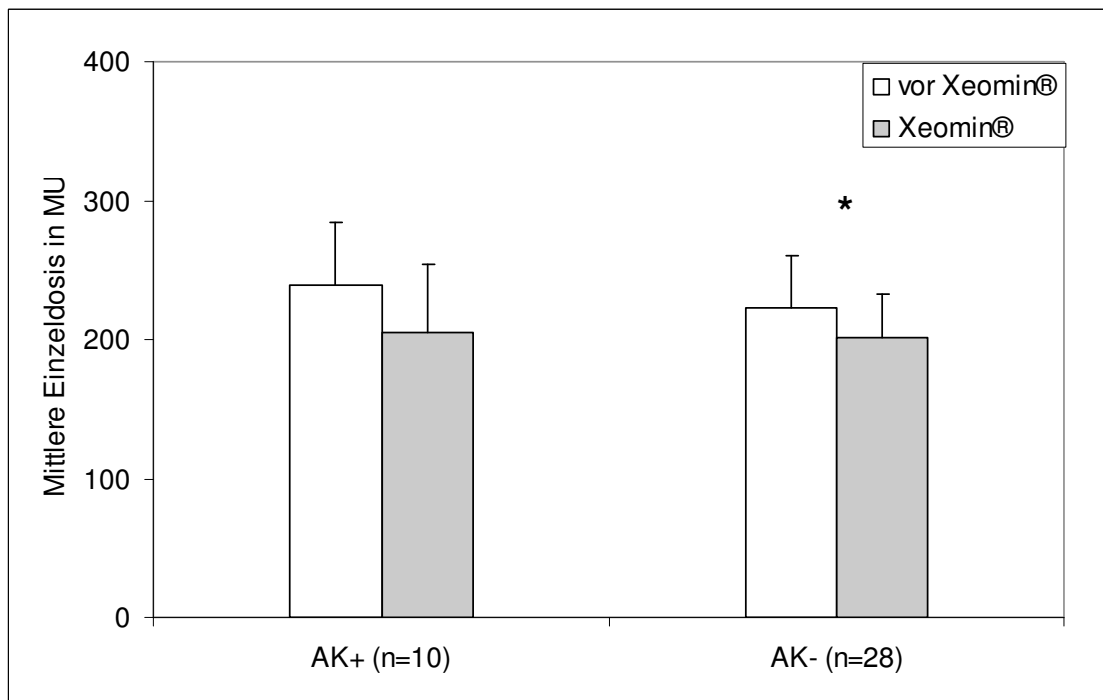


Abbildung 25 Mittlere BoNT-Einzeldosis von Ak-positiven und Ak-negativen Dystonie-Patienten, die mit anderen BoNT-Präparaten vorbehandelt wurden

Die BoNT-Einzeldosis war in der Ak-positiven Patientengruppe vor der Xeomin® - Umstellung mit $239,2 \pm 44,5$ MU tendenziell, jedoch nicht signifikant verschieden von der mittleren Einzeldosis bei den Ak-negativen Patienten ($222,6 \pm 38,0$ MU) (Abbildung 24). Der Vergleich der mittleren Einzeldosis ergab für die Gruppe der Patienten mit negativem Ak-Status eine signifikant niedrigere Einzeldosis unter Xeomin® im Vergleich zur vorangegangenen Behandlung auf $201,0 \pm 31,9$ MU. In der Gruppe der positiv getesteten Patienten verringerte sich die mittlere Einzeldosis auf $204,8 \pm 49,0$ MU. Es bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 25).

3.6.8 Kumulative BoNT-Dosis

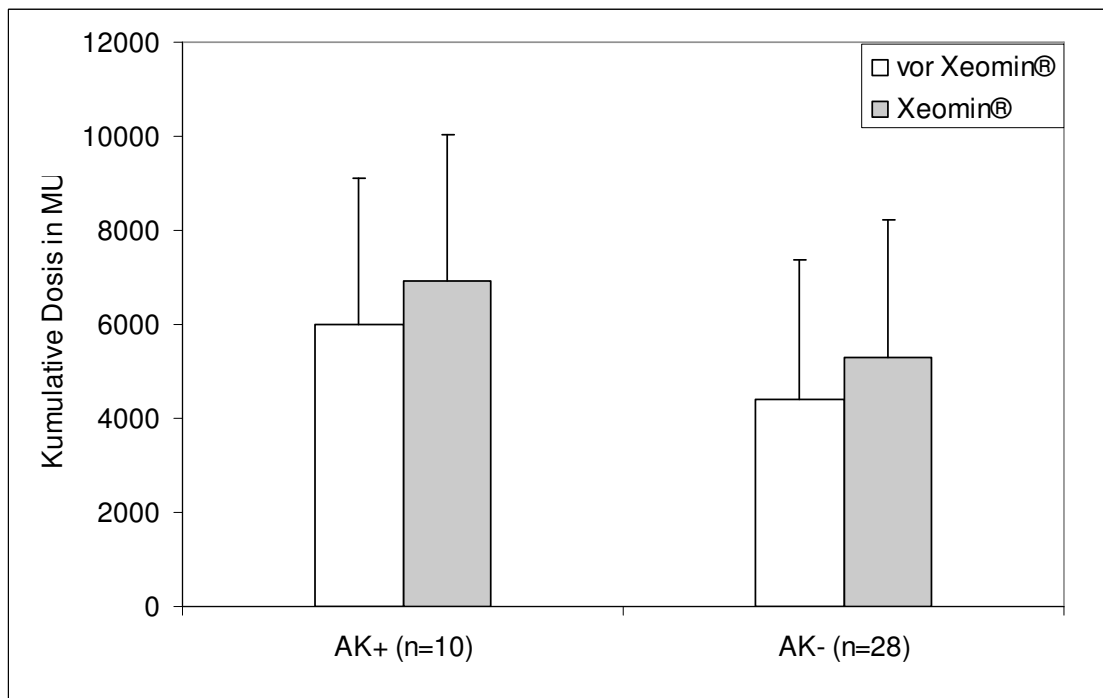


Abbildung 26 Kumulative BoNT-Dosis von Ak-positiven und Ak-negativen Dystonie-Patienten, die mit anderen BoNT-Präparaten vorbehandelt wurden

Die mittlere kumulative BoNT-Dosis lag bei den Ak-positiven Patienten vor der Xeomin®-Umstellung mit $5991,3 \pm 3163,6$ MU etwas höher als bei den Ak-negativen Patienten ($4416,5 \pm 2906,1$ MU) (Abbildung 26).

Der Unterschied wurde noch größer nach einjähriger Xeomin®-Therapie. Er war jedoch in beiden Fällen wegen der hohen Streubreite der Einzelwerte nicht signifikant.

4. Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete MDT zum Nachweis von nAk gegen BoNT-A ist ein In-vitro-Test, der alle Aspekte einer Intoxikation simuliert - Bindung des Toxins, Internalisierung und intrazelluläre toxische Wirkung (Pellett et al. 2007). Damit steht ein zuverlässiger Test zum Nachweis von ausschließlich nAk zur Verfügung. Ak gegen funktionsirrelevante Epitope des Neurotoxins werden hier nicht erfasst, was die Rate falsch positiver Ergebnisse minimiert (Goschel et al. 1997). Ein Vorteil gegenüber In-vivo-Tests (Mausprotektionstest, Mausletalitätstest) besteht zum einen in der Sensitivität der Ak-Erfassung, andererseits in der Reduktion der Versuchstieropfer (Dressler et al. 2000).

