

Diplomarbeit

**Serum Stickoxid als Marker für
Krankheitsprogression bei multipler Sklerose**

eingereicht von

Daniel Moser

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Neurologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Michael Khalil, PhD

Sen.Scientist Priv.-Doz. Mag. Dr.rer.nat Hans-Jürgen Gruber

Graz, 24.04.2018

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 24.04.2018

Daniel Moser eh

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ Michael Khalil, PhD für die Möglichkeit zur Arbeit mit dieser Thematik bedanken, sowie für die geduldige Unterstützung und sein Engagement über den gesamten Zeitraum in der diese Diplomarbeit entstanden ist. Ohne diese Unterstützung hätte diese Arbeit nicht in dieser Form entstehen können.

Außerdem möchte ich mich bei Martin Söllradl, Franz Hallwirth und Margarete Voortman für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität, welche mir oft geholfen hat die Motivation beim Erstellen der Diplomarbeit hoch zu halten, bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern Gisi und Hans, für die Möglichkeit Medizin zu studieren und für die jahrelange unentwegte und bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen.

Einen weiteren großen Dank möchte ich meiner Freundin Sarah aussprechen, da sie mir während meiner gesamten Studienzeit einen starken Rückhalt gegeben hat.

Abschließend möchte mich auch bei meinen Freundinnen und Freunden bedanken, denn erst sie haben die Studienzeit in Graz zu etwas Besonderem gemacht.

Zusammenfassung

Hintergrund: Oxidativer Stress spielt eine zentrale Rolle in der Pathologie der multiplen Sklerose (MS) und führt zu Neurodegeneration und Krankheitsprogression. Rezente Studien weisen darauf hin, dass neben reaktiven Sauerstoffspezies auch reaktive Stickstoffspezies, besonders das freie Radikal Stickoxid (NO_x), welches durch DNA Schädigung, Störung von mitochondrialen Funktionen, Schädigung und Durchtrennung von Axonen und Apoptose von Neuronen die Pathogenese der MS vorantreibt. Verschiedene Studien beschäftigen sich mit NO_x im Liquor, die Rolle von NO_x im Serum bei MS ist allerdings weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Diplomarbeit war es, Serum NO_x in einer größeren MS-Kohorte zu untersuchen und mit gesunden Kontrollen (KG) zu vergleichen und den Zusammenhang mit klinischen Daten zu beurteilen um somit eine Eignung von Serum NO_x als Progressionsmarker zu überprüfen.

Methoden: Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden 214 Serumproben untersucht, davon 29 PatientInnen mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS) (Durchschnittsalter 36,4 SD 9,7 Jahre), 109 MS PatientInnen (Durchschnittsalter 36,6 SD 9,3 Jahre) und 79 KG (Durchschnittsalter 36,2 SD 9,0 Jahre). 86 (62,3 %) der CIS/MS PatientInnen erhielten verlaufsmodifizierende Therapie (Interferon- β n = 53, Glatirameracetat n = 13, Natalizumab n = 20). Die Serum NO_x Konzentration wurde mit dem Nitric Oxide Quantification Kit (Active Motif) bestimmt.

Ergebnisse: Es konnte ein erhöhter Serum NO_x Wert bei unbehandelten CIS/MS PatientInnen (Median 9,2 IQR 7,3-14,1 μM) im Vergleich mit Personen unter verlaufsmodifizierender Therapie (Median 6,6 IQR 4,9-10,3 μM) ($p < 0,01$) und der KG (Median 7,6 IQR 5,8-10,9 μM) ($p = 0,05$) gezeigt werden. Zwischen verschiedenen Krankheits- und Behandlungsformen lag kein signifikanter Unterschied des Serum NO_x Wertes vor. Frauen hatten unter den CIS/MS PatientInnen einen höheren Serum NO_x Wert (Median 8,9 IQR 6,1-13,4 μM) im Vergleich zu Männern (Median 6,6 IQR 4,9-9,1 μM) ($p < 0,05$). Es gab keinen Zusammenhang zwischen Serum NO_x , Alter, Expanded Disability Status Scale, Lebensstilfaktoren und Erkrankungsdauer.

Diskussion: Es konnten signifikant erhöhte Serum NO_x Werte bei unbehandelten MS PatientInnen festgestellt werden, welche bei PatientInnen mit verlaufsmodifizierender Therapie auf Werte gesunder Kontrollen herabgesetzt waren. MS Patientinnen scheinen stärker von erhöhten NO_x Werten betroffen zu sein. Es sind weitere Studien nötig, um das Potential von Serum NO_x als Biomarker zur Überwachung der Krankheitsaktivität und der Behandlungseffizienz bei MS zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen des MSPARIS2017 – 7th Joint ECTRIMS – ACTRIMS Meeting von 25-28. Oktober 2017 in Paris, Frankreich als Poster veröffentlicht.(1)

Abstract

Background: Oxidative stress plays a central role in multiple sclerosis (MS) pathology leading to neurodegeneration and disease progression. Recent research indicates that apart from reactive oxygen species, reactive nitrogen species, in particular the free radical nitric oxide (NO_x) may be a driving factor in MS pathology by promoting DNA damage, mitochondrial dysfunction, axonal swelling and transection and neuronal apoptosis. So far there are some reports investigating NO_x in cerebrospinal fluid, but the role of serum NO_x in MS remains largely unclear.

Objective: We aimed to investigate the role of serum NO_x in a larger cohort of MS patients compared to healthy donors (KG) and assess its relation to clinical data.

Methods: The study included 214 samples from 29 clinically isolated syndrome (CIS) (mean age 36,4 SD 9,7 years), 109 MS (mean age 36,3 SD 9,3 years) patients and 79 KG (36,2 SD 9,0 years). Among CIS/MS patients 86 (62,3 %) received disease modifying therapy (Interferon-β n = 53, Glatiramer acetate n = 13, Natalizumab n = 20). Serum NO_x concentration was determined by a spectrophotometric analysis and quantification of its metabolites nitrate and nitrite using the nitrate reductase and Griess reaction method (Nitric Oxide Quantitation Kit, Active Motif).

Results: We found increased serum NO_x levels in untreated (median 9,2 IQR 7,3-14,1 μM) compared to treated MS patients (median 6,6 IQR 4,9-10,3 μM) ($p < 0,01$) and KG (median 7,6 IQR 5,8-10,9 μM) ($p = 0,05$). Serum NO_x levels were comparable among different MS therapies and MS subtypes. Only in CIS/MS we found higher serum NO_x in female (median 8,9 IQR 6,1-13,4 μM) compared to male (median 6,6 IQR 4,9-9,1 μM) patients ($p < 0,05$). Serum NO_x was unrelated to age, the Expanded Disability Status Scale Score, disease duration and age at disease onset.

Conclusion: Abnormal high serum NO_x levels are present in untreated MS patients, which are reduced to levels of KG under effective immunomodulatory

therapy. Female MS patients seem to be more affected by an imbalanced NO_x serum status. Future studies are needed to investigate if serum NO_x may serve as a marker to monitor disease activity and treatment efficacy in MS.

The results of this study were published as a poster at the MSPARIS2017 – 7th JointECTRIMS – ACTRIMS Meeting 25-28 October in Paris, France.(1)

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN	II
ZUSAMMENFASSUNG.....	III
ABSTRACT	V
INHALTSVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGEN	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	X
TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
1 EINLEITUNG	1
1.1 EPIDEMIOLOGIE	2
1.2 ÄTIOLOGIE.....	3
1.2.1 <i>Genetik</i>	4
1.2.2 <i>Umweltfaktoren</i>	4
1.3 VERLAUFSFORMEN	5
1.3.1 <i>Klinisch isoliertes Syndrom</i>	5
1.3.2 <i>Schubförmig remittierende multiple Sklerose</i>	7
1.3.3 <i>Sekundär progrediente multiple Sklerose</i>	7
1.3.4 <i>Primär progrediente multiple Sklerose</i>	8
1.4 PATHOGENESE.....	8
1.4.1 <i>Inflammation und Autoimmunität</i>	9
1.4.2 <i>Axonschädigung und Neurodegeneration</i>	12
1.4.3 <i>Oxidativer und nitrosativer Stress</i>	15
1.4.4 <i>Die Rolle von Stickoxid in der Pathogenese vom MS</i>	16
1.5 DIAGNOSTIK	18
1.5.1 <i>Klinische Symptomatik</i>	18
1.5.2 <i>Neurologische Untersuchung</i>	20
1.5.3 <i>McDonald Kriterien</i>	21
1.5.4 <i>Magnetresonanztomographie</i>	25

1.5.5	<i>Liquor Diagnostik</i>	28
1.5.6	<i>Evozierte Potenziale</i>	30
1.5.7	<i>Differentialdiagnosen</i>	31
1.6	THERAPIE	34
1.6.1	<i>Schubtherapie</i>	37
1.6.2	<i>Verlaufsmodifizierende Therapie</i>	37
1.7	BIOMARKER BEI MULTIPLER SKLEROSE	41
1.7.1	<i>Biomarker in verschiedenen Körperflüssigkeiten</i>	42
1.7.2	<i>Notwendigkeit der Erforschung neuer Biomarker</i>	43
1.7.3	<i>Biomarker für Neurodegeneration und Axonschädigung</i>	44
1.8	FRAGESTELLUNG	46
2	MATERIAL UND METHODEN	48
2.1	PATIENTINNEN, PATIENTEN UND KONTROLLEN	48
2.2	BLUTABNAHME UND BESTIMMUNG DES SERUM NO _x WERTES.....	48
2.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	DEMOGRAPHISCHE DATEN.....	50
3.2	SERUM NO _x WERTE	51
3.2.1	<i>Gruppenvergleiche</i>	51
3.2.2	<i>Einfluss von verlaufsmodifizierender Therapie auf Serum NO_x</i>	52
3.2.3	<i>Einfluss von Lebensstilfaktoren auf Serum NO_x</i>	53
3.3	KORRELATIONEN	55
4	DISKUSSION	56
5	LITERATURVERZEICHNIS	64

Abkürzungen

ADEM	Akut disseminierte Enzephalomyelitis
AQP4-IgG	IgG Antikörper gegen Aquaporin 4
ATP	Adenosintriphosphat
BBB	Blut-Hirn-Schranke (blood-brain barrier)
BMI	Body Mass Index
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom
CSF	Liquor
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EP	Evozierte Potentiale
FLAIR:	Fluid-attenuated inversion recovery
GKS	Glukokortikosteroide
IgG	Immunglobulin G
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
K ⁺	Kalium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
Na ⁺	Natrium
NAWM	Normal-appearing white matter
NMO	Neuromyelitis optica
NO	Stickoxid, Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
OCB	Oligoklonale Banden
PPMS	Primär progrediente MS
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RRMS	Schubförmig remittierende MS
SPMS	Sekundär progrediente MS
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Globale Prävalenz der multiplen Sklerose 2013	2
Abbildung 2: Verlaufsformen der MS.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Schädigung des ZNS bei MS	9
Abbildung 4: Axonschädigung und Neurodegeneration	13
Abbildung 5: Evolution einer MS Läsion	27
Abbildung 6: Klassifizierung von OCB Mustern	29
Abbildung 7: Vergleich verschiedener krankheitsmodifizierender MS-Therapien mit Placebo.....	40
Abbildung 8: Serum NO _x Werte bei Männern und Frauen innerhalb der CIS/MS Gruppe	52
Abbildung 9: Serum NO _x Werte bei Personen mit CIS/MS die eine Therapie erhalten und bei Personen ohne Therapie	53
Abbildung 10: Serum NO _x Werte bei Personen mit CIS/MS die zum Zeitpunkt der Probeentnahme geraucht haben im Vergleich mit Personen die zum Zeitpunkt der Probeentnahme nicht geraucht haben	54
Abbildung 11: Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag und deren Einfluss auf den Serum NO _x Wert.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte klinische Symptome nach Läsionsort	19
Tabelle 2: McDonald Kriterien 2017 für die Diagnostik der MS bei Personen mit einem Schub bei Ausbruch der Erkrankung.	23
Tabelle 3: McDonald 2017 Kriterien für die Diagnostik von MS bei Personen mit progredientem Verlauf ab Ausbruch der Erkrankung	24
Tabelle 4: Ausgewählte Differentialdiagnosen mit schubhaft-remittierenden Verlauf	33
Tabelle 5: Therapieschema der Deutschen Gesellschaft für Neurologie	36
Tabelle 6: Demographische und klinische Daten.....	51

1 Einleitung

Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Im Laufe der Erkrankung kommt es zur Schädigung von Myelin und Axonen, dies führt zur Ausbildung der klinischen Symptome. Ein Merkmal der Erkrankung sind sogenannte Plaques in der weißen und grauen Substanz von Gehirn und Rückenmark, diese entstehen durch Verlust von Myelinscheiden und Oligodendrozyten.

Das klinische Bild der MS ist sehr heterogen, es kann zu kognitiven, visuellen, sensorischen oder motorischen Störungen kommen aber auch zu Schmerzen und vielen weiteren Symptomen, von denen nur wenige spezifisch für MS sind. Ursächlich dafür, welche Symptome sich zeigen, ist die Lokalisation der Schädigung im ZNS.(2,3)

Neben dem klinischen Bild der MS ist auch der Verlauf heterogen. Bei etwa 85 % der Patientinnen und Patienten verläuft die Krankheit anfänglich schubförmig-remittierend, dies bedeutet, dass auf Phasen der Erkrankung Phasen mit teilweise vollständiger Rückbildung der Symptome folgen, welche als Remissionsphasen bezeichnet werden. Mit Fortschritt der Erkrankung nimmt die Besserung der Symptome nach weiteren Schüben ab und es kommt zur progredienten Verschlechterung. Bei etwa 10 % der Patientinnen und Patienten kommt es nach dem ersten Auftreten von Symptomen zu keiner Remission, der Verlauf ist von Beginn an progredient.(3)

Für die Progression verantwortlich ist die Anhäufung der axonalen Schädigungen im Verlauf der Erkrankung und die daraus folgende Neurodegeneration.(2)

MS ist eine häufige Ursache für ernsthafte körperliche Beeinträchtigung bei jungen Erwachsenen, das durchschnittliche Alter bei Erkrankungsbeginn liegt bei rund 30 Jahren. 25 Jahre nach Erstdiagnose benötigen etwa 50 % der Patientinnen und Patienten permanent einen Rollstuhl, darüber hinaus vermindert MS die Lebenserwartung um 5-10 Jahre.(2,3)

Die genaue Ursache der MS ist noch unbekannt, epidemiologische Daten weisen jedoch darauf hin, dass sowohl genetische Faktoren, als auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen.(4)

1.1 Epidemiologie

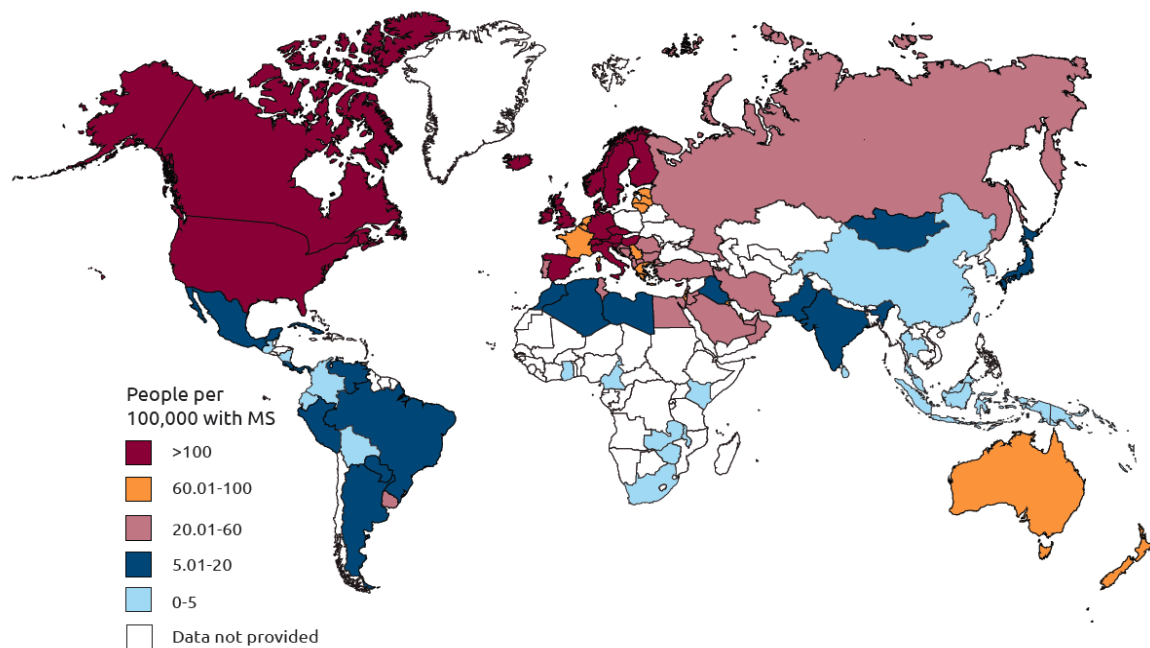


Abbildung 1: Globale Prävalenz der multiplen Sklerose 2013. ©Multiple Sclerosis International Federation. Aus Atlas of MS.

2013 waren weltweit etwa 2,3 Millionen Menschen an MS erkrankt. Die Prävalenz (Anzahl der MS Patientinnen und Patienten pro 100 000 Personen zu einem definierten Zeitpunkt) ist im Vergleich zu den Jahren davor steigend, was vermutlich einerseits an längerer Lebenserwartung und ansteigender Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen pro 100 000 Personen pro Jahr) liegt, andererseits können auch Verbesserungen in der Diagnostik der MS ein Grund für den Anstieg sein.(5)

Die Inzidenz der MS hat ihren Höhepunkt bei etwa 30 Jahren, die Prävalenz ist bei etwa 50 Jahren am höchsten.

Inzidenz und Prävalenz der MS variieren geographisch sehr stark, wie in Abbildung 1 dargestellt wird. Ein rezenter Übersichtsartikel untersuchte epidemiologische Studien seit 1965, demnach liegen die höchsten Prävalenzen in Europa und Nordamerika vor. In Zentral- und Osteuropa, Australien und Neuseeland ist die Prävalenz niedriger, die niedrigsten Prävalenzen liegen in Asien, dem mittleren Osten und Afrika vor.(6) Derselbe Übersichtsartikel stellte auch die gängige Hypothese infrage, dass das Risiko an MS zu erkranken mit den Breitengraden von Süden nach Norden ansteigt.(6,7)

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Migration einen Einfluss auf das Risiko an MS zu erkranken hat. So korreliert beispielsweise der Ort, an dem die frühe Kindheit verbracht wird, mit dem Risiko an MS zu erkranken. Migration aus einer Hochrisikoregion in eine Niedrigrisikoregion während der Kindheit ist mit einem reduzierten Risiko MS zu entwickeln assoziiert und umgekehrt.(2,8–10)

In Österreich beträgt die Prävalenz der MS 98,5 pro 100 000 Einwohner, was etwa den Werten anderer Länder Zentraleuropas entspricht.(11)

Frauen erkranken häufiger an MS als Männer, ein systematisches Review, das 28 epidemiologische Studien untersuchte, konnte zeigen, dass die Inzidenz bei Frauen im Vergleich zu Männern von 1955 bis 2000 von 1,4:1 auf 2,3:1 angestiegen ist.(7)

1.2 Ätiologie

MS ist eine komplexe Erkrankung, zum Ausbruch der Erkrankung kommt es durch ein Zusammenspiel verschiedener Umweltfaktoren bei genetisch empfänglichen Patienten. Die exakte Ursache und ob bei allen Betroffenen derselbe Auslöser vorliegt, ist nach aktuellem Wissensstand nicht bekannt.(3,12)

1.2.1 Genetik

Das Risiko an MS zu erkranken ist mit verschiedenen Allelen auf dem Major Histocompatibility Complex (MHC) assoziiert. Die genauen Mechanismen sind hochkomplex, verschiedene Haplotypen sind mit einem bis zu dreifach erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass andere MHC Haplotypen wiederum einen protektiven Effekt haben.(4,13,14) In anderen Studien konnte auch ein mäßiger Einfluss von anderen Genen wie Interleukin-7 Rezeptor α , interleukin-2 Rezeptor α , CD58 oder CD6 auf das Erkrankungsrisiko der MS gezeigt werden.(4)

Auch die ethnische Herkunft spielt eine Rolle, die Prävalenz bei männlichen Afroamerikanern ist beispielsweise niedriger als jene von weißen männlichen Amerikanern.(4,15) Das Geschlecht hat ebenso Einfluss darauf, ob es zu einer Erkrankung mit MS kommt. Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, tritt MS bei Frauen häufiger auf als bei Männern, durch verschiedene Studien konnte jedoch kein Zusammenhang mit MS assoziierten Genen auf dem X-Chromosom festgestellt werden.(4)

In einer großen dänischen Studie konnte gezeigt werden, dass das Risiko an MS zu erkranken für Verwandte ersten Grades um das Siebenfache erhöht ist.(16) In einer anderen landesweiten Studie in Dänemark wurden Zwillinge untersucht, laut dieser Studie liegt das Lebenszeitrisiko an MS zu erkranken für eineiige Zwillinge, wenn der andere Zwilling bereits erkrankt ist, bei etwa 24 %. Bei zweieiigen Zwillingen liegt es hingegen nur bei 3 %. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten aus anderen Zwillingsstudien.(2,17)

1.2.2 Umweltfaktoren

Eine Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2015 befasste sich mit publizierten Studien und Metaanalysen zum Thema Umweltfaktoren und MS. Demnach zeigten die Risikofaktoren Epstein-Barr Virusinfektion und Rauchen die stärkste Konstanz in Bezug auf eine Assoziation mit MS.(18)

Als Einflussfaktoren werden unter anderem verschiedene Infektionen, der Breitengrad, der Vitamin D Spiegel, Sonnenexposition, Ernährungsverhalten, der Geburtsmonat, das Mikrobiom des Darmes und weitere Faktoren in der Literatur diskutiert.(4,12,18–20)

1.3 Verlaufsformen

Das International Advisory Committee on Clinical Trials of MS überarbeitete im Jahr 2013 die im Jahr 1996 vom US National Multiple Sclerosis Society Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis definierten Phänotypen der MS und stellte die vier folgenden überarbeiteten Verlaufsformen (Abbildung 2) zur Verfügung (21):

- Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)
- Schubförmig remittierende MS (RRMS)
- Sekundär progrediente MS (SPMS)
- Primär progrediente MS (PPMS)

1.3.1 Klinisch isoliertes Syndrom

Der Begriff CIS wird verwendet, um eine erste klinische Episode zu beschreiben, in der eine Person Symptome zeigt, die auf eine entzündlich demyelinisierende Erkrankung des ZNS hindeutet. Die Episode muss mindestens 24 Stunden andauern und es dürfen keine Infektionszeichen, Fieber oder klinische Hinweise auf eine Enzephalopathie vorliegen. Außerdem muss ein CIS zeitlich isoliert auftreten.

