

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universität
Rostock

Direktor: Prof. Dr. Reiner Benecke

Sektion Neuroimmunologie: Prof. Dr. Uwe K. Zettl

**Einfluss wiederholter intrathekaler Applikationen von
Triamcinolon acetonid auf Neurofilament, Tau-Protein und
Protein S-100B im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit
Multipler Sklerose**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von Frank Kamin,
geb. am 13.06.1980 in Rostock

Rostock, 2014

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. U.K. Zettl
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Tuman
3. Gutachter: Prof. Dr. J.H. Faiss

Datum der Einreichung: 21.01.2015

Datum der Verteidigung: 29.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose	1
1.1.1	Symptomatik und klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	1
1.1.2	Ätiologie der Multiplen Sklerose	2
1.1.3	Pathogenese der Multiplen Sklerose	4
1.1.4	Pathophysiologie der Multiplen Sklerose	5
1.1.5	Diagnostische Kriterien der Multiplen Sklerose	7
1.1.6	Therapie der Multiplen Sklerose	11
1.1.7	Glukokortikosteroide in der Therapie der Multiplen Sklerose	15
1.2	Liquor cerebrospinalis	21
1.2.1	Anatomie und Physiologie	21
1.2.2	Liquorpunktion	22
1.2.3	Liquoranalytik	23
1.2.4	Liquorbefunde bei Multipler Sklerose	26
1.2.5	Biomarker für pathogenetische Prozesse der Multiplen Sklerose	26
1.2.5.1	Neurofilamente	27
1.2.5.2	Tau-Protein	31
1.2.5.3	Protein S-100B	33
2	Zielstellung	35
3	Patienten, Material und Methoden	36
3.1	Patienten und Studiendesign	36
3.1.1	Triamcinolon acetonid - Therapieschema	39
3.2	Analyse des Liquor cerebrospinalis	40
3.2.1	Messung des Neurofilamentes	41
3.2.2	Messung des Tau-Proteins	44
3.2.3	Messung des Proteins S-100B	46
3.2.4	Messung der Liquor-Routine-Parameter	48
3.3	Klinische Verlaufsparemeter	48
3.4	Statistische Analyse	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Neurofilament	51
4.2	Tau-Protein	54
4.3	Protein S-100B	55
4.4	Liquor-Basisparameter	56
4.5	Klinische Parameter	58
4.5.1	Expanded Disability Status Scale	58

4.5.2	Modifizierte Ashworthscale	59
4.5.3	Gehstrecke.....	62
4.5.4	25-Fuß-Test.....	64
4.5.5	Lebensqualität	64
4.5.6	Blasenfunktion	67
4.6	Zusammenhänge	69
4.6.1	Beziehungen des NfH zu Liquorbasis- und klinischen Parametern	69
4.6.2	Beziehungen des Tau-Proteins zu Liquorbasis- und klinischen Parametern	70
4.6.3	Beziehungen des Protein S-100B zu Liquorbasis- und klinischen Parametern	73
5	Diskussion	74
6	Literaturverzeichnis.....	85
7	Anhang	98
7.1	Tabellenverzeichnis	98
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	99
7.3	Abkürzungsverzeichnis.....	101
	Publikationen	103
	Thesen.....	104
	Erklärung.....	107
	Danksagung	108

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), welche mit Demyelinisierung, dem Verlust von Neuronen und konsekutiver Astroglieose sowie zunehmender körperlicher Behinderung einhergeht [3].

1.1.1 Symptomatik und klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

In Deutschland sind 100-150 Patienten pro 100.000 Einwohner von der MS betroffen. Pro Jahr sind 3000 bis 5000 Neuerkrankungen zu verzeichnen. Das Verhältnis von weiblichen gegenüber männlichen Patienten beträgt 2:1 [25, 176]. Das periventrikuläre Marklager, der Nervus opticus, die Pons und das zervikale Rückenmark sind die häufigsten Lokalisationen, in denen sich die Entzündung herdförmig manifestiert. Prinzipiell kann jede Struktur des ZNS betroffen sein. Daraus resultiert eine extreme Variabilität der Symptomatik. Nahezu jedes zentrale neurologische Symptom kann im Rahmen der MS auftreten. In 70% der Fälle erfolgt die Erstmanifestation monosymptomatisch. Das Spektrum der Symptommhäufigkeiten variiert zwischen der Erstmanifestation und dem Verlauf (Tab. 1).

Tabelle 1: Klinische Symptomatik der MS zu Beginn und im Verlauf der Erkrankung modifiziert nach Poser et al. 1982 [176] in [25].

Symptomatik	Initial (%)	Im Verlauf (%)
Paresen	43	82
Hirnstamm / Kleinhirn	24	76
Sensibilität	43	84
Blase / Darm	9	58
Nervus Optikus	33	62
Kognitive Störungen	4	36
Augenmotilität	14	35

Oft vernachlässigte, jedoch häufige und die Lebensqualität einschränkende Symptome betreffen das autonome Nervensystem. Dazu gehören Störungen der Blasen- und Mastdarmfunktion, die Beeinträchtigung der Sexualfunktion [129] und selten Störungen der Thermoregulation und der kardiovaskulären Regulation [4]. Eine große Anzahl von

MS-Patienten leidet zudem an abnormer physischer und/oder psychischer Erschöpfbarkeit, der sogenannten *Fatigue* [194], sowie an Schmerzen, die z.B. durch Spastik und Fehlhaltung begünstigt werden [13].

Es werden grundsätzlich 3 klinische Verlaufsformen der MS unterschieden [131]:

- Schubförmig remittierende MS (RRMS)
- Sekundär chronisch-progrediente MS (SPMS)
- Primär chronisch-progrediente MS (PPMS)

In 80-90% der Fälle beginnt die Erkrankung mit einem Schubereignis. Es treten subakut neurologische Symptome auf, die länger als 24 Stunden persistieren. Zwischen den Schüben tritt eine Remission ein und es bestehen keine Beschwerden oder eine stabile Residualsymptomatik. Bei den meisten Patienten mit einem schubförmigen Verlauf geht die Symptomatik nach einigen Jahren in die sekundär chronisch-progrediente Verlaufsform über. Dabei kommt es zu einer schleichenden Zunahme der Behinderung und auch intermittierende, aufgesetzte Schübe können auftreten. Etwa 40 % der RRMS-Patienten gehen während der ersten 10 Jahre des Krankheitsverlaufes in die SPMS über. 10-20% der Patienten erkranken an einer PPMS, wobei sich diese Verlaufsform durch eine primäre, schleichende Zunahme der neurologischen Symptomatik auszeichnet. Patienten mit PPMS erkranken später, haben eine schlechtere Prognose und die spinale Symptomatik überwiegt gegenüber den zerebralen Symptomen [220]. Darüber hinaus wird eine weitere Patientengruppe beschrieben, die eine primäre langsam voranschreitende Symptomatik in Kombination mit aufgesetzten Schubereignissen aufweist. Diese klinische Untergruppe wird als *progressiv-schubförmige* MS bezeichnet [131].

1.1.2 Ätiologie der Multiplen Sklerose

Die Ätiologie der MS ist trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass die Entstehung und der Verlauf der MS durch genetische und Umweltfaktoren beeinflusst werden.

Genetik

Die MS variiert signifikant in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund des Patienten. Eine hohe Prävalenz findet sich unter Kaukasiern, wogegen die Erkrankung unter Asiaten und Afrikanern seltener auftritt [47]. Das Risiko eine MS zu entwickeln, ist bei blutsverwandten Familienmitgliedern höher als in der Normalbevölkerung. Bei eineiigen Zwillingen ist es um das 300-fache, bei Geschwistern um das 20-40-fache und bei Halbgeschwistern um das 10-fache gegenüber der Prävalenz der Normalbevölkerung von

0,1 Prozent erhöht [58]. Eingehetete Familienmitglieder zeigen keine erhöhte Prävalenz der Erkrankung [25, 59].

Für das Erkrankungsrisiko ist eine große Anzahl von interagierenden Genen verantwortlich. Im Rahmen der sogenannten *polygenetischen Vererbung* weisen die einzelnen Gene für sich genommen eine geringe Penetration auf und üben einen moderaten, kumulierenden Effekt aus [48, 101]. Für den Krankheitsverlauf spielen Gen-Gen und Gen-Umweltinteraktionen eine bedeutende Rolle. Risikogene variieren in Abhängigkeit von der Population und den Umweltfaktoren [157]. Funktionell regulieren diese Gene Faktoren der Immunantwort oder steuern die Zusammensetzung und Stabilität des Myelins [1, 140]. Auch das Ansprechen auf bestimmte Therapieformen kann durch genetische Faktoren beeinflusst werden. Bisher wurde kein eindeutiges krankheitsauslösendes Gen nachgewiesen. Eine herausragende Rolle innerhalb des komplexen genetischen Hintergrundes der MS spielen humane Leukozytenantigene (HLA) der Klasse II [75, 133, 215]. Diese Gene und ihre Produkte stehen mit einem fast vierfach erhöhten relativen Risiko für die Entwicklung einer MS in nordeuropäischen Individuen im Zusammenhang [64]. Weiterhin werden Assoziationen zwischen der MS und den Genen für das Apolipoprotein E und für bestimmte Zytokine diskutiert [42, 171, 215].

Umwelt

Migrationsstudien sprechen für das Vorhandensein von Umweltfaktoren. Bei Migranten, die während ihrer ersten zwei Lebensdekaden von einem Hochrisikogebiet in ein Niedrigrisikogebiet auswanderten, wurde die Erkrankungswahrscheinlichkeit geringer. Menschen, die von einem Niedrigrisikogebiet in ein Hochrisikogebiet zogen, tendierten dazu, das geringere Risiko des Ursprungslandes zu behalten [72]. Virale Infektionen des oberen Respirationstraktes sind mit einer erhöhten Schubrate und Schubdauer assoziiert [35]. Als weiterer Umweltfaktor steht Stress mit Exazerbationen der MS im Zusammenhang. Die Assoziation von Stress und Exazerbation ist komplex und im Einzelfall nicht vorherzusagen [11, 145]. Physische Traumen, insbesondere Schädelhirntraumen, stehen dagegen in keinem Zusammenhang mit der Manifestation einer MS [80].

1.1.3 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Es werden drei wesentliche Hypothesen der Pathogenese der MS unterschieden [234]:

- Autoimmunhypothese
- Infektionshypothese
- Neurodegenerationshypothese

Autoimmunhypothese

Das Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und seine Varianten hat viele Erkenntnisse über die Pathogenese von chronisch entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS erbracht. Das EAE-Modell beinhaltet eine entzündliche Erkrankung des ZNS mit verschiedenen Graden der Demyelinisierung, die durch die Immunisierung mit Myelinantigenen ausgelöst wird [210]. Das Tiermodell hat zur allgemein akzeptierten Hypothese geführt, dass die MS aufgrund einer Autoimmunantwort gegenüber einem Autoantigen in einem dafür suszeptiblen Organismus auftritt. Ein wesentlicher Mechanismus in diesem Zusammenhang ist das sogenannte *epitope spreading*. Nach Injektion eines einzelnen Myelinproteinepitopes werden T-Zellen auch gegen andere Epitope desselben Proteins sowie gegen Epitope anderer Myelinproteine aktiviert [89]. Auch das Modell des *molekularen Mimikry* unterstützt die Autoimmunhypothese [226]. Auf das Myelin-Basische-Protein (MBP) immunisierte T-Zell-Klone reagieren in vitro mit einem Peptid, das identisch mit der Sequenz eines Antigens des Epstein-Barr-Virus ist [124, 227]. Die Autoimmunhypothese erklärt viele Aspekte der Pathogenese aber die Evidenz ist dennoch limitiert. Myelin-spezifische T-Zellen finden sich in gesunden Probanden ohne pathogenetische Relevanz sowie in MS-Patienten und Individuen mit variierenden neurologischen Erkrankungen [49, 136].

Infektionshypothese

Der Zusammenhang zwischen infektiösen Erregern und der MS wird kontrovers diskutiert. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Identifikation verschiedener Erreger bei MS-Patienten. Antikörper gegen *Chlamydia pneumoniae* werden überproportional häufig in MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden gefunden. Außerdem kann der Erreger bei einer hohen Anzahl von MS-Patienten im Liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid, CSF) isoliert werden. Ein kausaler Zusammenhang zwischen einer Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* und der Multiplen Sklerose kann nicht nachgewiesen werden [208]. Auch von *Acinetobacter* können spezifische Antikörper in Patienten mit MS nachgewiesen werden [60]. Viren, wie der Humane-Herpes-Virus 6 [9], der Epstein-Barr-Virus [14], Rhinoviren [118] und MS-assoziierte

Retroviren [164] sind im Zusammenhang mit der MS untersucht worden, wobei die klinische Signifikanz einer Infektion von MS-Patienten mit den genannten Erregern und ihre Rolle in der Ätiologie der MS unklar bleiben. Den John Cunningham Polyomaviren (JC-Viren), bekannt als Verursacher der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML), wird eine Rolle in der Ätiologie der MS zugesprochen [8]. Chronische Infektionen des Hirngewebes durch Coronaviren können nicht mit der MS in Verbindung gebracht werden [51].

Neurodegenerationshypothese

Akute und chronische neurodegenerative Erkrankungen wie Hirninfarkt, Schädelhirntraumen, Amyotrophe Lateralsklerose und M. Alzheimer lösen über die Aktivierung von Mikroglia, die Freisetzung von Zytokinen und der reaktiven Leukozyteninfiltration in das ZNS eine Immunantwort aus [6, 20]. Fehlregulationen des Immunsystems im ZNS, zum Beispiel durch die Expression von antiapoptotischen Genen, die eine Apoptoseresistenz von Lymphozyten hervorruft, bedingen eine fortdauernde Entzündungsreaktion nach primär neurodegenerativen Ereignissen [201, 232]. Weitere Hinweise auf die Rolle neurodegenerativer Prozesse in der Pathogenese der MS finden sich im Tiermodell. Hierbei werden eine Hyperphosphorylierung und vermehrte Aggregation des Tau-Proteins beobachtet. Diese Veränderung findet sich bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen [199]. Auch der bereits initial im Krankheitsverlauf der MS nachweisbare Verlust von Axonen weist auf neurodegenerative Prozesse im Rahmen der Pathogenese der Erkrankung hin [31].

1.1.4 Pathophysiologie der Multiplen Sklerose

Aufgrund eines noch unbekannten Primärereignisses gelangen Antigene aus dem ZNS in periphere Lymphknoten. Es kommt zu einer Aktivierung von Antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten. Die aktivierten Lymphozyten passieren die Bluthirnschranke und migrieren in das ZNS [144]. Die Blut-Hirn-Schranke hat dabei wichtige immunregulatorische Eigenschaften [50]. Durch Antigen präsentierende Zellen im ZNS erfolgt eine rezeptorspezifische Aktivierung der migrierenden Lymphozyten. In der Folge entsteht ein entzündliches Milieu, in dem Moleküle des sogenannten major *histocompatibility complex* der Klassen I und II (MHC) sowie proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α , Interferon γ , die Interleukine 1, 2, 23 vermehrt exprimiert werden [94, 144]. Effektorzellen führen zu einer antigen-spezifischen Apoptose neuronaler Zellen. Makrophagen setzen toxische Substanzen frei oder phagozytieren. Plasmazellen produzieren Antikörper, die das Komplementsystem aktivieren. Laborchemisch können diagnostisch wichtige intrathekal synthetisierte Immunglobuline nachgewiesen werden. Deren Nachweis korreliert mit einer

persistierenden Immunantwort gegen ZNS-spezifische Antigene [162]. Zytotoxische T-Zellen befinden sich vorwiegend in aktiven Entmarkungsherden und B-Lymphozyten in perivaskulären Räumen sowie den Meningen [234]. In einem aktiven MS-Herd ist die Entzündungsreaktion mit der vermehrten Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen assoziiert [41]. Die Immunantwort im ZNS führt zur Schädigung des Hirnparenchyms. Demyelinisierung und der Verlust von Axonen sind die Folge. Gleichzeitig finden Reparaturvorgänge statt. Gliazellen und T-Zellen produzieren Neutrophine, die in axonale Reparaturvorgänge involviert sind [100].

Pathologie der Multiplen Sklerose

MS-Läsionen können hinsichtlich ihrer Entzündungsaktivität als aktiv oder inaktiv klassifiziert werden. Entzündungszellinfiltrate aktiver MS-Läsionen umfassen perivaskuläre oligoklonale T-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen. Makrophagen befinden sich meist im Zentrum der Läsion und in ihrem Zytoplasma lassen sich phagozytierte Myelinbestandteile nachweisen. In chronisch aktiven Läsionen ist das Entzündungszellinfiltrat auf den Randbereich konzentriert. Das Zentrum wird durch eine reaktive Gliose gebildet [89]. Es fehlen Zeichen aktiven Myelinabbaus. Auch die Anzahl der myelinbildenden Oligodendrozyten ist stark reduziert oder sie fehlen gänzlich [234]. In frühen aktiven Läsionen kann es zu einer Remyelinisierung kommen. Einige Plaques remyelinisieren komplett und werden *Markschattenherde* genannt. Remyelinisierungsvorgänge nehmen mit zunehmender Krankheitsdauer ab und sind im späteren Verlauf nur noch vereinzelt zu finden [125]. Nach detaillierten Untersuchungen von Lucchinetti und Kollegen können MS-Läsionen histomorphologisch in vier Muster eingeteilt werden. Gemeinsam ist allen Mustern, dass die aktiven Läsionen ein Entzündungszellinfiltrat von T-Lymphozyten und Makrophagen aufweisen. Die Unterschiede bestehen im Ausmaß des Verlustes von Myelin und Oligodendrozyten, der Morphologie der Plaques und dem Vorhandensein von Immunglobulin und Komplementablagerungen. Es besteht keine intraindividuelle Heterogenität, denn das Muster der Läsionen in einem Patienten ist identisch. Eine klare Zuordnung der Läsionsmuster zu einer klinischen Verlaufsform ist nicht erkennbar [132]. Patienten mit dem Läsionstyp II, welcher sich durch eine verstärkte Ablagerung von Immunglobulinen und Komplementfaktoren auszeichnet, können therapeutisch besonders von einer Plasmaaustauschbehandlung profitieren [110]. Obwohl es zu einem extensiven Untergang von Oligodendrozyten im Zuge der Demyelinisierung kommt, korreliert der Verlust von Axonen am stärksten mit dem Grad der klinischen Krankheitsprogression [120]. Die neuropathologischen Befunde spiegeln die interindividuelle Heterogenität hinsichtlich des Krankheitsverlaufes und der Krankheitsprogression der MS wieder.

1.1.5 Diagnostische Kriterien der Multiplen Sklerose

Bis in die sechziger Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts war die MS eine klinische Ausschlussdiagnose. Die erste internationale Übereinkunft über diagnostische Kriterien geht auf eine Expertengruppe um Schumacker zurück [200]. Sie basierte auf klinisch definierten Kriterien und umfasste die Grundprinzipien der räumlichen und zeitlichen Dissemination [236]. Die bis heute gültige Definition eines Schubes basiert auf den Vorschlägen der Schumacker-Kommission und wurde durch McDonald und Kollegen [141] erweitert. Es muss für mindestens 24 Stunden eine Störung des ZNS vorliegen. Assoziierte Infekte oder Fieber dürfen nicht vorliegen. Falsche Schübe müssen ausgeschlossen sein. Diese können beispielsweise durch tonische Störungen vorgetäuscht werden [234]. Der Mindestabstand zwischen zwei Schüben beträgt 30 Tage. Tritt ein zweites Ereignis nach dieser Zeitspanne auf, liegt ein zweiter Schub vor und eine zeitliche Dissemination ist gesichert. Treten erneute neurologische Defizite innerhalb von 30 Tagen nach Schubbeginn auf, spricht man von einem Schub mit Exazerbation. Die zeitliche Dissemination gilt auch bei einer langsamen Progredienz der Symptome über mindestens sechs Monate als bewiesen. Die genaue Erfassung der Schubanzahl spielt eine große Rolle in der Verlaufsbeobachtung und Therapieüberwachung [236]. Polytope klinische und paraklinische Befunde beweisen die räumliche Dissemination. In den siebziger Jahren versuchte man der Heterogenität der MS gerecht zu werden, indem die Diagnosen „definitive MS“, „wahrscheinliche MS“ und „mögliche MS“ unterschieden wurden [234, 236]. Die Konsensusgruppe um Charles M. Poser entwickelte 1983 neue diagnostische Kriterien [175]. Die Schubdefinition von Schumacker wurde beibehalten. Die primär chronisch progrediente Verlaufsform blieb aufgrund schwieriger Differentialdiagnose unberücksichtigt [234]. Es wurde betont, dass die Diagnose MS vorwiegend klinisch zu stellen sei. Paraklinisch sollten die Bildgebung, die Elektrophysiologie, die Liquoranalytik, spezielle urologische Untersuchungen, neuropsychologische Tests und induzierte Hyperthermie zur Diagnosefindung berücksichtigt werden. Das MRT (Magnetresonanztomographie) fand noch keine Verwendung. Die ersten eindeutigen Definitionen zur räumlichen Dissemination im MRT wurden 1988 formuliert [66]. 2001 folgten Festlegungen zur zeitlichen Dissemination [141]. Die Liquoranalytik besteht aus dem Nachweis einer chronischen Entzündung des ZNS mittels Verifizierung einer autochthonen intrathekalen Ig-Synthese. Dazu werden die selektiven oligoklonalen Banden (OKB) im CSF bestimmt. Die Klassifikation der Diagnose MS nach den Poser-Kriterien erfolgte in vier Gruppen:

- klinisch sicher
- laborunterstützt sicher
- klinisch wahrscheinlich
- laborunterstützt wahrscheinlich

Die Konsensusgruppe unter W.J. McDonald aktualisierte im Jahr 2001 die diagnostischen Kriterien der MS unter verstärkter Berücksichtigung der Zusatzdiagnostik [141] (Tab. 2). Eine besondere Bedeutung kommt der Frühdiagnose der MS zu. Der Übergang erster klinischer Symptome oder *klinisch isolierter Syndrome* (CIS) in eine definitive MS können durch die McDonald-Kriterien mit höherer Sensitivität und Spezifität vorausgesagt werden [234]. Die Diagnosestellung PPMS wurde konkretisiert und die visuell evozierten Potentiale als Parameter hinzugezogen. Der Liquorbefund verlangt eine Pleozytose von ≤ 50 Zellen/ μl und den Nachweis von OKB oder einem erhöhten IgG-Index. Ein positiver Liquorbefund ist jedoch nicht in jedem Falle für die Diagnosestellung notwendig.[234]. Die Kriterien für die Anzahl und Lokalisation der Herde im MRT zum Nachweis der räumlichen Dissemination sind exakt definiert und in die McDonalds-Kriterien aufgenommen worden [19, 141, 221]. Die McDonald-Kommission entwickelte Richtlinien zur Feststellung der zeitlichen Dissemination im MRT. Zum Nachweis dieser werden in Zeitintervallen von mindestens drei Monaten nach Auftreten der ersten neurologischen Symptomatik MRT-Kontrollen durchgeführt. Zeigt die erste Kontrolle eine Gadolinium-positive Läsion, die nicht der Lokalisation entspricht, die durch die Initialsymptomatik repräsentiert wird, gilt die zeitliche Dissemination als bewiesen. Ist die erste Kontrolle negativ, erfolgt nach mindestens drei Monaten eine weitere, wobei ein Gadolinium-positiver Herd oder neue Läsionen in der T2-Wichtung die zeitliche Dissemination belegen. Das Mindestintervall von drei Monaten zwischen den MRT-Untersuchungen sollte unbedingt eingehalten werden, um monophasische Erkrankungen wie die akute demyelinisierende Enzephalomyelitis auszuschließen [234]. Die McDonald-Kriterien entscheiden im Gegensatz zu den Poser-Kriterien, zwischen MS, möglicher MS und keiner MS. Eine weitere Expertengruppe schlug 2005 Modifikationen der McDonald-Kriterien vor [174]. Ergänzungen zum Nachweis der zeitlichen und räumlichen Dissemination im MRT sowie zur Diagnosestellung der PPMS wurden integriert. Polman und Kollegen aktualisierten im Jahre 2011 nach einer erneuten Revision der McDonald-Kriterien die international anerkannten Richtlinien zur Diagnosestellung der MS [173]. Insgesamt ist nun eine frühere und spezifischere Diagnosestellung der MS möglich [77] (Tab.2). Die bisher geltenden Kriterien zum bildmorphologischen Nachweis der räumlichen Dissemination nach Barkhof [19] und Tintoré [221] wurden reevaluiert und durch neu erarbeitete Richtlinien ersetzt, die eine erleichterte Anwendung und erhöhte Sensitivität bei gleicher Spezifität ermöglichen sollen [173, 216, 217]. Der Nachweis der räumlichen Dissemination erfordert mindestens eine hyperintense Läsion in der T2-Wichtung in 2 der 4 für die MS als charakteristisch geltenden Lokalisationen [141]. Zu diesen zählen das periventrikuläre Marklager, juxtakortikale und infratentorielle Regionen [173]. Auch die Anforderungen zum Nachweis der zeitlichen Dissemination im MRT haben sich im Gegensatz zu den revidierten McDonald Kriterien von 2005 [174] geändert. Die zeitliche Dissemination gilt

nun als bewiesen bei Neuauftreten T2-hyperintenser Läsionen im MRT im Vergleich zu einer Voruntersuchung, unabhängig vom zeitlichen Abstand. Des Weiteren weisen das gleichzeitige Vorhandensein asymptomatischer Gadolinium-aufnehmender und nicht-aufnehmender Läsionen im MRT die zeitliche Dissemination nach [173]. Die neuen bildmorphologischen Kriterien zur Erfüllung der zeitlichen Dissemination werden auch in der Diagnosestellung der PPMS angewendet [173].

Tabelle 2: Diagnosekriterien der MS nach McDonald et al. 2001 [141] und Polman et al. 2005 und 2010 [174], [173] (modifiziert nach [234] und [173]).

KAT	Klinik	McDonald-Kriterien (McDonald 2001 #55) Zusatzinformation	Revidierte Kriterien 2005 (Polman 2005 #60) Zusatzinformation	Revidierte Kriterien 2010 (Polman 2011 #61) Zusatzinformation
1	≥ 2 Schübe mit ≥ 2 Läsionen (objektiv)	Keine erforderlich, Paraklinik darf nicht negativ sein	Keine erforderlich	Keine erforderlich
2	≥ 2 Schübe mit 1 Läsion (objektiv)	Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> MRT (Barkhof-Kriterien) ≥ 2 MRT-Läsionen + Liquor oder weiterer Schub mit anderer Lokalisation Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT (McDonald-Kriterien) oder weiterer klinischer Schub 	Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> MRT (Barkhof- u. Tintoré Kriterien) oder ≥ als 2 MRT-Läsionen + Liquor oder weiterer Schub mit anderer Lokalisation Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT oder weiterer klinischer Schub 	Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> MRT (Swanton und Kollegen) oder ≥ als 2 MRT-Läsionen + Liquor oder weiterer Schub mit anderer Lokalisation Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> simultane asymptomatische Gadolinium-aufnehmende und nicht-aufnehmende Läsionen im MRT ; oder neue T2-hyperintense Läsion in Folge-MRT unabhängig vom Zeitpunkt der Voruntersuchung weiterer klinischer Schub
3	1 Schub mit ≥ 2 Läsionen (objektiv)			
4	1 Schub mit 1 Läsion (objektiv) „monosymptomatische Präsentation“ „klinisch isoliertes Syndrom“	Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT (Barkhof-Kriterien) oder ≥ 2 MRT-Läsionen + Liquor und Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT (McDonald-Kriterien) oder weiterer klinischer Schub 	Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT oder ≥ 2 MRT-Läsionen + Liquor und Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT oder weiterer klinischer Schub 	Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> MRT (Swanton Kriterien) oder ≥ als 2 MRT-Läsionen + Liquor oder weiterer Schub mit anderer Lokalisation Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> simultane asymptomatische Gadolinium-aufnehmende und nicht-aufnehmende Läsionen im MRT ; oder neue T2-hyperintense Läsion in Folge-MRT unabhängig vom Zeitpunkt der Voruntersuchung weiterer klinischer Schub
5	Primär progressive MS (schleichende Progression seit Beginn)	Positiver Liquor und Räumliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> ≥ 9 T2 Hirnläsionen oder ≥ 2 Rückenmarksläsionen oder 4-8 Hirn- und 1 Rückenmarksläsion oder <ul style="list-style-type: none"> VEP + 4-8Hirnläsionen oder VEP + < 4 Hirn- und 1 Rückenmarksläsion und Zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> im MRT (McDonald-Kriterien) oder kontinuierliche Progression über 1 Jahr 	Kontinuierliche Progression über 1 Jahr und Erfüllung von zwei der drei folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> positives Hirn-MRT (9 T2 Läsionen o. ≥ 4 T2 Läsionen + VEP) positives Rückenmarks-MRT (2 Läsionen) positiver Liquor 	Kontinuierliche Progression über 1 Jahr und Erfüllung von zwei der drei folgenden Kriterien: <ul style="list-style-type: none"> positives Hirn-MRT (≥ 1 T2-Läsion in MS-typischen Lokalisationen: periventrikulär, juxtakortikal,) positives Rückenmarks-MRT (2 Läsionen) positiver Liquor

1.1.6 Therapie der Multiplen Sklerose

Die Therapie der MS umfasst vier große Behandlungssäulen:

kausalorientiert

symptomatisch

Coping / Krankheitsbewältigung

Sozialmedizin

Im folgenden Kapitel soll die kausalorientierte immunmodulatorische Stufentherapie der MS aus den aktuellen Therapieempfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Neurologie dargestellt werden (Abb. 1) [77]. Genaue Ausführungen zu den anderen Therapiesäulen sollen an dieser Stelle der Spezialliteratur überlassen sein [236]

Indikation	CIS	RRMS			SPMS	
Eskalations- therapie			1. Wahl Fingolimod ⁴ Natalizumab ⁴	2. Wahl Mitoxantron (Cyclo- phosphamid) ⁵	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
Basistherapie	Glatirameracetat Interferon β 1a i.m. Interferon β 1a s.c. Interferon β 1b s.c.	Glatirameracetat Interferon β 1a i.m. Interferon β 1a s.c. Interferon β 1b s.c. (Azathioprin) ¹ (IvIg) ²			Interferon β 1a s.c. Interferon β 1b s.c. (Cyclo- phosphamid) ⁵	Mitoxantron (Cyclo- phosphamid) ⁵
Schubtherapie	2. Wahl - Plasmaseparation					
	1. Wahl - Methylprednisolonpuls					

¹ = Zugelassen, wenn Interferon β nicht möglich ist oder unter Azathioprintherapie ein stabiler Verlauf erreicht wird.
² = Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.
⁴ = Fingolimod und Natalizumab haben neben der Zulassung zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung therapie-naiver Patienten bei mindestens 2 behindernden Schüben mit Krankheitsprogression binnen der letzten 12 Monate und mindestens einer Gadolinium-Läsion bzw. einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT
⁵ = Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunerkrankheiten, somit nur als Ausweichtherapie anzuwenden.

Abb.1: Stufenschema der immunmodulatorischen Therapie der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [77]). Abkürzungen: CIS, klinisch isoliertes Syndrom; RRMS, schubförmig remittierende Multiple Sklerose; SPMS, sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose; IvIG, intravenöse Immunglobuline.

Therapie des akuten Schubes

In der Behandlung des Schubes der MS werden Glukokortikosteroide als etablierter Therapiestandard eingesetzt [77]. Die intravenöse Therapie mittels hochdosierter Glukokortikosteroide bedingt eine raschere Symptomrückbildung [77]. Es liegen zahlreiche Studien zur therapeutischen Wirksamkeit der Glukokortikosteroide vor [36, 37]. Als therapeutischer Standard hat sich die intravenöse Glukokortikosteroid-Pulstherapie etabliert [142]. Bei persistierender schwerer Symptomatik kann die Dosis der applizierten Glukokortikosteroide erhöht werden. Des Weiteren stehen die Plasmapherese und die Immunadsorption als Möglichkeiten in der Eskalationstherapie des akuten Schubes zur Verfügung [77].

Interferon- β -Präparate

Interferon β -Präparate werden in der Basistherapie der Schubprophylaxe bei Patienten mit RRMS als Mittel der ersten Wahl eingesetzt [77]. Außerdem sind diese Therapeutika bei Patienten mit einem einmaligen Schubereignis und einem hohen Risiko für die Entwicklung einer klinisch sicheren MS indiziert [108]. Die Daten der BENEFIT-Studie führten zur Zulassung des Interferon β -1b-Präparates Betaferon® für Patienten mit CIS [109]. Es konnte gezeigt werden, dass Betaferon® die Konversion des CIS in eine klinisch definitive MS verzögert. Auch für das Interferon β -1a-Präparat Avonex® erfolgte die Zulassung für diese Indikation. Für alle 3 Interferon- β -Präparate existieren Langzeitbeobachtungen von bis zu 9 Jahren, die bestätigt haben, dass nicht mit schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen nach Langzeitanwendung gerechnet werden muss [184]. Auch bei Kindern mit juveniler MS kann eine Interferon β -Therapie erfolgen, sofern die Transaminasen im Normbereich liegen [74]. Der Einsatz der β -Interferone in der Schwangerschaft erhöht das Risiko für Frühaborte und erniedrigtes Geburtsgewicht [193]. Die verschiedenen subcutan bzw. intramuskulär applizierbaren Interferon β -Präparate wurden hinsichtlich ihrer klinischen und paraklinischen Wirksamkeit verglichen [44, 56, 81, 163]. Bei der Betrachtung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der β -Interferone darf die Bildung neutralisierender Antikörper nicht unberücksichtigt bleiben. Die Häufigkeit der Bildung von neutralisierenden Antikörpern unterscheidet sich zwischen den einzelnen Präparaten [24]. In den ersten beiden Jahren nach Behandlungsbeginn ist das Risiko für die Entwicklung von neutralisierenden Antikörpern besonders hoch [206]. Fortlaufend erhöhte Titer der neutralisierenden Antikörper erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens [207].

Glatirameracetat

Glatirameracetat (Copaxone®) ist ein Oligopeptid, das täglich subkutan appliziert wird. Wie die β -Interferone wird Glatirameracetat in der Basistherapie der Schubprophylaxe der MS bei Patienten mit RRMS als Mittel der ersten Wahl eingesetzt [77]. Bei Patienten mit CIS wird die Konversion in eine klinisch definitive MS deutlich verlangsamt [46]. Langzeitdaten einer 10-jährigen Verlaufsbeobachtung erbrachten keine relevanten unerwarteten Nebenwirkungen [69]. Glatirameracetat zeigt gegenüber den β -Interferonen eine vergleichbare Wirksamkeit [112].

Fingolimod und Natalizumab

Fingolimod und Natalizumab sind als Mittel der ersten Wahl in der Eskalationstherapie im Rahmen der Schubprophylaxe bei Patienten mit einer hochaktiven RRMS zugelassen. Auch Patienten, die unter einer Therapie mit Basistherapeutika, an einer höheren Schubfrequenz leiden, können mit Fingolimod und Natalizumab behandelt werden [77].