Wie nahezu jeder biologische Test bietet der MDT nicht ausschließlich Vorteile. Ein wesentlicher Nachteil des hochkomplexen Testsystems besteht in dem zeitlichen, finanziellen und gerätetechnischen Aufwand. Zudem erfordert die erfolgreiche Durchführung des Tests eine längere Einarbeitungszeit zum Erlernen der Präparation des empfindlichen Nerv-Muskel-Systems. Der Test selbst unterliegt erheblichen Schwankungen. Zudem ist die Reproduzierbarkeit limitiert, da der einzelne Test eine erhebliche Menge an Patientenmaterial benötigt (ca. 5ml Serum/Test). In der vorliegenden Arbeit waren jedoch für nahezu alle getesteten Patienten Doppeluntersuchungen möglich, was eine Sicherheit für den Nachweis von nAk, insbesondere im grenzwertigen Titer-Bereich, bot.

Die Ak-Nachweisschwelle des MDT wird in der Literatur zumeist mit 0,3 mU/ml angegeben und liegt damit deutlich unter den Nachweisschwellen alternativer In-vitro-Tests (Sesardic et al. 2004; Lange et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wahl der Schwellenwerte positiver Ak-Titer anhand der gefitteten Kalibrierungskurven für die BoNT-Präparate A4 und A5 getroffen, da diese Kurven die Streuung der Einzelwerte berücksichtigen. Die Nachweisschwelle wurde dabei möglichst wenig restriktiv gewählt,

um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden und einen Zusammenhang zwischen niedrigem Ak-Titer und der Therapieresponse untersuchen zu können. Dadurch ergab sich jedoch die Notwendigkeit, in Anlehnung an die aktuelle Literatur, einen Grenzbereich zu definieren (Kranz et al. 2008).

Die untere Nachweisschwelle für A4 betrug 0,2 mU/ml, daran schloss sich der Grenzbereich bis 1 mU/ml an. Für A5 ergab sich ab einem Titer von 0,6 mU/ml die Möglichkeit eines Ak-Nachweises, wiederum schließt sich der Grenzbereich bis 1 mU/ml an. Die unterschiedlichen Nachweisschwellen für die Lieferungen A4 und A5 erklären sich durch die unterschiedliche Wirksamkeit. Zudem ergaben die Messungen für A5 größere Schwankungen der Einzelwerte, welche in der gefitteten Kalibrierungskurve zur Bestimmung der Nachweisschwelle berücksichtigt wurden.

In der aktuellen Literatur ist eine signifikante Korrelation niedriger Ak-Titer mit klinischen Tests gezeigt worden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass niedrige Titer bereits einen Einfluss auf das Therapieergebnis haben können (Kranz et al. 2008). Ab einem Titer von 1 mU/ml ist eine deutliche Beeinträchtigung der klinischen Wirkung zu erwarten (Goschel et al. 1997).

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Schweregrad und Therapieresponse

Kenntnisse über die Wirksamkeit einer neuen Therapie sind von großem Interesse, insbesondere im Vergleich mit bewährten Therapien, um Empfehlungen für die Zukunft treffen zu können.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Gruppen von Patienten hinsichtlich der Änderung von Schweregrad der Erkrankung und Therapieresponse vor und nach der Umstellung der BoNT-Therapie auf das neue Präparat Xeomin[®] untersucht. Im Gesamtkollektiv der 38 vorbehandelten Patienten, also bei allen Patienten mit sowohl guter als auch nicht zufrieden stellender Response, ließ sich eine signifikante Reduktion des Schweregrades nach Umstellung auf die Behandlung mit Xeomin[®] nachweisen. Insbesondere fällt eine hochsignifikante Reduktion des Schweregrades in der Gruppe der

vorbehandelten Patienten mit sTV auf. Am Ende des BZ unterscheiden sich die Schweregrade zwischen den Gruppen mit und ohne sTV nicht mehr signifikant.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Therapieresponse. Auch hier zeigt sich eine signifikante Verbesserung der Therapieresponse im Gesamtkollektiv der 38 vorbehandelten Patienten. Eine hochsignifikante Verbesserung der Therapieresponse findet sich wiederum in der Gruppe der Patienten mit sTV. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen findet sich am Ende des BZ nicht mehr.

Durch die vorliegenden Daten kann also von einer sehr guten klinischen Wirksamkeit und Effektivität des Präparates Xeomin[®] ausgegangen werden, die den Therapien mit den BoNT-Präparaten der ersten Generation zumindest gleichwertig ist. Es besteht für die vorbehandelten Patienten mit guter Therapieresponse kein Unterschied zwischen der Wirkung von Xeomin[®] und der vorherigen Therapie. Diese Beobachtung deckt sich mit den Literaturangaben, nach denen es sich bei der Therapie mit Xeomin[®] um eine sichere und effektive Behandlung handelt (Benecke et al. 2005; Benecke 2009; Dressler 2010).

Ein anderes Bild zeigt sich in der Beobachtung der vorbehandelten Patienten mit sTV. Hier scheint eine Behandlung mit Xeomin[®] von größerem Erfolg zu sein als die Behandlung mit den Präparaten der ersten Generation. Die von einem sTV betroffenen Patienten reagierten auf die Xeomin[®]-Behandlung mit einer Reduktion des Schweregrades und einer Besserung der Therapieresponse auf ein Niveau, das ungefähr dem der vorbehandelten Patienten mit guter Response entspricht. Über die Ursachen dieser Beobachtung kann in der vorliegenden Arbeit lediglich spekuliert werden. Da nicht bei allen Patienten mit sTV ein positiver Ak-Titer gefunden wurde und niedrige Ak-Titer keinen wesentlichen Einfluss auf das Therapieergebnis zu haben scheinen (Kranz et al. 2008), bietet der theoretische Ansatz der verringerten Antigenität keine zufrieden stellende Erklärung. Möglicherweise spielen eine Placebowirkung und die Hoffnung der Patienten auf eine verbesserte Wirkung des neuen Präparates eine Rolle. Allerdings sind diese Vermutungen nicht belegt und sollten in geblindeten Studien abgeklärt werden.

Unstrittige Erkenntnis der vorliegenden Daten ist allerdings, dass ein Therapieversuch mit Xeomin® bei Patienten mit sTV gerechtfertigt ist und durchaus erneut gute Wirkung zeigen kann. Inwieweit diese Wirkung über die Dauer eines Jahres hinausgeht, muss wiederum Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Neben der Gruppe der vorbehandelten Patienten wurden im Rahmen der vorliegenden Studie auch solche Patienten beobachtet, die erstmals mit BoNT behandelt wurden. Bei diesen de novo Xeomin®-behandelten Patienten zeigte sich erwartungsgemäß eine hochsignifikante Reduktion des Schweregrades und eine ausnahmslos zufrieden stellende Therapieresponse. Primäres Therapieversagen trat in der vorliegenden Studie nicht auf. Insofern stützt diese Beobachtung die in zahlreichen Veröffentlichungen getroffene Aussage, dass es sich bei der Therapie mit Xeomin® um eine sichere und effektive Therapie handelt (Benecke et al. 2005). In klinischen Studien über einen Xeomin®-BZ von bis zu 3 Jahren wurde über das Ausbleiben von sTV berichtet (Benecke 2009; Dressler 2009; Dressler 2010).

