

Diplomarbeit

**Untersuchung der Interaktionen von Astrozyten in
einem Tiermodell der progredienten Multiplen Sklerose**

eingereicht von

Klaus Altenberger

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Neurologie

Klinischen Abteilung für allgemeine Neurologie

unter der Anleitung von Assoz. Prof.-Doz. Dr.med.univ. Dr.rer.nat.

Sonja Hochmeister

und

Sen.Scientist Dr.scient.med.

Michaela Tanja Haindl, BSc MSc

Graz, 10.06.2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 10.06.2024

Klaus Altenberger eh.

Danksagungen

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um all denjenigen meinen herzlichen Dank auszusprechen, die mich während der Erstellung dieser Diplomarbeit und des Studiums unterstützt und begleitet haben.

Einen außerordentlichen Dank gebührt meinen zwei Betreuerinnen, Assoz. Prof. DDr. Sonja Hochmeister und Sen.Scientist Dr. sci. med. Michaela Tanja Haindl Msc. Bsc., für ihre wertvolle Unterstützung, die zahlreichen hilfreichen Ratschläge und die motivierende Begleitung durch das gesamte Projekt. Ohne ihre Geduld und ihr Engagement wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Freunden, Studienkolleg*innen und meiner Freundin Yvonne, die mich stets motiviert und in schwierigen Zeiten ermutigt haben. Ihre Unterstützung und Hilfestellung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir stets den Rücken gestärkt und mir den Raum und die Möglichkeiten gegeben haben, mich vollkommen auf mein Studium zu konzentrieren.

Zusammenfassung

Einleitung

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste neurologische Ursache für nicht-traumatische Behinderungen bei jungen Erwachsenen. Wie bei anderen autoimmun vermittelten Erkrankungen gibt es geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz, des Verlaufs und der Schwere der Symptome. Die Rolle der Astrozyten im Krankheitsverlauf von MS ist nicht sehr gut verstanden, ebenso wie die Auswirkungen der Vitamin-D-(VD-) Supplementation auf zellulärer Ebene. Basierend auf einem Tiermodell der kortikalen Demyelinisierung, welche ein charakteristisches Merkmal der progredienten MS darstellt, untersucht diese Diplomarbeit die Interaktionen von Astrozyten bei weiblichen und männlichen Ratten.

Methoden

Die Arbeit basiert auf dem Tiermodell von Ücal et al., 2017 und simuliert eine großflächige, kortikale Demyelinisierung. Die untersuchten Ratten wurden in 4 Gruppen eingeteilt. Kontrollgruppen bestanden aus männlichen und weiblichen Ratten, die das beschriebene Tiermodell durchliefen und mit Standard-Rattenfutter gefüttert wurden. Die experimentellen Gruppen bestanden aus männlichen und weiblichen Ratten, die ab dem Alter von 3 Wochen einmal wöchentlich 400 IE VD erhielten, bis zum Ende des Experiments. Am 15. Tag, bei maximaler kortikaler Demyelinisierung, wurden die Ratten euthanasiert und die Gehirne wurden histologisch mittels Immunhistochemie auf das Auftreten verschiedener Astrozyten-Phänotypen, das Ausmaß der Mikroglia-Aktivierung, die neuronale Erhaltung und den Verlust des kortikalen Myelins analysiert.

Ergebnis

Die Aktivierung der Astrozyten unterschied sich je nach Geschlecht und VD-Behandlung. Insgesamt zeigten die VD-behandelten Gruppen eine höhere Aktivierung der Astrozyten, wobei die Aktivierung des neuroprotektiven A2-Phänotyps im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant erhöht war. Gleichzeitig wurde der proinflammatorische A1-Phänotyp in den VD-behandelten Gruppen reduziert. Männliche Gruppen zeigten generell eine stärkere Aktivierung der Astrozyten im Vergleich zu weiblichen Gruppen.

Diskussion

Insgesamt zeigen die Ergebnisse geschlechts- und behandlungsspezifische Unterschiede in den histopathologischen Veränderungen im Kortex sowie in der Aktivierung von Astrozyten, Mikroglia und dem Erhalt der Neuronen im Läsionsmodell. Die verstärkte Aktivierung des neuroprotektiven A2-Phänotyps in VD-behandelten Gruppen korreliert mit früheren Forschungsergebnissen, die VD neuroprotektive und immunmodulierende Eigenschaften zuschreiben. Die Reduktion des proinflammatorischen A1-Phänotyps unter VD deutet darauf hin, dass VD möglicherweise die Astrozyten-Phänotypisierung zugunsten neuronaler Gesundheit und Überleben fördert. Trotz der positiven Effekte von VD sollte der Serumspiegel bei Patienten mit VD-Supplementation regelmäßig überwacht werden, um Überdosierungen zu vermeiden. Es besteht noch Bedarf an weiterer Forschung zur therapeutischen Anwendung von VD und seinen geschlechtsspezifischen Auswirkungen.

Abstract

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is the most common neurological cause of non-traumatic disability in young adults. As in other autoimmune mediated diseases there are sex specific differences regarding incidence, progression and severity of symptoms. The role of astrocytes in MS disease progression is not very well understood, as well as the impact of Vitamin D (VD) supplementation on a cellular level. Based on an animal model of cortical demyelination, which is a hallmark of progressive MS, this diploma thesis investigates the interactions of astrocytes with or without VD supplementation in both female and male rats.

Methods/Model

The animal model is described in detail by Ücal et al, 2017 and simulates a widespread cortical inflammatory demyelination. The investigated rats were divided into 4 groups. Control groups consisted of male and female rats undergoing the animal model as described and were fed standard rodent food. The experimental groups consisted of male and female rats receiving 400IU VD once a week from age 3 weeks on until the end of the experiment. On day 15, at peak disease with maximum cortical demyelination, rats were sacrificed and brains were histologically analysed by immunohistochemistry for the occurrence of different astrocyte phenotypes, the extent of microglia activation, neuronal preservation and loss of cortical myelin.

Result

The activation of astrocytes differed depending on sex and VD-treatment. Overall, VD-treated groups exhibited higher astrocyte activation, with the activation of the neuroprotective A2 phenotype significantly increased compared to untreated animals. Simultaneously, the proinflammatory A1 phenotype was suppressed in the VD-treated groups. Male groups generally displayed an overall stronger astrocyte activation compared to female groups.

Discussion

Our results demonstrate gender- and treatment-specific differences in the activation of astrocytes and microglia as well as the cortical preservation of neurons in the lesion model. The enhanced activation of the neuroprotective A2 phenotype in VD-supplemented groups correlates with previous research findings attributing neuroprotective and

immunomodulatory properties to VD. The reduction of the proinflammatory A1 phenotype under VD suggests that VD may promote astrocyte phenotyping in favour of neuronal health and survival. Despite the positive effects of VD, serum levels should be regularly monitored in patients receiving VD supplementation to avoid overdosing. Further research is needed on the therapeutic application of VD and its sex-specific effects.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	3
Zusammenfassung	4
Abstract.....	6
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1. Einleitung	13
2. Multiple Sklerose	14
2.1 Definition und Pathogenese	14
2.2 Klinische Muster und Verlauf der MS.....	16
2.3 Diagnose	18
2.4 Einfluss des Geschlechts	19
2.5 Epidemiologie	21
2.6 Behandlung	21
2.7 Tiermodelle der Multiplen Sklerose	24
2.7.1 EAE.....	25
2.7.2 TMEV	25
2.7.3 CPZ.....	26
2.7.4 Das spezielle kortikale Tiermodell nach Ücal	26
2.8 Vitamin D und Multiple Sklerose	27
2.8.1 Allgemeines	27
2.8.2 Vitamin D bei RRMS und PMS	27
2.8.3 Widersprüche und Diskussion	29
2.9 Die Rolle der Astrozyten in der Multiplen Sklerose.....	29
2.9.1 Pathophysiologische Rolle der Astrozyten	29

2.9.2	Astrozyten Phänotypen	30
2.10	Forschungsziel dieser Diplomarbeit.....	31
3.	Material und Methoden	32
3.1	Kortikales Läsionsmodell nach Üçal et al.....	32
3.2	Immunhistochemische Färbemethoden.....	33
3.3	Histopathologische Evaluierung	34
3.4	Statistische Analysen	35
4.	Resultate	36
4.1	Histopathologische Veränderungen im Kortex.....	36
4.2	Quantifizierung der Veränderungen im Kortex	39
4.2.1	Astrozytenphänotypen.....	39
4.2.2	Darstellung kortikaler Veränderungen von Myelin, Mikroglia und Neurone im Läsionsmodell.....	42
5.	Diskussion	45
5.1	Limitationen	48
5.2	Ausblick und weiterführende Forschung.....	48
6.	Referenzen.....	50
7.	Anhang	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Doppelmarkierung der Md15 und Wd15.	37
Abbildung 2: Doppelmarkierung bei VDMd15 und VDWd15.	38
Abbildung 3: A2 bzw. A1 Phänotypenverlauf in den jeweiligen Gruppen.....	40
Abbildung 4: Boxplotdarstellung der Astrozytenaktivierung je Gruppe.	42
Abbildung 5: Boxplot-Darstellung der unterschiedlichen Gruppen der Marker PLP, Iba1 und NeuN	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien nach McDonald (2017)	18
Tabelle 2: Basis- und Eskalationstherapie bei RRMS und MS-Erstereignis	23
Tabelle 3: Verlaufsmodifizierende Therapie bei SPMS und PPMS	24
Tabelle 4: Anzahl der verwendeten Versuchstiere in den jeweiligen Gruppen	33
Tabelle 5: Unterschiedsanalyse der Astrozytenphänotypen mittels Mann-Whitney-U-Test.	41
Tabelle 6: Deskriptive Statistik - Median und IQR der jeweiligen Gruppen.	41
Tabelle 7: Unterschiedsanalyse der Gruppen (PLP, Iba, NeuN) mittels Mann-Whitney-U-Test.	44
Tabelle 8: Einzelne Arbeitsschritte der Immunhistochemischen Färbung.....	53
Tabelle 9: Liste der Primärantikörper.....	54

Abkürzungsverzeichnis

MS	Multiple Sklerose
ZNS	Zentralnervensystem
VD	Vitamin D
CD	Cluster of Differentiation
Th	T-Helferzellen
RRMS	schubförmige remittierende Multiple Sklerose
PPMS	primär progressive Multiple Sklerose
SPMS	Sekundär progressive Multiple Sklerose
MRT	Magnetresonanztomographie
TNF	Tumor Nekrose Faktor Alpha
IL	Interleukin
NK	Natürliche Killerzellen
IFN	Interferon
DMT	Disease-Modifying-Therapies
HET	High-Efficacy-Therapies
S1P	Sphingosin-1-Phosphat-Inhibitor
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
TMEV	Theiler-Murin-Enzephalomyelitis-Virus-induzierte Demyelinisierung
CPZ	Cuprizone-induzierte Demyelinisierung
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein
TLR	Toll-Like-Rezeptoren
MHC-II	major histocompatibility complex class II
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformalaldehyd
GFAP	glial fibrillary acidic protein
S100A10	S100 calcium-binding protein A10
C3d	Komplementfaktor 3
PLP	myelin proteolipid protein

NeuN	neuronal nuclear protein
Iba1	Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
FCS	Fetal Calf Serum
DAB	Diaminobenzidin
IHC	Immunhistochemie
Md15	Gruppenbezeichnung männlich Tag 15
VDMd15	Gruppenbezeichnung Vitamin-D männlich Tag 15
Wd15	Gruppenbezeichnung weiblich Tag 15
VDWd15	Gruppenbezeichnung Vitamin-D weiblich Tag 15
MHC	männliche Kontrollgruppe
WHC	weibliche Kontrollgruppe
BBB	Blood-Brain-Barrier
Abb	Abbildung
ZSF	zerebrospinale Flüssigkeit
IE	Internationale Einheit

In dieser Arbeit werden aus Gründen der Lesbarkeit nur die männliche Form von Patienten verwendet. **Es sind jedoch immer beide Geschlechter gemeint.**

1. Einleitung

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische neurogenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und eine der häufigsten Ursachen für eine nicht-traumatische Behinderung bei jungen Erwachsenen (1, 2). Charakterisiert ist die Krankheit durch eine T-Zell medierte Demyelinisierung der Myelinscheiden, was in weiterer Folge zu einer axonalen Degeneration und einer Zerstörung von Nervengewebe führt. Bei MS finden wir unterschiedlichste Ausprägungen und Verlaufsformen, somit zeigt sich die Klinik oft sehr heterogen. Typischerweise erkranken die meisten PatientInnen zunächst an einer schubhaften MS; Schübe von Krankheitssymptomen wechseln sich mit symptomfreien Intervallen ab (schubförmige oder relapsing-remitting MS). In dieser Phase kommt es zur Bildung von entzündlichen Herden (MS Plaques) in verschiedenen Bereich des Gehirns und Rückenmarks, nach Abklingen der Entzündung bessern sich die Symptome wieder. Nach langjähriger Erkrankungsdauer kann es allerdings zu einer progredienten Krankheitsphase kommen, in der die PatientInnen eine langsame stetige Verschlechterung neurologischer Funktionen erleiden (progrediente MS). In dieser Phase spielt Entzündung kaum mehr eine Rolle, sondern ein neurodegenerativer Prozess hat eingesetzt. Nur ein geringer Teil der MS PatientInnen erlebt eine solche Verlaufsform schon ab Beginn der Erkrankung (primär progredienten MS).

Die Prävalenz sowie die Inzidenz sind weltweit steigend, was sich einerseits durch die verbesserte Behandlung und damit längere Lebenszeit und andererseits durch die frühere und bessere Diagnostik begründen lässt. Dabei sind vor allem Frauen im Vergleich zu Männern in einem Verhältnis von 2-3:1 betroffen, wobei sich der vermehrte Frauenanteil generell bei den meisten Autoimmunerkrankungen beobachten lässt. Hingegen zeigen betroffene Männer häufiger einen schwereren und progredienten Verlauf.

Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist bis dato ungeklärt. Bisher konnten jedoch viele Studien einen starken genetischen Faktor nachweisen. Darüber hinaus scheinen verschiedene Umweltfaktoren und deren Interaktionen miteinander einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu haben. Faktoren wie der zu niedrige Vitamin D (VD) Status scheinen beispielsweise eine starke Assoziation zur Manifestation einer MS zu haben.

Die im Verhältnis noch weniger erforschten zellulären Mechanismen der progredienten MS sind noch ein großes Gebiet für weitere Forschung. Das Verständnis dieser

pathophysiologischen Vorgänge auf zellulärer Basis ist jedoch Grundvoraussetzung, um wirksame Strategien gegen die chronische Neurodegeneration zu entwickeln. Ein besseres Verständnis der zellulär- neuronalen Prozesse für jene Mechanismen, wie die Interaktionen zwischen Gliazellen und deren Reaktionen auf externe sowie interne Signale, könnte in Zukunft neue Therapieoptionen bieten. In den letzten Jahren gab es zunehmend mehr Hinweise, dass Astrozyten eine entscheidende pathogenetische Rolle spielen und für die Demyelinisierung und Remyelinisierung zumindest mitverantwortlich sind. Der Fokus dieser Diplomarbeit richtet sich daher auf die Erforschung von Interaktionen von Astrozyten in De- und Remyelinisierung mit bzw. ohne Supplementierung mit VD mittels immunhistochemischer Methoden in einem speziellen Tiermodell der späten Phase der MS.

2. Multiple Sklerose

2.1 Definition und Pathogenese

MS ist eine chronische immun-medierte entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist gekennzeichnet durch eine T-Zell medierte Demyelinisierung der schützenden Myelinschicht, die die Axone umgeben. „Nackte“, ungeschützte Axone leiten Nervenimpulse nur fehlerhaft weiter, was die Symptome im Schub erklärt. Durch einen Wiederaufbau der Myelinscheide, der Remyelinisierung, kommt es zu einer Rückbildung der Symptome. Vorallem nach längerer Krankheitsdauer kommt es allerdings auch zur axonalen Degeneration und letztlich irreversiblen Funktionsverlust.

Zurzeit besteht kein Zweifel daran, dass immun-medierte Prozesse und die Inflammation entscheidend sind für die Pathogenese der MS. Ob die pathophysiologische Kaskade der MS primär durch die Inflammation oder sekundär durch ein noch nicht entdecktes infektiöses Agens bzw. eine intrinsische ZNS-Degeneration ausgelöst wird, ist noch nicht geklärt (3).

Bei anderen Autoimmunerkrankungen konnte eine Assoziation zwischen spezifischen Auto-Antigenen bzw. der Präsenz oder Abwesenheit eines infektiösen Agens hergestellt werden. Dies konnte bei Patienten mit MS noch nicht bestätigt werden. Bakterielle oder virale Antigene, besonders das Epstein-Barr-Virus werden bei MS Patienten immer wieder in Publikationen diskutiert, jedoch ohne eindeutige Resultate. Derzeit fehlt noch der

wissenschaftliche Beweis, der die Rolle von aktiven Autoantigenen und Antikörper für die Entzündung und Demyelinisierung unterstützen würde (4).

Momentan wird vermutet, dass durch einen noch unbekanntem Trigger in der Peripherie aktivierte autoreaktive T-Zellen die gestörte Blut-Hirn Schranke (BBB; blood-brain barrier) durchdringen, das Gehirn und Rückenmark infiltrieren und Myelin-Proteine attackieren.

Cluster of Differentiation, abgekürzt CD, sind spezifische Oberflächenproteine, die auf verschiedenen Zelltypen vorkommen und mit einer einzigartigen Nummer versehen sind. Diese CD-Nomenklatur ist ein wichtiges Tool, um immunzelluläre Prozesse näher zu erforschen, so hat sich auch gezeigt, dass CD4⁺T-Lymphozyten und CD8⁺T-Zellen eine Schlüsselrolle in der MS-Progression spielen. In Läsionen und auch im Blutkreislauf wurden diese Immunzellen vermehrt gefunden. Studien haben zudem gezeigt, dass die Inhibierung von T-Helferzellen (Th1 und Th17) sowie die Erhöhung von zirkulierenden T-regulatorischen Zellen (Tregs) eine Suppression der Progression der MS bewirken können (5, 6). Die Hyperaktivität von Th1, als auch Th17 führt zur Ausschüttung eines hohen Spiegels von Interleukinen, was zum Untergang von Myelin-produzierenden Oligodendrozyten führt. Dies bewirkt direkte Myelin- bzw. Nervenschäden, die dann zu Läsionen im ZNS führen (6).

Ein direkter Verdacht, dass auch B-Lymphozyten in der Pathogenese von MS mitwirken, liefern histologische ZNS-Analysen von Betroffenen (7). Die anhaltende Proliferation von B-Lymphozyten, die Anti-Myelin-Antikörper produzieren, verursacht Schäden im Cortex und beschleunigen das Fortschreiten (8). Etwa 95% der MS-Patienten haben nachweisbare oligoklonale Immunglobulin-G (IgG)-Banden im Liquor. Zudem zeigen Ablagerungen von IgG in den Läsionen entscheidende Hinweise auf die Pathologie der MS (9).

Zusätzlich erhärtet sich der Verdacht, dass Gliazellen und vor allem Astrozyten und Mikroglia durch ihre proinflammatorischen und toxischen Phänotypen einen wesentlichen Beitrag liefern. Nach neuen Erkenntnissen haben Astrozyten einen aktiven Einfluss auf die Krankheitsentstehung und können je nach umgebendem, zellulärem Milieu protektiv oder toxisch auf das neuronale System wirken. Um die genauen zellulären Mechanismen zu Verstehen bedarf es aber weiterer intensiver Forschung.

2.2 Klinische Muster und Verlauf der MS

Die klinische Präsentation der MS ist sehr variabel und wird auch als Chamäleon bezeichnet. Sie ist gekennzeichnet durch Heterogenität in ihrem klinischem Erscheinungsbild, Verlaufsformen und Ausgängen (10). Es kann keine Vorhersage getroffen werden, wann Schübe auftreten bzw. wie schnell die Krankheit voranschreitet. Gehäuft sind Patienten zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr betroffen. Somit stellt MS die häufigste Ursache für eine nicht-traumatische Behinderung bei jungen Erwachsenen dar (11).

Patienten mit MS zeigen physische, sowie kognitive Beeinträchtigungen, die einen erheblichen negativen Effekt auf die Lebensqualität haben. MS präsentiert sich zu Beginn oft typisch mit unilateraler Optikusneuritis, fokalen sensorischen Störungen (wie Parästhesien oder Dysästhesien in den Extremitäten, Abdomen oder Brust), partieller Myelitis oder Hirnstammsymptomen (wie Doppelbildern oder einer bulbären Sprache). Zudem kann bei Betroffenen Ataxie, muskuläre Schwäche, Hyperreflexie, sensorische Defizite oder afferente Pupillen-Anomalien festgestellt werden (12).

Ein Rückfall oder Schub ist definiert als eine einzelne klinische Attacke mit Symptomen und objektiven Befunden, die von einem fokalen oder multifokalen entzündlichen demyelinisierenden Ereignis im ZNS ausgelöst wird. Dabei kann sich die Episode akut oder subakut entwickeln und muss mindestens 24 Stunden anhalten. Zusätzlich müssen Fieber und eine Infektion ausgeschlossen werden (12).

Der Verlauf der MS kann sich zwischen Patienten stark unterscheiden, dabei werden vorwiegend drei Ausprägungen differenziert.

Die häufigste Verlaufsform mit 85% ist die schubförmige remittierende MS (relapsing remitting multiple sclerosis; RRMS). Sie ist durch Episoden einer akuten Verschlechterung der neurologischen Funktionen (neue Symptome oder Verschlechterung der bestehenden Symptome) mit vollkommener oder partieller Erholung, bei fehlender offenkundiger Progression der Erkrankung gekennzeichnet. Die Frequenz und Intensität der Symptome können individuell ausgeprägt sein (10).

Die primär progressive MS (PPMS) ist wiederum seit Beginn durch eine ständige Verschlechterung der neurologischen Funktionen, ohne dazwischenliegende Remission

gekennzeichnet. Davon entwickeln 10-20% der MS Patienten diesen Phänotyp der Erkrankung ohne initialer RR-Phase (10).

Die sekundäre progressive MS (SPMS) wird als zweite Phase der RRMS bezeichnet, die sich erst nach Jahren oder sogar erst nach Jahrzehnten nach der Diagnosestellung der schubförmigen remittierenden MS manifestiert. Nach einem schubförmigen Verlauf der MS entwickelt sich eine stetige Progression der Erkrankung ohne definierte Remissionsperioden (10).

Zusätzlich ist das klinisch isolierte Syndrom definiert, das sich auf die erste Episode der Demyelinisierung im ZNS bezieht. Auch hier muss ein fokal neurologisches Defizit akut oder subakut auftreten und für mindestens 24 Std. persistieren (10). Das klinisch isolierte Syndrom kann sich bei weiterer Krankheitsaktivität zu einer definitiven MS weiterentwickeln.

2.3 Diagnose

MS ist in ihrer Erscheinung sehr variabel und diese Heterogenität überträgt sich auch auf die Symptome der Betroffenen. Zu differenzieren sind typische und atypische Symptome, wobei „typische“ häufig auftretende Störungen umfassen. Zu den typischen Symptomen zählt unter anderem Optikusneuritis, internukuläre Ophthalmoplegie, cerebrale Symptome sowie eine transverse Myelitis (13).

Um MS dann sicher zu diagnostizieren, ist die Kombination zwischen der klinischen Präsentation sowie die Bildgebung durch die Magnetresonanztomographie (MRT) entscheidend. Dabei werden die „2017 McDonald Kriterien“ für die Diagnose herangezogen, welche in Tabelle 1 veranschaulicht sind.

Tabelle 1: Diagnosekriterien nach McDonald (2017)

Anzahl klinischer Schübe	Anzahl objektivierbarer klinischer Manifestationen im MRT	weitere erforderliche Kriterien
Schubhaft-remittierende MS		
≥2	≥2	keine
≥2	1	Räumliche Dissemination ¹ nachgewiesen im MRT oder weiterer klinischer Schub
1	≥2	Zeitliche Dissemination ² nachgewiesen im MRT oder zweiter klinischer Schub oder ZSF ³ -spezifische oligoklonale Banden
1	1	Nachweis räumlicher Dissemination und zeitliche Dissemination im MRT oder zweiter klinischer Schub, oder Nachweis ZSF-spezifischer oligoklonaler Banden
Primäre progressive Multiple Sklerose		
1 Jahr Krankheitsprogression (retrospektiv oder prospektiv festgestellt), unabhängig von klinischen Rückfällen		

und zusätzlich mind. 2 der folgenden Punkte:

- ≥ 1 T₂-hyperintense Läsionen in für MS charakteristischen Hirnregionen: periventrikulär, (juxta)kortikal oder infratentoriell
- ≥ 2 T₂-hyperintense Läsionen im Rückenmark
- Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor

¹Die zeitliche Dissemination veranschaulicht die Krankheitsaktivität im ZNS an verschiedenen Zeitpunkten: Sie gilt, wenn ein gleichzeitiger Nachweis von Gadolinium-anreichenden Läsionen neben nicht-Kontrastmittel-anreichenden Läsionen zu einem beliebigen Zeitpunkt erfasst werden oder neue T₂-Läsionen verglichen mit vergangener Referenzaufnahmen auftreten

²Unter räumlicher Dissemination versteht man, dass sich Läsionen an mehr als einer anatomisch typischen Lokalisation im ZNS manifestieren. Typische Lokalisation: Infratentoriell, Juxtakortikal, kortikal, periventrikulär, spinal

³zerebrospinale Flüssigkeit

(12)

Die McDonald 2017 Kriterien stellen hierbei das aktuelle Diagnoseschema für die MS dar. Dabei ist es nach der überarbeiteten Version der McDonald Kriterien möglich bereits nach dem ersten klinischen Schub MS zu diagnostizieren, wenn die Kriterien der zeitlichen und räumlichen Dissoziation der Veränderungen im MRT erfüllt sind (13).

2.4 Einfluss des Geschlechts

Geschlechtsspezifische Unterschiede der MS konnte bereits bei klinischen Beobachtungen durch die Anfälligkeit und dem Fortschreiten der Behinderung gezeigt werden. Hierbei spielt die Genexpression der Geschlechtschromosomen im Immunsystem oder im ZNS einen entscheidenden Faktor, wobei sie durch Sexualhormone in unterschiedliche Richtungen modifiziert werden (14).

Die Unterschiede des Geschlechts bei der MS lassen sich unter anderem in der Prävalenz feststellen. Frauen sind häufiger von MS betroffen als Männer. Laut aktuellen Studien variiert das Verhältnis je nach Region von 2:1 bis 3:1, wobei dieser Trend vor allem in der RRMS-Verlaufsform zu finden ist. Auch sind geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich Beschwerdebild und Schweregrad bekannt. Frauen erfahren häufiger Rückfälle, entwickeln mehr entzündliche Läsionen in der MRT und haben oft einen früheren Krankheitsbeginn als Männer. Im Gegensatz dazu zeigen Männer allerdings ein schnelleres

Fortschreiten, einen ein schwereres Erscheinungsbild mit stärkerer Beteiligung des Kleinhirns, mehr kognitive Beeinträchtigung, Atrophie der grauen Substanz und T1-Läsionen (15).

Es zeigt sich aber auch, dass Männer und Frauen eine etwa gleiche Gesamtsymptombelastung aufweisen, wobei Frauen ein hohes Level an Angststörungen und Müdigkeit aufweise, während Männer eine Verschlechterung der Mobilität und Geschicklichkeit verzeichnen (16).