Natalizumab

Bei Natalizumab handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper gegen das $\alpha 4$ -Integrin, der das Very-Late-Antigen-4 (VLA) auf der Oberfläche zahlreicher Immunzellen erkennt. Natalizumab bindet an das VLA und blockiert dessen Interaktion mit dem Vascular-Cell-Adhesion-Molecule (VCAM) auf den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Somit wird die Einwanderung von Lymphozyten und Monozyten in das ZNS vermindert [186]. Natalizumab wird innerhalb der sekundären Schubprophylaxe bei Patienten mit RRMS als Eskalationstherapie bei besonders hoher Schubfrequenz eingesetzt. In zwei zulassungsrelevanten Studien wurde Natalizumab bei RRMS zum einen gegen Placebo und zum anderen kombiniert mit Interferon β -1a getestet. In beiden Studien war Natalizumab in allen Endpunkten sowohl in der Mono- als auch in der Kombinationstherapie überlegen. Im zweijährigen Beobachtungszeitraum der Studien befinden sich unter den mit Natalizumab therapierten Patienten mehr als eine doppelt so hohe Anzahl von Individuen ohne Krankheitsaktivität [172, 191]. Starke unerwünschte Nebenwirkungen sind bekannt. Drei Patienten erkrankten an einer PML, wobei zwei verstarben und einer mit schwerer Behinderung überlebte. Diese Nebenwirkungen betrafen Patienten unter der Kombinationstherapie von Natalizumab und Interferon β -1a (Avonex®) sowie einen Patienten, der aufgrund von Morbus Crohn und rheumatoider Arthritis überlappend immunsuppressiv behandelt wurde [178, 230]. Aktuelle Untersuchungen bestätigen fatale Komplikationen durch eine neu aufgetretene PML bei MS-Patienten nach längerer Natalizumab-Therapie [28, 62]. Über 200 bestätigte Fälle einer PML unter Natalizumab-Therapie sind bekannt. Ein erhöhtes Risiko tragen Patienten, die positiv auf JC-Viren getestet sind, Individuen mit einer längeren

Therapiedauer und Patienten die zuvor mit Immunsuppressiva behandelt worden sind [26]. Bei einem Schubereignis unter Natalizumab-Therapie sollte stets eine PML ausgeschlossen werden. Das Auftreten der PML wird durch Reaktivierung einer latenten Infektion durch das JC-Virus verursacht [135]. Für Hochrisikopatienten steht seit 2011 ein sensitiver Test auf JC-Virus-Antikörper zur Verfügung [77].

Fingolimod

Fingolimod bindet an Sphingosin-1-Phosphatrezeptoren zahlreicher Immunzellen. Sphingosin-1-Phosphat ist ein intra- und extrazellulär wirkender Mediator, der in zahlreichen pathogenetischen Prozessen der MS eine Rolle spielt. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren werden im kardiovaskulären System und auf zahlreichen Immunzellen expremiert [43]. Fingolimod unterliegt einer raschen Phosphorylierung und moduliert den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor. Dieser wird herunterreguliert und somit die Migration von Lymphozyten aus den lymphatischen Organen in die Zirkulation reduziert. Dadurch verringert sich die Translokation autoreaktiver Lymphozyten in das ZNS [43]. Fingolimod ist das erste oral verfügbare Medikament zur Behandlung der RRMS und wird 1-mal täglich in einer Dosierung von 0,5 mg appliziert [77]. In mehreren großen Studien konnte die Wirksamkeit der Substanz in der Behandlung der RRMS nachgewiesen werden. Vor allem die jährliche Schubrate reduzierte sich unter Fingolimod-Therapie im Vergleich zu Placebo und einer Behandlung mittels Interferon- β -Präparaten [45]. Es sind jedoch unerwünschte Nebenwirkungen wie, Makulaödem, Hautkrebs, eine erhöhte Infektionsrate, einschließlich zweier fataler Infektionen durch Herpes simplex und Herpes zoster, Bradykardie und av-Blockaden aufgetreten [45, 52, 65, 103, 105]. Daher ist ein entsprechendes Therapiemanagement nötig, um die möglichen Nebenwirkungen frühzeitig zu erkennen und zu behandeln [78].

Intravenöse Immunglobuline

Aufgrund der insgesamt widersprüchlichen Studiendaten und der nicht geklärten Dosisfrage werden intravenöse Immunglobuline (IVIG) als Reservepräparat in der Basistherapie der Schubprophylaxe der RRMS angesehen, sind offiziell jedoch für die Therapie der MS nicht zugelassen [77]. IVIG können in Schwangerschaft und Stillzeit als bisher einziges Präparat gefahrlos zur Sekundärprophylaxe eingesetzt werden [5].

Mitoxantron

Die Zulassung von Mitoxantron für die Behandlung von Patienten mit SPMS oder PPMS und bei Versagen oder Unverträglichkeit einer Therapie mit Immunmodulatoren erfolgte 2002 aufgrund der Ergebnisse der MIMS-Studie [90, 116]. Vereinzelt wurden schwere Nebenwirkungen wie Kardiomyopathie oder sekundäre Leukämien bei MS-Patienten

während und nach der Therapie beobachtet. Die Behandlung jüngerer Patienten muss aufgrund der schweren Auswirkungen auf die Reproduktionsfähigkeit nach abgeschlossener Familienplanung erfolgen. In Deutschland liegt eine Fachinformation vor, die eine Fortführung der Behandlung bis zu einer Gesamtdosis von 140mg/m² Körperoberfläche unter strenger Nutzen-Risiko-Abwägung und gleichzeitiger echokardiographischer Überwachung on-label ermöglicht [77].

1.1.7 Glukokortikosteroide in der Therapie der Multiplen Sklerose

1938 gelang es, natürliche Steroidhormone aus Nebennierenrinden zu extrahieren und zu charakterisieren. Synthetische Steroide wurden erstmals 1947 hergestellt [95]. Gegenwärtig sind potente Glukokortikosteroide in hochdosierter Anwendung Standard in der Therapie akuter Exazerbationen neuroinflammatorischer Erkrankungen [34, 78].

Therapie des akuten MS-Schubes

Glukokortikosteroide in Form von intravenösem Methylprednisolon (IVMP) werden in der Eskalationstherapie des akuten Schubes der MS verwendet (1000mg pro Tag für 3-5 Tage) [183]. Die Applikation erfolgt in der Regel morgens um der physiologischen Ausschüttung der Glukokortikosteroide zu entsprechen und unerwünschte Wirkungen zu vermeiden [77]. Bei schweren Schüben ohne relevanten Rückgang der Symptomatik zwei Wochen nach Beendigung des ersten IVMP-Pulses wird die Applikation eines zweiten hoch dosierten IVMP-Pulses von 2g pro Tag über 5 Tage empfohlen [183].

Wiederholte Applikation von intravenösen Glukokortikosteroiden

Eine randomisierte, kontrollierte und einfach geblindete Studie untersuchte bei 88 Patienten mit RRMS den Effekt von wiederholten IVMP-Pulsen [237]. Endparameter waren das Volumen T1-hypointenser Läsionen als bildmorphologisches Korrelat für progressiven strukturellen Hirnschaden und die Behinderungsprogression, eruiert durch die Kurzke-Skala [121], der sogenannten *Expanded-Disability-Status-Scale* (EDSS). Der Beobachtungszeitraum betrug 5 Jahre, wobei die IVMP-Pulse (1g pro Tag über 5 Tage) alle 4 Monate in den ersten 3 bzw. alle 6 Monate in den letzten 2 Jahren verabreicht wurden. Die Untersuchung ergab für den IVMP-Puls-Arm eine Reduktion der hypointensen T1-Läsionen sowie eine Verringerung der Behinderungsprogression [237]. Andere Untersuchungen bestätigten positive Effekte einer IVMP-Pulstherapie auf den klinischen Verlauf der Behinderungsprogression bei Patienten mit RRMS und SPMS [12, 142]. Zusätzlich können intravenös applizierte Glukokortikosteroide die Anzahl Gadolinium-anreichernder Läsionen im MRT bei Patienten mit RRMS nach

Schubereignis reduzieren [137], wobei über eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung berichtet wird [159]

Intrathekale Anwendung von Glukokortikosteroiden

Die intrathekale Applikation von Glukokortikosteroiden mit retardierter Freisetzung, wie Triamcinolonacetonid (TCA), führt zu einer deutlichen Reduktion des EDSS bei MS-Patienten mit chronisch progredientem Krankheitsverlauf. Die Effizienz dieser Therapiemethode ist Gegenstand kontroverser Diskussionen [92, 93, 98, 99, 150]. Die positiven Effekte zeigen sich bei Patienten mit vorwiegend spinaler Symptomatik. Eine Vergleichsstudie erbringt keine Unterschiede in der Reduktion des EDSS zwischen systemisch oder intrathekal applizierten Glukokortikosteroiden. Allerdings sind die Patienten nicht nach ihrem klinischen Verlaufstyp klassifiziert worden [97]. Diverse Nebenwirkungen der intrathekalen Glukokortikosteroid-Therapie sind bekannt. Dazu gehören unter anderem die adhäsive Arachnoiditis und aseptische Meningitis [150]. Demgegenüber zeigt eine Untersuchung über die intrathekale MP-Therapie bei Patienten mit postherpetischer Neuralgie positive Ergebnisse ohne ernsthafte Nebenwirkungen bei 89 Studienteilnehmern [115]. Auch spätere Studien bestätigen die Ungefährlichkeit der wiederholten intrathekalen Applikation von TCA bei MS-Patienten [92, 93, 98, 99]. Dennoch kann die Möglichkeit einer neuronalen Schädigung durch die intrathekale Anwendung noch nicht komplett ausgeschlossen werden [128, 237]. Dies gab den Anlass für die vorliegende Arbeit, die den Langzeiteffekt von zyklisch intrathekal appliziertem TCA auf die Konzentrationen verschiedener Biomarker für axonalen Schaden und Astroglie im CSF untersucht.

1.1.6.2 Struktur, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Glukokortikosteroide

Steroidhormone lassen sich auf das Cyclopentano-perhydro-penanthren-Gerüst zurückführen. Ihre endogene Synthese geht vom Cholesterin aus, wobei als Zwischenstufe immer Progesteron synthetisiert wird. Das Kortisol weist Hydroxylierungen in den Positionen 11, 17 und 21 auf [156]. Glukokortikosteroide haben ein heterogenes Wirkungsprofil auf den Stoffwechsel, Kreislauf, Wasser- und Elektrolythaushalt sowie das Immunsystem. Aufgrund der autoimmunologischen Pathogenese der MS und der sich daraus ergebenden therapeutischen Anwendung sind im Folgenden die immunsuppressiven Effekte der Glukokortikosteroide dargestellt. Die klassischen immunsuppressiven Wirkungen der Glukokortikosteroide werden auf genomischer Ebene durch einen intrazytoplasmatischen Rezeptor mediert. Niedrige Glukokortikosteroid-Konzentrationen sind ausreichend, um Effektormechanismen auszulösen. Inzwischen hat sich gezeigt, dass die Glukokortikosteroide bei hochdosierter Anwendung zusätzliche Effektoreigenschaften auf nicht genomischer Ebene besitzen [78]. Diese Effekte treten extrem schnell nach der Applikation auf und sind daher nicht durch den Wirkmechanismus der Glukokortikosteroide auf genomischer Ebene erklärbar [39].

Wirkungen der Glukokortikosteroide auf genomischer Ebene

Der Glukokortikosteroidrezeptor ist ein saures Protein bestehend aus 3 Domänen: einer N-terminalen die Transkriptionsaktivität steuernden Domäne, einer DNA-Bindungsdomäne sowie einer carboxyterminalen Hormonbindungsdomäne. Das Protein befindet sich im Zytoplasma fast aller Zellen und ist als Heterotetramer an Hitzeschockproteine gebunden. Die im Plasma zu mehr als 90% an Transkortin und Albumin gebundenen Glukokortikosteroide gelangen als freie Moleküle in die Zellen und binden an den Rezeptor, worauf der Heterotetramer-Komplex dissoziiert und in den Zellkern transloziert [10]. Das Glukokortikosteroidrezeptor- Glukokortikosteroidmolekül dimerisiert und bindet an spezifische DNA-Nukleotidsequenzen [23]. Die Transkription spezifischer Gene wird durch die Stabilisierung von Transkriptionsinitiationskomplexen oder indirekt durch Auflockerung des Chromatins und Aufdecken von Transkriptionsfaktor-Bindungssequenzen gesteigert. Beispiele für induzierte Gene sind Lipocortin-1 und der β 2-Adrenorezeptor. Weiterhin bindet der Glukokortikosteroidrezeptor an spezifische DNA-Sequenzen, die eine Inhibition der Transkription bestimmter Gene bedingen. Beispiele hierfür sind Gene proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL) 1, 2-6, 8 und Interferon. Der Glukokortikosteroidrezeptor interferiert mit anderen Transkriptionsfaktoren wie dem nukleären-Faktor-Kappa-B oder dem Aktivierungsprotein-1, welche die Expression proinflammatorischer Proteine stimulieren. Auf diesem Wege inhibierte Zytokine sind

IL-1b, der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und IL-2 [10]. Die für die Pathogenese der MS relevanten immunsuppressiven Effekte der Glukokortikosteroide betreffen eine große Anzahl von Effektoren des Immunsystems (Tab. 3).

Tabelle 3: Zelluläre Mechanismen der Glukokortikosteroid induzierten Immunsuppression (modifiziert nach [10]).

Gefäßendothel	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition der Expression von ICAM-1 und E-Selektin • Reduktion der Prostaglandin-I2-Sekretion sowie der postkapillären Gefäßpermeabilität
Blut-Hirn-Schranke	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung von KM-Enhancement • Steigerung der Konzentration von Inhibitoren der Metalloproteinasen
Leukozyten Chemotaxis	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion der Chemotaxis und Diapedese
Anzahl zirkulierender Leukozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Reduktion von CD4 T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Monozyten
Makrophagen/Mikroglia	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition der Phagozytose , Aktivierung und Proliferation in vitro • Abnahme von MHC, CR3 -und FC-Rezeptoren • Synthesehemmung von Arachidonsäuremetaboliten, IL-1, 3-6, 8, TNF, GMCSF , Proteasen, Steigerung der TGF-Sekretion
Lymphozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferationshemmung , Aktivitätshemmung von natürlichen Killerzellen , Sekretionshemmung von IFN- und IL-2 • Aktivitätssteigerung von T-Suppressor-Zellen in vitro und erhöhte Anzahl im CSF • Inhibition der Ig-Synthese im ZNS

Abkürzungen: ICAM-1: Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1, KM: Kontrastmittel, CD: Differenzierungskluster, MHC: Major Histocompatibility Complex, IL: Interleukin, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor, GMCSF: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, TGF: Transformierender Wachstumsfaktor, Ig: Immunglobulin

Wirkungen der Glukokortikosteroide auf nicht-genomischer Ebene

Nicht-genomische Effekte resultieren aus der Interaktion der Glukokortikosteroide mit biologischen Membranen, zum einen über membrangebundene Rezeptoren [160] als spezifische nicht-genomische Effekte oder durch physikochemische Interaktionen als unspezifische nicht-genomische Effekte [39, 40]. Diese Interaktionen bedingen Veränderungen der Zellfunktionen durch die Beeinflussung des transmembranösen Kationentransportes und durch Verstärkung des Proteindurchtritts durch die Mitochondrienmembran. Glukokortikosteroide senken das mitochondriale Membranpotential [38]. Die daraus resultierende reduzierte Verfügbarkeit von Adenosin-Triphosphat ist charakteristisch für die Apoptose vor der DNA-Fragmentation. Hohe therapeutisch relevante Dosen von Glukokortikosteroiden können sehr schnell den zellulären Kalzium-Influx inhibieren, der ein integraler Bestandteil der Aktivierung von Lymphozyten ist [38].

Glukokortikosteroid induzierte T-Zell-Apoptose

Die T-Zell-Apoptose spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der MS. Erhöhte T-Zell-Apoptoseraten während der Remission können im Tiermodell der EAE nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen physiologischen Mechanismus, durch den autoreaktive T-Zellen aus dem Entzündungsherd entfernt werden, und der damit ein pathophysiologisches Korrelat zur klinischen Remission nach Schubereignissen bietet [198]. Seit den 1980er Jahren ist bekannt, dass Glukokortikosteroide lymphozytäre Apoptose auslösen können [228]. Nach intravenöser Applikation von Glukokortikosteroiden kann im Modell der experimentellen Autoimmunneuritis eine verstärkte T-Zell Apoptose *in situ* beobachtet werden [231]. Eine weitere Untersuchung demonstriert am Tiermodell der EAE, dass hoch dosiert intravenös applizierte Glukokortikosteroide die T-Zell-Apoptose verstärken [195]. Der Effekt war abhängig von der Dosierung und der Schwere des Entzündungsprozesses. Weitere Studien bestätigen den dosisabhängigen Effekt Glukokortikosteroid-induzierter T-Zell-Apoptose [152]. Leukozyten aus dem peripheren Blut von MS-Patienten, die einer intravenösen MP-Pulstherapie unterzogen wurden, zeigen eine signifikant erhöhte Apoptoserate insbesondere von CD4-T-Zellen [128].

Glukokortikosteroide und Hirnatrophie bei Patienten mit MS

Hirnatrophie beginnt bereits in einem frühen Krankheitsstadium der MS und wird durch pathophysiologische Prozesse wie Inflammation, axonalen Schaden und Untergang sowie Demyelinisierung verursacht [33]. Atrophische Prozesse setzen sich während des Krankheitsverlaufes fort [70], wobei sich die jährliche Rate des Parenchymverlustes nicht zwischen der RRMS und der SPMS unterscheidet [73, 138]. In der RRMS schreitet die Hirnatrophie zu Beginn klinisch inapparent voran und kann durch immunmodulatorische Therapien verlangsamt werden [189]. Es wurde postuliert, dass Glukokortikosteroide durch die Induktion eines Proteinkatabolismus in Neuronen sowie durch einen indirekten Entzug von Wasser durch verminderte Gefäßpermeabilität toxische Wirkungen auf das Hirnparenchym ausüben können [237]. Potentielle neurotoxische Wirkungen der Glukokortikosteroide würden den Therapieansatz mittels dieser Medikamentengruppe in Frage stellen. Dies ergibt einen wesentlichen Ansatz der vorliegenden Untersuchung, welche die Sicherheit und Effektivität der zyklischen intrathekalen Anwendung von Glukokortikosteroiden bei Patienten mit MS untersucht. Eine frühere Untersuchung weist ein reduziertes Voranschreiten der Hirnatrophie unter hochdosierter intravenöser Pulstherapie mit MP bei Patienten mit MS nach. Die Autoren diskutieren protektive Effekte der Glukokortikosteroide auf das Hirnparenchym [237].

1.2 Liquor cerebrospinalis

Im ZNS lassen sich drei Kompartimente unterscheiden: das vaskuläre Kompartiment, der Intra –und Extrazellulärraum des Hirnparenchyms und das Liquorsystem [234].

1.2.1 Anatomie und Physiologie

Der CSF füllt die Hirnventrikel und die Subarachnoidalräume aus. Das Ventrikelsystem besteht aus zwei Seitenventrikeln, die innerhalb des Neokortex in fronto-occipitaler Richtung verlaufen. Der dritte Ventrikel ist im Zwischenhirn lokalisiert und über ein Aquädukt mit dem vierten Ventrikel zwischen Pons und Zerebellum verbunden. Der vierte Ventrikel dehnt sich nach kaudal in den Rückenmarkskanal aus, welcher bei gesunden Neugeborenen bereits verschlossen ist, sodass der Liquorraum dort endet. Eine Verbindung des Liquorraumes zum Subarachnoidalraum existiert in Form von drei Öffnungen des vierten Ventrikels, dem Foramen Magendii im Ventrikeldach in Verbindung mit der Cisterna magna und den zwei Foramina Luschkae im Bereich der Cisterna pontis. Die Hirnhäute setzen sich aus der Dura mater, der Arachnoidea mater und der Pia mater zusammen. Größere Venen der Dura sind die Sinus durae matris. Die Kapillaren der Dura mater sind fenestriert und liegen somit im Serummilieu. Die Dura mater wird durch das Neurothel von der Arachnoidea mater getrennt. Die Neurothelien sind durch *tight-junctions* miteinander verbunden, sodass die Arachnoidea dem Liquormilieu angehört. Arachnoidea und Pia mater bilden die beiden Häute der Leptomeninx und begrenzen den mit CSF gefüllten Subarachnoidalraum. Arachnoidalzotten, die sogenannten *Pacchionischen Granulationen* treten in den Sinus sagittalis und bedingen die Liquorresorption im Venenblut. Über perivaskuläre Aussackungen der Pia mater, die *Virchow-Robin-Räume*, kommuniziert der Subarachnoidalraum mit dem Extrazellulärraum des Hirnparenchyms. 500-600 ml CSF werden innerhalb von 24 Stunden produziert. Das Gesamtvolumen des Liquorraumes beträgt 150-170ml. Daraus ergibt sich ein Austausch des gesamten Liquorvolumens von 3-4 mal pro Tag. Syntheseorte des CSF sind die fenestrierten Blutgefäße der Plexus choroideus der Hirnventrikel, Blutgefäße des Gehirns und des Subarachnoidalraumes. Die Liquorzirkulation wird durch den pulsatilen arteriellen Blutfluss generiert, der zu Druckwellen in den inneren und äußeren Liquorräumen führt. In Abhängigkeit von Systole und Diastole wechselt die Flussrichtung des CSF. Hauptsächlich Resorptionsorte des CSF sind Verlängerungen des Subarachnoidalraumes um die Austrittsstellen bestimmter Hirnnervenfasen und Nervenwurzeln durch die Meningen. Die Zusammensetzung des CSF unterliegt einer strengen Regulation durch spezifische Schrankensysteme. Die Grundprinzipien der Sekretion und des Transports des CSF an der Blut-Liquor-Schranke sind identisch mit denen der Blut-Hirn-Schranke. Es handelt

sich dabei um aktiven Transport und erleichterte Diffusion. An der Blut-Liquor-Schranke findet ein bidirektionaler Transport statt [234].

Mit Ausnahme hirneigener Proteine lassen sich die meisten Liquorproteine in deutlich höherer Konzentration im Blut nachweisen. Die Quantität der Liquorsubstanzen kann daher nur in Verbindung zu den jeweiligen Serumparametern und der Blut-Hirn-Schranken-Funktion bewertet werden. Bei intakter Blut-Hirn-Schranke bestehen für hydrophile Moleküle stabile Liquor-Serum-Quotienten. Die Höhe des Konzentrationsgradienten steigt mit dem Molekulargewicht. Ein erhöhter Liquor-Serum-Quotient des in der Leber synthetisierten Albumins dient als Indikator für eine Funktionsstörung der Blut-Hirn-Schranke. Bei Schrankenfunktionsstörungen nimmt die Konzentration von aus dem Serum stammenden Proteinen im CSF entsprechend einer Hyperbelfunktion zu [180]. Ist die Konzentration insbesondere der Immunglobuline höher als im Zusammenhang mit der Blut-Hirn-Schrankenfunktion (Liquor/Serum-Albumin-Quotient) zu erwarten ist, muss von einer intrathekalen Synthese ausgegangen werden. Dies deutet im Falle der Immunglobuline auf einen intrathekalen Entzündungsprozess hin [234].

1.2.2 Liquorpunktion

Für die Liquorgewinnung stehen verschiedene Punktionstechniken zu Verfügung [234].

- Lumbalpunktion
- mediale Suboccipitalpunktion
- laterale Zervikalpunktion
- Ventrikelpunktion
- Foramen ovale Punktion

Zur differentialdiagnostischen Abklärung bei dem Verdacht auf eine MS wird meist eine Lumbalpunktion durchgeführt. Sollte auf diesem Wege kein CSF zu gewinnen sein, können eine technisch anspruchsvollere und risikoreichere mediale Suboccipitalpunktion oder eine laterale Zervikalpunktion in Erwägung gezogen werden [234].

Die Lumbalpunktion

Die Lumbalpunktion wird zwischen dem 4. Und 5. oder dem 3. Und 4. Lendenwirbelkörperfortsatz durchgeführt. Der Conus medullaris reicht meistens bis zum LWK 1 oder 2. Eine Punktion oberhalb LWK 2/3 ist daher nicht zu empfehlen. Der Patient befindet sich in liegender oder sitzender Position. Die Höhe des Dornfortsatzes LWK 4 projiziert sich auf eine gedachte Verbindungslinie zwischen den beiden Beckenkämmen. Die Punktionsstelle kann im Vorfeld markiert werden. Steriles

Vorgehen ist angezeigt und ggf. kann eine Lokalanästhesie erfolgen. Gestochen wird streng median mit leicht nach kranial gerichteter Nadel. Ein federnder Widerstand deutet auf das Durchdringen des Ligamentum flavum oder der Dura mater. In 4-5 cm Eindringtiefe sollte nach Herausziehen des Mandrins CSF heraustropfen. Gründe für eine verhinderte lumbale Liquorgewinnung können punktionstechnische Ursachen, Zustand nach Wirbelsäulenoperationen, starke degenerative Wirbelsäulenveränderungen, lokale Entzündungen oder Tumoren und Fehlbildungen sein. Im Rahmen der Liquorentnahme sollte bei makroskopischer Blutbeimengung eine Dreigläserprobe zur Abgrenzung einer artifiziellen von einer pathologischen Blutung erfolgen. 15 ml CSF können beim Erwachsenen problemlos zur diagnostischen Zwecken entnommen werden. Kontraindikationen einer Liquorpunktion sind entzündliche Infiltrationen der Haut im Punktionsbereich, erhöhter intrakranieller Druck und zerebrale Herniation. Als relative Kontraindikationen gelten therapeutische Antikoagulation und Blutgerinnungsstörungen. Seltene Komplikationen der Liquorpunktion sind zerebrale und spinale Herniation, das Subduralhämatom, Hirnnervenerkrankungen und eine Inokulationsmeningitis. Bei der Lumbalpunktion sind häufiger radikuläre Reizsyndrome, eine postpunktionelle unspezifische Reizpleozytose und das postpunktionelle Liquorunterdrucksyndrom zu beobachten [234].

1.2.3 Liquoranalytik

Die Analyse des CSF erfolgt nach einem dreiteiligen Stufenprogramm. Es besteht aus der Notfalldiagnostik, Basisdiagnostik und den Spezialanalysen. Die Notfalldiagnostik umfasst Zellzahl, Glukose, Laktat und die Proteinanalyse [234].

Zellzahl

Der Referenzwert beträgt 0-4 Zellen/ μ l. Die Zellzahl ist der wichtigste Akutparameter entzündlicher ZNS-Erkrankungen. Während eines MS-Schubes kommt es zu einer Pleozytose von 5-50 und selten von 50-100 Zellen/ μ l [234].

Glukose und Laktat

Sie dienen dem Nachweis eines anaeroben Glukosestoffwechsels im ZNS. Der lumbale Liquorglukosespiegel beträgt beim Gesunden 50-60% des Serumwertes. Bei bakteriellen Infektionen fällt der Liquoranteil des Glukosespiegels auf unter 50%. Eine Glukoseerniedrigung korreliert mit einem Laktatanstieg im CSF [234].

Der Referenzbereich der Konzentration des Laktates im CSF liegt zwischen 1,2-2,1 mmol/l. Eine Laktatazidose des CSF findet sich bei bakteriellen Meningitiden, intrazerebralen Massenblutungen, Insulten und malignen Erkrankungen [234].

Gesamtprotein und Albuminquotient als Funktionsparameter der Blut-Hirn-Schranke

Die Konzentration des Gesamtproteins und der schrankenunabhängigen Einzelproteine im CSF ist altersabhängig und nimmt von ventrikulär nach lumbal kontinuierlich zu. Bei intakter Blut-Hirnschranken-Funktion ist der Liquor/Serum-Albuminquotient $<8 \times 10^{-3}$. Eine Erhöhung des Quotienten kann durch eine verstärkte Kapillarpermeabilität der Blut-Liquor-Schranke oder durch Liquorzirkulationsstörungen bedingt sein. Beispiele für starke Störungen der Schrankenfunktion sind die eitrige Meningitis, für mittelschwere Störungen die akute Neuroborreliose und das Guillain-Barré-Syndrom, für leichte Störungen die virale Meningitis und Polyneuropathien.

Zur Basisdiagnostik des CSF gehören die Liquorzytologie, die Bestimmung der Liquor/Serum-Quotienten bzw. der intrathekalen Synthese von IgG, IgA, IgM und die oligoklonalen IgG Banden (OKB) [234].

Liquorzytologie

Der Normalbefund zeigt ein zellarmes Präparat, das mehr Lymphozyten als Monozyten und vereinzelt Plexus –und Ependymzellen enthält. Auch bei Normozytose sind das Auftreten von Granulozyten, Plasmazellen, Blasten, atypischen Zellen, Erythrozyten und Siderophagen als pathologisch einzuordnen. Alle akut entzündlichen Prozesse im ZNS gehen mit einer Liquor-Pleozytose einher. Diese beträgt bei der bakteriellen Meningitis im Rahmen der neutrophilen Reaktion nicht selten >1000 Zellen/ μl . Bei subakut verlaufenden bakteriellen Infektionen und bei intrazellulärer Keimvermehrung ist eine gemischtzellige überwiegend lympho-monozytäre Reaktion zu erwarten. Eine lymphozytäre Entzündungszellreaktion ist typisch für virale Meningitiden bzw. Enzephalitiden. Die Liquorzytologie spielt des Weiteren eine Rolle in der Diagnostik der Subarachnoidalblutung und der Meningeosis neoplastica [234].

Intrathekale Synthese von IgG, IgA und IgM

Die Referenzwerte der Liquor/Serum Immunglobulinquotienten sind abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke. Daher erfolgt die Auswertung in Zusammenhang mit dem Liquor/Serum-Albuminquotienten mit Hilfe empirisch abgeleiteter Quotientendiagramme [180]. Die intrathekal synthetisierte Fraktion der Immunglobuline wird gesondert dargestellt. Eine intrathekale prädominante IgM-Synthese spricht zusammen mit einer mittelgradigen Schrankenfunktionsstörung für eine Neuroborreliose. Überwiegt die intrathekale Synthese von IgA gegenüber IgG und IgM kann ein Hirnabszess oder eine tuberkulöse Meningitis vorliegen. Die Veränderungen der Immunglobuline sind unspezifisch und kein direkter Beweis für die Infektion durch einen spezifischen Erreger [234].

Oligoklonale Banden

Sie sind ein sensitiver Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese mittels isoelektrischer Fokussierung und anschließender Immundetektion auf Agarosegel. Eine parallele Untersuchung des Parameters im CSF und im Serum ist erforderlich. Bei Patienten ohne Plasmozytom oder Entzündungsreaktion treten OKB weder im CSF noch im Serum auf. OKB treten unspezifisch bei subakut und chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen in Erscheinung. Zum Nachweis einer intrathekalen IgG-Produktion sind OKB sensitiver als die Quotientendiagramme. Mit Hilfe der OKB ist in 98% der MS-Fälle eine intrathekale Entzündungsreaktion nachweisbar. Dies gelingt im Falle der Quotientendiagramme nur in 70% der Fälle. Die OKB sind positiv, wenn mindestens zwei liquorspezifische Banden nachweisbar sind [234].

Spezielle Liquoruntersuchungen beinhalten die Bestimmung von erregerspezifischen Antikörperindizes [234].

Die Bestimmung erregerspezifischer Antikörperindizes dient zum Erregernachweis bei akuten oder subakuten ZNS-Infektionen und zur Charakterisierung der Entzündungsreaktion bei chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen. Die intrathekale Synthese wird mit Hilfe der Antikörperindizes berechnet. Ein positiver Antikörperindex stellt keinen Beweis für eine frische Infektion dar. Nur im Beisein akuter Entzündungsparameter sowie entsprechender anamnestischer und klinischer Befunde lässt sich ein positiver Antikörperindex als Hinweis auf eine erregerbedingte ZNS-Entzündung werten. Sind multiple erregerspezifische Antikörper im CSF gleichzeitig erhöht, kann dies auf eine Autoimmunerkrankung wie die MS hindeuten. Das beinhaltet den Nachweis intrathekalen Antikörper gegen Masern, -Röteln –und dem Varizella-Zoster-Virus im Rahmen der sog. *MRZ-Reaktion*. Die MRZ-Reaktion besitzt für die MS eine höhere diagnostische Spezifität als die OKB, sie belegt das Vorliegen einer chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankung, ist typisch für Autoimmunerkrankungen und kann in 94% der MS-Patienten nachgewiesen werden [234].

1.2.4 Liquorbefunde bei Multipler Sklerose

Es gibt keinen einzelnen pathognomonischen Liquormarker, sondern nur ein MS-typisches Profil aus mehreren Parametern, das die Diagnose MS ermöglicht [234].

- Pleozytose, 0-50 Zellen/ μ l, meist Lymphozyten, aktivierte B-Zellen, Plasmazellen.
- normales bis leicht erhöhtes Gesamtprotein.
- normaler bis leicht erhöhter Albuminquotient ($<8-10 \times 10^{-3}$), gering- bis mittelgradige Blut-Hirn-Schrankenfunktionsstörung.
- intrathekale Synthese von Immunglobulinen, meist IgG, nachgewiesen durch Quotientendiagramme oder durch sensitivere OKB.
- Die positive MRZ-Reaktion als Nachweis einer intrathekalen Synthese von Antikörpern gegenüber Masern, -Röteln -und Varizella-Zoster-Virus.

1.2.5 Biomarker für pathogenetische Prozesse der Multiplen Sklerose

Ein Biomarker in Körperflüssigkeiten stellt einen objektiv messbaren Parameter dar, der als Indikator für normale und pathologische Prozesse dienen kann. Dabei ergeben sich vielfältige Nutzungsmöglichkeiten im Hinblick auf die mögliche Vorhersage des Krankheitsverlaufes der MS oder das Monitoring von spezifischen Therapien. Für das ZNS ist der CSF von besonderem Interesse, da er in direktem Kontakt mit dem Hirngewebe steht und somit einen einzigartigen Einblick in ablaufende pathogenetische Prozesse liefert [219]. Für die bekannten Teilprozesse der Pathogenese der MS hat man verschiedene Substanzen untersucht, die als spezifische Biomarker dienen (Tab. 4).

Tabelle 4: Pathogenetische Prozesse der MS und ausgewählte prozess-spezifische Biomarker (modifiziert nach [234]).

Prozess	Marker
Inflammation	Zytokine und Zytokinrezeptoren, Chemokine, Antikörper, Komplement-Faktoren, Adhäsionsmoleküle, Antigenprozessierung, Zellzyklus- und Apoptosemarker (FLIP, TRAIL), zelluläre Subpopulationen (B, T, M), Funktionsassays
Alteration der Blut-Hirnschranke	MMP's, MMP-Inhibitoren (TIMP), PAF, Thrombomodulin
Demyelinisierung	MBP, MBP-like Material, Gliotoxin, 7-Ketocholesterol
Oxidative Schädigung	NO und stabile Metaboliten (Nitrit, Nitrat), Harnsäure, Isoprostane
Neuroregeneration	NCAM, CNTF, NGF, NT-3, BDNF
Gliose	GFAP, Protein S-100B
Neurodegeneration	Tau-Protein, Neurofilamente, 14-3-3

Abkürzungen: FLIP, Fas-assoziiertes IL-1 konvertierendes enzyminhibitorisches Protein; TRAIL, TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand; MMP, Matrix-Metalloproteinase; PAF, Plättchen-aktivierender Faktor; MBP, myelinbasiertes Protein, NO, Stickstoffradikale; N-CAM, neurales Zelladhäsionsmolekül; CNTF, ciliärer neurotropher Faktor; NT-3, Neutrophin; BDNF, Hirnstämmiger neurotropher Faktor; GFAP, Gliafibrilläres saures Protein.

1.2.5.1 Neurofilamente

Neurofilamente (Nf) sind ein integraler Bestandteil des axonalen Zytoskeletts. Strukturell handelt es sich um Heteropolymere, die aus drei Untereinheiten bestehen. Einer leichten (NfL), einer mittleren (NfM) sowie einer schweren Kette (NfH). Mit einem Durchmesser von etwa 10nm gehören die Nf zu den Intermediärfilamenten. Nf sind neuronenspezifische Proteine und daher als Biomarker für axonalen Schaden und Untergang geeignet [165]. Untersuchungen an Zellkulturen unterstreichen die Spezifität der Nf für das axonale Kompartiment [168]. Demgegenüber hat eine ältere Untersuchung gezeigt, dass auch T-Zellen NfH exprimieren können [149]. Die 3 Untereinheiten der Nf besitzen verschiedene molekulare Eigenschaften (Tab 5).

Tabelle 5: Molekulargenetische Eigenschaften der Neurofilament-Isoformen (modifiziert nach [165]).

