

Diplomarbeit

**AUSWIRKUNG VON VITAMIN D SUPPLEMENTIERUNG
AUF DIE OXIDATIVE KAPAZITÄT IN EINEM TIERMO-
DELL DER KORTIKALEN DEMYELINISERUNG**

eingereicht von

Nina Henne

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.med.univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Neurologie

unter der Anleitung der Betreuerinnen

Assoz. Prof. Priv.-Doz.Dr.med.univ.Dr.rer.nat. Sonja Hochmeister

und

Sen.Scientist Dr.scient.med. BSc MSc Michaela Tanja Haindl

Bregenz, den 21.07.2022

I. 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.

Bregenz, den 21.07.2022

Nina Henne eh.

II. Danksagung

Ich möchte zuerst meinen beiden engagierten Betreuerinnen danken. Frau Assoz. Prof. PD.DDr. Sonja Hochmeister als Erstbetreuerin für die Ideenfindung und flexible Gestaltung der Arbeit. Meiner Zweitbetreuerin Frau Dr.scient.med Michaela Haindl für die gute Einarbeitung und Betreuung der praktischen Teile im Labor. Danke, dass du auf alle meine Fragen immer schnell eine Antwort hattest. Dein Input hat mich oft mehrere Schritte vorangebracht.

Ich möchte mich auch bei meinen Eltern Katrin und Thomas Henne bedanken. Vor allem für eure uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums und auf dem Weg dahin.

Danke auch an Nina und Matthias Berg, dass ihr eure wissenschaftliche Erfahrung durch das Korrekturlesen eingebracht habt und Dinge durch mich manche Dinge hinterfragen lassen habt.

Außerdem möchte ich mich auch bei Imke, David, Max, Valentin und Sarah und der 7a bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei all meinen lieb gewonnenen Menschen aus Graz, die mich über die Studienzeit begleitet und unterstützt haben. Unsere gemeinsame Zeit hat mich sehr bereichert!

III. Inhaltsverzeichnis

I. Eidesstattliche Erklärung	II
II. Danksagung	III
III. Inhaltsverzeichnis	IV
IV. Abbildungsverzeichnis	VI
V. Tabellenverzeichnis	VII
VI. Zusammenfassung	VIII
VII. Abstract	X

1. Einleitung	1
1.1 Multiple Sklerose (MS)	1
1.2 Kortikale Läsionen bei MS	7
1.3 Tiermodelle der MS	9
1.4 Oxidativer Stress bei neurologischen Erkrankungen	12
1.5 Oxidative Parameter	14
1.6 Vitamin D und MS	17
1.7 Einfluss des Geschlechts	20
1.8 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Tiermodell	22
2.2 Immunhistochemie (IHC)	24
2.3 Photometrische Tests	26
2.4 Statistische Analyse	27
3. Ergebnisse	27
3.1 Geschlechtsunterschiede	27
3.1.1 Polyphenole (PP)	28
3.1.2 TAC	29
3.1.3 PLP	30

3.2 Unterschiede der Tiere mit und ohne VD-Supplementierung	32
3.2.1 PP	32
3.2.2 TAC	33
3.3 Oxidative Stressmarker	34
3.3.1 Cu ²⁺ -ox-LDL	34
3.3.2 HOCL-LDL	35
4. Diskussion	36
4.1. Oxidative Kapazität	36
4.2 Oxidative Parameter	38
4.3 Marker der antioxidativen Therapie	39
4.4 Nebenwirkungen und Dosierung von VD	41
4.5 Geschlechterunterschiede	43
4.6 Ethische Fragen des Tiermodells	44
5. Fazit	46
6. Literaturverzeichnis	47

IV. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und -ablauf des in unserer Studie verwendeten Tiermodells nach Ücal et al. 22
- Abb.2: In dieser Abbildung wird die Veränderung der Polyphenole im Zeitverlauf dargestellt. B steht für Baseline, M für männlich, W für weiblich und T für Tag. Mit Tag 45 ist der 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion bezeichnet. Bei den Gruppen, welche durch den roten Rahmen markiert sind, konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. 28
- Abb.3: Dargestellt wird in dieser Abbildung der Zeitverlauf der Werte für die totale anti-oxidative Kapazität (TAC) während des Versuchs. Die rote Linie zeigt den Cut-Off Wert der TAC. B steht für Baseline, M für männlich, W für weiblich und T für Tag. Tag 45 bezeichnet den Tag 15 nach der zweiten Zytokininjektion. Der rote Kasten markiert jene Gruppen, welche sich signifikant in den Werten der TAC unterscheiden. 29
- Abb. 4: In dieser Grafik wird der PLP-Verlust im Verhältnis zur Zeit dargestellt. B steht für Baseline, M für männlich, W für weiblich und T für Tag. Die Kontrollgruppe setzt sich aus Männchen und Weibchen zusammen. 30
- Abb. 5 a und b: Die Fotografien zeigen die immunhistochemisch gefärbten histologischen Schnitte der Versuchstiere in 20 – facher Vergrößerung. Braun gefärbt ist hier das PLP. Die Zellkerne erscheinen durch die Gegenfärbung in blau. Der Bildausschnitt (a) stammt von einem Tier ohne und (b) von einem Tier mit VD Substitution. 31
- Abb. 5: Grafische Darstellung der PP in mM im Verhältnis zu den verschiedenen Zeitpunkten und der Kontrolltiere. T bedeutet Tag und VD bezeichnet die Versuchstiere mit VD-Supplementierung. Zur Vereinfachung ist mit T45 der 15. Tag nach der zweiten Zytokin-injektion genannt. Der rote Kasten markiert die Gruppen, welche signifikante Unterschiede im Vergleich aufweisen. 32
- Abb. 6: Darstellung der totalen antioxidativen Kapazität im Zeitverlauf und im Verhältnis zu den Kontrolltieren. T steht für Tag, VD für die Tiere, welche VD bekommen haben. Tag 45 bezeichnet den 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion. Der rote Kasten kennzeichnet die Gruppen, bei denen ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Die rote Linie zeigt den Cut-Off-Wert für die TAC an. 33
- Abb. 7: Grafische Darstellung der Cu^{2+} -ox-LDL zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Dies im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt. T steht für Tag. Mit Tag 45 ist Tag 15 nach der zweiten Zytokininjektion bezeichnet. Der Vorschub VD steht für Versuchstiere mit VD-Supplementierung. 34
- Abb. 8: Grafische Darstellung der HOCl-LDL-Werte der Versuchs- sowie Kontrolltiere, welche mit den verschiedenen Messzeitpunkten ins Verhältnis gesetzt werden. T steht für Tag, VD kennzeichnet die Gruppe mit VD-Supplementierung. Zur grafischen Vereinfachung wird in der Tabelle T45 für den 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion genannt. 35

V. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Versuchstiere und Tötungszeitpunkt</i>	24
--	----

VI. Zusammenfassung

Einleitung: Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische Erkrankung des zentralen Nervensystems mit weltweit steigender Inzidenz. Der Krankheitsverlauf sowie die Symptomatik sind nur schwer vorhersehbar. Im Verlauf geht die Erkrankung meist mit erheblichen Einschränkungen des alltäglichen Lebens einher. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die genauen pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung unklar. Es wird ein Zusammenspiel aus genetischen, autoimmunologischen und umweltbedingten Faktoren angenommen. Vor allem die Mechanismen der progredienten Form ohne akut entzündliche Aktivität sind weitgehend unklar. Daher sind die therapeutischen Optionen limitiert. In zahlreichen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Vitamin D (VD) und MS festgestellt werden. Der Ausgleich eines VD Defizits bei MS PatientInnen wird in der neuen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) empfohlen. Zu den pathophysiologischen Prozessen von VD bei MS ist bislang wenig bekannt.

Methoden: Für diese Studie wurde das Rattenmodell der kortikalen Demyelinisierung von Ücal et al. (2017) verwendet. Die Gehirne der Versuchstiere wurden nach Entnahme histologisch analysiert. Mittels immunhistochemischer Färbung und einer Gegenfärbung mit Hämalan, wurden Kupfer²⁺-modifiziertes Low density Lipoprotein (Cu²⁺- LDL), Hypochlorid modifiziertes LDL (HOCL-LDL) und Proteolipidprotein (PLP) dargestellt. Sowohl Polyphenole (PP) als auch die totale antioxidative Kapazität (TAC) wurden im Serum bestimmt. Messzeitpunkte stellten Tag 15 und 30 nach erster und Tag 15 nach zweiter Zytokininjektion dar. Die statistische Signifikanzgrenze wurde für alle Auswertungen auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Daten wurden in einer weiteren Analyse getrennt nach den Geschlechtern analysiert.

Ergebnisse: Die TAC war nach der ersten Zytokininjektion bei Versuchstieren mit VD Substitution immer höher im Vergleich zur Gruppe ohne Substitution. Gemessen wurden die PP an Tag 15 ($p = 0,015$) und Tag 30 ($p = 0,009$) TAC ($p = 0,016$) mit signifikant höheren Werten in der Gruppe mit VD Substitution. Nach der zweiten Zytokininjektion konnte kein signifikanter Unterschied TAC ($p = 0,789$) und der PP ($p = 0,431$) festgestellt werden. Die oxidativen Stressmarker waren in der Gruppe ohne VD Substitution mit Cu²⁺-ox-LDL (Tag 15: $p = 0,002$; Tag 30: $p = 0,004$; Tag 15 nach zweiter Injektion: $p =$

0,001) und HOCL-LDL (Tag 15: $p = 0,001$; Tag 30: $p = 0,0042$; Tag 15 nach zweiter Injektion: $p = 0,001$) immer signifikant höher als bei den Tieren, welche VD erhielten.

Zusätzlich wurde der Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren betrachtet. Die Polyphenole der weiblichen Versuchstiere waren nach erster Zytokininjektion signifikant höher (Tag 15: $p < 0,001$; Tag 30: $p < 0,007$) als bei den männlichen Tieren.

Fazit: In dieser Studie konnten wir die protektive Wirkung von VD vor kortikaler Demyelinisierung und Oxidation körpereigener Stoffe im hier verwendeten Tiermodell nachweisen. Ebenfalls legten die Ergebnisse nahe, dass VD im weiblichen Organismus eine bessere Wirkung als im männlichen besitzt. Für die Frage nach präventivem oder therapeutischen Nutzen für Menschen mit progredienter MS sind weitere Studien notwendig.

VII. Abstract

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system with increasing incidence worldwide. The course of the disease and the symptoms are difficult to predict. In the course of the disease, it is usually accompanied by considerable restrictions of everyday life. At present, the exact pathophysiological mechanisms of the disease are unclear. An interplay of genetic, autoimmunological and environmental factors is assumed. Especially the mechanisms of the progressive form without acute inflammatory activity are largely unclear. Therefore, therapeutic options are limited. A correlation between Vitamin D (VD) and MS has been established in numerous studies. The compensation of a VD deficit in MS patients is recommended in the new guideline of the German Society of Neurology (DGN). Little is known so far about the pathophysiological processes of VD in MS.

Methods: In this study, we used the rat model of cortical demyelination of Ücal et al. (2017). Histologically, the brains of the experimental animals were analyzed after explantation. By means of immunohistochemical staining and counterstaining with hemalaun, copper²⁺-modified low density lipoprotein (Cu²⁺-LDL), hypochloride-modified LDL (HOCL-LDL) and proteolipid (PLP) were visualized. Both polyphenols (PP) and total antioxidant capacity (TAC) were determined in serum. Measurement time points represented day 15 and 30 after first cytokine injection and day 15 after second cytokine injection. The statistical significance limit was set at $p < 0.05$ for all analyses. Data were analyzed separately by gender in a further analysis.

Results: TAC was always higher after the first cytokine injection in experimental animals with VD substitution compared to the group without substitution. PP were measured at day 15 ($p = 0.015$) and day 30 ($p = 0.009$) TAC ($p = 0.016$) with significantly higher values in the group with VD substitution. After the second cytokine injection, no significant difference between TAC ($p = 0.789$) and PP ($p = 0.431$) was detected. Oxidative stress markers were always significantly higher in the group without VD substitution with Cu²⁺-ox-LDL (day 15: $p = 0.002$; day 30: $p = 0.004$; day 15 after second injection: $p = 0.001$) and

HOCL-LDL (day 15: $p = 0.001$; day 30: $p = 0.0042$; day 15 after second injection: $p = 0.001$) than in the animals receiving VD.

Also, the difference between male and female animals was investigated. The PP of the female experimental animals were significantly higher after first cytokine injection (day 15: $p < 0.001$; day 30: $p < 0.007$) than in the male animals.

Conclusion: In this study, we demonstrated the protective effect of VD in relation to cortical demyelination and oxidation of endogenous substances in the animal model used here. Likewise, the results suggested that VD has a better effect in the female organism than in the male. For the question of preventive or therapeutic benefits for people with progressive MS, further studies are required.

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose (MS)

MS ist eine Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit charakteristischen degenerativen Veränderungen, Entzündung und Demyelinisierung und wurde im Jahr 1868 erstmalig von Charcot beschrieben (1,2).