Geschlechtshormone wie Progesteron, Androgen und Östrogene in hohen Dosen haben einen anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekt. Östradiol hat hauptsächlich einen anti-inflammatorischen Effekt durch die Hemmung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF), Interleukin (IL)-1 und IL-6, und Natürliche Killerzellen (NK) Aktivierung (15). Prolaktin und Östrogene in niedrigen Konzentrationen dagegen induzieren einen pro-inflammatorischen Effekt (17). Eine niedrigere Konzentration stimuliert TNF-alpha, Interferon (IFN)-gamma IL-1 Produktion und die natürliche Killerzellaktivität (15).

Es haben vermutlich beide Aspekte während der Lebensspanne einer Frau und der hormonellen Umstellung einen Einfluss auf das neuronale Überleben sowie den Beginn und Verlauf von MS (18).

Testosteron hat in vitro einen neuroprotektiven Effekt gegen Glutamat- induzierte Toxizität und oxidativen Stress, dabei stimuliert Testosteron die Myelinbildung und Regeneration, welche durch den neuronalen Androgen Rezeptor mediiert wird (19).

Die hormonelle Umstellung während der Pubertät beeinflusst das Immunsystem bei Männern und Frauen unterschiedlich. Der höhere Anteil von Androgenen bei Männern stimuliert CD8+ Zellen und reduziert das CD4+/CD8+ Verhältnis. Der Östrogen-Anstieg bei Frauen bewirkt einen gegenteiligen Effekt, da er das Überleben der CD4+ T-Zellen unterstützt. Die Umstellung des Immunsystems in der Pubertät ist dabei mitverantwortlich für den höheren Frauenanteil bei MS Betroffenen. Zudem ist bekannt, dass eine frühe Menarche mit einem früheren Beginn assoziiert ist (18).

2.5 Epidemiologie

Nach derzeitiger Schätzung (2020) sind ca. 2.8 Millionen Menschen auf der Welt von MS betroffen. Im Vergleich zu 2013 waren es noch 2.3 Millionen. Im Großen und Ganzen zeigen die meisten Studien, dass die Inzidenz der diagnostizierten und registrierten Fälle von MS über die letzten 20 Jahre weltweit stetig gestiegen ist. Mögliche Gründe für die gestiegene Inzidenz sind wahrscheinlich die gesteigerte öffentliche Bewusstseinsbildung und Anpassungen der Diagnosekriterien in Kombination mit besseren technischen Möglichkeiten. Auch die gestiegene Anzahl an Spezialisten und MRT-Scannern wird nicht eine unwesentliche Rolle spielen. Im Allgemeinen hat sich die Inzidenz speziell für die RRMS im Gegensatz zur PPMS stärker erhöht. Bei Frauen ist die Inzidenz stärker gestiegen als bei den Männern (20). Das durchschnittliche Manifestationsalter der MS liegt bei 32 Jahren, wobei ein wesentlich späterer Beginn durchaus auch möglich ist (21)

Einige Studien zu Folge spielt der Breitengrad eine nicht unwesentliche Rolle. Menschen, die in Ländern mit hohem Breitengrad leben, haben ein höheres Risiko an MS zu erkranken als Menschen, die in der Nähe des Äquators leben. Die Prävalenz steigt mit der Höhe des Breitengrads, was durch niedrigere Sonnenlicht-Exposition und somit niedrigere VD-Synthese in Zusammenhang stehen könnte (21).

2.6 Behandlung

Die Behandlung der MS hängt einerseits vom Subtyp, sowie der Krankheitsprogression und der individuellen Konstitution der jeweiligen Person ab. Hierbei ist ein multidisziplinäres Therapiekonzept heranzuziehen.

Therapieziele sind einerseits Behandlung der akuten Exazerbation und andererseits eine längerfristige Symptomverbesserung zu schaffen. Dies wird grundsätzlich auf 3 Säulen aufgebaut.

Ein akut auftretender Schub wird, aufgrund der antiinflammatorischen Wirkung, mit einer Glucocorticoid-Hochdosistherapie (Methylprednisolon 1g/d) für 3-5 Tage intravenös behandelt. Bei therapierefraktärer Schubsymptomatik kann auch eine Plasmaseparation angewandt werden (22, 23).

Die zweite Säule greift in die immunmodulatorischen Prozesse ein. Dabei soll im Verlauf die Anzahl sowie die Intensität der Schübe bei der RRMS reduziert, eine weitere Erkrankungsprogression verlangsamt oder sogar gestoppt werden und die Lebensqualität erhalten bleiben (23, 24).

Durch sogenannte Disease-Modifying Therapies (DMT, krankheitsmodifizierende Therapien) wird versucht das Immunsystem zu supprimieren oder zu modulieren. Der Effekt von DMTs ist, dass sie die Zahl und die Schwere der Schübe reduzieren. Dadurch sollen durch die Schübe ausgelöste Nervenschäden reduziert werden. Dabei gibt es je nach Verlaufsform andere Therapieoptionen. Derzeit stehen 18 immunmodulatorische DMTs in den USA und in Europa für die Behandlung von RRMS zu Verfügung. Zudem zeigten vielversprechende klinische Ergebnisse, dass eine frühe Behandlung mit High-Efficacy-Therapies (HETs, hochwirksame Therapien) in einem frühen Stadium der MS Vorteile in Hinblick auf die Progression bringen. Eine frühe Behandlung mittels HETs kann die Akkumulation der Nervenschädigungen reduzieren und hätte für den Patienten möglicherweise einen verbesserten langfristigen Ausgang in der Lebensqualität (25).

Ein Vertreter der HET ist Ocrelizumab (seit 2017 verfügbar), ein humaner monoklonaler Antikörper, der gegen das CD20 Molekül von reifen B-Lymphozyten gerichtet ist, und gegen die RRMS eingesetzt wird. Dieses Präparat zeigt eine sehr hohe Effektivität gegen neuerliche Schübe und einer Progression bei RRMS-Patienten. Außerdem hat es die einzige Zulassung für die Behandlung der PPMS. Ein weiterer-anti-CD20-monoklonaler Antikörper wäre Ofatumumab, welches subkutan gegeben wird. Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Inhibitoren, wie Fingolimod oder Siponimod sind Präparate, die zur oralen Gabe zu Verfügung stehen. Natalizumab, ein humaner monoklonaler Antikörper und ein $\alpha 4\beta 1$ Integrin Inhibitor, wird dabei alle 4 Wochen intravenös verabreicht (22, 25).

In den nachfolgenden Tabellen 2 und 3 sind schematisch Therapiealgorithmen bei Erstinstellung und Eskalation sowie bei chronisch progredienter MS angeführt. Die Tabellen entsprechen den aktuellen Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie.

Tabelle 2: Basis- und Eskalationstherapie bei RRMS und MS-Erstereignis

Asymptomatisch	Klinisches Ereignis		
Radiologisch isoliertes Syndrom	Demyelinisierendes Ereignis unklarer Signifikanz	Klinisch isoliertes Syndrom	Schubförmig remittierende MS
Abwarten		Immuntherapie	
<p>Keine Therapie² Regelmäßige klinische und MRT Kontrollen</p>		<p>ungünstige Prognosefaktoren¹</p>	
		<p>Kategorie 1</p> <p>Dimethylfumerat /Diroximelfumarat Glatirameroide Interferon-beta Teriflunomid</p>	<p>Kategorie 2</p> <p>Cladribin Fingolimod Ozanimod Ponesimod</p>
		<p>anhaltende Krankheitsaktivität³</p>	

¹ Junges Alter, polysymptomatischer Beginn; schlechte Rückbildungstendenz d. Schübe; hohe Läsionslast; spinale/infratentorielle Läsionen und/oder quantitative oligoklonale Banden im Liquor

² positive oligoklonale Banden sowie wiederholt entzündliche Aktivität in der MRT würden für eine Immuntherapie sprechen

³ Zeichen einer anhaltenden Krankheitsaktivität nach mind. 6 Monaten Immuntherapie: \geq klinisch objektivierbarer Schub oder 1 nicht eindeutig zu objektivierender Schub und \geq 1 neue MS-typische Läsion in der MRT oder zu \geq 2 Zeitpunkten \geq 1 neue MS-typische Läsion in der MRT oder zu einem Zeitpunkt eine deutliche Zunahme der T2-Läsionslast in der MRT

→Medikamente in Kategorie 1-3 sind alphabetisch gelistet, nicht nach Priorität.

(26)

Tabelle 3: Verlaufsmodifizierende Therapie der SPMS und PPMS

Sekundär progrediente MS		Primär progrediente MS	
Alter/Krankheitsdauer		Alter/Krankheitsdauer	
Schubaktivität		MRT-Aktivität	
MRT-Aktivität		Progression ¹	
Progression ¹			
<p>↓</p> <p>Siponimod Interferon-beta 1b Cladribin; Interferon-beta 1a; Ocrelizumab, Ofanumumab, Ponesimob, Rituximab</p>		<p>↓</p> <p>Keine Immuntherapie Regelmäßige klinische und bildgebende Kontrollen</p>	
		<p>↓</p> <p>Ocrelizumab Rituximab (off-label)</p>	
<p>¹Eine Immuntherapie ist in Einzelfällen durch eine rasche Zunahme der Behinderungsprogression auch ohne Nachweis von MRT-Aktivität gerechtfertigt → Medikamente sind alphabetisch gelistet, nicht nach Priorität</p>			

(26)

Die letzte wichtige Säule für die Behandlung der MS ist die begleitende symptomatische Therapie. Antispastische Medikamente sollten für die Therapie berücksichtigt werden, da sie die Lebensqualität sowie Integrität des Patienten und die eigenständige Lebensführung positiv beeinflussen können. Außerdem ist ein multidisziplinärer Ansatz wichtig, um Symptomlinderung zu schaffen. Unter anderem sollten Physio-, Ergo-, Logo-, und Psychotherapie eng zusammenarbeiten (23).

2.7 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Tiermodelle dienen in erster Linie dazu, die pathophysiologischen Mechanismen von MS zu erforschen und damit neue Therapieverfahren zu ermöglichen. Diese Modelle können unter anderem Aufschluss auf spezifische zelluläre und molekulare Signalwege, Umweltfaktoren und Genetik in der Krankheitsentstehung und Progression liefern. Dennoch gibt es einige Limitationen und es bleibt zu bedenken, dass es kein einziges Tiermodell gibt, welches das gesamte Spektrum der Heterogenität der menschlichen MS reflektieren könnte (2). Tatsächlich decken die Tiermodelle zur Erforschung zellulärer Mechanismen der MS eher

den Bereich der RRMS als der PMS ab. Unter den zahlreichen Modellen die es zur Erforschung der MS gibt, werden in dieser Arbeit folgende kurz vorgestellt: die „Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis“ (EAE), „Theiler-Murine-Enzephalomyelitis-Virus-induzierte Demyelinisierung“ (TMEV), „Cuprizone-induzierte Demyelinisierung“ (CPZ) und das „kortikale Läsionsmodell nach Ücal et al (10).

2.7.1 EAE

Als das häufigste Tiermodell zur Untersuchung der MS wird die Induktion der „Experimental Autoimmune Encephalomyelitis“ (EAE) bei Labortieren wie Ratten oder Mäusen herangezogen. Dabei handelt es sich um eine künstlich induzierte Erkrankung, bei dem das Tier mit einem Myelinprotein (häufig Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG), in Kombination mit einem Adjuvans (Freund's-Adjuvans) immunisiert wird (2). Das Ergebnis sind eine Demyelinisierung von axonalen Bahnen und beeinträchtigen axonalen Verbindungen und progressive Lähmungen (27). Es kommt zur Proliferation von autoreaktiven T-Zellen in den Lymphknoten, die spezifisch gegen das Myelin gerichtet sind. Obwohl die EAE auch für Remyelinisierungsstudien Verwendung findet, muss beachtet werden, dass Zeitpunkt und Lokalisation der Läsionen hauptsächlich das Rückenmark und nicht das Gehirn betreffen. Außerdem sind die meisten Formen von EAE CD4+-T-Zell-abhängig, wobei sich sehr wenige Studien mit der Rolle von CD8+-T-Zellen, die in MS-Läsionen häufig vorkommen, befassen (9).

2.7.2 TMEV

Die „Theiler-Murine-Enzephalomyelitis-Virus induzierte Demyelinisierung“ beschränkt sich auf eine Infizierung von Mäusen mit dem sogenannten Theiler-Murine-Enzephalomyelitis-Virus und ist bei anderen Individuen nicht einsetzbar. Dabei bedarf es einer persistenten viralen Infektion des ZNS. Die Virusinjektion erfolgt in der Regel intrakranial oder intraperitoneal, von wo sich das Virus im ganzen Körper vermehrt und ausbreitet. Die klinische Manifestation ist dabei der humanen chronisch-progredienten MS sehr ähnlich. Die pathologischen Merkmale der virusinduzierten Demyelinisierung werden

durch die Aktivierung des Immunsystems vermittelt und nicht durch eine direkte Zytotoxizität (9).

2.7.3 CPZ

Bei „Cuprizone-induzierte Demyelinisierung“ wird mithilfe von Kupferchelatorbildner eine selektive, toxische Demyelinisierung erreicht. Über einen definierten Zeitraum wird Cuprizone oral oder durch eine intraperitoneale Injektion verabreicht. Nach dem Absetzen von Cuprizone kommt es wiederum zu einer Remyelinisierung. CPZ wird vor allem für die Untersuchung von De- und Remyelinisierung verwendet. EAE und injektionsinduzierte Demyelinisierungsmodelle werden im Vergleich seltener zur Untersuchung der Remyelinisierung verwendet aufgrund des fortschreitenden Verfalls der motorischen Funktion, der begrenzten Erholung bei EAE, sowie der technischen anspruchsvollen Methode (28). Jedoch zeigt CPZ auch Schwächen in Bezug auf die Lymphozyten (T- und B-Zellen), die nur selten in den demyelinisierenden Läsionen beobachtet wurden. Auch wird die Oligodendrozytenschädigung bei MS nicht mit einer toxischen Substanz als Auslöser assoziiert (9) Demnach ist das CPZ Modell gut geeignet für schnell durchzuführende kleinere Remyelinisierungsstudien, allerdings nicht für die Erforschung anderer, komplexer Mechanismen.