Isoform	Chromosom	Aminosäuren	Molekulargewicht (kDa)
NfL	8p21	543	68
NfM	8p21	916	150
NfH	22q12.2	1020	190-210

Abkürzungen: kDa, Kilodalton, NfL, Neurofilament leichte Kette, NfM, Neurofilament mittlere Kette, NfH, Neurofilament schwere Kette.

Molekularstruktur der Neurofilamente

Jede Nf-Untereinheit besteht aus einer helikalen Kerndomäne, flankiert von einer Kopf- und hypervariablen Schwanzdomäne am N- bzw. C-terminus. Die Kernregion spielt eine Hauptrolle in der Zusammensetzung der Neurofilamente während Kopf- und Schwanzregionen für Protein-Protein-Interaktionen, wie Querverbindungen mit anderen Eiweißen des Zytoskeletts, verantwortlich sind. Die Synthese der Nf erfolgt in 6 Schritten [165]:

1. Synthese der Nf-Untereinheiten
2. Dimerisation der Nf-Untereinheiten
3. Dimere formieren sich antiparallel zu Tetrameren
4. Tetramere formieren sich longitudinal Kopf-an-Schwanz zu Protofilamenten
5. Protofilamente formieren sich längs zu Neurofilamenten
6. Phosphorylierung der Neurofilamente

NfH ist das am stärksten phosphorylierte Protein des ZNS. Phosphorylierung und Dephosphorylierung sind hochkomplexe, langsame Prozesse, die durch verschiedene Enzyme orchestriert [82] und im axonalen Kompartiment des Neurons reguliert werden [225]. Man unterscheidet verschiedene NfH-Phosphoformen (NfHp). Eine hypophosphorylierte und eine physiologische hyperphosphorylierte Form [165]. Perikarya, Dendriten und proximale Axone weisen geringer phosphoryliertes NfH auf. In langen Axonen überwiegt nach distal zunehmend hyperphosphoryliertes NfH [211]. 80% der axonalen Nf sind hyperphosphoryliert, ergeben den statischen Pool und sind in das Zytoskelett integriert. 20% sind weniger stark phosphoryliert und bilden den dynamischen Pool [153].

Funktionen der Neurofilamente

Nf werden ständig durch Proteinkinasen und Phosphatasen modifiziert. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Polypeptiden der Nf-Untereinheiten regulieren die verschiedenen Funktionen wie Polymerisation, axonalen Transport und die Interaktionen mit anderen Proteinen des Zytoskeletts [153]. Nf sind essentiell für das Wachstum und die Aufrechterhaltung des axonalen Durchmessers großer myelinisierter Fasern. Das axonale Kaliber determiniert die Geschwindigkeit der elektrischen Signalweiterleitung [179]. Hyperphosphorylierung der NfH erhöht durch elektrostatische Wechselwirkungen die Räume zwischen benachbarten Filamenten. Dadurch vergrößert sich der axonale Durchmesser [87]. Das axonale Wachstum wird nicht allein durch das NfH beeinflusst. Hauptregulatoren sind das NfM und das NfL [63, 179]. Es wird vermutet, dass der Phosphorylierungsprozess mit der Myelinisierung in Wechselwirkung steht [127]. Atypische Phosphorylierungsprozesse spielen in der axonalen Pathologie eine Rolle. Während die Phosphorylierung vor allem im axonalen Kompartiment stattfindet, kommt es unter pathologischen Bedingungen, als Reaktion auf axonalen Schaden, zu Hyperphosphorylierung von Nf in Dendriten und Perikarya [91].

Bedeutung der Neurofilamente im Rahmen neurologischer Erkrankungen

Akkumulation oder Mutationen von Nf werden in der MS und in anderen neurologischen Erkrankungen beobachtet. Zu diesen gehören die amyotrophe Lateralsklerose [188], Spinale Muskelatrophie [229], M. Parkinson [126], M. Alzheimer [79, 212], Schlaganfall [91], Subarachnoidalblutung [169], diabetische Polyneuropathie [196] und Charcot-Marie-Tooth-Krankheit [238].

NfH als Biomarker für Neurodegeneration in der MS

Neuronale Markerproteine, die direkt aus dem ZNS freigesetzt werden, sind im CSF regelmäßig, im Urin häufig und sehr selten im Blut nachweisbar [234]. Der Verlust von Axonen ist die Hauptursache der irreversiblen Behinderung bei MS-Patienten. Axonaler Schaden beginnt bereits sehr früh im Krankheitsverlauf und korreliert mit der Entzündungsaktivität [57]. Neurofilamente gelangen während der axonalen Desintegration in den Extrazellulärraum und von dort aus in den CSF [165]. Die Konzentrationen des NfH im CSF sind bei zerebralen Raumforderungen, Diskusprolaps, amyotropher Lateralsklerose und Subarachnoidalblutung deutlich höher im pathologischen Bereich als bei MS-Patienten. Dies deutet darauf hin, dass axonaler Schaden bei diesen Erkrankungen eine noch größere Rolle spielt als in der MS [168]. Eine 3-jährige Follow-Up-Untersuchung weist einen signifikanten Anstieg der Konzentration des NfH im CSF bei MS-Patienten nach, was auf progressiven axonalen Schaden und Neurodegeneration während des Krankheitsverlaufes der MS hindeutet [167]. Eine andere prospektive Studie an Patienten mit akuter unilateraler Optikusneuritis (ON) zeigt höhere Konzentrationen des NfH im Blutplasma als in der Kontrollgruppe und stellt den Zusammenhang zwischen erhöhten Plasmakonzentrationen des NfH und schwacher klinischer Remission her [170]. Brettschneider und Kollegen analysierten den diagnostischen Wert der Biomarker NfH, Tau-Protein und Gesamtprotein im CSF bezüglich der Fähigkeit die Konversion eines CIS in eine MS vorherzusagen. Diese Daten sind mit den Ergebnissen der Bildgebung mittels MRT verglichen worden. Die Sensitivität und Spezifität ist für eine Kombination von NfH, Tau-Protein und Liquor-Gesamtprotein höher als für das MRT allein und am höchsten in der Kombination von Liquormarkern und Bildgebung [32]. Hinsichtlich weiterer klinischer Parameter besteht eine proportionale Beziehung zwischen der Konzentration des NfH im CSF bei MS-Patienten und dem Grad der Behinderung [61, 119]. Letztere Untersuchung belegt zudem die im Rahmen einer akuten Schubexazerbation stark erhöhten NfH-Konzentrationen im

CSF von RRMS-Patienten. In Follow-Up-Untersuchungen korreliert eine schwache klinische Remission mit höheren Konzentrationen des NfH im CSF[181].

1.2.5.2 Tau-Protein

Das Tau-Protein ist ein intrazelluläres Phosphoprotein in Neuronen und Gliazellen des ZNS und gehört zur Familie der Mikrotubuli-assoziierten Proteine [21, 55].

Molekularstruktur des Tau-Proteins

Das Tau-Protein ist auf Chromosom 17q21 auf einem einzelnen Gen codiert. Durch alternatives m-RNA splicing entstehen sechs im ZNS synthetisierte Isoformen des Proteins mit Molekulargewichten zwischen 50 und 70kDa. In fetalen Hirnen wird die kürzeste Isoform expremiert. Zusätzlich gibt es eine für das PNS exklusive hochmolekulare Isoform von 120kDa [76]. In der c-terminalen Hälfte des Proteins findet sich die Mikrotubuli-Interaktionseinheit [202].

Funktion des Tau-Proteins

Als Phosphoprotein bindet es in Axonen an Mikrotubuli und spielt eine entscheidende Rolle im axonalen Transport [21]. Das Tau-Protein ist in der Lage die Polymerisationsrate der Mikrotubuli zu stimulieren, die Depolymerisation zu hemmen und die strukturelle Instabilität zu reduzieren. Moduliert werden diese Prozesse über Phosphorylierungsvorgänge am Tau-Protein, wodurch die Affinität zu den Mikrotubuli-Gittern reduziert wird [55, 223]. Das Tau-Protein interagiert direkt oder indirekt mit Aktinfilamenten des Zytoskeletts und beeinflusst dadurch die Zellform, die Zellmotilität und Mikrotubuli-Zellmembran-Interaktionen [29, 202].

Bedeutung des Tau-Proteins im Rahmen neurologischer Erkrankungen

Bei der Alzheimerkrankheit kommt es zu einer Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins, wodurch es in seiner Funktion gestört wird [85] und zu einem Konzentrationsanstieg im CSF [224]. Zu den Krankheiten, die auf eine Tau-Protein basierende neurofibrilläre Pathologie zurückzuführen sind, und als *Tauopathien* bezeichnet werden, zählen M. Alzheimer, die frontotemporale Demenz, die progressive supranukleäre Parese, die kortikobasale Degeneration, die Pick-Krankheit, die progressive subkortikale Gliose, das

Down-Syndrom, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und M. Parkinson [67, 202]. Die Konzentration des Tau-Proteins im CSF unterscheidet sich deutlich zwischen verschiedenen neurologischen Erkrankungen. Patienten mit einem Guillain-Barré-Syndrom und peripherer Neuroborreliose zeigen regelrechte Werte. Die höchsten Konzentrationen finden sich bei der Herpes-Simplex-Enzephalitis und der intrazerebralen Blutung. Während bei einer bakteriellen Meningitis normwertige Konzentrationen des Tau-Proteins im CSF vorliegen, kommt es bei einer fortgeleiteten Enzephalitis zu einem Anstieg der Konzentration. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF und der Funktion der Blut-Hirn-Schranke besteht nicht [213].

Das Tau-Protein als Biomarker für neuronalen Schaden in der MS

Kommt es durch die Immunreaktion im ZNS zur strukturellen Schädigung des Hirnparenchyms, wird das Tau-Protein in CSF freigesetzt. Unter normalen Umständen finden sich im CSF Konzentrationen des Tau-Proteins von 250-500pg/ml [71]. Da nicht nur Neurone, sondern auch Oligodendrozyten dieses Protein synthetisieren, weist ein Anstieg der Konzentration im CSF auf einen axonalen und/oder oligodendrozytären Schaden [182, 213]. Das Tau-Protein und das NfH stellen wertvolle Biomarker für axonalen Schaden bei Patienten mit CIS dar [32]. Zwischen den einzelnen klinischen Verlaufsformen der MS bestehen keine signifikanten Unterschiede der Konzentration des Tau-Proteins im CSF. Korrelationen zwischen der Liquorkonzentration des Tau-Proteins bei Patienten mit MS und dem Behinderungsgrad, der Krankheitsaktivität, der Schubanzahl, der Krankheitsdauer und der Anzahl T1-hypointensiver Läsionen im MRT lassen sich nicht sicher nachweisen. Aktuelle Untersuchungen zeigen bei Patienten mit RRMS während eines akuten Schubes deutlich höhere Konzentrationen des Markers im CSF als bei Patienten in der sekundär-chronisch progredienten Krankheitsphase [104]. Dementsprechend sind die Tau-Protein-Konzentrationen im CSF bei Patienten mit frischen Kontrastmittel anreichernden Hirnläsionen im MRT signifikant höher als bei Patienten, die keine Kontrastmittel aufnehmenden Herde vorweisen [21, 31, 107].

1.2.5.3 Protein S-100B

1965 isolierte Moore eine Proteinfraction aus Rindergehirn, der er aufgrund ihrer Eigenschaft in 100% gesättigtem Ammoniumsulfat bei neutralem pH in Lösung zu gehen, den Namen S-100 gab [147]. Die Hauptvertreter dieser Proteinfamilie sind Protein S-100A1 sowie Protein S-100B. Nachfolgend wurden diese Eiweiße aus Menschen- und Rattenhirnen isoliert [106, 122].

Das Protein S-100 wird in einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe expremiert [53]. Im Nervensystem ist die Expression auf Astrozyten und in geringerem Maße auf Schwann-Zellen beschränkt [197]. Es handelt sich um strukturell eng verwandte kalziumbindende Proteine der Calmodulin-S100-Troponin-C-Superfamilie mit strukturell fast identischen Kalziumbindungsstellen.

Molekularstruktur und Funktion des Protein S-100B

S-100-Proteine haben ein Molekulargewicht zwischen 9 und 14 kDa. Die Proteine S-100A1-13 sind beim Menschen eng benachbart auf Chromosom 1 in einem Gencluster kodiert, während S-100B auf Chromosom 21q22.3 liegt, was in einer Überexpression bei Trisomie 21 resultiert [86]. Intrazellulär bilden S-100-Proteine meist Homodimere. Die Dimerisierung und kalziumabhängige Konformationsänderungen sind entscheidend für die Interaktion mit Zielproteinen wie dem gliafibrillären sauren Protein (GFAP), Desmin, Tubulin oder Tumorsuppressorprotein p53, Myosin, Enzyme des Glukosestoffwechsels, die Adenylatzyklase, Neuromodulin oder Neurogranin [53, 197]. Durch die Interaktionen mit Proteinen des Zytoskeletts wie Mikro- und Intermediärfilamenten wird die Zellform modifiziert. Außerdem beeinflusst das Protein S-100B die Kalziumhomöostase, die Zellproliferation und deren Differenzierung. Protein S-100B wird in den Extrazellularraum sezerniert, es stimuliert konzentrationsabhängig neuronales Überleben, Apoptose, Astrozytenproliferation und übt immunmodulatorische Effekte aus [22, 53].

Bedeutung des Protein S-100B im Rahmen neurologischer Erkrankungen

Eine Überexpression von Protein S-100B spielt bei der Entstehung der Demenz vom Alzheimer-Typ und dem Down-Syndrom eine Rolle [7, 18, 86]. Die Expression von Protein S-100B in gesunden Individuen ist altersabhängig. Im frühen Kindesalter besteht eine hohe Expression von Protein S-100B. Im späten Kindesalter wird ein Plateau erreicht, im Erwachsenenalter kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme, um im Alter wieder anzusteigen [203]. Das Protein S-100B wurde in einer Reihe von Studien durch

verschiedene Methoden gemessen. Die Aussagen zum Referenzwert im CSF differieren erheblich. Das liegt zum einen an der Messmethode und zum anderen an der Auswahl der Referenzpopulation. Ein Referenzwert von 0,4ng/ml wird als angemessen beschrieben [84]. Bei Patienten mit Trisomie 21 ist die Immunreaktivität gegen Protein S-100B in allen Lebensabschnitten deutlich erhöht [143]. Erhöhte Konzentrationen von Protein S-100B im CSF wurden ferner bei zerebralen Blutungen sowie Hirntumoren [84], der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit [161], der frontotemporalen Demenz [83], der Epilepsie [209], dem Hirninfarkt [16] und dem Schädelhirntrauma [96] berichtet.

Protein S-100B als Biomarker für Astrozytenaktivierung in der MS

Durch den Transfer Protein S-100B spezifischer T-Zellen kann tierexperimentell eine Panenzephalitis und Uveoretinitis ausgelöst werden [114]. Damit gehört das Protein S-100B zum Kreis potentieller Autoantigene der MS [197]. Klinische Studien, in denen die Konzentration von Protein S-100B im CSF mit der klinischen Krankheitsaktivität der MS korreliert wird, erbringen widersprüchliche Resultate [123, 146]. Einige Daten zeigen, dass die Liquorkonzentration des Proteins S-100B bei Patienten mit einer RRMS gegenüber Kontrollpersonen signifikant erhöht ist [139, 166]. Eine andere Untersuchung bestätigt erhöhte Konzentrationen des Proteins S-100B im CSF bei Patienten mit RRMS während eines akuten Schubes, wobei keine Korrelation zum Behinderungsgrad ermittelt wird [181]. Eine prospektive Studie bei Patienten mit PPMS unter einer Therapie mit INF- β zeigen im Vergleich zu den Kontrollen keine signifikant erhöhten Serumkonzentrationen von Protein S-100B. Zwischen der Serumkonzentration von Protein S-100B und dem EDSS, der Krankheitsprogression, Änderungen von Therapieregimen und quantitativen MRT-Parametern stellen verschiedene Studien keine Zusammenhänge her [130]. Eine Untersuchung zur kindlichen MS erbringt keine signifikanten Unterschiede der Konzentration des Protein S-100B im CSF gegenüber der Kontrollpopulation [187]. Insgesamt steigt die Konzentration des Protein S-100B im CSF bei der MS selten über den Referenzwert an und ist deutlich geringer als bei neurologischen Erkrankungen, die durch großflächigen, akuten Hirnschaden gekennzeichnet sind [84, 139]. Die erhöhten Konzentrationen des Biomarkers nach akuter Hirnverletzung und chronisch progredienten Erkrankungen müssen getrennt voneinander betrachtet werden. Das Protein S-100B spielt während chronischer Krankheitsprozesse möglicherweise eine andere pathogenetische Rolle. Immunmodulatorische und den Krankheitsverlauf modifizierende Effekte werden diskutiert [53, 166].

2 Zielstellung

Das Ziel dieser prospektiven Studie ist die Untersuchung des Einflusses zyklischer intrathekalen Applikationen des retardiert freigesetzten Glukokortikosteroids Triamcinolon acetonid auf Biomarker für axonale Läsionierung und Astrogliose im CSF bei Patienten mit Multipler Sklerose.

Primäres Ziel ist die Untersuchung der Biomarker im CSF. Sekundäre Endpunkte sind die Ergebnisse klinischer Parameter. Zur detaillierten Beurteilung haben wir folgende Fragen formuliert:

Biomarker

- Welchen Einfluss hat TCA auf Parameter für axonale Läsionierung, repräsentiert durch das NfH und das Tau-Protein?
- Welchen Einfluss hat TCA auf die Astrogliose, operationalisiert durch das Protein S-100B?
- Welche Auswirkungen hat TCA auf Parameter der Routine-Diagnostik im CSF wie die Zellzahl, das Gesamtprotein, die Liquor-Zytologie und die Liquor-Serum-Quotienten der Immunglobuline G, M und A als Indikatoren für ein entzündliches Geschehen im ZNS und auf den Albumin-Liquor-Serum-Quotienten als Marker für die Blut-Hirn-Schrankenfunktion?

Klinik

- Haben repetitive TCA-Applikationen Auswirkungen auf den klinischen Status gemessen an dem klinisch-neurologischen Score EDSS, der allgemeinen Mobilität eruiert durch die Gehstrecke und den 25-Fuß-Test, die Spastik erfasst durch die modifizierte Ashworthscale (AS)?
- Sind Auswirkungen auf autonome Bereiche des Nervensystems wie die Blasenfunktion zu verzeichnen?
- Ändert sich unter der Therapie die Lebensqualität der Patienten?

Zusammenhänge

- Besteht ein Zusammenhang zwischen den klinischen Parametern und den Biomarkern im CSF?

3 Patienten, Material und Methoden

Das folgende Kapitel gliedert sich in eine Darstellung der Patientenkohorte und des zeitlichen Rahmens der Untersuchung. Es schließen sich Ausführungen über das Studiendesign, das Therapieregime, die Messmethodik der Biomarker im CSF und über die Evaluation klinischer und paraklinischer Parameter an. Den Abschluss bildet eine Übersicht zur statistischen Analyse der Daten.

3.1 Patienten und Studiendesign

Über einen Zeitraum von 9 Monaten haben wir prospektiv 54 Patienten mit klinisch und paraklinisch gesicherter MS beobachtet. Die Patienten unterzogen sich einer symptomatischen antispastischen Therapie durch ein intrathekal appliziertes, retardiert freigesetztes Glukokortikosteroid, dem TCA. Dieses Medikament wird in einem festen Zyklus alle 3 Monate appliziert. Der Beobachtungszeitraum umfasst 4 Therapiezyklen beziehungsweise 9 Monate. Alle Patienten wiesen zu Beginn der Untersuchung einen stabilen Krankheitsverlauf auf und boten keine Anzeichen für eine akute primäre oder aufgesetzte Schubsymptomatik (Tabelle 6).

Tabelle 6: Patienteneigenschaften

		Gesamtkohorte	Frauen	Männer	Gruppenvergleich
Anzahl (n)		54	36	18	
Lebensalter in Jahren (MW±SD)		47,9±9,7	48,7±9,7	46,2±9,9	n.s.*
Verlaufsform (n)	RRMS	20	14	6	n.s.*
	SPMS	26	19	7	n.s.*
	PPMS	8	3	5	n.s.*
Alter bei Krankheitsbeginn in Jahren (MW±SD)		35,1±8,7	35,5±8,8	34,4±8,8	n.s.*
Krankheitsdauer in Jahren (MW±SD)		12,4±8,4	13,0±8,5	11,3±8,1	n.s.*

* Kolmogorov-Smirnov-Test, Mann-Whitney-U-Test, Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; MW, Mittelwert; SD, Standardabweichung

Weibliche Individuen bilden den größten Teil der Patienten. Das Lebensalter, das Alter bei Krankheitsbeginn, die Krankheitsdauer und die klinische Verlaufsform unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Geschlechtern (Tab. 6). Die Leitsymptomatik der MS-Patienten besteht zu Studienbeginn aus motorischen (n=48), sensiblen (n=3) und aus kombiniert sensiblen und motorischen Störungen (n=3). Vor jeder intrathekalen Applikation des TCA erfolgten Liquorentnahmen für die Routinediagnostik. Aus diesem Kontingent wurde CSF für die speziellen Untersuchungen der Biomarker bereitgestellt.

Für diese Studie wurden keine zusätzlichen Liquorpunktionen durchgeführt. Die Patienten rekrutieren sich aus der Klinik für Neurologie des Martha-Maria Halle-Dölau Krankenhauses Halle (n=14), der Klinik für Neurologie und Neurologische Intensivmedizin des SKH Hubertusburg (n=30) und der Universitätsklinik und Poliklinik für Neurologie Rostock (n=10). Im Vorfeld erfolgte bei jedem Patienten eine schriftliche Aufklärung und Einverständniserklärung hinsichtlich der Therapie mittels TCA und der Teilnahme an der vorliegenden Studie. Eine Kontrollgruppe wurde nicht gebildet, da die Applikation eines Placebos aufgrund der Invasivität der Therapie ethisch nicht vertretbar gewesen wäre. Außerdem wäre den Patienten im Placeboarm eine nachgewiesenermaßen wirkungsvolle antispastische Therapie vorenthalten worden [92, 93, 98, 99].

Patienten von denen der Liquorproben aus dem 1. Therapiezyklus unvollständig vorlagen, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Während des Beobachtungszeitraumes von 9 Monaten reduzierte sich die Anzahl der Probanden. Die häufigsten Gründe waren unvollständig zugesendete Liquorproben, Klinikwechsel der Patienten und Therapieabbruch auf Patientenwunsch. Die verbliebenen Probanden werden als Gesamtkohorte zusammengefasst. Für den Zyklus 1 ergeben sich n=54, für den Zyklus 2 n=34, für den Zyklus 3 n=26 und für den Zyklus 4 n=24 Patienten (Abb.1). Für einige in die Studie eingeschlossene Patienten konnten aus logistischen Gründen Daten bestimmter klinischer und paraklinischer Parameter nicht akquiriert werden (Abb.2).

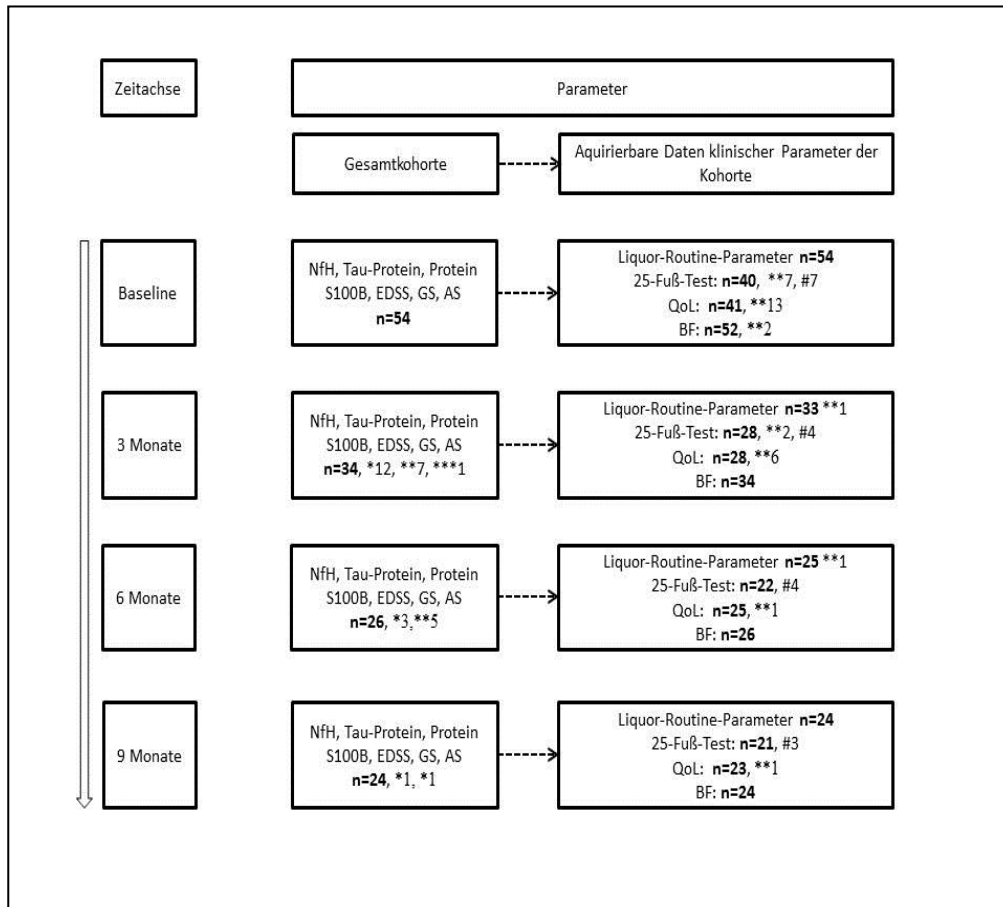


Abb. 2: Schematische Darstellung der Patientenanzahl der Gesamtkohorte bezogen auf gemessene klinische und paraklinische Parameter über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten. Anzahl und Ursache des Ausfalls von Patienten und/oder Daten sind gesondert dargestellt.

Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; EDSS, Expanded-Disability-Status-Scale; AS, Ashworthscale; GS, Gehstrecke; BF, Blasenfunktion; QoL, Quality of Life; * Therapieabbruch aufgrund von Patientenwunsch; ** Proben/Daten nicht vorhanden; *** Wechsel der Klinik; # Test aufgrund schwerer Behinderung nicht möglich.

3.1.1 Triamcinolon acetonid - Therapieschema

Die intrathekale Applikation von TCA findet stationär in aufeinander folgenden Zyklen im Abstand von 3 Monaten statt. Es werden 40-80 mg TCA jeden zweiten Tag 3- bis 5-mal pro Therapiezyklus intrathekal appliziert. Der Beobachtungs-zeitraum erstreckt sich über 4 Zyklen in 9 Monaten (Abb. 3).

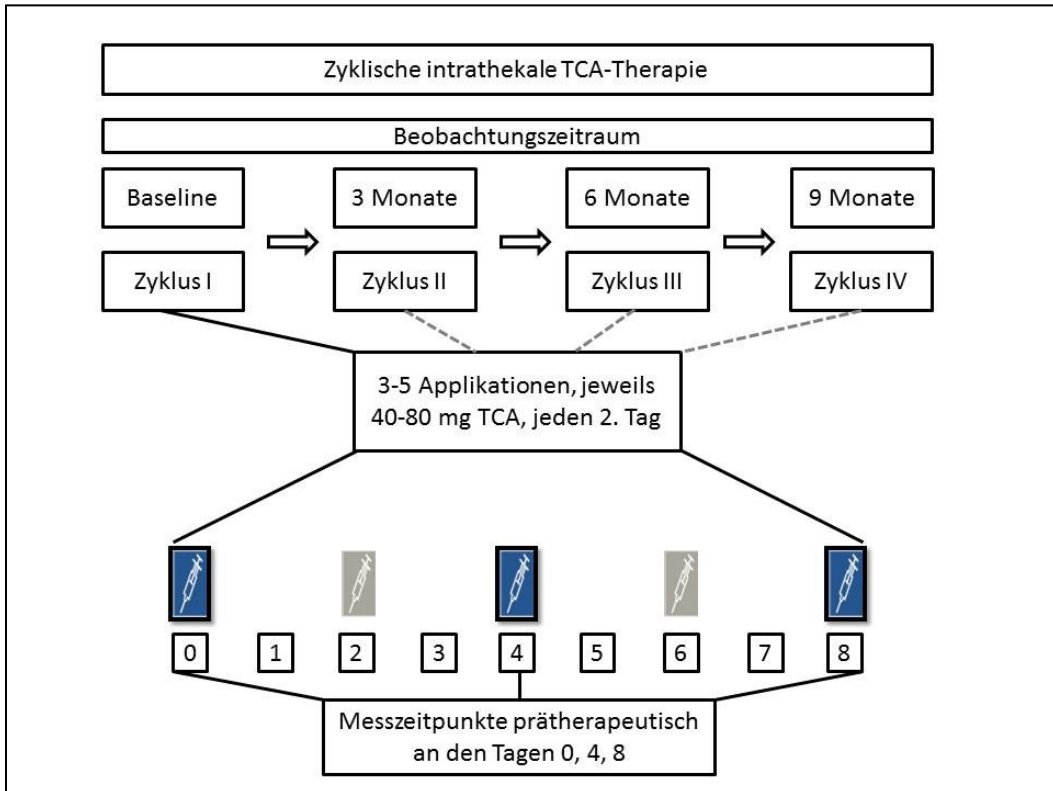


Abb. 3: Darstellung des zyklischen TCA-Therapieschemas über den gesamten Beobachtungszeitraum sowie der Mess- und Applikationszeitpunkte. Die Spritzensymbole stellen die Applikationszeitpunkte des TCA dar. Die hervorgehobenen, umrahmten Spritzensymbole entsprechen den prätherapeutischen Messzeitpunkten.

Abkürzungen: TCA, Triamcinolonacetonoid.

Vor der Medikamentengabe wird CSF für die Standarddiagnostik im Rahmen des Therapie-Monitorings gewonnen. Die atraumatische *Sprotte-Nadel*® (Pajunk Medizintechnologie GmbH, Geisingen, Deutschland) [30] ist in allen Fällen für die Lumbalpunktion verwendet worden.

Die Applikationszahl pro Zyklus und die Dosis pro Applikation sind individuell festgelegt worden. Dosisanpassungen erfolgen beispielsweise dann, wenn die antispastische Wirkung des Medikamentes für den Patienten als zu stark empfunden wird oder sich nicht der gewünschte Therapieeffekt einstellt. Technische Schwierigkeiten oder ein starkes Schmerzempfinden des Patienten bei der Liquorpunktion führen nicht selten zu einer Reduktion der Applikationsanzahl pro Therapiezyklus oder einem Therapieabbruch. Unsere Patientenkohorte wurde in Individuen die 3 oder 5

Applikationen empfangen haben eingeteilt. Patienten die weniger als 3 Applikationen in einem Zyklus erhielten, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Somit ergeben sich in Abhängigkeit von der Applikationsanzahl und den Einzeldosen unterschiedliche Zyklusgesamtdosen. Die Gesamtdosis eines Zyklus korreliert stark positiv mit der Anzahl der Applikationen (Tab. 7). Hauptindikationen für die intrathekale TCA-Therapie der 54 Patienten unserer Kohorte sind das Versagen einer primären antispastischen Therapie (n=33), individuelle Gründe wie spinale Herde, Sensibilitätsstörungen, Therapieoptimierung bei ausgeprägter Para -und Tetraparese (n=17) und das Versagen einer anderen Immuntherapie (n=4).

Tabelle 7: Vergleich der pro Therapiezyklus applizierten Gesamtdosis TCA zwischen den nach Anzahl der Applikationen getrennten Subgruppen.

Therapiezyklen	Gesamtkohorte (TCA in mg, MW±SD)	Patienten mit 5 Applikationen (TCA in mg, MW±SD)	Patienten mit 3 Applikationen (TCA mg, MW±SD)	Gruppen- vergleich
Zyklus I Ausgangspunkt	156,7±42,4 (n=54)	185,9±37,3 (n=27)	127,4±22,3 (n=27)	p<0,000*
Zyklus II 3 Monate	151,8±54,9 (n=34)	185,0±65,5 (n=16)	122,2±9,4 (n=18)	p<0,000*
Zyklus III 6 Monate	143,9±53,1 (n=26)	176,4±70,9 (n=11)	120,0±0,0 (n=15)	p<0,005*
Zyklus IV 9 Monate	145,0±57,9 (n=24)	180,0±78,9 (n=10)	120,0±0,0 (n=14)	p<0,004*

*=Kolmogorov-Smirnov-Test, Mann-Whitney-U-Test; MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung

3.2 Analyse des Liquor cerebrospinalis

Der untersuchte CSF wurde den Patienten nach vorheriger Aufklärung und Einverständniserklärung vor jeder TCA Applikation im Rahmen der standardmäßigen Liquordiagnostik entnommen und sofort bei -70°C eingefroren. Die Liquor-Basisparameter wurden in den Liquorlaboren der behandelnden Kliniken ermittelt und dem Autor im Nachhinein bereitgestellt. Die Analysen der Spezialmarker wurden für das NfH am Institut für Neurologie, Abteilung Neuroimmunologie der Universität London unter der Leitung von Prof. Petzold zu einem Großteil durch den Autor selbst durchgeführt. Tau-Protein und Protein S-100B wurden in der Klinik für Neurologie der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. med. Tumani untersucht. Die Protokolle zur Durchführung der Immunassays zur Bestimmung von Tau-Protein und Protein S-100B wurden von Herrn Prof. Dr. med. Tumani zur Verfügung gestellt. Logistik, Katalogisierung und Versand der Liquorproben an die Zentren wurden durch den Autor durchgeführt und erfolgten auf Trockeneis ohne Unterbrechung der Kühlkette.

3.2.1 Messung des Neurofilamentes

Petzold und Kollegen entwickelten einen enzymbasierten Immunassay zur quantitativen Bestimmung des NfH im CSF und im Serum.

Antikörper

Der erste Antikörper des Immunoessays ist ein monoklonaler NfH-Antikörper der Maus (Sternberger Monoclonals Utherville, USA). Für die verschiedenen NfHp sind unterschiedliche Antikörper kommerziell verfügbar. Diese binden an Epitope des NfH in Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad. Petzold und Kollegen schlugen daher nomenklatorisch vor, die gemessenen NfHp nach dem bindenden ersten Antikörper zu benennen (Tab. 8) [168]. In der vorliegenden Studie wurde der NfH^{SMI35} verwendet.

Der Detektionsantikörper ist ein polyklonaler Hasen-anti-NfH-Antikörper (N4142, SIGMA). Als Indikatorantikörper kommt ein polyklonaler Schweine-anti-Hasen-Antikörper zum Einsatz, welcher mit einer Meerrettich-Peroxidase markiert ist (DAKO, Kopenhagen, Dänemark).

Tabelle 8: Nomenklatur der NfH Phosphoformen, Antikörperbindungs-Epitope an NfH Phosphoformen, Antikörpertypen und die im Vorfeld publizierten kommerziellen Bezeichnungen der monoklonalen Mausantikörper (Sternberger Monoclonals) (modifiziert nach [168]).

Vorgeschlagene Nomenklatur	Epitope an NfH Phosphoformen	Antikörper-Typ	Antikörper Bezeichnung
NfH ^{SMI32}	nicht phosphoryliertes NfH	IgG1	SMI32
NfH ^{SMI33}	phosphoryliertes und nicht phosphoryliertes NfH	IgM	SMI33
NfH ^{SMI34}	stark phosphoryliertes NfH	IgG1	SMI34
NfH ^{SMI35}	leicht bis stark phosphoryliertes NfH	IgG1	SMI35
NfH ^{SMI37}	nicht phosphoryliertes NfH	IgM	SMI37
NfH ^{SMI38}	nicht phosphoryliertes NfH	IgG1	SMI38
NfH ^{SMI310}	extrem stark phosphoryliertes NfH	IgG1	SMI310
NfH ^{SMI311}	nicht phosphoryliertes NfH	Antikörper-Cocktail	SMI311
NfH ^{NE14}	phosphoryliertes NfH	IgG1	NE14

NfH=Neurofilament schwere Kette, Ig=Immunglobulin

Chemikalien

Für den Essay wurden verschiedene Chemikalien unterschiedlicher Hersteller verwendet. Diese bilden die Grundlage zur Erstellung verschiedener Lösungen. (Tab. 9-10).