Beim Auftreten eines CIS liegt meist keine räumliche Dissemination vor (monofokal), die Symptome deuten dabei größtenteils auf eine Läsion im N. opticus, Rückenmark, Hirnstamm oder Kleinhirn hin. Allerdings kommt es bei manchen Patientinnen und Patienten zu einer räumlichen Dissemination (multifokal), es liegen also beispielsweise Symptome wie eine Optikusneuritis und

eine Ataxie vor, die auf Läsionen im Bereich des N. opticus und des Kleinhirns hinweisen.(22,23)

In der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen sich bei 50-70 % der Erwachsenen mit CIS zusätzlich multiple asymptomatische Läsion in der weißen Substanz des Gehirns, die auf Demyelinisierung hinweisen. In diesen Fällen liegt das Langzeitrisiko an MS zu erkranken bei 60-80 %. Ist die MRT bis auf die symptomatische Läsion unauffällig, beträgt das Langzeitrisiko jedoch nur etwa 20 %.(22)

Das CIS erfüllt somit die diagnostischen Kriterien eines MS Schubes, jedoch liegt noch keine zeitliche Dissemination vor. Beim Großteil aller an MS erkrankten Personen beginnt die Erkrankung mit einem CIS.(22,24)

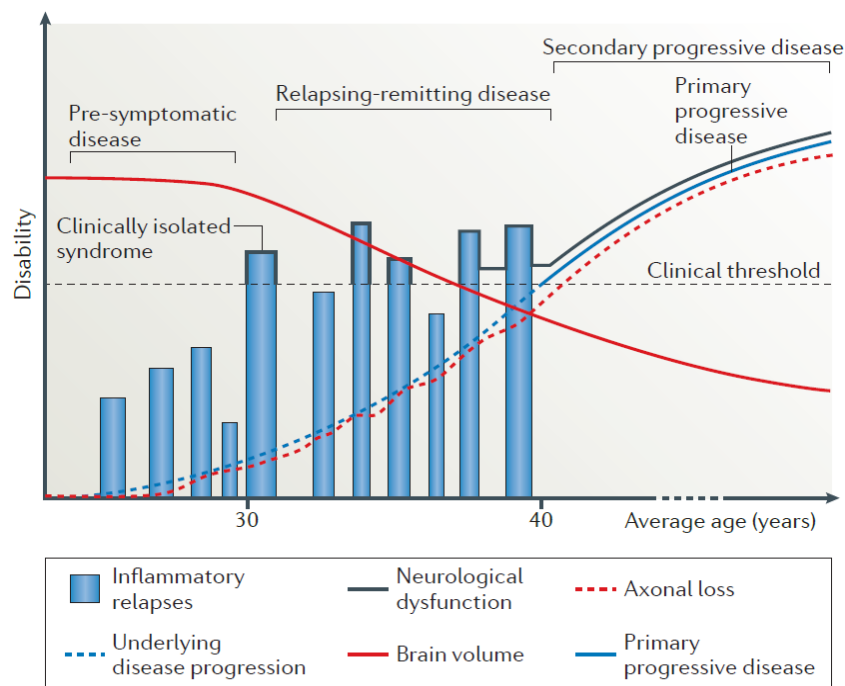


Abbildung 2: Verlaufsformen der MS. Blaue Balken = entzündliche Schübe, blaue strichlierte Linie = Progression, schwarze Linie = neurologische Störungen, rote Linie = Hirnvolumen, rote strichlierte Linie = Axonverlust, blaue Linie = PPMS, schwarz strichlierte Linie = klinische Schwelle. [Reproduced from (3) with permission from Nature Publishing Group.]

1.3.2 Schubförmig remittierende multiple Sklerose

RRMS ist die häufigste Verlaufsform und betrifft 85-90 % aller Patientinnen und Patienten mit MS. Diese Verlaufsform ist charakterisiert durch das wiederholte Auftreten von Schüben (zeitliche Dissemination) und anschließenden Phasen der Remission. Ein Schub entspricht einer Episode neurologischer Störung, die mindestens 24 Stunden anhält, gleichzeitig dürfen keine Infektionszeichen oder Fieber vorliegen. Ein erster Schub bei dem Verdacht auf RRMS wird als CIS bezeichnet. Die Remissionsphasen sind variabel, es kann zu vollständiger Rückbildung der klinischen Symptome eines Schubs kommen aber auch zu unvollständiger Rückbildung der Symptomatik.(25)

Die Diagnose RRMS kann durch Anwendung der McDonald 2017 Kriterien auch bereits bei Auftreten des ersten Schubes mit Hilfe von MRT und Liquor Diagnostik gestellt werden. Dadurch ist es möglich, bereits bei einem Drittel der Patientinnen und Patienten, die sich klinisch mit einem CIS präsentieren, eine MS zu diagnostizieren.(25–27)

Mit Fortdauer der Erkrankung lässt die Rückbildung der Symptome in den Remissionsphasen nach und etwa 85 % entwickeln eine SPMS.(3)

1.3.3 Sekundär progrediente multiple Sklerose

SPMS wird in den meisten Fällen retrospektiv, durch eine progrediente Verschlechterung eines Anfangs schubförmigen Verlaufs, diagnostiziert. Bei diesen Patientinnen und Patienten nimmt die Schubrate ab oder es kommt zum vollständigen Sistieren der Schübe, während es zu einer langsamen, kontinuierlich fortschreitenden Verschlechterung der Symptomatik kommt. Derzeit gibt es noch keine klaren Parameter, weder pathologisch, immunologisch noch radiologisch, um den genauen Übergang von RRMS zu SPMS zu bestimmen.(21,28) In einer Studie die 2484 RRMS Patientinnen und Patienten einschloss, lag die Zeit bis zum Übergang von RRMS in SPMS im Median 18,9 Jahre.(29)

1.3.4 Primär progrediente multiple Sklerose

Diese Form betrifft etwa 10-15 % der MS Patientinnen und Patienten. Die PPMS ist gekennzeichnet durch eine schleichende progrediente Verschlechterung der Symptomatik, in der Regel ohne aufgesetzte Schübe. Die Erkrankung beginnt bei dieser Form mit etwa 40 Jahren und ist somit im Vergleich zu RRMS später. Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen.(21,25,30)

1.4 Pathogenese

Charakteristisch für die Pathologie der MS (Abbildung 3) sind demyelinisierte Areale in der weißen und grauen Substanz in Gehirn und Rückenmark, welche als Plaques oder Läsionen bezeichnet werden und den Verlust von Myelinscheiden und Oligodendrozyten anzeigen. Sie stellen das Endprodukt eines Prozesses dar, in den Entzündung, Demyelinisierung, Remyelinisierung, Oligodendrozytenverlust, Astroglie, sowie Axonschädigung und Neurodegeneration involviert sind.(2,3)
Inflammation ist in allen Stadien der MS vorhanden, verstärkt in akuten Erkrankungsphasen.(3)

Die Pathogenese der MS ist aufgrund ihrer hohen Komplexität weiterhin Gegenstand aktueller Forschung, die genau ablaufenden Prozesse sind jedoch noch immer unbekannt.

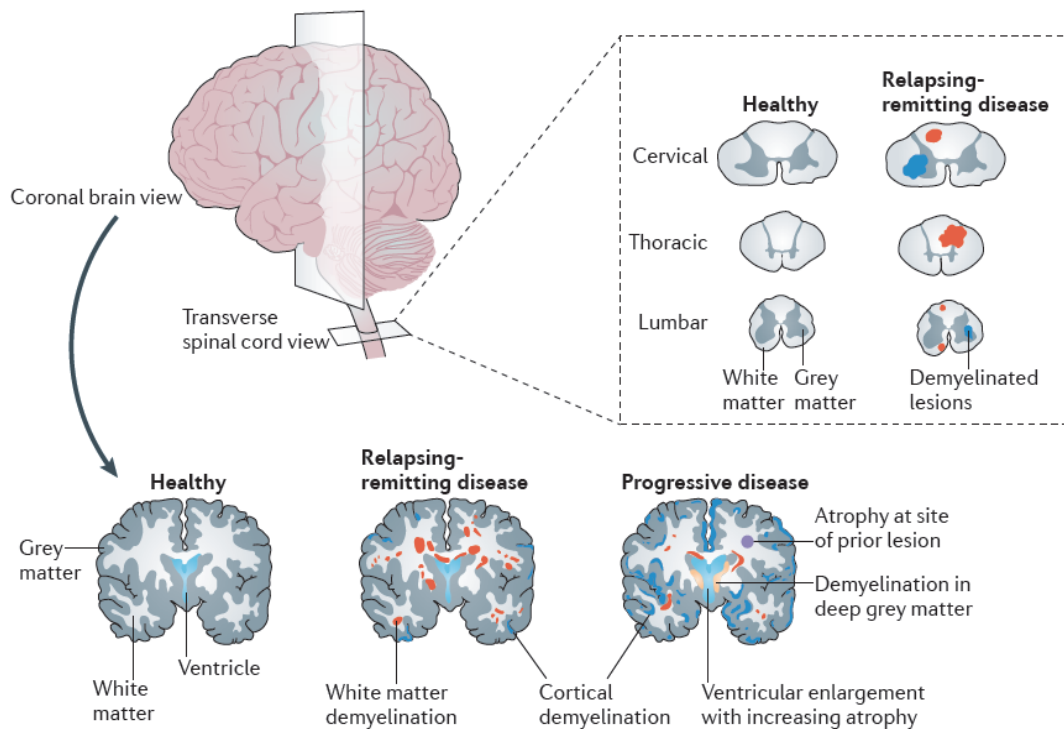


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Schädigung des ZNS bei MS. Dunkelgrau = graue Substanz, hellgrau = weiße Substanz, rot = demyelinisierte Läsionen in der weißen Substanz, blau = demyelinisierte Läsionen in der grauen Substanz, hellblau = Ventrikel, violett = Atrophie am Ort einer vorherigen Läsion, beige = Demyelinisierung im Bereich der Kerngebiete der grauen Substanz. Die Box rechts zeigt die Veränderungen im Rückenmark bei RRMS (rechts) im Vergleich mit einer gesunden Person (links) anhand eines transversalen Schnittes durch das Rückenmark auf drei verschiedenen Ebenen (Hals-, Brust- und Lumbalmark). Unten zeigen drei koronare Schnitte durch das Gehirn die Veränderungen bei MS (Mitte RRMS, rechts progredienter Verlauf) im Vergleich mit einem gesunden Gehirn (links). [Reproduced from (3) with permission from Nature Publishing Group.]

1.4.1 Inflammation und Autoimmunität

Die Hypothese, dass MS eine Autoimmunerkrankung ist, stammt hauptsächlich aus den Beobachtungen der Ähnlichkeiten von MS und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der MS. Während die EAE als Myelin spezifische T-Zell Antwort, die in der Peripherie ausgelöst wird und in Folge aktivierte T-Zellen in das zentrale Nervensystem (ZNS) infiltrieren,

beschrieben werden kann, ist die Pathologie der MS um ein Vielfaches komplexer. (31,32)

Derzeitige Erklärungsmodelle der MS gehen größtenteils davon aus, dass der Erkrankungsprozess mit der vermehrten Migration von autoreaktiven Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke („Blood-Brain Barrier“, BBB) beginnt. Der Übergang von physiologischer Funktion des Immunsystems zu pathologischer Schädigung liegt in einer Kaskade von regulatorischen Defekten, die schlussendlich zu einer Immunreaktion im zentralen Nervensystem führen. Das radiologische Korrelat zur Störung der BBB zeigt sich in der Magnetresonanztomographie durch Läsionen, welche gadoliniumhaltiges Kontrastmittel aufnehmen. (Abbildung 5). (2,33)

Die Migration der Lymphozyten über die BBB wird vor allem von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Matrix-Metallo-Proteinasen bestimmt. Hervorzuheben ist in Bezug auf MS das Adhäsionsmolekül $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, welches an der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten exprimiert wird und mit dem „vascular adhesion molecule 1“ an der Oberfläche von Kapillarendothelien interagiert. Die Wichtigkeit dieser Interaktion zeigt sich durch die Wirkungsweise des humanisierten monoklonalen Antikörpers Natalizumab, der in der MS Therapie eingesetzt wird. Seine Wirkung entfaltet dieser durch die therapeutische Blockade der $\alpha 4$ Untereinheit des $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, wodurch die Migration von Immunzellen ins ZNS gehemmt wird und es dadurch zu einer signifikanten Reduktion der klinischen und radiologischen Krankheitsaktivität kommt. (32)

Unter physiologischen Bedingungen werden autoreaktive Zellen durch periphere Toleranzmechanismen erkannt und zerstört. Bei Patientinnen und Patienten mit MS ist dieser Mechanismus offenbar gestört und regulatorische T-Lymphozyten sind nicht in der Lage Effektorzellen zu unterdrücken, diese autoreaktiven Zellen gehen also nicht in Apoptose. Somit können gegen das ZNS gerichtete, in der Peripherie aktivierte autoreaktive B- und T-Zellen zu aggressiven Effektorzellen werden, durch die BBB ins ZNS gelangen und dort eine Immunreaktion auslösen.

Einmal aktiviert, lösen CD8+ T-Lymphozyten, differenzierte CD4+ T-Lymphozyten, TH-17-Lymphozyten, B-Lymphozyten und unspezifische Immunzellen wie Makrophagen zusammen mit den im ZNS ansässigen aktivierten Mikroglia und Astrozyten Demyelinisierung und Axonschädigung durch direkte Zellkontakt-abhängige Mechanismen und durch die Wirkung von löslichen Entzündungs- und neurotoxischen Mediatoren aus. Die durch Entzündungsreaktion im zerebralen Interstitium ausgeschütteten Zytokine und Chemokine führen zu einer zusätzlichen Störung der BBB.(2,3,33)

Wo genau es im ZNS zu Entzündung kommt liegt vermutlich an Störungen der lokalen regulatorischen Mechanismen. Am Entzündungsort liegen vor allem perivaskuläre CD8+ Zell Infiltrate vor, welche Bildung von Plaques führen. Typische Plaque Lokalisationen liegen im Bereich der lateralen Ventrikel, des Corpus Callosum, im Cortex und der subkortikalen weißen Substanz, sowie im Bereich des N. opticus, des Hirnstamms und entlang des Rückenmarkes.(2)

Welche Antigene die Immunreaktion auslösen ist noch unbekannt, ursprünglich gab es die Hypothese, dass bestimmte Myelin Proteine der Initiator des Erkrankungsprozesses bei MS sind, jedoch geht man mittlerweile davon aus, dass auch andere Antigene und Prozesse wie molekulares Mimikry eine Rolle spielen.(2,3)

In demyelinisierten Arealen in weißer und grauer Substanz kommt es teilweise, vor allem in frühen Stadien der Erkrankung, spontan zu Remyelinisierung, welche jedoch mitunter insuffizient ist. Durch die Remyelinisierung entstehen sogenannte „shadow plaques“. Undifferenzierte Vorläuferzellen von Oligodendrozyten umschließen dabei die Läsion und haben vermutlich das Potential die Axone wieder zu remyelinisieren.(2,3,34)

Zusätzlich zu den akuten inflammatorischen Schüben gibt es eine weitere chronisch-inflammatorische Komponente im ZNS selbst, die nur marginal von der

peripheren Immunregulation beeinflusst wird und zur sukzessiven Neurodegeneration und zum Abbau der Oligodendrozyten beiträgt. Eine Rolle in dieser, vor allem in späteren Stadien der Erkrankung dominierenden, chronischen Inflammation spielen sogenannte tertiäre-lymphoide Strukturen die sich im Verlauf der Erkrankung im ZNS bilden.(3)

1.4.2 Axonschädigung und Neurodegeneration

Bei akuten Läsionen kommt es zu einer beträchtlichen Durchtrennung von Axonen (Abbildung 4), Trapp et al. konnten etwa zeigen, dass sich in aktiven Läsionen pro mm^3 weißer Substanz mehr als 11 000 durchtrennte Axone befinden, während sich pro mm^3 weißer Substanz bei gesunden Kontrollen weniger als ein durchtrenntes Axon finden lässt. (35,36) In frühen Stadien der MS kann diese Schädigung jedoch durch die Aktivierung neuer kortikaler Regionen kompensiert werden, was erklärt, warum es trotz der massiven akuten Axonschädigung zu keinen klinischen Auswirkungen kommt. Der Übergang von RRMS zu SPMS dürfte erfolgen, wenn das Ausmaß der Axonschädigung diese Kompensationsfähigkeit übersteigt.(35)

Akute Axonschädigung wird häufig in entzündlichen Plaques bei frühen Stadien der RRMS gefunden, ist aber auch in chronisch aktiven Läsionen und „normal-appearing white matter“ (NAWM) zu finden. Obwohl NAWM als makroskopisch und mikroskopisch normal myelinisierte weiße Substanz definiert ist, konnte gezeigt werden, dass auch in diesen Regionen die Dichte der Axone signifikant vermindert ist. Diese Verminderung der Axondichte ist nicht mit Plaques in der weißen Substanz assoziiert, was darauf schließen lässt, dass dieser Prozess zumindest teilweise unabhängig von der Demyelinisierung abläuft.(37)

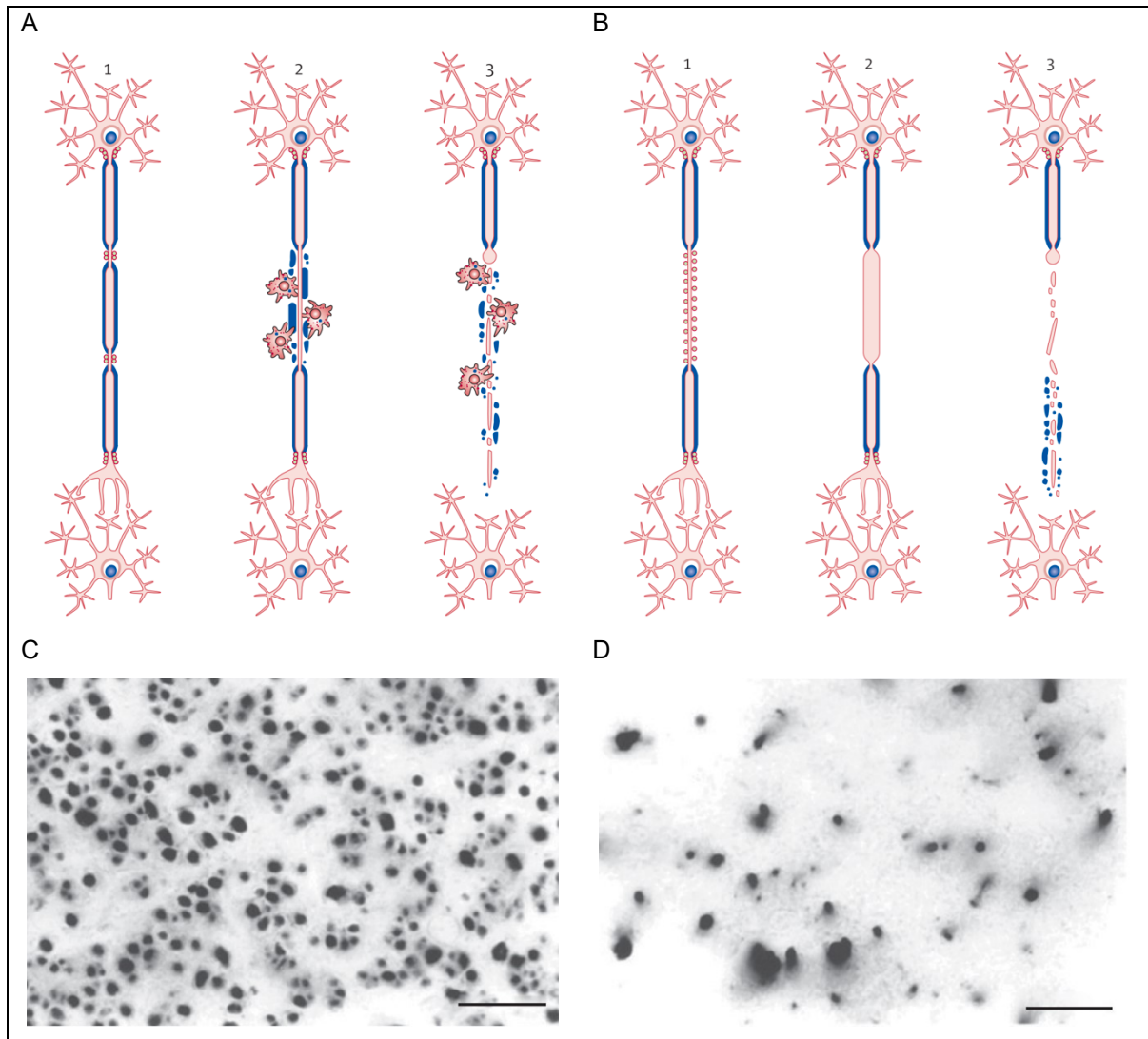


Abbildung 4: Axonschädigung und Neurodegeneration. (A) Schematische Darstellung der Prozesse bei Durchtrennung eines Axons: (1) Normal myelinisiertes Axon. (2) Demyelinisierung durch Immunzell-vermittelte Prozesse. (3) Der distale der Durchtrennung liegende Axonabschnitt degeneriert rasch, der proximale Anteil der mit dem Nervenzellkörper verbunden ist überlebt. (B) Schematische Darstellung der Degeneration eines chronisch demyelinisierten Axons. (1) Die meisten Axone überleben die Demyelinisierung, es kommt zu Umverteilung von Natrium Kanälen (rot umrandete graue Kreise) und können ihre Funktion wiederherstellen. (2) Durch den Verlust der Myelinscheide (blaue Umrandung entlang des Axons) kommt es zum progredienten Anschwellen des Axons und zu zunehmender Desorganisation des Zytoskeletts. (3) Diese Axone degenerieren letztendlich oder werden durchtrennt. (C, D) Vergleich der Axondichte im Rückenmark eines MS Patienten in einer Kontrollregion (C) und in einem demyelinisierten Areal (D).