2.7.4 Das spezielle kortikale Tiermodell nach Ücal

Die Forschung der progredienten MS ist oft dadurch eingeschränkt, dass bei herkömmlichen Tiermodellen der MS der Kortex normalerweise nicht stark bzw. zu schwach betroffen ist. „Das spezielle kortikale Tiermodell nach Ücal“ versucht diese Limitationen zu umgehen und repräsentiert kortikale Pathologie mit großflächiger Demyelinisierung beider Hemisphären, die ihr Maximum am Tag 9-15 erreicht. Anschließend startet langsam die Remyelinisierung, wobei noch mindestens bis zum 30. Tag kortikale Veränderungen detektierbar sind. Ein Vorteil ist, dass die Ratten durch das Prozedere keine motorischen Ausfälle erleiden. Sie zeigen lediglich um den Tag 15 diskrete Anzeichen von Müdigkeit (29). Außerdem können

über den Katheter auch weitere Demyelinisierungs-Zyklen durch wiederholte Zytokingaben induziert werden.

2.8 Vitamin D und Multiple Sklerose

2.8.1 Allgemeines

VD gehört zu den secosteroidalen Prohormonen. Es ist einerseits essenziell für die Regulation des Kalzium- und Phosphatmetabolismus und andererseits auch ein wichtiger immunmodulatorischer Faktor. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass VD bzw. die aktive Form, 1,25-Dihydroxy-VD, signifikante biologische Aktivitäten auf das angeborene und erworbene Immunsystem haben. Das Verabreichen von VD oder deren Metaboliten in Tierexperimenten hat gezeigt, dass diese das Immunsystem beeinflussen und das Risiko verschiedener immunbezogener Krankheiten reduzieren können. VD-Rezeptoren und deren Metabolite werden dabei von verschiedensten Immunzelltypen wie Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen exprimiert (30).

VD greift mitunter in das Gleichgewicht der CD4⁺-T-Lymphozyten ein, indem es die Differenzierung der Th1- und Th17-Zellen verringert und die Proliferation von Th2- und Tregs fördert. Das Ungleichgewicht von CD4-Lymphozyten fördert die Aktivierung von Myelin-spezifischen Th1- und Th17-Zellen, die zu einer Stimulation einer Auto-Inflammation im ZNS führen (31, 32).

2.8.2 Vitamin D bei RRMS und PMS

Klinische Beobachtungen zeigen Korrelationen zwischen einem niedrigem VD-Status und einem erhöhten Risiko für autoimmun-medierte Krankheiten wie MS. Dies wird auch durch die höhere Prävalenz in Regionen mit einem hohen Breitengrad deutlich. Der VD-Mangel stellt für MS Patienten in einem sehr frühen Krankheitsstadium ein Problem dar. In einer Studie zeigten sich statistisch signifikant niedrigere 25(OH)- Werte in RRMS als in der Kontrollgruppe (33). Die niedrigere Sonnenexposition und die daraus resultierende reduzierte VD-Synthese der Haut wird häufig als Grund angeführt. Studien haben zudem

gezeigt, dass der Serum-Spiegel von 25D und 1,25D von MS-Patienten niedriger ist als der von gesunden Kontrollgruppen und eine Assoziation zwischen der Krankheitsaktivität- und Schweregrad besteht (32).

VD hat wahrscheinlich indirekt auch bei der Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung von Myelinscheiden einen Einfluss. Niedrigere VD-Spiegel führen zu einer Dysbalance zwischen inflammatorischer und anti-inflammatorischer Prozesse bei der Remyelinisierung (34). Hinweise liefern experimentelle Studien, in denen VD die Demyelinisierung abschwächt und die Remyelinisierung durch die Regulation der Differenzierung von Vorläuferzellen der Oligodendrozyten induziert. VD stimuliert die Aktivierung von Mikrogliazellen, was wiederum die Remyelinisierung begünstigt und Myelinabbauprodukte beseitigt (35, 36).

VD-Mangel steht hierbei vor allem im Zusammenhang mit einer erhöhten Krankheitsaktivität bei RRMS, jedoch ist noch nicht ausreichend geklärt, wie sich ein VD-Mangel bei PMS auswirkt. Im Gegensatz zu RRMS konnte bei PMS in einer Studie von 2019 keine Korrelation zwischen dem VD-Spiegel und dem Hirnvolumen bzw. Läsionsausmaß gefunden werden. Jedoch zeigten sich Hinweise darauf, dass höhere VD-Spiegel bei PMS den Schutz von Myelin begünstigen könnten (37). In einem Tiermodell zur Untersuchung der Pathomechanismen der PMS konnte ein positiver zellulärer Effekt von VD auf den Erhalt kortikaler Strukturen gezeigt werden. Zusätzlich konnte ein Schutz vor oxidativem Stress durch moderate VD-Dosen festgestellt werden (38).

2.8.3 Widersprüche und Diskussion

Klinische Beobachtungen sowie Studien weisen darauf hin, dass VD einen wesentlichen Einfluss auf unser Immunsystem hat. Die Frage, die sich hier stellt, ist inwieweit sich der Einfluss eines hohen oder niedrigen VD-Spiegels auf die Krankheitsentstehung bzw. auf die Therapie der MS auswirkt. Nach derzeitigem Wissensstand ist es schwierig eine direkte Kausalität festzustellen, da durch die fortschreitende Behinderung Patienten zwangsläufig eine verringerte Sonnenexposition erhalten und dadurch reduzierte VD-Spiegel aufweisen. Derzeit gibt es wenig Evidenz dafür, dass eine effektive Therapie mit hohen VD-Dosen eine Verbesserung des Beschwerdebilds verspricht. Derzeitige Daten sprechen sich aber mehrheitlich für das Aufrechterhalten eines normalen VD-Status durch Einnahme moderater Dosen aus. Dies kann zur Prävention und adjuvant zur MS-Therapie genutzt werden (30). Zusätzlich ist es wichtig den VD-Spiegel unter ärztlicher Aufsicht zu kontrollieren. Eine unbedachte oder selbstständige Einnahme von hohen Dosen VD könnte eine Hyperkalzämie auslösen und viele negative Folgen, wie Schäden an Nieren, Herz und Blutgefäße, Knochenverlust oder abdominale Beschwerden mit sich bringen.

2.9 Die Rolle der Astrozyten in der Multiplen Sklerose

2.9.1 Pathophysiologische Rolle der Astrozyten

Unter dem Begriff Gliazellen werden unterstützende und regulative Einheiten des zentralen Nervensystems zusammengefasst, dazu zählen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen. Astrozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS), indem sie auf pro-inflammatorische Zytokine und pathogenassoziierte molekulare Muster reagieren und sowohl neuroprotektive als auch proinflammatorische Funktionen ausüben. Ihre Aktivität wird durch eine beeinträchtigte Blut-Hirn-Schranke (BBB) und periphere Immunzellinvasion initiiert, was zu einer Inflammation des ZNS führt. Astrozyten sind nicht nur die häufigsten Gliazellen im ZNS, sondern auch zentrale Akteure bei der Modulation der neuronalen Mikroumgebung und der Integrität der BBB. Sie beeinflussen die Leukozyteninfiltration ins ZNS und spielen eine Rolle bei der Unterdrückung der Immunantwort sowie der Nährstoffversorgung. Durch die

Expression von Connexin 43 (Gap-Junction) und ihre Fähigkeit, auf TLR-Signale zu reagieren, können Astrozyten entweder Entzündungen fördern oder hemmen. Ihre Aktivität beeinflusst die Migration, Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen und stimuliert die Produktion von Inhibitoren, die die Remyelinisierung fördern. Ihre immunmodulatorische Funktion wird durch die Expression von MHC-II-Molekülen verstärkt. Trotz ihrer neuroprotektiven Funktionen können Astrozyten auch neurodegenerative Prozesse fördern und den Krankheitsverlauf beschleunigen. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung und Bindung von Leukozyten an den Läsionsstellen und können eine Feedback-Entzündungsschleife vermitteln, die die MS-Pathologie verstärkt.

2.9.2 Astrozyten Phänotypen

Der Arbeit von Liddel et al. aus dem Jahr 2017 zufolge können dahingehend Astrozyten in drei Astrozytenphänotypen klassifiziert werden. Der erste Phänotyp beschreibt ruhende, inaktive Astrozyten mit geringer Reaktivität auf äußere Einflüsse. Der A1-Phänotyp hingegen ist durch eine erhöhte Expression von Entzündungsmediatoren und der daraus resultierenden proinflammatorischen Wirkung gekennzeichnet. Als dritte Ausprägung wird der A2-Phänotyp skizziert, der wiederum eine neuroprotektive Wirkung hat und die Neuroregeneration fördert. (39).

Jedenfalls wird davon ausgegangen, dass multiple reaktive Phänotypen von Astrozyten und Gliazellen in Zusammenhang stehen, je nach Typ und Stadium neurodegenerativen Erkrankungen, sowie der regionalen Lage. Die Prozesse, die zu einem Wechsel der Phänotypen, Verlust der neuroprotektiven bzw. Überwiegen von neurotoxischen Funktionen führen, sind komplex und möglicherweise vom Stadium und Schwere der neurodegenerativen Erkrankung abhängig (40).

In Anbetracht der Relevanz von Astrozyten-Aktivitäten in Bezug auf MS, könnten direkte Therapiestrategien die destruktive Komponente dämpfen und die neuroregenerativen unterstützenden Funktionen steigern. Dabei ist auch immer zu bedenken in welcher Phase der neurodegenerativen Erkrankung die Astrozyten moduliert werden würden. So könnte es beispielsweise durch den Verlust oder Unterbrechung der Astrozyten-Funktionen sogar zu einer Verschlechterung der Erkrankung kommen.

2.10 Forschungsziel dieser Diplomarbeit

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, Unterschiede im pathologischen Verlauf kortikaler Demyelinisierung zwischen den Geschlechtern mit und ohne VD aufzuzeigen, mit besonderem Fokus auf Astrozytenphänotypen. Mithilfe von immunhistochemischen Methoden soll Gewebe eines speziellen Tiermodells der PMS untersucht werden. Hierbei wird Hirngewebe von Ratten auf unterschiedliche Astrozytentypen untersucht und quantitativ unter dem Mikroskop ausgewertet.

3. Material und Methoden

3.1 Kortikales Läsionsmodell nach Üçal et al

Im tierexperimentellen Teil meiner Diplomarbeit wird ein spezielles Tiermodell zur Darstellung kortikaler Pathologien verwendet. Genauere Informationen über Katheter-Implantation, Immunisierung, sowie die intrazerebrale Zytokin-Injektion ist der Originalliteratur zu entnehmen (29).

Für das Experiment wurden weibliche (Wd15) und männliche (Md15) dunkle Agouti-Ratten (siehe Tabelle 4) am Höhepunkt der kortikalen Pathologie (d15) untersucht. Dabei bekam jeweils eine Tiergruppe pro Geschlecht 400 IE VD (VDMd15; VDWd15) pro Woche ab der Entwöhnung von der Mutter per Hand (Pipette) verabreicht, um eine Ausbildung des Immunsystems unter hohen VD-Spiegeln zu gewährleisten. Alle Tierversuche wurden unter Genehmigung der lokalen Behörden durchgeführt (Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung; BMBWF-66.010/0072-WF/V/3b/2017) Für die Katheterimplantation wurden die Tiere narkotisiert und in einem stereotaktischen Rahmen fixiert (29).

Nach einer Heilungsphase von 14 Tagen wurden die Ratten mit einer niedrigen MOG-Dosis (emulgiert in inkompletten Freund's Adjuvans) immunisiert. Die Dosis sollte dabei einen stabilen Antikörpertiter generieren, ohne dabei klinische Symptome oder zentralnervöse Pathologien zu verursachen. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion von steriler Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) anstelle von MOG-Protein (MHC, WHC; „healthy control“).

Nach Erreichen eines ausreichend hohen Anti-MOG-Antikörpertiter wurde den Ratten eine Zytokinmischung über den Katheter injiziert, um die BBB zu öffnen.

Alle Tiere dieses Experimentes wurden an Tag 15 nach der Injektion von Zytokinen unter tiefer Anästhesie euthanasiert. Die Euthanasie erfolgte durch eine kardiale Injektion von 25mg Thiopental und einer transkardialen Perfusion mit 4%iger paraformaldehydhaltiger (PFA) Lösung, um die Gewebe für weitere Untersuchungen zu fixieren (29).

Tabelle 4: Anzahl der verwendeten Versuchstiere in den jeweiligen Gruppen

	Anzahl der Tiere
Md15	10
VDMd15	8
Wd15	7
VDWd15	6
MHC	7
WHC	7

3.2 Immunhistochemische Färbemethoden

Für die immunhistochemischen (IHC) Färbungen in dieser Arbeit wurden sowohl Einzelmarkierungen als auch Doppelmarkierungen durchgeführt.

Dabei wurden für die Veranschaulichung kortikaler Veränderungen unter dem Lichtmikroskop für die Einzelmarkierung Antikörper gegen folgende Zielmoleküle verwendet:

- **neuronales nukleäres Antigen (NeuN)**, ein Proteinmarker, der vorzugsweise in ausgereiften Neuronen exprimiert wird und als Neuronenmarker dient.
- **ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1)** markiert spezifisch aktivierte Mikrogliazellen (Immunzellen des Nervensystems). Diese werden bei Entzündungsreaktionen oder generellen Zerstörung von Zellen im Gehirn aktiviert.
- **Proteolipidprotein (PLP)**, ein Hauptbestandteil der Myelinscheide und dient als histologischer Marker der Demyelinisierung

Die Erfassung der Astrozytenphänotypen erfolgte mittels Doppelmarkierung. Für die Markierungen des A2-Phänotyps wurde der Marker S100 calcium-binding protein A10 (S100A10) in Doppelmarkierung mit glial fibrillary acidic protein (GFAP) verwendet. Die A1-Astrozyten wurden mit Hilfe von complement component 3d (C3d) Antikörpern in Doppelmarkierung mit GFAP bestimmt.