In der vorliegenden Studie wurden die Seren der 20 de novo Xeomin®-behandelten Patienten am Ende des Beobachtungsintervalls im MDT auf das Vorliegen von nAk untersucht, um in Ergänzung zu den klinischen Befunden eine Aussage über die Ak-Prävalenz, insbesondere auch im niedrigen Titerbereich, treffen zu können.

Keiner der 20 untersuchten Patienten zeigte im einjährigen Verlauf ein sTV. Auch gelang bei keinem dieser Patienten ein Nachweis von nAk im MDT. Klinisch und experimentell ist damit zunächst im einjährigen Verlauf die geringere Immunogenität von Xeomin® bestätigt worden. Dennoch handelt es sich trotz fehlender Begleitproteine bei dem Neurotoxin um ein potentiell immunogenes, körperfremdes Eiweiß, sodass zunächst davon ausgegangen werden muss, dass ein AKTV, wenn auch seltener, so doch gelegentlich auftreten kann. Eine Neueinstellung auf Xeomin® ist aufgrund der vorliegenden Daten und besonders hinsichtlich der verringerten Proteinlast im Vergleich zu den anderen Präparaten sinnvoll und empfehlenswert.

Ob sich dieser Erfolg in der Behandlung mit Xeomin[®] auch im Langzeitverlauf fortsetzen wird, ist derzeit Untersuchungsziel einer weiteren Studie an der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock.

4.2.2 Titerverlauf Ak-positiver Patienten während der einjährigen Therapie mit Xeomin[®]

Während der einjährigen Beobachtungsphase wurde der Verlauf der Ak-Titer bei den insgesamt 10 positiv getesteten, ausschließlich vorbehandelten Patienten untersucht. Über eine solche Verlaufsbeobachtung ist bislang in der Literatur nicht berichtet worden.

7 der untersuchten Patienten wiesen vor Umstellung auf Xeomin[®] einen Ak-Titer auf. 2 dieser Patienten zeigten vor Beginn der Xeomin[®]-Therapie einen grenzwertigen Ak-Titer von 0,22 mU/ml. Nach einjähriger Xeomin[®]-Therapie war bei diesen beiden Patienten ein Ak-Nachweis nicht mehr möglich. Ob es sich dabei um eine echte Reduktion des Ak-Titers handelt, muss aufgrund der höheren Ak-Nachweisschwelle während der Untersuchungen mit der BoNT-Lieferung A5 offen bleiben. Alle weiteren 5 Patienten zeigten durchweg einen Anstieg der Ak-Titer. Vermutlich angesichts der geringen Fallzahl war die Änderung nicht signifikant, sodass die Aussagekraft hier begrenzt bleiben muss.

Bei 3 weiteren Patienten war eine Testung vor Beginn der Xeomin[®]-Therapie aus organisatorischen Gründen nicht möglich.

Zusammenfassend zeigt sich also, dass die Mehrzahl der Patienten auf die Umstellung des Präparates zunächst nicht mit einem Rückgang des Ak-Titers reagiert.

Eine Aufgabe in der vorliegenden Arbeit bestand darin, den beschriebenen Titerverlauf bei Ak-positiven Patienten während der laufenden Therapie mit Xeomin[®] zu dokumentieren und daraus Empfehlungen für die zukünftige Therapie dieser speziellen Patientengruppe abzuleiten. Da aus immunologischer Sicht bei einem durchaus geringen Zeitfenster von einem Jahr keine grundlegenden Veränderungen von Ak-Titern zu erwarten sind und zudem ein spontaner Abfall des Ak-Titers nach BoNT-Karenz erst nach etwa 16-60 Monaten beobachtet wurde (Dressler 2003), können die vorliegenden

Daten lediglich erste Anhaltspunkte liefern und als Grundlage für weitere Langzeit-Studien dienen.

4.2.3 Zusammenhang zwischen Ak-positiven Patienten und sekundärem Therapieversagen

Ein interessanter Aspekt dieser Arbeit und zugleich Ziel aktueller Veröffentlichungen ist die Erkenntnis, dass Patienten mit positivem Ak-Nachweis nicht in jedem Falle von einem sTV betroffen sind. Andererseits sind Patienten mit einem sTV nicht in jedem Falle Ak-positiv getestet worden (Kranz et al. 2008; Lange et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass lediglich 40% der Ak-positiven Patienten ein sTV aufwiesen. 60% der positiv getesteten Patienten berichten zum Ende des BZ über sehr gute und gute Therapieergebnisse. Es kann davon ausgegangen werden, dass niedrige Ak-Titer zunächst kein vollständiges Versagen der Therapie zur Folge haben. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob diese Patienten ein höheres Risiko tragen, später ein partielles oder vollständiges TV zu entwickeln.

Betrachtet man nun die von einem sTV betroffenen Patienten, so fällt auf, dass nicht mehr als 50% dieser Patienten auch Ak-Träger sind. Diese Beobachtung widerspiegelt die seit langem bestehende Vermutung, dass neben bekannten Einflussfaktoren wie Fehldiagnosen, Injektionsfehlern und Qualitätsmängel der BoNT-Präparate weitere noch unbekannte Ursachen für die Entwicklung eines sTV existieren (Lange et al. 2009). Insbesondere hier besteht weiterer Klärungsbedarf, da nur das fundierte Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen eine effektive Behandlung zur Folge haben kann.

4.2.4 Schweregrad und Therapieresponse bei Ak+ und Ak-

Für ein besseres Verständnis der Auswirkungen eines positiven Ak-Titers auf den Schweregrad der Erkrankung und die erreichte Therapieresponse erfolgte ein Vergleich dieser beiden Parameter zwischen den Gruppen mit und ohne Ak-Nachweis.

Für den Schweregrad zeigte sich dabei weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vor Umstellung der Therapie auf Xeomin[®], noch nach Umstellung. Eine tendenzielle jedoch nicht signifikante Besserung des Schweregrades war in beiden Gruppen zu verzeichnen.

Letztlich kann also davon ausgegangen werden, dass Ak-Titer, insbesondere im niedrigen Bereich, keine wesentliche Beeinträchtigung des Therapieergebnisses zur Folge haben. Diese Beobachtung deckt sich mit den aktuellen Literaturangaben (Kranz et al. 2008). Ak-positiv getestete Patienten profitieren nicht stärker von einer Umstellung auf Xeomin[®], als negativ getestete Patienten.