Neurofilamentfärbung, Maßstabsleiste = 25µm. [(A, B) reproduced from (36) with permission from Wolters Kluwer Health, Inc. and (C, D) reproduced from (38) with permission from Springer Nature.]

Neurodegeneration ist das Endprodukt einer Kaskade verschiedener Prozesse auf axonaler und neuronaler Ebene (Abbildung 4). Motor für diese Prozesse ist vermutlich die chronische Inflammation im ZNS, welche im Hintergrund der Erkrankung abläuft. Chronische Inflammation bei MS führt zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiver Stickstoffspezies (RNS), diese fördern wahrscheinlich mitochondriale Schädigung als Folge einer Ansammlung von DNA Mutationen. Dieser Zustand begünstigt wiederum metabolischen Stress, falsche Faltung von Proteinen und Energiemangel, was kritische Folgen auf die einzelnen Neurone hat. Der axonale Transport von Mitochondrien, Motorproteinen und anderen Stoffwechselprodukten aus dem Perikaryon zu distalen Anteilen der Axone ist essentiell für den Erhalt der Funktion der Neurone. Dieser Transport ist höchst energieaufwendig und die benötigte Energie wird von den Mitochondrien in Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt.(3)

Bei normal myelinisierten Neuronen sind Natrium (Na^+) Kanäle an den Ranvier-Schnürringen konzentriert, dadurch kann ein Aktionspotential rasch von einem zum nächsten Ranvier-Schnürring springen. Das einströmende Na^+ muss anschließend ATP abhängig im Austausch gegen Kalium (K^+) wieder aus den Zellen transportiert werden. Bei demyelinisierten Axonen werden verschiedene Ionenkanäle diffus entlang der Axone eingebaut, dadurch wird versucht die Homöostase der Ionen aufrechtzuerhalten. Dies bewirkt jedoch einen erhöhten Na^+ Einstrom und der Energiebedarf steigt weiter an, da das Na^+ mit Hilfe von ATP abhängigen Transportern wieder aus dem Axon befördert werden muss. Gleichzeitig ist die Energiebereitstellung in den Mitochondrien durch die oben genannten Mechanismen vermindert, man bezeichnet diesen Zustand als „virtual hypoxia“.(35) Zusammen mit der vermehrten Ansammlung von Glutamat, welches bei neuronalen Verletzungen verstärkt ausgeschüttet wird, kommt es so zu einem

Missverhältnis von Ionen, dieses Missverhältnis hält den gewebsschädlichen Zustand aufrecht. Ausgehend von der initialen Läsion kann sich dieser Prozess retrograd Richtung Zellkörper oder anterograd Richtung Axonterminal ausbreiten und so präsynaptische und postsynaptische Neurone beeinflussen und schließlich zu Apoptose oder Nekrose dieser führen.(3,35)

1.4.3 Oxidativer und nitrosativer Stress

Oxidativer Stress ist ein wichtiger Faktor bei schädlichen Prozessen im ZNS wie Inflammation oder Neurodegeneration. Induziert wird oxidativer Stress durch die Produktion von ROS und RNS, vor allem von Mikroglia und Makrophagen. Nach Aktivierung produzieren Mikroglia und Makrophagen Enzyme wie induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxydase und Myeloperoxidase und fördern somit die Bildung von ROS und RNS.(39,40)

ROS und RNS können mitochondriale Schädigungen verursachen, dies konnte durch verschiedene in vitro und EAE Studien belegt werden. Darüber hinaus sind die Mitochondrien selbst eine potentielle Quelle für ROS, da Störungen in der oxidativen Phosphorylierung von Sauerstoff zur einer verstärkten Bildung von ROS führen.(40–44)

Durch ROS und RNS ausgelöste Schäden in MS Läsionen konnten in verschiedenen Studien nachgewiesen werden.(40,45–49) In einer Studie von Haider et al. wurde Beispielsweise die Oxidierung von DNA in Oligodendrozyten, sowie oxidierte Lipide in Myelin, Oligodendrozyten und Axonen und deren Assoziation mit aktiver Demyelinisierung und Neurodegeneration gezeigt.(49) Fischer et al. konnten die These, dass oxidativer und nitrosativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Demyelinisierung und Gewebsschädigung bei MS spielen, untermauern und schlugen folgendes Erklärungsmodell vor: Durch den Entzündungsprozess kommt es zur Aktivierung von Mikroglia und

Makrophagen, dies hat die Freisetzung von ROS und RNS zur Folge, wodurch schließlich Gewebsschädigung initiiert wird. Es kommt außerdem zur Schädigung von Mitochondrien und zur Störung der mitochondrialen Atmungskette, was neben einem Energiemangel zu einer weiteren Bildung von ROS führt.(40,50,51)

1.4.4 Die Rolle von Stickoxid in der Pathogenese vom MS

Die enzymatische Synthese von Stickoxid (NO) aus der Aminosäure Arginin erfolgt im gesunden ZNS durch zwei Isoformen des Proteins Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), endothelialer und neuronaler NOS (eNOS und nNOS). Diese produzieren niedrige Konzentrationen von NO für die Regulation des Blutflusses und für neuronale Übertragung. Infolge von Inflammation kommt es jedoch zur Bildung von weitaus höheren Konzentrationen von NO durch die induzierbare Form der NOS (iNOS), iNOS kommt physiologisch nicht im ZNS vor und verursacht eine permanente NO Produktion. In pathologischen Studien konnte iNOS in aktiven MS Läsionen nachgewiesen werden und ebenso in verminderter Form in chronischen Läsionen.(46,52,53) Aufgrund der Reaktionsfreudigkeit von NO kommt es im Gewebe nicht nur als freies Radikal vor, sondern verursacht auch die Bildung von verschiedenen anderen potentiell gewebsschädlichen Verbindungen wie Peroxinitrit (ONOO⁻), Stickstoffdioxid (NO₂), salpetrige Säure (HNO₂) und andere, welche in Summe als RNS bezeichnet werden. Aufgrund der Komplexität und Reaktionsfreudigkeit von NO ist es daher wichtig, all diese Prozesse zu berücksichtigen, wenn man die Rolle von NO im Organismus betrachtet.(34,46,54)

Wie bereits in den Kapiteln 1.4.2 und 1.4.3 beschrieben, ist Stickoxid in der Form von RNS vermutlich in eine Vielzahl von Prozessen involviert, die in der Pathogenese der MS eine Rolle spielen. Durch Einfluss von NO kommt es beispielsweise sowohl bei physiologischen, wie auch bei pathologischen Bedingungen zur Vasodilatation der zerebralen Gefäße, was durch eine Verminderung der Blutflussgeschwindigkeit Inflammation vorantreiben kann und

zur Störung der BBB beitragen kann. Zusätzlich kommt es bei pathologisch erhöhten NO Konzentrationen zu einer Störung der Permeabilität der BBB, dies erleichtert den Durchtritt von inflammatorischen Zellen und Mediatoren durch die BBB in das ZNS Parenchym. Eine gestörte BBB ist ein Merkmal der Pathogenese der MS, welches durch die Aufnahme von Gadolinium in der MRT bei aktiven Läsionen dargestellt werden kann (Abbildung 5).(34,55)

Bei der Schädigung der Oligodendrozyten spielt NO vermutlich ebenfalls eine Rolle. Diese reagieren bei einem gleichen Maß an Schädigung der DNA und der Mitochondrien sensibler auf ROS und RNS induzierte Verletzungen als andere Zellarten im ZNS, wie Astrozyten oder Mikroglia. Des Weiteren kann NO durch direkte Störung von Ionenkanälen oder durch die bereits erläuterte Störung des mitochondrialen Stoffwechsels in Axonen zur reversiblen Blockade der Reizweiterleitung führen.

NO ist außerdem in die synaptische Übertragung involviert. Bei Personen mit MS kann das sensible Gleichgewicht an Neurotransmittern durch hohe NO Konzentrationen in der Nähe von Synapsen gestört werden und so die synaptische Übertragung beeinflussen.(34,39,56)

Die ohnehin komplexe Rolle von NO in der Pathophysiologie der MS wird dadurch verkompliziert, dass NO, neben all den erwähnten schädlichen Effekten, auch positive antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. So kann NO beispielsweise Antigenpräsentation und die Proliferation von T-Zellen hemmen, wodurch es potentiell die Aktivierung von autoreaktiven Zellen und deren Migration ins ZNS stören kann. Darüber hinaus kann NO die Expression von Adhäsionsmolekülen vermindern und somit das Eindringen von Immunzellen in das ZNS erschweren. Auch in der Induktion der Apoptose von T-Zellen ist NO involviert, somit wirkt NO vermutlich auch beim Abbau von bereits etablierter Inflammation mit. Die positiven Effekte von NO konnten durch Ergebnisse von Studien, in welchen die Wirkung von NOS Blockern in der Therapie der EAE untersucht wurde, gezeigt werden. Die Behandlung von an EAE erkrankten Tieren

mit NOS Blockern führte dabei bei einem Teil der Tiere zu einer Besserung der Symptome, bei anderen jedoch zu einer Verschlechterung der Symptomatik.(34,54,57)

1.5 Diagnostik

Eine frühe und genaue Diagnose der MS ist essentiell, da effektive Therapien für RRMS vorhanden sind. Der Kern der MS Diagnostik ist, neben der neurologischen Symptomatik, der Nachweis örtlicher und zeitlicher Dissemination. Die sicherste Diagnose lässt sich nach wie vor klinisch stellen, mit dem Nachweis der zeitlichen Dissemination durch mindestens zwei unabhängig auftretende Schübe und mit dem Nachweis der örtlichen Dissemination durch Symptome, die für Läsionen an mindestens zwei verschiedenen Arealen im ZNS sprechen. Besteht der Verdacht auf MS aber es kann keine Diagnose durch klinische Symptome und Anamnese allein gestellt werden, gibt es verschiedene in der Diagnostik unterstützende Verfahren wie MRT, Liquordiagnostik und evozierte Potentiale.(25,27)

1.5.1 Klinische Symptomatik

Beispiele für das klinische Bild der MS sind in Tabelle 1 aufgeführt. Abhängig von der Lokalisation der Läsionen im ZNS, sind die möglichen Symptome vielfältig und nur wenige sind spezifisch für die Erkrankung. Beim ersten Auftreten von MS kommt es am häufigsten zu sensorischen Ausfällen (54,3 %), gefolgt von optischen (21,5 %), den Hirnstamm betreffenden (20,7 %) und motorischen (17,9 %) Symptomen. Cerebelläre Symptome (6,3 %), sowie Blasen- und Mastdarmstörungen (3,1 %) sind beim Auftreten des ersten Schubes am seltensten.(58)

Weitere Charakteristika für MS sind beispielsweise das Lhermitte-Zeichen, welches sich durch eine elektrische Missempfindung entlang der Wirbelsäule oder

der Extremitäten bei Nackenbeugung äußert. Beim sogenannten Uhthoff Phänomen kommt es zur vorübergehenden Verschlechterung von vorliegenden neurologischen Symptomen oder zum Wiederauftreten von bereits aufgetretenen Symptomen bei Erhöhung der Körperkerntemperatur, Auslöser können zum Beispiel Fieber, körperliche Aktivität oder ein heißes Bad sein. Ursache dafür sind Veränderungen in der Reizweiterleitung von teilweise demyelinisierten Axonen, welche bei Erhöhung der Temperatur auftreten und vermutlich durch eine Veränderung auf Ebene der axonalen Ionenkanäle nach Demyelinisierung ausgelöst werden. (2,22,59–61)

Tabelle 1: Ausgewählte klinische Symptome nach Läsionsort. (2,22,62)

	Symptomatik
N. opticus	Unilaterale Optikusneuritis Schmerzen bei Augenbewegung Skotome
Cerebellum	Tremor Gleichgewichtsprobleme Gangstörung
Hirnstamm	Schwindel Schluckprobleme Sprachprobleme Sensorische Störungen im Gesicht
Rückenmark	Schwäche einzelner Extremitäten Sensorische Störungen Spasmen Blasenfunktionsstörungen Erektile Dysfunktion Obstipation Lhermitte-Zeichen
Cerebrum	Kognitive Störungen Sensorische Störungen Hemiparese

1.5.2 Neurologische Untersuchung

Bei der Untersuchung von Personen mit dem Verdacht der Erkrankung an MS, ist es wichtig eine detaillierte Anamnese zu erheben, um den Beginn und Verlauf der Symptomatik genau zu bestimmen. Dadurch können eventuelle bereits aufgetretene Schübe erkannt werden und somit zu einer Diagnose führen. Darüber hinaus kann eine Aussage über die Verlaufsform getätigt werden.(25)

Außerdem ist es fundamental für die Diagnostik, dass vorliegende Symptome richtig interpretiert werden, um einen Schub als solchen zu erkennen. Ein Schub ist definiert als vom Patienten berichtete oder objektiv betrachtete typische Zeichen eines akuten inflammatorischen demyelinisierenden Ereignisses im ZNS, mit einer Dauer von mindestens 24 Stunden, wobei keine Zeichen von Fieber und Infektion vorliegen dürfen.(25,27) Ein neu auftretender Schub sollte durch eine genaue neurologische Untersuchung dokumentiert werden, allerdings kann unter den richtigen Umständen ein in der Vorgeschichte aufgetretenes Ereignis mit für MS typischen Symptomen und Verlauf, auch ohne neurologisch objektivierte und dokumentierte Symptome beweisend für ein stattgefundenes demyelinisierendes Ereignis sein. Paroxysmal auftretende Symptome sollten in multiplen Episoden über mindestens 24 Stunden auftreten, um als Hinweis für einen Schub gewertet zu werden. Um zwei Schübe differenzieren und als separate Schübe werten zu können, müssen mindestens 30 Tage zwischen Beginn der Symptome des ersten Schubes und Beginn der Symptome des zweiten Schubes liegen.(27,63)

Es gibt verschiedene Instrumente um die Progression und die Beeinträchtigung die sich bei MS entwickelt zu quantifizieren. Diese werden ebenfalls als Endpunkte für klinische Studien verwendet, um die Effektivität von therapeutischen Interventionen zu messen.(64)

Die am häufigsten verwendete Methode ist hierbei der Expanded Disability Status Scale nach Kurtzke (EDSS). Beim EDSS kommt es zu einer Beurteilung verschiedener Funktionssysteme des ZNS (Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorik, Blasen- und Mastdarmfunktion, Visus, zerebrale Funktionen) von 0

(keine Beeinträchtigung) bis 5 bzw. 6 (maximale Beeinträchtigung in diesem System). Abhängig von den Werten in den einzelnen Funktionssystemen ergibt sich ein Gesamtscore im Bereich von 0-10, welcher ab dem Wert 1 in 0,5 Punkte Schritte gegliedert ist. Ein EDSS von 0 entspricht dabei einem unauffälligen neurologischen Status, ein EDSS von 10 entspricht dem Tod durch MS. Werte ab 5 aufsteigend stellen eine verstärkte Einschränkung im Alltagsleben und in der Gehfähigkeit dar. Ein Wert von 9,5 entspricht Bettlägerigkeit mit einem Verlust der Fähigkeit effektiv zu schlucken und zu kommunizieren. Ein Nachteil des EDSS ist, dass die Abstufung im Bereich von 4-6 sehr stark von der Gehfähigkeit abhängt.(64,65)

Eine weiteres vor allem in den letzten Jahren häufig verwendetes Instrument ist der Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC), bei dem die Funktion der oberen und unteren Extremität sowie die kognitive Funktion untersucht wird.(66)

1.5.3 McDonald Kriterien

McDonald et al. veröffentlichen im Jahr 2001 diagnostische Kriterien, mithilfe derer man durch die Kombination von klinischer Symptomatik, MRT und Labordiagnostik MS diagnostizieren kann.(63) Die Kriterien wurden im Jahr 2005 einer ersten Revision unterzogen, eine zweite folgte im Jahr 2010 und die aktuellste Überarbeitung wurde Ende 2017 veröffentlicht (Tabelle 2). Eine der wichtigsten Auswirkungen der Überarbeitung von 2010 war, dass Patientinnen und Patienten, welche in der früheren Version noch mit CIS diagnostiziert wurden, nun bereits als MS erkannt werden und dies Einfluss auf die Behandlung haben kann.(62,63,67)

Aufgrund der gut erprobten Anwendbarkeit der McDonald 2010 Kriterien lag der primäre Fokus bei der Erstellung der McDonald 2017 Kriterien, die Kriterien von 2010 zu vereinfachen und einzelne Komponenten zu verdeutlichen, um so bei wahrscheinlicher MS eine frühere Diagnose zu ermöglichen und gleichzeitig die Spezifität zu erhalten, um die Frequenz der Fehldiagnosen zu vermindern.(27,67,68)

Im Vergleich zu den McDonald Kriterien von 2010 wurden folgende Veränderungen durchgeführt:

- Bei Personen mit einem typischen CIS und dem klinischen oder radiologischen Nachweis einer räumlichen Dissemination kann beim Vorliegen von Liquor („cerebrospinal fluid“; CSF)-spezifischen oligoklonalen Banden die Diagnose MS gestellt werden.
- Symptomatische und asymptomatische Läsionen können zum Nachweis von räumlicher oder zeitlicher Dissemination herangezogen werden. Ausnahme sind Läsionen im N. opticus bei Personen mit einer Optikusneuritis.
- Kortikale und juxtakortikale Läsionen können zum Nachweis für räumliche Dissemination in der MRT verwendet werden.
- Bei den Kriterien für die Diagnose einer PPMS muss nicht mehr zwischen symptomatischen und asymptomatischen Läsionen in der MRT unterschieden werden, außerdem können kortikale Läsionen für die Diagnosestellung herangezogen werden
- Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung soll eine vorläufige Verlaufsform angegeben werden, darüber hinaus soll angegeben werden ob der Verlauf aktiv ist und ob der Verlauf basierend auf der Vorgeschichte des letzten Jahres progredient ist. Die Verlaufsform soll regelmäßig durch Gewinnung weiterer Informationen neu beurteilt werden.

Tabelle 2: McDonald Kriterien 2017 für die Diagnostik der MS bei Personen mit einem Schub bei Ausbruch der Erkrankung.

	Anzahl der Läsionen mit klinisch objektivierbarem Nachweis	Weitere Daten die für die Diagnose von MS notwendig sind
≥ 2 klinische Schübe ^a	≥ 2	Keine ^b
≥ 2 klinische Schübe ^a	1 (sowie eindeutige Hinweise auf einen Schub in einer anderen anatomischen Region in der Vorgeschichte ^c)	Keine ^b
≥ 2 klinische Schübe ^a	1	Nachweis räumlicher Dissemination durch einen weiteren klinischen Schub welcher eine Läsion in einer anderen ZNS Region impliziert oder durch eine MRT ^d
Ein klinischer Schub ^a	≥ 2	Nachweis zeitlicher Dissemination durch einen weiteren klinischen Schub oder durch eine MRT ^e ODER Nachweis CSF spezifischer oligoklonaler Banden ^f
Ein klinischer Schub ^a	1	Nachweis räumlicher Dissemination durch einen weiteren klinischen Schub welcher eine Läsion in einer anderen Region des ZNS impliziert oder durch eine MRT ^d UND Nachweis zeitlicher Dissemination durch einen weiteren klinischen Schub oder durch eine MRT ^e ODER Nachweis CSF spezifischer oligoklonaler Banden ^f

Sind die McDonald Kriterien 2017 erfüllt und es gibt keine bessere Erklärung für die klinische Symptomatik lautet die Diagnose „MS“. Besteht der Verdacht, aber die Kriterien sind nicht vollständig erfüllt lautet die Diagnose „mögliche MS“. Gibt es eine Diagnose welche die klinischen Symptome besser erklärt laut die Diagnose „keine MS“.