Weltweit sind schätzungsweise 2,8 Millionen Menschen betroffen. Die Inzidenz stieg in den letzten Jahren in allen Regionen der Welt an. Sie beträgt circa 2,1 / 100000 Menschen / Jahr. Es ist die häufigste neurologische Erkrankung von jungen Erwachsenen mit einem Inzidenzmaximum um das 30. Lebensjahr. Die Mehrzahl der Erkrankten entwickelt erhebliche Einschränkungen im Krankheitsverlauf. Einerseits kommt es durch die Erkrankung selbst beispielsweise zu einer Abnahme der Mobilität, andererseits treten häufig Komorbiditäten wie Depressionen auf. Angesichts des jungen Erkrankungsalters sind die sozioökonomischen Folgen weitreichend. Es tritt nicht nur häufig eine verfrühte Arbeitsunfähigkeit der Betroffenen ein, sondern Angehörige erleben ebenfalls häufig berufliche Einschränkungen durch die Erkrankung. Dazu kommt die häufigere Beanspruchung des Gesundheitssystems. Diese Faktoren tragen zu der enormen sozioökonomischen Belastung der Gesellschaft durch MS bei. Die erwartete Steigerung der Prävalenz wird auf 6,7% geschätzt, was den Effekt durch die älter werdende Bevölkerung noch überschreitet (3,4).

Der Krankheitsverlauf ist sehr variabel und kaum prognostizierbar. Das klinisch isolierte Syndrom (KIS) beschreibt das erstmalige Auftreten von Symptomen, welche auf ein demyelinisierendes Ereignis hinweisen ohne dass zeitliche Dissemination gegeben sein muss (1). In 80% der Fälle ist der Verlauf zu Krankheitsbeginn schubförmig mit partiellen oder totalen Remissionsphasen und wird in der englischen Literatur als relapsing remitting MS (RRMS) bezeichnet. Unbehandelt kommt es dabei häufig nach 10-15 Jahren zur sekundären Progredienz, der secondary progressive MS (SPMS), die durch kontinuierliche Verschlechterung der Symptome definiert ist (5). Eine restliche Schubaktivität kann auch dann noch vorhanden sein. Die Unterscheidung dieser vorig genannten Formen geschieht lediglich anhand von klinischer Einschätzung (6). Eine durchgängig einheitliche Einteilung ist

bislang aufgrund der fehlenden Biomarker zur Verlaufskontrolle sowie dem fehlenden Verständnis des Zusammenhangs der MRT-Korrelate und der klinischen Symptomatik erschwert. In 15% der Fälle handelt es sich um eine primary progressive MS (PPMS), welche primär fortschreitend und nicht in Schüben verläuft. Alle progressiven Formen der MS gehen mit irreversiblen neuronalen Schäden einher. Die oben genannten Formen werden weiter in aktiv oder nicht aktive Formen unterteilt. Eine weitere Kategorie, welche per Definition keine Form der MS darstellt, ist das radiologisch isolierte Syndrom (RIS). Damit werden MRT Befunde bezeichnet, die mit einer MS vereinbar sind. Beim RIS existiert kein klinisches oder anamnestisches Korrelat. Derzeit wird kontrovers diskutiert, ob das RIS eine frühe Form der MS darstellt (7,8). Auch der Zusammenhang zwischen der schubförmigen und primär progredienten Form der MS ist unklar. Die gängige Theorie, dass es sich um verschiedene Stadien derselben Erkrankung handelt, wird immer wieder kritisch hinterfragt (9,10).

Die Symptomatik der MS umfasst zentrale Paresen, Ataxie und Sensibilitätsstörungen. Oft besteht eine Beteiligung der Hirnnerven. Die Charcot-Trias, welche sich aus Nystagmus, skandierender Sprache und Intentionstremor zusammensetzt, tritt meist gemeinsam als Symptomenkomplex auf. Für MS charakteristisch ist, dass sich die Symptomatik nicht auf Läsionen eines bestimmten Hirnareals zurückführen lässt. In jedem 3. Fall beginnt die Erkrankung mit der Retrobulbärneuritis, einer Entzündung des Nervus opticus, welche mit Verschlechterung des Visus und Schmerzen einhergeht. Im Verlauf kommt es häufig zu Miktionsstörungen, bulbärer Sprache, Störungen der Sexualfunktion sowie Dysphagie. Neuropsychologische Symptome wie kognitive Störungen und Depressionen als Komorbiditäten spielen ebenfalls eine Rolle (11). Der Grad der Ausprägung der Erkrankung variiert ebenfalls stark. Von klinisch stummen Entzündungsherden bis hin zu schneller Progredienz der Symptomatik mit einem Versterben innerhalb weniger Monate.

Die Prädisposition an MS zu erkranken, wird unter anderem durch genetische Faktoren beeinflusst. Es konnten nahezu 100 single nucleotide polymorphisms (SNPs), also die Varianz einzelner Basenpaare im Nukleotiddoppelstrang, die mit der Erkrankung in Verbindung stehen, identifiziert werden (12). Unter diesen SNPs befinden sich mindestens zwei, welche auch mit dem Vitamin D (VD) Stoffwechsel in Verbindung stehen. Vor allem befinden sich diese in Abschnitten, die für das adaptive Immunsystem, insbesondere die T-Zellen, codieren. Da in Studien mit monozygoten Zwillingen lediglich eine Konkordanz von 15-25%

festgestellt wurden, können erbliche Faktoren keine tragende Rolle spielen und es wird damit die große Relevanz von Umweltfaktoren für die Entwicklung von MS unterstrichen (13,14).

Die Krankheitsursache bleibt bislang weitgehend ungeklärt. Eine multifaktorielle Genese aus genetischen, autoimmunologischen und umweltbedingten Faktoren ist jedoch anzunehmen. Umweltbedingte Risikofaktoren sind vor allem Rauchen und VD – Mangel, ebenso diätetische Faktoren und Übergewicht in der Kindheit. Ebenso wird die Rolle von Infektionen unterschiedlich diskutiert. Einerseits entwickeln sich durch durchgemachte Erkrankungen im Kindesalter weniger Allergien und das Risiko Autoimmunerkrankungen zu entwickeln sinkt ebenfalls (15). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass Viren, wie beispielsweise durchgemachte Infektionen mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) oder dem Varicella-Zoster Virus (VZV) eine Ursache für die Entwicklung von MS sein könnten (5,16,17). Einer der am längsten bekannten Faktoren ist die ungleiche geografische Verteilung von MS. Es gibt eine, durch Meta-Analysen bestätigte statistische Signifikanz, dass das Erkrankungsrisiko mit Entfernung vom Äquator steigt. Ausnahmen bilden hier lediglich Italien und Nordskandinavien, was mit kulturellem Verhalten vereinbar wäre. Unklar bleibt jedoch, was genau unter kulturellem Verhalten gemäß den Studien zu verstehen ist (18,19). In Migrationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass für das Risiko einer Erkrankung der Aufenthaltsort in den ersten zwei Lebensjahrzehnten ausschlaggebend ist (20). Dies unterstützt wiederum die Annahme, dass Umweltfaktoren in der frühen Kindheit einen Einfluss auf die Entwicklung von MS haben. Abgeleitet von den geografischen Unterschieden wurde der Mangel an VD als einer der bislang bedeutsamsten Risikofaktoren identifiziert. Vermehrte UV-B Strahlung und häufiger Aufenthalt im Freien ist mit einem niedrigeren Erkrankungsrisiko verknüpft (21–23). Ein hoher VD-Spiegel reduziert das Schubrisiko bei RRMS unabhängig von der Jahreszeit (24). Obwohl einige Studien VD und MS aus verschiedenen Blickwinkeln untersucht haben und einen Zusammenhang feststellen konnten, sowie plausible physiologische Mechanismen als Erklärung hinzugezogen werden können, könnte ein bisher nicht berücksichtigter Faktor als Ursache für MS in Frage kommen, da der genaue Pathomechanismus bislang unbekannt geblieben ist.

MS zeigt sowohl Charakteristiken einer autoimmunentzündlichen als auch einer klassischen neurodegenerativen Erkrankung. Die Mechanismen des intermittierend-schubförmigen Verlaufs wurden in den letzten Jahren immer besser verstanden und durch neue Therapiemög-

lichkeiten konnten sowohl die Schubhäufigkeit sowie -schwere verringert werden. Pathophysiologisch gibt es Hinweise, dass in der schubförmigen Phase entzündliche Prozesse im Vordergrund stehen. Dahingegen rückt die entzündliche Komponente in der progredienten Phase in den Hintergrund und verminderte neuronale Reparaturmechanismen erlangen eine größere Bedeutung (25).

Ziele der MS Therapie sind eine Reduktion der klinischen Krankheitsprogression, der mittels MRT detektierbaren subklinischen Entzündungen und Erhalt der Lebensqualität. Die Immuntherapeutika werden drei verschiedenen Wirksamkeitskategorien zugeordnet. Zur Kategorie I zählen beispielsweise das auch körpereigen vorkommenden Zytokin Interferon- β oder der Immunmodulator Glatirameracetat. In Kategorie II fallen Substanzen wie Siponimod, einer Weiterentwicklung von Fingolimod, welches über die Bindung an einen Rezeptor auf Lymphozyten deren Migration reguliert (26). Zur Wirksamkeitskategorie III zählen monoklonale Antikörper. Dazu gehört der Wirkstoff Ocrelizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen CD-20 auf B-Lymphozyten. Mit dem Wirkstoff Natalizumab wird die T-Zell Migration über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) gehemmt (1). Es konnte nachgewiesen werden, dass dieser Ansatz in Bezug auf Krankheitsaktivität- und Progression wirksamer als Interferon – β ist. Jedoch fehlen dazu Langzeitstudien (27).

Das Ziel dieser Einteilung ist die nach Krankheitsaktivität angepasste Therapie, um zu erreichen, dass Nutzen und Nebenwirkungen in einem ausgewogenen Verhältnis sind. Die Mehrzahl der aktuellen Medikamente wirkt unspezifisch und beeinflusst die Aktivität vieler Immunzellen. Durch diese unspezifische Immunsuppression kommt es oftmals zu schweren Nebenwirkungen (28).

Bei den progredienten Phasen der MS sind die Pathomechanismen im Gegensatz zur schubförmigen Form der MS bislang weitgehend unbekannt (9). Daher gibt es noch keine spezifische Therapie für die progrediente MS ohne Schubaktivität (29). Die Empfehlungen der Europäischen MS Guidelines für PPMS basieren alle auf schwacher Evidenz, da in klinischen Studien meist lediglich ein geringer Unterschied zwischen Therapie mit Placebo und Medikamenten gefunden wurde. Es spielt zudem eine Rolle, dass die Bestimmung des Zeitpunkts der Konversion von RRMS zur SPMS unklar ist. Daraus resultiert, dass die Definition der progressiven MS ebenfalls aufgrund der diagnostischen Ungenauigkeit inkonstant ist (30). Kernpunkte der Therapie von PatientInnen mit progressiver MS sind das Abwägen der möglichen Nebenwirkungen und die Verträglichkeit des Medikaments mit dem Benefit sowie

die symptomatische Behandlung. Es werden Herangehensweisen gesucht, unter welchen Umständen die Therapie zeitweise oder dauerhaft abgesetzt werden kann (10). Es gibt aktuell eine Empfehlung für Ocrelizumab und den Off – Label Gebrauch von Rituximab bei PPMS (10,30,31). Diese zurückhaltenden Empfehlungen kommen unter anderem aufgrund fehlender Langzeitstudien zustande. Bisherige Studienergebnisse sind vielversprechend in Hinsicht auf die Krankheitsmodulation. Im Falle einer restlichen Schubaktivität bei SPMS können beispielsweise Cladibrin, Interferon – β 1a und 1b oder CD20- Antikörper zum Einsatz kommen. Bei fulminanten Fällen von SPMS wird das Zytostatikum Cyclophosphamid therapeutisch im Off - Label Use eingesetzt (1,31). Bei fehlenden klinischen Schüben bei gleichzeitiger entzündlicher Aktivität in der MRT wird Siponimod empfohlen (32). Bei PatientInnen mit PPMS über dem 50. Lebensjahr (LJ) und fehlender entzündlicher Aktivität in der MRT sollten die CD20-Antikörper sehr zurückhaltend eingesetzt werden (10).

Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der MS. Die extrinsische Theorie besagt, dass in der Frühphase der MS autoreaktive T-Zellen, welche durch molekulare Mimikry aktiviert wurden, mit B-Zellen und Monozyten von Peripher ins ZNS migrieren und dort eine Entzündung auslösen (13). Das adaptive periphere Immunsystem spielt hier vermutlich die bedeutendste Rolle. Dafür spricht auch, dass bei RRMS gegen T-Zellen gerichtete Medikamente mit Antikörpern wie Natalizumab erfolgreich zur Therapie eingesetzt werden (1). Ein Zusammenhang zwischen dem Darmmikrobiom und MS wurde in der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) beschrieben. Versuchstiere, die Polysaccharid A der *Bacteroides fragilis*, welche ein Bestandteil des menschlichen Mikrobioms ist, verabreicht bekamen, waren gegenüber der induzierten MS resistent. Eine Beimpfung mit dem Mikrobiom von MS erkrankter Menschen konnte bei diesen Versuchstieren eine spontan auftretende, der MS ähnliche Erkrankung auslösen. Jedoch sind die Ergebnisse der Studien, welche sich mit dem Mikrobiom befassen aufgrund der geringen Fallzahlen und unterschiedlicher Ergebnisse kontrovers diskutiert. Daher ist weitere Forschung notwendig, um aussagekräftige Rückschlüsse auf eine Beteiligung des Darmmikrobioms bei MS ziehen zu können (33–35).