Die Gehirnpräparate für die IHC wurden zunächst für 24 Stunden in 4% PFA fixiert, dann dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Dann wurden die Präparate 1,5-2 µm dünn geschnitten, entparaffiniert und für den Färbeprozess rehydriert. Die Vorbehandlung für die Detektion der Zielmoleküle erfolgte mit Citratpuffer pH 6,0 und Zuhilfenahme eines Dampfgerärs. Anschließend wurden die Präparate zuerst mit einer Blockerlösung und

anschließend mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht inkubiert. Bei den durchgeführten Doppelmarkierungen konnten dabei jeweils die zwei verschiedenen Antikörper, von verschiedenen Tierspecies stammend, gleichzeitig inkubiert werden. Am nächsten Tag nach dem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit dem jeweiligen gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper inkubiert. Um das Signal des Antikörper-Antigen-Komplexes sichtbar zu machen, wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet. Bei den Doppelmarkierungen wurden zusätzlich das Vector VIP-Kit verwendet, welches ein violette Farbpräzipitat bildet.

Weitere Informationen zu den Verdünnungen, Herstellungsunternehmen und Katalognummern der Primärantikörper sind im Anhang in Tabelle 9 dokumentiert. Zusätzlich sind die einzelnen Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbungen als Protokoll im Anhang in Tabelle 8 angeführt.

3.3 Histopathologische Evaluierung

Zur Quantifizierung der IHC wurden positiv gefärbte Strukturen der ipsilateralen Seite (Hemisphäre, in der sich der Stichkanal des Katheters befindet) sowie der kontralateralen Seite des Kortex unter Verwendung eines optischen Gitters (Zähllokular) bei einer 20- (Einzelmarkierung) bzw. 40-fachen (Doppelmarkierung; beide Marker immer im gleichen Großquadrat gezählt) Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop gezählt.

Hierbei wurden die spezifisch angefärbten Zellen anhand drei definierter quadratischer Flächen pro Hemisphäre gezählt. Die Durchschnittswerte der Quadratflächen wurden dann in Zellen/mm² umgerechnet, sodass die Daten besser vergleichbar waren.

Sowohl die Quantifizierung als auch Fotografie (40x Objektiv) wurden mit dem „Zeiss Axio Scope.A1“ Mikroskop durchgeführt. Dabei beträgt der Maßstab jeweils eine Länge von 100 µm.

3.4 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit IBM SPSS Statistics Version 28 durchgeführt. Die angeführten Grafiken (Boxplots sowie Säulendiagramme) wurden mittels Microsoft Excel 2010 erstellt. Mithilfe der Software „IBM SPSS Statistics Version 28“ wurden statistische Signifikanzwerte berechnet und in Tabellen angeführt.

Weibliche (WHC) und männliche (MHC) Kontrolltiere sind in den statistischen Berechnungen von NeuN, Iba1 und PLP mit einbezogen. Bei der Untersuchung der Astrozytenphänotypen (GFAP/S100A10) und GFAP/C3d) wurden die Kontrollen nur einer qualitativen Bewertung unterzogen und nicht in die statistische Berechnung miteinbezogen.

Da es sich um keine Normalverteilung handelt (überprüft via Kolmogorov-Smirnov-Test), wurde die statistische Signifikanz der beobachteten Veränderungen zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test bewertet. Dabei wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gewählt. Weiters wurden, um die Unterschiede von GFAP/C3d und GFAP/S100A10 zu beurteilen, die Prozentanteile der Marker (C3d, S100A10) bezogen auf die Gesamtheit reaktiver Astrozyten (GFAP) verwendet.

4. Resultate

4.1 Histopathologische Veränderungen im Kortex

Alle nachfolgenden mikroskopischen Fotos wurden mit dem „Zeiss Axio Scope.A1“ Mikroskop mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen und mit einem Maßstabsbalken von 100 µm Länge versehen. Sie stellen die histopathologischen Veränderungen im Kortex dar. Die jeweiligen Astrozyten Phänotypen A1 und A2 wurden mithilfe einer Doppelmarkierung mit den Antikörpern GFAP/S100A10 für A2 und GFAP/C3d für A1 visualisiert (Abb.1-Abb.2). Die IHC-Färbung ermöglichte es durch eine Violett-färbung die zytoplasmatischen Anteile aktivierter Astrozyten mittels GFAP-Antikörper sichtbar zu machen. Mithilfe eines zweiten Markers mittels S100A10- oder C3d Antikörpern, wurden die Kerne zusätzlich braun gefärbt und damit doppelmarkiert. Als positiv doppelmarkiert gelten Zellen, welche gleichzeitig erkennbare Violett-färbung des Zytoplasmas und Braunfärbung des Zellkerns aufweisen. Die Morphologie der Astrozyten ist durch die Verzweigungen und vielen langen Fortsätze gut von anderen Zellen zu unterscheiden.

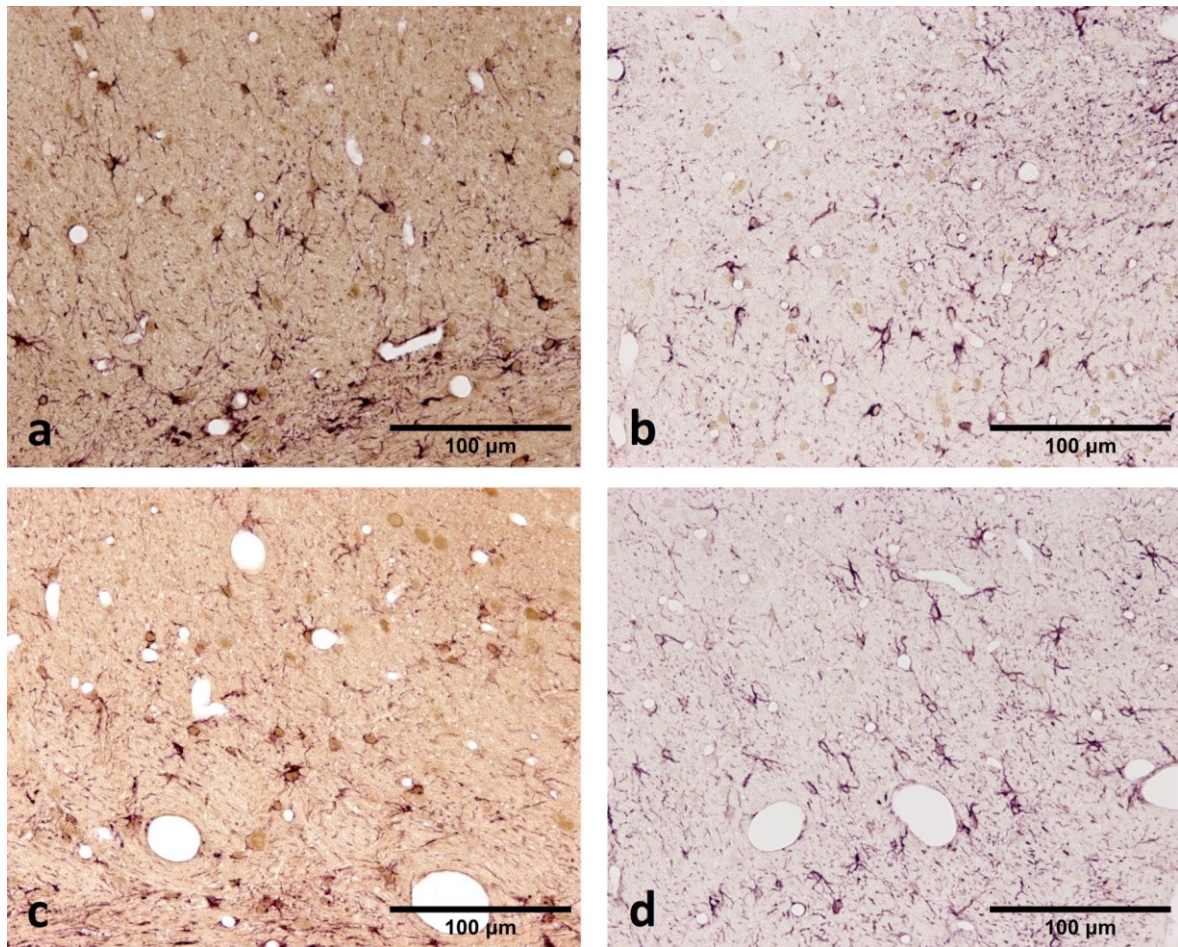


Abbildung 1: Doppelmarkierung der Md15 (a, b) und Wd15 (c, d). In beiden Geschlechtern dominiert jeweils der A1 Phänotyp (a, c) im Vergleich zum A2 Phänotyp (b, d)

In Abbildung 1 (a) und (b) sind aktivierte Astrozytenphänotypen der männlichen Gruppe am Tag 15 abgebildet. In 1 (a) zeigt sich eine relativ starke Hintergrundfärbung, dennoch sind GFAP (violettes Zytoplasma) sowie C3d (braune Zellkerne) positiv markierter Zellen gut erkennbar. In 1 (b) ist eine schwächere Hintergrundfärbung erkennbar, weshalb doppelmarkierte Astrozyten mit GFAP/S100A10 gut zu sehen sind. Dabei ist eine sternförmige Form der Astrozyten in beiden Bildern, (a) und (b), gleich gut ausgeprägt. In dieser Tiergruppe Md15 ist der A1 Phänotyp stärker ausgeprägt als der A2 Phänotyp.

In der Abbildung 1 (c) und (d) sind aktivierte Astrozytenphänotypen der weiblichen Gruppe am Tag 15 abgebildet. Wie bereits bei der männlichen Gruppe ist in 1 (c) ein ähnliches Bild zu erkennen. Es sind doppelmarkierte GFAP/Cd3 Zellen zu sehen, die den A1 Phänotyp darstellen. Im Vergleich zur männlichen Gruppe ist in 1 (d) allerdings das S100A10 Signal schwächer ausgeprägt, was auf eine geringere A2-Aktivierung schließen lässt. Es sind vor allem negativ doppelmarkierte Bereiche wahrzunehmen, die lediglich auf eine positive

GFAP-Expression zurückzuführen sind. Auch in dieser Tiergruppe, Wd15 dominiert der A1 Phänotyp.

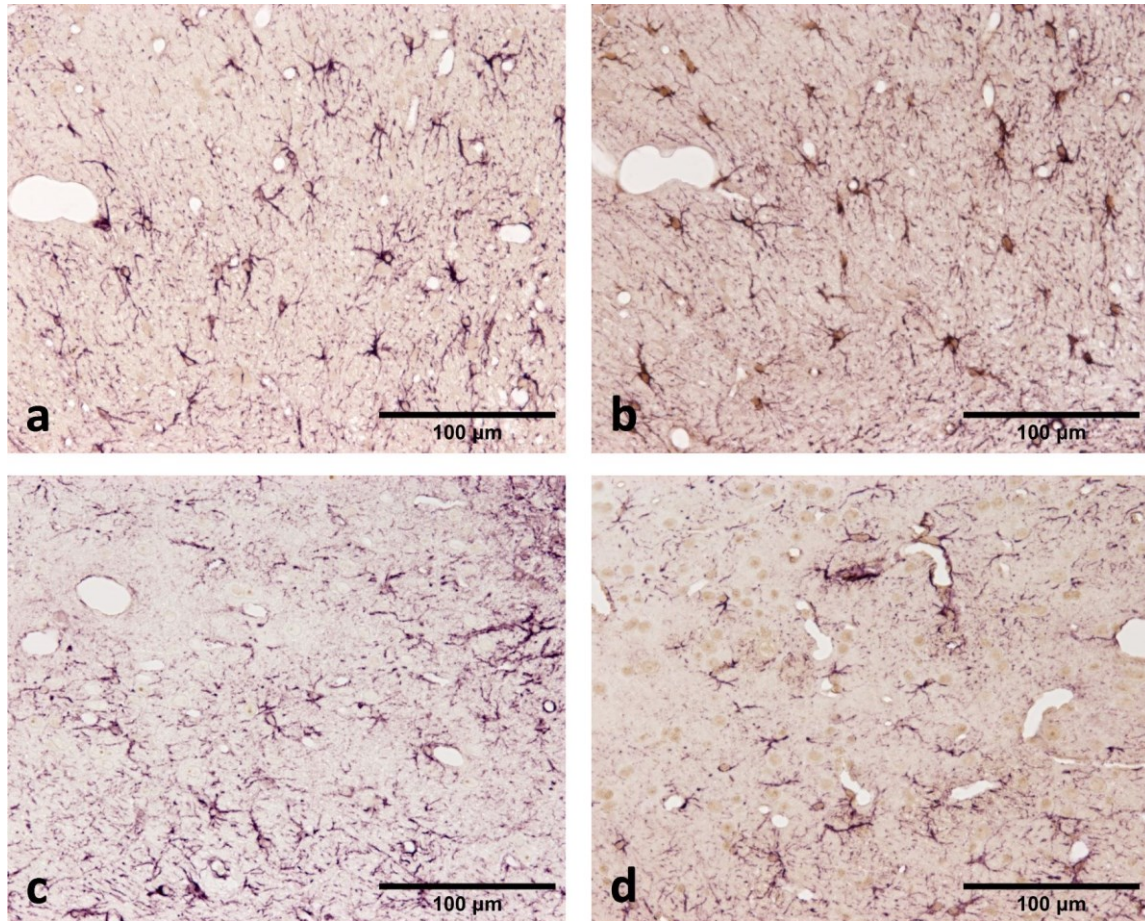


Abbildung 2: Doppelmarkierung bei VDMd15 (a, b) und VDWd15 (c, d). Hier überwiegt in beiden Geschlechtern jeweils der A2 Phänotyp (b, d) im Vergleich zum A1 Phänotyp (a, c).

In der Abbildung 2 (a) und (b) sind aktivierte Astrozytenphänotypen der VDMd15 Gruppe abgebildet. In Bild 2 (a) ist nur eine geringe positive Ausprägung der Doppelmarkierung mit GFAP/C3d ersichtlich. Stattdessen ist im Bild 2 (b) der A2 Phänotyp durch die braune Kernfärbung sehr gut erkennbar. In der VDMd15 Tiergruppe dominiert also der A2 Phänotyp.