^a Schubdefinition siehe Kapitel 1.5.2

^b Keine weiteren Untersuchungen sind notwendig um zeitliche und räumliche Dissemination nachzuweisen. Trotzdem sollte, wenn möglich, bei allen Personen mit dem Verdacht auf MS eine MRT des Gehirns durchgeführt werden. Zusätzlich sollte bei Personen mit unzureichenden klinischen und radiologischen Hinweisen für eine MS Diagnose, welche Symptome zeigen die nicht typisch für ein CIS sind oder eine atypische Präsentation zeigen, eine MRT des RM oder Liquordiagnostik in Betracht gezogen werden. Sind durchgeführte Untersuchungen wie MRT oder Liquordiagnostik negativ, ist bei der Diagnosestellung einer MS äußerste Vorsicht geboten und alternative Diagnosen müssen in Betracht gezogen werden.

^c Die klinische Diagnostik basierend auf zwei objektivierten klinischen Schüben am sichersten. Nachweise auf einen Schub mit typischer Symptomatik und typischem Verlauf für einen entzündlichen demyelinisierenden Schub in der Vorgeschichte ohne Dokumentation können für die Diagnostik ausreichend sein, jedoch muss zumindest ein Schub objektiv nachgewiesen sein.

^d Räumliche Dissemination kann in der MRT durch das Vorhandensein von einer oder mehr T2-hyperintensiven Läsionen in zumindest zwei von vier MS typischen Regionen des ZNS (periventrikulär, kortikal oder juxtakortikal, infratentoriell, Rückenmark) nachgewiesen werden.

^e Zeitliche Dissemination kann in der MRT durch gleichzeitiges Vorliegen von Gadolinium aufnehmenden und nicht Gadolinium aufnehmenden Läsionen zu jedem Zeitpunkt oder durch

eine neue T2 hyperintense und/oder Gadolinium aufnehmende Läsion bei einer Follow-Up MRT im Vergleich zu einer Baseline MRT, unabhängig vom Zeitpunkt der Baseline MRT, nachgewiesen werden.

^f Das Vorliegen von CSF spezifischen oligoklonalen Banden ist kein Nachweis von zeitlicher Dissemination per se aber kann die Notwendigkeit des Nachweises dieses Kriteriums ersetzen.

Die McDonald Kriterien wurden zu Anwendung bei Personen entwickelt, die sich mit einem typischen CIS mit Verdacht auf MS oder mit Symptomen die für eine demyelinisierende inflammatorische Erkrankung des ZNS sprechen präsentieren. Bei Anwendung der McDonald Kriterien ist es wichtig, alternative Diagnosen in Betracht zu ziehen und Differentialdiagnosen auszuschließen. Die McDonald Kriterien sollten nicht verwendet werden um MS von anderen neurologischen Erkrankungen zu differenzieren, da die MRT Bilder von Patientinnen und Patienten mit zerebrovaskulären Erkrankungen der kleinen Gefäße, anderen inflammatorischen aber auch nicht inflammatorischen Erkrankungen der weißen Substanz und sogar von gesunden Personen Läsionen zeigen können, welche die McDonald Kriterien erfüllen.(25,27)

Etwa 10-15% der Patientinnen und Patienten mit MS haben eine Verlaufsform welche durch progrediente Verschlechterung von Erkrankungsbeginn an charakterisiert ist (PPMS). Die für CIS Patientinnen und Patienten entwickelten McDonald Kriterien wurden deshalb modifiziert, um sie bei Personen mit progredientem Verlauf anwenden zu können. Die McDonald Kriterien 2017 für Personen mit progredientem Verlauf sind in Tabelle 3 dargestellt.(21,25,27,30)

Tabelle 3: McDonald 2017 Kriterien für die Diagnostik von MS bei Personen mit progredientem Verlauf ab Ausbruch der Erkrankung

Die Diagnose PPMS kann gestellt werden bei:

- Einem Jahr Krankheitsprogression (retrospektiv/prospektiv) unabhängig von klinischen Schüben

Und erfüllen von zwei der drei folgenden Kriterien:

- ≥ 1 für MS charakteristische T2-hyperintense Läsionen in einer oder mehr der folgenden Regionen des Gehirns: periventrikulär, kortikal oder juxtakortikal, infratentoriell
- ≥ 2 T2-hyperintense Läsionen im Rückenmark
- Vorliegen von CSF-spezifischen oligoklonalen Banden

1.5.4 Magnetresonanztomographie

Aufgrund der hohen Sensitivität in der Darstellung von Plaques im ZNS ist die MRT Untersuchung das wichtigste Hilfsmittel in der Diagnostik von MS. Typische MS Plaques im Gehirn sind ovoid und befinden in asymmetrischer, zufälliger Anordnung in periventrikulären, juxtakortikalen, kortikalen oder infratentoriellen Arealen. Läsionen im Rückenmark sind typischerweise zigarrenförmig, in ihrer Längsausdehnung kleiner als die Höhe zweier Wirbelkörper, der Durchmesser beträgt weniger als den halben Durchmesser des Rückenmarkes und die Lage ist dezentral. Bevorzugte Regionen sind das Halsmark und der Hinterstrang.(69,70) Neben der Darstellung der Lokalisation der Läsionen, dient die MRT durch kontinuierliche Untersuchungen auch zur Darstellung neuer Plaques und so kann aufgrund aktueller diagnostischer Kriterien die Diagnose MS auch in Abwesenheit einer weiteren klinischen Episode gestellt werden.(2,27)

Die Interpretation der MRT Bilder hängt stark von der Durchführung der Untersuchung und dem Wissen der befundenen Person über MS ab. Um Fehldiagnosen zu vermeiden, hat die Magnetic Resonance Imaging in MS Gruppe (MAGNIMS) Guidelines für die Durchführung und Interpretation von MRT Untersuchungen bei Patientinnen und Patienten mit Verdacht auf MS veröffentlicht. Neben einem Protokoll welche Areale untersucht werden sollen und welche Sequenzen verwendet werden sollen, enthält dieses auch Richtlinien für die Befundung. Etablierte Sequenzen in der MS Diagnostik sind Fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), T1- und T2-gewichtete Sequenzen sowie T1-gewichtete Sequenzen mit Gabe von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel.(69–71)

T2-hyperintense, also helle, Läsionen können Inflammation, Ödeme, Störungen in der Myelinscheide, Gliose oder axonale Schädigung darstellen und sind in 90-95 % der MS Patientinnen und Patienten vorhanden. Zwischen T2-Läsionsvolumen, Anzahl der T2-Läsionen und klinischer Symptomatik besteht nur eine schwache Korrelation. Ein Grund für dieses „klinisch-radiologische Paradoxon“ könnte darin liegen, dass die T2-Läsionen klinisch unspezifisch sind

und sowohl für Ödeme und reversible Gewebsschädigung stehen können, als auch für irreversible Demyelinisierung und Axonschädigung. Eine andere Erklärung für diese schwache Korrelation könnte darin liegen, dass eine Vielzahl der T2-Läsionen klinisch stumme Läsionen sind.(70,72)

Der Vorteil der FLAIR Sequenz gegenüber der T2-gewichteten Sequenz ist eine kürzere Aufnahmezeit bei ähnlicher Sensitivität, zusätzlich lässt sich bei der FLAIR Sequenz das Signal des Liquors unterdrücken, wodurch vor allem in juxtakortikalen Arealen das Erkennen der Plaques erleichtert wird.(72)

Ein Teil der in der T2-Sequenz hyperintens abgebildeten Läsionen erscheint auf T1-gewichteten Bildern hypointens, also dunkel. Diese T1-hypointensen Läsionen bezeichnet man als „Black Holes“ (Abbildung 5). Der Großteil dieser Black Holes verschwindet innerhalb von sechs Monaten, man bezeichnet sie als „Acute Black Holes“. Auf MRT Bildern von Follow-Up Untersuchungen sind sie nicht mehr sichtbar, ihr Ursprung liegt darin, dass sich alle akuten Läsionen mit Störung der BBB in T1-gewichteten Sequenzen hypointens präsentieren. Jene Black Holes, die auch auf Follow-Up MRT Bildern bestehen bleiben, bezeichnet man als „Persistent Black Holes“, sie deuten auf stark vorangeschrittene Demyelinisierung und starke Axonschädigung hin und sind am häufigsten bei Patientinnen und Patienten mit langer Krankheitsdauer oder progredienten Verlaufsformen zu sehen.(69,70,72)

Neue, aktive Läsionen können aufgrund der akuten inflammationsbedingten Störung der BBB dargestellt werden (Abbildung 5). Nach der intravenösen Verabreichung von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel kommt es durch die gestörte BBB zu einer Aufnahme des Kontrastmittels in die akuten Läsionen im ZNS, diese Kontrastmittelaufnahme stellt sich in T1-gewichteten Sequenzen hyperintens dar.(70,72)

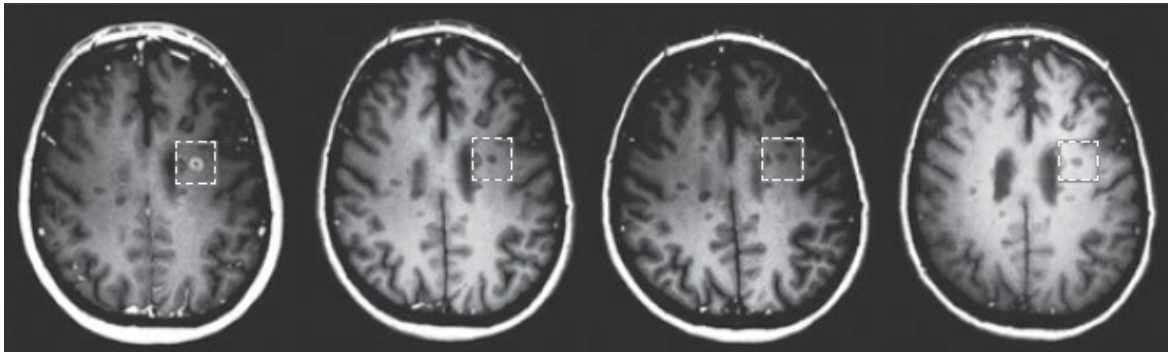


Abbildung 5: Evolution einer MS Läsion. Im Abstand von je zwei Monaten aufgenommene T1-gewichtete MRT Aufnahmen zeigen die Entwicklung einer neuen kontrastmittelaufnehmenden Läsion (hell, außen links) zu einem hypointensen Black Hole (dunkel, außen rechts). Die Kontrastmittelaufnahme ist das Korrelat zu einem akuten inflammatorischen Prozess mit Störung der BBB. Das Black Hole ist das Korrelat zur voranschreitenden Neurodegeneration. [Reproduced from (37) with permission from Nature Publishing Group.]

Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, kommt es bei einem Großteil der MS Patientinnen und Patienten zu einer in MRT Scans darstellbaren Atrophie des Gehirns, welche in der Regel auf T1-gewichteten Bildern beurteilt wird. Diese Atrophie kann zum Teil auch bereits bei CIS und frühen Stadien von RRMS erkennbar sein. Die Atrophie-Rate ist allerdings bei den verschiedenen MS Subtypen sehr heterogen. Die Korrelation zwischen Atrophie und körperlicher bzw. kognitiver Beeinträchtigung von MS Patientinnen und Patienten ist stärker als die Korrelation zwischen anderen MRT Zeichen und diesen klinischen Parametern. Darüber hinaus ist die Atrophie ein stärkerer Prädiktor für zukünftige Beeinträchtigung als T1- oder T2-Läsionslast. Allerdings ist die Atrophiemessung von vielen Variablen abhängig und einigen Störfaktoren ausgesetzt. Diese Methode wird nicht routinemäßig im klinischen Alltag verwendet und derzeit im Bereich der Forschung eingesetzt.(22,70,73,74)

Neben diesen etablierten Sequenzen gibt es auch eine Vielzahl von neuen MRT Techniken, die in der MS Forschung bereits eingesetzt werden, welche beispielsweise eine bessere Darstellung von Plaques in der NAWM oder im

Cortex ermöglichen oder Perfusionsunterschiede im Gehirn zeigen und somit zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der MS beitragen. Bei diesen MRT Techniken bedarf es jedoch noch weiteren Studien und besserer Standardisierung, um sie in den klinischen Alltag der MS Diagnostik miteinbeziehen zu können.(70)

1.5.5 Liquor Diagnostik

Aus dem CSF gewonnene Parameter wie Immunglobulin G (IgG)-Index oder IgG oligoklonale Banden (OCB) sind unterstützende Kriterien bei der Diagnosestellung von MS. Die Liquordiagnostik ist ein etablierter Teil der Routine Diagnostik bei Verdacht auf MS, vor allem auch zur Abgrenzung von Differentialdiagnosen und ist weiterhin ein wichtiger Bestandteil bei der Diagnosefindung, vor allem bei klinisch oder radiologisch unklaren Fällen. (75,76) In den McDonald Kriterien 2017 hat die Liquor Diagnostik im Vergleich zu den früheren Überarbeitungen wieder an Wichtigkeit gewonnen. So kann bei Patientinnen und Patienten mit einem typischen CIS, welche die MRT Kriterien für räumliche Dissemination erfüllen und bei denen keine bessere Erklärung für die Symptomatik vorliegt, mit dem Nachweis von OCB im CSF die Diagnose MS gestellt werden. Die Diagnose kann dabei selbst ohne den Nachweis von zeitlicher Dissemination in der MRT oder in Abwesenheit eines zweiten klinischen Schubes erfolgen und somit können OCB im CSF in dieser Situation den Nachweis von zeitlicher Dissemination ersetzen.(27)

Bei gesunden Personen gelangen IgG durch Diffusion aus dem peripheren Blut in den Liquor, diese sind ausschließlich polyklonal. Der Nachweis von IgG mit OCB im CSF, welche im Blut nicht vorkommen, ist demnach beweisend für eine intrathekale Antikörperproduktion und ist ein Hinweis für im ZNS stattfindende pathologische Prozesse (Abbildung 6). Jene Plasmazellen, die das IgG im ZNS produzieren, liegen vermutlich an den Meningen und im Parenchym.(77) Die

Sensitivität der Untersuchung auf das Vorliegen von OCB im CSF hängt von der angewandten Methode ab, in den McDonald 2017 Kriterien wird empfohlen Agarosegel Elektrophorese mit isoelektrischer Fokussierung und Immunoblotting oder Immunofixierung zu verwenden. Ebenso ist es notwendig immer gleichzeitig Serum und CSF Proben zu untersuchen, um feststellen zu können, ob die OCB ausschließlich im CSF vorkommen.(27)

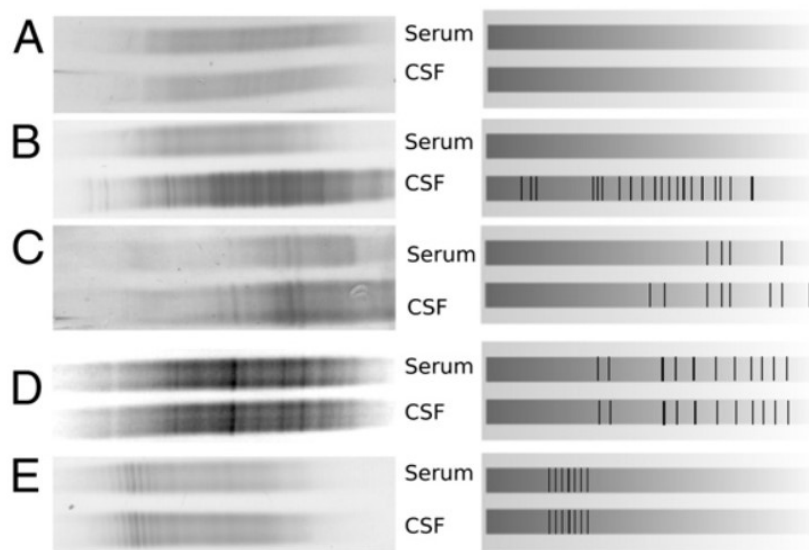


Abbildung 6: Klassifizierung von OCB Mustern.(76–79) (A) Typ 1: Normal; keine OCB in CSF oder Serum. (B) Typ 2: lokale Synthese; OCB im CSF aber nicht im Serum, dies zeigt isolierte intrathekale oligoklonale IgG Synthese an. Dieses Muster kann bei MS beobachtet werden. (C) Typ 3: „mirror plus pattern“; zusätzlich zu identen OCB in Serum und CSF auch CSF spezifische OCB. Dies zeigt lokale Synthese und zusätzliche systemische Synthese an. Dieses Muster kann bei MS beobachtet werden. (D) Typ 4: „mirror pattern“; identische OCB in Serum und CSF, dies zeigt eine systemische Immunreaktion an. (E) Typ 5: „mirror steps“; monoklonale Banden in Serum und CSF, dies zeigt das Vorliegen eines Paraproteins an. [Reproduced from (77) with permission from Springer Nature.]

Eine rezente Metaanalyse die 12 253 MS- und 2 685 CIS Patientinnen und Patienten einschloss, untersuchte die Prävalenz von OCB im CSF. Demnach sind 87,7 % der MS- und 68,6 % der CIS betroffenen OCB positiv, außerdem konnte gezeigt werden, dass OCB positive CIS Patientinnen und Patienten ein beinahe

zehnfach erhöhtes Risiko haben im weiteren Verlauf MS zu erkranken als OCB negative. (76)

Laut einer anderen Metaanalyse aus dem Jahr 2013, die 49 Studien untersuchte und 13 467 Personen einbezog, hat der Nachweis von OCB eine Sensitivität von 93 % und Spezifität von 94 %, allerdings sank die Spezifität auf 61 % beim Vergleich von MS Erkrankten mit Patientinnen und Patienten mit anderen entzündlichen Erkrankungen.(77)

Eine weitere Möglichkeit um eine IgG Produktion im ZNS nachzuweisen ist der IgG Index. Dabei wird das Verhältnis des Quotienten von IgG im CSF und im Serum zum Quotienten des Albumins in CSF und Serum angegeben (CSF-IgG/Serum-IgG : CSF-Albumin/Serum-Albumin). Liegt dieser über 0,7 spricht dies für eine IgG Produktion im ZNS. Die Nachteile des IgG Index liegen in einer signifikant geringeren Sensitivität im Vergleich zum Nachweis von OCB im CSF, darüber hinaus kommt es selten zu einer alleinigen Erhöhung des IgG Index ohne das Vorliegen von OCB im CSF.(80)

Andere Charakteristika des Liquors bei MS Patientinnen und Patienten sind eine normale bis leicht erhöhte Zellzahl (< 25 Zellen pro cm³, vorwiegend Lymphozyten) und normal bis leicht erhöhtes Protein (< 1g/L).(79)

1.5.6 Evozierte Potenziale

Evozierte Potentiale (EP) werden verwendet um Veränderungen der Nervenleitgeschwindigkeit darzustellen. Setzt man einen bestimmten externen Stimulus, kommt es zu einer Reizantwort mit einer spezifischen Latenz und Amplitude. Anomalien dieser evozierten Potenziale haben eine gute Übereinstimmung mit der klinischen Symptomatik, die durch die betroffenen afferenten Bahnen ausgelöst wird. So können EP Informationen über die zugrunde

liegende Störung, wie im Falle von MS Demyelinisierung und axonale Schädigung liefern.

In der MS Diagnostik kann die Untersuchung von visuellen, sensorischen, auditiven und motorischen EP hilfreich für die Diagnostik sein, darüber hinaus können durch EP diffuse Symptome objektiviert werden. Durch Demyelinisierung und axonale Schädigung kommt es zu verlangsamter Reizweiterleitung, Störung der Weiterleitung von Impulsen mit hoher Frequenz bis hin zur kompletten Reizleitungsblockade. Diese Störungen führen zu charakteristischen Veränderungen der EP, wie einer bestimmten Wellenmorphologie zusammen mit einer Latenzverzögerung, welche hinweisend für eine demyelinisierende Erkrankung sind, allerdings nicht spezifisch für MS.

Die Bedeutung von EP für die MS Diagnostik hat durch die MRT stark an Bedeutung verloren, da durch MRT Untersuchungen Läsionen mit einer höheren Sensitivität erkannt werden können. In den McDonald 2017 Kriterien wird weitere Forschung auf diesem Gebiet empfohlen, um das Potential der EP für die Diagnostik weiter zu explorieren.(25,27,81,82)

1.5.7 Differentialdiagnosen

Bei Personen, die sich mit einer klinischen Symptomatik präsentieren, welche für räumliche und zeitliche Dissemination typisch ist, verbunden mit für MS charakteristischen MRT Zeichen, ist die Diagnose MS sehr wahrscheinlich. Allerdings gibt es viele atypische Symptome, sogenannte „Red Flags“, bei deren Vorkommen beim Verdacht auf eine demyelinisierende Erkrankung an die Möglichkeit einer alternativen Diagnose gedacht werden muss. Miller et al. liefern in einem Übersichtsartikel eine Übersicht über klinische, demografische, paraklinische und radiologische Red Flags und geben auch eine Wertung über die Gewichtung der einzelnen Red Flags in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit einer anderen Diagnose an.(23)

Zusätzlich können sich eine Reihe von neoplastischen, angeborenen, metabolischen, vaskulären oder idiopathischen inflammatorisch-demyelinisierenden Erkrankungen ähnlich wie MS präsentieren (eine Auswahl an Differentialdiagnosen findet sich in Tabelle 4). Für ein optimales Management der Patientinnen und Patienten und deren Therapie ist eine frühe Diagnose essentiell.(23,25,62)

Zwei der häufigsten Differentialdiagnosen aus der Gruppe der idiopathisch inflammatorisch-demyelinisierenden Erkrankungen sind die akut disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) und die Neuromyelitis optica (NMO).