4.2.5 Diskussion der Risikofaktoren für die Entwicklung eines AKTV

Bereits seit dem ersten Auftreten von Versagen in der Therapie mit BoNT ist über mögliche Risikofaktoren spekuliert worden. In der Vergangenheit haben sich einige dieser Einflüsse als sicheres Risiko für die Entwicklung eines AKTV herausgestellt, während einzelne in der Literatur kontrovers diskutiert werden oder als Risikofaktoren sogar ausgeschlossen werden konnten.

Als sichere Risikofaktoren, welche in dieser Arbeit untersucht wurden, waren das Alter der Patienten zu Beginn der Therapie, die Höhe der Einzeldosen, sowie die Interinjektionsintervalle benannt worden (Dressler et al. 2000). Zusätzlich wurden in dieser Arbeit auch die BoNT-Kumulativedosen, die Anzahl der Injektionsserien und der Gesamtbehandlungszeitraum in die Analyse einbezogen.

Bei der Betrachtung des einzigen untersuchten patientenabhängigen Parameters „Alter zu TB“, fällt in den vorliegenden Daten kein wesentlicher Unterschied auf. Ein geringfügig niedrigeres Alter zu TB bei den Ak-positiv getesteten Patienten ist nicht signifikant. Eine Ursache dafür liegt möglicherweise in der geringen Anzahl der untersuchten Patienten mit einer relativ großen Streuung der Einzelwerte.

Letztlich gelang es in der vorliegenden Arbeit also nicht, das Alter zu TB als Risikofaktor zu bestätigen. Auch in vorherigen Studien sind die Ergebnisse diesbezüglich kontrovers diskutiert worden. Es ist sowohl über eindeutige Zusammenhänge berichtet worden (Jankovic et al. 1995; Kessler et al. 1999) als auch über eine Irrelevanz des Alters als Risikofaktor (Dressler et al. 2000).

Eine besondere Rolle spielt die Behandlung von Kindern mit infantiler Cerebralparese. Hier zeigten sich in der Vergangenheit Ak-Prävalenzen bis zu 30 %. Neben dem niedrigen Alter zu Beginn der Therapie kommt allerdings auch dem hohen Verhältnis zwischen applizierter Dosis und Körpergewicht eine Bedeutung zu, sodass die hohe Ak-Prävalenz nicht allein der Effekt des Alters sein dürfte (Herrmann et al. 2004).

Der Vergleich der therapielevanten Risikofaktoren Gesamtbehandlungszeitraum und Anzahl der Injektionsserien zwischen den Patientengruppen mit und ohne Ak-Nachweis stellt sich folgendermaßen dar:

Für die Gesamtbehandlungszeiträume zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den vorbehandelten Ak-positiven und -negativen Patienten. In der Literatur ist über einen Einfluss der Gesamtbehandlungszeiträume nicht berichtet worden. Jedoch wird davon ausgegangen, dass AKTV häufig im Zeitraum 60 bis 1500 Tage nach TB auftritt und nach Ablauf von 1500 Tagen ein eher seltenes Ereignis darstellt (Dressler 2002). Insofern war ein längerer Gesamtbehandlungszeitraum bei Ak-positiven Patienten nicht zu erwarten.

Der Vergleich der Injektionsserien zeigte ebenso keinen signifikanten Unterschied, jedoch einen Trend zu einer größeren Anzahl der Behandlungen bei Ak-positiven Patienten. In der Literatur ist für die Anzahl der Injektionsserien kein signifikanter Zusammenhang beschrieben worden (Jankovic et al. 1995), was sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen deckt.

Bei der Betrachtung des mittleren Behandlungsintervalles zeigte sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen. In Studien war ein Zusammenhang zwischen kürzeren Interinjektionsintervallen und der Entwicklung von nAk beschrieben worden. Insbesondere Booster-Injektionen galten als hochrisikoreich (Zuber et al. 1993; Greene et al. 1994), sie spielten bei den hier vorgestellten Untersuchungen allerdings keine Rolle, da sie bei den Patienten nicht angewandt wurden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich hier ein Trend zu längeren Interinjektionsintervallen bei Ak-positiv getesteten Patienten. Die Hälfte der Ak-positiven Patienten der vorliegenden Studie ist von einem AKTV betroffen. Dabei ist mit nachlassender Wirkung der Injektionen von einer mangelnden Compliance auszugehen, sodass die Patienten sich nicht mehr regelmäßig in der Sprechstunde vorstellen oder die Therapie sogar eine Zeitlang unterbrechen. Solche und weitere Einflüsse könnten für die Diskrepanz zwischen den hier vorliegenden Ergebnissen und den Literaturangaben verantwortlich sein.

Obwohl also ein Zusammenhang zwischen den Behandlungsintervallen und der Entwicklung eines AKTV hier nicht nachzuweisen war, ist davon auszugehen, dass mit kürzeren Interinjektionsintervallen das Risiko für die Entwicklung eines AKTV steigt. Für diese Annahme liefern Veröffentlichungen und die Beobachtung von Patienten, welche Booster-Injektionen erhielten, Hinweise (Zuber et al. 1993; Greene et al. 1994).

Die hier beobachtete signifikante Verkürzung des mittleren Behandlungsintervalles beider untersuchter Patientengruppen findet seine Erklärung im Studienprotokoll, welches ein relativ starres Behandlungsintervall von 3 Monaten vorsieht.

Zusammenfassend lässt sich also für keinen der bekannten Risikofaktoren im vorliegenden Patientengut ein signifikanter Einfluss auf die BoNT-Ak-Bildung nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist der geringe Stichprobenumfang mit teilweise erheblichen Schwankungen der Einzelwerte.

4.3 Ausblick

Es stellt sich die überaus interessante Frage, ob niedrige Ak-Titer einen prognostischen Wert für das spätere Entwickeln eines AKTV besitzen. Diese Frage kann in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Zudem bleibt offen, ob es während der Langzeittherapie mit dem weniger immunogenen Präparat Xeomin[®] zu einem weiteren Anstieg der Ak-Titer kommt. Hier bedarf es der weiteren Untersuchung

der grenzwertig positiv getesteten Patienten mit bislang guten Therapieergebnissen über einen längeren Zeitraum.

5. Zusammenfassung

Die Behandlung mit BoNT hat sich dank überzeugender Ergebnisse als Goldstandard in der Therapie der Dystonien durchgesetzt und wird im Rahmen der Leitlinien für Dystonien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit einem Evidenzgrad A belegt.

Bei dem intramuskulär zu injizierenden Neurotoxin handelt es sich um ein körperfremdes Protein mit potentiell immunisierender Wirkung auf den Zielorganismus. Bis zur Einführung des hoch aufgereinigten Neurotoxins Xeomin® war eine Behandlung mit BoNT stets durch eine Konfrontation des Immunsystems mit adjuvant wirkenden Begleitproteinen verbunden. Zusätzlich wird die immunstimulierende Wirkung getriggert durch regelmäßige Reinjektionen.

Die Bildung von nAk kann zu einem AKTV führen und ist eine häufige Ursache für das Versagen der Therapie mit BoNT. Die bekannten Risikofaktoren für das Entwickeln eines AKTV, hohe BoNT-Einzeldosis, geringes Interinjektionsintervall und Alter des Patienten zu TB, konnten am vorliegenden Patientengut, das aus 58 Patienten mit zervikaler Dystonie bestand, nicht reproduziert werden.