Tabelle 9: *NfH-Immunassay: Chemikalien und Hersteller.*

Chemikalie	Hersteller
Na-EDTA	SIGMA
Na-Barbital	SIGMA
Na-Carbonat	SIGMA
Na-Hydrogencarbonat	SIGMA
Tween20 (Seife)	SIGMA
BSA	SIGMA
HCL	Merck
TMB	DAKO

Abkürzungen: EDTA, Ethyldiamintetraacetat; Na, Natrium; BSA, Bovines Serumalbumin; HCL, Salzsäure; TMB, Tetramethylbenzidin

Tabelle 10: *NfH-Immunassay: Lösungen und ihre Zusammensetzung.*

Lösung	Zusammensetzung
Barbital 2-EDTA-Puffer (pH 8,6) (pro 1 L destilliertes Wasser)	13,1g Natriumbarbital 2,1g Barbital (5,5-Diethylbarbitursäure) 0,25g Natrium-EDTA
Carbonat-Puffer (pH 9,6) (pro 1 L destilliertes Wasser)	13,85g Natriumcarbonat 26,10g Natriumhydrogencarbonat
Blocklösung	2% BSA in Barbital 2-EDTA Puffer (2g BSA in 1ml Puffer)
Probenlösung	0,2% BSA in Dibarbital-EDTA Puffer
Waschlösung	0,2% BSA, 0,05% Tween20 in Barbital 2-EDTA Puffer

Abkürzungen: EDTA, Ethyldiamintetraacetat; BSA, Bovines Serumalbumin

Standard

Um die Standardkurve zu ermitteln, wird eine Verdünnungsreihe des bovinen NfH Proteins (Affiniti Research Products) erstellt. 10 ml des NfH-Antigens in der Konzentration 50 µg/ml wurden in 1000 ml destilliertem Wasser verdünnt (1:100). Man erhält eine Konzentration von 500 ng/ml. Diese Lösung wird dann auf 1:20 verdünnt (500 µl in 10 ml) und damit ist eine Konzentration von 25 ng/ml erreicht. Die Verdünnungsreihe beginnt bei 25 ng/ml und umfasst sieben Verdünnungsstufen bis 0,19 ng/ml. Die neue Standardkurve wird mit der alten Standardkurve verglichen.

Verdünnungen zwischen 0 und 5 ng/ml werden akzeptiert. Die optische Dichte der niedrigsten Standardkonzentration sollte 3 Standardabweichungen über dem Leertest sein. Die neuen Standardlösungen werden in neue Fläschchen pipettiert und für spätere Benutzung mit dem Datum, dem Analysten und den Konzentrationen beschriftet und bei -20°C eingefroren.

Testablauf

Es werden Maxisorb Mikrotiterplatten (Life Technologies, Paisley, Scotland) verwendet. 2 µl anti-NfH^{SMI35} werden mit 10,5 ml Carbonatpuffer vermischt. 100 µl gelöster Antikörper werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Messtag werden die bei -70°C gefrorenen Liquorproben im Warmwasserbad langsam auf Raumtemperatur aufgetaut und für jeweils 10 Sekunden mit einem Vortex-Mischer geschüttelt. Dann erfolgt das Dekantieren und Abwaschen der Platte mit Waschlösung. Einstündiges Inkubieren mit Blocklösung bei Raumtemperatur vermeidet unspezifische Bindungen, anschließend Dekantieren und zweimaliges Waschen der Platte mit 250 µl Waschlösung. Je 50 µl Liquor-Proben bzw. kalibrierte Standardlösungen und Leertests werden jeweils doppelt in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann dekantieren und waschen der Platte 6 x 5 Minuten mit 250 µl Waschlösung. 10 µl des polyklonalen Hasen-anti-NfH Detektions-antikörpers in 10,5 ml Probenlösung auflösen und davon 100 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte geben, anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren, dekantieren und die Platte mit 250 µl Waschlösung 6 x 5 Minuten waschen. 10 µl des durch die Meerrettichperoxidase markierten Schwein-anti-Hasen Indikatorantikörpers in 10,5 ml Probenlösung lösen und davon 100 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte hinzugeben. Eine Stunde wird bei Raumtemperatur inkubiert, dann dekantieren und 6 x 5 minütiges Waschen der Platte mit 250 µl Waschlösung anschließen. 100 µl TMB als Enzym-Substrat werden in jede Vertiefung pipettiert und bei Raumtemperatur für 15-20 Minuten in der Dunkelheit inkubiert. Die Farbreaktion sollte so lange andauern bis sich der niedrigste Standard vom Leertest abhebt. Die Farbreaktion wird durch das Hinzugeben von 50 µl 1M Salzsäure in jede Vertiefung gestoppt. Zum Schluss erfolgt das Auslesen der Absorption bei 450 und 750 nm an einem Wallac Victor 2. Die optische Dichte ist proportional zur Antikörper-gebundenen Menge NfH. Zur weiteren Auswertung wird die anhängende Excel-ELISA-Datei verwendet. Zur Qualitätskontrolle werden die Standards, die Leertests und die Proben jeweils doppelt gemessen. Der Variationskoeffizient zwischen den Wertepaaren sollte 10% nicht übersteigen. Andernfalls wird die Messung wiederholt.

3.2.2 Messung des Tau-Proteins

Testprinzip

Es wurde der Enzymimmunoassay INNOTEST® hTau Ag von INNOGENETICS verwendet, der es ermöglicht, humanes Tau-Protein quantitativ zu erfassen.

Die Vertiefungen der verwendeten Mikrotiterplatten aus Polystyrol sind mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes Tau-Protein (AT120) beschichtet. In diese Vertiefungen werden die Standards und Proben pipettiert und mit Konjugat 1 inkubiert, das zwei biotinylierte Tau-spezifische monoklonale Antikörper (HT7 und AT2) zur Erkennung der unterschiedlichen Epitope enthält. Das hinzugegebene Konjugat 2 enthält peroxidase-konjugiertes Streptavidin, an das sich das Biotin der Antikörper bindet. Wird nun das Substrat mit einem Chromogen in die Vertiefungen pipettiert, entsteht eine blaue Farbe, die nach Zugabe von Schwefelsäure als Stopplösung in gelb umschlägt und deren Intensität proportional der in den anfänglichen Proben oder Standards vorhandenen Menge an humanem Tau-Protein ist.

Testablauf

Der Kit wird bei 2 - 8°C aufbewahrt und die daraus benötigten Substanzen am jeweiligen Messtag ungefähr 30 Minuten vor Testbeginn aus dem Kühlschrank, die Liquorproben ungefähr 45 Minuten davor aus dem Gefrierschrank (-80°C) geholt, um Raumtemperatur zu erlangen. Um eine schnellere Durchführung des Tests zu garantieren, werden pro Messung nur 6 Teststreifen verwendet. Die restlichen Streifen werden verschlossen in einem Plastikbeutel mit einem Silikagelbeutelchen wieder in den Kühlschrank gebracht. Konjugat 1 wird durch Verdünnen mit Konjugatverdünnungspuffer im Verhältnis 1:100 in einem 13ml Reagenzgefäß hergestellt. Der höchste Standard (1200 pg/ml) wird durch Zugabe von 500µl Probenverdünnungspuffer angefertigt, und nach 15 Sekunden für die Dauer von 15 Sekunden auf dem Vortex-Mischer gemischt. Die restlichen Standards werden durch serielle Verdünnung mit Probenverdünnungspuffer im Verhältnis 1:1 in Eppendorf-Tubes hergestellt (600; 300; 150; 75 pg/ml). Die Liquorproben werden vor dem Test für etwa 10 Sekunden auf dem Vortex-Mischer durchmischt. Das Konjugat 1 wird in das V-förmige Reservoir eingefüllt und mit der Mehrkanalpipette (TECAN) werden 75 µl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gebracht. Anschließend werden mit einer Eppendorf-Pipette 25 µl der Standards und des Probenverdünnungspuffers für den Leerwert und die Proben einpipettiert. Zur Durchmischung wird die Platte bei 1000 U/min auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler bewegt. Die Vertiefungen werden mit Klebefolie bedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen werden die benötigten Reagenzien aus dem Kühlschrank geholt und auf Raumtemperatur

gebracht. Die Waschlösung wird durch Verdünnen von 60 ml des Waschlösungskonzentrats (im Verhältnis 1:25) auf 1500 ml mit destilliertem Wasser hergestellt. Diese Lösung wird so lange in einem Erlenmeyerkolben geschwenkt bis alle darin befindlichen Kristalle aufgelöst sind. Das Mikrotiterplattenwaschgerät wird mit dieser Lösung einmal gespült und anschließend die Platte 4 x mit jeweils 0,4 ml Waschlösung gewaschen. Währenddessen wird das Konjugat 2 durch Verdünnung mit Konjugatverdünnungspuffer im Verhältnis 1:100 angefertigt. Mit der Mehrkanalpipette werden 100 µl in die einzelnen Vertiefungen pipettiert und die Streifen mit einer Klebefolie bedeckt sowie bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Substratlösung wird durch Verdünnen des TMB-Chromogen-Konzentrats im Verhältnis 1:100 mit dem Substratpuffer gewonnen. Es muss darauf geachtet werden, dass das TMB vollständig geschmolzen ist, da es unterhalb einer Temperatur von 18°C auskristallisiert. Die Streifen werden mit dem automatischen Waschgerät gewaschen und mit der Mehrkanalpipette werden 100 µl der Substratlösung in jede Vertiefung zugegeben und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die 2 N Schwefelsäure wird nach Ende der Inkubation in derselben Reihenfolge wie das Substrat mit der Mehrkanalpipette zugegeben. Die Reagenzien werden durch vorsichtiges seitliches Klopfen an der Platte gemischt und diese innerhalb von 15 min bei 450 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen.

Die Messungen werden auf einen Peacock-Computer übertragen, die Standardkurven berechnet und ausgedruckt. Aus den gemessenen Doppelbestimmungen wird der Mittelwert berechnet. Die Standardabweichungen der Doppelbestimmungen sollten kleiner als 10% betragen, die Absorption des Probenverdünners sollte $< 0,200$ liegen. Die Absorption des höchsten Tau Standards sollte 1,6 - 2,2 betragen, gemessen bei 450 nm. Proben außerhalb des angegebenen Messbereichs von 75 pg/ml-1200 pg/ml müssen bei der nächsten Messung mit Probenverdünner verdünnt und die gemessene Konzentration um den Verdünnungsfaktor korrigiert werden (Protokoll zur Durchführung der Messung des Tau-Proteins wurde dem Autor von Herrn Prof. Dr. H. Tumani, Neurologische Universitätsklinik Ulm zu Verfügung gestellt.)

3.2.3 Messung des Proteins S-100B

Testprinzip und Antikörper

Die Messung des ProteinS100-B im CSF erfolgt mit einem immunluminometrischen Assay der Firma Sangtec (Bromma, Schweden). Dieser misst die B-Untereinheit des Proteins S-100 nach dem „Sandwich-Prinzip“. Ein Antikörper gegen S-100B, der an der Wand der verwendeten Röhrchen haftet, bindet dieses, ein Materialüberschuss wird durch die Waschkvorgänge entfernt. Das zugegebene Tracerkonjugat besteht aus einem zweiten Anti-S-100-Antikörper mit einem daran gebundenen Isoluminolderivat, der sich an das S-100B bindet, das nun an die Wand der Röhrchen durch den ersten Antikörper fixiert wird. Im eigentlichen Messschritt wird alkalische Peroxidlösung und Katalysatorlösung in die Teströhrchen gegeben und die Oxidation des Isoluminols sofort gestartet, weshalb dieser Vorgang automatisch im Messgerät durchgeführt wird. Das durch die Emission der Photonen freigesetzte Licht (425nm), gemessen in relativen Lichteinheiten, ist proportional zur gebundenen Menge an S-100B in der Probe und wird mit Hilfe eines Photomultipliers im Luminometer gemessen.

Testablauf

Die Reagenzien (Test-Kit und Starter-Kit) werden bei 2 - 8°C gekühlt und etwa 45 min. vor Gebrauch aus dem Kühlschrank geholt, um Raumtemperatur zu erlangen. Die Liquorproben werden in dieser Zeit von -70°C aufgetaut, bis sie ebenfalls Raumtemperatur haben und für jeweils zehn Sekunden mit Hilfe eines Vortex-Mischers durchgeschüttelt, um eine Durchmischung der Proben zu erhalten. Die Röhrchen werden in einen Halteständer eingesetzt und mit der Rekonstitution der Standards kann dann begonnen werden. Es wird 1 ml destilliertes Wasser mit einer Eppendorf-Pipette jeweils in die Glasbehälter mit lyophilisiertem Standard und Kontrollseren gegeben und kurz auf dem Vortex-Mischer durchmischt. Anschließend wird in jedes Röhrchen 100 µl des Diluents pipettiert und sofort damit begonnen, 100 µl des Standards (Konzentrationen in µg/l: 0; 0,1; 0,4; 2; 8; 20), der Kontrollseren bzw. der Proben in die Röhrchen als Doppelbestimmung zu geben. Es soll darauf geachtet werden, dass die Proben innerhalb von zehn Minuten eingefüllt werden. Es folgt eine Stunde Inkubationszeit. In dieser Zeit wird die Waschlösung durch Verdünnung der mitgelieferten 50 ml Konzentration mit destilliertem Wasser auf 1000 ml vorbereitet, wobei sich die in der konzentrierten Waschlösung befindlichen Kristalle vollständig aufgelöst haben müssen. Nach Ende der Inkubationszeit wird der Inhalt der Röhrchen ausgeleert und mit einer Eppendorf Multipipette-Plus (versehen mit Combitip 50 ml) gewaschen, indem in drei Waschzyklen jeweils 2 ml der Waschlösung zugegeben wurden und nach jedem Waschgang der

Ständer umgedreht und ausgeleert wird. Als nächstes werden jeweils 200 µl des Tracerkonjugats mit der Eppendorf Multipipette (versehen mit Combitip 5 ml) zugegeben und die Proben zwei Stunden inkubiert.

Vorbereitung des Luminometers

Während der Inkubationszeit wird der Auto-CliniLumat für die Messung unter zu Hilfenahme des Starter-Kits vorbereitet. Eine Peroxid-Tablette wird in 50 ml der 4%igen Natronlauge aufgelöst und 30 Minuten leicht bewegt. Die Katalysatorlösung stellt man her, indem 500 µl der Katalysatorstammlösung in 50 ml Katalysator-Diluent überführt und vorsichtig zur Durchmischung geschwenkt werden. Das Lyophilisat der Lichttest-Reagenz wird mit 2 ml destilliertem Wasser rekonstituiert, vorsichtig geschüttelt, um eine Schaumbildung zu vermeiden, und für 5 Minuten stehen gelassen. Die alkalische Peroxid-Lösung wird in Injektor-Position 1 des Luminometers und die Katalysator-Lösung in Injektor-Position 2 gebracht. Das Gerät wird nun mit drei Waschzyklen durchgespült, wobei 6 der im Starter-Kit enthaltenen Röhrchen verwendet werden. Anschließend wird der Lichttest durchgeführt. Die Messung des Geräteleerwerts, in der die relativen Lichteinheiten der vom Messgerät automatisch injizierten Reagenzien gemessen werden, erfolgt in zwei Röhrchen. Die Messung der Lichttestreagenzien wird in drei Messröhrchen, befüllt mit jeweils 100 µl Lichttestreagenz, vorgenommen. Die Richtwerte können dem mitgelieferten Qualitätskontrollbericht entnommen werden. Chemischer Background (Geräteleerwert) : < 1500 RLU (relative Lichteinheiten) Licht-Check : 400 000 – 1000 000 RLU

Luminiszenzmessung

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Proben und Kontrollen wieder mit 3 x 2 ml Waschlösung gewaschen, wobei die Eppendorf Multipipette-Plus (versehen mit Combitip 50 ml) benutzt wird. Die Lumineszenzmessung wird durchgeführt, indem zuerst zwei Röhrchen ohne enthaltenden Antikörper und nach einer Freistelle zuerst die Kontrollseren für die Standardkurve, dann die Röhrchen für die Hoch-/Niedrig-Kontrollen und anschließend die Proben jeweils in Doppelbestimmung in das Gerät gestellt werden. Die Messzeit beträgt 5 Sekunden, die Werte und die Standardkurve werden auf dem Drucker im Gerät ausgedruckt. Die Sollwerte der gemessenen Kontrollseren im hohen und niedrigen Bereich variieren von Kit zu Kit und werden den beiliegenden Sollberichten entnommen. Die Mittelwerte werden jeweils aus den Doppelbestimmungen berechnet. Die maximale Standardabweichung der Doppelbestimmungen darf 10% betragen. Der Messbereich wird mit 0,02 - 20 µg/l angegeben. Nach jedem Messtag wird der Luminometer mit destilliertem Wasser durchgespült, indem die zwei Flaschen in den

Injektorpositionen durch destilliertes Wasser ersetzt werden. Hierzu werden zehn Starter-Kit-Röhrchen verwendet, die für die 5 Waschzyklen notwendig sind. (Protokoll zur Durchführung der Messung des Proteins S-100B wurde dem Autor von Herrn Prof. Dr. H. Tumani, Neurologische Universitätsklinik Ulm zu Verfügung gestellt.)

3.2.4 Messung der Liquor-Routine-Parameter

Die Untersuchung der Konzentrationen des Gesamtproteins, der Liquor-Serum-Quotienten des Albumins, der Immunglobuline G, M und A erfolgten für die Gesamtkohorte am Ausgangspunkt eines jeden Therapiezyklus in den Labors der behandelnden Kliniken.

Zur Untersuchung der Liquor-Zytologie rekrutierten wir eine Subkohorte von 10 Patienten, die in der Klinik für Neurologie der Universität Rostock behandelt wurden. Die Durchführung der Zytologie erfolgte in einem angeschlossenen auf Liquorzytologie spezialisierten Labor.

3.3 Klinische Verlaufsparemeter

Prospektiv wurden vor und nach jedem Therapiezyklus zur Beobachtung des klinischen Verlaufes der EDSS [121], die modifizierte AS [15, 27], die Gehstrecke, die Lebensqualität und die Blasenfunktion bestimmt. Ferner wurde einmal innerhalb eines Therapiezyklus die 25-Fußstrecke eruiert. Vor und nach jedem Zyklus erfolgte die Erfassung der Lebensqualität mit Hilfe einer semiquantitativen Analogskala, in der Werte von 0 (schlecht) bis 10 (sehr gut) gemessen wurden. Die Ermittlung dieser Parameter wurde vollständig durch die klinischen Physiotherapeuten und das ärztliche Personal der behandelnden Kliniken vorgenommen. Im Rahmen der Rostocker Untergruppe von 10 Patienten wurde die Lebensqualität vom Autor retrospektiv telefonisch im Patientengespräch erfragt. Zur semiquantitativen Evaluation der Blasenfunktion sind mehrere Kategorien verwendet worden: Besserung, Restharngefühl, Kontinenz und Inkontinenz.

3.4 Statistische Analyse

Die statistischen Berechnungen führte der Autor mit der Software SPSS® 15.0 und IBM® SPSS® Statistics Version 20 durch. Die Voranalyse der Daten, die Implementierung in SPSS und die Auswahl der statistischen Tests geschahen in Zusammenarbeit mit Frau Dipl.-Math. Krentz des Institutes für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock.

Statistische Tests

Alle Parameter wurden durch den Kolmogorov-Smirnov-Test auf ihre Verteilung geprüft und als nicht normalverteilt eingestuft. Zur Berechnung der Parameter wurden Mittelwerte aus den Messwerten der Patienten gebildet.

Zur Untersuchung des zeitlichen Verlaufes der speziellen Liquor-Biomarker, der Liquor-Routine-Parameter, der klinischen Messwerte über den Untersuchungszeitraum kamen der Friedmann-Test und der Wilcoxon-Test für voneinander abhängige Stichproben zur Anwendung.

Um Liquor-Biomarker, Liquor-Routine-Parameter, soziodemographische und klinische Parameter an einem Zeitpunkt miteinander zu vergleichen wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Mann-Whitney-U-Test für voneinander unabhängige Stichproben benutzt.

Um die Stärke des Einflusses verschiedener Variablen auf eine abhängige Variable zu erfassen, sind Multiple Regressionsanalysen durchgeführt worden.

Zur Darstellung der Beziehungen zwischen einzelnen Parametern ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt worden.

Das Werk „Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin“ diente als Grundlage für die Berechnungen der genannten statistischen Verfahren [117].

4 Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse werden in einer festen, schematischen Reihenfolge dargestellt (Abb. 4). Beginnend mit dem CSF und den spezifischen Biomarkern sowie den Liquor-Routineparametern. An zweiter Stelle folgen die klinischen Parameter. Den Abschluss bilden die Resultate der Beziehungen zwischen den Biomarkern untereinander und mit den Liquor-Routineparametern sowie den klinischen Einflussgrößen. Diese Daten werden innerhalb von verschiedenen Vergleichs- und Betrachtungsebenen aufgeführt. Die Vergleichsebenen betrachten Unterschiede zwischen Geschlecht, klinischer Verlaufsform und den nach der Anzahl der TCA-Applikationen gebildeten Subgruppen. Die Betrachtungsebenen der Ergebnisse gliedern sich in den ersten Therapiezyklus, dem Gesamtverlauf über 9 Monate, in interzyklische Vergleiche und Paarvergleiche der Werte am Ausgangspunkt (Baseline) mit späteren Zeiträumen.

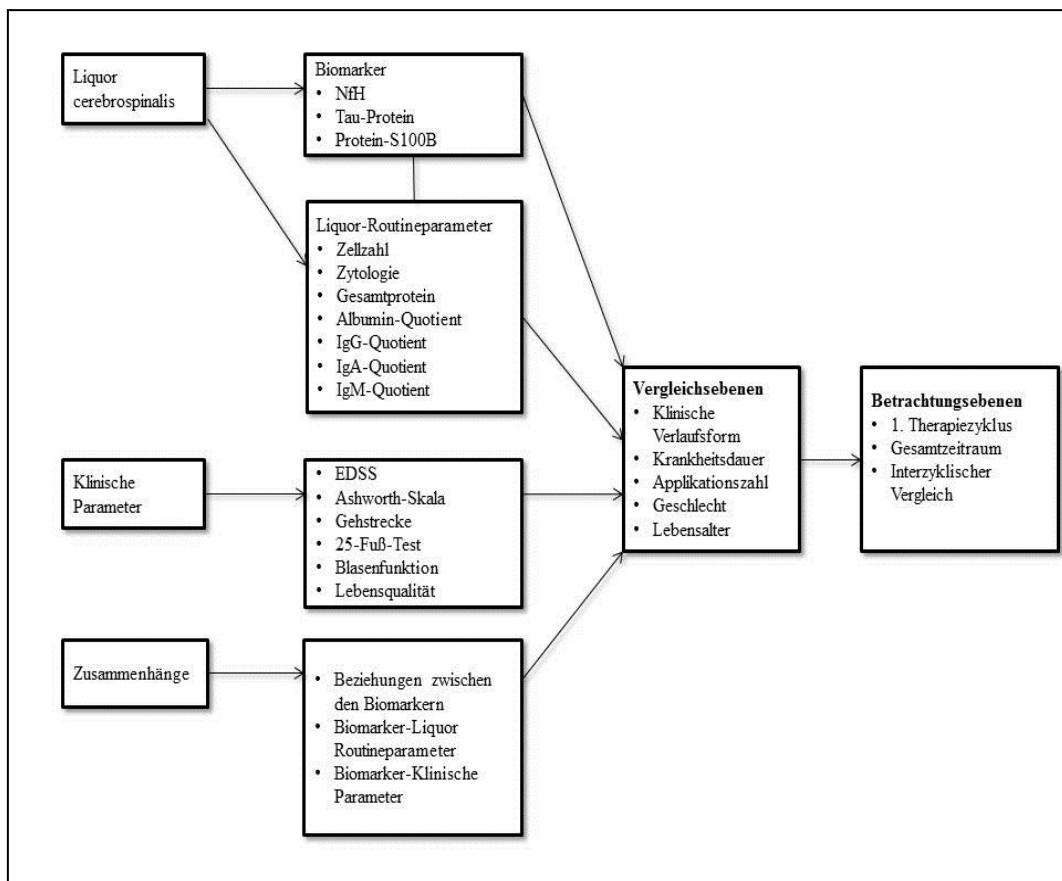


Abb. 4: Algorithmus der Datenanalyse und Ergebnisdarstellung.

4.1 Neurofilament

Die Konzentration des NfH im CSF der Gesamtkohorte zeigt keine signifikanten Veränderungen zwischen aufeinander folgenden Applikationen innerhalb des ersten Therapiezyklus. Gleiches gilt für die folgenden 3 Therapiezyklen und für die interzyklische Betrachtungsebene. In der Gegenüberstellung der Konzentration des NfH im CSF vor Therapiebeginn (Baseline) mit den Messzeitpunkten in späteren Therapiezyklen werden für verschiedene Zeitpunkte signifikante Anstiege der Konzentration des Biomarkers deutlich (Abb. 5). Betrachtet man den Verlauf der Liquorkonzentration des NfH über den gesamten Beobachtungszeitraum, zeigt sich ein deutlich sichtbarer Anstieg der Konzentrationen zwischen aufeinander folgenden Therapiezyklen (Abb. 5). Sichtbar ist auch, dass die Konzentrationen des NfH von der ersten bis zur dritten Applikation innerhalb eines Zyklus tendenziell ansteigen und zur fünften Applikation am Tag 9 abfallen. Diese grafisch eindeutig sichtbaren Trends erreichen keine statistische Signifikanz. In den Zyklen 3 und 4 wird der Referenzwert von 0,75ng/ml überschritten [168]. In der separaten Analyse der nach Applikationsanzahl des TCA getrennten Subgruppen zeigen sich zwischen aufeinanderfolgenden Zeitpunkten keine signifikanten Veränderungen der Konzentration des NfH im CSF während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Im Vergleich der Ausgangskonzentration des NfH im CSF mit den Konzentrationen an Messzeitpunkten folgender Therapiezyklen ergeben sich für die nach Applikationsanzahl getrennten Patientengruppen verschiedene Resultate (Abb. 6). In der höher dosierten Patientenkohorte lassen sich keine signifikanten Konzentrationsveränderungen des Biomarkers erkennen. Die Patientengruppe, welche mit 3 Applikationen pro Zyklus eine niedrigere Dosis TCA erhalten hat, zeigt grafisch einen Anstieg der Konzentrationen des NfH im CSF. Dies betrifft aufeinander folgende Applikationen innerhalb des 1., 3. und 4. Zyklus. Interzyklisch ist ebenfalls ein Anstieg der Konzentration des Biomarkers feststellbar. Diese Veränderungen sind jedoch nicht statistisch signifikant. Darüber hinaus ergibt der Vergleich späterer Messzeitpunkte zum Ausgangswert signifikant erhöhte Konzentrationen des NfH im CSF (Abb. 6). Die Liquorkonzentrationen des Biomarkers in der Subgruppe der Patienten mit 3 Applikationen sind gegenüber der Patientengruppe mit 5 Applikationen TCA pro Therapiezyklus signifikant erhöht. Dies zeigt sich in den Behandlungszyklen 2, 3 und 4 (Abb. 6). Im 3. und 4. Behandlungszyklus überschreiten die Konzentrationen des NfH im CSF die Schwelle zum pathologischen Bereich von 0,75 ng/ml (Abb. 6). Lebensalter, Geschlecht, klinische Verlaufsform oder Krankheitsdauer der untersuchten MS-Patienten haben keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Konzentration des NfH im CSF.

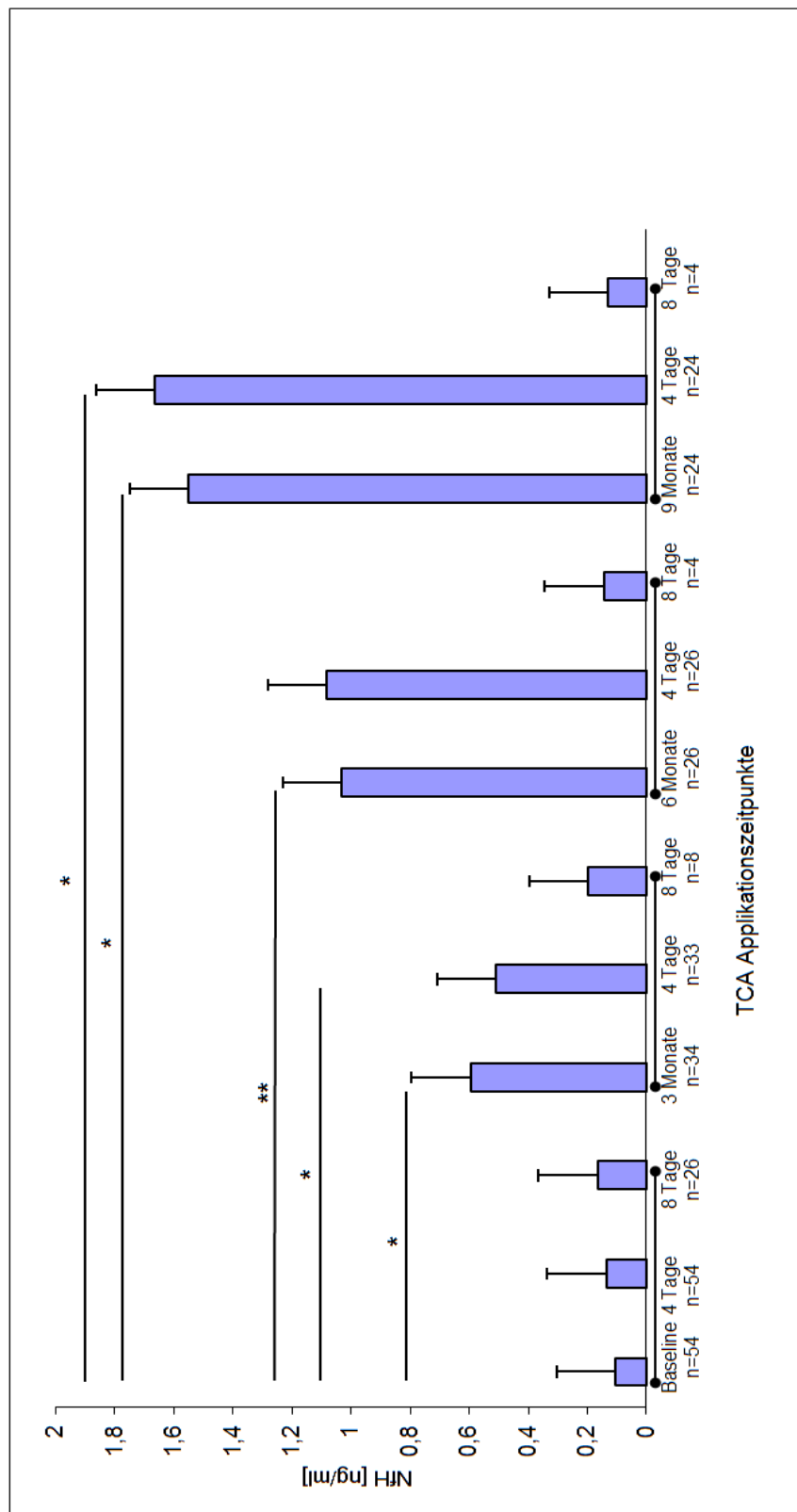


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf der Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis der Gesamtkohorte über den Zeitraum von 9 Monaten. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten an den Messzeitpunkten; TCA, Triamcinolon acetonid

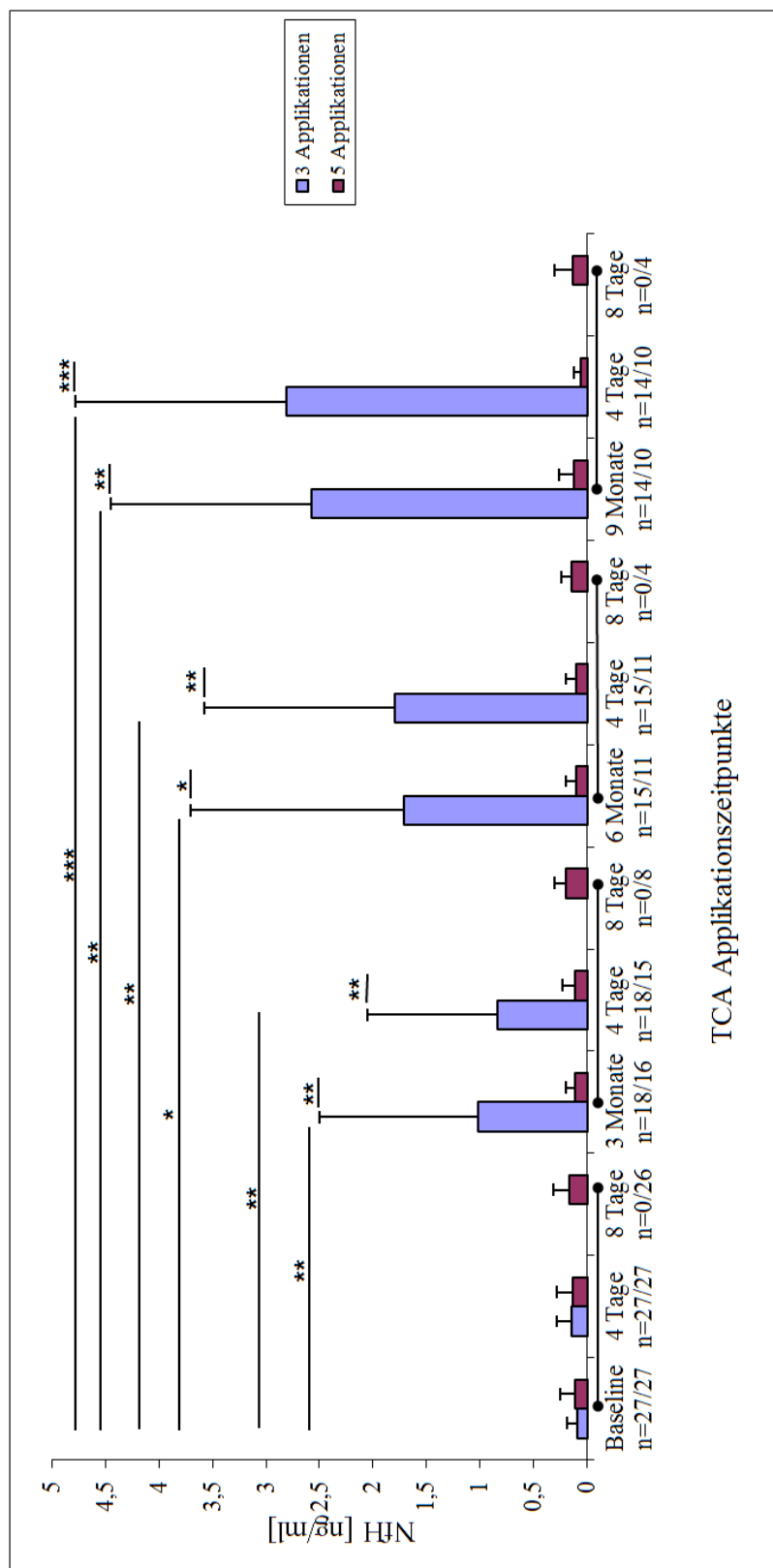


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen des NfH im Liquor cerebrospinalis über 9 Monate der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten mit 3/5 Applikationen; M, Monate; d, Tage; TCA, Triamcinolon acetonid.

4.2 Tau-Protein

Die Konzentration des Tau-Proteins im CSF steigt zwischen aufeinander folgenden Applikationen des ersten Therapiezyklus signifikant an (Abb. 7).