Die ADEM ist bei Erwachsenen selten und tritt vor allem bei Kindern auf. Klinisch präsentiert sich die ADEM beinahe immer monophasisch, beinhaltet multifokale neurologische Ausfälle und Enzephalopathie, teilweise liegt eine vorangegangene Infektion oder Impfung vor. In der MRT zeigen sich symmetrische multifokale oder diffuse Läsionen, die Liquoranalyse zeigt eine lymphatische Pleozytose und OCB können vorübergehend vorliegen. Da sich sowohl klinische-, radiologische- und Liquorparameter von ADEM und MS überschneiden, sollte bei der Diagnostik der ADEM vor allem auf das Vorliegen von Enzephalopathie geachtet werden Diese äußert sich durch Veränderungen des Bewusstseinszustandes, Verhaltensänderungen oder veränderte kognitive Funktion und hat typischerweise einen monophasischen Verlauf. (23,25)

Die NMO ist eine idiopathisch inflammatorisch-demyelinisierende Erkrankung des ZNS die typischerweise den Nervus opticus und das Rückenmark befällt. Die klinische Symptomatik und radiologische Charakteristika überschneiden sich mit denen der MS. Erst durch die Entdeckung des Biomarkers IgG Antikörper gegen Aquaporin 4 (AQP4-IgG) im Serum im Jahr 2004, konnte die NMO als eigene Erkrankung von MS differenziert werden, diese Differenzierung hat wichtige Folgen für Behandlung und Verlauf der Erkrankung. Der Test auf AQP4-IgG im Serum ist hochspezifisch, allerdings sollte er aufgrund der niedrigen Inzidenz der

NMO in Europa nicht routinemäßig bei allen Personen mit Verdacht auf eine demyelinisierende Erkrankung durchgeführt werden, sondern nur bei jenen Patientinnen und Patienten, die sich mit einem ersten Krankheitsschub präsentieren, welcher den klinischen Charakteristika einer NMO entspricht.

Tabelle 4: Ausgewählte Differentialdiagnosen mit schubhaft-remittierenden Verlauf.(25)

	Symptomatik	Paraklinische Parameter
NMOSD	Optikusneuritis (vor allem beidseits) Transverse Myelitis, starke Übelkeit und Erbrechen, paroxysmale tonische Spasmen	<u>MRT</u> : ausgedehnte Läsionen im N. Opticus, weitere Läsionen im Gehirn, Läsionen mit einer Ausdehnung von ≥ 3 Wirbelkörper im RM <u>CSF</u> : in 20 % OCB vorhanden IgG gegen Aquaporin-4 im Serum
Neurosarkoidose	Hirnnervenausfälle, Myelopathie, rasche Verschlechterung nach Absetzen von Glukokortikosteroiden, systemische Beteiligung möglich	<u>MRT</u> : KM Aufnahme der Meningen und nodulär innerhalb der Läsionen, vergrößerte Tränendrüsen <u>CSF</u> : OCB teilweise vorhanden Charakteristisches Lungenröntgen
ZNS Vaskulitis	Kopfschmerz, akute ZNS Syndrome wie Hemiparese oder Ataxie, systemische Beteiligung möglich	<u>MRT</u> : Punktförmige oder größere Läsionen in weißer und grauer Substanz, häufig KM aufnehmend <u>CSF</u> : OCB teilweise vorhanden Serum ANCA
CADASIL	Migräne, wiederkehrende akute Hemiparese oder andere vaskuläre Syndrome, Neuropsychiatrische Störungen, Demenz	<u>MRT</u> : Ausgedehnte Veränderungen in der weißen Substanz <u>CSF</u> : keine OCB Test auf NOTCH3 Genmutation
Bindegewebs- erkrankungen (SLE, Sjögren Syndrom, Anti- phospholipid Syndrom)	Optikusneuritis, transverse Myelitis, systemische Beteiligung möglich	<u>CSF</u> : OCB meist nicht vorhanden Test auf ANA, Antiphospholipid AK, IgG gegen Aquaporin 4
Morbus Behçet	Hirnstammsyndrom, Myelopathie, orale und genitale Ulzera, intraokulare Entzündung	<u>MRT</u> : KM aufnehmende Läsionen, v.A. in Mittelhirn, Thalami, Capsula Interna <u>CSF</u> : Pleozytose (> 50 Zellen/cm ³), OCB meist nicht vorhanden

NMOSD = Neuromyelitis optica Spektrum Erkrankungen, RM = Rückenmark, KM = Kontrastmittel, ANCA = Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper, CADASIL = Zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie, SLE = Systemischer Lupus Erythematoses, ANA = Antinukleäre Antikörper

Typische klinische Symptomatik der NMO beinhaltet eine Optikusneuritis, die im Gegensatz zu MS häufig bilateral auftritt, transverse Myelitis, ein Area postrema

Syndrom, gekennzeichnet durch anderweitig nicht erklärable Episoden von Schluckauf, Übelkeit und Erbrechen oder ein Hirnstamm Syndrom. Charakteristika der NMO in der MRT sind ausgedehnte longitudinale Läsionen im Rückenmark, die sich über mindestens 3 Wirbelsegmente erstrecken und im Vergleich zu MS eher zentral liegen, sowie ausgedehnte Läsionen im N. opticus, welche sich beispielsweise über die halbe Strecke von Orbita zu Chiasma Optimum ausbreiten. Im Gegensatz zur MS sind OCB bei NMO nur selten vorhanden.(23,25,83–85)

Es gibt Hinweise das Antikörper gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein, ein Protein das ausschließlich im ZNS an der Oberfläche der Myelinscheiden und an der Plasmamembran von Oligodendrozyten exprimiert wird, eine Rolle in der Pathogenese der ADEM und bei AQP4-IgG seronegativer NMO spielt. Die genaue Rolle dieses Antikörpers ist derzeit jedoch unklar und es bedarf weiterer Studien um die klinische Relevanz dieses Antikörpers für Diagnostik, Prognose und Behandlung zu ergründen.(86,87)

1.6 Therapie

Trotz intensiver Forschung im Bereich neuer MS Medikationen gibt es aktuell noch keine kausale Therapie. Die Behandlung der MS kann in Schubtherapie, also Behandlung der Symptome einer Verschlechterung im Rahmen eines Schubes und eine verlaufsmodifizierende Therapie, deren Ziel es ist, das Auftreten neuer Schübe zu verhindern, unterteilt werden. Zusätzlich werden symptomatische Medikamente eingesetzt um Beeinträchtigungen zu behandeln die im Laufe der Erkrankung auftreten, wie beispielsweise Muskelspasmen, Inkontinenz oder sexuelle Dysfunktion.

Der Nachteil der aktuellen verlaufsmodifizierenden Therapie liegt darin, dass ihre Wirkungsweise größtenteils auf die schubhaft inflammatorische Phase der MS

limitiert ist und sie zwar die Beeinträchtigung, welche sich im Rahmen von Schüben akkumuliert mindert, jedoch wenige Therapien zu Verfügung stehen, die die Progression und die damit assoziierte Beeinträchtigung aufhalten.(2,30,31,88,89)

In einer rezenten Phase III Studie konnte eine signifikant niedrigere Rate an klinischer und MRT Progression bei PPMS Patientinnen und Patienten unter Ocrelizumab Therapie im Vergleich mit Placebo gezeigt werden.(90)

Bei Ocrelizumab handelt es sich um einen humanisierten monoklonalen Antikörper, der seine Wirkung durch selektive Depletion von CD20 exprimierenden B-Zellen entfaltet. Bei Personen mit einer primär progredienten Verlaufsform wird eine Ocrelizumab Therapie empfohlen, die Marktzulassung der European Medicines Agency erfolgte im Jänner 2018.(91–94)

Das aktuelle Therapieschema der Deutschen Gesellschaft für Neurologie aus dem Jahr 2014 findet sich in Tabelle 5 . Auch das European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) und die European Academy of Neurology haben aktuell gemeinsam Guidelines für die MS Therapie, welche Anfang 2018 veröffentlicht wurden.(88,95,96)

Tabelle 5: Therapieschema der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. ©DGN/Prof. Ralf Gold.

Aus: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, www.dgn.org

		CIS ¹	RRMS ¹			SPMS ¹	
			1. Wahl	2. Wahl	3. Wahl	Mit aufgesetzten Schüben	Ohne aufgesetzte Schübe
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-)aktive Verlaufsform		<ul style="list-style-type: none"> •Alemtuzumab •Fingolimod •Natalizumab 	<ul style="list-style-type: none"> •Mitoxantron •(Cyclophosphamid)⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> •Experimentelle Verfahren 		
	Milde/moderate Verlaufsform	<ul style="list-style-type: none"> •Glatirameracetat •Interferon-β 1a i.m. •Interferon-β 1a s.c. •Interferon-β 1b s.c. 	<ul style="list-style-type: none"> •Dimethylfumarat •Glatirameracetat •Interferon-β 1a i.m. •Interferon-β 1a s.c. •Interferon-β 1b s.c. •PEG-Interferon-β 1a s.c. •Teriflunomid •(Azathioprin)² •(IVIg)³ 			<ul style="list-style-type: none"> •Interferon-β 1a s.c. •Interferon-β 1b s.c. 	<ul style="list-style-type: none"> •Mitoxantron •(Cyclophosphamid)⁴
Schubtherapie	2. Wahl	<ul style="list-style-type: none"> •Plasmapherese 					
	1. Wahl	<ul style="list-style-type: none"> •Methylprednisolonpuls 					

Die Wirkstoffe Ocrelizumab und Cladribin sind bereits zur MS Behandlung zugelassen aber noch nicht im Therapieschema der DGN verankert.

Bei Versagen der verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patientinnen und Patienten wie eine aktive MS behandelt.

¹ Substanzen in alphabetischer Reihenfolge; die hier gewählte Darstellung impliziert keine Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe.

² Azathioprin; zugelassen wenn Interferon-β nicht möglich oder unter Azathioprin Therapie stabiler Verlauf erreicht.

³ IVIg; Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.

⁴ Cyclophosphamid; zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren.

CIS = klinisch isoliertes Syndrom, RRMS = Schubförmig remittierende MS, SPMS = Sekundär progrediente MS, i.m. = intramuskulär, s.c. = subkutan, IVIg = intravenöse Immunglobuline.

1.6.1 Schubtherapie

Die Standardtherapie eines akuten Schubes besteht in der Gabe von Glukokortikosteroiden (GKS). Ziel dieser Behandlung liegt in der rascheren Rückbildung der Symptomatik des aktuellen Schubes, auf die Langzeitprognose und das zukünftige Auftreten neuer Schübe hat die Gabe von Glukokortikosteroiden allerdings keinen Effekt.(88,97)

Im deutschsprachigen Raum hat sich die Gabe eines Methylprednisolonpulses etabliert, hierbei wird eine tägliche Dosis von 500-1000mg Methylprednisolon intravenös für drei bis fünf Tage in Form einer Kurzinfusion verabreicht. Kommt es in diesem Zeitraum zu keiner Besserung, kann die GKS Therapie auf maximal 10 Tage verlängert werden. Vorzugsweise erfolgt die Verabreichung morgens, da dies eher dem physiologischen Hormonverlauf entspricht und für bessere Verträglichkeit sorgt. Der Vorteil von Methylprednisolon oder auch Dexamethason gegenüber anderen Glukokortikosteroiden liegt in einer besseren Liquorgängigkeit und linearen Dosiskinetik, bei gleichzeitig schwächerer mineralkortikoider Wirkung.(88,98)

Bei Patientinnen und Patienten, die auf die GKS Therapie nicht ansprechen, kann zwei Wochen nach Gabe der ersten GKS Dosis eine ultrahochdosierte Therapie mit bis zum 2000mg GKS erfolgen. Bleiben die Symptome weiter bestehen, sollte als Alternative eine Plasmapherese durchgeführt werden. Eine rezente Studie untersuchte das Ansprechen von CIS und MS Patientinnen und Patienten auf eine Plasmapherese, demnach kam es in 72 % der Fälle zu einer Besserung der klinischen Symptomatik.(88,99)

1.6.2 Verlaufsmodifizierende Therapie

Aktuell sind laut der European Medicines Agency 14 verschiedene Medikamente zur krankheitsmodifizierenden Therapie in der Europäischen Union zugelassen. Diese haben verschiedene Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile, außerdem ist die Verabreichungsform und –frequenz unterschiedlich. Die Entscheidung, welche

Behandlung für individuelle Patientinnen und Patienten am besten geeignet ist gestaltet sich äußerst komplex. Die Wahl der Medikation hängt nicht nur von der Wirkung der einzelnen Präparate ab, sondern ist aufgrund der verschiedenen Darreichungsformen und Therapieschemata auch stark von der Adherence der behandelten Personen abhängig. Darüber hinaus muss in der verlaufsmodifizierenden Therapie beachtet werden, dass aufgrund der verschiedenen Wirkmechanismen der verfügbaren MS Therapeutika und deren Auswirkungen auf das Immunsystem ein Wechsel der Therapie sorgfältig geplant werden muss, da Auswaschphasen und Karenzzeiten von bis zu sechs Monaten eingehalten werden müssen.

Das Ziel der Therapie ist die Reduktion der Schubrate und die Verminderung der Ansammlung von Läsionen im ZNS, um so eine Beeinträchtigung, die durch unvollständige Remission von Schüben entsteht, zu verhindern (Abbildung 7). Um den Ausbruch von MS hinauszuzögern, sollte bereits bei CIS Patienten eine krankheitsmodifizierende Therapie mit Interferon- β oder Glatirameracetat eingeleitet werden.(88,100,101)

Laut den aktuellen DGN Leitlinien sollte die Frühtherapie der RRMS mit den parenteral zu verabreichenden Interferon- β Präparaten oder Glatirameracetat erfolgen. Zusätzlich stehen zur Behandlung von milden oder moderaten Verlaufsformen die täglich oral zu verabreichenden Optionen Dimethylfumarat oder Teriflunomid zur Verfügung. In Summe werden diese Therapeutika auch als „first-line“ Therapien bezeichnet.

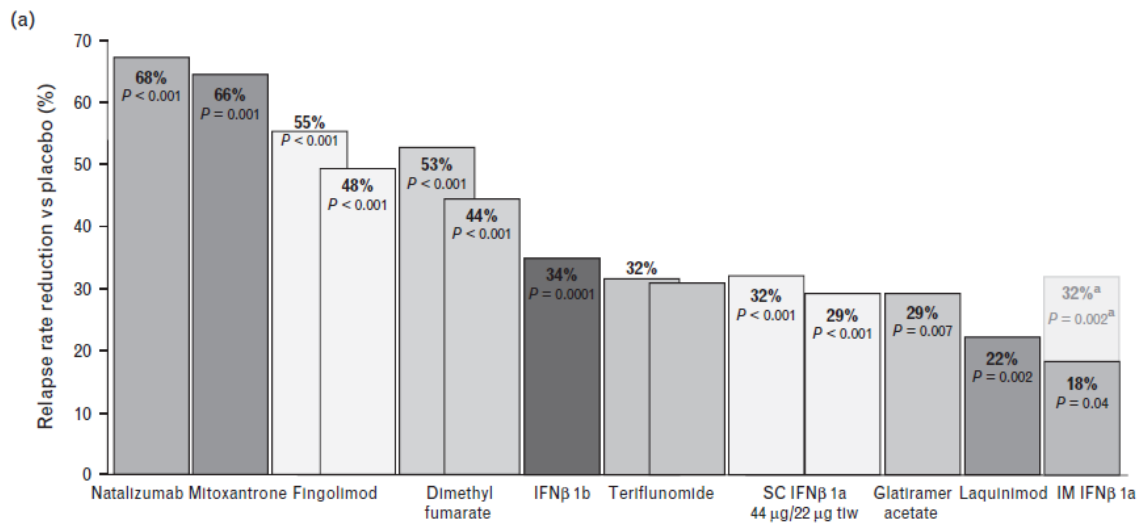
Interferon- β ist das bereits am längsten in der MS Therapie eingesetzte Therapeutikum und besitzt ein günstiges Nutzen-Risiko Profil, dies konnte in vielen Studien belegt werden.(102,103) Das von Fibroblasten produzierte Polypeptid hat eine entzündungshemmende und immunmodulatorische Wirkung, die genauen Wirkmechanismen sind jedoch nicht bekannt. Potentielle Angriffsmechanismen von Interferon- β sind die Regulation der T-Zell Aktivierung und Proliferation, Induktion antiinflammatorischer Zytokine oder Hemmung der

Migration von Immunzellen durch die BBB und die Hemmung der iNOS Expression auf Gliazellen. In der MS Therapie stehen die rekombinanten Formen Interferon- β 1a oder 1b zur Verfügung. Die verschiedenen Interferone unterscheiden sich sowohl in der Applikationsfrequenz als auch in der Applikationsform, welche entweder intramuskulär oder subkutan erfolgt.

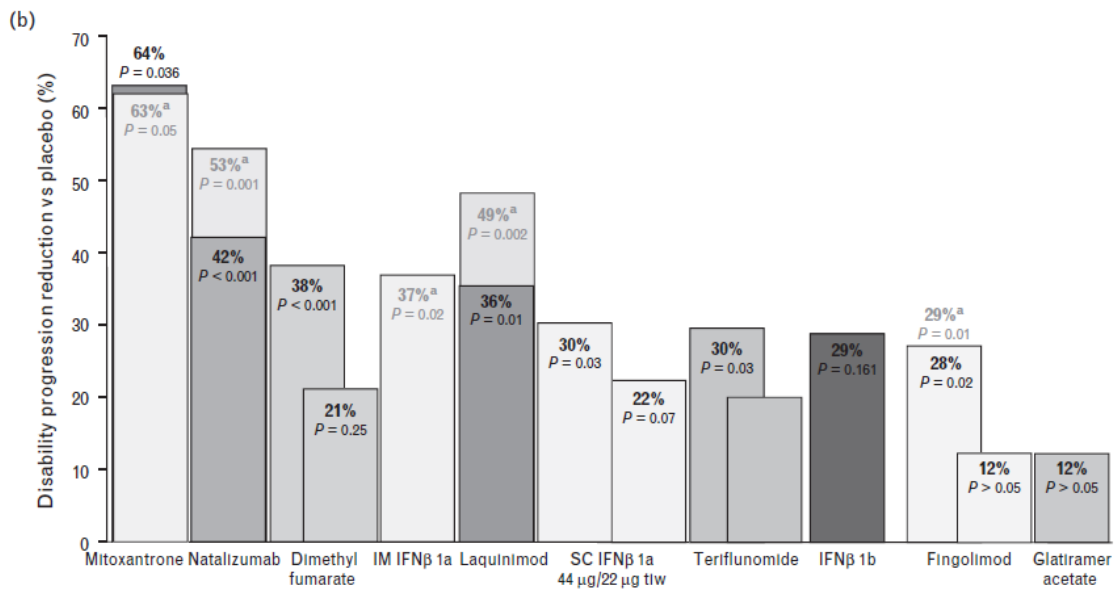
Typische Nebenwirkungen sind grippeähnliche Symptome wie Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen oder Schüttelfrost nach der Injektion, welche sich durch die prophylaktische Gabe von Ibuprofen oder Paracetamol lindern lassen. Überdies können bei den subkutan verabreichten Präparaten lokale Hautreaktionen auftreten. Außerdem kann es zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern kommen, welche die Wirkung der Therapie vermindern.(88,100,102–104)

Liegt trotz Einsatz eines „first-line“ Therapeutikums eine hohe Krankheitsaktivität vor oder besteht von Krankheitsbeginn an ein schwerer, schnell voranschreitender Verlauf, sollte eine Therapie mit einem sogenannten „second-line“ Therapeutikum erfolgen.

Von der DGN empfohlene Wirkstoffe sind Fingolimod, sowie die monoklonalen Antikörper Natalizumab und Alemtuzumab. Fingolimod und Natalizumab entfalten ihre Wirkung durch eine Hemmung der Migration von Immunzellen ins ZNS, Alemtuzumab erkennt das Oberflächenantigen CD52, das vom Großteil aller immunkompetenten Zellen im peripheren Blut exprimiert wird und sorgt für eine Zerstörung dieser. Allerdings gilt zu beachten, dass diese Medikamente neben der guten Wirksamkeit bei MS aufgrund ihrer Wirkmechanismen zum Teil schwere Nebenwirkungen auslösen können, etwa im Falle von Natalizumab das Auftreten der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie.(88,100,103)



Results (intent to treat) from separate clinical studies cannot be directly compared; ^afor patients completing 2 years in the study.



Results (intent to treat) from separate clinical studies cannot be directly compared; ^afor patients completing 2 years in the study.

Abbildung 7: Vergleich verschiedener krankheitsmodifizierender MS-Therapien mit Placebo: (a) in Bezug auf Schubrate, (b) in Bezug auf EDSS Reduktion. IM = intramuskulär, SC = subkutan. [Reproduced from (100) with permission from Wolters Kluwer Health, Inc.]

1.7 Biomarker bei Multipler Sklerose

Ein Biomarker ist definiert als ein Merkmal, das objektiv gemessen und ausgewertet wird und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder das pharmakologische Ansprechen auf eine therapeutische Intervention dient.(105)

MS ist eine sehr komplexe Erkrankung mit einem hohen Maß an Heterogenität in klinischer, radiologischer, pathologischer sowie auch in therapeutischer Hinsicht. Da MS Läsionen kaum biopsiert werden, werden Biomarker benötigt, welche die verschiedenen Aspekte der Krankheit objektivierbar darstellen. Biomarker haben das Potential zu einem besseren Verständnis von Ätiologie und Pathogenese beizutragen, die Diagnostik zu verbessern, den Effekt von Therapien zu bestimmen oder bei der Entdeckung neuer Therapieformen hilfreich zu sein.