Zum Nachweis geringer Titer von nAk ist nach heutigem Stand des Wissens der MDT unter allen verfügbaren Tests am besten geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test für sämtliche Messungen verwendet. Die ermittelte Nachweisschwelle lag zwischen 0,2 und 0,6 mU/ml.

Der Verlauf der Titer bei den 10 positiv auf Ak getesteten Patienten im einjährigen Verlauf zeigt, dass es bei der Mehrzahl der Patienten auch nach Umstellung auf Xeomin® zu einem Anstieg des Titers kommt.

Die Behandlung mit Xeomin[®] stellt sich nach den vorliegenden Daten als sicher und effektiv dar. Für die Behandlung der Patientengruppe mit sTV scheint Xeomin[®] den bisherigen Präparaten in der Wirksamkeit überlegen zu sein, während die Präparate in der Behandlung der vorbehandelten Patienten mit guter Response gleichwertig sind.

Keiner der de novo Xeomin[®]-behandelten Patienten zeigte im einjährigen Verlauf eine Entwicklung von nAk. Damit ist das neue Präparat Xeomin[®] den Präparaten der ersten Generation im untersuchten Patientengut überlegen.

6. Thesen

1. Botulinumneurotoxin-A (BoNT-A) Präparate stellen eine effektive Behandlungsoption der zervikalen Dystonie mit sehr guter klinischer Wirksamkeit und Effektivität dar und wurden in den Therapieleitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit dem Evidenzgrad A versehen.
2. Eine wesentliche Limitation der BoNT-Therapie besteht in dem Auftreten neutralisierender Antikörper (nAk), das zu einem sekundären Therapieversagen (sTV) führen kann.
3. Um das Risiko eines Ak-bedingten sTV zu vermindern, wurde das hochgereinigte, von adjuvanten Komplexproteinen befreite BoNT-A-Präparat Xeomin[®] entwickelt.
4. In einer prospektiven klinischen Studie wurden 58 Dystoniepatienten unter der Behandlung mit Xeomin[®] in einjährigem Abstand mit dem hochsensitiven Maus-Diaphragma-Test (MDT) auf die Bildung von nAk untersucht.
5. 20 Patienten erhielten erstmals eine BoNT-Therapie (de novo Xeomin[®]-Patienten), 38 wurden von einem herkömmlichen, nicht komplexproteinfreien BoNT-A-Präparat (Botox[®] oder Dysport[®]) auf Xeomin[®] umgestellt.
6. Im Ergebnis sind Patienten mit einem positiven Ak-Nachweis nur in 40% (4/10) der Fälle von einem sTV betroffen.
7. Nur in 50% (4/8) der Fälle von sTV gelingt der Nachweis von nAk.
8. Während der einjährigen Therapie mit Xeomin[®] tritt bei de novo Xeomin[®]-Patienten eine Bildung von im MDT nachweisbaren nAk nicht auf.

9. Bei den 10 auf Xeomin[®] umgestellten Ak-positiven Patienten kommt es im einjährigen Verlauf zu keinem Titer-Rückgang, sondern bei 50% sogar zu einem Titer-Anstieg.
10. Werden Ak-positive Patienten mit Xeomin[®] behandelt, so führt dies im einjährigen Verlauf weder zu einer Verminderung des Schweregrades nach Tsui noch zu einer Verbesserung der Therapieresponse.
11. Jedoch profitieren Patienten, die von einem sTV betroffen sind, im einjährigen Verlauf von der Xeomin[®]-Therapie, indem sie eine Verminderung des Schweregrades und eine Verbesserung der Therapieresponse aufweisen.
12. De novo Xeomin[®]-Patienten zeigen eine hochsignifikante Reduktion des Schweregrades der Erkrankung.
13. Bekannte Risikofaktoren für das Auftreten von nAk, wie hohe BoNT-Einzeldosen und kurze Interinjektionsintervalle, lassen sich im vorliegenden Patientengut nicht vermehrt nachweisen.
14. Eine abschließende Beurteilung der Immunogenität des Präparates Xeomin[®] erfordert Langzeitstudien.

Literaturverzeichnis

- Adam, O. R., et al. (2007). "Treatment of dystonia." Parkinsonism Relat Disord **13 Suppl 3**: S362-8.
- Adler, C. H., et al. (2000). "Pharmacological and surgical options for the treatment of cervical dystonia." Neurology **55**(12 Suppl 5): S9-14.
- Benecke, R. (1999). "Pathophysiologische Mechanismen der Dystonien." Klin Neurophysiol **30**: 96-103.
- Benecke, R. (2009). "Xeomin in the treatment of cervical dystonia." Eur J Neurol **16 Suppl 2**: 6-10.
- Benecke, R., et al. (2007). "Botulinum toxin treatment of axial and cervical dystonia." Disabil Rehabil **29**(23): 1769-77.
- Benecke, R., et al. (2005). "A new botulinum toxin type A free of complexing proteins for treatment of cervical dystonia." Neurology **64**(11): 1949-51.
- Blasi, J., et al. (1993). "Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25." Nature **365**(6442): 160-3.
- Borodic, G. E., et al. (1995). "Antibodies to botulinum toxin." Neurology **45**(1): 204.
- Botox®-Fachinformation (2009). (PHARM ALLERGAN).
- Brin, M. F., et al. (2004). "Pharmacology of botulinum toxin therapy." In: Jankovic J, Comella C, Brin MF (eds) *Dystonia: etiology, clinical features and treatment*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 93-112.
- Comella, C. L., et al. (2005). "Comparison of botulinum toxin serotypes A and B for the treatment of cervical dystonia." Neurology **65**(9): 1423-9.
- Critchfield, J. (2002). "Considering the immune response to botulinum toxin." Clin J Pain **18**(6 Suppl): S133-41.
- Crowner, B. E. (2007). "Cervical dystonia: disease profile and clinical management." Phys Ther **87**(11): 1511-26.
- de Paiva, A., et al. (1999). "Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3200-5.
- Dong, M., et al. (2006). "SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A." Science **312**(5773): 592-6.
- Dressler, et al. (2000). "Botulinum toxin therapy: Risk factors for therapy failure." Mov Disord **15 (suppl 2)**: 51.
- Dressler, D. (1997). "Botulinum toxin therapy failure: causes, evaluation procedures and management strategies." Eur J Neurol **4**: 67-70.