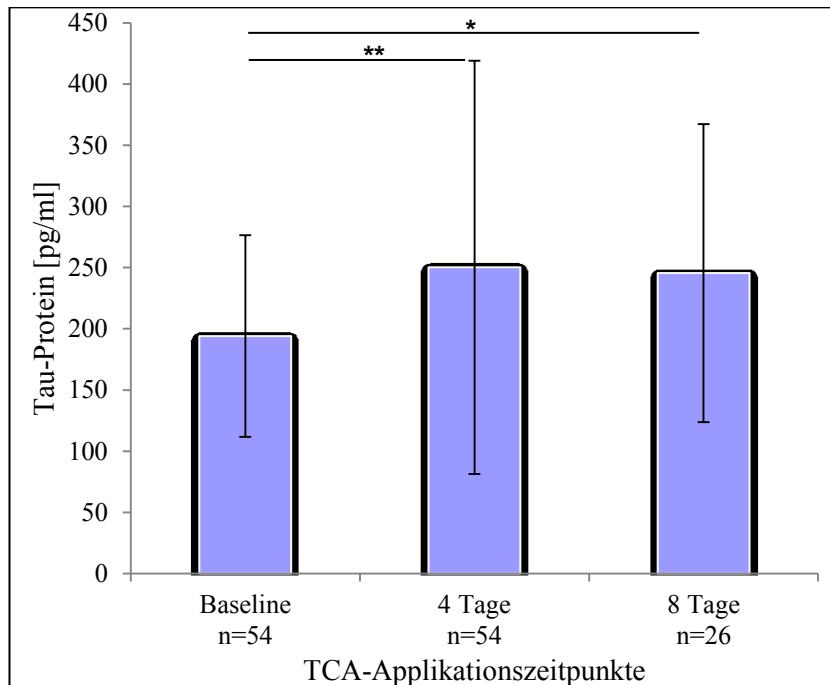


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis der gesamten Patientenkohorte innerhalb des 1. Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; TCA, Triamcinolon acetonid.

In den Folgezyklen kommt es zu keinen signifikanten Veränderungen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF. Die interzyklische Betrachtung und der Vergleich der Ausgangswerte mit späteren Zeitpunkten zeigen keine signifikanten Änderungen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF. Innerhalb der nach Applikationsanzahl unterteilten Subgruppen sind keine signifikanten Unterschiede der Konzentration des Tau-Proteins im CSF im gesamten Beobachtungszeitraum erkennbar und zu keinem Zeitpunkt unterschieden sich die Subgruppen statistisch signifikant. Das Geschlecht, Lebensalter und die Krankheitsdauer der untersuchten MS-Patienten haben keinen Einfluss auf die Liquor-Konzentration des Tau-Proteins während des Beobachtungszeitraums von 9 Monaten. Auch zwischen den klinischen Verlaufsformen ließen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Konzentrationen des Tau-Proteins im CSF nachweisen.

4.3 Protein S-100B

Die Konzentration des Protein S-100B im CSF der Gesamtkohorte verringert sich zwischen aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten innerhalb des 1. Therapiezyklus signifikant (Abb. 8). Die Veränderungen vollziehen sich innerhalb des physiologischen Referenzbereiches von 2,5 µg/l (weiblich) und 3,5 µg/l (männlich).

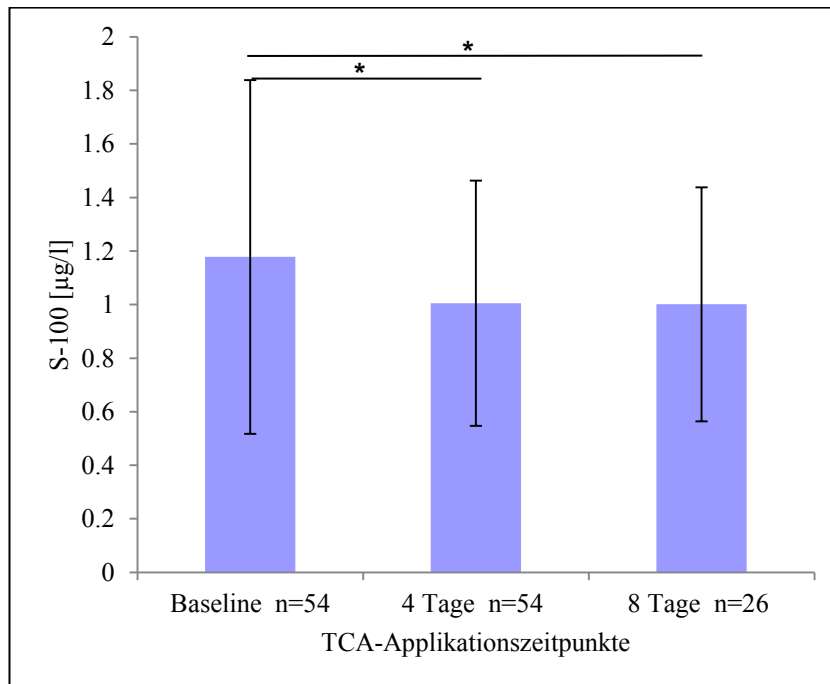


Abb. 8: Verlauf der Konzentration des Protein-S100B im Liquor cerebrospinalis der Gesamtkohorte innerhalb des 1. Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; TCA, Triamcinolon acetonid.

Während der folgenden Therapiezyklen sind keine signifikanten Veränderungen der Liquorkonzentration des Protein S-100B nachweisbar. Dies gilt ebenso für die interzyklische Betrachtungsebene. Im Vergleich der Ausgangskonzentration des Protein S-100B im CSF der Gesamtkohorte mit den Konzentrationen späterer Zeitpunkte zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. Die Analyse der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen ergibt keine signifikanten Unterschiede des zeitlichen Verlaufes der Konzentration des Biomarkers im CSF. Im direkten Vergleich beider Subkohorten finden sich an keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Konzentration des Proteins S-100B. Zwischen den Konzentrationen des Protein S-100B bezogen auf das Lebensalter, die klinischen Verlaufsformen und die Krankheitsdauer bestehen während des gesamten Behandlungszeitraumes keine signifikanten Beziehungen.

4.4 Liquor-Basisparameter

In der Gesamtkohorte und den Subgruppen der MS-Patienten zeigen die Konzentrationen des Gesamtproteins und des Albumins im CSF sowie die Liquor-Serum-Quotienten des Albumins, des IgG, des IgM und des IgA keine signifikanten Veränderungen während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Die Anzahl der Applikationen des TCA, die klinische Verlaufsform, Lebensalter und Krankheitsdauer haben keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den zeitlichen Verlauf dieser Parameter.

Die Untersuchung der Differentialzytologie im CSF erfolgt im Rahmen einer Subgruppe von 10 Patienten, die in der Klinik für Neurologie der Universität Rostock rekrutiert wurden (Tab.11). Am Ausgangspunkt ist die Zellzahl bei 50 % der Patienten auf maximal 11 Mpt/l erhöht. Ein Patient zeigt am Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus eine Zellzahl von 64 Mpt/l, die den relativ hohen Mittelwert und die deutliche Standardabweichung bedingt. Die Pleozytose dieses Patienten reduzierte sich im Verlauf des Behandlungszyklus auf 9 Mpt/l. Klinisch bestanden keine Anzeichen eines Meningismus. Dieser Patient konnte aufgrund eines Wohnortwechsels nicht über den ersten Behandlungszyklus hinaus weiter beobachtet werden. Im Falle eines Patienten war die Zellzahl durch eine hämorrhagische Punktion am 8. Tag des 2. Behandlungszyklus artifiziell auf 240 Mpt/l erhöht. Dieser Umstand verursacht darüber hinaus die extrem erhöhte Anzahl der Erythrozyten im CSF an diesem Zeitpunkt. 50% der Patienten entwickelten im Verlauf des 2. Zyklus eine leichte Pleozytose bis 25 Mpt/l. Im 3. Zyklus sind bei 25 % und im 4. Therapiezyklus bei 50 % der Patienten leichte Erhöhungen der Zellzahl bis 13 Mpt/l nachweisbar. Man erkennt zwischen aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten innerhalb aller Behandlungszyklen einen Anstieg des prozentualen Anteils der Granulozyten im Differentialzellbild des CSF. Interzyklisch zeigt sich eine deutliche Reduktion des Granulozytenanteils an den Ausgangspunkten der jeweiligen Folgezyklen. An den Startpunkten der ersten 3 Therapiezyklen ist der prozentuale Anteil an Lymphozyten des Gesamtzellbildes im CSF erhöht. Im Vergleich aufeinanderfolgender Messzeitpunkte innerhalb der Zyklen reduziert sich der Gehalt an Lymphozyten. Der prozentuale Anteil der Monozyten liegt an allen Messzeitpunkten unterhalb des Referenzwertes. Bei einem Teil der Patienten können an verschiedenen Zeitpunkten pathologische Makrophagen, Lymphoid- und Plasmazellen nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Differentialzytologie im Liquor cerebrospinalis über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten innerhalb einer Subgruppe von 10 Patienten, die in der Klinik für Neurologie der Universität Rostock rekrutiert wurden.

Zeitpunkte	Zellzahl Mpt/l MW±SD	Erythrozyten Mpt/l MW±SD	Monozyten % MW±SD	Granulozyten % MW±SD	Lymphozyten % MW±SD	Plasmazellen % MW±SD	Lymphoid- zellen % MW±SD	Makrophagen % MW±SD
Baseline (n=10)	10,8±18,9	41,0±116,8	10,5±3,8	0±0	89,2±3,6	0±0	0,3±0,7	0±0
+ 4 Tage (n=9)	10,8±8,4	44,3±111,6	9,1±8,8	18,6±32,9	71,9±30,7	0,1±0,3	0,3±1,0	0±0
+ 8 Tage (n=8)	6,3±6,2	65,9±163,0	7,5±5,7	14,4±19,1	77,5±20,5	0±0	0±0	0,6±1,8
3 Monate (n=6)	1,1±1,2	13,7±32,3	5,5±3,0	0,3±0,8	94,0±2,9	0±0	0,2±0,4	0±0
+ 4 Tage (n=6)	5,2±7,9	1237,9±2301,3	4,3±2,3	36,3±32,2	59,3±33,3	0±0	0±0	0±0
+ 8 Tage (n=4)	44,2±96,2	64551±157966	5,5±3,1	44,0±40,8	49,5±41,9	0±0	0±0	1,0±2,0
6 Monate (n=6)	1,4±0,9	3,8±6,1	6,3±2,6	0,5±1,2	92,8±4,5	0±0	0±0	0,8±2,0
+ 4 Tage (n=6)	3,3±3,0	12,3±17,8	6,2±1,5	3,8±3,7	89,7±4,2	0±0	0,3±0,5	0±0
+ 8 Tage (n=4)	3,8±3,6	143,0±278,0	9,8±4,8	45,8±32,4	44,5±31,9	0±0	0±0	0±0
9 Monate (n=6)	2,5±2,8	62,7±114,4	6,7±3,3	7,2±11,3	85,3±13,9	0,2±0,4	0,2±0,4	0,5±1,2
+ 4 Tage (n=6)	5,5±5,3	576,3±1308,5	10,0±6,0	19,2±21,5	69,7±19,9	0,2±0,4	0,5±1,2	0±0
+ 8 Tage (n=4)	3,5±1,3	40±72,7	10,8±9,8	31,8±31,1	56,5±28,4	0±0	0±0	0,8±1,8

Abkürzungen: MW±SD, Mittelwert ± Standardabweichung; Normwerte, Zellzahl, <5 Mpt/l; Erythrozyten, 0 Mpt/l; Monozyten, 15–30%; Granulozyten, 0%, Lymphozyten, 70–85%; Plasmazellen, 0%, Lymphoidzellen, 0%; Makrophagen, 0%.

4.5 Klinische Parameter

Es erfolgt die Darstellung der klinischen Parameter EDSS, AS, Gehstrecke, 25-Fuß-Test und Lebensqualität am Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus (Tab. 12). Die Ausgangswerte der klinischen Parameter unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den Geschlechtern.

Tabelle 12: Klinische Parameter zu Beginn des Beobachtungszeitraumes

	Gesamtpopulation (MW±SD)	Frauen (MW±SD)	Männer (MW±SD)	Gruppen - vergleich
EDSS	5,8±1,6	5,7±1,7	6,2±1,4	n.s.*
Ashworthscale	2,2±1,3	2,1±1,3	2,4±1,4	n.s.*
Gehstrecke (m)	246,7±302,1	251,7±314,1	236,8±284,8	n.s.*
25-Fuß-Test (s)	22,7±30,4	24,8±33,8	18,3±22,1	n.s.*
Quality of Life	4,6±1,9	4,8±2,1	4,3±1,6	n.s.*

Abkürzungen: MW±SD, Mittelwert ± Standardabweichung; n.s., nicht signifikant; *, Kolmogorov-Smirnov-Test, Mann-Whitney-U-Test.

4.5.1 Expanded Disability Status Scale

Innerhalb des ersten Therapiezyklus reduziert sich der EDSS der Gesamtkohorte signifikant (Abb. 9). Zwischen aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten der Folgezyklen können dann keine signifikanten Veränderungen des EDSS für die Gesamtkohorte ermittelt werden. Interzyklisch zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des EDSS.

Im Vergleich des Ausgangswertes mit den Messwerten späterer Zeitpunkte ergeben sich für die Gesamtkohorte keine signifikanten Veränderungen des EDSS.

In der Analyse der nach Applikationsanzahl des TCA getrennten Subgruppen zeigen sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine signifikanten Unterschiede des Verlaufes des EDSS. Das gilt für die interzyklische Betrachtungsebene und für den Vergleich des Ausgangswertes mit den Messresultaten späterer Behandlungszyklen. Der EDSS der beiden Subgruppen unterscheidet sich an keinem Zeitpunkt signifikant voneinander.

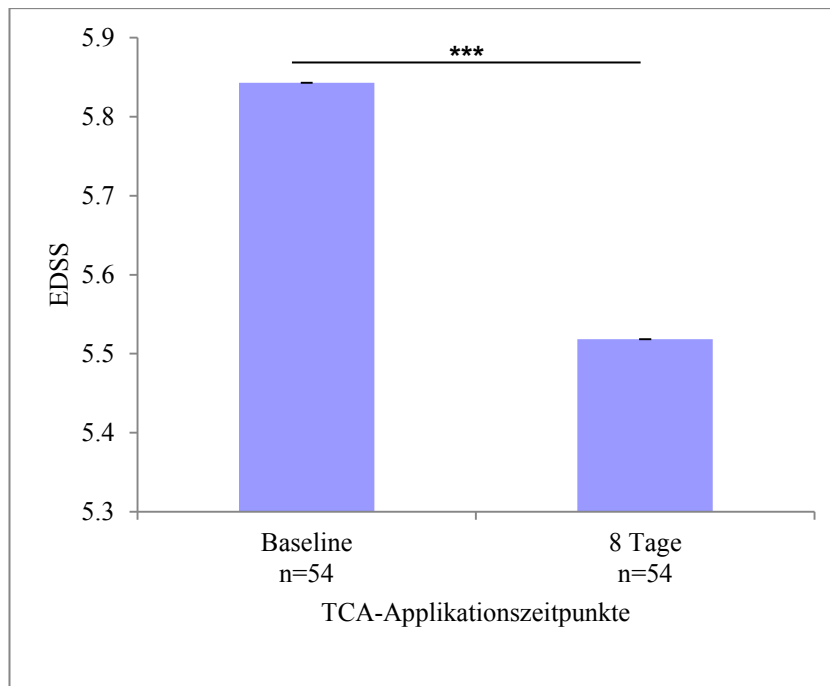


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf des EDSS der Gesamtkohorte während des ersten Behandlungszyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; TCA, Triamcinolon acetonid.

4.5.2 Modifizierte Ashworthscale

Die AS der Gesamtkohorte der MS-Patienten verringert sich während des ersten Behandlungszyklus signifikant. Auch zwischen aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten in den Folgezyklen 2 und 3 kommt es zu einer signifikanten Reduktion der AS (Abb. 10). Interzyklisch zeigt die Gesamtkohorte eine signifikante Erhöhung der AS zwischen dem 1. und 2. sowie dem 2. und 3. Behandlungszyklus (Abb. 10). Vergleicht man im Rahmen der Gesamtkohorte den Ausgangswert der AS zu Beginn des ersten Therapiezyklus mit späteren Zeitpunkten, erkennt man eine signifikant verringerte AS an den verschiedenen Messpunkten des 2., 3. und 4. Therapiezyklus (Abb. 10).

Stellt man die nach der Applikationszahl des TCA getrennten Subgruppen gegenüber, zeigen sich für MS-Patienten, die 5 Applikationen erhalten haben, signifikante Veränderungen analog zur Gesamtkohorte (Abb. 11). Bei den Patienten mit 3 Applikationen TCA pro Behandlungszyklus sind die grafisch erkennbaren Veränderungen der AS nicht statistisch signifikant. Vergleicht man die beiden Subkohorten miteinander, ergeben sich an keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der AS.

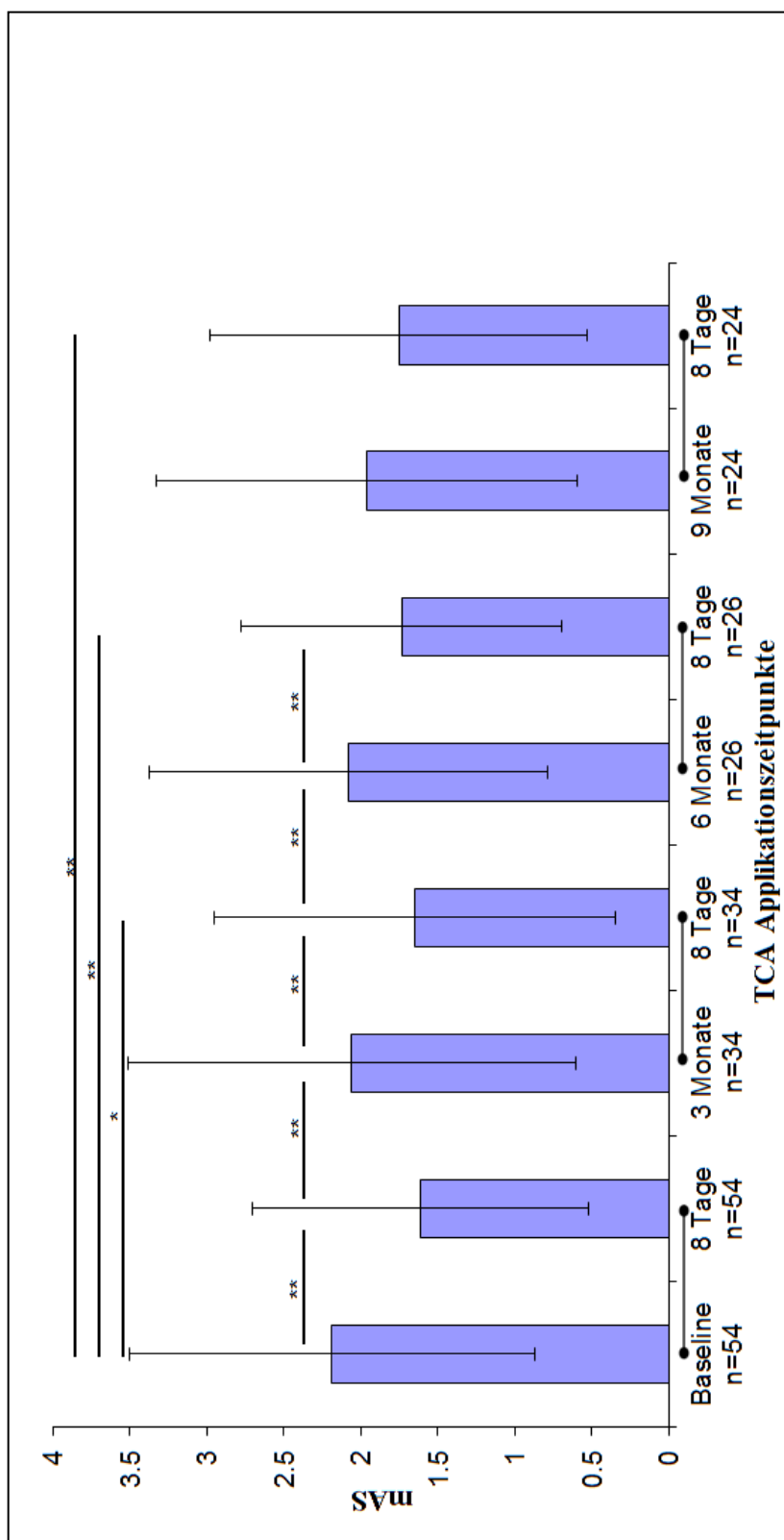


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der mAS der Gesamtkohorte über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten. Messzeitpunkte sind jeweils zu Beginn und am Ende jedes Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten an den Messzeitpunkten; TCA, Triamcinolon acetonid; AS, Ashworthscale.

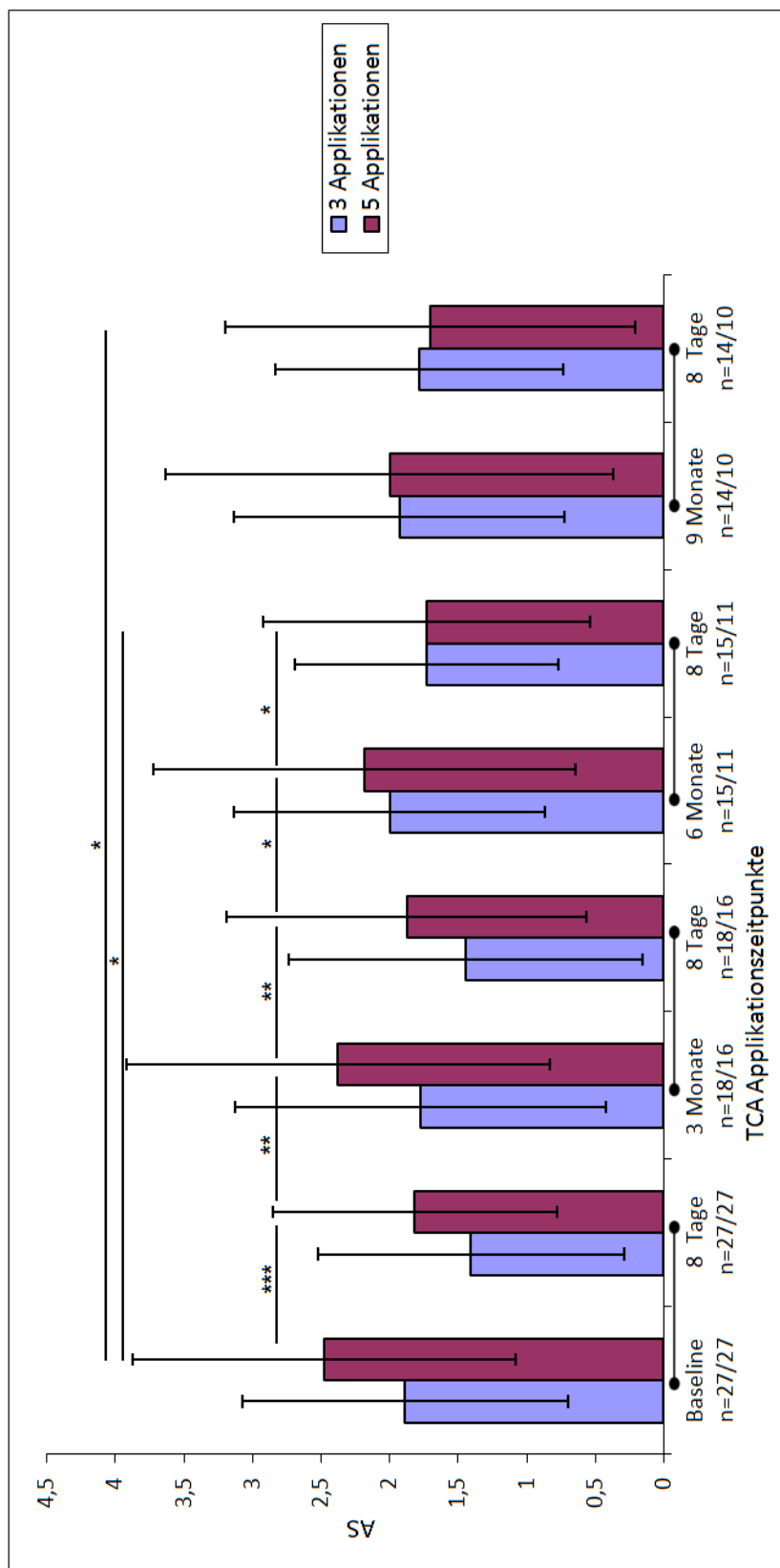


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der mAS der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen über den Zeitraum von 9 Monaten. Messzeitpunkte sind jeweils zu Beginn und am Ende jedes Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten mit 3/5 Applikationen; TCA, Triamcinolon acetonid; AS, Ashworthscale.

4.5.3 Gehstrecke

Die Gehstrecke der Gesamtkohorte steigt innerhalb des 1., 2. und 4. Behandlungszyklus signifikant an (Abb. 12). Interzyklisch zeigen sich während des gesamten

Beobachtungszeitraumes von 9 Monaten keine signifikanten Veränderungen der Gehstrecke in der Gesamtkohorte der MS-Patienten (Abb. 12).

In dem Vergleich des Ausgangswertes des 1. Therapiezyklus mit Messzeitpunkten während des 2. und 3. Behandlungszyklus ist ein signifikanter Anstieg der Gehstrecke erkennbar (Abb. 12).

Die nach der Anzahl der TCA-Applikationen unterteilten Subgruppen der MS-Patienten zeigen keine signifikanten Veränderungen der Gehstrecke im gesamten Beobachtungszeitraum. Im direkten Vergleich zwischen beiden Gruppen ist an keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Gehstrecke nachweisbar.

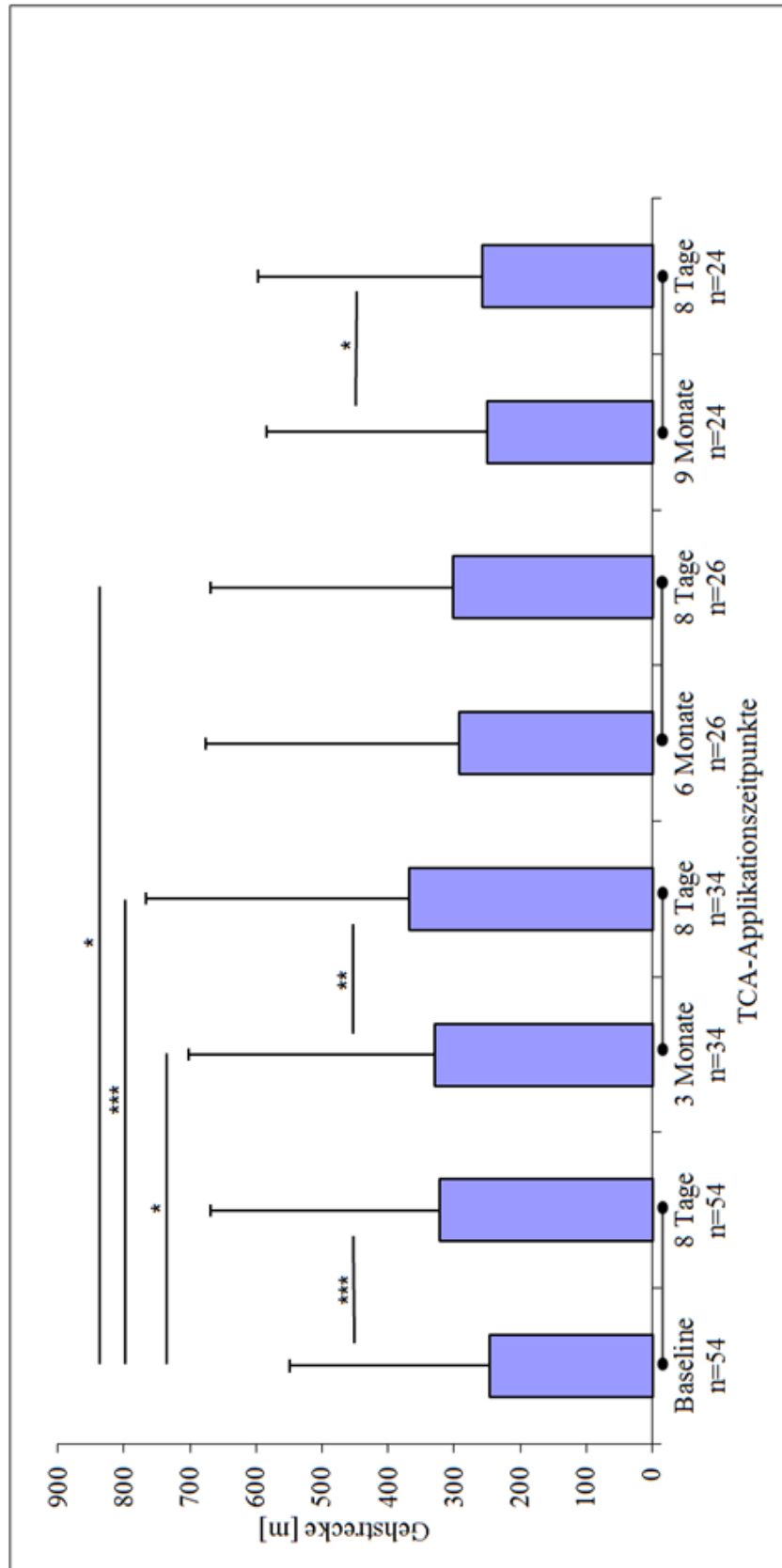


Abb. 12: Zeitlicher Verlauf der Gehstrecke der Gesamtkohorte über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten. Messzeitpunkte sind jeweils zu Beginn und am Ende jedes Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten an den Messzeitpunkten; TCA, Triamcinolon acetonid.

4.5.4 25-Fuß-Test

Für den 25-F-Test ergeben sich für die Gesamtkohorte und die nach der TCA-Dosis untergliederten Subgruppen der MS-Patienten keine signifikanten Veränderungen während des gesamten Beobachtungszeitraumes. Dies gilt für die interzyklische Betrachtungsebene und den Vergleich der Ausgangswerte des ersten Therapiezyklus mit den Ergebnissen späterer Messzeitpunkte. Signifikante Beziehungen zwischen dem 25-Fuß-Test und den Surrogaten NfH, Tau-Protein, Protein S-100B sowie den soziodemographischen und klinischen Parametern bestehen nicht.

4.5.5 Lebensqualität

Die Lebensqualität steigt während des ersten Therapiezyklus in der Gesamtkohorte der MS-Patienten signifikant an (Abb. 13). Auch in den Folgezyklen ist ein signifikanter Anstieg der Lebensqualität evident. Interzyklisch ist zwischen dem 2. und 3. Therapiezyklus eine signifikante Reduktion der Lebensqualität zu verzeichnen. Im Vergleich der Ausgangswerte des ersten Therapiezyklus mit den Messdaten späterer Zeitpunkte ist eine signifikante Erhöhung der Lebensqualität nachweisbar (Abb. 13). Betrachtet man die nach Anzahl der TCA-Applikationen unterteilten Subgruppen zeigen die Patienten mit 3 Applikationen TCA pro Therapiezyklus keine signifikanten Veränderungen der Lebensqualität im gesamten Beobachtungszeitraum. Einen signifikanten Anstieg der Lebensqualität im ersten Therapiezyklus sowie bleibende Erhöhungen des Parameters im Vergleich der Ausgangswerte des ersten Therapiezyklus mit den Daten späterer Zeitpunkte können für die Patientengruppe, die 5 Applikationen TCA Behandlungszyklus erhalten haben, nachgewiesen werden (Abb. 14). Interzyklisch zeigen die Subgruppen keine signifikanten Veränderungen der Lebensqualität. Im direkten Vergleich der beiden Subgruppen ergeben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Lebensqualität.

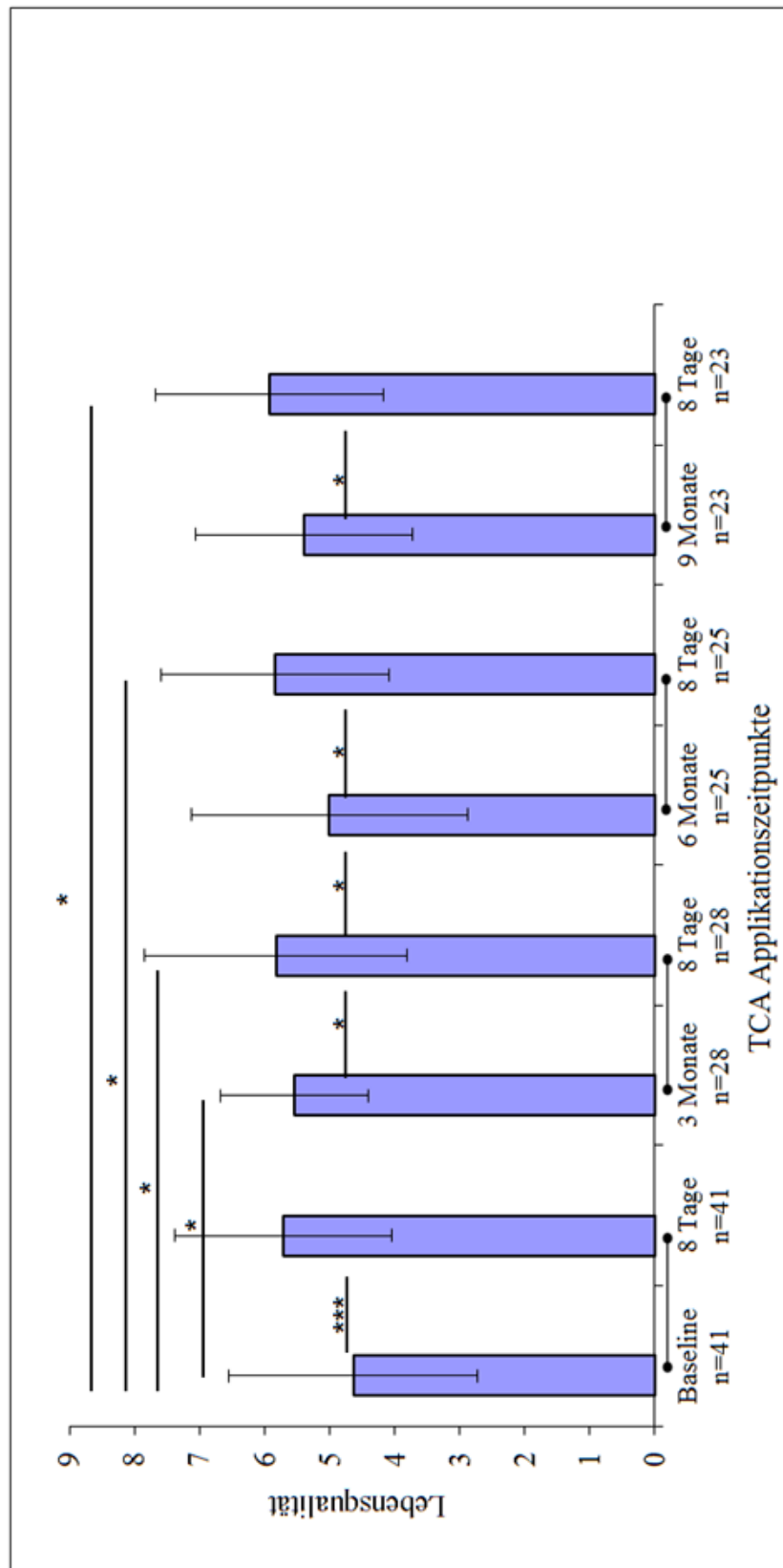


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf der Lebensqualität der Gesamtkohorte über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten. Die Messungen erfolgen mit Hilfe einer visuellen Analogskala; 0, sehr schlecht bis 10, sehr gut. Messzeitpunkte sind jeweils zu Beginn und am Ende jedes Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten an den Messzeitpunkten; TCA, Triamcinolon acetonid.