Im Gegenteil zur schubförmigen MS könnten in der progredienten Phase, auf das ZNS beschränkte, immunologische Prozesse eine ursächliche Rolle spielen. Es wird eine, von der Peripherie abgekapselte Entzündung mit intakter BHS angenommen (13,29). Ebenfalls diskutiert wird der Einfluss von meningealer auf die kortikale Entzündung als Kennzeichen der PMS (36). In den letzten Jahren wurde der Fokus außerdem auf durchgemachte Infektionen

als Krankheitsursache gelenkt. So konnte eine Assoziation zwischen einer durchgemachten EBV-Infektion und dem Erkrankungsrisiko festgestellt werden (16). Ein auslösender Mechanismus nach einer Infektion könnte molekulare Mimikry sein. Das bedeutet, dass Epitope des infektiösen Agens körpereigenen Strukturen ähneln und dadurch autoimmune Prozesse ausgelöst werden. Ebenso könnten bei Neuronenuntergang, welcher durch eine Infektion hervorgerufen wird, Autoantigene aus den Neuronen freigesetzt werden und wiederum zu autoimmuner Inflammation führen (37).

Die pathophysiologischen Prozesse der PMS werden in nicht immunologische und immunologische Vorgänge eingeteilt. Ein pathologisches Kennzeichen der chronischen Entzündung sind chronisch aktive Läsionen. Histopathologisch bestehen diese gemischt aktiv und inaktiven Läsionen aus einem Kern mit wenigen Entzündungszellen und einem Randgebiet aus aktivierten Mikrogliazellen und Makrophagen (38). Betrachtet man Läsionen mit Aktivität genauer, so ist die Einteilung in demyelinisierende und post-demyelinisierende Läsionen sinnvoll. Bei (Rest-)Aktivität der Läsionen befinden sich Myelinabbauprodukte des Myelin- Basic Protein (MBP) oder Proteolipidprotein (PLP) im Bereich der Läsion. Dies kann mittels immunhistochemischer Verfahren oder bestimmten histologischen Färbungen sichtbar gemacht werden (39). Es gibt Hinweise darauf, dass die histologischen Veränderungen bei RRMS und PPMS und SPMS in ähnlichen Regionen und Reihenfolge auftreten (40). Charakterisiert ist die Entzündung bei progredienter MS durch Demyelinisierung, Verlust von Neuronen und Oligodendrozyten, sowie reaktiver Astroglie. Man geht davon aus, dass durch die randständigen Zellen der chronischen Läsionen chronisch axonale Schäden und Demyelinisierung verursacht werden. Ebenfalls sind Mitochondropathie, Überschuss von intraaxonalem Ca^{2+} , abnorme Verteilung von Ionenkanälen, defizitärer axonaler Transport mit konsekutiver axonaler Dysfunktion und Neurodegeneration pathophysiologische Vorgänge. Zur Immunreaktion gehören B-Zell-Expansion, Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, zytotoxische $CD8^{+}$ T-Lymphozyten (6,41).

Während aktiver Demyelinisierung wird vermehrt Eisen von Oligodendrozyten und den Myelinscheiden freigesetzt (42). Eine Fehlregulation des Eisenhaushalts führt, ebenso wie oxidativer Stress, zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die unter anderem mit Enzymen und Molekülen reagieren und deren Funktion ändern (43). Im ZNS entstehen ROS hauptsächlich durch aktivierte Mikroglia, werden aber auch von Neuronen und Astrozyten als Nebenprodukt der ATP-Produktion in Mitochondrien gebildet (44,45). ROS sind im ZNS physiologisch als Botenstoffe vorhanden, in größerer Menge führen sie zu oxidativem Stress.

Dies trägt bei MS sowohl zu Läsionen in der weißen als auch in der grauen Substanz bei (13). Chronisch geschädigte Axone im progressiven Stadium der MS benötigen mehr Energie, um Aktionspotentiale zu generieren. Dies verstärkt wiederum die unausgeglichene Homöostase der bereits vorgeschädigten Mitochondrien und es entsteht ein Circulus vitiosus aus erhöhtem ATP-Bedarf und oxidativem Stress. Dieser Teufelskreis mündet in der Apoptose von Neuronen (13,46). Die Hauptquelle der ROS als Nebenprodukt der Atmungskette wird durch die Nicotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat (NADPH) – Oxidasen, den NOX Enzymen, vermittelt. Sie katalysieren die Reaktion zu ROS. Die Enzyme werden durch neuronale Schädigung, Entzündung oder ROS selbst aktiviert. In aktiven Läsionen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) und in histopathologischen Schnitten wurde eine vermehrte Expression von NOX festgestellt. Dabei korrelierten die Gebiete der neuronalen Dysfunktion und der Läsionen der EAE mit der vermehrten Aktivierung der NOX - Enzyme (47–49).

1.2 Kortikale Läsionen bei MS

Histopathologisch können bei MS Läsionen der weißen und grauen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks sowie Atrophie der weißen und grauen Substanz beobachtet werden, welche die Atrophie von Individuen ohne MS überschreitet. Läsionen sind abgegrenzte Gebiete im Parenchym, in denen durch Einwanderung von Immunzellen Entzündung, Demyelinisierung, Gliose und neuroaxonale Degeneration hervorgerufen werden (29). Für die Diagnosestellung, Verlaufs- und Aktivitätskontrolle mittels T2-gewichteter Magnetresonanztomografie (MRT) sind die Läsionen der weißen Substanz wesentlich. Trotz der Möglichkeiten, die Veränderungen zu erfassen, bleibt der Zusammenhang zwischen aktiven demyelinisierenden Läsionen der weißen Substanz und klinischer Krankheitsaktivität, sowie Neurodegeneration spekulativ (50). Im letzten Jahrzehnt wurden daher die Läsionen der grauen Substanz näher untersucht. Fokus liegt hierbei vor allem auf dem Kortex. Im Gegensatz zu Läsionen der weißen Substanz, die bei unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen auftreten können, ist das Vorkommen von Läsionen der grauen Substanz auf die MS beschränkt.

Vergleicht man den histologischen Aufbau der kortikalen Läsionen mit jenem der weißen Substanz, liegen weniger Immunzellen und eine weniger beschädigte Blut-Hirn-Schranke vor. Es gibt drei Arten der kortikalen Läsionen, welche abhängig von ihrer Lokalisation kategorisiert werden. Zum einen leukokortikal, subpial und zum anderen kleine, auf den Kortex begrenzte Läsionen (51). Erstere Läsion breitet sich über angrenzende subkortikale Schichten der weißen Substanz und im unteren Kortex aus. Die am häufigsten vorkommende, subpiale Läsion dehnt sich meist über mehrere Gyri von der pialen Oberfläche bis zur 3. oder 4. Kortexschicht aus. Häufig befinden sich die Läsionen an der subpialen Oberfläche entlang der Ausdehnung von entzündlichen Veränderungen der Meningen (50). Das Vorhandensein von ektopten lymphoiden Follikeln in den Hirnhäuten ist der histologische Beweis für meningeale Inflammation. In einer histologischen Studie wurde herausgefunden, dass eine ausgeprägte meningeale Entzündung mit vermehrtem pathologischem Korrelat der grauen Substanz einhergeht. Dies könnte ein Hinweis auf eine kausale Ursache zwischen meningealer Entzündung und Pathologie der grauen Substanz sein (36). Ein möglicher Mechanismus ist der Übertritt von löslichen Faktoren in den Kortex, welche dort inflammatorische Prozesse fördern. Für diese Theorie sprechen mehrere Faktoren. Zum einen, dass bei Patienten mit progressiver MS proinflammatorische Zytokine in den angrenzenden Meningen und dem Liquor gefunden werden können (13). Zum anderen gibt die Verteilung der Läsionen einen Hinweis. Sie kommen vorwiegend an tiefen Einstülpungen und Sulci des Kortex vor. Also an Stellen, an denen der Liquor langsamer zirkuliert und ein Durchwandern von proinflammatorischen Zytokinen erleichtert ist (52).

Der Neuronenuntergang, welcher anhand der Verschmälerung des Kortex erkennbar wird, korreliert nicht mit dem Grad der kortikalen Demyelinisierung (50). Kortikale Läsionen sind bereits bei PatientInnen mit CIS vorhanden. Sie sind mit einer floriden Entzündungsreaktion verknüpft und zeigen eine Disposition für einen frühen Übergang von schubförmiger in progressive MS an. Je weiter die MS fortgeschritten ist, desto mehr Regionen sind von einer Kortextrophie betroffen. Die Ausbreitung der Atrophie tritt bei allen Formen der MS auf (40,53). Zwischen einem dünneren Kortex und Verschlechterung der Symptomatik, insbesondere der mnesticen Fähigkeiten, wurde in mehreren Studien ein Zusammenhang nachgewiesen (54). Die Verschmälerung des Kortex muss dabei nicht zwingend durch kortikale Demyelinisierung verursacht werden. In einer Studie wurden bei allen Studienteilnehmenden kortikale Läsionen nur in Kombination mit subkortikalen ermittelt. Es könnte sich um eine retrograde Reaktion auf aktive Läsionen in der weißen Substanz handeln (52,54). Es

wird ein kortikal dominanter Subtyp der MS vorgeschlagen. Dieser ist durch mnestiche Defizite und verschmälerten Kortex charakterisiert. Aufgrund der leicht abweichenden Klink und Pathologie der PatientInnen mit vorwiegend kortikalen Läsionen ist ein unterschiedlicher Pathomechanismus im Vergleich zu Läsionen der weißen Substanz ebenfalls naheliegend (54).

Das spärliche Wissen über die kortikalen Läsionen im Vergleich zu Läsionen der weißen Substanz lässt sich durch ihre komplexere Detektion erklären. In histologischen Routinefärbungen sind sie nicht so gut darstellbar. Erst immunhistochemische Färbungen machen die Läsionen eindeutiger sichtbar. In der MRT sind die Läsionen aufgrund technischer Limitationen schwerer erkennbar. Jedoch ist eine präzisere Detektion durch Weiterentwicklung der MRT Technik in Zukunft zu erwarten.

1.3 Tiermodelle der MS

Bisher sind die genauen Pathomechanismen der progredienten MS unklar und infolgedessen existieren lediglich unzureichende Therapien. Das Ziel ist, durch möglichst realitätsgetreue Experimente die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu ergründen, um im weiteren Schritt neue Therapiemöglichkeiten zu finden und diese an den Modellen zu testen. Da MS jedoch nur beim Menschen vorkommt, ist es wichtig, durch unterschiedliche Modelle verschiedene Aspekte der Erkrankung zu beleuchten, da die Erkrankung bei Tieren bislang nicht in seiner Gesamtheit induziert werden konnte.

Um entzündliche und autoimmunologisch bedingte Erkrankungen des ZNS zu untersuchen, ist das Modell der EAE am weitesten verbreitet. Die EAE kann als neuroallergische Modellkrankheit der MS aufgefasst werden und bildet vor Allem die Frühphase der MS und die RRMS gut ab. Nur wenige Modelle führen zu einem chronischen Phänotyp (11,51,55). Es existieren zwei Induktionsarten. Zum einen passiv durch Übertragung von T-Zellen, die eine Entzündungsreaktion im Gehirn auslösen. Zum anderen aktiv durch die Impfung mit Myelinpeptiden. Hier werden unter anderem Proteolipidprotein (PLP), Myelin assoziiertes Glykoprotein oder Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) verwendet. Diese Proteine stellen wichtige Bausteine der Myelinscheide von Nervenzellen dar. Bei der aktiven Induktion wird complete Freund's adjuvant (CFA) in Versuchstiere, wie Ratten, Mäuse, Meerschweinchen oder Affen injiziert, um die Reaktion auszulösen. Bei CFA handelt es sich um

eine Emulsion aus Wasser und Öl mit abgetöteten Mykobakterien. Die Antigene werden von lokalen Immunzellen phagozytiert und nach Transport in regionale Lymphknoten oder die Milz T-Zellen bilden sich Antigen spezifische T-Zellen. Diese können nach Verlassen der primären Lymphorgane die BHS überwinden und durch ihre Migration ins ZNS eine Entzündungsreaktion auslösen. Abhängig von der Art des Versuchstiers sowie dem Verhältnis von CFA und Antigen variiert der Ausprägungsgrad der durch EAE ausgelösten Reaktionen (37,55–60).