In der Abbildung 2 (c) und (d) sind aktivierte Astrozytenphänotypen der VDWd15 Gruppe abgebildet. Wie bereits in Abbildung 2 (a) zu sehen ist, kann man in 2 (c) ein sehr ähnliches Bild beobachten, allerdings mit allgemein etwas geringerer Astrozytenaktivierung. Die A1-Phänotypisierung ist nur sehr schwach ausgeprägt. Wie bei VDMd15 ist auch in 2 (d) eine

stark positive S100A10 Markierung der Zellkerne zu erkennen, wodurch auch in der VDWd15 Gruppe der A2 Phänotyp überwiegt.

4.2 Quantifizierung der Veränderungen im Kortex

4.2.1 Astrozytenphänotypen

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3) werden vier Diagramme gezeigt, die die aktivierten Astrozyten Phänotypen (A1 und A2) bei den männlichen und weiblichen Gruppen mit und ohne VD-Substitution veranschaulicht. Zusammenfassend zeigen die Diagramme **(a)** und **(c)** in Abb. 5 die Anzahl positiver Zellen pro mm² mit GFAP/S100A10 und mit GFAP/C3d Markierungen in Bezug auf die unterschiedlichen Gruppen. Die Grafiken **(b)** und **(d)** geben jeweils die positiv markierten Zellen in Prozent an, wobei die jeweilige gesamt Anzahl aktivierter GFAP positiver Astrozyten als 100% gilt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen und eine deutlichere Aussage zu generieren. Grafik **(a)** zeigt den A2-Phänotyp-Verlauf in den einzelnen Gruppen. VD-Gruppen beider Geschlechter zeigen jeweils höhere Werte als die Gruppen, die kein VD erhielten. In der VDMd15 Gruppe liegt der höchste Wert bei 140 Zellen/mm² (IQR 56). Die Gruppen ohne VD (Md15 und Wd15) weisen dagegen mit 75 und 74 Zellen/mm² (IQR 49 und 50) annähernd gleich niedrige Werte auf. Zwischen den männlichen Gruppen (ohne und mit VD-Substitution) ist eine stärkere Diskrepanz zu beobachten als bei den beiden weiblichen Gruppen. Hier fällt die A2-Aktivierung generell geringer aus als bei den männlichen Tieren. In der Wd15-Gruppe konnten 74 (IQR 50) und in der VDWd15-Gruppe 97 positive Zellen/mm² (IQR 54) gezählt werden. Ergänzend werden im Bild **(b)** die A2 Phänotypen in % angegeben und damit in ein vergleichbares Verhältnis zu den anderen Gruppen gebracht. Dabei ergeben sich signifikante Unterschiede in der Präsenz des A2 Phänotyps in der Md15 Gruppe verglichen mit VDMd15 ($p < 0,001$), und der Wd15 ($p = 0,011$) Gruppe (siehe Tabelle 5). In der Grafik **(c)** ist die A1-Phänotyp Aktivierung in Zellen/mm² durch den Marker Cd3 dargestellt. Dabei haben die VD-Gruppen, VDMd15 (31 Zellen/mm² IQR 26) und VDWd15 (26 Zellen/mm² IQR 29) relativ gleich niedrige Werte. Die höchste A1-Phänotyp Aktivierung lässt sich in der Md15-Gruppe mit 70 Zellen/mm² (IQR 14) finden. In Abbildung **(d)** werden wiederum die positiven A1-Phänotyp Zellen in % angegeben, um die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen und deren Unterschiede besser darzustellen. Nur

bei VDMd15 im Verhältnis zu Md15 ($p=0,01$) und Wd15 ($p=0,017$) können signifikanten Unterschiede des A1 Phänotyps festgestellt werden (Tabelle 5).

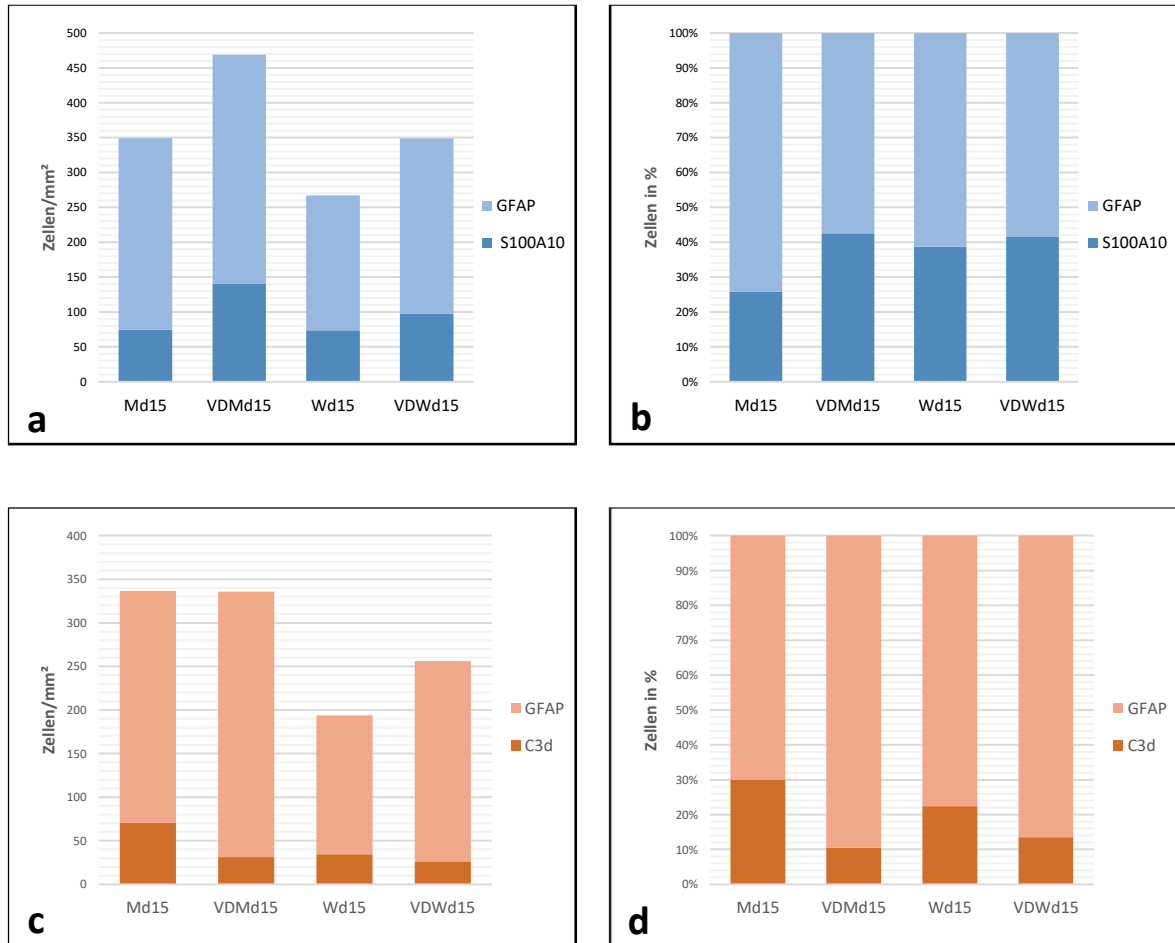


Abbildung 3: A2 bzw. A1 Phänotypenverlauf in den jeweiligen Gruppen. Die Diagramme (a) und (c) zeigen die Anzahl positiver Zellen pro mm² mit GFAP/S100A10 und mit GFAP/C3d in den verschiedenen Gruppen. Die Grafiken (b) und (d) geben jeweils die positiv markierten Zellen in Prozent an. (a) In der VDMd15 Gruppe ist die höchste Anzahl an A2 positiven Zellen mit 140 Zellen/mm² (IQR 56) zu beobachten. Die Gruppen ohne VD, Md15 und Wd15, weisen dagegen mit 75 und 74 Zellen/mm² (IQR 49 und 50) annähernd gleich niedrige Werte auf. In der VDWd15 Gruppe konnten 97 positive A2-Zellen/mm² (IQR 54) gezählt werden. (b) Ergänzend werden die A2 Phänotypen in % angegeben. (c) Cd3 positive Zellen variiert zwischen 26 und 71 Zellen/mm². VD-Gruppen, VDMd15 (32 Zellen/mm², 26 IQR) und VDWd15 (31 Zellen/mm², 29 IQR) haben relativ gleich niedrige Werte. Die höchste A1-Phänotyp Aktivierung lässt sich in der Md15-Gruppe mit 70 Zellen/mm² (IQR 14) finden. In (d) werden wiederum die positiven A1-Phänotyp Zellen in % angegeben. Nur die Gruppe VDMd15 zeigt im Vergleich zu Md15 ($p=0,01$) und Wd15 ($p=0,017$) einen signifikanten Unterschied des A1 Phänotyps.

Tabelle 5: Unterschiedsanalyse der Astrozytenphänotypen mittels Mann-Whitney-U-Test. Diese Tabelle fasst die p-Werte der Gruppenvergleiche zusammen. Signifikante Unterschiede ($p < 0,050$) sind dabei fett gedruckt dargestellt.

	Md15/VD Md15	Md15/ Wd15	Md15/VD Wd15	Wd15/VD Wd15	Wd15/VD Md15	VDMd15/V DMd15
GFAP(Zellen/mm²)	0,087	0,003	0,533	0,004	0,001	0,012
S100A10 (in %)	0,001	0,011	0,001	0,935	0,441	0,270
C3d (in %)	0,010	0,324	0,370	0,092	0,017	1,000

Tabelle 6: Deskriptive Statistik - Median und IQR der jeweiligen Gruppen. In dieser Tabelle ist die deskriptive Statistik zusammengefasst. Als Streuungsmaß wurde der Interquartilabstand (IQR) gewählt, wobei ein großer IQR auf eine größere Streuung und ein kleiner IQR auf eine engere Verteilung der Daten um den Median hindeutet.

Median/IQR	Md15	VDMd15	Wd15	VDWd15
GFAP (Median)	258	341	161	242
S100A10 (Median)	77	143	72	92
C3d(Median)	72	26	29	37
GFAP (IQR)	109	119	64	77
S100A10 (IQR)	49	56	50	54
C3d (IQR)	14	26	19	29

In Abbildung 4 (Abb. 4) wird durch eine Boxplot-Darstellung der gesamte Verlauf aktivierter Astrozyten in den jeweiligen Gruppen gezeigt. Dazu wurde der Mittelwert aller GFAP-Werte (welche durch die Doppelmarkierungen mit S100A10 und Cd3 erfasst wurden) berechnet. Die gezählten Zellen variieren zwischen 80 und 432 positiven GFAP-Zellen/mm² (Tabelle 6). Männliche Gruppen (Md15, VDMd15) zeigen dabei im Vergleich zu den weiblichen Gruppen (Wd15, VDWd15) eine deutlich höhere Anzahl aktivierter Astrozyten. Außerdem zeigen VD substituierte Gruppen eine höhere Astrozyten-Aktivierung.

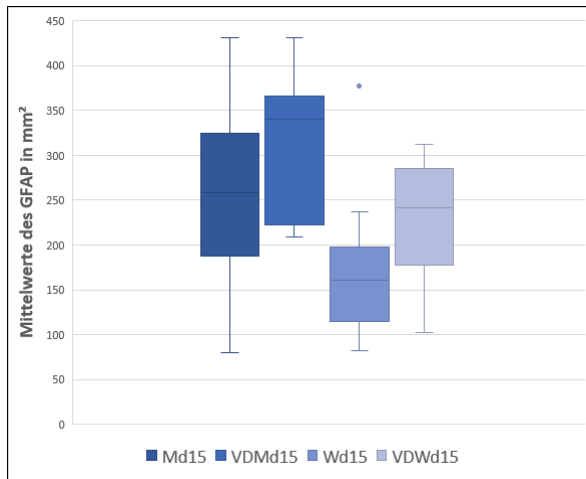


Abbildung 4: Boxplotdarstellung der Astrozytenaktivierung je Gruppe. Geschlechterunterschiede sind anhand der durchwegs niedrigeren Werte in den weiblichen Gruppen erkennbar. In VDMd15 und VDWd15 wird in Relation zu Md15 und Wd15 eine höhere Astrozyten-Aktivierung verzeichnet. Anzumerken ist, dass in den Gruppen eine relativ starke Streuung vorhanden ist, die in Md15 am größten ist.

4.2.2 Darstellung kortikaler Veränderungen von Myelin, Mikroglia und Neurone im Läsionsmodell

In Abbildung 5 werden kortikale Veränderungen mit Hilfe von Boxplot-Darstellung gezeigt (PLP-Verlust => Myelin; Iba1 => Aktivierung von Mikrogliazellen; NeuN => neuronale Zellkerne). Neben den Geschlechter- und VD-Gruppen sind auch gesunde Kontrollgruppen in der grafischen Darstellung angeführt.

In Abbildung 5 (a) werden die Verläufe des PLP Verlusts/mm² gemessen und in einem Boxplot zusammengefasst. Daraus wird ersichtlich, dass der PLP Verlust in Md15 am Größten ist. Dagegen ist in Md15VD und Wd15 weniger PLP Verlust/mm² zu dokumentieren. Dabei ist zwischen den Gruppen Md15 und Wd15 ein signifikanter Unterschied ($p=0,019$) zu erkennen. Zudem lässt sich auch zwischen Md15 und Md15VD ($p=0,32$) ein signifikanter Unterschied feststellen. Den niedrigsten Verlust des PLP-Signals sowie die niedrigste Streuung ist in der Gruppe Wd15VD zu beobachten. Die größte Streuung kann in der Md15 Gruppe verzeichnet werden.

In der Grafik (b) in Abb. 5 ist dieser Marker durch positiv gezählte Mikroglia-Zellen/mm² dargestellt. Das größte Vorkommen an positiven Mikrogliazellen ist in Wd15 zu beobachten.