- Dressler, D. (2002). "Clinical features of antibody-induced complete secondary failure of botulinum toxin therapy." Eur Neurol **48**(1): 26-9.
- Dressler, D. (2003). "Antikörpervermitteltes Versagen der Botulinum-Toxin-Therapie." Nervenarzt **74**(12): 1098-104.
- Dressler, D. (2003). "Antikörperinduziertes Therapieversagen: Symptomatik, Abklärung, Behandlung." Habilitationsschrift, Universität Rostock, 2003.
- Dressler, D. (2004). "Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy." Mov Disord **19 Suppl 8**: S92-S100.
- Dressler, D. (2006). "Pharmakologische Aspekte therapeutischer Botulinum-Toxin-Präparationen." Nervenarzt **77**(8): 912-21.
- Dressler, D. (2009). "Routine use of Xeomin in patients previously treated with Botox: long term results." Eur J Neurol **16 Suppl 2**: 2-5.
- Dressler, D. (2010). "Botulinum toxin for treatment of dystonia." Eur J Neurol **17 Suppl 1**: 88-96.
- Dressler, D., et al. (2002). "Botulinum toxin antibody type A titres after cessation of botulinum toxin therapy." Mov Disord **17**(1): 170-3.
- Dressler, D., et al. (2003). "Botulinum toxin type B in antibody-induced botulinum toxin type A therapy failure." J Neurol **250**(8): 967-9.
- Dressler, D., et al. (2001). "Botulinum toxin antibody testing: comparison between the immunoprecipitation assay and the mouse diaphragm assay." Eur Neurol **45**(4): 257-60.
- Dressler, D., et al. (2000). "Botulinum toxin antibody testing: comparison between the mouse protection assay and the mouse lethality assay." Mov Disord **15**(5): 973-6.
- Dressler, D., et al. (2002). "Antibody-induced botulinum toxin therapy failure: can it be overcome by increased botulinum toxin doses?" Eur Neurol **47**(2): 118-21.
- Dressler, D., et al. (2000). "Electromyographic quantification of the paralyzing effect of botulinum toxin in the sternocleidomastoid muscle." Eur Neurol **43**(1): 13-6.
- Dysport®-Fachinformation (2009). (IPSEN PHARMA).
- Erbguth, F. J. (1996). "Festlegung des Schweregrades der zervikalen Dystonie mittels Ratingskalen vor und nach Injektion." In: Das Krankheitsbild der zervikalen Dystonie ("Torticollis spasmodicus"), S.Roderer Verlag, Regensburg, pp 33-34
- Ferreira, J. J., et al. (2007). "The management of cervical dystonia." Expert Opin Pharmacother **8**(2): 129-40.
- Gonnering, R. S. (1988). "Negative antibody response to long-term treatment of facial spasm with botulinum toxin." Am J Ophthalmol **105**(3): 313-5.
- Goschel, H., et al. (1997). "Botulinum A toxin therapy: neutralizing and nonneutralizing antibodies--therapeutic consequences." Exp Neurol **147**(1): 96-102.

- Greene, P., et al. (1994). "Development of resistance to botulinum toxin type A in patients with torticollis." Mov Disord **9**(2): 213-7.
- Hallett, M., et al. (2009). "Treatment of focal dystonias with botulinum neurotoxin." Toxicon **54**(5): 628-33.
- Hanna, P. A., et al. (1998). "Mouse bioassay versus Western blot assay for botulinum toxin antibodies: correlation with clinical response." Neurology **50**(6): 1624-9.
- Herrmann, J., et al. (2004). "Clinical impact of antibody formation to botulinum toxin A in children." Ann Neurol **55**(5): 732-5.
- Houser, M. K., et al. (1998). "Further studies using higher doses of botulinum toxin type F for torticollis resistant to botulinum toxin type A." J Neurol Neurosurg Psychiatry **64**(5): 577-80.
- Jankovic, J. (2006). "Treatment of dystonia." Lancet Neurol **5**(10): 864-72.
- Jankovic, J., et al. (1995). "Response and immunoresistance to botulinum toxin injections." Neurology **45**(9): 1743-6.
- Jankovic, J., et al. (2003). "Comparison of efficacy and immunogenicity of original versus current botulinum toxin in cervical dystonia." Neurology **60**(7): 1186-8.
- Jost, W. H., et al. (2007). "Botulinum neurotoxin type A free of complexing proteins (XEOMIN) in focal dystonia." Drugs **67**(5): 669-83.
- Kessler, K. R., et al. (1997). "The EBD test--a clinical test for the detection of antibodies to botulinum toxin type A." Mov Disord **12**(1): 95-9.
- Kessler, K. R., et al. (1999). "Long-term treatment of cervical dystonia with botulinum toxin A: efficacy, safety, and antibody frequency. German Dystonia Study Group." J Neurol **246**(4): 265-74.
- Kranz, G., et al. (2008). "Neutralizing antibodies in dystonic patients who still respond well to botulinum toxin type A." Neurology **70**(2): 133-6.
- Kupsch, A., et al. (2006). "Pallidal deep-brain stimulation in primary generalized or segmental dystonia." N Engl J Med **355**(19): 1978-90.
- Lange, O., et al. (2009). "Neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing?" Clin Neuropharmacol **32**(4): 213-8.
- Mahrhold, S., et al. (2006). "The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves." FEBS Lett **580**(8): 2011-4.
- Maruta, T., et al. (2006). "Inhibition by human sera of botulinum neurotoxin-A binding to synaptosomes: a new assay for blocking and non-blocking antibodies." J Neurosci Methods **151**(2): 90-6.
- Messner, M., et al. (2009). "Wie gefährlich ist die medizinische Anwendung von Botulinumtoxin?" Nervenheilkunde **28**: 891-5.

- Mohammadi, B., et al. (2009). "A long-term follow-up of botulinum toxin A in cervical dystonia." Neurol Res **31**(5): 463-6.
- Munchau, A., et al. (2001). "Prospective study of selective peripheral denervation for botulinum-toxin resistant patients with cervical dystonia." Brain **124**(Pt 4): 769-83.
- Naumann, M. (1998). Botulinumtoxin Wirkprinzip und klinische Anwendung. UNI-MED, Bremen, pp 12-18
- Naumann, M., et al. (1998). "Depletion of neutralising antibodies resensitises a secondary non-responder to botulinum A neurotoxin." J Neurol Neurosurg Psychiatry **65**(6): 924-7.
- Neurobloc®-Fachinformation (2010). (Eisai Manufacturing Limited).
- Neychev, V. K., et al. (2008). "The basal ganglia and cerebellum interact in the expression of dystonic movement." Brain **131**(Pt 9): 2499-509.
- Pappert, E. J., et al. (2008). "Botulinum toxin type B vs. type A in toxin-naive patients with cervical dystonia: Randomized, double-blind, noninferiority trial." Mov Disord **23**(4): 510-7.
- Pearce, L. B., et al. (1994). "Measurement of botulinum toxin activity: evaluation of the lethality assay." Toxicol Appl Pharmacol **128**(1): 69-77.
- Pellett, S., et al. (2007). "A neuronal cell-based botulinum neurotoxin assay for highly sensitive and specific detection of neutralizing serum antibodies." FEBS Lett **581**(25): 4803-8.
- Reichel, G., et al. (2009). "Zur Phänomenologie der zervikalen Dystonien." Fortschr Neurol Psychiatr **77**(5): 272-7.
- Rosales, R. L., et al. (2006). "Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations." Eur J Neurol **13 Suppl 1**: 2-10.
- Schrader, C., et al. (2009). "Tiefe Hirnstimulation bei Dystonie. Empfehlungen der deutschen Arbeitsgemeinschaft Tiefe Hirnstimulation." Nervenarzt **80**(6): 656-61.
- Schwarz, C. S., et al. (2009). "Genetics and treatment of dystonia." Neurol Clin **27**(3): 697-718.
- Sesardic, D., et al. (2004). "Detection of antibodies against botulinum toxins." Mov Disord **19 Suppl 8**: S85-91.
- Shanker, V., et al. (2009). "What's new in dystonia?" Curr Neurol Neurosci Rep **9**(4): 278-84.
- Simpson, D. M., et al. (2008). "Assessment: Botulinum neurotoxin for the treatment of movement disorders (an evidence-based review): report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology." Neurology **70**(19): 1699-706.
- Velickovic, M., et al. (2001). "Cervical dystonia pathophysiology and treatment options." Drugs **61**(13): 1921-43.