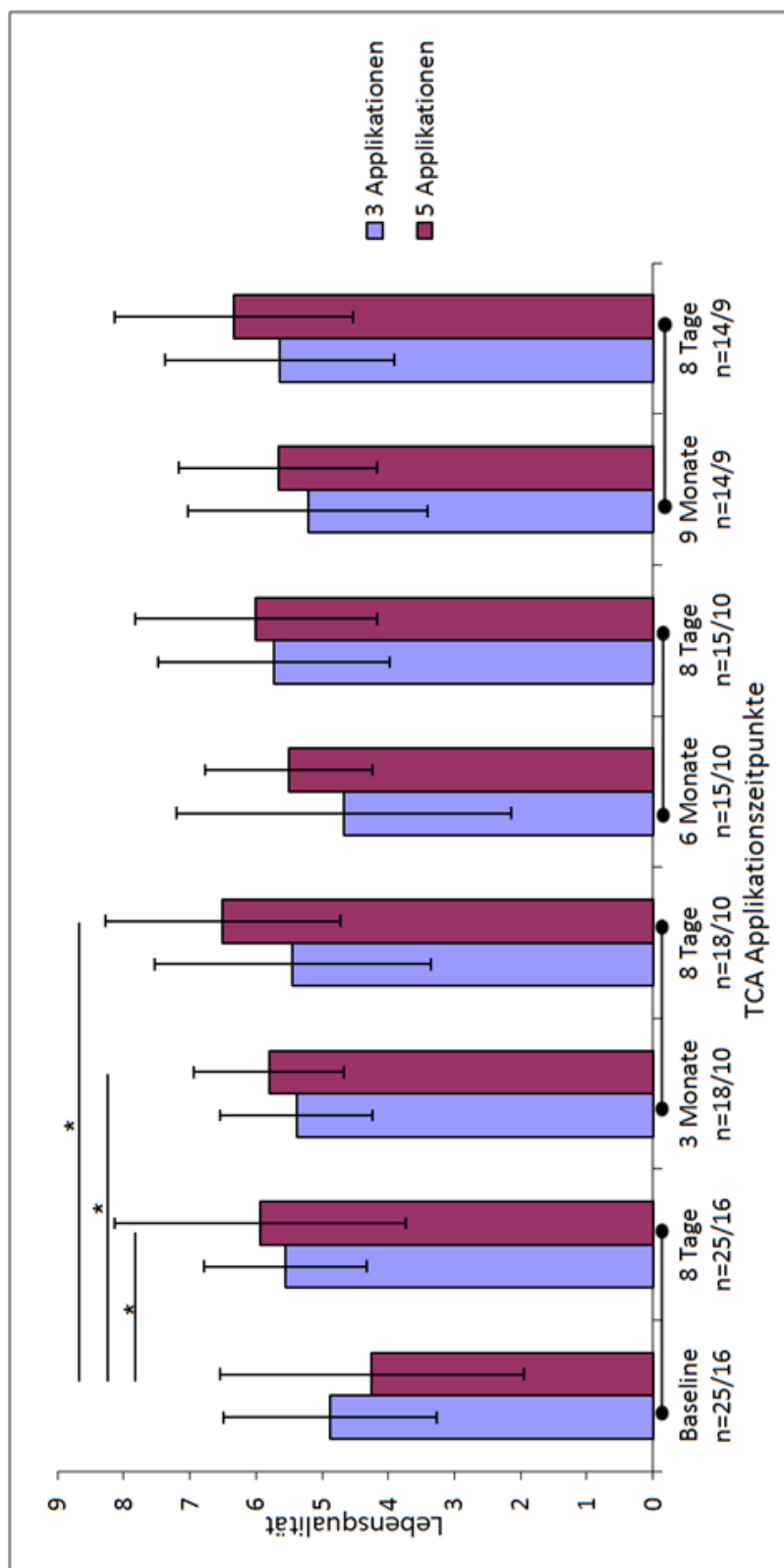


Abb. 14: Zeitlicher Verlauf der Lebensqualität der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen über den Zeitraum von 9 Monaten. Die Messungen erfolgen mit Hilfe einer visuellen Analogskala; 0, sehr schlecht bis 10, sehr gut. Messzeitpunkte sind jeweils zu Beginn und am Ende jedes Therapiezyklus. Statistische Analyse: Friedman-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten mit 3/5 Applikationen; TCA, Triamcinolon acetonid.

4.5.6 Blasenfunktion

Semiquantitativ werden die Zustände „kontinent“, „inkontinent“, „Restharngefühl“ und „Besserung gegenüber vorher“ dargestellt (Abb. 15). Die Messzeitpunkte bestehen zu Beginn und am Ende eines Therapiezyklus. Die Gesamtkohorte der MS-Patienten zeigt insgesamt keine signifikanten Veränderungen der Blasenfunktion im Beobachtungszeitraum, wenngleich einzelne Patienten eine Besserung angegeben haben (Abb. 15.). Dies gilt ebenso für die Analyse der nach Applikationsanzahl des TCA getrennten Subgruppen. Interzyklisch und im Vergleich des Ausgangswertes der Blasenfunktion im 1. Therapiezyklus mit den Messwerten späterer Zeitpunkte sind keine statistisch signifikanten Veränderungen nachweisbar.

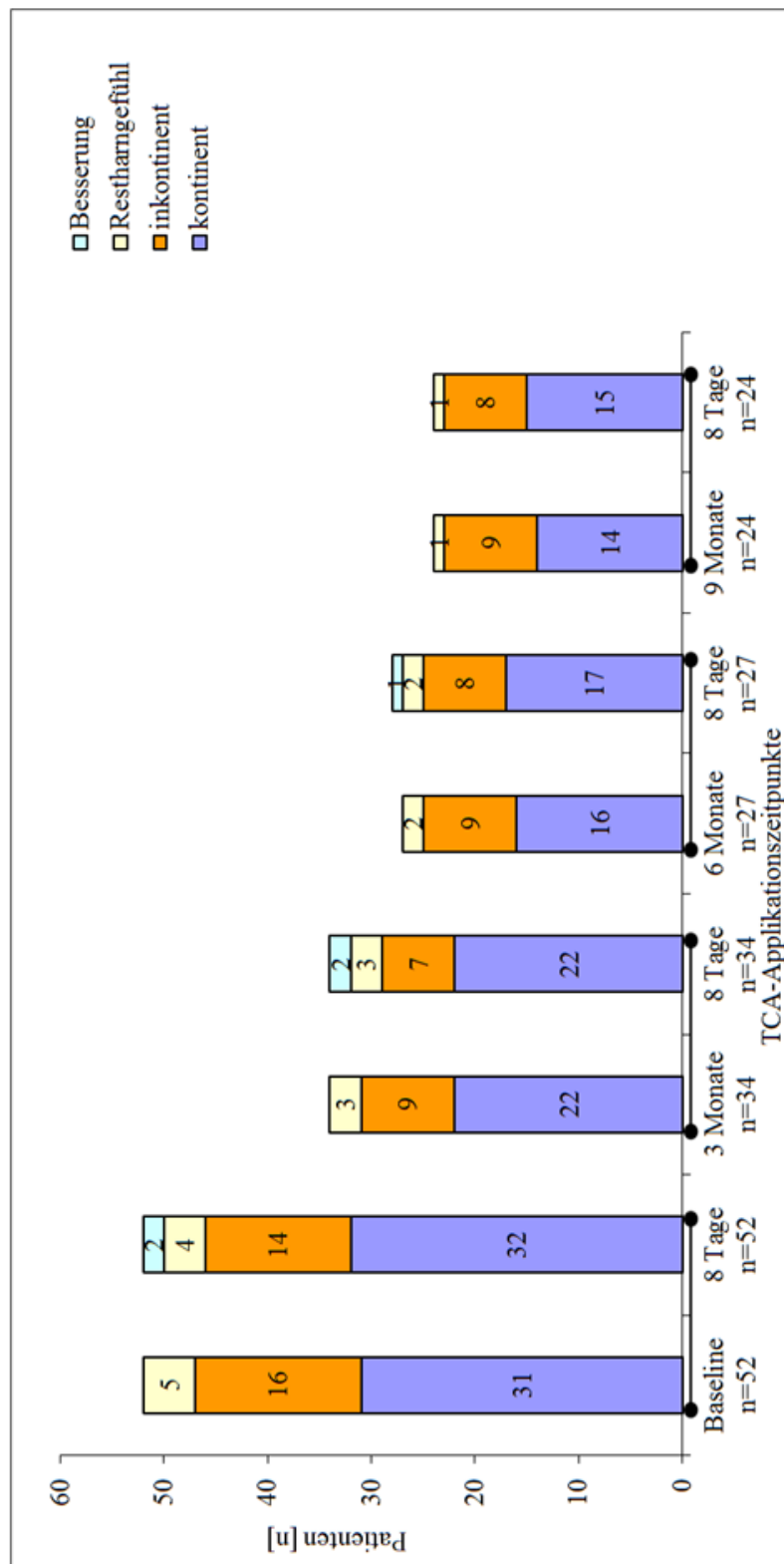


Abb. 15: Zeitlicher Verlauf der Blasenfunktion der Gesamtpopulation über den Behandlungszeitraum von 9 Monaten. Messzeitpunkte sind jeweils zu Beginn und am Ende jedes Therapiezyklus. Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; TCA, Triamcinolon acetonid.

4.6 Zusammenhänge

Für die Gesamtkohorte der MS-Patienten folgt die Darstellung von Beziehungen der Biomarker NfH, Tau-Protein und Protein S-100B untereinander sowie mit den Parametern der Liquor-Routine-Diagnostik und den klinischen Messgrößen.

Es lassen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen der Biomarker NfH, Tau-Protein und dem Protein S-100B im CSF feststellen. Nachfolgend werden die Beziehungen zwischen den Biomarkern und den Routineparametern der Liquordiagnostik sowie den klinischen Variablen aufgeführt.

4.6.1 Beziehungen des NfH zu Liquorbasis- und klinischen Parametern

Zwischen der Konzentration des NfH im CSF und den Parametern der Liquor-Basisdiagnostik sind zu Beginn des Beobachtungszeitraumes signifikante Beziehungen feststellbar (Tab. 13).

Tabelle 13: Beziehung der Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis und Parametern der Liquor-Basisdiagnostik am Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus ($n=54$). Der hervorgehobene IgM-Quotient zeigt die statistisch stärkste Beziehung zur Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis (multiple Regressionsanalyse, $p=0,005$).

Liquor-Basis-Parameter	NfH
	KK
Gesamtprotein	0,33*
Albuminquotient	0,29*
IgA-Quotient	0,36**
IgM-Quotient	0,38**

Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; KK, Korrelationskoeffizient nach Spearman; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$.

In der Gesamtkohorte der MS-Patienten zu Beginn des ersten Behandlungszyklus hat der IgM-Quotient die statistisch stärkste positive Beziehung zu der Konzentration des NfH im CSF nachgewiesen anhand der multiplen Regressionsanalyse (Abb. 16). In den folgenden Therapiezyklen sind keine weiteren signifikanten positiven oder negativen Beziehungen zwischen der Konzentration des NfH im CSF und den Basisparametern der Liquordiagnostik feststellbar.

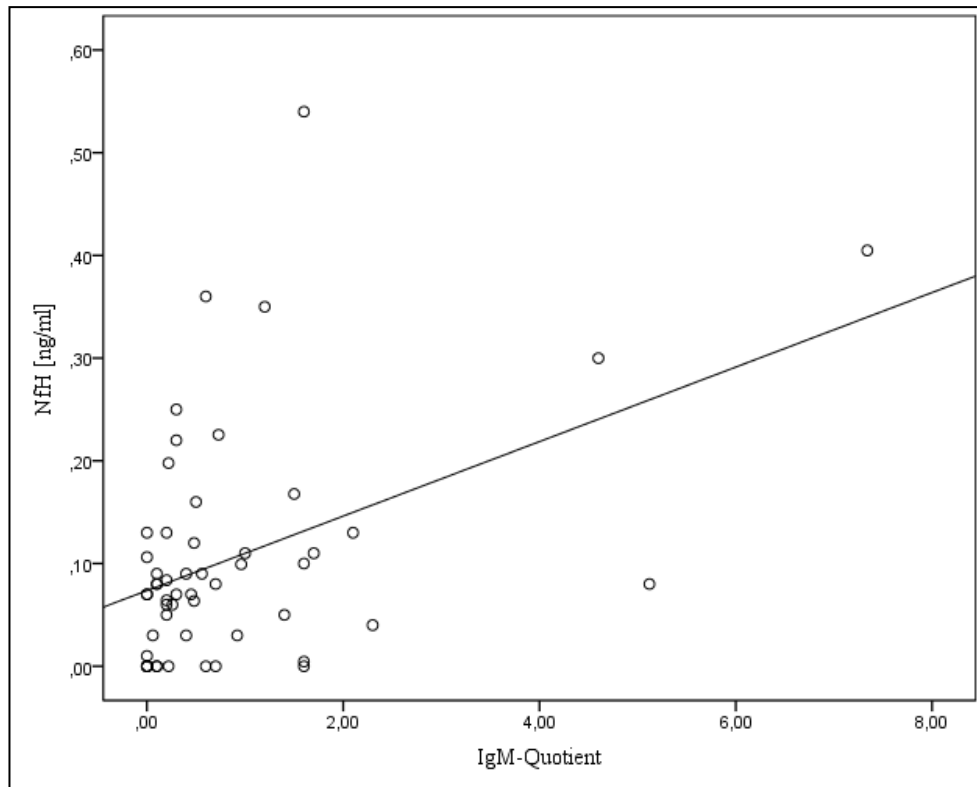


Abb. 16: Zusammenhang zwischen der Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis und dem IgM-Quotienten vor Beginn des ersten Therapiezyklus der Gesamtkohorte ($n=54$). Korrelationskoeffizient nach Spearman 0,38, $p<0,01$.

Beziehungen zwischen der Konzentration des NfH im CSF und den klinischen Parametern EDSS, AS, Gehstrecke, 25-Fuß-Test, der Blasenfunktion und der Lebensqualität lassen sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht nachweisen.

4.6.2 Beziehungen des Tau-Proteins zu Liquorbasis- und klinischen Parametern

Zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF und einer Reihe von Parametern der Liquorbasis-Diagnostik bestehen zum Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus signifikante proportionale Beziehungen (Tab. 14).

Tabelle 14: Beziehung der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis zu Parametern der Liquor-Basisdiagnostik der Gesamtkohorte am Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus ($n=54$). Das hervorgehobene Gesamtprotein zeigt den statistisch größten Einfluss auf die Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis (multiple Regressionsanalyse $p=0,007$).

Liquor-Basis-Parameter	Tau-Protein
	KK
Zellzahl	0,47***
Gesamtprotein	0,41**
IgA - Quotient	0,32*

Abkürzungen: n, Anzahl der Patienten; KK, Korrelationskoeffizient nach Spearman, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

In der Gesamtkohorte der MS-Patienten hat die Konzentration des Gesamtproteins im CSF als Einflussvariable die stärkste proportionale Beziehung zu der Konzentration des Tau-Proteins zu Beginn des ersten Therapiezyklus nachgewiesen durch die multiple Regressionsanalyse (Abb. 17).

In späteren Therapiezyklen lassen sich keine positiven oder negativen signifikanten Beziehungen zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF und den Basisparametern der Liquordiagnostik nachweisen.

In der Gesamtkohorte der MS-Patienten können zwischen den klinischen Parametern EDSS sowie AS und der Liquorkonzentration des Tau-Proteins an verschiedenen Therapiezeitpunkten umgekehrt proportionale Beziehungen festgestellt werden (Abb. 18-19).

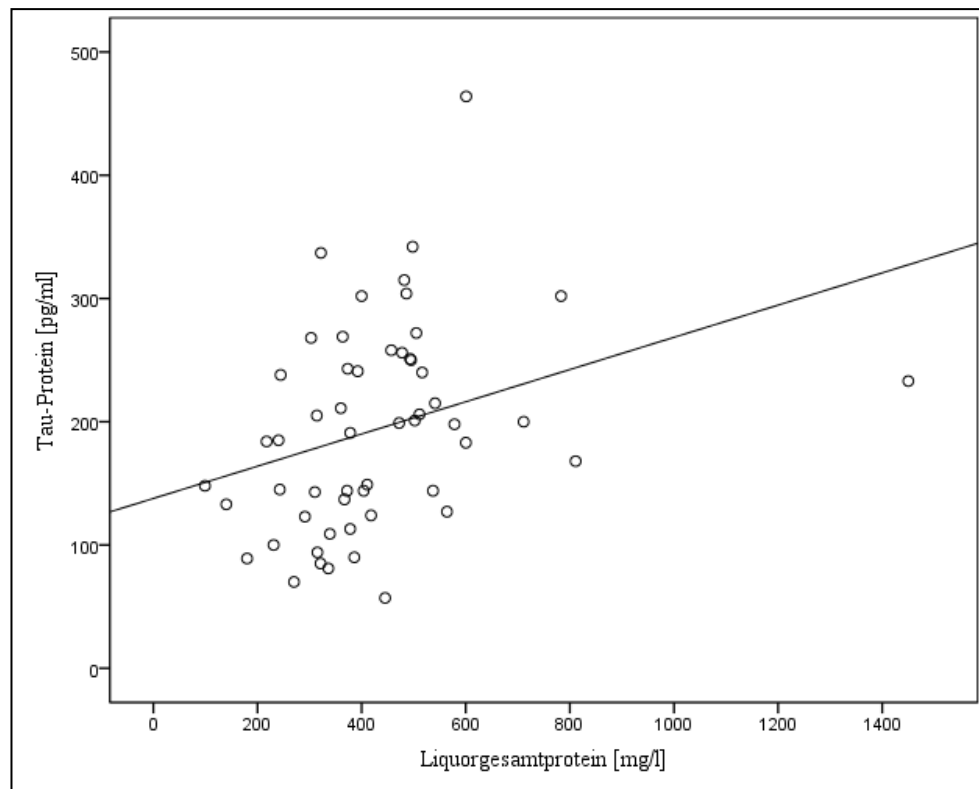


Abb. 17: Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins und des Gesamtproteins im Liquor cerebrospinalis vor Beginn des ersten Therapiezyklus der Gesamtkohorte ($n=54$). Korrelationskoeffizient nach Spearman 0,41, $p<0,01$.

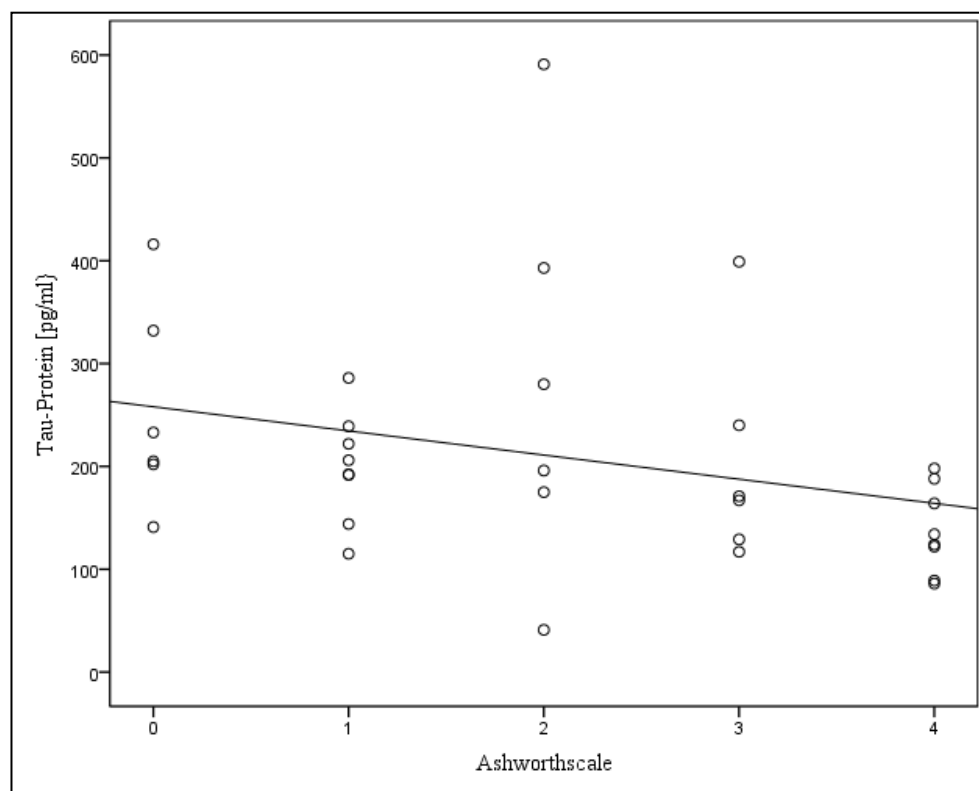


Abb. 18: Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis und der AS nach 3 Monaten zu Beginn des 2. Therapiezyklus der Gesamtkohorte ($n=34$). Korrelationskoeffizient nach Spearman -0,41, $p<0,01$.

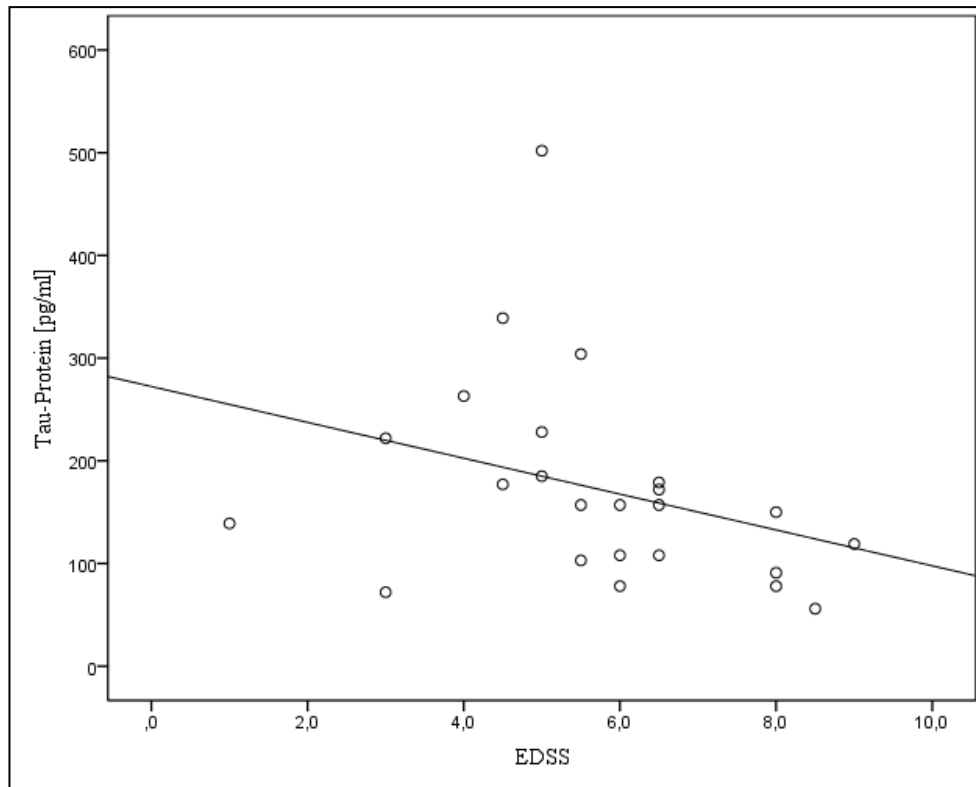


Abb. 19: Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis und dem EDSS nach 9 Monaten zu Beginn des 4. Therapiezyklus der Gesamtkohorte ($n=24$). Korrelationskoeffizient nach Spearman $-0,47$, $p<0,05$.

Die klinischen Parameter Gehstrecke, 25-Fuß-Test, Blasenfunktion und Lebensqualität zeigen während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine signifikanten Zusammenhänge mit der Konzentration des Tau-Proteins im CSF.

4.6.3 Beziehungen des Protein S-100B zu Liquorbasis- und klinischen Parametern

Die Parameter der Liquor-Routine-Diagnostik weisen für die Gesamtkohorte der MS-Patienten während des gesamten Therapiezeitraumes keine signifikanten Beziehungen zur Konzentration des Protein S-100B im CSF auf. Auch die klinischen Parameter wie EDSS, Gehstrecke, AS, 25-Fuß-Test, Blasenfunktion und Lebensqualität zeigen im gesamten Therapieverlauf keine signifikanten Beziehungen zu der Liquorkonzentration des Protein S-100B.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beinhaltet die erste Studie, welche die Auswirkung einer zyklischen intrathekalen Therapie durch verzögert freigesetzte Glukokortikosteroide über 9 Monate auf Biomarker für axonalen Schaden und Astrogliose im CSF von MS-Patienten untersucht. Immunmodulierende Therapien reduzieren die Schubrate bei Patienten mit schubförmig remittierender MS, haben aber keinen überzeugenden Einfluss auf den klinischen Verlauf von Patienten mit chronisch progredienter MS gezeigt [81]. Diese Therapien folgen demnach eher einem präventiven Ansatz. Durch ihre immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung haben sich die Glukokortikosteroide in Form der intravenösen Pulstherapie mittels MP als Standardtherapie des akuten Schubes der MS etabliert und führen in vielen Fällen zu einer Remission der Symptomatik [3, 34, 183]. Allerdings ist die gepulste Applikation von Glukokortikosteroiden mit dosisabhängigen Nebenwirkungen wie Myalgien, gastralen Ulzera, Kopfschmerzen und Stimmungsschwankungen assoziiert [177]. Zudem stehen Glukokortikosteroide im Verdacht, neuronalen Zellschaden über eine Verstärkung der Hirnatrophie zu induzieren [237]. Eine Langzeittherapie führt zu unerwünschten Wirkungen wie arterieller Hypertonie, Hyperglykämie, Osteoporose, Katarakt, Steatosis hepatis, verstärkter Infektneigung und Gedächtnisstörungen [158].

Die intrathekale Applikation von verzögert freigesetzten Kortikosteroiden stellt eine alternative symptomatische Therapieoption zur Stabilisierung des Krankheitsverlaufes und zur möglichen Reduktion des Behinderungsgrades dar. Seit den 50er Jahren wird diese therapeutische Herangehensweise im Rahmen der MS und anderer neurologischer Erkrankungen immer wieder kontrovers diskutiert. Klinisch konnten bereits damals positive Effekte beobachtet werden [3, 97, 150]. Diese Therapieform verlor jedoch aufgrund von mehrfach berichteten Komplikationen wie Arachnoiditis, aseptische Meningitis, transiente Urininkontinenz, Subarachnoidalblutung, Hirnschäden, spinale Läsionierung und generalisierte Pachymeningitis zunehmend an Bedeutung [3, 54, 150, 151]. In tierexperimentellen Untersuchungen ergaben sich insbesondere nach direkter Injektion von MP in periphere Nerven und Strukturen des ZNS Hinweise auf neurotoxische Effekte [150]. Demgegenüber fanden andere Autoren in tierexperimentellen Untersuchungen keine neurotoxischen Effekte einer wiederholten intrathekalen Injektion von TCA [2]. Neuere Studien zeigen keine unerwünschten Nebenwirkungen nach wiederholter intrathekalen Applikation von Glukokortikosteroiden bei Patienten mit postherpetischer Neuralgie [115] und MS [92, 93, 98, 99]. Diese Ergebnisse führten in gewisser Weise zu einem Wiederaufleben dieser Therapieform. Die Daten belegen auch, dass weitere Untersuchungen nötig sind, um den Effekt intrathekal applizierter Glukokortikosteroide auf das Nervengewebe und damit die

Therapiesicherheit zu untersuchen. Diese Fragestellung ist einer der wesentlichen Ansatzpunkte für die vorliegende Arbeit.

Axonaler Schaden und Verlust stellen einen entscheidenden pathogenetischen Faktor der MS dar und sind hauptverantwortlich für bleibende neurologische Defizite und Behinderung. Die primäre Demyelinisierung von Neuronen ist ein wesentliches Kennzeichen von MS-Läsionen. Trotzdem kann axonaler Schaden bereits in sehr frühen Krankheitsphasen nachgewiesen werden [68, 120]. Pathologisch veränderte Axone werden in akuten und chronischen MS-Läsionen gefunden [222].

Neurofilamente sind wichtige Strukturproteine des axonalen Zytoskeletts. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion und dem axonalen Transport. Gewebsuntergang im ZNS bedingt ein Austreten intrazellulärer Proteine in den Extrazellulärraum und den CSF. NfH kann somit als Biomarker für ablaufenden axonalen Schaden im CSF angesehen werden [168]. Unsere Resultate zeigen, dass wiederholte intrathekale Applikationen von TCA keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Konzentration des NfH im CSF zwischen aufeinander folgenden Messzeitpunkten haben. Zu Beginn der Therapie sind die Konzentrationen des NfH im CSF unterhalb des Referenzwertes von 0,73 ng/ml [168]. Die MS-Patienten der vorliegenden Studie befinden sich in einem klinisch stabilen Zustand außerhalb von Schubereignissen oder verstärkter Progredienz der Erkrankung. Unsere Daten stimmen mit Untersuchungen überein, die zeigen, dass Patienten innerhalb eines Schubereignisses der MS [32] oder Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen wie Subarachnoidalblutung, Hirninfarkt oder ALS [154, 168] deutlich höhere NfH-Konzentrationen im CSF aufweisen als klinisch stabile MS-Patienten. Wir können einen tendenziellen Anstieg der Konzentrationen des NfH zwischen den ersten drei aufeinander folgenden TCA-Applikationen innerhalb der 4 Therapiezyklen beobachten, wobei dies Patienten betrifft, die eine niedrigere Dosis und geringere Anzahl von Applikationen des TCA erhalten haben. Während der 3. und 4. Therapiezyklen nach 6 und 9 Monaten überschritten die Mittelwerte der NfH-Konzentrationen im CSF den Referenzwert von 0,73 ng/ml. Außerdem können an mehreren Messzeitpunkten der 2., 3., und 4. Therapiezyklen, im Vergleich zum Ausgangswert zu Beginn des 1. Therapiezyklus, signifikant erhöhte Konzentrationen des NfH im CSF festgestellt werden. Daher kann ein verzögerter Effekt von TCA auf die Integrität des axonalen Kompartiments der Neurone bei einem Teil der Patienten diskutiert werden, zumal Petzold und Kollegen den von ihnen errechneten Referenzwert für konservativ eingestuft halten [168]. Andererseits verfügt unsere Studie über keine Kontrollgruppe, sodass der Beobachtete Effekt auch das langsame Voranschreiten der Erkrankung repräsentieren könnte. Bei Patienten mit 5 Applikationen TCA pro Zyklus und einer dadurch höheren TCA-Gesamtdosis lassen sich diese Veränderungen nicht feststellen, sodass die Ergebnisse insgesamt gegen starke akute und subakute

neurotoxische Effekte wiederholter intrathekalen Applikationen von TCA sprechen und bekannte Studien zur Sicherheit dieser Therapieform bestätigen [92, 93, 98, 99].

Unsere Untersuchung kann keine signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen des NfH im CSF und dem Lebensalter, dem Geschlecht sowie der Krankheitsdauer feststellen. Eine frühere prospektive Studie zeigt in einer 3-jährigen Follow-Up-Beobachtung einen signifikanten Anstieg der Konzentrationen des NfH im CSF bei Patienten mit SPMS [167]. Diese Daten sprechen für eine Akkumulation des NfH im CSF und damit fortwährenden axonalen Schaden während der sekundären progredienten Krankheitsphase der MS. Die genannte Studie zeigt zudem eine proportionale Beziehung der Liquorkonzentration des NfH mit klinischen Parametern der Behinderungsprogression. Andere Untersuchungen weisen deutlich erhöhte Konzentrationen des Biomarkers im CSF von RRMS-Patienten innerhalb eines akuten Schubes nach und ermitteln positive Zusammenhänge mit dem EDSS als klinischer Indikator für den Behinderungsgrad [119]. Wir konnten keine positive Beziehung der Konzentration des NfH im CSF mit der klinischen Verlaufsform der MS und sämtlichen klinischen Parametern als Anhaltspunkte für die Behinderungsprogression ermitteln. Die Diskrepanzen könnten durch den Therapieeinfluss der Glukokortikosteroide und durch die relative Kürze des Beobachtungszeitraumes von 9 Monaten bedingt sein. Darüber hinaus zeigen die Patienten unserer Kohorte während des Beobachtungszeitraumes keine Progredienz der klinischen Symptomatik. Andererseits ist die Datenlage gegenwärtig nicht eindeutig, denn in einer anderen Untersuchung an Patienten mit RRMS während eines akuten Schubereignisses kann keine signifikante Beziehung der Konzentration des Biomarkers im CSF mit dem klinischen Behinderungsgrad eruiert werden [181].

Die Dynamik der Nf variiert erheblich zwischen den verschiedenen Phosphoformen und in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums und der Aktivität der MS. So zeigen verschiedene Untersuchungen erhöhte Konzentrationen des NfL und NfH während eines CIS [32], wie der Optikusneuritis [170] und akuter Schubereignisse der MS [155, 181]. Hyperphosphorylierte Nf scheinen dagegen auch während der progressiven Krankheitsphase zu kumulieren [167]. Nach neuerem Verständnis repräsentiert NfL eher akuten axonalen Schaden, der durch Entzündungsprozesse ausgelöst wird. Die Untereinheit des NfH reflektiert chronische neurodegenerative Prozesse und korreliert mit einem langsamen Voranschreiten des Behinderungsgrades [219].

Ein weiterer wichtiger Aspekt unserer Untersuchung ist die proportionale Beziehung zwischen der Liquorkonzentration des NfH und dem IgM-Quotienten. Die Synthese oligoklonaler Antikörper im CSF als Zeichen einer unspezifischen intrathekalen Entzündung kann bei einer Mehrheit von MS-Patienten nachgewiesen werden [234]. Die erhöhte Konzentration des IgM-Antikörpers im CSF und somit die Erhöhung des IgM-

Quotienten wird mit einem schwereren Krankheitsverlauf der MS in Verbindung gebracht [205]. IgM-Antikörper können in akuten, chronisch aktiven und inaktiven MS-Läsionen nachgewiesen werden und spielen möglicherweise eine Rolle in der Genese des axonalen Schadens [192]. Eine positive Beziehung zu Biomarkern axonaler Läsionierung erscheint somit plausibel. Der IgM-Quotient zeigt innerhalb unserer Patientenkohorte zwischen aufeinanderfolgenden Untersuchungszeitpunkten keine signifikanten Veränderungen und scheint somit nicht durch die intrathekale TCA-Therapie beeinflusst zu werden.

Das Tau-Protein ist ein intrazelluläres Protein in Neuronen und Gliazellen [21]. In Axonen reguliert es die Stabilität von Mikrotubuli [213]. Ein Anstieg der Konzentration dieses Biomarkers im CSF spricht für einen axonalen und oligodendrozytären Schaden, wodurch angenommen wird, dass die Liquorkonzentration des Tau-Proteins ein potentes Surrogat für einen strukturellen Hirnschaden darstellt [32]. Über den Einfluss der Konzentration des Tau-Proteins im CSF auf den Krankheitsverlauf der MS besteht eine widersprüchliche Datenlage. Zum einen wurden bei MS-Patienten erhöhte Konzentrationen des Tau-Proteins im CSF nachgewiesen, die mit Kontrollpersonen ohne neuroinflammatorische Erkrankungen verglichen wurden [21, 107, 218]. Andere Studien bestätigen einen solchen Zusammenhang nicht [71, 88]. Die pathologische Phosphorylierung des Tau-Proteins wird nicht nur mit degenerativen Veränderungen im Rahmen der sogenannten Tauopathien, sondern auch mit entzündlichen Prozessen der MS in Verbindung gebracht [199]. In der vorliegenden Untersuchung lassen die während des ersten Therapiezyklus zwischen aufeinander folgenden TCA-Applikationen signifikant erhöhten Liquorkonzentrationen des Tau-Proteins einen initialen Effekt des TCA auf Zellen des Hirnparenchyms vermuten. Da sich die Liquorkonzentration des NfH im gleichen Zeitraum nicht signifikant erhöht, ist eine bedeutende Störung des axonalen Kompartimentes unwahrscheinlich. Möglicherweise führen unspezifische Wechselwirkungen der lipophilen Glukokortikosteroidmoleküle mit Zellmembranen von Oligodendrozyten und Neuronen zu einer passageren Konzentrationserhöhung des Tau-Proteins im Extrazellulärraum und damit im CSF. In den Folgezyklen lassen sich keine weiteren signifikanten Konzentrationsveränderungen des Tau-Proteins im CSF nachweisen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die wiederholte Gabe von TCA einen stärkeren strukturellen Hirnschaden bewirkt. Unsere Ergebnisse zeigen keine Unterschiede der Konzentration des Tau-Proteins im CSF zwischen den klinischen Subtypen der MS. Allerdings befinden sich die MS-Patienten der untersuchten Kohorte in einem klinisch stabilen Zustand. Hypothetisch könnte die Konzentration des Tau-Proteins im CSF eher die akute Krankheitsaktivität beziehungsweise den ablaufenden axonalen Schaden repräsentieren als strikt die klinische Verlaufsform. Dementsprechend können erhöhte Konzentrationen des Biomarkes im CSF von RRMS-Patienten während akuter Schubaktivität nachgewiesen werden [107]. Andere neurologische Erkrankungen wie die Subarachnoidalblutung und die Meningoenzephalitis, die durch akuten

Hirnparenchymschaden gekennzeichnet sind, weisen ebenfalls deutlich erhöhte Konzentrationen des Tau-Proteins im CSF auf, was die Rolle dieses Proteins als Marker für den axonalen Schaden untermauert [213].