Ein weniger etablierter Versuchsaufbau ist das Cuprizon-Mausmodell. Durch Futterzugabe von Oxalsäure wird eine Intoxikation hervorgerufen. Es wird angenommen, dass durch Kupferchelatformung Enzyme der mitochondrialen Atmungskette gehemmt werden und dies zu oxidativem Stress führt. Oligodendrozyten sind als erstes betroffen und gehen in Apoptose. Infolgedessen werden Mikroglia, T-Zellen und Astrozyten aktiviert. Die Demyelinisierung ist gut reproduzierbar und findet in ähnlichen Regionen, vor allem dem Corpus callosum, statt (61). Es lässt sich eine starke spontane Remyelinisierung nach dieser akut induzierten Demyelinisierung beobachten. Die motorischen Fähigkeiten bleiben auch Wochen nach dem Experiment unter dem Niveau von Kontrolltieren, was die Progression der Erkrankung gut abbildet. Insbesondere bei einer Anwendung von Cuprizon über 12 Wochen hinaus kommt es nicht mehr zur vollständigen Remyelinisierung. Die Autoimmunität spielt bei diesem Modell keine Rolle, weswegen das EAE Modell für Untersuchungen dieses Aspektes verwendet wird (55,61).

Obwohl die EAE ein etabliertes Tiermodell ist, welches verschiedene pathologische Aspekte der MS abbilden kann, existieren kaum Modelle für die progrediente Phase der Erkrankung. Als Pionierarbeiten für die Simulation der progredienten MS gelten die Modelle von Merkler et al. und Gardener et al.. Beide werden an Versuchsratten durchgeführt. Das Prinzip basiert im ersten Schritt auf einer ähnlichen Vorgehensweise wie bei der Induktion der EAE, wobei das MOG an der Schwanzbasis injiziert wird (51,62,63). Bei der Entwicklung von demyelinisierenden Läsionen und Induktion der peripheren T-Zell-Aktivierung im Tiermodell wurde herausgefunden, dass MOG eine Schlüsselrolle spielt (64). In einem zweiten Schritt wurde eine Entzündung induziert. Dafür wurde 1µl Zytokinlösung, welche aus Tumornekrosefaktor- α (TNF α), Interferon- γ (IFN γ) und einem Lösungsmittel besteht, injiziert. Diese zwei pro-inflammatorischen Botenstoffe wurden ausgewählt, da sie bei MS eine ausschlaggebende Rolle spielen. Die Zielorte der Injektion waren der präfrontale Kortex und der Sub-

arachnoidalraum. Aufgrund des invasiven Eingriffs erfolgte dieser Schritt unter Vollnarkose. Bei beiden Modellen wurden kortikale Demyelinisierung und Einwanderung von Entzündungszellen beobachtet. Es kam zudem zur axonalen Schädigung, Neuronenuntergang und bei subarachnoidaler Injektion zur Entzündung der Meningen sowie Aktivierung von Mikroglia. All diese histologisch observierten Pathologien können ebenfalls bei der progredienten MS auftreten. Allerdings waren diese lokal auf eine Hemisphäre beschränkt und bildeten sich nach einigen Tagen wieder fast vollständig zurück. So kann die Irreversibilität als wichtiges Kennzeichen der progredienten MS mittels dieser Modelle nicht abgebildet werden (62,63,65).

Als Weiterentwicklung der oben erläuterten Modelle kann das in dieser Studie verwendete Modell von Ücal und Haindl et al. gesehen werden. Im Unterschied zu den zwei vorherigen Studien, wurde ein bereits eingeeilter Katheter zur Zytokininjektion verwendet. Durch dieses zeitversetzte Vorgehen ist es möglich, die Gewebsreaktion auf die Zytokine von der Gewebsreaktion der Injektion zu unterscheiden. Die histologischen Befunde waren grundsätzlich deckgleich mit denen der Modelle von Merkler et al. und Gardener et al.. Die Demyelinisierung dauerte länger an und breitete sich über beide Hemisphären im Kortex aus. Obwohl sich die Demyelinisierung ebenfalls wieder zurückbildete, konnte eine zweite Reaktion durch Zytokininjektion ausgelöst werden. Somit kann dieses Modell die ausgedehnten und langanhaltenden Pathologien der progredienten MS besser als andere Modelle abbilden und könnte in Zukunft für die Untersuchung der irreversiblen Neurodegeneration vermehrt eingesetzt werden (51,66).

Die Pathologien können mittels Histologie dargestellt werden. Die MRT spielt, im Gegensatz zur Untersuchung beim Menschen, aufgrund von methodischen Limitationen eine untergeordnete Rolle (51). Tiermodelle unterstützen die Theorie der peripheren Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen. Ebenfalls geben die Modelle Hinweise darauf, dass die entzündlichen Veränderungen im Kortex primär reversibel und erst bei mehrmaliger Entzündung irreversibel sind. An den Modellen wird ebenfalls der Zusammenhang zwischen kognitiven Funktionen und kortikalen Läsionen ermittelt (51). Auch andere Mechanismen, wie beispielsweise der Einfluss des Darmmikrobioms auf MS können anhand der EAE erforscht werden (33,34).

1.4 Oxidativer Stress bei neurologischen Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen stellen eine wachsende sozioökonomische Herausforderung dar. Struktur- und Funktionsverlust der Neurone führen zum Auftreten oder zur Progression vieler neuronaler Erkrankungen, welche durch verschiedenste Mechanismen, unter anderem oxidativen Stress, ausgelöst werden. Dies könnte ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Therapien sein (67).

Bei oxidativem Stress handelt es sich um eine Dysbalance zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), reaktiven Stickstoffspezies (RNS) auf der einen, und antioxidativen Faktoren auf der anderen Seite. Die Akkumulierung der ROS und RNS ist für den Körper toxisch. Es kommt zur Schädigung zahlreicher Zellstrukturen wie beispielsweise den intrazellulären Lipiden, Proteinen und der DNA. Diese Schäden stellen einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen dar (68,69). Das Gehirn ist gegenüber oxidativem Stress durch mehrere Faktoren besonders vulnerabel. Dazu zählen der hohe Anteil an ungesättigten Fettsäuren, der hohe Sauerstoffbedarf und eine vergleichsweise geringe Menge an antioxidativen Enzymen. Auch ein hoher Anteil von Metallen im Gewebe, welche oxidative Reaktionen katalysieren, trägt dazu bei (49). Gleichzeitig ist zu erwähnen, dass der zelluläre Alterungsprozess durch oxidativen Stress und mitochondriale Dysfunktion vorangetrieben werden. Das Alter stellt den größten Risikofaktor neurodegenerativer Erkrankungen dar (70). Die Abgrenzung von physiologischen Mechanismen des Alterungsprozesses, welche ebenfalls durch oxidativen Stress hervorgerufen werden, ist sinnvoll (71).

Mitochondrien sind die Hauptquelle von ROS, welche ein Nebenprodukt der mitochondrialen Energiegewinnung sind. Als Ursache wird hierfür der übermäßige Ca^{2+} -Einfluss in Mitochondrien vermutet. Zudem regulieren Mitochondrien selbst die Ca^{2+} -Homöostase, sowie den programmierten Zelltod (44,72,73). Unser Gehirn verbraucht 20 % des im Körper verfügbaren Sauerstoffs (73). Die Stoffwechsellage der grauen Substanz des Gehirns entspricht dem Verbrauch eines Beinmuskels während eines Marathons. Dieser Vergleich verbildlicht die enorme Wichtigkeit und hohe Aktivität der Mitochondrien als ATP-Lieferanten im Gehirn (74).

Neben den schädlichen Auswirkungen der ROS existieren auch protektive Mechanismen. Neben der Abwehr von Erregern über Aktivierung des Immunsystems, tragen sie auf niedrigem Niveau zur Stressanpassung durch Sauerstoffmangel bei, indem sie mitochondriale Proteine modifizieren. Die dadurch reduzierte enzymatische Aktivität führt zu einem verminderten Energiebedarf der Zellen und stellt beispielsweise bei Gewebsverletzungen einen protektiven Faktor dar. In höherer Konzentration kann die überschüssige Modifikation von Enzymen durch ROS jedoch zur enzymalen Dysfunktion führen (45,69). ROS können unter anderem Neurone, Gliazellen und das Endothel schädigen. Der antioxidative Schutz von Neuronen wird durch die verminderte Expression des Zellfaktors nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) beeinträchtigt (73). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 aktiviert antioxidative Gene. Aufgrund dessen wird er mit Resistenz gegenüber oxidativem Stress und der Langlebigkeit eines Organismus in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu führt die Hemmung des Nrf2 – Signalwegs zu frühzeitiger Zellalterung (75). Es gibt erste Hinweise darauf, dass VD bei MS PatientInnen durch den Nrf2 wirkt, indem DNA Reparaturgene hochreguliert werden (76). Nrf2 wirkt sich auf direktem sowie indirektem Weg auf Entzündungsprozesse aus. Direkt durch Modulation des Redox Status und indirekt durch Interaktion mit NfkappaB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) und Inflammasomen (77). NFkappaB fördert die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und wird durch ROS aktiviert (78). In einer ersten Zellstudie konnte bewiesen werden, dass VD über den NFkappaB – Weg hemmend auf TNF- α wirkt (79). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer Demenz oder Parkinson Erkrankung konnte die verminderte Genexpression von Nrf2 festgestellt werden (49). Im Zusammenhang mit MS ist zudem der Wirkstoff Dimethylfumarat zu erwähnen. Die etablierte Therapie mit Dimethylfumarat bei RRMS wirkt unter anderem durch die Stabilisierung von Nrf2 (80,81). Ob ein direkter Zusammenhang zwischen VD und Nrf2 besteht, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen spielt die Entzündung eine wesentliche Rolle. Entzündungsreaktionen und oxidativer Stress sind eng miteinander verknüpft. Durch oxidativen Stress können Entzündungen induziert werden und die dabei produzierten proinflammatorischen Zytokine, wie beispielsweise der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Interleukin-10 (IL-10), rufen wiederum oxidativen Stress hervor (69).

Der größte Anteil an ROS im ZNS wird durch Makrogliazellen verursacht. Astrozyten gehören zu den Makrogliazellen, haben eine Stützfunktion im ZNS und beeinflussen die neuronale Aktivität durch vielfältige Mechanismen. Durch Regulation des extrazellulären Milieus und des Blutflusses modulieren sie den neuronalen Metabolismus. Zudem spielen sie eine Rolle in adulter Neurogenese und Reparaturmechanismen des Gewebes nach Verletzungen und schützen so vor oxidativem Stress sowie Neurodegeneration (46). Im Gegensatz zu Neuronen ist Nrf2 in Astrozyten sehr stabil und führt infolgedessen zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress. Daher ist deren Beteiligung in einem dysfunktionalen Zustand an neuronalen Erkrankungen naheliegend (73). Oligodendrozyten gehören wie die Astrozyten zu den Makrogliazellen und bilden im Gehirn die Myelinscheide der Axone. Sie sind sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress, was folglich die (Re-)Myelinisierung von Axonen vermindert (45). Neben der Myelinisierung spielen Oligodendrozyten ebenfalls eine Rolle in der Energieversorgung der Axone. Über einen Transporter wird Laktat an Axone übermittelt, welche dieses zur Generierung von ATP verwerten (55). Wenn ROS Proteine der Lipiddoppelschicht oxidieren, führt dies zu Zellschäden und -tod (45). In einer in vitro Studie konnte festgestellt werden, dass Endothelzellen, die ROS ausgesetzt waren, vermehrt Adhäsionsmoleküle produzierten. Dies führt im Gehirn zu einer erhöhten Permeabilität der BHS (82). Als Folge dessen nimmt die Sensibilität des Gehirns gegenüber pathogenen Einflüssen aus der Peripherie zu. Bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wird vermehrt eine infektiöse Pathogenese diskutiert. Das bedeutet, dass Erreger, die in den Körper eingedrungen sind, nach durchgemachter Infektion oder auch ohne klinischer Infektionssymptomatik persistieren oder langfristige Veränderungen hervorrufen, welche die pathophysiologischen Prozesse anstoßen. Infolgedessen könnte eine beeinträchtigte BHS zur Pathogenese von Erkrankungen des ZNS beitragen.

1.5 Oxidative Parameter

Bei oxidativem Stress stehen einem Organismus insbesondere zwei protektive Systeme zur Verfügung. Zum einen nach erfolgter Oxidation durch reaktive Stoffe. Hier wird durch Reparatursmechanismen der DNA und modifizierter Proteine entgegengesteuert. Zum anderen vor Oxidation durch Antioxidantien. Im Folgenden möchte ich auf die wichtigsten Stoffe und Mechanismen, die eine Rolle für diese Arbeit spielen, eingehen.