Nach einem rezenten Übersichtsartikel können molekulare Biomarker bei MS in vier Kategorien unterteilt werden: prädiktive Biomarker, diagnostische Biomarker, Biomarker die die Krankheitsaktivität anzeigen und Biomarker, die das Ansprechen auf Therapie quantifizieren. Verschiedene Biomarker können allerdings auch in mehreren Kategorien inkludiert werden.(106,107)

Prädiktive Biomarker können eingesetzt werden um Personen zu erkennen, die zwar asymptomatisch sind aber ein erhöhtes Risiko haben an MS zu erkranken. Beispielsweise könnten so Verwandte von MS Patientinnen und Patienten untersucht werden, um das individuelle Erkrankungsrisiko zu bestimmen.

Diagnostische Biomarker können verwendet werden um bei Personen, die sich mit einer neurologischen Symptomatik präsentieren, die für eine demyelinisierende Erkrankung spricht, zu unterscheiden, ob es sich um MS, eine andere Erkrankung oder um gesunde Personen handelt. Ein Beispiel für einen diagnostischen Biomarker wäre das Auftreten von AQP4-IgG im Serum, ein Biomarker der hochspezifisch für NMO Patienten und Patientinnen ist und auch in den diagnostischen Kriterien für diese Erkrankung verankert ist.(83,106)

Biomarker welche die Krankheitsaktivität anzeigen können von den zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozessen der MS beeinflusst sein. So spielen vermutlich Biomarker, welche für Inflammation, Demyelinisierung und oxidativen Stress stehen, eine stärkere Rolle während der schubhaft-remittierenden Phase, Biomarker für axonale Schädigung und Neurodegeneration hingegen eher für das progrediente Voranschreiten der Erkrankung. Diese Form der Biomarker könnte, zusammen mit radiologischen und klinischen Methoden, hilfreich sein um Patientinnen und Patienten mit aktivem Verlauf von solchen mit milden Verläufen zu unterscheiden und somit helfen, die Therapie je nach Krankheitsaktivität zu adaptieren.

Trotz intensivster Forschung stehen aktuell praktisch nur eine Handvoll Biomarker für den klinischen Alltag zur Verfügung. Beispiele hierfür sind die Untersuchung auf Antikörper gegen den JC-Virus bei Natalizumab Therapie, der eine progressive multifokale Leukenzephalopathie auslösen kann oder der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern unter Interferon- β Therapie, die die Wirksamkeit der Therapie hemmen. Somit können Biomarker entscheidend für Therapieplanung und Sicherheit der MS Therapie sein.(102,103,106)

1.7.1 Biomarker in verschiedenen Körperflüssigkeiten

Biomarker können in verschiedenen Körperflüssigkeiten bestimmt werden, im Fall von MS werden vor allem CSF und peripheres Blut verwendet. Biomarkeranalysen aus anderen Körperflüssigkeiten, wie Urin, Speichel und Tränenflüssigkeit, werden bei MS seltener als bei anderen Erkrankungen durchgeführt und es bedarf weiterer Forschung in diesem Bereich.

Der Vorteil von Liquor liegt in seiner engen Beziehung zum ZNS. Er wird im ZNS gebildet und umspült dieses, somit liegt der Liquor direkt an dem Ort, an dem sich die pathologischen Prozesse bei MS abspielen. Allerdings ist Liquor schwer zugänglich, die Gewinnung von Liquor durch eine Lumbalpunktion ist eine invasive Methode, welche die Möglichkeit wiederholter Messungen einschränkt und somit

die Eingliederung in den klinischen Alltag im Rahmen von regelmäßigen Verlaufskontrollen erschwert.

Im Gegensatz dazu ist die Abnahme von peripherem Blut aus einer Vene weniger invasiv und somit für wiederholte Messungen im klinischen Alltag besser geeignet. Auch wenn das periphere Blut mehr Einflussfaktoren wie beispielsweise systemischen Inflammationen ausgesetzt ist und verschiedene Komponenten durch Verdünnung in geringeren Konzentrationen als im CSF vorliegen, ist die Gewinnung von Biomarkern aus dem peripheren Blut aufgrund der leichteren Zugänglichkeit zu bevorzugen.(106)

1.7.2 Notwendigkeit der Erforschung neuer Biomarker

Trotz Fortschritten in der MS Therapie und neuen Erkenntnissen in Hinsicht auf die Pathophysiologie der MS, ist das Wissen über diese Erkrankung bei weitem nicht vollständig. Es besteht ein Bedarf an neuen Biomarkern für MS, um das Verständnis über die Grundlagen der MS zu erweitern, den Verlauf genauer objektivieren und prognostizieren zu können, Therapiestrategien zu verfeinern, und um die Diagnostik zu präzisieren. Trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet haben die meisten Biomarker allerdings noch keine Relevanz für den klinischen Alltag.

Neue diagnostische Biomarker können hilfreich sein um Personen in frühen Erkrankungsphasen, welche die diagnostischen Kriterien für eine MS Diagnose noch nicht erfüllen, zu erkennen und somit frühzeitig eine spezifische Therapie zu starten oder um, wie im Falle der NMO, durch erkennen spezifischer Biomarker andere Differentialdiagnosen zu erkennen und eine Fehlbehandlung mit potentiell negativen Auswirkungen zu verhindern. Ein weiterer Grund für die Notwendigkeit neuer Biomarker liegt darin, dass Diagnostik und Verlaufsbestimmung stark von der Erfahrung der behandelnden Ärztinnen und Ärzte mit MS abhängt, dadurch gibt es einen Bedarf an objektiven Biomarkern um die klinische Entscheidungsfindung zu unterstützen und zu objektivieren.(75,106)

1.7.3 Biomarker für Neurodegeneration und Axonschädigung

Fortschreitende Axonschädigung und Neurodegeneration sind das morphologische Korrelat zur von Erkrankungsbeginn an kontinuierlich im Hintergrund ablaufenden Krankheitsprogression im ZNS bei MS. Darüber hinaus ist der Verlust von Axonen ein irreversibler Prozess, welcher ursächlich für das Voranschreiten der Erkrankung ist und die Hauptursache der dauerhaften neurologischen Beeinträchtigungen bei MS Patientinnen und Patienten. Aktuell gibt es keine im klinischen Alltag einsetzbaren Biomarker, welche die Progression bestimmen oder voraussagen können. Da es bereits früh im Verlauf der MS zu Axonschädigung kommt, haben Biomarker, welche diese Änderungen erfassen, das Potential eine objektive Prognose zu ermöglichen und frühzeitig Informationen bezüglich der Wirksamkeit einer Therapie darzustellen.(108–110)

Vielversprechende Biomarker für Progression sind Untereinheiten von Neurofilamenten, die nach ihrer molekularen Masse benannten Neurofilament light- (NfL), Neurofilament intermediate (NfM) und Neurofilament heavy chains (NfH). Neurofilamente sind wichtige Bestandteile des axonalen Zytoskeletts, kommt es zur Schädigung von Axonen werden Neurofilamente in den Extrazellularraum freigesetzt. Am besten erforscht sind die NfL, welche eher mit inflammatorischer axonaler Schädigung assoziiert sind und NfH, welche stärker mit chronischer axonaler Schädigung korrelieren. In einem rezenten Übersichtsartikel beschreiben Teunissen und Khalil die Rolle von Neurofilamenten als Biomarker bei MS. Demnach sind erhöhte NfL Werte im CSF assoziiert mit Schüben, gadoliniumaufnehmenden Läsionen, Auftreten von OCB und der Zellzahl im CSF. Außerdem traten erhöhte NfL Werte bei Patientinnen und Patienten auf, bei denen es zur Konversion von CIS zu MS kam, allerdings gab es keinen starken Zusammenhang mit der Progression. Im Gegensatz dazu sind erhöhte CSF NfH Werte, welche bei RRMS und SPMS auftraten, laut diesem Artikel assoziiert mit Progression in Bezug auf den EDSS, wodurch der NfH Wert potentiell prognostischen Wert haben könnte.(106,108)

Durch technische Limitationen war es bis vor kurzem nicht möglich, NfL im Serum zu messen, da bisherige Methoden eine zu geringe Sensitivität aufwiesen. Disanto et al. konnten durch Anwendung eines technisch weiterentwickelten Verfahrens, des Single Molecule Array (Simoa), die Sensitivität stark erhöhen und somit in einer kürzlich publizierten Studie zeigen, dass Serum NfL Werte die NfL Konzentrationen im CSF widerspiegeln und Serum NfL Werte bei MS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht sind. Überdies zeigte die Studie erhöhte Serum NfL Werte bei MS Erkrankten, welche kürzlich einen Schub erlitten hatten und bei Personen mit einem höheren EDSS Wert, sowie eine Assoziation von Serum NfL mit der Anzahl von T2- und gadoliniumaufnehmenden Läsionen. Außerdem ergab die Studie, dass es zu einer Abnahme des Serum NfL Wertes mit zunehmender Dauer einer verlaufsmodifizierenden Therapie kommt. Dementsprechend könnte Serum NfL eine Rolle in der Quantifizierung der Schwere der Erkrankung spielen, klinische Verschlechterungen anzeigen oder zur Überwachung verlaufsmodifizierender Therapien dienen.(111,112)

1.7.3.1 Stickoxid als Biomarker

NO ist sehr reaktionsfreudiges Molekül und hat eine sehr kurze Halbwertszeit, deshalb kann es in vivo nur schwer gemessen werden. Die Messung der stabileren Endprodukte Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) bietet allerdings eine Möglichkeit einen Rückschluss auf die NO Produktion in vivo zu ziehen, die Summe dieser beiden Werte wird als NO_x bezeichnet.(34,113)

Verschiedene Studien haben die NO_x Werte bei MS Patientinnen und Patienten im CSF untersucht. Im Großteil dieser Studien konnte ein signifikant erhöhter NO_x Wert im CSF bei an MS erkrankten Personen festgestellt werden.(114–119) In zwei Studien konnte gezeigt werden, dass die CSF NO_x bzw. Nitrit Werte bei aktivem Verlauf und in frühen Phasen im Vergleich mit Personen mit stabilem Verlauf signifikant erhöht waren, folglich CSF NO_x ein Marker für inflammatorische Krankheitsaktivität sein könnte (116,119). Auch bei PPMS Patientinnen und

Patienten konnten erhöhte CSF NO_x Werte werden.(115,116). Des Weiteren konnten Rejdak et al. in einer longitudinalen Studie eine Assoziation zwischen erhöhten Baseline CSF NO_x Werten und EDSS Progression nachweisen, ebenso wie eine Korrelation zwischen Baseline CSF NO_x Werten und T2-Läsionslast in MRT Untersuchungen.(116) Zusammenfassend hat CSF NO_x somit Potential als diagnostischer Marker und es gibt Ergebnisse, die auch ein Potential als Progressionsmarker erkennen lassen, allerdings sind CSF Werte aufgrund der notwendigen Lumbalpunktion nicht optimal für eine klinische Anwendung als Progressionsmarker.

Bisherige Studien zu NO_x Werten im peripheren Blut lieferten diametrale Ergebnisse. Es wurden sowohl signifikant erhöhte Werte bei MS Patientinnen und Patienten (114,117,120–126), als auch signifikant erniedrigte Werte (127–129) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen berichtet, ebenso gab es Studien, die keinen signifikanten Unterschied zwischen MS Patientinnen und Patienten und gesunden Kontrollgruppen feststellen konnten (115,118,130). Die Aussagekraft und Qualität der durchgeführten Studien ist sehr unterschiedlich, da teils geringe Kohortengrößen untersucht wurden, MS Verlaufsformen, Krankheitsdauer und weitere Faktoren variierten. Außerdem wurden die NO_x Werte sowohl im Serum als auch Plasma ermittelt, ein weiterer Faktor der den Vergleich der Studien potentiell erschwert.

1.8 Fragestellung

Oxidativer Stress spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS und führt zu Neurodegeneration und zum Voranschreiten der Erkrankung. Aktuelle Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass neben ROS auch RNS, im speziellen NO_x, ein entscheidender Faktor in der MS Pathogenese ist. Es gibt mehrere Studien die sich mit NO_x im CSF befassten (114–119), die Datenlage bezüglich NO_x im Serum ist jedoch weitgehend unklar.(114,115,117,118,120–130)

Ziel dieser Diplomarbeit ist es, durch Bestimmung der Serum NO_x Werte an einer größeren Kohorte im Vergleich mit gesunden Kontrollen, zu untersuchen inwiefern sich Serum NO_x als Biomarker für Krankheitsprogression eignet. Außerdem soll geklärt werden, welchen Einfluss verschiedene MS Verlaufsformen, Therapie, ausgewählte klinische Parameter, sowie Lebensstilfaktoren auf den NO_x Wert im Serum haben. Der Grund, warum die Bestimmung des NO_x Wertes aus Serum gegenüber CSF für diese Diplomarbeit gewählt wurde, trotz der potentiellen Schwierigkeit von vermehrter Verdünnung von NO_x im peripheren Blut und der Möglichkeit von Störung durch systemische Einflüsse, liegt in der geringeren Invasivität einer Blutabnahme gegenüber einer Lumbalpunktion, wodurch sich Serum Biomarker besser zur klinischen Verlaufskontrolle eignen.(34,75,106)

2 Material und Methoden

2.1 Patientinnen, Patienten und Kontrollen

Im Rahmen dieser Studie wurden 138 Patientinnen und Patienten untersucht die in der Ambulanz für multiple Sklerose am Institut für Neurologie der Medizinischen Universität Graz behandelt werden. Einschlusskriterien waren die Diagnose CIS oder MS bei zu Probeentnahme gültigen diagnostischen Kriterien.(23,63,67,68)

Die Kontrollgruppe besteht aus 76 gesunden Erwachsenen und wurde anhand der demographischen Daten an die Studienkohorte angepasst. Es wurden folgende Ausschlusskriterien definiert: keine chronischen oder akuten Erkrankungen wie Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, Leber- oder Nierenerkrankungen oder Schilddrüsenfunktionsstörungen sowie keine dauerhafte Einnahme von Medikamenten. Schwangere und stillende Frauen wurden ebenso ausgeschlossen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt. Alle Teilnehmerinnen und Teilnehmer waren volljährig und gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis an der Studie teilzunehmen.

2.2 Blutabnahme und Bestimmung des Serum NO_x Wertes

Blut wurde durch die Punktion einer peripheren Vene gewonnen, sofort bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend bei -80 °C nach aktuellen Biobanking Richtlinien bis zur Analyse aufbewahrt.(131) Die verwendeten Aliquote wurden für die Analysen dieser Studie erstmals aufgetaut. Die Lagerung und Handhabung der Blutproben erfolgte durch geschulte Analytikerinnen und

Analytiker, welche keine klinischen Informationen über die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer hatten.

Die Serum NO_x Konzentration wurde mittels Quantifizierung der Metaboliten Nitrit und Nitrat mithilfe des NO Quantification Kit der Firma Active Motif (Rixensart, Belgien) und spektralphotometrischer Analyse bei 540nm wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt und die Ergebnisse in Mikromolar dargestellt.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen SPSS 23.0 der Firma SPSS Inc. (Chicago, Illinois, USA) und GraphPad Prism 5 der Firma Graph Pad (San Diego, USA) durchgeführt.

Zur Untersuchung auf Unterschiede bezüglich der Geschlechterverteilung von Kontrollgruppe und Patientinnen und Patienten wurde der Chi-Quadrat Test angewandt. Die Daten wurden mithilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung geprüft. Für die Analyse von Gruppenunterschieden zwischen zwei Gruppen wurde der t-Test bzw. der Mann-Whitney U Test verwendet. Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen diente der Kruskal-Wallis Test. Bei der Analyse des Einflusses des täglichen Zigarettenkonsums auf den Serum NO_x Wert wurden die p-Werte mit der Bonferroni Korrektur für multiples Testen korrigiert. Zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten zwischen den Serum NO_x Werten, klinischen und demographischen Daten sowie Lebensstilfaktoren wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Im Rahmen dieser Studie wurden die Serum NO_x Werte von insgesamt 214 Personen untersucht, zwischen Studienkohorte und Kontrollgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich Alter und Geschlecht.

Für die Sammlung der demografischen Daten (Tabelle 6) wurden Geschlecht und Alter bei Probeentnahme ermittelt, darüber hinaus zu einem späteren Zeitpunkt retrospektiv Daten bezüglich Raucherstatus, Körpergröße und Körpergewicht bei Probeentnahme. Die retrospektiven Daten konnten von 111 der 138 Patientinnen und Patienten ermittelt werden. Aus den Daten zu Körpergröße und Körpergewicht wurde der Body Mass Index (BMI) berechnet. Personen die Angaben zu rauchen wurden in die Kategorien < 10 und ≥ 10 konsumierte Zigaretten pro Tag eingeteilt.

Außerdem wurden klinische Verlaufsform nach zum Zeitpunkt der Blutabnahme gültigen McDonald Kriterien, Vorliegen einer MS Therapie zum Zeitpunkt der Probeentnahme, sowie die Erkrankungsdauer festgestellt. Zur Beurteilung der Beeinträchtigung wurde der aktuellste schubfreie EDSS Wert herangezogen, der vor der Probeentnahme in der Ambulanz durch eine Neurologin oder einen Neurologen festgestellt wurde.(67,68)

Patientinnen und Patienten, welche bei Probeentnahme eine verlaufsmodifizierende Therapie erhielten, wurden mit einem der folgenden Wirkstoffe behandelt: Interferon-β (n = 53), Glatirameracetat (n = 13) oder Natalizumab (n = 20).

Tabelle 6: Demographische und klinische Daten

	CIS/MS*	KG	p Wert
Anzahl	138	76	NA
Anzahl weiblich (%)	86 (62,3)	48 (63,2)	NS ^a
Alter bei PE, Mittelwert (SD)	36,3 (9,3)	36,1 (9,0)	NS ^b
KD bei PE in Jahren, Median (IQR)	4,7 (2,3-9,2)	NA	NA
Anzahl Pat. Mit MS Therapie bei PE (%)	86 (62,3)	NA	NA
EDSS vor PE, Median (IQR)	1,5 (0,0-2,0)	NA	NA
BMI bei PE, Median (IQR), n = 111^d	23,7 (21,3-27,0)	22,7 (20,0-25,2)	0,017 ^c
Anzahl Raucher bei PE (%), n = 111^d	39 (35,1)	NA	NA
Anzahl akuter Schub^e (%)	6 (4,3)	NA	NA
Serum NO_x in µM, Median (IQR)	7,6 (5,4-11,2)	7,6 (5,8-10,9)	NS ^c

CIS = klinisch isoliertes Syndrom, MS = Multiple Sklerose, KG = Kontrollen, NA = nicht anwendbar, NS = nicht signifikant, KD = Krankheitsdauer, PE = Probeentnahme, SD = Standardabweichung, IQR = Interquartilsabstand, Pat. = Patientinnen und Patienten, RRMS = schubhaft remittierende MS, SPMS = sekundär progrediente MS.

* Die CIS/MS Gruppe setzt sich zusammen aus: CIS (n = 29), RRMS (n = 97), SPMS (n = 12).

^a Chi-Quadrat Test, ^b t-Test für unabhängige Stichproben, ^c Mann-Whitney U Test für unabhängige Stichproben. ^d Die Lebensstildaten (Raucherstatus, BMI) konnten nur bei 111 Personen ermittelt werden. ^e Akuter Schub im Zeitraum von 30 Tagen vor Probeentnahme

Patientinnen und Patienten bei denen es in einem Zeitraum von 30 Tagen vor Probeentnahme zum Auftreten von Symptomen kam, die den 2017 McDonald Kriterien eines Schubes entsprechen, wurden als „Person mit akutem Schub“ kategorisiert (n = 6).(27,63)

3.2 Serum NO_x Werte

3.2.1 Gruppenvergleiche

Beim Vergleich der Serum NO_x Werte zwischen der gesamten Studienkohorte (CIS und MS) und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den CIS/MS Patientinnen und Patienten und der gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden.

Betrachtet man die Serum NO_x Werte innerhalb der Gruppe von CIS und MS Patientinnen und Patienten, so zeigt sich, dass Frauen innerhalb dieser Gruppe einen signifikant höheren Serum NO_x Wert im Vergleich zu Männern innerhalb der Gruppe haben ($p = 0,018$ Mann-Whitney U Test), wie in Abbildung 8 dargestellt ist. Innerhalb der Kontrollgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Geschlechtes.

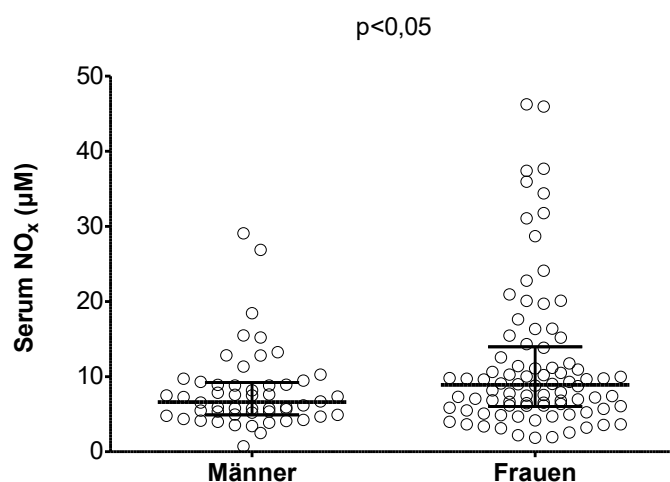


Abbildung 8: Serum NO_x Werte bei Männern und Frauen innerhalb der CIS/MS Gruppe. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median und den Interquartilsabstand.