- Vidailhet, M., et al. (2007). "Bilateral, pallidal, deep-brain stimulation in primary generalised dystonia: a prospective 3 year follow-up study." Lancet Neurol **6**(3): 223-9.
- Voller, B., et al. (2004). "Ninhydrin sweat test: a simple method for detecting antibodies neutralizing botulinum toxin type A." Mov Disord **19**(8): 943-7.
- Wohlfarth, K., et al. (2008). "Biological activity of two botulinum toxin type A complexes (Dysport and Botox) in volunteers: a double-blind, randomized, dose-ranging study." JNeurol **255**(12): 1932-9.
- Xeomin®-Fachinformation (2009). (MERZ Pharma).
- Zuber, M., et al. (1993). "Botulinum antibodies in dystonic patients treated with type A botulinum toxin: frequency and significance." Neurology **43**(9): 1715-8.

Anhang – Tabelle 1 Patientendaten und Ergebnisse der Ak-Bestimmung

Patienten- code	Geschlecht	Alter TB	Diagnose	Behandlungs- strategie ^a	BZ	Schweregrad		Response		Ak-Status		Ak-Titer	
						Tsui Beginn	Tsui nach Therapie	vor Xeomin	Xeomin	vor Xeomin	Xeomin	vor Xeomin	Xeomin
A.G.	W	22	Torticollis	2	12	4	4	2	3	negativ	negativ		
A.Scha.	W	20	Torticollis	2	16	6	2	3	1	positiv	positiv	0,62	0,85
A.Schr.	W	51	Retrocollis	1	12	6	1	X	2	negativ			
A.Sd.	W	42	myokl Torticollis	1	12	6	4	X	2	negativ			
A.W.	W	37	Torticollis	1	15	10	1	X	1	negativ			
B.W.	M	55	Laterocollis	3	10	10	4	4	2	nicht bestimmt	positiv	n. bestimmt	0,62
C.Br.	W	41	Laterocollis	1	12	6	4	X	2	negativ			
C.Bu.	M	39	myokl Torticollis	2	16	2	2	2	2	positiv	positiv	1	2,44
C.G.	W	68	Torticollis	1	16	8	4	X	3	negativ			
C.K.	W	39	Torticollis	2	15	4	4	2	2	negativ			
C.P.	W	69	myokl Laterocollis	2	15	4	4	3	2	positiv	positiv	0,62	0,7
D.H.	W	57	Laterocollis	1	11	8	2	X	2	negativ			
E.J.	W	67	Torticollis	2	11	6	4	3	2	negativ			
E.R.	W	52	Torticollis	2	13	2	4	2	2	negativ			
E.S.	W	56	dyst Kopftremor	1	15	2	1	X	2	negativ			
E.W.	W	63	Torticollis	1	12	12	4	X	2	negativ			
F.Z.	M	45	Torticollis	2	13	4	4	2	2	negativ			
G.B.	M	77	Torticollis	2	14	4	4	2	2	negativ			
G.S.	W	47	dyst Kopftremor	2	14	2	2	2	2	negativ			
H.B.	W	47	Torticollis	2	10	2	4	2	2	positiv	positiv	1,16	1,62
H.F.	M	60	Torticollis	2	12	6	6	2	3	negativ			
H.G.	M	40	Torticollis	2	9	4	4	2	2	negativ			
H.K.	M	47	Torticollis	2	12	1	1	2	1	negativ			
H.Pe.	W	53	dyst Kopftremor	1	12	4	4	X	1	negativ			
H.Po.	M	49	Torticollis	1	16	12	8	X	3	negativ			
H.R.	W	64	Torticollis	2	12	1	1	2	2	negativ			
H.S.	W	56	Torticollis	2	12	4	4	2	2	negativ			
H.Z.	M	43	myokl Torticollis	1	17	4	1	X	1	negativ			
I.A.	W	63	Torticollis	2	11	4	4	2	2	negativ			
I.S.	W	39	Torticollis	2	17	2	2	2	2	negativ			

Anhang – Tabelle 1 Patientendaten und Ergebnisse der Ak-Bestimmung (Fortsetzung)

I.V.	W	52	Torticollis	2	12	2	2	2	2	negativ			
I.W.	W	35	Torticollis	2	11	4	4	2	2	negativ			
J.B.	M	41	Torticollis	2	12	2	1	2	2	negativ			
J.H.	M	33	Torticollis	2	11	2	2	1	1	negativ			
J.L.	M	26	Torticollis	3	15	10	8	4	3	negativ			
J.T.	W	34	Torticollis	3	15	6	2	4	1	negativ			
J.v.L.	M	53	Torticollis	3	11	6	6	3	3	nicht bestimmt	positiv	n. bestimmt	0,5
K.K.	M	61	Torticollis	2	12	2	2	2	2	negativ			
K.L.	W	53	Torticollis	2	16	2	1	2	2	negativ			
K.S.	M	62	Torticollis	1	15	10	6	X	2	negativ			
L.F.	M	36	Torticollis	1	12	6	4	X	2	negativ			
M.B.	M	45	Torticollis	1	10	6	2	X	2	negativ			
M.F.	W	40	Torticollis	3	14	6	4	3	2	negativ			
M.K.	W	43	Torticollis	3	17	6	4	3	1	positiv	positiv	0,69	1,84
M.L.	W	60	Laterocollis	1	20	4	1	X	1	negativ			
M.R.	W	43	dyst Kopftremor	2	13	6	4	3	2	negativ			
O.S.	W	50	Laterocollis	1	15	6	2	X	2	negativ			
P.R.	M	36	Torticollis	2	12	2	2	2	2	negativ			
R.D.	W	54	myokl Retrocollis	1	14	4	1	X	1	negativ			
R.N.	W	52	Torticollis	2	15	4	2	3	2	negativ			
R.Z.	W	78	dyst Kopftremor	1	12	4	1	X	2	negativ			
S.B.	M	68	Torticollis	1	11	10	6	X	2	negativ			
S.D.	W	29	myokl Laterocollis	2	11	4	4	2	2	positiv	negativ	0,22	neg
S.H.	M	48	Laterocollis	3	19	6	2	4	1	positiv	negativ	0,22	neg
S.K.	W	34	Torticollis	2	15	6	4	2	2	negativ			
T.K.	M	46	Laterocollis	2	11	4	4	2	2	nicht bestimmt	positiv	n. bestimmt	0,62
T.S.	M	35	Torticollis	3	17	6	4	3	2	negativ			
T.W.	M	44	Laterocollis	1	17	10	2	X	1	negativ			
MW		48			13,4	5,1	3,2	2,4	1,9				
SD		13			2,4	2,8	1,7	0,7	0,6				