Polyphenole sind aromatische Verbindungen, welche mehr als einen Phenolring in ihrer Struktur enthalten. Am häufigsten kommen sie in Früchten, Gemüse und Pflanzen vor. Es existieren mehr als 8000 molekulare Varianten der Polyphenole, anhand derer sie klassifiziert werden. Grob kann zwischen den Flavonoiden, Tanninen und Phenolsäuren unterschieden werden. Sie wirken vor allem antioxidativ, antimikrobiell, entzündungshemmend sowie immunmodulatorisch. Die Wirkmechanismen sind vielfältig. Auf Immunzellen befinden sich spezifische Rezeptoren für Polyphenole. Bei Bindung der Polyphenole an diese Rezeptoren werden Signalwege einer Immunantwort initiiert. Ein anderer Mechanismus beruht auf der epigenetischen Modifikation. Durch eine verminderte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wirken sie antiinflammatorisch. Die vasoprotektive Wirkung kommt durch Stimulation der endothelialen NO – Liberation zustande (83,84). Insbesondere die immunmodulatorischen, antioxidativen und entzündungshemmenden Wirkungen der Polyphenole sind im Zusammenhang mit MS von Interesse.

Reaktive Moleküle reagieren häufig auf direktem oder indirektem Wege mit ungesättigten Fettsäuren. Temporär kommt es zur Bildung von intermediär gebildeten Fettsäureradikalen und anschließend zu Fettsäureperoxyradikalen. Diese reagieren mit einem weiteren Fettsäuremolekül oder einem Antioxidans zu Fettsäurehydroperoxiden. Im biologischen System binden die Fettsäurehydroperoxide an Proteine oder Übergangsmetallionen wie Kupfer oder Eisen. Die am häufigsten eingesetzten Marker für die Messung von oxidativem Stress sind oxidativ modifizierte Fettsäuren. Oxidierte low-density-Lipoproteine (oxLDL) fördern in niedriger Konzentration das Zellwachstum wohingegen sie in höherer Konzentration die Apoptose von Zellen induzieren. Dies geschieht sowohl über Caspase-abhängige als auch – unabhängige Mechanismen. Werden Monozyten oxidativ modifizierten Proteinen ausgesetzt, so steigt die Anzahl der Monozyten, die zu Makrophagen reifen, an. Es konnte in einem Zellversuch herausgefunden werden, dass Monozyten unter Einfluss von oxLDL im Vergleich zur Exposition mit LDL schneller zu Makrophagen reifen. Einen möglichen Mechanismus stellt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche durch eine Veränderung des Redoxstatus hervorgerufen wird, dar. In erster Linie möchte ich auf Cu^{2+} -LDL und HOCL-LDL eingehen. Insbesondere wird von Cu^{2+} -LDL der proinflammatorische Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa light chain enhancer der B-Zellen (NFkappaB) aktiviert. CuSO_4 oxidiert die Lipidkomponente von LDL, wohingegen HOCL die Proteinkomponente oxidiert. Damit könnten die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der unterschiedlichen oxLDL erklärt werden (85,86).

Mit der totalen antioxidativen Kapazität wird die Gesamtheit, der im Serum gelösten antioxidativen Stoffe, erfasst. Im Speziellen wird die Fähigkeit der Moleküle getestet, ein reaktives Molekül zu neutralisieren. Ist die TAC erniedrigt, so ist der untersuchte Organismus vulnerabler gegenüber oxidativem Stress im Vergleich zu einer höheren TAC. Es kann jedoch keine Aussage über bestehende Schäden durch oxidativen Stress getroffen werden. Die TAC wird durch vielfältige Faktoren beeinflusst. Zum einen durch endogene Faktoren, wie die Stoffe Harnsäure oder Bilirubin, welche daneben auch Metabolite oxidativer Reaktionen sind. Zu den endogenen Faktoren zählen ebenfalls die Aminosäuren Cystein, deren Thiolgruppen entweder direkt mit ROS reagieren oder indirekt Peroxide inaktivieren. Proteine wie Coeruloplasmin oder Transferrin spielen eine protektive Rolle durch Bindung an die Übergangsmetalle Kupfer und Eisen. Zum anderen durch exogene Faktoren. Sie werden mit der Nahrung in den Organismus aufgenommen. Hierzu zählen Spurenelemente wie Selen, Kupfer oder Zink, welche Bestandteile von antioxidativen Enzymen sind. Auch Vitamin C, E, Carotinoide und Polyphenole werden zu den exogenen Antioxidantien gezählt (87).

Die Bestimmung der oxidativen Parameter lässt Rückschlüsse über das Ausmaß der oxidativen Reaktionen zu. Jedoch kann dadurch über den aktiven Schaden, also die Demyelinisierung, keine Aussage getroffen werden. Um die Demyelinisierung in aktiven Läsionen näher zu bestimmen, kann durch immunhistochemische Färbung PLP bestimmt werden. PLP ist ein lipophiles und membranstabilisierendes Protein der Myelinscheiden. Der Verlust von PLP zeigt die Demyelinisierung an. Findet sich in einer Läsion kein Anhaltspunkt für Demyelinisierung, so befindet sie sich in einem post-demyelinisierenden Zustand. Klinisch äußert sich eine Störung von PLP in Störung der Myelinisierung und neuronaler Dysfunktion. Eine Fehlfunktion von PLP durch eine Mutation im PLP 1 Gen ist die sehr seltene Pelizaeus-Merzbacher disease. Durch verschiedene Mutationen kommt es zu einer fehlerhaften Myelinisierung und daraus folgend zu verzögerter geistiger und motorischer Entwicklung (39,88).

1.6 Vitamin D und MS

VD gehört zu den Steroidhormonen und wurde als erstes in den 1920er Jahren von McCollum et al. im Zusammenhang mit Rachitis beschrieben. Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen und der endogenen Synthese wird es molekularbiologisch seit einigen Jahren als Prohormon eingestuft. Die Bezeichnung als Vitamin ist weiterhin zutreffend, da in den Wintermonaten mit wenig Sonneneinstrahlung die körpereigene Produktion unzureichend ist und folglich die Zufuhr von VD über die Nahrung notwendig ist. In den letzten Jahrzehnten wurde herausgefunden, dass VD mehr als 100 Gene reguliert, welche unter anderem das Immunsystem, die Entwicklung sowie Physiologie des ZNS beeinflussen. Daher gilt es auch als Neurosteroid. Trotz der Beteiligung an zahlreichen Prozessen steuert VD in erster Linie den Calcium- und Phosphathaushalt aller höheren Wirbeltiere (89–91). Seine komplexe Synthese vom Cholesterin bis zur aktiven Form von VD spielt sich mit der Leber, der Niere und der Haut in drei verschiedenen Organen ab.

Die aktive Form von VD (1,25-Dihydroxyvitamin D₃) bindet an intranukleäre VD-Rezeptoren (VDR) und Oberflächenproteine. Erstere wirken über Genregulation, wohingegen die Oberflächenproteine kurzfristige Wirkungen, ähnlich den Steroidwirkungen, vermitteln. Die genauen Wirkungen über Oberflächenproteine sind bislang unklar, weswegen in dieser Arbeit ein Fokus auf VDR gelegt wird. Sie kommen in großer Anzahl im Cortex, der Amygdala, im Hippocampus, Thalamus und der Substantia nigra vor. Lokale Wirkungen durch auto- und parakrine Sekretion von in Mikroglia und Neuronen synthetisiertem VD steuert die Differenzierung, das Wachstum und Überleben dieser Zellen (89). Im Hippocampus und Kortex, welche für Kognition und komplexes Planen wesentliche Regionen sind, befinden sich besonders viele VDR (89). Ebenfalls ist bekannt, dass VD Einfluss auf die Produktion von Neurotransmittern wie Acetylcholin (ACh), Serotonin und Dopamin hat. Somit könnte VD Einfluss auf die Kognition und Depressionen von MS PatientInnen haben (92). Durch vasoprotektive Mechanismen wird zudem die Kognition auf indirektem Wege positiv durch VD beeinflusst. In mehreren Studien konnte beobachtet werden, dass endotheliale Dysfunktion und Gefäßsteifigkeit invers mit dem VD-Spiegel zusammenhängen. Durch den Schutz vor plötzlichem Ca²⁺-Anstieg werden neuronalen Schäden verhindert. Eine neuroprotektive Wirkung von VD beruht darauf, dass die Ca²⁺-bindenden Proteine Calbindin sowie Parvalbumin vermehrt produziert, werden. Zudem werden L-Typ Calciumkanäle herunterreguliert (89).

Einheitliche Serumgrenzwerte für VD sind derzeit Gegenstand des wissenschaftlichen Diskurses. Lange war ein Serumlevel unter 50 nmol/L als Mangel definiert. Gegenwärtig gibt es mehr Evidenz, dass erst der Grenzwert auf 100 nmol/L heraufgesetzt werden sollte. Hintergrund dafür ist, dass der Fokus bei den niedrigeren Grenzwerten auf einen funktionierenden Knochenstoffwechsel gelegt wurde. Es ist indessen bekannt, dass VD viele weitere Funktionen erfüllt. Erst ab einem höheren Serumspiegel funktionieren alle bisher untersuchten physiologischen Prozesse, bei denen VD eine Rolle spielt (93). Bei der Dosierung müssen jedoch auch die direkt toxischen Effekte von hochdosiertem, sowie die Langzeitnebenwirkungen von VD berücksichtigt werden. Als unerwünschte Wirkungen treten beispielsweise Hyperkalzämie, Gefäßablagerungen oder gastrointestinale Beschwerden auf (94).

Zwischen einem VD-Mangel und dem Risiko an MS zu erkranken, besteht ein signifikanter Zusammenhang. In einer Fall-Kontroll-Studie wurde herausgefunden, dass Serumspiegel unter 50nmol/l ein signifikant höheres Risiko hervorrufen. Ein VD-Mangel über diesem Wert geht nicht mit erhöhtem Risiko einher, an MS zu erkranken (23,95,96). Eine vermehrte Exposition gegenüber UV-B Strahlen und Aktivitäten im Freien während der Sommermonate reduzieren das Erkrankungsrisiko (22). Obwohl ein genetisch determinierter niedriger Spiegel mit einer erhöhten Prädisposition einhergeht, wurde kein Zusammenhang zwischen neonatalen VD-Spiegel und dem Erkrankungsrisiko gefunden. Ebenso konnte bisher weder ein positiver noch negativer Effekt auf den VD Serumspiegel von Genen, welche mit einem erhöhten MS Risiko und dem VD Metabolismus in Zusammenhang stehen, festgestellt werden (14,97–99). VD beeinflusst nicht nur das Risiko, an MS zu erkranken, es gibt ebenfalls Hinweise darauf, dass ein krankheitsmodulierender Zusammenhang besteht (24,95). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit hohem VD-Spiegel eine geringere Wahrscheinlichkeit haben, eine neue Gadolinium-anreichernde Läsion im MRT zu entwickeln. Diese Läsionen sind ein wichtiger Bestandteil sowohl für die Diagnose als auch den Verlauf von MS. Zudem wurde festgestellt, dass Patienten mit höherem VD-Spiegel mildere Verläufe einer Optikusneuritis zeigten, sich Männer schneller davon erholten und der Grad der Einschränkung durch MS bei VD-Mangel größer war (100).

Die Wirkung von VD und Östrogenen sind synergistisch im Hinblick auf Autoimmunität von T-Zellen der EAE. Da dieser schützende Mechanismus bei Frauen mehr Bedeutung hat, könnte dies ein Grund sein, weshalb die Erkrankung bei Frauen im Vergleich zu Männern milder verläuft. Aufgrund der protektiven Wirkung von Östrogen vor MS im Hinblick auf

Schübe und Progression könnte dies eine zukünftige Therapie darstellen (101). Durch verminderte Calciumaufnahme bei VD-Mangel kommt es zu einer verminderten Darmmotilität. Hierdurch können vermehrt von Darmbakterien produzierte Endotoxine in die Blutbahn übertreten. Diese pro-inflammatorischen Zytokine können ebenfalls negative Auswirkungen auf das ZNS haben (102).

Es ist bekannt, dass VD bei Infektionen im frühen Stadium zur Aktivierung von Makrophagen notwendig ist. Gleichzeitig wird VD von aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen im ZNS synthetisiert (103). Zudem wird die Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen begünstigt, sowie die von pro-inflammatorischen Zytokinen unterdrückt. Es wird angenommen, dass die Dysbalance zwischen Th1, T17 und regulatorischen T-Zellen der wichtigste Faktor für die Entzündungsreaktion von MS ist. Da auf all diesen Zellen VDR existieren, könnte VD einen regulatorischen Effekt haben (104). Die genaue Rolle von B-Zellen bei MS ist noch ungeklärt. Trotz nicht signifikanten Unterschieden in neu aufgetretenen Gadolinium-anreichernden Läsionen in der MRT bei Therapie mit Rituximab konnte ein Unterschied im Gangbild und bei jungen Patienten (<51J.) festgestellt werden (105). Bei Aktivierung von B-Zellen erhöht sich die Anzahl der VDR. Bei in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass VD die IgG- und IgM-Produktion hemmt, indem B-Zellen in die Apoptose geleitet werden und deren Wachstum somit gehemmt wird. Ein immunsuppressiver Mechanismus von VD besteht darin, die Proliferation inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) abzuschwächen. Die anti-entzündlichen Zytokine IL-10 und IL-4 werden hingegen vermehrt produziert (106).