Auch beim Vergleich zwischen an CIS erkrankten Personen und MS Patientinnen und Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Serum NO_x Werte. Beim Vergleich der verschiedenen MS Verlaufsformen untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede des Serum NO_x Wertes zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden.

3.2.2 Einfluss von verlaufsmodifizierender Therapie auf Serum NO_x

Vergleicht man, innerhalb der Gruppe der CIS und MS Patientinnen und Patienten, jene die zum Zeitpunkt der Probeentnahme eine verlaufsmodifizierende

Therapie erhielten mit den Personen die keine Therapie erhielten, so zeigt sich ein signifikant erhöhter Serum NO_x Wert bei Personen ohne verlaufsmodifizierende MS Therapie ($p = 0,003$, Mann-Whitney U Test). Bei Patientinnen und Patienten ohne verlaufsmodifizierende Therapie zeigt sich ein erhöhter Serum NO_x Wert im Vergleich mit der Kontrollgruppe ($p = 0,05$, Mann-Whitney U Test). Dargestellt wird dies in Abbildung 9.

Bei der Untersuchung zwischen den einzelnen Therapieformen (Interferon, Glatirameracetat, Tysabri) konnte kein signifikanter Unterschied der Serum NO_x Werte festgestellt werden.

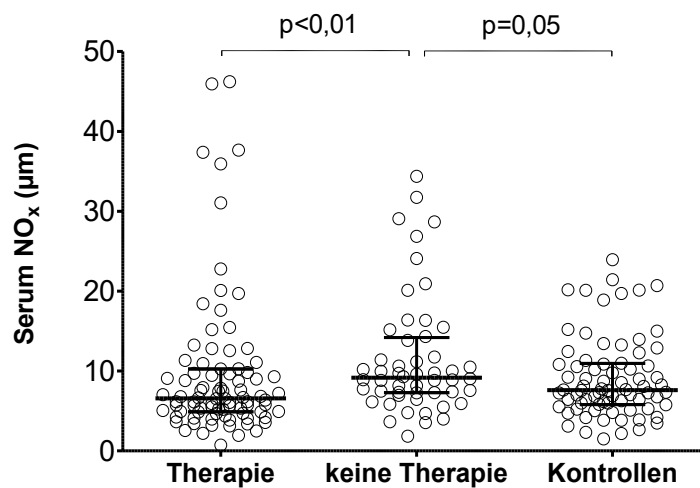


Abbildung 9: Serum NO_x Werte bei Personen mit CIS/MS die eine Therapie erhalten und bei Personen ohne Therapie. Rechts die Kontrollgruppe. Die Linien repräsentieren den Median und den Interquartilsabstand.

3.2.3 Einfluss von Lebensstilfaktoren auf Serum NO_x

Bei der Betrachtung des Raucherstatus und dessen Einfluss auf den NO_x Wert im Serum zeigt sich ein signifikant niedrigerer Wert bei Personen, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme geraucht haben im Vergleich zu Nichtraucherinnen und

Nichtrauchern (Mann-Whitney U Test, $p = 0,039$), dargestellt in Abbildung 10. Durch genauere Betrachtung der Daten zeigt sich, dass der NO_x Wert erst ab einer Menge von ≥ 10 Zigaretten pro Tag erniedrigt ist (Kruskal Wallis Test, $p = 0,029$), wie sich in Abbildung 11 zeigt.

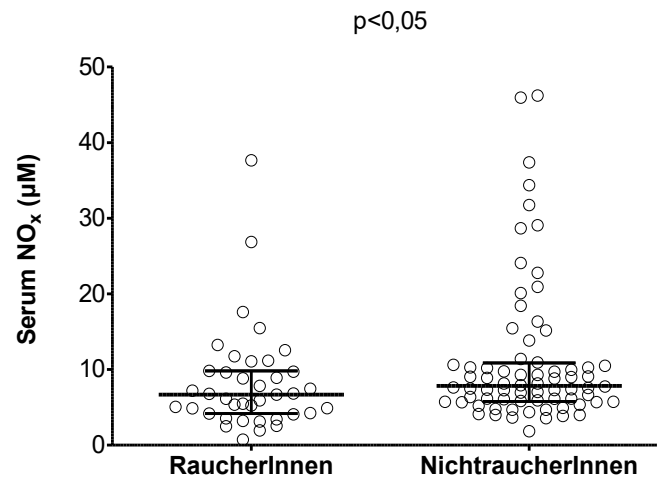


Abbildung 10: Serum NO_x Werte bei Personen mit CIS/MS die zum Zeitpunkt der Probeentnahme geraucht haben im Vergleich mit Personen die zum Zeitpunkt der Probeentnahme nicht geraucht haben. Die Linien repräsentieren den Median und den Interquartilsabstand.

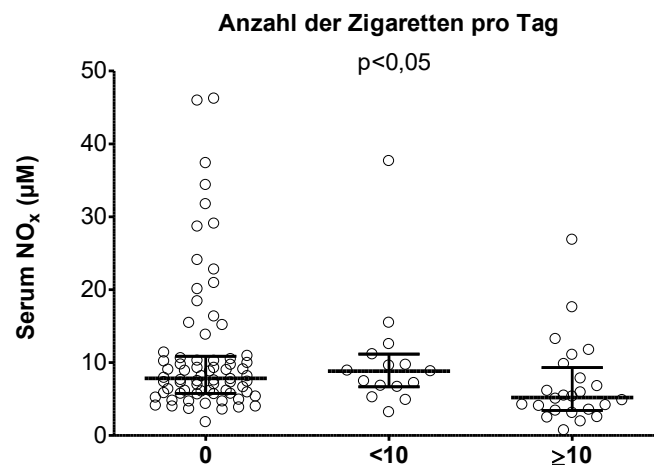


Abbildung 11: Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag und deren Einfluss auf den Serum NO_x Wert. Bonferroni-korrigiert für multiples Testen.

Nach Einteilung der Studienkohorte in Personen mit Normalgewicht (BMI 18,5 bis ≤ 25) und Personen mit Präadipositas und Adipositas (BMI > 25) zeigte sich im Gruppenvergleich kein signifikanter Unterschied der Serum NO_x Werte zwischen den beiden Gruppen. Auch bei der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden.

3.3 Korrelationen

Bei der Untersuchung der Daten der CIS/MS Patientinnen und Patienten auf das Vorliegen von Korrelationen des Serum NO_x Wertes mit Erkrankungsdauer, Rauchen, BMI, EDSS bei Probeentnahme und jährlicher Schubrate konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden. Auch in der Kontrollgruppe konnte keine signifikante Korrelation zwischen Serum NO_x Wert und BMI gezeigt werden. Des Weiteren wurden Korrelationen zwischen dem Baseline Serum NO_x und verschiedenen klinischen Progressionsmarkern nach mindestens zwei Jahren Follow-Up Zeit untersucht. Bei der Analyse der Daten jener Patientinnen und Patienten, welche bei der Follow-Up Untersuchung einen schubhaften Verlauf aufwiesen (n = 97) zeigte sich keine Korrelation zwischen jährlicher Schubrate und Serum NO_x. Bezüglich der Veränderung des EDSS vom Zeitpunkt der Probeentnahme bis zum Zeitpunkt der letzten Follow-Up Untersuchung, konnte keine Korrelation mit dem Serum NO_x Wert festgestellt werden. Ebenso konnte kein Zusammenhang zwischen Personen die von CIS zu MS konvertierten (n = 12) und Serum NO_x gezeigt werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit Serum NO_x als potentiellen Biomarker für Krankheitsaktivität und Progression bei CIS und MS Patientinnen und Patienten. Nach Auswertung der Studiendaten konnte ein signifikant erhöhter Serum NO_x Wert bei Personen ohne verlaufsmodifizierende Therapie im Vergleich zu CIS oder MS Patientinnen und Patienten, welche eine verlaufsmodifizierende Therapie erhielten, festgestellt werden. Außerdem zeigte sich innerhalb der Gruppe der an CIS oder MS erkrankten Personen ein signifikanter Einfluss des Geschlechtes und des Raucherstatus auf den Serum NO_x Wert. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied des Serum NO_x Wertes zwischen an CIS oder MS erkrankten Personen und den gesunden Personen der Kontrollgruppe festgestellt werden.

NO spielt eine wichtige Rolle im ZNS, so ist es bei physiologischen Verhältnissen in niedrigen Konzentrationen vorliegend etwa an der Regulation des Blutflusses und an der synaptischen Übertragung beteiligt. Bei Inflammation liegt NO jedoch in weitaus höherer Konzentration vor und ist an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen beteiligt, die in der Pathophysiologie der MS involviert sind. So können erhöhte Konzentrationen von NO etwa die BBB stören, Oligodendrozyten und Mitochondrien schädigen, Ionenkanäle und die synaptische Übertragung stören und sind somit Teil einer Kaskade von Prozessen, an deren Ende axonale Schädigung und Neurodegeneration steht. NO hat allerdings auch antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften, was die Funktion von NO in der Pathogenese der MS äußerst komplex gestaltet und es schwierig macht, einen genauen Nettoeffekt von NO in der Pathophysiologie zu bestimmen.(3,34,54,57)

MS ist in Bezug auf klinische Symptomatik, Verlauf, Pathologie und deren Einfluss auf die Therapie eine sehr komplexe und heterogene Erkrankung. Dadurch ergibt

sich die Notwendigkeit der Erforschung neuer Biomarker für MS um die verschiedenen Prozesse quantifizierbar darzustellen und so objektive Entscheidungen im Management von Betroffenen Patientinnen und Patienten treffen zu können. Zugleich sind Ätiologie und die Prozesse der Pathophysiologie der MS bis dato noch nicht vollständig ergründet und die Erforschung neuer Biomarker hat das Potential mehr Klarheit in die Vorgänge der Krankheitsentstehung und des Verlaufes zu bringen.

In dieser Studie wurde die Untersuchung von NO_x im Serum vollzogen, da sich die Blutabnahme aus einer peripheren Vene sehr viel besser für wiederholte Messungen im Rahmen von klinischen Kontrolluntersuchungen eignet als wiederholte Lumbalpunktionen, auch wenn Biomarker im Serum einer Vielzahl von potentiellen Störfaktoren im systemischen Kreislauf ausgesetzt sind und es im Vergleich zum CSF zu einer stärkeren Verdünnung der einzelnen Komponenten kommt. Aufgrund der Nähe zu den pathologischen Prozessen bei MS würde sich zwar CSF als Medium auf der Suche nach Biomarkern bei MS anbieten, allerdings mit dem Nachteil, dass angesichts der Invasivität einer Lumbalpunktion sich CSF für Marker bezüglich der Aktivität und Progression der Erkrankung nur bedingt im klinischen Alltag umsetzen lässt.(106)

Der Großteil der Studien, die NO_x Werte im CSF untersuchten, zeigten erhöhte Werte im Vergleich zu Kontrollen (114–119), jedoch lieferten bisherige Studien die sich mit der Thematik von NO_x als Biomarker im peripheren Blut beschäftigten variable Ergebnisse. Bei diesen wurden sowohl signifikant erhöhte, als auch signifikant erniedrigte Serum NO_x Werte im Vergleich mit Kontrollgruppen festgestellt und in anderen Studien konnte kein signifikanter Unterschied des Serum NO_x Wertes festgestellt werden.(114,115,117,118,120–130) Da die Methodik in diesen Studien variierte und teils nur kleine Studienkohorten und Kontrollgruppen vorlagen, war es das Ziel dieser Studie, durch den Vergleich einer größeren Studienkohorte mit einer größeren Kontrollgruppe und durch hohe qualitative Standards der Proben, welche für die Analysen dieser Studie erstmals

aufgetaut wurden, den Einfluss von präanalytischen Faktoren möglichst gering zu halten und somit möglichst valide Ergebnisse zu erhalten.(131)

Während die destruktive Rolle von oxidativem Stress in der Pathogenese der MS schon besser erforscht ist, verbleibt die Rolle von nitrosativem Stress großteils unklar. NO ist in eine Vielzahl von Prozessen in der Pathophysiologie im Verlauf der MS involviert, die Art der Schädigung im ZNS durch NO ist in den verschiedenen Erkrankungsstadien jedoch unterschiedlich und hängt stark davon ab, in welchem Stadium sich eine Läsion befindet.(39,40)

Beim Vorherrschen von inflammatorischen Bedingungen produzieren Makrophagen und Mikroglia durch die Aktivierung von iNOS große Mengen an NO. Aufgrund der Reaktion mit anderen Verbindungen kommt es zur Entstehung von Metaboliten welche ein Milieu von oxidativem und nitrosativem Stress induzieren, dies führt zu Schädigung von verschiedenen Zelltypen, beispielsweise durch Oxidierung von DNA. Oligodendrozyten reagieren besonders sensibel auf durch NO verursachte Schädigung. Die Hochregulation von iNOS in akuten inflammatorischen MS Läsionen konnte in verschiedenen pathologischen Studien nachgewiesen werden.(34,46,52,132,133)

Neben der direkten Schädigung in akut inflammatorischen Läsionen ist NO auch in den Prozess der axonalen Degeneration involviert, der wiederum in zwei Stadien unterteilt werden kann. Einerseits akute axonale Schädigung bei akut inflammatorischen Läsionen und andererseits langsame, kontinuierliche axonale Degeneration im Rahmen der chronisch inflammatorischen Läsionen. Die genauen Mechanismen dieser beiden Prozesse sind noch nicht bekannt, jedoch ist NO vermutlich in beide dieser Phasen involviert. In den akut inflammatorischen Läsionen kommt es zu inflammationsbedingter Ausschüttung von verschiedenen Molekülen, unter anderem RNS und ROS, dies führt zur Durchtrennung von Axonen in aktiven Läsionen.(36,132,133)

Die Ursache für die langsame, chronische Neurodegeneration ist vermutlich eine Folge von Veränderungen innerhalb der demyelinisierten Axone. So kommt es, als

Reaktion auf die Demyelinisierung, zu einem Missverhältnis der Menge an Energie die in den Mitochondrien produziert wird und dem Energiebedarf, der für den axonalen Transport benötigt wird, ein Prozess, der schlussendlich zur irreversiblen Zerstörung des Axons führt. NO greift in mehrere Schritte dieser Kaskade ein und ist somit ein wichtiger Faktor der axonalen Schädigung in chronisch inflammatorischen Läsionen. Beispielsweise schädigt NO die Mitochondrien direkt, indem es die mitochondriale Atmungskette stört und somit den Energiemangel verstärkt. Darüber hinaus kann die Schädigung von Mitochondrien durch ROS und RNS in der inflammatorischen Phase zu einer verstärkten ROS Produktion der geschädigten Mitochondrien in der späteren Erkrankungsphase führen. Außerdem hat NO das Potential, die axonale Reizweiterleitung direkt zu stören und kann ebenso die Funktion der axonalen Na⁺ Kanäle stören.(34,35,133)

Da NO sowohl in die frühen, als auch in die späteren Erkrankungsphasen, in denen Inflammation in den Hintergrund tritt, involviert ist, ergibt sich die Annahme, dass sich NO als Progressionsmarker über den gesamten Krankheitsverlauf eignen könnte.

In der hiesigen Studie konnte gezeigt werden, dass an CIS oder MS erkrankte Personen, welche eine verlaufsmodifizierende Behandlung erhielten, signifikant niedrigere Serum NO_x Werte hatten, als Erkrankte die keine verlaufsmodifizierende Therapie erhielten. Stepien et al. konnten in einer longitudinalen Studie über 3 Jahre die RRMS Patientinnen und Patienten einschloss, welche erstmals mit Interferon-β 1a oder 1b therapiert wurden, einen ähnlichen Effekt zeigen. Dabei konnte eine signifikante Reduktion des Serum Nitrit Wertes zum Endpunkt der Studie festgestellt werden.(134) Ein Grund für diese Reduktion könnte die selektive Hemmung der iNOS Expression auf Gliazellen durch Interferon-β sein.(104)

In den letzten Jahren hat sich die Therapielandschaft dahin gehend verändert, dass sogenannte „second-line“ Therapeutika zu Verfügung stehen, welche in ihrer Wirksamkeit um vieles potenter sind als die älteren „first-line“ Medikamente. Dies

könnte eine Ursache für die in dieser Studie gezeigte Reduktion des Serum NO_x Wertes sein und somit könnte Serum NO_x ein potentieller Marker für die Effektivität einer verlaufsmodifizierenden Therapie sein.

Gegenteilige Ergebnisse zeigte eine Studie bei welche den Einfluss verschiedener verlaufsmodifizierender Therapien auf den Serum NO_x Wert bei RRMS Patientinnen und Patienten untersucht wurde. Hierbei wurden erhöhte Serum NO_x Werte bei an RRMS erkrankten Personen unter Interferon-β 1a, Interferon-β 1b oder Glatirameracetat Therapie im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt. Allerdings bestand die Kontrollgruppe aus nur zehn Personen und es wurde keine Lagerungstemperatur der Proben angegeben.(135)

Der Vergleich mit anderen Studien, die sich mit NO_x im peripheren Blut beschäftigen, erschwert sich durch die Variabilität in Methodik und Durchführung der Studien. In zwei rezenten größeren Studien wurde etwa ein signifikant niedrigerer NO_x Wert im Plasma von an MS erkrankten Personen im Vergleich zu gesunden Kontrollen festgestellt (127,128). Da allerdings Plasma untersucht wurde, ist die Vergleichbarkeit mit den aus Serum ermittelten Ergebnissen der vorliegenden Studie nur eingeschränkt möglich, wie ein Übersichtsartikel zeigt in den Konzentrationen von Nitrit und Nitrat in Plasma und Serum untersucht wurden. Als mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Konzentrationen werden präanalytische Faktoren wie die Auswahl der Monovetten und verschiedene Stoffwechselfvorgänge im Blut diskutiert.(136)

Der Vergleich mit Studien die eine signifikante Erhöhung des Serum NO_x Wertes bei MS Patientinnen und Patienten berichten ist nur eingeschränkt möglich, da in vier Studien (114,121,124,125) die Proben bei -20 °C gelagert wurden, bei vier anderen Studien (117,120,122,135) wurde keine Lagerungstemperatur angegeben, eine Studie (123) führte die Lagerung der Proben bei -35 °C durch und eine weitere lagerte die Proben zunächst bei -20 °C und anschließend bei -70 °C (126). Die Problematik hierbei ergibt sich dadurch, dass die Stabilität der

Proteine in den Proben bei -20 °C über längere Zeit nicht gegeben ist, wie Teunissen et al. in den 2009 erstellten Standards für Biobanking darstellen. Eine Problematik, die natürlich auch dadurch zustande kommt, dass ein Teil dieser Studien vor Erstellung dieser Richtlinien durchgeführt wurde.(114,117,122,123,125)

Auch bei jenen Studien, die keinen signifikanten Unterschied von NO_x im peripheren Blut zwischen MS Patientinnen und Patienten und gesunden Kontrollen feststellen konnten (116,118,130,135), ist die Vergleichbarkeit aufgrund verschiedener Methodiken und teils kleiner Studienkohorten und Kontrollgruppen begrenzt.

Eine Ursache dafür, dass die erhöhten Konzentrationen an NO, welche im ZNS in pathologischen Studien und im CSF gezeigt werden konnten, im Serum nicht festgestellt werden konnten, könnte darin liegen, dass sich in der Studienkohorte nur sechs Personen befinden, die in den letzten 30 Tagen einen akuten Schub erlitten hatten. Ein weiterer Grund für den fehlenden Unterschied des Serum NO_x Wertes könnte sich dadurch ergeben, dass es im systemischen Kreislauf vermutlich zu einer stärkeren Verdünnung von NO_x aus dem ZNS kommt. Außerdem sind systemische Produktion von NO und Aufnahme von NO durch Ernährung weitere potentielle Quellen und Störfaktoren für NO_x im Serum, welche sowohl auf Kontrollen, als auch die Studienkohorte Einfluss haben könnten.(34)

Bezüglich des Einflusses des Geschlechts auf den Serum NO_x Wert konnte bei den gesunden Kontrollen kein signifikanter Unterschied zwischen Frauen und Männern festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Studien, die diese Fragestellung untersuchten, allerdings gibt es nur wenige Studien die sich mit dieser Thematik befassen.(137–139)

Innerhalb der Gruppe der Erkrankten wurde ein signifikant erhöhter Serum NO_x Wert bei Frauen im Vergleich zu Männern festgestellt. Ein Vergleich zu anderen Studien fällt hierbei schwer, da in Studien welche sich mit NO_x im Serum bei MS

Patientinnen und Patienten beschäftigten, bisher Geschlechtsunterschiede nicht untersucht wurden. Es gibt Studien aus anderen Forschungsgebieten in denen ein Einfluss von Östrogenen auf verschiedene NOS Isoformen und den NO_x Haushalt diskutiert wird.(140–143)

Es konnte in dieser Diplomarbeit außerdem eine Auswirkung von Zigarettenkonsum auf die Konzentration von NO_x im Serum gezeigt werden. Auch wenn es keine in der Methodik vergleichbaren Studien gibt, so bestätigen diese Ergebnisse Studien aus anderen Forschungsgebieten, wie aus dem Bereich der Kardiologie. Diese konnten zeigen, dass die Expression und Aktivität von NOS durch Zigarettenrauch vermindert wird.(144–147) Jedoch bleibt die Bedeutung der verminderten Serum NO_x Werte bei starken Rauchern vorerst unklar.