Die beiden männlichen und weiblichen VD-Gruppen sind sehr ähnlich und haben eine niedrigere Anzahl an positiven Zellen. Beide Kontrollgruppen MHC und WHC zeigen fast identische Boxplotdarstellungen mit den zu erwartenden niedrigsten Werten. Jedoch konnte zwischen den Geschlechter- und VD-Gruppen (gesunden Kontrollgruppen ausgeschlossen) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Die letzte Grafik (c) in Abbildung 5 befasst sich mit NeunN positiv markierten Zellen des kortikalen Läsionsmodells. Das Bild (c) zeigt, dass die höchste Anzahl an positiv markierten Zellen/mm² in den Kontrollgruppen (am höchsten in MHC) sowie auch in Wd15VD vorhanden ist. Die niedrigsten Werte kann man in der männlichen Gruppe ohne VD beobachten. Zusätzlich ist zwischen den Gruppen Md15VD und Wd15 eine ähnliches Vorkommen an positiv markierten Zellen zu verzeichnen. Zwischen den Gruppen Md15 und Md15VD besteht ein p-Wert von 0,008, welcher somit als signifikant zu werten ist. Die jeweiligen signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen werden in der Tabelle 7 angeführt.

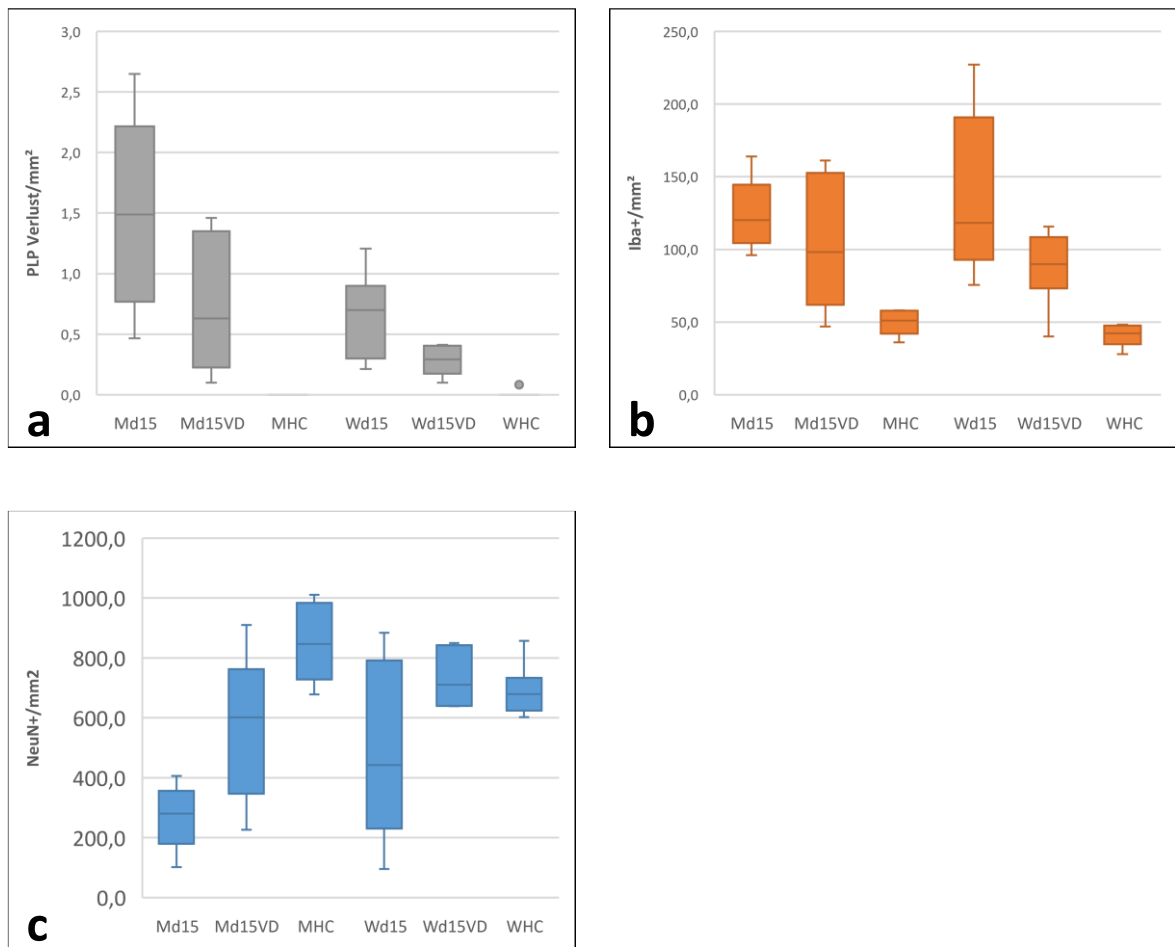


Abbildung 5: Boxplot-Darstellung der unterschiedlichen Gruppen der Marker PLP (a), Iba1 (b) und NeuN (c) Bei PLP markierten Gruppen werden signifikante Unterschiede zwischen Md15/VDMd15 (0,032), Md15/Wd15 (0,019) und Md15/VDWd15 (0,001) beobachtet. Bei der Iba-Markierung zeigt sich nur zwischen Md15 und VDWd15 ein signifikanter Unterschied von $p=0,017$. In den NeuN markierten-Gruppen sind zwischen Md15/VDMd15 (0,008) und Md15/VDWd15 (0,001) Signifikanzen zu sehen.

Tabelle 7: Unterschiedsanalyse der Gruppen (PLP, Iba, NeuN) mittels Mann-Whitney-U-Test. Diese Tabelle fasst die p-Werte der Gruppenvergleiche zusammen. Signifikante Unterschiede ($p<0,050$) sind dabei fett gedruckt dargestellt.

	Md15/VD MD15	Md15/W d15	Md15/VD Wd15	Wd15/VD Wd15	Wd15/VD Md15	VDMd15/VD Md15
PLP Verlust (Zellen/ mm²)	0,032	0,019	0,001	0,816	0,071	0,152
Iba (Zellen/ mm²)	0,374	0,914	0,017	0,245	0,109	0,699
NeuN (Zellen/ mm²)	0,008	0,118	0,001	0,563	0,116	0,302

5. Diskussion

Die Ergebnisse aus der vorgestellten Studie und die umfassende Analyse der bereitgestellten Literatur liefern wichtige Erkenntnisse zur Wirkung von VD auf die Phänotypen von Astrozyten und zeigen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Reaktion auf diese Supplementierung auf. Diese Diskussion befasst sich mit den Implikationen dieser Befunde für die VD-Supplementierung, den Genderbezug in der MS-Forschung und die Rolle verschiedener Astrozytenphänotypen in der Neuroinflammation.

Die beobachtete verstärkte Aktivierung des neuroprotektiven A2-Phänotyps in VD-supplementierten Gruppen korreliert mit früheren Forschungsergebnissen, die VD neuroprotektive und immunmodulierende Eigenschaften zuschreiben (41). Die Reduktion des proinflammatorischen A1-Phänotyps unter VD deutet darauf hin, dass dieses Vitamin möglicherweise die Astrozyten-Phänotypisierung hin zu einem Zustand begünstigt, der förderlich für die neuronale Gesundheit und das Überleben ist. Diese Beobachtungen sind konsistent mit der Hypothese, dass VD nicht nur als einfacher Nährstoff, sondern als potentielles therapeutisches Agens in der Behandlung von MS fungieren könnte, indem es die entzündliche Umgebung moduliert und die Myelinintegrität unterstützt.

Im Zusammenhang mit MS fördert die aktive Form von VD (1,25(OH)₂D₃) die Proliferation von Stammzellen und treibt deren Differenzierung in Oligodendrozyten an, die wiederum in weiterer Folge die Remyelinisierung durchführen. VD wirkt der Neurodegeneration entgegen, indem es die Aktivierung reaktiver Astrozyten und oxidativen M1-Mikroglia unterdrückt. Zudem fördert es die Expression verschiedener neuroprotektiver Faktoren, verringert die Permeabilität der BBB und reduziert die Rekrutierung von Leukozyten in das ZNS (42). All jene immunmodulierenden Faktoren, die mit VD assoziiert werden, können theoretisch ein günstiges Milieu für das neuronale Überleben erzeugen und dabei autoimmunologische Vorgänge bekämpfen bzw. in der Therapie als unterstützende Einheit wirken. Ein niedriger VD-Spiegel spricht für ein höheres Risiko für den Beginn einer Autoimmunerkrankung sowie einen ungünstigeren Krankheitsverlauf. Viele Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen VD-Serumspiegel und dem Ausbruch und Fortschreiten der Krankheit hin. Für die therapeutische Anwendung von VD bedarf es jedoch weiterer Forschung, da die nötige Dosierung von Patienten stark variieren kann und vom Alter und Geschlecht abhängig ist (43).

Zurzeit ist die Empfehlungen für die VD-Supplementation bei allen gesunden Erwachsenen in Europa etwa 1000 IE täglich. Dadurch würde der VD Serumspiegel bei über 95% der Bevölkerung auf <50 nmol/L steigen. Bei erkrankten Menschen sollte der VD-Serumspiegel regelmäßig kontrolliert werden und entsprechend individuell angepasst werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden (44). In der Literatur zeigt sich besonders bei Frauen im gebärfähigen Alter eine gesteigerte protektive Wirkung im Vergleich zu Männern aufgrund der Wechselwirkung zwischen Östrogen und VD (43). Darüber hinaus wird über eine VD und 17-beta-Östradiol Therapie bei RRMS-Patienten diskutiert (45). Jedoch zeigt sich auch, dass männliche Ratten in unserem Experiment durch den antioxidativen Effekt der VD-Supplementation einen Vorteil gegenüber Ratten ohne VD-Substitution haben können.

Trotz der positiven Effekte von VD, sollte der VD-Serumspiegel bei Patienten mit einer VD-Supplementierung regelmäßig überprüft werden, um das Risiko von Überdosierungen und ihrer Folgen zu minimieren. Des Weiteren ist noch nicht gänzlich geklärt, inwieweit und in welcher Ausprägung VD autoimmunologische Prozesse beim Menschen modifizieren kann. Die meisten Erkenntnisse wurden durch Tiermodelle gewonnen, deren zelluläre Abläufe nicht 1:1 auf den Menschen übertragen werden können (46). Die bisherige Forschung und auch dieses Experiment deuten jedoch auf einen Benefit bezüglich der Stärkung des Immunsystems hin. Weitere Forschung in diesem Bereich besonders die Auslegung auf den Menschen ist wichtig, um die prophylaktische und therapeutische Wirkung von VD insbesondere bei der PMS besser abschätzen zu können.

Neben der Wirkung von VD konnten auch geschlechtsspezifische Unterschiede in der vorgelegten Studie festgestellt werden. Die geschlechtsspezifischen Unterschiede, insbesondere die stärkere Aktivität des A2-Phänotyps bei männlichen Ratten und die effektivere Reduktion des A1-Phänotyps unter VD, legen nahe, dass männliche und weibliche Individuen unterschiedlich auf Therapien ansprechen könnten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit, geschlechtsspezifische Ansätze in der Behandlung der MS zu berücksichtigen, was in Einklang mit früheren Studien steht, die auf die unterschiedliche Krankheitsprogression und Therapieantwort in Abhängigkeit vom Geschlecht hinweisen (47). Zur Erforschung von MS wurden vorwiegend Tierversuche mit nur einem Geschlecht durchgeführt, da man davon ausgegangen ist, dass die Auswirkungen für beide Geschlechter gleich sind. In 85% aller EAE-Studien wurden nur weibliche Tiere herangezogen, was folglich zu einer weiblichen Tendenz führte. Hierbei sind aber

geschlechtliche Unterschiede mitzuberechnen, da sich Frauen und Männer in ihrer Immunantwort, der Prävalenz, dem Verlauf sowie der Wirkung von MS-Therapeutika unterscheiden können (48). Außerdem unterscheiden sich die Geschlechter in oxidativen/antioxidativen und entzündlichen Stressmechanismen, was die Notwendigkeit der Berücksichtigung beider Geschlechter in Studien zusätzlich verstärkt (49).

Die Unterscheidung zwischen A1- und A2-Phänotypen in Astrozyten bietet einen wertvollen Ansatz für das Verständnis der komplexen Rolle dieser Zellen in neurologischen Erkrankungen. Insbesondere da in der früheren Forschung Astrozytenaktivierungen häufig pauschal als schädlich für das Gehirn betrachtet wurde, besonders im Kontext von neurologischen Erkrankungen wie MS. Man ging davon aus, dass die reaktiven Astrozyten hauptsächlich zur Neuroinflammation und dem Fortschreiten der Erkrankung beitragen, indem sie proinflammatorische Mediatoren freisetzen und die Bildung von Narbengewebe fördern was wiederum als Behinderung der Regeneration galt. Dieser veraltete Ansatz würde bei unserer Studie eine Verschlechterung der Gesamtsituation durch VD Gabe bedeuten, da die Gesamtanzahl der aktivierten Astrozyten bei den VD-supplementierten Tieren jeweils höher ist. Erst in den letzten Jahren hat sich das Verständnis differenziert. Mit fortschreitender Forschung und neuen Techniken, wie der Einzelzell-RNA-Sequenzierung, wurde deutlich, dass Astrozyten unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Rollen in neurologischen Krankheitsprozessen spielen können. Diese Erkenntnisse führten zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Astrozytenphänotypen. Die Anerkennung, dass Astrozyten sowohl schädliche als auch schützende Funktionen haben können, hat zu einem umfassenderen Bild ihrer Rolle in neurologischen Erkrankungen geführt und die Tür für neue therapeutische Ansätze geöffnet, die darauf abzielen, schädliche Astrozytenreaktionen zu modulieren, ohne die notwendigen unterstützenden Funktionen zu beeinträchtigen.