VD ist zudem ein bekanntes Antioxidans. Es konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass VD oxidativen Stress im ZNS reduziert (107). Die verminderte Demyelinisierung und die axonalen Schäden, welche in der EAE durch andere antioxidative Stoffe ausgelöst werden, könnten ebenfalls einen protektiven Mechanismus von VD darstellen (108).

Bei progredienten Formen der MS wurde ein signifikant niedrigerer VD-Spiegel im Vergleich zu PRMS gefunden (109). In einem systematischen Review konnte festgestellt werden, dass Patienten mit einem niedrigerem Serumspiegel besonders von einer VD-Supplementierung profitieren konnten. Bislang konnte dabei dennoch kein besserer Outcome der MS nachgewiesen werden. Gleichwohl steigen anti-inflammatorische Zytokine mit dem Vitaminspiegel an und in Studien konnte ein synergistischer, immunmodulatorischer Effekt

zwischen Interferon- β und VD nachgewiesen werden (110). Es ist im weiteren Schritt wichtig, die Mechanismen der SPMS und PPMS im Zusammenhang mit VD genauer zu untersuchen.

1.7 Einfluss des Geschlechts

In einer longitudinalen Studie in Kanada wurde herausgefunden, dass die Inzidenz der Neu-erkrankungen von Frauen höher als von Männern ist und diese Differenz immer größer wird (4,111). Bislang wird diese Entwicklung auf einen unbekanntem Umweltfaktor, welcher sich vor allem auf Frauen auswirkt, zurückgeführt (112). Denn aufgrund der kurzen Zeitspanne ist es unwahrscheinlich, dass evolutionär bedingte genetische Veränderungen die Ursache sind.

Geschlechtsreife Frauen haben eine stärkere T-Zell-medierte Immunantwort bei allgemeinen und parasitären Infektionen als Männer. Ein stärker reagierendes Immunsystem ist ein Risikofaktor für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Eine Schwangerschaft hat auf die Progredienz von MS keinen Einfluss (55,113). Im dritten Schwangerschaftstrimester treten weniger Schübe auf. Jedoch kehrt sich dieser Effekt postpartum um und es kommt zu vermehrten Schüben. In der EAE wurde herausgefunden, dass Progesteron und Östrogen Entzündung und Gliose verringern (114). Es konnte gezeigt werden, dass Östrogenlevel, wie sie bei Schwangeren vorkommen, die Produktion von regulatorischen B- und T-Zellen fördern und auf diesem Wege die Entzündung im ZNS verringern (115). Eine weitere Studie zeigt, dass klinische Schübe unter Östrogensupplementierung vermindert auftreten. Dies kann jedoch nicht uneingeschränkt als Therapieerfolg gewertet werden, da in der MRT keine Korrelate gefunden werden konnten. Daher führte Östrogen als therapeutische Ressource bislang nicht zu gewünschten Ergebnissen (116). Östrogen als pathophysiologischer Faktor bleibt jedoch interessant, da man annimmt, dass die Wirkung aus der Beeinflussung von B- und T-Zellen resultiert. Damit wären sowohl pathophysiologische Mechanismen der progredienten sowie der schubförmigen MS inkludiert (101,115).

Es wurde beobachtet, dass die MS Inzidenz bei Frauen in Frankreich stärker mit der Sonneneinstrahlung korreliert als bei Männern. Das heißt, dass im Vergleich in Wintermonaten mehr Frauen an MS neu erkranken. Der VD-Spiegel wurde nicht mit erhoben, weshalb un-

klar bleibt, auf welchen Unterschied dieses Ergebnis zurückzuführen ist (117). Ein Anhaltspunkt könnte sein, dass VD mehr Gene (51:1) bei Frauen im Vergleich zu Männern reguliert (118). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass VD die Östradiol- (E2) Produktion erhöht, was wiederum anti-inflammatorische Wirkungen hervorruft. Die Wirkungen von VD werden durch Östrogene beeinflusst (101). In geringerer, etwa dem normalen Menstruationszyklus entsprechenden Konzentration wirkt Östrogen proinflammatorisch. In höherer Konzentration werden anti-inflammatorischen Zytokine produziert und NK-Zellen inhibiert.

Trotz höherer Inzidenz, früherem Krankheitsbeginn, sowie häufigeren Schüben bei Frauen schreitet die Erkrankung bei Männern schneller voran und hat eine schlechtere Prognose (117,119). Zudem ist das genetische Risiko an MS zu erkranken bei Männern um 60% höher als bei Frauen (120). Interessant ist, dass Männer in höherem Alter als Frauen an MS erkranken. Dem könnte eine protektive Wirkung von Testosteron zugrunde liegen. Durch Testosteron konnten in einer Studie die mitochondriale Aktivität, Gewebsschäden sowie der oxidative Stress vermindert werden. Im EAE Modell hat sich Dihydrotestosteron (DHT) positiv auf den klinischen Score ausgewirkt und führte darüber hinaus zu weniger Gliose und Entzündung im Rückenmark. Eine Pilotstudie konnte zeigen, dass mit dermalen Applikation eines Testosterongels nach einem Jahr eine verbesserte Kognition sowie Verlangsamung der Kortextrophie erreicht werden konnte (119,121)

1.8 Zielsetzung

In dieser Studie wird ein Tiermodell der kortikalen Demyelinisierung verwendet. Das Ziel dieser Studie ist, die Effekte der alimentären Supplementierung von VD auf die oxidative Kapazität der Versuchstiere zu erheben. Wie oben erwähnt, existieren bereits zahlreiche Studien über den epidemiologischen Zusammenhang zwischen der Sonnenexposition, VD und MS (21,22,102,122,123). Jedoch sind die Zusammenhänge auf zellulärer sowie molekularer Ebene weitgehend unklar.

Eine positive Wirkung von VD auf die, in unserer Studie gemessenen Parameter, könnte wichtige Hinweise auf weitere Fragestellungen der klinischen Forschung geben. Insbesondere im Zusammenhang mit der Therapie und Prävention von PatientInnen mit progredienten

ter MS. Denn zum jetzigen Zeitpunkt sind viele Aspekte der pathophysiologischen Mechanismen der progredienten Phasen der MS unklar. Daraus folgend ergeben sich auch geringere therapeutische Optionen im Vergleich zu Phasen mit Schüben und entzündlicher Aktivität (1,31).

Ebenso könnte weiteres Wissen, über die Auswirkung von VD auf die oxidativen Marker, weitere Hinweise über die pathophysiologischen Mechanismen der kortikalen Demyelinisierung geben. Zum jetzigen Zeitpunkt sind diese Mechanismen nur teilweise bekannt (5). Neben der allgemeinen Erhebung der Effekte von VD werden in dieser Arbeit die Unterschiede der verschiedenen Geschlechter berücksichtigt. Deshalb ist ein weiteres Ziel, die Frage nach unterschiedlichen Reaktionen von männlichen und weiblichen Versuchstieren auf VD und ob in diesem Modell ein solcher Unterschied besteht.

2. Material und Methoden

2.1 Tiermodell

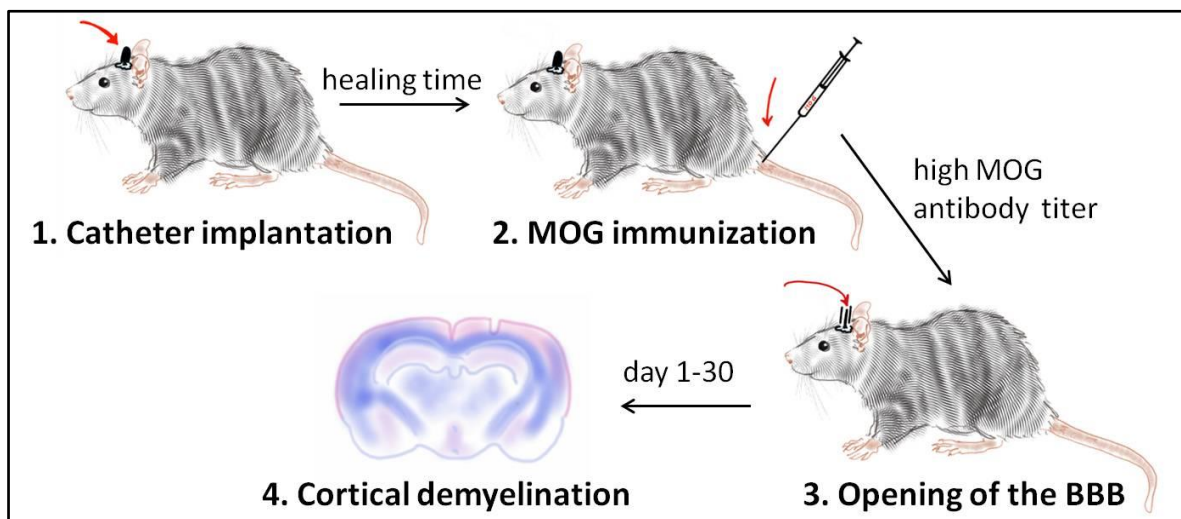


Abb.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und -ablaufes in unserer Studie verwendeten Tiermodells nach Ücal et al.

Es wurden 53 Dark Agouti (DA) Ratten aus Harlan, Niederlande oder Janvier, Frankreich in das Experiment einbezogen. Die kortikale Demyelinisierung beider Hemisphären erfolgte nach der 2017 publizierte Studie von Ücal et. al. "Widespread cortical demyelination of both hemispheres can be induced by injection of pro-inflammatory cytokines via an implanted catheter in the cortex of MOG-immunized rats" (66) . Der Tierversuch wurde vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMFWF-66.010/0072-WF/V/3b/2017).

Für das Experiment wurde ein MRT- und gewebskompatibler Katheter in den Frontallappen implantiert. Die Operation erfolgte unter Anästhesie mit einer Mischung aus Fentanyl (Janzen-Cilag Pharma, Wien, Österreich), Midazolam (Erwo Pharma, Brunn am Gebirge, Österreich) und Medetomidin (Orion Pharma, Espoo, Finnland). Nach der Operation heilte der Katheter zwei Wochen aus, um sicher zu stellen, dass die BHS nach der traumatischen Schädigung wieder intakt ist. Anschließend wurden die Ratten mit einer geringen Dosis von IFA (incomplete Freund's Adjuvant; Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz) gelöstem MOG subkutan am Schwanzansatz geimpft. Dies führte zu einem stabilen MOG-AK Titer ohne klinische oder histologische, im ZNS detektierbare Veränderungen. Im nächsten Schritt wurden über den Katheter für eine Dauer von 10min die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ in hoher Dosis infundiert. Die Flussgeschwindigkeit entsprach hierbei mit 0,2 μ l/min der natürlichen Geschwindigkeit des Liquoraustauschs. Damit konnten Schäden am Parenchym durch Infusionsdruck vermieden werden. Diese Zytokine bewirken eine selektive Öffnung der BHS. Somit konnten die in der Peripherie gebildeten AK gegen MOG in das Gehirnparenchym übertreten.

Aus den vorherigen Experimenten ist bekannt, dass die kortikale Demyelinisierung ab dem 1. Tag nach Zytokininjektion in der ipsilateralen und ab dem 3.Tag in der kontralateralen Hemisphäre beginnt. Das Maximum wird zwischen dem 9. und 15. Tag in beiden Hemisphären erreicht. Zu diesem Zeitpunkt ist das Verhalten der Ratten anhand des EAE Scores, klinisch gesehen langsamer, jedoch ohne motorische Symptomatik im Rotarod Performance Test. Ab dem 15. Tag normalisiert sich das Verhalten wieder. An Tag 30 sind einzelne De- und ebenfalls beginnende Remyelinisierungsherde detektierbar.

Histologische Veränderungen waren ebenfalls aus den vorangegangenen Experimenten bekannt. Astrozytose um den Katheter wird an Tag 1-3 nach Zytokininjektion beobachtet und nimmt ab Tag 15 ab. Mikroglia werden mit einem Maximum um den 3.-15. Tag aktiviert. Die Anzahl der Neuronen sinkt abrupt ab Tag 15, bleibt reduziert im Vergleich zu Versuchstieren ohne Zytokininjektion und erholt sich ab dem 30. Tag.

Die Induktion eines Rezidivs löst dieselben Symptome wie bei der ersten Injektion aus. Makroskopisch wurde nach der zweiten Zytokininjektion eine Atrophie des Gehirns beobachtet, was auch ein Zeichen bei progredienter MS beim Menschen sein kann.

Die Versuchstiere wurden ab der Entwöhnung vom Muttertier mit einer Dosis von 400 IU/Woche mit VD supplementiert. Die Kontrollgruppe ohne VD-Supplementierung umfasste 23 Tiere mit - und 5 gesunde Muttertiere ohne Katheter. Davon wurden die Daten dreier Tiere nicht in die Auswertung mit einbezogen. Zur Tötung wurde nach tiefer Anästhesie mit Midazolam, Fentanyl und Medetomidin (wie oben beschrieben) 25 mg Thiopental (Sandoz, Kundl, Österreich, 0,5 ml, 50 mg/ml) intrakardial injiziert. Im Anschluss erfolgte die transkardiale Injektion von 4% PFA (Merck, Darmstadt, Deutschland).