^a 1 – de novo Xeomin[®]-behandelte Patienten, 2 – vorbehandelte Patienten mit guter Response, 3 – Therapie bei sTV

Anhang – Tabelle 2 Behandlungsparameter

Patienten- code	Behandlungsdauer [mon]			Anzahl Injektionen			mittleres Injektionsintervall [mon]			Mittlere Einzeldosis [MU]			Kumulativedosis [MU]		
	vor Xeomin	Xeomin	Total	vor Xeomin	Xeomin	Total	vor Xeomin	Xeomin	gesamt	vor Xeomin	Xeomin	Total	vor Xeomin	Xeomin	Total
A.G.	162	12	174	24	4	28	6,8	3	6,2	200	225	204	4800	900	5700
A.Scha.	174	16	190	39	5	44	4,5	3,2	4,3	240	190	234	9360	950	10310
A.Schr.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	100	100	0	400	400
A.Sd.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	200	200	0	800	800
A.W.	0	15	15	0	5	5	0	3	3	0	200	200	0	1000	1000
B.W.	151	10	161	41	3	44	3,7	3,3	3,7	267	233	22	267	700	967
C.Br.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	150	150	0	600	600
C.Bu.	54	16	70	15	5	20	3,6	3,2	3,5	267	200	250	4000	1000	5000
C.G.	0	16	16	0	5	5	0	3,2	3,2	0	200	200	0	1000	1000
C.K.	118	15	133	34	5	39	3,5	3	3,4	194	200	219	7553	1000	8553
C.P.	97	15	112	28	5	33	3,5	3	3,4	127	100	123	3560	500	4060
D.H.	0	11	11	0	4	4	0	2,8	2,8	0	200	200	0	800	800
E.J.	124	11	135	32	4	36	3,9	2,8	3,8	167	200	170	5333	800	6133
E.R.	47	13	60	15	4	19	3,1	3,3	3,2	267	238	261	4000	950	4950
E.S.	0	15	15	0	4	4	0	3,8	3,8	0	67,5	68	0	270	270
E.W.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	200	200	0	800	800
F.Z.	26	13	39	8	4	12	3,2	3,2	3,2	213	200	209	1707	800	2507
G.B.	29	14	43	10	5	15	2,9	2,8	2,9	240	200	227	2400	1000	3400
G.S.	46	14	60	15	4	19	3,1	3,5	3,2	103	100	102	1545	400	1945
H.B.	165	10	175	38	4	42	4,4	2,5	4,2	240	225	239	9120	900	10020
H.F.	33	12	45	10	4	14	3,3	3	3,2	267	225	255	2667	900	3567
H.G.	6	9	15	2	3	5	3	3	3	240	200	216	480	600	1080
H.K.	94	12	106	27	4	31	3,5	3	3,4	209	200	208	5652	800	6452
H.Pe.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	100	100	0	400	400
H.Po.	0	16	16	0	5	5	0	3,2	3,2	0	270	270	0	1350	1350
H.R.	53	12	65	16	4	20	3,3	3	3,3	133	100	127	2133	400	2533
H.S.	141	12	153	35	4	39	4	3	3,9	227	200	224	7933	800	8733
H.Z.	0	17	17	0	5	5	0	3,4	3,4	0	100	100	0	500	500
I.A.	37	11	48	6	4	10	6	2,8	4,7	213	200	208	1280	800	2080
I.S.	189	17	206	21	6	27	9	2,8	7,6	240	233	239	5040	1400	6440

Anhang – Tabelle 2 Behandlungsparameter (Fortsetzung)

I.V.	54	12	66	18	4	22	3	3	3	225	200	215	4053	675	4728
I.W.	77	11	88	36	4	40	2,1	2,8	2,2	210	225	211	7548	900	8448
J.B.	111	12	123	36	4	40	3,1	3	3,1	267	200	260	9600	800	10400
J.H.	91	11	102	28	4	32	3,3	2,8	3,2	200	225	203	5600	900	6500
J.L.	191	15	206	41	5	46	4,7	3	4,5	248	200	243	10188	1000	11188
J.T.	36	15	51	6	5	11	6	3	4,6	240	200	222	1440	1000	2440
J.v.L.	152	11	163	17	4	21	8,9	2,8	7,8	300	300	300	5100	1200	6300
K.K.	9	12	21	3	4	7	3	3	3	236	200	215	707	800	1507
K.L.	108	16	124	28	5	33	3,9	3,2	3,8	231	170	222	6468	850	7318
K.S.	0	15	15	0	5	5	0	3	3	0	200	200	0	1000	1000
L.F.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	188	188	0	750	750
M.B.	0	10	10	0	3	3	0	3,3	3,3	0	200	200	0	600	600
M.F.	25	14	39	7	5	12	3,6	2,8	3,3	240	230	236	1680	1150	2830
M.K.	145	17	162	35	5	40	4,1	3,4	4,1	240	200	235	8400	1000	9400
M.L.	0	20	20	0	7	7	0	2,9	2,9	0	100	100	0	700	700
M.R.	92	13	105	29	5	34	3,2	2,6	3,1	214	200	212	6196	1000	7196
O.S.	0	15	15	0	5	5	0	3	3	0	100	100	0	500	500
P.R.	131	12	143	41	4	45	3,2	3	3,2	233	200	230	9539	800	10339
R.D.	0	14	14	0	5	5	0	2,8	2,8	0	108	108	0	540	540
R.N.	38	15	53	12	5	17	3,2	3	3,1	240	200	228	2880	1000	3880
R.Z.	0	12	12	0	4	4	0	3	3	0	100	100	0	400	400
S.B.	0	11	11	0	4	4	0	2,8	2,8	0	200	200	0	800	800
S.D.	60	11	71	19	4	23	3,2	2,8	3,1	232	200	226	4402	800	5202
S.H.	21	19	40	7	7	14	3	2,7	2,9	240	200	220	1680	1400	3080
S.K.	19	15	34	6	4	10	3,2	3,8	3,4	240	225	234	1440	900	2340
T.K.	49	11	60	14	4	18	3,5	2,8	3,3	240	200	231	3360	800	4160
T.S.	82	17	99	15	5	20	5,5	3,4	5	258	200	243	3865	1000	4865
T.W.	0	17	17	0	6	6	0	2,8	2,8	0	200	200	0	1200	1200
MW	56	13	69	14	4	19	3	3	4	148	187	195	2982	827	3810
SD	60	2	60	14	1	14	2	0	1	113	48	57	3206	251	3289

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, das Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Datum

.....
Unterschrift

Danksagung

Für die Überlassung des Themas sowie die geduldige und kompetente Betreuung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. med. R. Benecke herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. E. Mix für die umfassende fachliche und persönliche Unterstützung, für konstruktive Kritik und grenzenlose Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich bei all jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedlichste Weise während der Entstehung dieser Dissertation unterstützt haben.