Die Konzentration des Tau-Proteins im CSF kann während der Frühphase der MS Hinweise auf das Ausmaß des neuronalen Schadens liefern. Dieser Marker wird in Verbindung mit dem NfH und zusätzlicher Bildgebung als Indikator für die Progression eines CIS in eine definitive MS diskutiert [32]. In einer aktuellen Untersuchung mittels der semiquantitativen Western-Blot-Methode zeigen sich höhere Konzentrationen des Tau-Proteins im CSF von Patienten mit CIS, die in eine definitive MS konvertieren verglichen mit Patienten, bei denen sich die Symptomatik während des Beobachtungszeitraumes auf ein Ereignis beschränkt hat[17]. Diese Daten unterstützen die hypothetische Rolle des Tau-Proteins als prädiktiven Faktor für den klinischen Verlauf während der frühen Krankheitsphase der MS. Weitere, größer angelegte Studien sind nötig um mit Hilfe dieser Biomarker den Krankheitsverlauf der MS einschätzen zu können. Daraus ergäbe sich die Möglichkeit frühzeitig neuroprotektive Therapien zum Einsatz kommen zu lassen.

Unsere Untersuchung zeigt keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF und soziodemographischen Parametern. An verschiedenen Untersuchungszeitpunkten ergeben sich signifikante umgekehrt proportionale Beziehungen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF zu klinischen Verlaufparametern wie dem EDSS und der AS. In diesem Zusammenhang berichtet eine neuere Arbeit über einen Abfall der Liquor-Konzentration des Tau-Proteins in der sekundär progredienten Krankheitsphase bei Zunahme der Hirnatrophie [104]. Gleichzeitig messen die Autoren signifikant erhöhte Konzentrationen bei RRMS-Patienten. Es wird postuliert, dass die Liquorkonzentration des Tau-Proteins während der inflammatorisch geprägten schubförmigen Krankheitsphase durch konsekutiven axonalen und astroglären Schaden ansteigt und im Rahmen der durch Neurodegeneration bestimmten sekundär chronisch progredienten Phase wieder abfällt. Somit könnte eine Reduktion der Liquorkonzentration des Tau-Proteins indirekt einen Verlust an Hirnparenchym reflektieren [104]. Dieser zunehmende Verlust an funktionsfähigem Hirnparenchym kann mit einer stärkeren Behinderungsprogression einhergehen [190, 204], was einen Erklärungsansatz für geringere Liquorkonzentrationen des Biomarkers bei Patienten mit einem hohen Grad an Behinderung bietet. Demgegenüber steht das Resultat einer anderen Untersuchung, die keinen Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF und den klinischen Verlaufparametern ermittelt, sodass die Rolle des Tau-Proteins als klinischer Routineparameter zur Erfassung des axonalen Schadens und zur Prädiktion der Behinderungsprogression bei MS-Patienten unklar bleibt [88].

Unsere Daten zeigen signifikante positive Beziehungen zwischen der Liquorkonzentration des Tau-Proteins und der Zellzahl, dem Gesamtprotein, und dem IgA-Quotienten. Einige Autoren belegen Beziehungen zwischen der Liquorkonzentration des Tau-Proteins und den Antikörperindizes als Indikator für einen intrathekalen Entzündungsprozess [21]. Heterogene Wechselwirkungen zwischen dem Entzündungsgeschehen und neurodegenerativen Prozessen werden als Ursachen diskutiert. Signifikante Beziehungen zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im CSF und der Blut-Hirn-Schrankenfunktion bestehen nicht [213]. Unsere Daten bestätigen diese Ergebnisse und zeigen keinen Zusammenhang der Liquorkonzentration des Tau-Proteins und dem Albumin-Quotienten als Parameter der Blut-Hirn-Schrankenfunktion. Der Albumin-Quotient zeigt keine signifikanten Veränderungen unter der Therapie mit intrathekal applizierten Glukokortikosteroiden. Somit scheint die zyklische intrathekale Applikation des TCA keinen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirnschranken-Funktion zu haben, was die Sicherheit dieser Therapiemethode untermauert.

Das Protein S-100B gehört zu einer eng verwandten Familie kalziumbindender Proteine, die in vielen Geweben des Körpers nachgewiesen werden [53]. Innerhalb des ZNS wird dieses Protein vor allem in Astrozyten expremiert [197]. Die vermehrte Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia ist die unmittelbare zelluläre Reaktion im ZNS auf jeglichen Parenchymschaden [166]. Aktivierte Astrozyten sezernieren vermehrt Protein S-100B in den Extrazellulärraum [148]. Protein S-100B kann daher als Biomarker für eine vermehrte Aktivität und Proliferation von Astrozyten angesehen werden [166].

Unsere Ergebnisse zeigen während des ersten Behandlungszyklus eine Reduktion der Konzentration des Protein S-100B im CSF. In den Folgezyklen sind keine signifikanten Änderungen der Konzentration dieses Biomarkers im CSF mehr nachzuweisen. Möglicherweise führt die intrathekale Applikation von TCA initial durch immunsuppressive Effekte zu einer verminderten Aktivierung von Mikroglia. Da diese über das Zytokin IL-1 zu einer vermehrten Aktivität der Astrozyten führen, erscheint ein Abfall des Protein S-100B plausibel [148]. Demgegenüber führt adrenokortikotropes Hormon *in vitro* zu einer vermehrten Sekretion von Protein S-100B aus Astrozyten, was auf weitaus komplexere Zusammenhänge hindeutet [214].

Protektive und schädigende Wirkungen des Proteins S-100B auf neuronales Gewebe werden diskutiert [53]. Ein moderater Anstieg der Konzentration des Biomarkers im CSF könnte für eine moderate Astrozytose sprechen und mit neuroprotektiven Auswirkungen in Verbindung stehen. Dahingegen sind stark erhöhte Konzentrationen des Protein S-100B mit toxischen Effekten und neuronalem Untergang während eines akuten Schubereignisses assoziiert [166]. Einige Autoren berichten von gering erhöhten Konzentrationen des Protein S-100B im CSF während eines akuten Schubes bei RRMS

Patienten [139]. Diese Daten sprechen für neuroprotektive und immunmodulatorische Eigenschaften des Protein S-100B während der entzündlichen Phase der Erkrankung. Korrelierend mit publizierten Daten übersteigt die Konzentration des Biomarkers im CSF in der vorliegenden Untersuchung während des gesamten Beobachtungszeitraumes nicht den Referenzbereich von 2,5-3,5 ng/ml [84, 139]. In Übereinstimmung mit früheren Publikationen können wir keine Zusammenhänge der Liquorkonzentration des Protein S-100B und dem Lebensalter, dem Geschlecht sowie der klinischen Verlaufsform der MS nachweisen [166, 181]. Demgegenüber berichten Petzold und Mitarbeiter über tendenzielle Unterschiede der Liquorkonzentration des Protein S-100B zwischen den klinischen Verlaufsformen. Demnach steigt die Konzentration des Biomarkers im CSF von PPMS über SPMS nach RRMS an und überschreitet in einigen Fällen den Referenzwert [166]. Weitere Untersuchungen sind auch hier erforderlich, um diesen Trend zu überprüfen und die Rolle der Astrozytose unter Berücksichtigung der klinischen Verlaufsformen weiter zu beleuchten. Auch wenn das Protein S-100B ubiquitär in extraneuronalen Geweben expremiert wird [166], ist ein gesteigerter Einfluss auf die in unserer Untersuchung gemessenen Liquorkonzentrationen des Biomarkers unwahrscheinlich, da die Blut-Hirn-Schrankenfunktion intakt und die Patienten sich alle in einem klinisch stabilen Zustand befanden. Zu keinem Therapiezeitpunkt konnten wir eine Korrelation zwischen der Konzentration des Protein S-100B im CSF und dem Behinderungsgrad feststellen. Ähnliche Daten wurden in einer früheren Therapiestudie von Interferon β 1a bei PPMS-Patienten publiziert [130]. Auch RRMS-Patienten während eines akuten Schubereignisses zeigen keine Beziehung des Behinderungsgrades mit der Liquorkonzentration des Protein S-100B [181]. Eine verstärkte Aktivierung der Astroglia scheint somit keinen direkten Einfluss auf die Behinderungsprogression bei MS-Patienten zu haben. Insgesamt erbringen die Ergebnisse keine Hinweise auf eine verstärkte Astrozytose in Assoziation mit einer zyklischen intrathekalen Therapie mittels retardiert freigesetzter Glukokortikosteroide wie dem TCA. Dies unterstreicht nochmals die Sicherheit dieser Therapiemethode und bestätigt frühere Untersuchungen [98].

Unsere Daten zeigen an keinem Zeitpunkt signifikante Beziehungen der Biomarker NfH, Tau-Protein und Protein S-100B untereinander. Dies korreliert mit früher publizierten Daten [32] und deutet auf komplizierte pathogenetische Prozesse. Im Falle eines stärkeren axonalen Schadens wären deutliche Erhöhungen der Destruktionsparameter zu erwarten. Die Patienten unserer Studie befanden sich im Verlauf der Untersuchungen in einem klinisch stabilen Zustand ohne Anzeichen einer starken schubförmigen oder progredienten Krankheitsprogression. Die Konzentrationen der Biomarker verbleiben zumeist im Normbereich. Daraus ergibt sich zum einen ein Erklärungsansatz für fehlende proportionale Beziehungen zwischen den Biomarkern und zum anderen wird die Sicherheit der Therapiemethode bestätigt.

Interessanterweise zeigen unsere Daten und frühere Untersuchungen [21, 213] keine signifikanten proportionalen Beziehungen der Biomarker für neuronalen Schaden mit der Zellzahl im CSF. Eine Pleozytose des CSF ist ein laborchemisches Korrelat für entzündliche Prozesse und konsekutiven Hirnschaden [233]. Damit wird die Hypothese unterstützt, dass eine Subpopulation inflammatorischer Zellen, im Rahmen einer Pleozytose, in der Umgebung von MS-Läsionen als Reparaturmechanismus über bestimmte neurotrope Faktoren protektive Wirkungen ausüben und nicht ausschließlich einen Hirnschaden bewirken [111].

Seit den 50er Jahren sind verschiedene Glukokortikosteroid-Verbindungen im Rahmen einer intrathekalen Therapie von MS-Patienten getestet worden. Trotz kontroverser Ergebnisse können, insbesondere bei spinalen Symptomen wie der Spastik, klinische Besserungen des Beschwerdebildes beobachtet werden [3]. 54 Patienten die vorwiegend an spinalen, motorischen Symptomen leiden sind in die vorliegende Untersuchung eingeschlossen worden. Während des ersten Behandlungszyklus können wir eine signifikante Abnahme des EDSS in der Gesamtpopulation beobachten. Während der Folgezyklen ist dieser Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar. Zwischen den nach Applikationsanzahl getrennten Subkohorten und den klinischen Verlaufsformen lassen sich keine Unterschiede des EDSS belegen. Diese Daten decken sich mit früheren Veröffentlichungen [92, 93, 98, 99, 134] und unterstreichen zumindest in der Anfangsphase die Effektivität dieser Therapieoption, wobei unsere Daten keine weitere Besserung des Behinderungsgrades nach Langzeittherapie ergeben.

Die mAS und die Gehstrecke verbesserten sich während des ersten Zyklus und folgender Therapiezyklen signifikant, wobei zusätzlich eine anhaltende Besserung der Parameter im Vergleich zum Ausgangswert vor Therapiebeginn zu beobachten ist. Dieser anhaltende Effekt wurde ebenfalls in einer früheren Untersuchung beobachtet [92]. Im Falle der mAS betreffen die Veränderungen die Subgruppe der höher dosiert therapierten MS-Patienten mit 5 Applikationen pro Therapiezyklus. Auch die Verlaufsdaten dieser Parameter unterstreichen die Effektivität der Therapiemethode [92, 93, 98, 99] und bieten möglicherweise Hinweise auf eine positive Dosis-Wirkungs-Beziehung des Medikamentes im Hinblick auf die Reduktion der spinalen Symptomatik. Es ist zu vermuten, dass die intrathekale Applikation von TCA einen initialen Effekt bewirkt, der im weiteren Therapieverlauf stabil bleibt. Eine Erklärung für diesen anhaltenden Effekt auf die Verminderung der Spastik, könnte in der langen Wirksamkeit der Glukokortikosteroide zu finden sein. Überdies umgeht die intrathekale Applikation des Glukokortikosteroids die Blut-Hirn-Schranke und erreicht am Wirkungsort eine höhere Konzentration des Wirkstoffs [185]. Außerdem werden möglicherweise chronisch ablaufende Entzündungsprozesse unterdrückt [3]. Allerdings scheint der Therapieeffekt sich nicht zwischen den klinischen Verlaufsformen der MS zu unterscheiden. Eindeutige

Aussagen über die Auswirkung der zyklischen intrathekalen Therapie mittels TCA auf den Progressionsgrad der chronischen MS sind anhand unserer Daten nicht möglich. Eine frühere Untersuchung zeigt jedoch positive Effekte der intravenösen Therapie mittels MP im Sinne einer Reduktion des Voranschreitens der Hirnatrophie bei Patienten mit RRMS und SPMS [237]. Unsere Untersuchung bestätigt, dass sich die spinale Symptomatik auch bei SPMS-Patienten mit einem fortgeschrittenen Behinderungsgrad verbessert [93]. Als prädiktiver Faktor für das Ansprechen dieser Therapiemethode auf spinale Symptome bei Patienten mit chronisch progredienter MS wird das Ausmaß der Atrophie des oberen Rückenmarks aufgeführt [134]. Demnach profitieren Patienten mit einer geringen Atrophie des oberen Rückenmarks und initial stark eingeschränkter Gehfähigkeit im höchsten Maße von der Therapie. Dabei wird die Atrophie des Parenchyms in diesem funktionell wichtigen Gebiet als Endpunkt eines irreversiblen Gewebsunterganges angesehen, bei dem weniger starke Therapieerfolge erreicht werden können. Bei Patienten ohne Atrophie spielen möglicherweise ein subchronischer Entzündungsprozess und multifokale Ödemzonen eine funktionelle Rolle in der Entstehung der spinalen Symptomatik. In diesen Fällen können die immunsuppressiven Wirkungen der intrathekalen Glukokortikosteroide das deutlichere Ansprechen auf die Therapie erklären [134]. Die Probanden in unserer Untersuchung geben zumeist einen deutlichen Zuwachs der Lebensqualität durch die Therapiemethode an. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da für die meisten Patienten eine Reduktion der Spastik und Verlängerung der Gehstrecke deutliche Erleichterungen in der Bewältigung des alltäglichen Lebens bedeuten. Die zyklische Applikation des TCA hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Blasenfunktion unserer Patientenkohorte. Da die Motorik der Harnblase zum Teil vegetativ reguliert ist, kann postuliert werden, dass intrathekal applizierte Glukokortikosteroide keine relevante Wirkung auf die Funktion des vegetativen Nervensystems ausüben.

Es ist bekannt, dass Liquorpunktionen und intrathekal applizierte Medikamente im Liquorkompartiment Reaktionen auslösen, die mit Hilfe verschiedener Parameter der Liquor-Routinediagnostik gemessen werden können [235]. Bei einigen Patienten unserer Kohorte steigt der Anteil der Granulozyten im Differentialzellbild des CSF zwischen aufeinanderfolgenden TCA-Applikationen innerhalb eines Therapiezyklus an. Am jeweiligen Ausgangspunkt des Folgezyklus ist eine Normalisierung des Ausgangswertes nachweisbar. Als Ursache dieses Phänomens kann eine Reizpleozytose diskutiert werden. Diese kann durch Liquorpunktionen, Operationen innerhalb des ZNS und durch die intrathekale Applikation von Medikamenten bedingt werden. Differentialzytologisch zeigen sich neben vermehrten Granulozyten auch Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen [235]. Diese zytologischen Veränderungen lassen sich auch in einem Teil unserer Patienten nachweisen. Eine Reizpleozytose sollte mit Hilfe weiterer klinischer und liquordiagnostischer Parameter wie Zellzahl, Glukose und Lactat immer von einer

infektiösen Meningitis abgegrenzt werden, die als Komplikation jedes invasiven intrathekalen Eingriffs auftreten kann. Die Reizpleozytose kann außerdem durch eine Reaktion auf die kristalline Medikamentensuspension des Glukokortikosteroide bedingt werden. Eine neu aufgetretene neurologische Symptomatik, wie etwa Meningismus, ist bei den Probanden unserer Untersuchungsgruppe nicht beobachtet worden.

Synoptisch ist festzustellen, dass das komplexe Feld der Erforschung von Biomarkern für pathogenetische Prozesse der MS im CSF für die individuelle frühzeitige Erfassung und Prädiktion des Krankheitsverlaufes widersprüchliche Ergebnisse hervorbringt. Das stetige Voranschreiten der Krankheit ist die Hauptursache für die Zunahme des Behinderungsgrades bei Patienten mit MS. Der Verlauf der MS ist für den einzelnen Patienten nicht vorhersehbar.

Das NfH und das Tau-Protein im CSF sind verlässliche Biomarker für den axonalen Schaden während das Protein S-100B die astrozytäre Aktivierung im ZNS repräsentiert. Biomarker im CSF können potentiell eine entscheidende Rolle in der Vorhersage des Krankheitsverlaufes und des Ansprechens auf spezifische Therapien bei MS-Patienten spielen. Der Nutzen dieser Biomarker als klinische Routineparameter für eine subtile Beobachtung des Krankheitsverlaufes, insbesondere innerhalb der chronisch progredienten Krankheitsphase, ist durch die relativ geringe Sensitivität begrenzt. Bei klinisch stabilen Patienten sind die Liquorkonzentrationen dieser Marker oftmals im Normbereich und erst während akuter Schubereignisse erhöht [21, 165, 181, 219]. Auch bei statistisch signifikanten Konzentrationsänderungen der Biomarker handelt es sich oft um minimale Beträge. Deshalb müssen heterogene Prozesse beachtet werden, die mit primären durch die MS bedingten pathologischen Prozessen nicht im Zusammenhang stehen. Neuronaler Verlust geht mit dem normalen Alterungsprozess einher. Das altersabhängige Ansteigen der Konzentration des NfH im CSF deutet darauf hin, dass der Verlust von Neuronen mit zunehmendem Alter stärker wird [119]. Bei MS-Patienten zeigen sich ebenfalls deutliche Beziehungen zwischen dem Alter und der Liquorkonzentration des NfH. Dies betrifft vor allem Patienten mit CIS und RRMS und ist bei SPMS-Patienten nicht zu beobachten. Diese Erkenntnisse sind für zukünftige Studien von großer Bedeutung. Um eine adäquate klinische Interpretation der Messwerte zu gewährleisten, ist eine Alterskorrektur in der statistischen Analyse notwendig [219]. Bevor ein standardisierter Einsatz dieser Biomarker innerhalb der klinischen Praxis möglich ist, müssen weitere Anforderungen erfüllt sein. Variationen innerhalb methodischer Parameter wie die Test-Sensitivität oder die Stabilität der Messwerte zwischen verschiedenen Laboren müssen minimiert werden. Weltweit angelegte Stabilitätstests sollten durch große Konsortien durchgeführt werden. Ein weiterer Schritt ist eine Standardisierung der Lagerungsmaßnahmen der entnommenen Proben, um die größtmögliche Stabilität der Biomarker gegenüber äußeren Einflüssen zu gewährleisten.

Sind diese Anforderungen erfüllt, müssen die Biomarker in großen randomisierten klinischen Studien hinsichtlich ihres prädiktiven Wertes für den Krankheitsverlauf der MS und dem Therapiemanagement untersucht werden [219].

Zusammenfassend bestätigt unsere Studie die Sicherheit und Effektivität der wiederholten zyklischen intrathekalen Applikation retardiert freigesetzter Glukokortikosteroide bei Patienten mit MS, die vorwiegend eine spinale motorische Symptomatik aufweisen [92, 93, 98, 99, 134]. Ein rascher signifikanter Anstieg neuronaler Destruktionsmarker kann nicht nachgewiesen werden, wenngleich die Daten des NfH auf einen verzögerten Effekt der zyklischen Therapie mit retardiert freigesetztem TCA auf das axonale Kompartiment hindeuten. Um diese Wirkung zu bestätigen, sollten zukünftige Studien eine höhere Anzahl von Probanden rekrutieren und placebokontrolliert durchgeführt werden. Außerdem ist eine statistische Alterskorrektur der Messwerte nötig, um unspezifische Effekte auf die Konzentration der Biomarker im CSF auszuschließen.

Daher postulieren wir, dass die wiederholte intrathekale Applikation von TCA keine akuten und subakuten neurotoxischen Effekte bewirkt. Demgegenüber können verzögerte neurotoxische Wirkungen nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde sind weitere Untersuchungen notwendig, welche die Effektivität und Sicherheit dieser Therapiemethode insbesondere im Vergleich zu intravenös applizierten Glukokortikosteroiden bei Patienten mit chronisch progredienter MS untersuchen.

Außerdem wären aus Sicht der Evidenz basierten Medizin größer angelegte doppelblinde, Placebo kontrollierte Studien notwendig. Die Durchführung Placebo kontrollierter Studien im Rahmen dieser Therapiemethode birgt allerdings Kontroversen. Die wiederholte intrathekale Injektion eines Placebos über einen längeren Zeitraum ist aus ethischen Gesichtspunkten aufgrund der Invasivität der Methode kaum vertretbar [102]. Unter sorgfältiger Indikationsstellung und einer Patientenaufklärung („off-label-use“ Situation) sollte die Therapie ausschließlich von erfahrenen Neurologen in Therapiezentren durchgeführt werden.

Im Rahmen einer multizentrischen Kooperation wird aktuell eine internationale klinische Studie konzipiert, um die Sicherheit und Effektivität der wiederholten intrathekalen Therapie mittels retardiert freigesetzter Glukokortikosteroide bei Patienten mit progressiver MS zu untersuchen [113].

6 Literaturverzeichnis

1. Aboul-Enein F, Bauer J, Klein M, et al. (2004). Selective and antigen-dependent effects of myelin degeneration on central nervous system inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63(12): 1284–1296.
2. Abram S E, Marsala M, Yaksh T L (1994). Analgesic and neurotoxic effects of intrathecal corticosteroids in rats. *Anesthesiology* 81(5): 1198–1205.
3. Abu-Mugheisib M, Benecke R, Zettl U K (2011). Repeated intrathecal triamcinolone acetonide administration in progressive multiple sclerosis: a review. *Mult Scler Int* 2011: 219049.
4. Acevedo A R, Nava C, Arriada N, et al. (2000). Cardiovascular dysfunction in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 101(2): 85–88.
5. Achiron A, Kishner I, Sarova-Pinhas I, et al. (2004). Intravenous immunoglobulin treatment following the first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Neurol* 61(10): 1515–1520.
6. Allan S M, Rothwell N J (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2(10): 734–744.
7. Allore R, O'Hanlon D, Price R, et al. (1988). Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science* 239(4845): 1311–1313.
8. Altschuler E L (2000). Is JC polyoma virus the cause of ulcerative colitis and multiple sclerosis? *Med Hypotheses* 55(4): 335–336.
9. Alvarez-Lafuente R, Martín-Estefanía C, Las Heras V de, et al. (2002). Active human herpesvirus 6 infection in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59(6): 929–933.
10. Andersson P B, Goodkin D E (1998). Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J Neurol Sci* 160(1): 16–25.
11. Apel A, Klauer T, Zettl U K (2006). Stress und Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose. *Fortschr Neurol Psychiatr* 74(10): 567–574.
12. Araújo E A S d, Freitas M R G d (2008). Benefit with methylprednisolone in continuous pulsetherapy in progressive primary form of multiple sclerosis: study of 11 cases in 11 years. *Arq Neuropsiquiatr* 66(2B): 350–353.
13. Archibald C J, McGrath P J, Ritvo P G, et al. (1994). Pain prevalence, severity and impact in a clinic sample of multiple sclerosis patients. *Pain* 58(1): 89–93.
14. Ascherio A, Munch M (2000). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11(2): 220–224.
15. Ashworth B (1964). Preliminary trial of carisoprodol in multiple sclerosis. *Practitioner* 192: 540–542.
16. Aurell A, Rosengren L E, Karlsson B, et al. (1991). Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke* 22(10): 1254–1258.
17. Avsar T, Korkmaz D, Tütüncü M, et al. (2012). Protein biomarkers for multiple sclerosis: semi-quantitative analysis of cerebrospinal fluid candidate protein biomarkers in different forms of multiple sclerosis. *Mult Scler* 18(8): 1081–1091.
18. Azmitia E C, Griffin W S, Marshak D R, et al. (1992). S100 beta and serotonin: a possible astrocytic-neuronal link to neuropathology of Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 94: 459–473.
19. Barkhof F, Filippi M, Miller D H, et al. (1997). Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120 (Pt 11): 2059–2069.

20. Barone F C, Feuerstein G Z (1999). Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 19(8): 819–834.
21. Bartosik-Psujek H, Archelos J J (2004). Tau protein and 14-3-3 are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and correlate with intrathecal synthesis of IgG. *J Neurol* 251(4): 414–420.
22. Baudier J, Delphin C, Grunwald D, et al. (1992). Characterization of the tumor suppressor protein p53 as a protein kinase C substrate and a S100b-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 89(23): 11627–11631.
23. Berg J M (1989). DNA binding specificity of steroid receptors. *Cell* 57(7): 1065–1068.
24. Bertolotto A (2004). Neutralizing antibodies to interferon beta: implications for the management of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 17(3): 241–246.
25. Bitsch A (2001). Klinische Symptomatik und natürlicher Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose. In U.K. Zettl & E. Mix (Eds.), *Multiple Sklerose: Kausalorientierte, symptomatische und rehabilitative Therapie* (pp. 67–79). Berlin: Springer.
26. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, et al. (2012). Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 366(20): 1870–1880.
27. Bohannon R W, Smith M B (1987). Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. *Phys Ther* 67(2): 206–207.
28. Boster A L, Nicholas J A, Topalli I, et al. (2013). Lessons Learned From Fatal Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Patient With Multiple Sclerosis Treated With Natalizumab. *JAMA Neurol*: 1–5.
29. Brandt R, Léger J, Lee G (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131(5): 1327–1340.
30. Braune H J, Huffmann G A (1992). A prospective double-blind clinical trial, comparing the sharp Quincke needle (22G) with an "atraumatic" needle (22G) in the induction of post-lumbar puncture headache. *Acta Neurol Scand* 86(1): 50–54.
31. Brettschneider J, Maier M, Arda S, et al. (2005). Tau protein level in cerebrospinal fluid is increased in patients with early multiple sclerosis. *Mult Scler* 11(3): 261–265.
32. Brettschneider J, Petzold A, Junker A, et al. (2006). Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler* 12(2): 143–148.
33. Brex P A, Jenkins R, Fox N C, et al. (2000). Detection of ventricular enlargement in patients at the earliest clinical stage of MS. *Neurology* 54(8): 1689–1691.
34. Brusaferri F, Candelise L (2000). Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Neurol* 247(6): 435–442.
35. Buljevac D, Flach H Z, Hop W C J, et al. (2002). Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 125(Pt 5): 952–960.
36. Burton J M, O'Connor P W, Hohol M, et al. (2009). Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD006921.
37. Burton J M, O'Connor P W, Hohol M, et al. (2012). Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD006921.

38. Buttgereit F, Grant A, Müller M, et al. (1994). The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis. *Eur J Biochem* 223(2): 513–519.
39. Buttgereit F, Straub R H, Wehling M, et al. (2004). Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 50(11): 3408–3417.
40. Buttgereit F, Wehling M, Burmester G R (1998). A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41(5): 761–767.
41. Cannella B, Raine C S (1995). The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37(4): 424–435.
42. Chapman J, Vinokurov S, Achiron A, et al. (2001). APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS. *Neurology* 56(3): 312–316.
43. Chun J, Hartung H-P (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 33(2): 91–101.
44. Clanet M, Radue E W, Kappos L, et al. (2002). A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 59(10): 1507–1517.
45. Cohen J A, Barkhof F, Comi G, et al. (2010). Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362(5): 402–415.
46. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, et al. (2009). Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 374(9700): 1503–1511.
47. Compston A (1997). Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 62(6): 553–561.
48. Criswell L A, Pfeiffer K A, Lum R F, et al. (2005). Analysis of families in the multiple autoimmune disease genetics consortium (MADGC) collection: the PTPN22 620W allele associates with multiple autoimmune phenotypes. *Am J Hum Genet* 76(4): 561–571.
49. Cross A H, Trotter J L, Lyons J (2001). B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol* 112(1-2): 1–14.
50. Cserr H F, Knopf P M (1992). Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13(12): 507–512.
51. Dessau R B, Lisby G, Frederiksen J L (2001). Coronaviruses in brain tissue from patients with multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 101(6): 601–604.
52. Doggrell S A (2010). Oral fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis Evaluation of: Kappos L, Radue E-M, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:387-401; and Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362:402-15. *Expert Opin Pharmacother* 11(10): 1777–1781.
53. Donato R (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33(7): 637–668.
54. Dougherty J H, Fraser R A (1978). Complications following intraspinal injections of steroids. Report of two cases. *J Neurosurg* 48(6): 1023–1025.
55. Drechsel D N, Hyman A A, Cobb M H, et al. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3(10): 1141–1154.

56. Durelli L, Verdun E, Barbero P, et al. (2002). Every-other-day interferon beta-1b versus once-weekly interferon beta-1a for multiple sclerosis: results of a 2-year prospective randomised multicentre study (INCOMIN). *Lancet* 359(9316): 1453–1460.
57. Dutta R, Trapp B D (2007). Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology* 68(22 Suppl 3): S22-31; discussion S43-54.
58. Ebers G C, Sadovnick A D, Risch N J (1995). A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377(6545): 150–151.
59. Ebers G C, Yee I M, Sadovnick A D, et al. (2000). Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. Canadian Collaborative Study Group. *Ann Neurol* 48(6): 927–931.
60. Ebringer A, Hughes L, Rashid T, et al. (2005). Acinetobacter immune responses in multiple sclerosis: etiopathogenetic role and its possible use as a diagnostic marker. *Arch Neurol* 62(1): 33–36.
61. Eikelenboom M J, Petzold A, Lazeron R H C, et al. (2003). Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* 60(2): 219–223.
62. Eisele P, Szabo K, Hornberger E, et al. (2013). Presumptive Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Multiple Sclerosis after Natalizumab Therapy. *J Neuroimaging*.
63. Elder G A, Friedrich V L, Bosco P, et al. (1998). Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. *J Cell Biol* 141(3): 727–739.
64. Epplen C, Jäckel S, Santos E J, et al. (1997). Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol* 41(3): 341–352.
65. Fazekas F (2012). Fingolimod in the treatment algorithm of relapsing remitting multiple sclerosis: a statement of the Central and East European (CEE) MS Expert Group. *Wien Med Wochenschr* 162(15-16): 354–366.
66. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, et al. (1988). Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 38(12): 1822–1825.
67. Feany M B, Dickson D W (1996). Neurodegenerative disorders with extensive tau pathology: a comparative study and review. *Ann Neurol* 40(2): 139–148.
68. Ferguson B, Matyszak M K, Esiri M M, et al. (1997). Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120 (Pt 3): 393–399.
69. Ford C C, Johnson K P, Lisak R P, et al. (2006). A prospective open-label study of glatiramer acetate: over a decade of continuous use in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 12(3): 309–320.
70. Fox N C, Jenkins R, Leary S M, et al. (2000). Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. *Neurology* 54(4): 807–812.
71. Gajofatto A, Bongianni M, Zanusso G, et al. (2011). Are cerebrospinal fluid biomarkers useful in predicting the prognosis of multiple sclerosis patients? *Int J Mol Sci* 12(11): 7960–7970.
72. Gale C R, Martyn C N (1995). Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 47(4-5): 425–448.
73. Ge Y, Grossman R I, Udupa J K, et al. (2000). Brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis and secondary progressive multiple sclerosis: longitudinal quantitative analysis. *Radiology* 214(3): 665–670.
74. Ghezzi A, Amato M P, Capobianco M, et al. (2005). Disease-modifying drugs in childhood-juvenile multiple sclerosis: results of an Italian co-operative study. *Mult Scler* 11(4): 420–424.
75. Gödde R, Rohde K, Becker C, et al. (2005). Association of the HLA region with multiple sclerosis as confirmed by a genome screen using 10,000 SNPs on DNA chips. *J Mol Med* 83(6): 486–494.

76. Goedert M, Crowther R A, Garner C C (1991). Molecular characterization of microtubule-associated proteins tau and MAP2. *Trends Neurosci* 14(5): 193–199.
77. Gold R (2012). Online-Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
78. Gold R, Buttgereit F, Toyka K V (2001). Mechanism of action of glucocorticosteroid hormones: possible implications for therapy of neuroimmunological disorders. *J Neuroimmunol* 117(1-2): 1–8.
79. Goldstein M E, Sternberger N H, Sternberger L A (1987). Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis. *J Neuroimmunol* 14(2): 149–160.
80. Goodin D S, Ebers G C, Johnson K P, et al. (1999). The relationship of MS to physical trauma and psychological stress: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 52(9): 1737–1745.
81. Goodin D S, Frohman E M, Garmany G P, et al. (2002). Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58(2): 169–178.
82. Grant P, Pant H C (2000). Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J Neurocytol* 29(11-12): 843–872.
83. Green A J, Harvey R J, Thompson E J, et al. (1997). Increased S100beta in the cerebrospinal fluid of patients with frontotemporal dementia. *Neurosci Lett* 235(1-2): 5–8.
84. Green A J, Keir G, Thompson E J (1997). A specific and sensitive ELISA for measuring S-100b in cerebrospinal fluid. *J Immunol Methods* 205(1): 35–41.
85. Greenberg S M, Koo E H, Selkoe D J, et al. (1994). Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 91(15): 7104–7108.
86. Griffin W S, Stanley L C, Ling C, et al. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 86(19): 7611–7615.
87. Griffin JW G E B (1995). Axonal degeneration and disorders of the axonal cytoskeleton. In Waxman. SG, J. D. Kocsis, & P. K. Stys (Eds.), *The Axon: Structure, Function, and Pathophysiology* (pp. 357–390). New York: Oxford University Press.
88. Guimarães I, Cardoso M I, Sá M J (2006). Tau protein seems not to be a useful routine clinical marker of axonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler* 12(3): 354–356.
89. Hafler D A, Slavik J M, Anderson D E, et al. (2005). Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 204: 208–231.
90. Hartung H-P, Gonsette R, König N, et al. (2002). Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360(9350): 2018–2025.
91. Hedreen J C, Koliatsos V E (1994). Phosphorylated neurofilaments in neuronal perikarya and dendrites in human brain following axonal damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 53(6): 663–671.
92. Hellwig K, Schimrigk S, Lukas C, et al. (2006). Efficacy of mitoxantrone and intrathecal triamcinolone acetate treatment in chronic progressive multiple sclerosis patients. *Clin Neuropharmacol* 29(5): 286–291.
93. Hellwig K, Stein F J, Przuntek H, et al. (2004). Efficacy of repeated intrathecal triamcinolone acetate application in progressive multiple sclerosis patients with spinal symptoms. *BMC Neurol* 4(1): 18.
94. Hemmer B, Archelos J J, Hartung H-P (2002). New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3(4): 291–301.