Der Umstand, dass zum Zeitpunkt der Probeentnahme kein Routinelabor abgenommen wurde um subklinische Infektionen auszuschließen, muss als Limitation genannt werden. Des Weiteren schmälert die retrospektive Erhebung der Lebensstilfaktoren bei der Studienkohorte die Genauigkeit der Aussagekraft der Ergebnisse bezüglich BMI und Rauchen. Allerdings wurden die untersuchten Serumproben nach aktuellen Standards für Biobanking gelagert und verarbeitet, um den Einfluss von präanalytischen Faktoren möglichst gering zu halten und eine hohe Qualität der Proben zu gewährleisten, überdies wurden die Proben im Rahmen dieser Studie erstmals verwendet.(131)

Zusammengefasst konnten die Ergebnisse dieser Studie das Potential von Serum NO_x als Biomarker für die Wirksamkeit von verlaufsmodifizierender Therapie aufzeigen. Bezüglich der Eignung von Serum NO_x als Progressionsmarker und dessen Implementierung in klinischen Alltag konnte keine Klarheit geschaffen werden, allerdings können die Ergebnisse künftigen Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Biomarkerforschung bei multipler Sklerose als valider Vergleich mit einer großen Studien- und Kontrollkohorte dienen. Ein Ansatz für zukünftige

Studien wäre etwa die longitudinale Untersuchung des Serum NO_x Wertes von Personen unter verlaufsmodifizierender Therapie und ob es Korrelationen bezüglich paraklinischen MRT Parametern gibt.

5 Literaturverzeichnis

1. Hallwirth F, Moser D, Voortman M, Greiner P, Fuchs S, Enzinger C, et al. Serum nitric oxide is increased in untreated multiple sclerosis patients. *Mult Scler J.* 2017;23(S3):586–7.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Vol. 372, *The Lancet.* 2008. p. 1502–17.
3. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(9):545–58.
4. Ramagopalan S V., Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol.* 2010;9(7):727–39.
5. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor B V., et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology.* 2014;83(11):1022–4.
6. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 2010;9(5):520–32.
7. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology.* 2008;71(2):129–35.
8. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J.* 1971;3:725–9.
9. Elian M, Dean G. Multiple sclerosis among the United Kingdom-born children of immigrants from the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990;53(10):3906–11.
10. Alter M, Halpern L, Kurland L, Bornstein B, Leibowitz U, Silberstein J. Multiple sclerosis in Israel. Prevalence among immigrants and native inhabitants. *Arch Neurol.* 1962;7:253–63.
11. Baumhackl U, Eibl G, Ganzinger U, Hartung HP, Mamoli B, Pfeiffer KP, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Austria. Results of a nationwide survey. *Neuroepidemiology.* 2002;21:226–34.

12. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol.* 2004;3(12):709–18.
13. Dyment DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, et al. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: Susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet.* 2005;14(14):2019–26.
14. Ramagopalan S V., Morris AP, Dyment DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, et al. The inheritance of resistance alleles in multiple sclerosis. *PLoS Genet.* 2007;3(9):1607–13.
15. Wallin MT, Page WF, Kurtzke JF. Multiple Sclerosis in US Veterans of the Vietnam Era and Later Military Service: Race, Sex, and Geography. *Ann Neurol.* 2004;55(1):65–71.
16. Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, et al. Familial risk of multiple sclerosis: A nationwide cohort study. *Am J Epidemiol.* 2005;162(8):774–8.
17. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen H, Brønnum-Hansen H, Kyvik K. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler.* 2005;11(5):504–10.
18. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol.* 2015;14(3):263–73.
19. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008;7(3):268–77.
20. Budhram A, Parvathy S, Kremenchutzky M, Silverman M. Breaking down the gut microbiome composition in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2017;23(5):628–36.
21. Lublin FD, Reingold SC, Cohen J a, Cutter GR, Thompson AJ, Wolinsky JS, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis : The 2013 revisions Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. *Neurology.* 2014;83(3):278–86.
22. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet*

- Neurol. 2012;11(2):157–69.
23. Miller D, Weinshenker B, Filippi M, Banwell B, Cohen J, Freedman M, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Scler.* 2008;14(9):1157–74.
 24. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: A unifying concept. *Brain.* 2006;129(3):606–16.
 25. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet.* 2016;389(10076):292–302.
 26. Brownlee WJ, Swanton JK, Altmann DR, Ciccarelli O, Miller DH. Earlier and more frequent diagnosis of multiple sclerosis using the McDonald criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(5):584–5.
 27. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 2018;17(2):162–73.
 28. Lassmann H. Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology. *Exp Neurol.* 2014;262:2–7.
 29. Tremlett H, Zhao Y, Devonshire V. Natural history of secondary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008;14(3):314–24.
 30. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2007;6(10):903–12.
 31. Hauser SL, Chan JR, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: Prospects and promise. *Ann Neurol.* 2013;74(3):317–27.
 32. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol.* 2012;142(1):2–8.
 33. Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003;9(6):540–9.
 34. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002;1(4):232–41.
 35. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2009;8(3):280–91.

36. Trapp BD, Peterson JW, Ransohoff RM, Rudick RA, Mork S, Bo L, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338(5):278–85.
37. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(4):225–38.
38. Bjartmar C, Yin X, Trapp BD. Axonal pathology in myelin disorders. *J Neurocytol.* 1999;28(4–5):383–95.
39. Lassmann H, Van Horssen J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(3):506–510.
40. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain.* 2012;135(3):886–99.
41. Bolaños JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem.* 1997;68(6):2227–40.
42. Higgins GC, Beart PM, Shin YS, Chen MJ, Cheung NS, Nagley P. Oxidative stress: Emerging mitochondrial and cellular themes and variations in neuronal injury. *J Alzheimer's Dis.* 2010;20:453–73.
43. Witte ME, Geurts JGG, de Vries HE, van der Valk P, van Horssen J. Mitochondrial dysfunction: A potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion.* 2010;10(5):411–8.
44. Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* 2011;17(4):495–9.
45. Cross AH, Manning PT, Keeling RM, Schmidt RE, Misko TP. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1998;88(1–2):45–56.

46. Liu JS, Zhao ML, Brosnan CF, Lee SC. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 2001;158(6):2057–66.
47. Diaz-Sanchez M, Williams K, DeLuca GC, Esiri MM. Protein co-expression with axonal injury in multiple sclerosis plaques. *Acta Neuropathol.* 2006;111(4):289–99.
48. van Horssen J, Schreibelt G, Drexhage J, Hazes T, Dijkstra CD, van der Valk P, et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesions coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(12):1729–37.
49. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain.* 2011;134(7):1914–24.
50. Smith KJ. Newly lesioned tissue in multiple sclerosis--a role for oxidative damage? *Brain.* 2011;134:1877–81.
51. Lassmann H, Van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 2011;585(23):3715–23.
52. Oleszak EL, Zaczynska E, Bhattacharjee M, Butunoi C, Legido A, Katsetos CD. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(4):438–45.
53. De Groot CJA, Ruuls SR, Theeuwes JWM, Dijkstra CD, van der Valk P. Immunocytochemical Characterization of the Expression of Inducible and Constitutive Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997;56(1):10–20.
54. Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G. Nitric Oxide and Multiple Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005;5(3):232–8.
55. Giovannoni G, Miller RF, Heales SJR, Land JM, Harrison MJG, Thompson EJ. Elevated cerebrospinal fluid and serum nitrate and nitrite levels in patients with central nervous system complications of HIV-1 infection: A correlation with blood-brain-barrier dysfunction. *J Neurol Sci.*

- 1998;156(1):53–8.
56. Jack C, Antel J, Brück W, Kuhlmann T. Contrasting potential of nitric oxide and peroxynitrite to mediate oligodendrocyte injury in multiple sclerosis. *Glia*. 2007;55(9):926–34.
 57. Willenborg DO, Staykova MA, Cowden WB. Our shifting understanding of the role of nitric oxide in autoimmune encephalomyelitis: A review. *J Neuroimmunol*. 1999;100(1–2):21–35.
 58. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, et al. The natural history of multiple sclerosis, a geographically based study 10: Relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(7):1914–29.
 59. Frohman TC, Davis SL, Beh S, Greenberg BM, Remington G, Frohman EM. Uhthoff’s phenomena in MS - Clinical features and pathophysiology. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(9):535–40.
 60. Davis SL, Stu O. Modeling Uhthoff ’ s phenomenon in MS patients with internuclear ophthalmoparesis. *Neurology*. 2008;70(13 Pt 2):1098–106.
 61. Smith KJ, McDonald WI. The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanisms underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 1999;354(1390):1649–73.
 62. Selchen D, Bhan V, Blevins G, Devonshire V, Duquette P, Grand’Maison F, et al. MS, MRI, and the 2010 McDonald criteria: A Canadian expert commentary. *Neurology*. 2012;79(23, Supplement 2):S1–15.
 63. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121–7.
 64. Meyer-Moock S, Feng Y-S, Maeurer M, Dippel F-W, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol*. 2014;14:58.

65. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444–52.
66. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. *Mult Scler*. 1999;5(4):244–50.
67. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, et al. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2005 Revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol*. 2005;58:840–6.
68. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.
69. Rovira À, Wattjes MP, Tintoré M, Tur C, Yousry TA, Sormani MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis—clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(8):471–82.
70. Filippi M. Magnetic Resonance Techniques in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2011;68(12):1514.
71. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano, Evangelou N, Kappos L, et al. MRI Criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol*. 2016;15(3):292–303.
72. Filippi M, Charil A, Rovaris M, Absinta M, Rocca MA. Insights from magnetic resonance imaging. 1st ed. Vol. 122, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2014. 115-149 p.
73. Stefano N De, Giorgio A, Battaglini M, Rovaris M, Sormani M, Barkhof F, et al. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology*. 2010;74(23):1868–76.
74. Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2006;5(2):158–70.
75. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C, Killestein J. Body fluid biomarkers for multiple sclerosis—the long road to clinical application. *Nat*

- Rev Neurol. 2015;11(10):585–96.
76. Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013;84(8):909–14.
 77. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2013;262(1–2):1–10.
 78. Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(8):897–902.
 79. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2005;62(6):865–70.
 80. Link H, Huang YM. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*. 2006;180:17–28.
 81. Comi G, Leocani L, Medaglini S, Locatelli T, Martinelli V, Santuccio G, et al. Measuring evoked responses in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1999;5(4):263–7.
 82. Leocani L, Comi G. Clinical neurophysiology of multiple sclerosis. 1st ed. Vol. 122, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2014. 671-679 p.
 83. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology*. 2015;85(2):177–89.
 84. Lennon PVA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, et al. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;364(9451):2106–12.
 85. Pandit L, Asgari N, Apiwattanakul M, Palace J, Paul F, Leite M, et al. Demographic and clinical features of neuromyelitis optica: A review. *Mult Scler J*. 2015;21(7):845–53.

86. Pohl, MD D, Alper G, Van Haren K, Kornberg AJ, Lucchinetti CF, Tenenbaum S, et al. Acute disseminated encephalomyelitis: Updates on an inflammatory CNS syndrome. *Neurology*. 2016;87(9 Supplement 2):S38–45.
87. Reindl M, Di Pauli F, Rostásy K, Berger T. The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(8):455–61.
88. Gold R, Wiendl H, Hemmer B. DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Multiplen Sklerose. *Aktuelle Neurol*. 2014;21(6):326–7.
89. Frohman TC, Castro W, Shah A, Courtney A, Ortstadt J, Davis SL, et al. Symptomatic therapy in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2011;4(2):83–98.
90. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376(3):209–20.
91. New medicine for multiple sclerosis (European Medicines Agency) [Internet]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2017/11/news_detail_002847.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1
- 92.ECTRIMS and EAN join forces to formulate the first European MS treatment guidelines [Internet]. Available from: <https://www.ectrims.eu/wp-content/uploads/2016/09/ECTRIMS-2016-Press-Release-first-European-MS-treatment-guidelines.pdf>
93. Multiple Sklerose: Neue Therapieoptionen fließen in aktualisierte Leitlinien ein (Deutsche Gesellschaft für Neurologie) [Internet]. Available from: <https://www.dgn.org/presse/pressemitteilungen/55-pressemitteilung-2017/3465-multiple-sklerose-neue-therapieoptionen-fluessen-in-aktualisierte-leitlinien-ein>
94. European public assessment report for Ocrevus. 2018.
95. Otero-Romero S, Amato M., Chandraratna D, Clanet M, Comi G, Derfuss T, et al.ECTRIMS-EAN clinical practice guideline on pharmacological

- management of multiple sclerosis. ECTRIMS Online Libr. 2016;
96. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Susana O-R. ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Mult Sclerosis J.* 2018;96–120.
 97. Brusaferri F, Candelise L. Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *J Neurol.* 2000;247(6):435–42.
 98. Burton J, O Connor P, Hohol M, Beyene J. Oral versus Intravenous Steroids for Treatment of Relapses in Multiple Sclerosis (Review) Oral versus Intravenous Steroids for Treatment of Relapses in Multiple Sclerosis. *Cochrane database Syst Rev.* 2012;(12).
 99. Ehler J, Koball S, Sauer M, Mitzner S, Hickstein H, Benecke R, et al. Response to therapeutic plasma exchange as a rescue treatment in clinically isolated syndromes and acute worsening of multiple sclerosis: A retrospective analysis of 90 patients. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134583.
 100. Sorensen PS. New management algorithms in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol.* 2014;27(3):246–59.
 101. European Medicines Agency [Internet]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Ffanding%2Fepar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124&searchTab=searchByKey&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&status=Authorised&keyword=multiple+sclerosis&searchType=ti&taxonomyPath=Health+Care&t
 102. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology.* 2010;74(SUPPL1):S17-24.
 103. Torkildsen O, Myhr KM, Bø L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. *Eur J Neurol.* 2016;23:18–27.
 104. Hua LL, Liu JSH, Brosnan CF, Lee SC. Selective Inhibition of Human Glial Inducible Nitric Oxide Synthase by Interferon- β : Implications for Multiple Sclerosis.
 105. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth

- DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;69(3):89–95.
106. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. Vol. 13, *The Lancet Neurology.* 2014. p. 113–26.
 107. Tumani H, Hartung HP, Hemmer B, Teunissen C, Deisenhammer F, Giovannoni G, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2009;35(2):117–27.
 108. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler J.* 2012;18(5):552–6.
 109. Ziemann U, Wahl M, Hattingen E, Tumani H. Development of biomarkers for multiple sclerosis as a neurodegenerative disorder. *Prog Neurobiol.* 2011;95(4):670–85.
 110. Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. *Neurology.* 2007;68(22 SUPPL. 3).
 111. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2017;81(6):857–70.
 112. Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, et al. Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(10):1655–61.
 113. Ibitoye R, Kemp K, Rice C, Hares K, Scolding N, Wilkins A. Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: a review. *Biomark Med.* 2016;10(8):889–902.
 114. Giovannoni G. Cerebrospinal Fluid and serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1998;4(1):27–30.
 115. Peltola J, Ukkonen M, Moilanen E, Elovaara I. Increased nitric oxide products in CSF in primary progressive MS may reflect brain atrophy. *Neurology.* 2001;57(5):895–6.

116. Rejdak K, Eikelenboom MJ, Petzold ; A, Thompson EJ, Stelmasiak Z, Lazon RHC, et al. CSF nitric oxide metabolites are associated with activity and progression of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;63:1439–45.
117. Yuceyar N, Takiran D, Sagduyu A. Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2001;103(4):206–11.
118. De Bustos F, Navarro JA, De Andrés C, Molina JA, Javier Jiménez-Jiménez F, Ortí-Pareja M, et al. Cerebrospinal Fluid Nitrate Levels in Patients with Multiple Sclerosis. *Eur Neurol*. 1999;41(1):44–7.
119. Svenningsson A, Petersson A, Andersen O, Hansson G. Nitric oxide metabolites in CSF of patients with MS are related to clinical disease course. *Neurology*. 1999;53(8):1880–2.
120. Tavazzi B, Batocchi AP, Amorini AM, Nociti V, D 'urso S, Longo S, et al. Serum Metabolic Profile in Multiple Sclerosis Patients. *Mult Scler Int*. 2011;2011:167156.
121. Ibragic S, Sofic E, Suljic E, Avdagic N, Bajraktarevic A, Tahirovic I. Serum nitric oxide concentrations in patients with multiple sclerosis and patients with epilepsy. *J Neural Transm*. 2012;119(1):7–11.
122. Acar G, Idiman F, Idiman E, Kirkali G, Çakmakçi H, Özakbaş S. Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2003;250(5):588–592.
123. Nazliel B, Taşkıran D, Irkeç C, Kutay FZ, Pöğün Ş. Serum nitric oxide metabolites in patients with multiple sclerosis. *J Clin Neurosci*. 2002;9(5):530–2.
124. Giovannoni G, Miller DH, Losseff NA, Sailer M, Lewellyn-Smith N, Thompson AJ, et al. Serum inflammatory markers and clinical/MRI markers of disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2001;248(6):487–95.
125. Giovannoni G, Heales S, Silver N, Land RJ, Clark J, Thompson multiple sclerosis E, et al. Raised serum nitrate and nitrite levels in patients with Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci*. 1997;145(1):77–81.
126. Roghani M, Mahboudi F, Saharian MA, Etemadifar M, Esfahani AN,

- Nahrevanian H, et al. Concentrations of nitric oxide metabolites in the serum of Iranian multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci.* 2010;
127. Kallaur AP, Maria E, Reiche V, Sayonara &, Oliveira R, Name A, et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol.* 2017;54(1):31–44.
 128. Kallaur AP, Lopes J, Oliveira SR, Simões ANC, Reiche EMV, de Almeida ERD, et al. Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Stress Biomarkers of Depression Symptoms in Subjects with Multiple Sclerosis: Increased Peripheral Inflammation but Less Acute Neuroinflammation. *Mol Neurobiol.* 2016;53(8):5191–202.
 129. Seven A, Aslan M, Incir S, Altıntaş A. Evaluation of oxidative and nitrosative stress in relapsing remitting multiple sclerosis: effect of corticosteroid therapy. *Folia Neuropathol Folia Neuropathol.* 2013;51(511):58–64.
 130. Haghikia A, Kayacelebi AA, Beckmann B, Hanff E, Gold R, Haghikia A, et al. Serum and cerebrospinal fluid concentrations of homoarginine, arginine, asymmetric and symmetric dimethylarginine, nitrite and nitrate in patients with multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Amino Acids.* 2015;47(9):1837–45.
 131. Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. Vol. 73, *Neurology.* 2009. p. 1914–22.
 132. Trapp BD, Nave K-A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:247–69.
 133. Van Horssen J, Witte ME, Schreiber G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2011;1812(2):141–50.
 134. Stępień A, Chalimoniuk M, Lubina-Dąbrowska N, Chrapusta SJ, Galbo H, Langfort J. Effects of interferon β -1a and interferon β -1b monotherapies on selected serum cytokines and nitrite levels in patients with relapsing-

- remitting multiple sclerosis: A 3-year longitudinal study. *Neuroimmunomodulation*. 2013;20(4):213–22.
135. Niedziela N, Adamczyk-Sowa M, Niedziela JT, Mazur B, Kluczevska E, Sowa P, et al. Assessment of Serum Nitrogen Species and Inflammatory Parameters in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients Treated with Different Therapeutic Approaches. *Biomed Res Int*. 2016;4570351.
 136. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2007;851(1–2):51–70.
 137. Ghasemi A, Zahedi Asl S, Mehrabi Y, Saadat N, Azizi F. Serum nitric oxide metabolite levels in a general healthy population: Relation to sex and age. *Life Sci*. 2008;83:326–331.
 138. Peinado MA, López-Ramos JC, Camacho M V., Molina FJ, Martínez-Romero R, Hernández R, et al. Age and sex-related serum changes in nitric oxide: Correlations with serological markers. *Int J Cardiol*. 2007;121(1):88–90.
 139. Giovannoni G, Land J, Keir G, Thompson E, Heales S. Adaptation of the nitrate and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem*. 1997;34:193–8.
 140. Karpuzoglu E, Ahmed SA. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. *Nitric Oxide*. 2006;15(3):177–86.
 141. Xia Y, Krukoff TL. Estrogen induces nitric oxide production via activation of constitutive nitric oxide synthases in human neuroblastoma cells. *Endocrinology*. 2004;145(10):4550–7.
 142. Karpuzoglu E, Fenaux JB, Phillips RA, Lengi AJ, Elvinger F, Ansar Ahmed S. Estrogen up-regulates inducible nitric oxide synthase, nitric oxide, and cyclooxygenase-2 in splenocytes activated with T cell stimulants: Role of interferon- γ . *Endocrinology*. 2006;147(2):662–71.

143. Townsend E a, Meuchel LW, Thompson M a, Pabelick CM, Prakash YS. Estrogen increases nitric-oxide production in human bronchial epithelium. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(3):815–24.
144. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: An update. Vol. 43, *Journal of the American College of Cardiology.* 2004. p. 1731–7.
145. Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M. Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *Am J Cardiol.* 1997;79(11):1538–41.
146. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, DeVoe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional endothelial nitric oxide biosynthesis in healthy smokers with impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation.* 2001;104(16):1905–10.
147. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: An in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2003;107(18):2342–7.