Tötungszeitpunkt (Tag)	15	30	15 (nach 2. Zytokininjektion)
Tiere mit VD Supplementation	8	7	7
Tiere ohne VD Supplementation	6	5	11

Tabelle 1: Versuchstiere und Tötungszeitpunkt

2.2 Immunhistochemie (IHC)

Die Gehirne der Versuchstiere wurden nach Entnahme mit 4% PFA (Paraformaldehyd) fixiert und in Paraffin eingebettet. An einem Schlittenmikrotom wurden 1,5 µm dicke Schnitte gefertigt. Im ersten Schritt wurden die histologischen Präparate entparaffiniert. Dazu wurden sie 2x für 10 min in Xylol getaucht und anschließend 2x in 96% Ethanol gewaschen. Zur Zerstörung der endogenen Peroxidase wurden sie 30 min mit 1200 µl H₂O₂ vermisch mit 180 ml Methanol inkubiert. Der Reihe nach wurden die Präparate in 70% Alkohol, 50% Alkohol und Aqua destillata (Aqua dest.) zur Rehydrierung ohne angeführte Zeitangabe ge-

taucht. Die Vorbehandlung als zweiten Schritt erfolgte durch Dampfgeren in einem Citratpuffer mit 10 ml Stammlösung und 990 ml Aqua dest. mit einem pH-Wert von 6,0 für eine Stunde. Damit werden Querverbindungen, welche durch Formalinfixierung entstanden sind, gebrochen damit der Antikörper sein Epitop finden kann. Mit einem PBS-Puffer (2 Liter Stammlösung nach Sörensen und 6 Liter Aqua dest., pH-Wert 7,4) wurden die Präparate drei Mal gewaschen und die Gewebe mit einem Dako-Pen eingegrenzt.

Für die IHC-Färbung wurde das ImmPRESS® Goat Anti-Rabbit IgG Polymer Kit (VECTOR Laboratories, 30 Ingold Road, Burlingame, CA 94010 – USA) verwendet. Nach Anleitung des Kits wurden die Schnitte mit dem Blocking-Reagenz (Diluent + 2,5 % Ziegen Serum) für 20 min inkubiert. Dies führt zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen. Überschüssiges Serum wurde entfernt und die Primärantikörper aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Verwendet wurden die Primärantikörper anti-Cu²⁺-ox.-LDL Verdünnung 1:3000⁴, anti-HOCL-LDL in Verdünnung 1:2000⁴ in Blocking-Reagenz und anti-PLP (AB 2237198) mit einer Verdünnung von 1:500. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei Mal mit PBS-Puffer gewaschen und der Sekundärantikörper (ImmPRESS Reagenz) aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Entwicklung erfolgte mit dem DAB-Peroxidase Substrate Kit von Vector Laboratories. Dieses beinhaltet jeweils 6 ml Puffer mit pH-Wert 7,5, Wasserstoffperoxid Lösung und DAB-Lösung. Die Substratlösung wurde nach Angaben des Herstellers gemischt. Zuerst wurden die Schnitte mit in PBS gewaschen, bevor sie mit der DAB-Lösung unter mikroskopischer Kontrolle inkubiert wurden. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Schnitte in Wasser gewaschen.

Im Anschluss daran, wurde die Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Dazu wurden die Präparate nacheinander 5 min in Hämalaun, 2x in H₂O, in einer Mischung aus 0,5ml 37% HCl und 100 ml 70% Ethanol und 2x in Aqua dest. getaucht. Der nächste Schritt führte zur typischen Blaufärbung durch 5 min Tauchbad in Shandon Bluing Reagenz. Danach wurden die Schnitte zur Dehydrierung in Aqua dest., in 50%, 70%, 3x 96% und 100% Ethanol sowie n-Butylacetat getaucht. Abschließend wurden die Gewebsschnitte eingedeckt.

2.3 Photometrische Tests

Für den Polyphenol Mikrotiter im Serum wurde das Kit von Omnignostica (GmbH & Co KG, Research, Reagents & Recycling, Höflein an der Donau, Österreich) verwendet. Es beinhaltet Verdünnungsmittel (30 ml), Reagenz (11 ml), Verstärker (5 ml), Standards (5x 200 µl Gallensäure, beginnend mit 3 mM), Kontrolle, Verdünnungsplatte mit 96 Vertiefungen und eine Assay Platte mit 96 Vertiefungen.

Polyphenole sind aromatische Verbindungen, welche antioxidative Wirkung haben. Sie wurden im Serum der Versuchstiere bestimmt, um die totale antioxidative Kapazität der Proben zu ermitteln. Hämolytische Proben wurden nicht ausgeschlossen. Das Prinzip der Polyphenolmessung beruht auf ihrer Eigenschaft, Übergangsmetalle zu reduzieren. Diese Komplexe haben eine dunkelblaue Farbe mit der Wellenlänge 620-766 nm. Der Versuch wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Da es sich um tierisches Material handelt, wurden zum Eigenschutz Einmalhandschuhe sowie Schutzkleidung verwendet. Die Serumproben der Versuchstiere waren bei -80°C gelagert und wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Vorverdünnung erfolgte im Verhältnis 1:10 mit 20 µl Probe und 180 µl Verdünnungsmittel. Die Polyphenol Reaktion wurde induziert, indem 50 µl Verdünnungslösung, 100 µl Reagenz und 30 µl Verstärker zu den vorverdünnten Lösungen gegeben wurden. Die Bestandteile wurden auf einem horizontalen Schüttler gemischt und danach 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende photometrische Messung erfolgte bei 766 nm. Die Wellenlänge wurde höchstmöglich gewählt, um Überlagerungen durch andere Farbbestandteile zu vermeiden. Um die korrekten Werte der Serumproben zu erhalten, müssen die Ergebnisse um den Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

Die TAC (Totale antioxidative Kapazität) wurde mit einem Test von Omnignostica (Produktnummer DMP 20-4100) im Serum bestimmt. Darin enthalten sind Assay Puffer (50 ml), Peroxid (1 ml), Peroxidase (1 ml), Substrat (1 ml), Stopplösung (6 ml), Standard A-E (jeweils 1 ml), Kontrollen 1 und 2 (jeweils 1 ml) und eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen. Das Prinzip des Tests beruht auf einer blauen Farbreaktion von Peroxiden mit Peroxidasen. Durch Hinzufügen der Stopplösung entsteht eine gelbe Farbe, welche bei 450 nm fotometrisch gemessen werden kann. Mit Zunahme der Konzentration der Antioxidantien wird die Färbung schwächer. Der maximale Bestimmungswert liegt bei 3 mmol/L, da ab diesem Wert die Lösung farblos ist. Durch eine Standardreihe können die Ergebnisse der Testlösung

quantifiziert werden. Der Versuch wurde durchgehend bei Raumtemperatur durchgeführt. Im ersten Schritt wurden 25 µl der Standards, Kontrollen und Proben auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reagenzien A und B wurden nach Herstellerprotokoll gemischt und 100 µl bzw. 50 µl in alle Vertiefungen pipettiert. Im Anschluss wurde die Testplatte bei 2°C für 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Hinzugabe von 50 µl Stopplösung angehalten und die Extinktion bei 450 nm photometrisch bestimmt.

2.4 Statistische Analyse

Zur Analyse wurde SPSS Statistics (Version 23.0, IBM Corp. Armonk, NY) verwendet. Die Normalverteilung der erhobenen Daten wurde mit dem nicht-parametrischen Kolmogorov-Smirnov Anpassungstest geprüft. Da keine Normalverteilung gegeben ist, wurde der Kruskal-Wallis Test und anschließend die Gruppen mit Mann-Whitney-U-Test untereinander analysiert. Die Signifikanzgrenze wurde für alle Auswertungen auf $p < 0,05$ (5%) festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Geschlechtsunterschiede

Die folgenden Daten wurden als weiterer Bestimmungparameter außer der VD-Supplementierung bei Versuchstieren mit Induktion des Modells der progressiven MS nach Ücal et al. und einer Kontrollgruppe ohne Zytokininjektion erhoben. Ziel war dabei, den Zusammenhang zwischen weiblichem beziehungsweise männlichem Geschlecht und der antioxidativen Kapazität zu ermitteln.

3.1.1 Polyphenole (PP)

Der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen ist bei der Messung des Ausgangswerts der PP im Serum mit einem p-Wert von 0,301 nicht signifikant. Nach der ersten Zytokininjektion unterschied sich der Wert der PP jedoch zwischen männlichen und weiblichen Versuchstieren stark signifikant bei allen Messungen (Tag 15: $p < 0,001$; Tag 30: $p < 0,007$). Bei der Gruppe an Versuchstieren, welche eine zweite Zytokininjektion erhielten, wurde mit einem p-Wert von 0,529 kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern beobachtet.

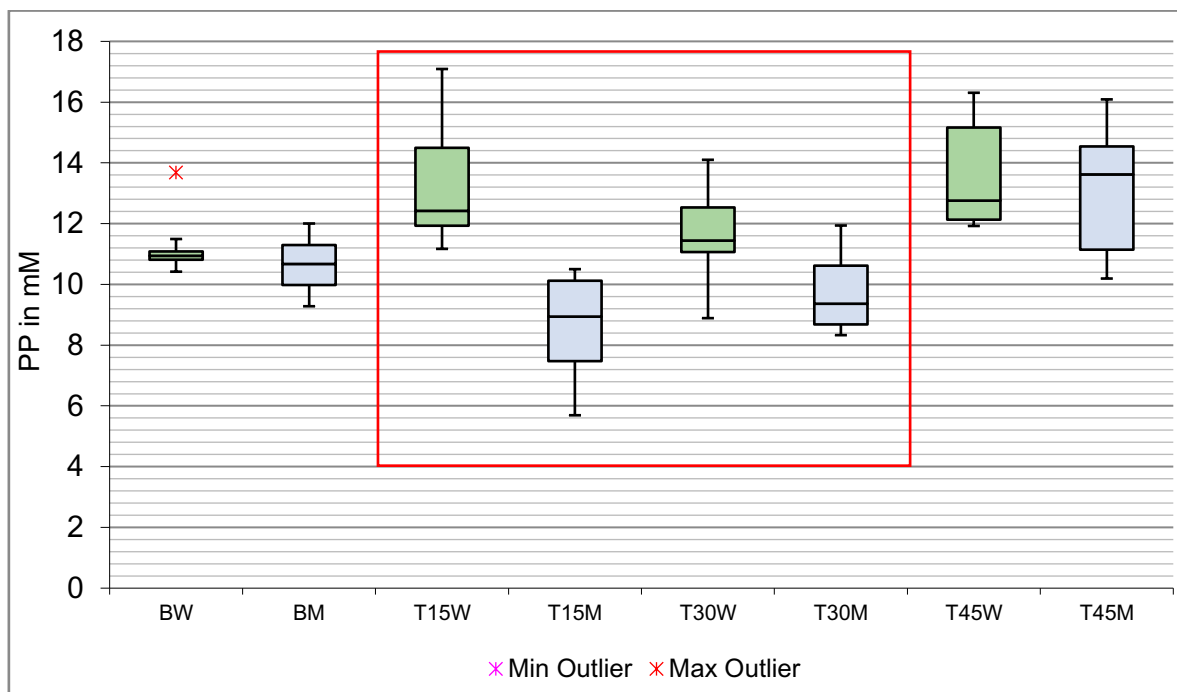


Abb.2: In dieser Abbildung wird die Veränderung der Polyphenole im Zeitverlauf dargestellt. B steht für Baseline, M für männlich, W für weiblich und T für Tag. Mit Tag 45 ist der 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion bezeichnet. Bei den Gruppen, welche durch den roten Rahmen markiert sind, konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.1.2 TAC

Bei der Messung der TAC im Serum der Versuchstiere konnte herausgefunden werden, dass an Tag 15 ($p = 0,028$) und 30 ($p = 0,021$) die Werte der weiblichen Versuchstiere signifikant höher als die der männlichen waren. Bei der zweiten Zytokininjektion gab es, analog zur PP-Messung mit einem p -Wert von 0,949 keinen signifikanten Unterschied. Es konnte auch bei den Messungen vor Zytokininjektion ($p = 0,754$) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