95. Hench P S, Kendall E C (1949). The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24(8): 181–197.
96. Herrmann M, Curio N, Jost S, et al. (2001). Release of biochemical markers of damage to neuronal and glial brain tissue is associated with short and long term neuropsychological outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 70(1): 95–100.
97. Heun R, Sliwka U, Rüttinger H, et al. (1992). Intrathecal versus systemic corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis: results of a pilot study. *J Neurol* 239(1): 31–35.
98. Hoffmann V, Kuhn W, Schimrigk S, et al. (2006). Repeat intrathecal triamcinolone acetonide application is beneficial in progressive MS patients. *Eur J Neurol* 13(1): 72–76.
99. Hoffmann V, Schimrigk S, Islamova S, et al. (2003). Efficacy and safety of repeated intrathecal triamcinolone acetonide application in progressive multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 211(1-2): 81–84.
100. Hohlfeld R, Kerschensteiner M, Stadelmann C, et al. (2000). The neuroprotective effect of inflammation: implications for the therapy of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 107(2): 161–166.
101. Holmes S, Friese M A, Siebold C, et al. (2005). Multiple sclerosis: MHC associations and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 7(3): 1–17.
102. Huston P, Peterson R (2001). Withholding proven treatment in clinical research. *N Engl J Med* 345(12): 912–914.
103. Ingwersen J, Aktas O, Kuery P, et al. (2012). Fingolimod in multiple sclerosis: mechanisms of action and clinical efficacy. *Clin Immunol* 142(1): 15–24.
104. Jaworski J, Psujek M, Janczarek M, et al. (2012). Total-tau in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis decreases in secondary progressive stage of disease and reflects degree of brain atrophy. *Ups J Med Sci* 117(3): 284–292.
105. Jeffery D R, Markowitz C E, Reder A T, et al. (2011). Fingolimod for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 11(2): 165–183.
106. Jensen R, Marshak D R, Anderson C, et al. (1985). Characterization of human brain S100 protein fraction: amino acid sequence of S100 beta. *J Neurochem* 45(3): 700–705.
107. Kapaki E, Paraskevas G P, Michalopoulou M, et al. (2000). Increased cerebrospinal fluid tau protein in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 43(4): 228–232.
108. Kappos L, Freedman M S, Polman C H, et al. (2007). Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet* 370(9585): 389–397.
109. Kappos L, Polman C H, Freedman M S, et al. (2006). Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 67(7): 1242–1249.
110. Keegan M, König F, McClelland R, et al. (2005). Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 366(9485): 579–582.
111. Kerschensteiner M, Stadelmann C, Dechant G, et al. (2003). Neurotrophic cross-talk between the nervous and immune systems: implications for neurological diseases. *Ann Neurol* 53(3): 292–304.
112. Khan O A, Tselis A C, Kamholz J A, et al. (2001). A prospective, open-label treatment trial to compare the effect of IFN beta-1a (Avonex), IFN beta-1b (Betaseron), and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 8(2): 141–148.

113. Kleiter I, Hellwig K, Tumani H, Zettl UK (2014). Usage, safety and efficacy of repeated intrathecal steroid administration in progressive multiple sclerosis. www.ms-society.org.
114. Kojima K, Berger T, Lassmann H, et al. (1994). Experimental autoimmune panencephalitis and uveoretinitis transferred to the Lewis rat by T lymphocytes specific for the S100 beta molecule, a calcium binding protein of astroglia. *J Exp Med* 180(3): 817–829.
115. Kotani N, Kishikata T, Hashimoto H, et al. (2000). Intrathecal methylprednisolone for intractable postherpetic neuralgia. *N Engl J Med* 343(21): 1514–1519.
116. Krapf H, Morrissey S P, Zenker O, et al. (2005). Effect of mitoxantrone on MRI in progressive MS: results of the MIMS trial. *Neurology* 65(5): 690–695.
117. Krentz H. *Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin* (Berichte aus der Statistik). Aachen: Shaker.
118. Kriesel J D, Sibley W A (2005). The case for rhinoviruses in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mult Scler* 11(1): 1–4.
119. Kuhle J, Leppert D, Petzold A, et al. (2011). Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology* 76(14): 1206–1213.
120. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, et al. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125(Pt 10): 2202–2212.
121. KURTZKE J F (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33(11): 1444–1452.
122. Kuwano R, Usui H, Maeda T, et al. (1984). Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of cDNA to mRNA for S-100 protein of rat brain. *Nucleic Acids Res* 12(19): 7455–7465.
123. Lamers K J, van Engelen B G, Gabreëls F J, et al. (1995). Cerebrospinal neuron-specific enolase, S-100 and myelin basic protein in neurological disorders. *Acta Neurol Scand* 92(3): 247–251.
124. Lang H L E, Jacobsen H, Ikemizu S, et al. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 3(10): 940–943.
125. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, et al. (1997). Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 3(2): 133–136.
126. Lavedan C, Buchholtz S, Nussbaum R L, et al. (2002). A mutation in the human neurofilament M gene in Parkinson's disease that suggests a role for the cytoskeleton in neuronal degeneration. *Neurosci Lett* 322(1): 57–61.
127. Lee M K, Cleveland D W (1996). Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19: 187–217.
128. Leussink V I, Jung S, Merschdorf U, et al. (2001). High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 58(1): 91–97.
129. Lew-Starowicz M, Rola R (2013). Prevalence of Sexual Dysfunctions Among Women with Multiple Sclerosis. *Sex Disabil* 31(2): 141–153.
130. Lim E T, Petzold A, Leary S M, et al. (2004). Serum S100B in primary progressive multiple sclerosis patients treated with interferon-beta-1a. *J Negat Results Biomed* 3: 4.
131. Lublin F D, Reingold S C (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46(4): 907–911.
132. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, et al. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47(6): 707–717.

133. Luckey D, Bastakoty D, Mangalam A K (2011). Role of HLA class II genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: studies using HLA transgenic mice. *J Autoimmun* 37(2): 122–128.
134. Lukas C, Bellenberg B, Hahn H K, et al. (2009). Benefit of repetitive intrathecal triamcinolone acetonide therapy in predominantly spinal multiple sclerosis: prediction by upper spinal cord atrophy. *Ther Adv Neurol Disord* 2(6): 42–49.
135. Mancuso R, Saresella M, Hernis A, et al. (2012). JC virus detection and JC virus-specific immunity in natalizumab-treated Multiple Sclerosis patients. *J Transl Med* 10: 248.
136. Martin R, McFarland H F, McFarlin D E (1992). Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10: 153–187.
137. Martinelli V, Rocca M A, Annovazzi P, et al. (2009). A short-term randomized MRI study of high-dose oral vs intravenous methylprednisolone in MS. *Neurology* 73(22): 1842–1848.
138. Martola J, Bergström J, Fredrikson S, et al. (2010). A longitudinal observational study of brain atrophy rate reflecting four decades of multiple sclerosis: a comparison of serial 1D, 2D, and volumetric measurements from MRI images. *Neuroradiology* 52(2): 109–117.
139. Massaro A R, Michetti F, Laudisio A, et al. (1985). Myelin basic protein and S-100 antigen in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis in the acute phase. *Ital J Neurol Sci* 6(1): 53–56.
140. Mayer M (1999). Essential fatty acids and related molecular and cellular mechanisms in multiple sclerosis: new looks at old concepts. *Folia Biol (Praha)* 45(4): 133–141.
141. McDonald W I, Compston A, Edan G, et al. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50(1): 121–127.
142. Milligan N M, Newcombe R, Compston D A (1987). A double-blind controlled trial of high dose methylprednisolone in patients with multiple sclerosis: 1. Clinical effects. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 50(5): 511–516.
143. Mito T, Becker L E (1993). Developmental changes of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein in the brain in Down syndrome. *Exp Neurol* 120(2): 170–176.
144. Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung H-P, et al. (2010). Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 92(3): 386–404.
145. Mohr D C, Hart S L, Julian L, et al. (2004). Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ* 328(7442): 731.
146. Mokuno K, Kato K, Kawai K, et al. (1983). Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J Neurol Sci* 60(3): 443–451.
147. Moore B W (1965). A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19(6): 739–744.
148. Mrak R E, Sheng J G, Griffin W S (1995). Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum Pathol* 26(8): 816–823.
149. Murphy A, Breen K C, Long A, et al. (1993). Neurofilament expression in human T lymphocytes. *Immunology* 79(1): 167–170.
150. Nelson D A, Landau W M (2001). Intraspinal steroids: history, efficacy, accidentality, and controversy with review of United States Food and Drug Administration reports. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 70(4): 433–443.
151. Nelson D A, Vates T S, Thomas R B (1973). Complications from intrathecal steroid therapy in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 49(2): 176–188.

152. Nguyen K B, McCombe P A, Pender M P (1997). Increased apoptosis of T lymphocytes and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(1): 58–69.
153. Nixon R A (1993). The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol* 3(1): 29–38.
154. Norgren N, Rosengren L, Stigbrand T (2003). Elevated neurofilament levels in neurological diseases. *Brain Res* 987(1): 25–31.
155. Norgren N, Sundström P, Svenningsson A, et al. (2004). Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology* 63(9): 1586–1590.
156. Ojasoo T, Doré J C, Gilbert J, et al. (1988). Binding of steroids to the progesterone and glucocorticoid receptors analyzed by correspondence analysis. *J Med Chem* 31(6): 1160–1169.
157. Oksenberg J R, Baranzini S E, Barcellos L F, et al. (2001). Multiple sclerosis: genomic rewards. *J Neuroimmunol* 113(2): 171–184.
158. Oliveri R L, Sibilio G, Valentino P, et al. (1998). Pulsed methylprednisolone induces a reversible impairment of memory in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 97(6): 366–369.
159. Oliveri R L, Valentino P, Russo C, et al. (1998). Randomized trial comparing two different high doses of methylprednisolone in MS: a clinical and MRI study. *Neurology* 50(6): 1833–1836.
160. Orchinik M, Murray T F, Moore F L (1991). A corticosteroid receptor in neuronal membranes. *Science* 252(5014): 1848–1851.
161. Otto M, Stein H, Szudra A, et al. (1997). S-100 protein concentration in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 244(9): 566–570.
162. Owens G P, Kraus H, Burgoon M P, et al. (1998). Restricted use of VH4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Ann Neurol* 43(2): 236–243.
163. Panitch H, Goodin D S, Francis G, et al. (2002). Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial. *Neurology* 59(10): 1496–1506.
164. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, et al. (2001). Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287(2): 321–332.
165. Petzold A (2005). Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 233(1-2): 183–198.
166. Petzold A, Eikelenboom M J, Gveric D, et al. (2002). Markers for different glial cell responses in multiple sclerosis: clinical and pathological correlations. *Brain* 125(Pt 7): 1462–1473.
167. Petzold A, Eikelenboom M J, Keir G, et al. (2005). Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 76(2): 206–211.
168. Petzold A, Keir G, Green A J E, et al. (2003). A specific ELISA for measuring neurofilament heavy chain phosphoforms. *J Immunol Methods* 278(1-2): 179–190.
169. Petzold A, Rejdak K, Belli A, et al. (2005). Axonal pathology in subarachnoid and intracerebral hemorrhage. *J Neurotrauma* 22(3): 407–414.
170. Petzold A, Rejdak K, Plant G T (2004). Axonal degeneration and inflammation in acute optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 75(8): 1178–1180.
171. Pinholt M, Frederiksen J L, Christiansen M (2006). The association between apolipoprotein E and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 13(6): 573–580.

172. Polman C H, O'Connor P W, Havrdova E, et al. (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354(9): 899–910.
173. Polman C H, Reingold S C, Banwell B, et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69(2): 292–302.
174. Polman C H, Reingold S C, Edan G, et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58(6): 840–846.
175. Poser C M, Paty D W, Scheinberg L, et al. (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13(3): 227–231.
176. Poser S, Raun N E, Poser W (1982). Age at onset, initial symptomatology and the course of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 66(3): 355–362.
177. Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, et al. (2004). Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci* 223(1): 47–51.
178. Ransohoff R M (2005). Natalizumab and PML. *Nat Neurosci* 8(10): 1275.
179. Rao M V, Houseweart M K, Williamson T L, et al. (1998). Neurofilament-dependent radial growth of motor axons and axonal organization of neurofilaments does not require the neurofilament heavy subunit (NF-H) or its phosphorylation. *J Cell Biol* 143(1): 171–181.
180. Reiber H (2003). Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Liquorfluß. In U. K. Zettl, R. Lehmitz, & E. Mix (Eds.), *Klinische Liquordiagnostik* (pp. 58–74). Berlin: Walter de Gruyter.
181. Rejdak K, Petzold A, Stelmasiak Z, et al. (2008). Cerebrospinal fluid brain specific proteins in relation to nitric oxide metabolites during relapse of multiple sclerosis. *Mult Scler* 14(1): 59–66.
182. Richter-Landsberg C (2000). The oligodendroglia cytoskeleton in health and disease. *J Neurosci Res* 59(1): 11–18.
183. Rieckmann P, Toyka K V, Bassetti C, et al. (2004). Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application. *J Neurol* 251(11): 1329–1339.
184. Río J, Tintoré M, Nos C, et al. (2005). Interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. An eight years experience in a specialist multiple sclerosis centre. *J Neurol* 252(7): 795–800.
185. Rohrbach E, Kappos L, Städt D (1988). Intrathecal versus oral corticosteroid therapy of spinal symptoms in multiple sclerosis: a double-blind controlled trial. *Neurology* 38(1): 256.
186. Ropper A H (2006). Selective treatment of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354(9): 965–967.
187. Rostasy K, Withut E, Pohl D, et al. (2005). Tau, phospho-tau, and S-100B in the cerebrospinal fluid of children with multiple sclerosis. *J Child Neurol* 20(10): 822–825.
188. Rouleau G A, Clark A W, Rooke K, et al. (1996). SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 39(1): 128–131.
189. Rudick R A, Fisher E, Lee J C, et al. (1999). Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology* 53(8): 1698–1704.
190. Rudick R A, Lee J-C, Nakamura K, et al. (2009). Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci* 282(1-2): 106–111.
191. Rudick R A, Stuart W H, Calabresi P A, et al. (2006). Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354(9): 911–923.

192. Sádaba M C, Tzartos J, Paíno C, et al. (2012). Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions. *J Neuroimmunol* 247(1-2): 86–94.
193. Sandberg-Wollheim M, Frank D, Goodwin T M, et al. (2005). Pregnancy outcomes during treatment with interferon beta-1a in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 65(6): 802–806.
194. Schapiro R T, Langer S L (1994). Symptomatic therapy of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 7(3): 229–233.
195. Schmidt J, Gold R, Schönrock L, et al. (2000). T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain* 123 (Pt 7): 1431–1441.
196. Schmidt R E, Beaudet L N, Plurad S B, et al. (1997). Axonal cytoskeletal pathology in aged and diabetic human sympathetic autonomic ganglia. *Brain Res* 769(2): 375–383.
197. Schmidt S (1998). S100B: Pathogenetische und pathophysiologische Bedeutung in der Neurologie. *Nervenarzt* 69(8): 639–646.
198. Schmied M, Breitschopf H, Gold R, et al. (1993). Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol* 143(2): 446–452.
199. Schneider A, Araújo G W, Trajkovic K, et al. (2004). Hyperphosphorylation and aggregation of tau in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem* 279(53): 55833–55839.
200. Schumacker G A, Beebe G, Kibler R F, et al. (1965). Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 122: 552–568.
201. Seidi O A, Sharief M K (2002). The expression of apoptosis-regulatory proteins in B lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 130(1-2): 202–210.
202. Shahani N, Brandt R (2002). Functions and malfunctions of the tau proteins. *Cell Mol Life Sci* 59(10): 1668–1680.
203. Sheng J G, Mrak R E, Rovnaghi C R, et al. (1996). Human brain S100 beta and S100 beta mRNA expression increases with age: pathogenic implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17(3): 359–363.
204. Shiee N, Bazin P-L, Zackowski K M, et al. (2012). Revisiting brain atrophy and its relationship to disability in multiple sclerosis. *PLoS ONE* 7(5): e37049.
205. Sola P, Mandrioli J, Simone A M, et al. (2011). Primary progressive versus relapsing-onset multiple sclerosis: presence and prognostic value of cerebrospinal fluid oligoclonal IgM. *Mult Scler* 17(3): 303–311.
206. Sorensen P S, Koch-Henriksen N, Ross C, et al. (2005). Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 65(1): 33–39.
207. Sorensen P S, Ross C, Clemmesen K M, et al. (2003). Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 362(9391): 1184–1191.
208. Sriram S, Stratton C W, Yao S, et al. (1999). Chlamydia pneumoniae infection of the central nervous system in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 46(1): 6–14.
209. Steinhoff B J, Tumani H, Otto M, et al. (1999). Cisternal S100 protein and neuron-specific enolase are elevated and site-specific markers in intractable temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 36(1): 75–82.
210. Steinman L (2003). Optic neuritis, a new variant of experimental encephalomyelitis, a durable model for all seasons, now in its seventieth year. *J Exp Med* 197(9): 1065–1071.
211. Sternberger L A, Sternberger N H (1983). Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 80(19): 6126–6130.

212. Su J H, Cummings B J, Cotman C W (1996). Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. I. Progressive changes in phosphorylation states of paired helical filaments and neurofilaments. *Brain Res* 739(1-2): 79–87.
213. Süssmuth S D, Reiber H, Tumani H (2001). Tau protein in cerebrospinal fluid (CSF): a blood-CSF barrier related evaluation in patients with various neurological diseases. *Neurosci Lett* 300(2): 95–98.
214. Suzuki F, Kato K, Kato T, et al. (1987). S-100 protein in clonal astrogloma cells is released by adrenocorticotrophic hormone and corticotropin-like intermediate-lobe peptide. *J Neurochem* 49(5): 1557–1563.
215. Svejgaard A (2008). The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics* 60(6): 275–286.
216. Swanton J K, Fernando K, Dalton C M, et al. (2006). Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 77(7): 830–833.
217. Swanton J K, Rovira A, Tintore M, et al. (2007). MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 6(8): 677–686.
218. Terzi M, Birinci A, Cetinkaya E, et al. (2007). Cerebrospinal fluid total tau protein levels in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 115(5): 325–330.
219. Teunissen C E, Khalil M (2012). Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler* 18(5): 552–556.
220. Thompson A J, Polman C H, Miller D H, et al. (1997). Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120 (Pt 6): 1085–1096.
221. Tintoré M, Rovira A, Martínez M J, et al. (2000). Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 21(4): 702–706.
222. Trapp B D, Peterson J, Ransohoff R M, et al. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338(5): 278–285.
223. Trinczek B, Biernat J, Baumann K, et al. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* 6(12): 1887–1902.
224. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, et al. (1993). Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem* 61(5): 1828–1834.
225. Waegh S M de, Lee V M, Brady S T (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell* 68(3): 451–463.
226. Wekerle H, Hohlfeld R (2003). Molecular mimicry in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 349(2): 185–186.
227. Wucherpfennig K W, Strominger J L (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80(5): 695–705.
228. Wyllie A H (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284(5756): 555–556.
229. Xu Z, Cork L C, Griffin J W, et al. (1993). Increased expression of neurofilament subunit NF-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73(1): 23–33.
230. Yousry T A, Major E O, Ryschkewitsch C, et al. (2006). Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 354(9): 924–933.

231. Zettl U K, Gold R, Toyka K V, et al. (1995). Intravenous glucocorticosteroid treatment augments apoptosis of inflammatory T cells in experimental autoimmune neuritis (EAN) of the Lewis rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 54(4): 540–547.
232. Zettl U K, Kuhlmann T, Brück W (1998). Bcl-2 expressing T lymphocytes in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24(3): 202–208.
233. Zettl U K, Mix E, Lehmitz R (2003). Klinische Liquordifferentialdiagnostik: Von der klinischen Diagnose zum Liquorbefund. In U. K. Zettl, R. Lehmitz, & E. Mix (Eds.), *Klinische Liquordiagnostik* (pp. 383–443). Berlin: Walter de Gruyter.
234. Zettl U K, Tumani H (2006). *Multiple 'Sklerose und Liquordiagnostik* . Massachusetts: Blackwell Publishing.
235. Zettl U K., Lehmitz R, Mix E (Eds.) (2003). *Klinische Liquordiagnostik* . Berlin: Walter de Gruyter.
236. Zettl UK (2004). Diagnostische Kriterien der Multiplen Sklerose – Aktuelle Aspekte. *psychoneuro* 30(7): 370–374.
237. Zivadinov R, Rudick R A, Masi R de, et al. (2001). Effects of IV methylprednisolone on brain atrophy in relapsing-remitting MS. *Neurology* 57(7): 1239–1247.
238. Züchner S, Vorgerd M, Sindern E, et al. (2004). The novel neurofilament light (NEFL) mutation Glu397Lys is associated with a clinically and morphologically heterogeneous type of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Neuromuscul Disord* 14(2): 147–157.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Symptomatik der MS.	1
Tabelle 2: Diagnosekriterien der MS.....	10
Tabelle 3: Zelluläre Mechanismen der Glukokortikosteroid induzierten Immunsuppression.....	18
Tabelle 4: Pathogenetische Prozesse der MS.	27
Tabelle 5: Molekulargenetische Eigenschaften der Neurofilament-Isoformen	28
Tabelle 6: Patienteneigenschaften	36
Tabelle 7: Vergleich der pro Therapiezyklus applizierten Gesamtdosis TCA zwischen den nach Anzahl der Applikationen getrennten Subgruppen	40
Tabelle 8: Nomenklatur der NfH Phosphoformen	41
Tabelle 9: NfH-Immunassay: Chemikalien und Hersteller.	42
Tabelle 10: NfH-Immunassay: Lösungen und ihre Zusammensetzung.	42
Tabelle 11: Differentialzytologie im Liquor cerebrospinalis	57
Tabelle 12: Klinische Parameter zu Beginn des Beobachtungszeitraumes	58
Tabelle 13: Beziehung der Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis und Parametern der Liquor-Basisdiagnostik am Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus.	69
Tabelle 14: Beziehung der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis zu Parametern der Liquor-Basisdiagnostik der Gesamtkohorte am Ausgangspunkt des ersten Therapiezyklus.....	71

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Stufenschema der Therapie der Multiplen Sklerose.....	11
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Patientenzahl der Gesamtkohorte.....	38
Abb. 3:	Darstellung des zyklischen TCA-Therapieschemas über den gesamten Beobachtungszeitraum sowie der Mess- und Applikationszeitpunkte	39
Abb. 4:	Algorithmus der Datenanalyse und Ergebnisdarstellung.	50
Abb. 5:	Zeitlicher Verlauf der Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis der Gesamtkohorte über den Zeitraum von 9 Monaten	52
Abb. 6:	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen des NfH im Liquor cerebrospinalis über 9 Monate der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen.....	53
Abb. 7:	Zeitlicher Verlauf der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis der gesamten Patientenkohorte innerhalb des 1. Therapiezyklus.	54
Abb. 8:	Verlauf der Konzentration des Protein-S100B im Liquor cerebrospinalis der Gesamtkohorte innerhalb des 1. Therapiezyklus.....	55
Abb. 9:	Zeitlicher Verlauf des EDSS der Gesamtkohorte während des ersten Behandlungszyklus.....	59
Abb. 10:	Zeitlicher Verlauf der mAS der Gesamtkohorte über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten	60
Abb. 11:	Zeitlicher Verlauf der mAS der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen über den Zeitraum von 9 Monaten	61
Abb. 12:	Zeitlicher Verlauf der Gehstrecke der Gesamtkohorte über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten	63
Abb. 13:	Zeitlicher Verlauf der Lebensqualität der Gesamtkohorte über den Beobachtungszeitraum von 9 Monaten	65
Abb. 14:	Zeitlicher Verlauf der Lebensqualität der nach Anzahl der TCA-Applikationen getrennten Subgruppen über den Zeitraum von 9 Monaten .	66
Abb. 15:	Zeitlicher Verlauf der Blasenfunktion der Gesamtpopulation über den Behandlungszeitraum von 9 Monaten	68
Abb. 16:	Zusammenhang zwischen der Konzentration des NfH im Liquor cerebrospinalis und dem IgM-Quotienten vor Beginn des ersten Therapiezyklus der Gesamtkohorte.....	70
Abb. 17:	Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins und des Gesamtproteins im Liquor cerebrospinalis vor Beginn des ersten Therapiezyklus der Gesamtkohorte.	72

- Abb. 18:** Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis und der mAS nach 3 Monaten zu Beginn des 2. Therapiezyklus der Gesamtkohorte..... 72
- Abb. 19:** Zusammenhang zwischen der Konzentration des Tau-Proteins im Liquor cerebrospinalis und dem EDSS nach 9 Monaten zu Beginn des 4. Therapiezyklus der Gesamtkohorte..... 73

7.3 Abkürzungsverzeichnis

BDNF	hirnstämmiger neurotropher Faktor
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Differenzierungskluster
CNTF	ciliärer neurotropher Faktor
CSF	engl. cerebrospinal fluid, Liquor cerebrospinalis
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded-Disability-Status-Scale
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FLIP	Fas-assoziiertes IL-1 konvertierendes enzyminhibitorisches Protein
GFAP	gliafibrilläres saures Protein
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie- stimulierender Faktor
HCL	Salzsäure
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IVIG	intravenöse Immunglobuline
IVMP	intravenöses Methylprednisolon
JC-Viren	John Cunningham-Polyomaviren
kDa	Kilodalton
KM	Kontrastmittel
MBP	Myelin-Basisches-Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
Na	Natrium
N-CAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
Nf	Neurofilament
NfH	Neurofilament schwere Kette
NfHp	NfH-Phosphoformen
NfL	Neurofilament leichte Kette
NfM	Neurofilament mittelschwere Kette
NO	Stickstoffradikale
NT-3	Neutrophin
OKB	oligoklonale Banden
ON	Optikusneuritis
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	Primär chronisch progrediente Multiple Sklerose
QA1b	Albumin-Quotient
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose
SPMS	sekundär chronisch progrediente Multiple Sklerose
TCA	Triamcinolonacetonid
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose induzierender Ligand

VCAM	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEP	visuell evozierte Potentiale
VLA	Very-Late-Antigen-4
ZNS	Zentralnervensystem

Publikationen

Paper

Abu-Mugheisib M, Tumani H, Petzold A, Kamin F, Winkelmann A, Koehler W, Hoffmann F, Benecke R, Zettl UK: Repeated intrathecal triamcinolone acetone application in multiple sclerosis patients: clinical aspects and effects on cerebrospinal fluid marker of astrocytic activation. In: Multiple Sclerosis 2009 (Vol 15), S. S144-S144.

Abu-Mugheisib, M, Petzold A, Grossmann A, Kamin F, Koehler W, Hoffmann F, Faiss J, H. Ringel I, Benecke R, Zettl U. K.: Influence of repeat intrathecal triamcinolone acetone application on cerebrospinal fluid and serum biomarkers in multiple sclerosis patients. In: Multiple Sclerosis 2006 (Vol 12), S. S103-S103.

Poster

Abu-Mugheisib M, Tumani H, Kamin F, Apel A, Koehler W, Hoffmann F, Benecke R, Zettl U.K.: Effects on cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis patients after repeated intrathecal triamcinolone acetone application. Posterpräsentation DGN 2007

Abu-Mugheisib M, Tumani H, Kamin F, Apel A, Koehler W, Hoffmann F, Benecke R, Zettl U.K.: Effects on cerebrospinal fluid biomarkers of immunological activation in multiple sclerosis patients after repeated intrathecal triamcinolone acetone application. Posterpräsentation ENS 2007

Abu-Mugheisib M, Tumani H, Kamin F, Apel A, Koehler W, Hoffmann F, Benecke R, Zettl U.K.: Influence of repeated intrathecal triamcinolone acetone application on cerebrospinal fluid biomarkers of axonal damage and glial activity in multiple sclerosis patients. Posterpräsentation ENS 2007

Abu-Mugheisib M, Kamin F, Voigt K, Koehler W, Weitz F, Hoffmann F, Benecke R, Zettl U.K.:
Effekt wiederholter intrathekaler Triamcinolonacetone - Gabe auf oligoklonale IgG Banden und intrathekale Immunglobulinsynthese im Liquor cerebrospinalis von Multiple Sklerose Patienten. Posterpräsentation Ostseesymposium 2008

Abu-Mugheisib M, Tumani H, Petzold A, Kamin F, Winkelmann A, Koehler W, Hoffmann F, Benecke R, Zettl U.K.: Effects of repeated intrathecal triamcinolone acetone application on cerebrospinal fluid biomarkers of axonal damage and glial activity in multiple sclerosis patients. Posterpräsentation AAN 2009

Thesen

1. Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), welche mit Demyelinisierung, neuronaler Degeneration und konsekutiver Behinderung einhergeht. Die klinisch-neurologische Symptomatik der MS ist variabel. Ein führendes Symptom ist die Spastik.
2. Unter strenger Indikationsstellung werden ausgewählten Patienten mit vorwiegend spinaler Symptomatik intrathekal Glukokortikosteroide appliziert. Mehrere neuere Untersuchungen bestätigen die Effizienz und Sicherheit dieser Therapiemethode, wobei die Indikation zur spasmolytischen Wirkung im Vordergrund steht.
3. Einige in vitro Untersuchungen ergeben Hinweise auf potentielle neurotoxische Effekte der Glukokortikosteroide, die durch direkte und indirekte Auswirkungen auf den Stoffwechsel von Neuronen ausgelöst werden. Eine genaue Überprüfung der Sicherheit und Effektivität der symptomatischen Therapie mittels intrathekal applizierter Glukokortikosteroide über einen längeren Beobachtungszeitraum ist notwendig und bildet den Hauptansatz der vorliegenden Arbeit.
4. Erstmals werden prospektiv 54 Patienten mit klinisch und paraklinisch gesicherter MS über einen Therapiezeitraum von bis zu 9 Monaten beobachtet. Das retardiert freigesetzte Glukokortikosteroid, Triamcinolon acetonid (TCA) wird zyklisch alle 3 Monate intrathekal appliziert, sodass sich ein Beobachtungszeitraum von 4 Therapiezyklen ergibt. Ein Therapiezyklus besteht aus 3 bis 5 Applikationen des TCA jeden zweiten Tag.
5. Im Rahmen der therapeutischen Liquorpunktionen wird Liquor cerebrospinalis (cerebrospinal fluid, CSF) zur Bestimmung spezifischer Biomarker gewonnen. Die schwere Kette des Neurofilamentes (NfH) und das Tau-Protein dienen als Biomarker für axonalen Schaden. Das Protein S-100B ist ein Biomarker für die Astrozytenaktivierung. Konzentrationsänderungen dieser Biomarker im CSF dienen als Indikator für pathogenetische Prozesse im Hirnparenchym.

6. Das primäre Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der Biomarker im CSF. Als sekundäre Endpunkte werden neben soziodemographischen Parametern klinische Einflussgrößen wie die klinische Verlaufsform der MS, die Expanded-Disability-Status-Scale (EDSS), die modifizierte Ashworth-Scale (mAS), die Gehstrecke, der 25-Fuß-Test, die Blasenfunktion und die Lebensqualität untersucht.
7. Die Resultate zeigen einen tendenziellen Anstieg der Konzentration des NfH im CSF zwischen den ersten drei aufeinander folgenden TCA-Applikationen innerhalb der 4 Therapiezyklen, wobei dies Patienten betrifft, die eine niedrigere Dosis des TCA erhalten haben. Nach 6 und 9 Monaten überschritten die Mittelwerte der NfH-Konzentration im CSF den Referenzwert von 0,73 ng/ml. Außerdem können in späteren Therapiezyklen im Vergleich zum Ausgangswert zu Beginn des 1. Therapiezyklus signifikant erhöhte Konzentrationen des NfH im CSF festgestellt werden. Ein verzögerter Effekt des TCA auf die Integrität des axonalen Kompartiments der Neurone kann bei einem Teil der Patienten diskutiert werden.
8. Die Konzentration des Tau-Proteins im CSF steigt innerhalb des ersten Therapiezyklus signifikant an. In den Folgezyklen sind keine signifikanten Konzentrationsänderungen des Biomarkers zu verzeichnen. Unspezifische Wechselwirkungen der lipophilen Glukokortikosteroid-Moleküle mit Zellmembranen von Oligodendrozyten und Neuronen könnten zu einer passageren Konzentrationserhöhung des Tau-Proteins im CSF führen. Da sich die Konzentration des NfH parallel dazu nicht signifikant erhöht, ist ein therapieinduzierter Schaden des axonalen Kompartimentes unwahrscheinlich.
9. Während des ersten Behandlungszyklus zeigt sich eine Reduktion der Konzentration des Protein S-100B im CSF. In den Folgezyklen sind keine signifikanten Änderungen der Konzentration dieses Biomarkers nachweisbar. Möglicherweise führt die intrathekale Applikation von TCA initial durch immunsuppressive Effekte zu einer verminderten Aktivierung von Mikroglia, wodurch ein Absinken der Konzentration dieses Biomarkers im CSF bedingt sein könnte.

10. Zwischen aufeinander folgenden Messzeitpunkten des ersten Therapiezyklus und innerhalb der Folgezyklen finden sich eine signifikante Reduktion der mAS sowie eine Erhöhung der Gehstrecke. Die EDSS reduziert sich im Verlauf des ersten Therapiezyklus signifikant. Der Effekt auf die genannten klinischen Parameter bleibt im Vergleich von mehreren Messzeitpunkten späterer Therapiezyklen mit dem Ausgangswert vor Beginn der Therapie erhalten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen bessert sich die Lebensqualität der MS-Patienten während des gesamten Behandlungszeitraumes signifikant.
11. Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die Effektivität der Therapiemethode und bieten keinen eindeutigen Anhalt für eine akute oder subakute therapieinduzierte Schädigung des Hirnparenchyms innerhalb des Beobachtungszeitraumes.
12. Der Evidenzgrad der vorliegenden Untersuchung ist aufgrund eines fehlenden Placeboarms eingeschränkt. Größer angelegte doppelblinde, Placebo kontrollierte Studien sind notwendig, um die Sicherheit und Effektivität dieser Therapiemethode zu unterstreichen und verzögerte neurotoxische Effekte des TCA vollständig auszuschließen.
13. Darüber hinaus muss die Rolle der spezifischen Biomarker hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Monitoring des Krankheitsverlaufes der MS weiter beleuchtet werden.
14. Aktuell sollte diese Therapiemethode unter sorgfältiger Indikationsstellung und einer Patientenaufklärung („off-label“-use Situation) ausschließlich von erfahrenen Neurologen in Therapiezentren durchgeführt werden.

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema Einfluss wiederholter intrathekalen Applikationen von Triamcinolon acetonid auf NfH, Tau-Protein und Protein S-100B im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit Multipler Sklerose selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Brandenburg, den 18.12.2014

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich hiermit ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Zettl, Leiter der Forschungsgruppe Neuroimmunologie der Universität Rostock, bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen und mir mit seinem wissenschaftlichen Rat hilfreich zur Seite stand.

Herrn Dr. med. Mazen Abu-Mugheisib danke ich besonders für die zuverlässige und komplikationslose Betreuung und seine ständige Hilfsbereitschaft.

Ein ganz spezieller Dank für die Zusammenarbeit geht an den CA der Klinik für Neurologie des Martha-Maria Krankenhauses Halle, Herrn Dr. med. F. Hoffmann und an den CA der Klinik für Neurologie des SKH Hubertusburg, Herrn W. Köhler. Ich bedanke mich sehr für die Rekrutierung der Patienten und für die reibungslose logistische Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Petzold, der es mir ermöglichte, im Liquorlabor der Universität London unter seiner Anleitung experimentelle Messungen durchzuführen und im Nachhinein bei besonderen Fragestellungen hilfsbereit zu Verfügung stand.

Meiner Tante Frau CÄ Dr. med. Astrid Francke danke ich ganz herzlich für die genaue, zeitaufwändige Korrekturlesung der Arbeit.

Bei meiner lieben Frau Blanda möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.