Die Modulation dieser Phänotypen durch VD könnte neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen, insbesondere in der gezielten Behandlung neuroinflammatorischer und neurodegenerativer Erkrankungen wie MS. Die Tatsache, dass VD den A2-Phänotyp fördert und den A1-Phänotyp reduziert, könnte wegweisend für die Entwicklung neuer Therapieansätze sein, die auf die Wiederherstellung der neuronalen Funktion und die Verhinderung weiterer Schäden abzielen.

5.1 Limitationen

Als größte Limitation der Ergebnisinterpretation dieser Studie ist die Verwendung eines Tiermodells zu nennen. Tiermodelle der MS haben zwar wesentlich zum Verständnis der Pathogenese und der potenziellen Behandlung der Krankheit beigetragen, und werden das in Zukunft noch tun, weisen jedoch auch erhebliche Limitationen auf. Zum einen sind die speziesspezifischen Unterschiede zu nennen. Die Immunsysteme und die ZNS-Architektur von Tieren unterscheiden sich grundlegend von denen des Menschen. Diese Unterschiede können die Übertragbarkeit der aus Tiermodellen gewonnenen Erkenntnisse auf menschliche Verhältnisse einschränken. Beispielsweise sind die entzündlichen Prozesse und die Immunantworten bei Tieren oft nicht identisch mit denen in Menschen und vielfach künstlich induziert. Des Weiteren können Tiermodelle Krankheitsmechanismen nur vereinfacht darstellen. Viele Tiermodelle konzentrieren sich nur auf bestimmte Aspekte der MS und können andere wichtige Faktoren, die zum Krankheitsbild des Menschen gehören, nicht oder nicht vollständig abbilden. Dies kann zu einem unvollständigen Bild der Krankheit führen. Außerdem waren in der Vergangenheit viele Therapien, die sich in Tiermodellen als wirksam erwiesen haben, beim Menschen letztlich doch nicht erfolgreich. Aufgrund dieser Limitationen ist bei der Interpretation von Ergebnissen aus Tiermodellen Vorsicht geboten. Während sie wertvolle Einblicke in die grundlegenden Mechanismen der Krankheit bieten und helfen können, potenzielle therapeutische Ziele zu identifizieren, ist eine kritische Bewertung erforderlich, um zu bestimmen, welche Ergebnisse wahrscheinlich auf den Menschen übertragbar sind. Es ist wichtig, Tiermodellresultate durch Studien an menschlichen Geweben und, wo möglich, durch klinische Versuche zu ergänzen, um die Relevanz und Sicherheit der potenziellen Behandlungen zu validieren.

5.2 Ausblick und weiterführende Forschung

Die Ergebnisse dieser Arbeit fügen sich nahtlos in die aktuelle Forschungslandschaft ein, die sich zunehmend auf die Bedeutung der Neuroimmunologie und die therapeutischen Potenziale von Ernährungsinterventionen konzentriert. Die Erkenntnis, dass VD signifikant die Astrozytenaktivität beeinflusst und dabei geschlechtsspezifische Unterschiede aufweist,

fordert eine tiefere Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen und eine stärkere Berücksichtigung dieser Aspekte in klinischen Studien.

Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die molekularen Mechanismen, die der Modulation von Astrozytenphänotypen durch VD zugrunde liegen, detaillierter zu erforschen. Es ist entscheidend, das Zusammenspiel von VD mit anderen immunmodulatorischen Signalwegen zu verstehen, um gezielte Therapien entwickeln zu können, die die Astrozytenfunktion in neurologischen Erkrankungen optimieren. Darüber hinaus wäre es von Bedeutung, klinische Studien durchzuführen, die die Wirksamkeit von VD in verschiedenen Phasen der MS und in unterschiedlichen Patientenpopulationen, einschließlich einer differenzierten Betrachtung nach Geschlecht, evaluieren.

6. Referenzen

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol.* 2019;26(1):27-40.
2. Procaccini C, De Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of Multiple Sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:182-91.
3. Nourbakhsh B, Mowry EM. Multiple Sclerosis Risk Factors and Pathogenesis. *Continuum (Minneap Minn).* 2019;25(3):596-610.
4. Lemus HN, Warrington AE, Rodriguez M. Multiple Sclerosis: Mechanisms of Disease and Strategies for Myelin and Axonal Repair. *Neurol Clin.* 2018;36(1):1-11.
5. Wang L, Liang Y. MicroRNAs as T Lymphocyte Regulators in Multiple Sclerosis. *Front Mol Neurosci.* 2022;15:865529.
6. Liu R, Du S, Zhao L, Jain S, Sahay K, Rizvanov A, et al. Autoreactive lymphocytes in multiple sclerosis: Pathogenesis and treatment target. *Front Immunol.* 2022;13:996469.
7. Parker Harp CR, Archambault AS, Sim J, Shlomchik MJ, Russell JH, Wu GF. B cells are capable of independently eliciting rapid reactivation of encephalitogenic CD4 T cells in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One.* 2018;13(6):e0199694.
8. Chacko JA, Strati P, Stout PW, Archer RL, Baltz BP, Chacko JG. Primary mediastinal large B-cell lymphoma in a patient on Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;49:102776.
9. Smith P. Animal Models of Multiple Sclerosis. *Curr Protoc.* 2021;1(6):e185.
10. Klineova S, Lublin FD. Clinical Course of Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018;8(9).
11. Tullman MJ. Overview of the epidemiology, diagnosis, and disease progression associated with multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 2013;19(2 Suppl):S15-20.
12. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA.* 2021;325(8):765-79.
13. Solomon AJ. Diagnosis, Differential Diagnosis, and Misdiagnosis of Multiple Sclerosis. *Continuum (Minneap Minn).* 2019;25(3):611-35.
14. Voskuhl RR. The effect of sex on multiple sclerosis risk and disease progression. *Mult Scler.* 2020;26(5):554-60.
15. Ysraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology.* 2019;156(1):9-22.
16. Kister I, Bacon T, Cutter GR. How Multiple Sclerosis Symptoms Vary by Age, Sex, and Race/Ethnicity. *Neurol Clin Pract.* 2021;11(4):335-41.
17. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol.* 2014;35(3):347-69.
18. Sparaco M, Bonavita S. The role of sex hormones in women with multiple sclerosis: From puberty to assisted reproductive techniques. *Front Neuroendocrinol.* 2021;60:100889.
19. Collongues N, Patte-Mensah C, De Seze J, Mensah-Nyagan AG, Derfuss T. Testosterone and estrogen in multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutics. *Expert Rev Neurother.* 2018;18(6):515-22.
20. Koch-Henriksen N, Magyari M. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2021;17(11):676-88.
21. The Multiple Sclerosis International Federation, Atlas of MS, 3rd Edition
The Multiple Sclerosis International Federation (MSIF); 2020 [Available from: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms>. (abgerufen am 25.05.2023)]

22. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020;133(12):1380-90 e2.
23. Multiple Sklerosis [updated 03.04.2023. Available from: https://www.amboss.com/de/wissen/Multiple_Sklerose/ (abgerufen am 13.04.2023).
24. Olek MJ. Multiple Sclerosis. *Ann Intern Med.* 2021;174(6):ITC81-ITC96.
25. Freeman L, Longbrake EE, Coyle PK, Hendin B, Vollmer T. High-Efficacy Therapies for Treatment-Naive Individuals with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs.* 2022;36(12):1285-99.
26. Hemmer B. et al., Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie, 2023, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 29.04.2024)
27. Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:173-89.
28. Sen MK, Mahns DA, Coorssen JR, Shortland PJ. The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. *Glia.* 2022;70(7):1215-50.
29. Ucal M, Haindl MT, Adzemovic MZ, Strasser J, Theisl L, Zeitelhofer M, et al. Widespread cortical demyelination of both hemispheres can be induced by injection of pro-inflammatory cytokines via an implanted catheter in the cortex of MOG-immunized rats. *Exp Neurol.* 2017;294:32-44.
30. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic Effects of Vitamin D on Human Health and Disease. *Nutrients.* 2020;12(7).
31. Scazzone C, Agnello L, Bivona G, Lo Sasso B, Ciaccio M. Vitamin D and Genetic Susceptibility to Multiple Sclerosis. *Biochem Genet.* 2021;59(1):1-30.
32. Ao T, Kikuta J, Ishii M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. *Biomolecules.* 2021;11(11).
33. Kucuk A, Bir LS, Tekin S, Demir S. Serum 25(OH) vitamin D level in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis and clinically isolated syndrome groups. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2022;43(3):281-8.
34. Matias-Guiu J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia (Engl Ed).* 2018;33(3):177-86.
35. Krenek P, Benesova Y, Bienertova-Vasku J, Vasku A. The Impact of Five VDR Polymorphisms on Multiple Sclerosis Risk and Progression: a Case-Control and Genotype-Phenotype Study. *J Mol Neurosci.* 2018;64(4):559-66.
36. Goudarzvand M, Javan M, Mirnajafi-Zadeh J, Mozafari S, Tiraihi T. Vitamins E and D3 attenuate demyelination and potentiate remyelination processes of hippocampal formation of rats following local injection of ethidium bromide. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30(2):289-99.
37. Abbateamarco JR, Fox RJ, Li H, Ontaneda D. Vitamin D and MRI measures in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2019;35:276-82.
38. Haindl MT, Ucal M, Wonisch W, Lang M, Nowakowska M, Adzemovic MZ, et al. Vitamin D-An Effective Antioxidant in an Animal Model of Progressive Multiple Sclerosis. *Nutrients.* 2023;15(15).
39. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
40. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener.* 2020;9(1):42.

41. Haindl MT, Ucal M, Tafrali C, Wonisch W, Erdogan C, Nowakowska M, et al. Sex Differences under Vitamin D Supplementation in an Animal Model of Progressive Multiple Sclerosis. *Nutrients*. 2024;16(4).
42. Sangha A, Quon M, Pfeffer G, Orton SM. The Role of Vitamin D in Neuroprotection in Multiple Sclerosis: An Update. *Nutrients*. 2023;15(13).
43. Dupuis ML, Pagano MT, Pierdominici M, Ortona E. The role of vitamin D in autoimmune diseases: could sex make the difference? *Biol Sex Differ*. 2021;12(1):12.
44. Rupprecht M, Wagenpfeil S, Schope J, Vieth R, Vogt T, Reichrath J. Meta-Analysis of European Clinical Trials Characterizing the Healthy-Adult Serum 25-hydroxyvitamin D Response to Vitamin D Supplementation. *Nutrients*. 2023;15(18).
45. Avila M, Bansal A, Culbertson J, Peiris AN. The Role of Sex Hormones in Multiple Sclerosis. *Eur Neurol*. 2018;80(1-2):93-9.
46. Klotz L, Antel J, Kuhlmann T. Inflammation in multiple sclerosis: consequences for remyelination and disease progression. *Nat Rev Neurol*. 2023;19(5):305-20.
47. Magyari M. Gender differences in multiple sclerosis epidemiology and treatment response. *Dan Med J*. 2016;63(3).
48. Ryan L, Mills KHG. Sex differences regulate immune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2022;52(1):24-33.
49. Martinez de Toda I, Gonzalez-Sanchez M, Diaz-Del Cerro E, Valera G, Carracedo J, Guerra-Perez N. Sex differences in markers of oxidation and inflammation. Implications for ageing. *Mech Ageing Dev*. 2023;211:111797.

7. Anhang

Tabelle 8: Einzelne Arbeitsschritte der Immunhistochemischen Färbung

Tag 1		
1	2x 10 min Xylol	Wachsreste entfernen
2	2x 96% Ethanol	waschen
3	30 min H ₂ O ₂ -Methanol	Zerstörung der endogenen Peroxidase (Störfaktoren minimieren)
4	70% Ethanol, 50% Ethanol, A.d.	rehydrieren
5	1 h dampfgaren in Citrat	aufbrechen der Quervernetzungen der Formalinfixierung
6	1 h bei Raumtemperatur abkühlen dann 2x in PBS waschen	
7	Gewebe mit Dako-Pen abgrenzen und Objektträger in Färbewanne mit etwas PBS legen	verhindert das Auslaufen der Flüssigkeiten am Schnitt, der Puffer in der Färbewanne verhindert das Austrocknen der Schnitte
8	2,5% Pferdeserum in Diluent (2,5%PD; Blockerlösung) für 20 min 200µl pipettieren	Verhindern unspezifische Bindestellen
9	Blockierlösung ableeren und primären AK, verdünnt in 2,5%PD laut Austestung auftragen und über Nacht bei 4 °C inkubieren	
Tag 2		
1	Schnitte 2x mit PBS waschen	
2	Sekundärantikörper auftragen (3-5Tropfen), 30 min inkubieren und dann mit PBS waschen	Sekundärantikörper muss gegen Primärantikörper gerichtet sein
3	Mit DAB unter mikroskopischer Kontrolle entwickeln und Färbung mit Leitungswasser stoppen	Visualisierung
4	3-5 min in Hämalaun	Gegenfärbung (Rotfärbung der Kerne)
5	Spülung 2x in H ₂ O	waschen und bläuen beginnen
6	HCl-Ethanol	Differenzieren
7	2x mit Aqua destillata (AD) spülen	waschen
8	3-5 min Bläuendes Reagenz	pH-Wert Änderung, Verfärbung bis ins Gräuliche
9	AD spülen, in aufsteigender Alkoholreihe (50%-, 70%-, 3x 96%-, 100%-Ethanol) entwässern	dehydrieren
10	n-Butylacetat und eindecken	

Tabelle 9: Liste der Primärantikörper

Antikörper	Target	Host	Verdünnung	Firma	Bestellnummer
C3d	Anti-A1 Astrocytes	Ziege	1:1000	R&D Systems	AF2655
GFAP	Anti-GFAP Ab-6 (Clone ASTRO6)	Maus	1:100	Thermo Scientific	MS1376-P
Iba1	Anti-Iba1	Hase	1:1000/0	Wako	019-197441
NeuN	Anti-NeuN, clone A60 (KC)	Maus	1:100	Millipore	MAB377
PLP	Anti- Proteolipid protein (Myelinprotein)	Maus	1:500	Serotec	MCA839G
S100A10	Anti-A2 Astrocytes	Hase	1:000	Abcam	Ab187201