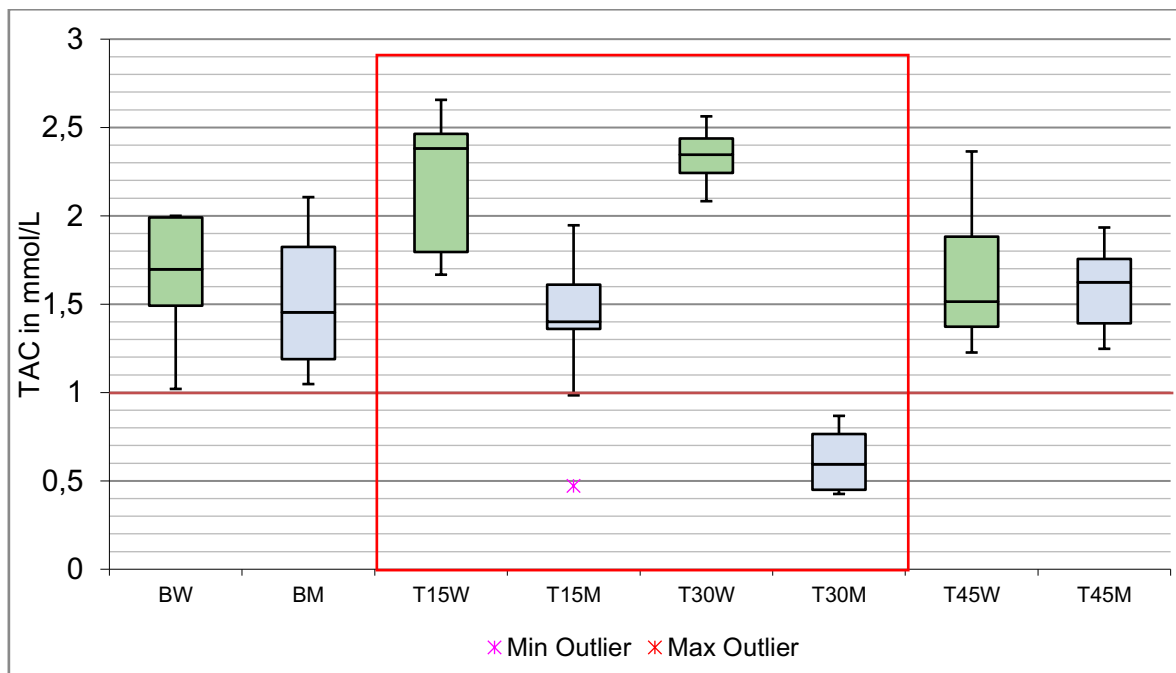


Abb.3: Dargestellt wird in dieser Abbildung der Zeitverlauf der Werte für die totale antioxidative Kapazität (TAC) während des Versuchs. Die rote Linie zeigt den Cut-Off Wert der TAC. B steht für Baseline, M für männlich, W für weiblich und T für Tag. Tag 45 bezeichnet den Tag 15 nach der zweiten Zytokininjektion. Der rote Kasten markiert jene Gruppen, welche sich signifikant in den Werten der TAC unterscheiden.

3.1.3 PLP

Anhand der immunhistochemischen Bestimmung von PLP konnte bei den Weibchen an Tag 15 nach Zytokininjektion signifikant weniger PLP – Verlust im Vergleich zu den Männchen festgestellt werden. Dies galt sowohl bei den Tieren ohne ($p = 0,004$), als auch den Tieren mit VD Supplementierung ($p = 0,028$). Auch innerhalb der Geschlechtergruppen zeigten sich signifikante Unterschiede des PLP - Verlusts. So hatten die Tiere, welche VD supplementiert bekamen bei den Männchen ($p = 0,028$) und den Weibchen ($p = 0,028$) signifikant weniger PLP – Verlust als die Tiere, welche kein VD verabreicht bekamen. Dies wird im Vergleich der histologischen Schnitte optisch verdeutlicht. In der Kontrollgruppe ohne Zytokininjektion und VD – Substitution blieb PLP konstant.

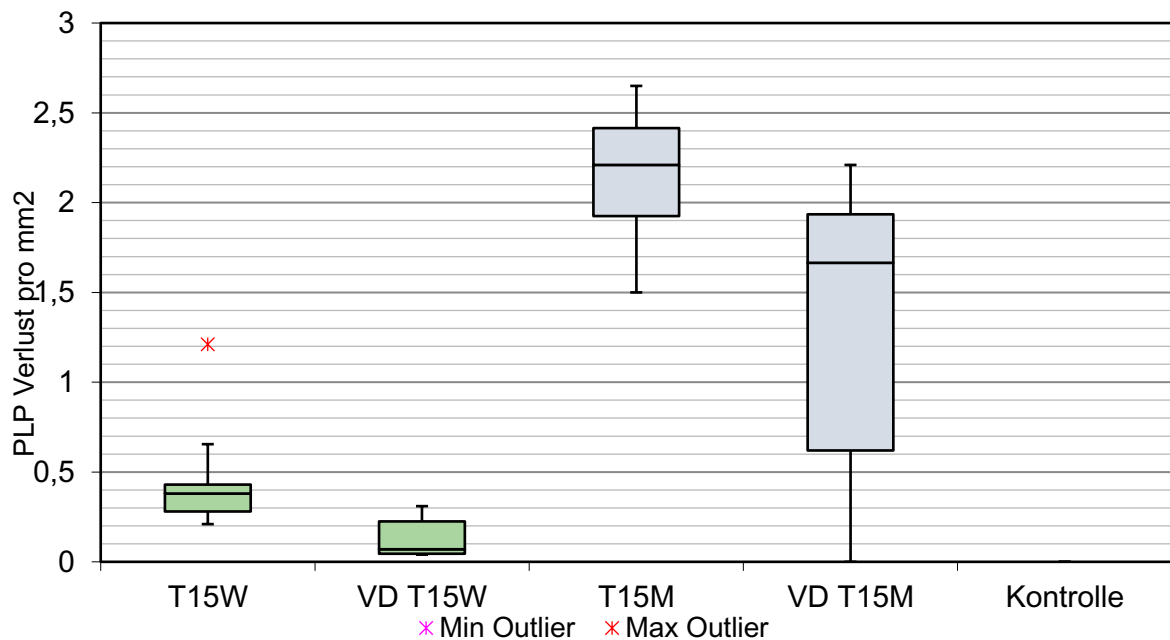


Abb. 4: In dieser Grafik wird der PLP-Verlust im Verhältnis zur Zeit dargestellt. B steht für Baseline, M für männlich, W für weiblich und T für Tag. Die Kontrollgruppe setzt sich aus Männchen und Weibchen zusammen.

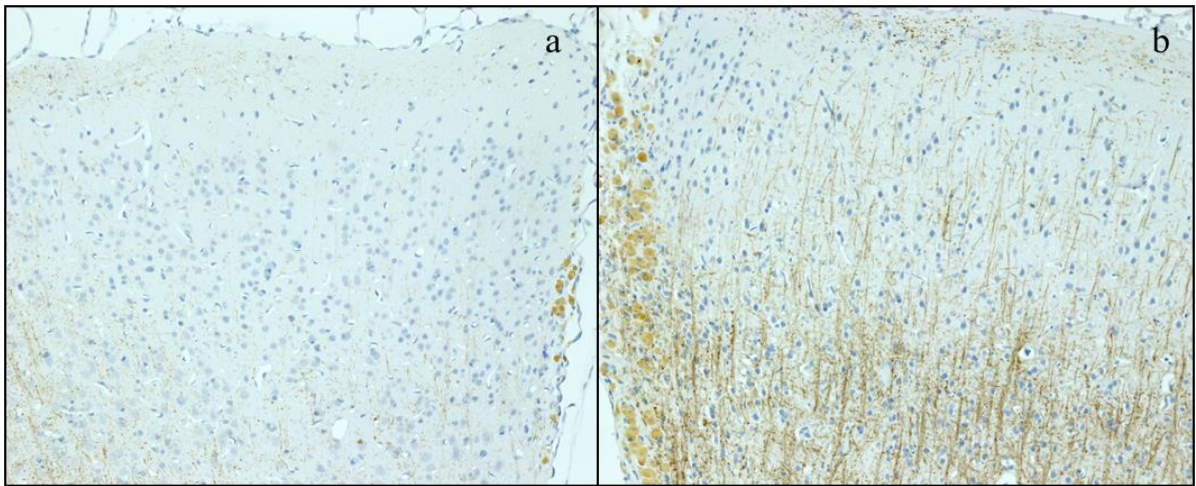


Abb. 5 a und b: Die Fotografien zeigen die immunhistochemisch gefärbten histologischen Schnitte der Versuchstiere in 20-facher Vergrößerung. Braun gefärbt ist hier das PLP. Die Zellkerne erscheinen durch die Gegenfärbung in blau. Der Bildausschnitt (a) stammt von einem Tier ohne und (b) von einem Tier mit VD Substitution.

3.2 Unterschiede der Tiere mit und ohne VD-Supplementierung

3.2.1 PP

Bei der Messung der PP im Serum bei Tieren ohne, im Vergleich zu Versuchstieren mit VD-Supplementierung konnten bei der ersten Zytokininjektion nach 15 ($p = 0,015$) und 30 Tagen ($p = 0,009$) signifikant weniger PP im Serum detektiert werden. Zu diesen Messzeitpunkten waren die Werte der gesunden Kontrollgruppe und den Tieren ohne VD-Supplementierung ebenfalls signifikant höher (Tag 15: $p = 0,024$; Tag 30: $p = 0,036$). An Tag 15 nach der zweiten Zytokininjektion war kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit und jener ohne VD-Supplementierung detektierbar ($p = 0,431$).

Ebenfalls betrachtet werden kann das Verhältnis der Werte der gesunden Kontrollgruppe und denen mit VD-Supplementierung. Zu den Messpunkten an Tag 30 ($p = 0,028$) und Tag 15 nach zweiter Injektion ($p = 0,035$) waren die Werte der VD-Gruppe signifikant höher. An Tag 15 nach erster Zytokininjektion ergab der Vergleich zwischen den Gruppen keine Signifikanz ($p = 0,121$) des höheren Werts der VD-Gruppe.

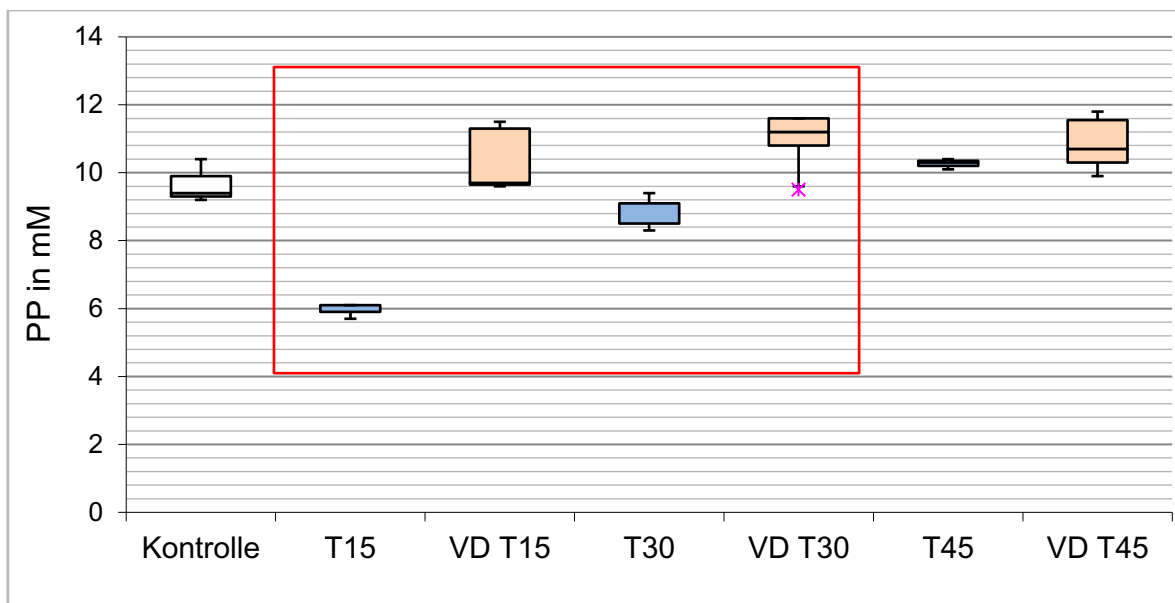


Abb. 5: Grafische Darstellung der PP in mM im Verhältnis zu den verschiedenen Zeitpunkten und der Kontrolltiere. T bedeutet Tag und VD bezeichnet die Versuchstiere mit VD-Supplementierung. Zur Vereinfachung ist mit T45 der 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion genannt. Der rote Kasten markiert die Gruppen, welche signifikante Unterschiede im Vergleich aufweisen.

3.2.2 TAC

Die TAC der VD-Gruppe war an beiden Zeitpunkten der Messung nach erstmaliger Zytokininjektion signifikant höher ($p = 0,016$). An Tag 15 nach zweiter Injektion konnte demgegenüber keine Signifikanz festgestellt werden ($p = 0,789$). Vergleicht man nun die Kontrollgruppe mit den Tieren ohne VD-Supplementierung, so ergibt sich zu allen Messpunkten eine signifikant höhere TAC der Tiere in der Kontrollgruppe (Tag 15: $p = 0,024$; Tag 30: $p = 0,021$; Tag 15 nach zweiter Injektion: $p = 0,035$). Signifikant höhere Werte der Kontrollgruppe als in der VD-Gruppe bestehen an Tag 15 nach erster ($p = 0,023$) sowie zweiter ($p = 0,009$) Zytokininjektion. An Tag 30 ist diese Differenz der Messwerte nicht signifikant ($p = 0,463$).

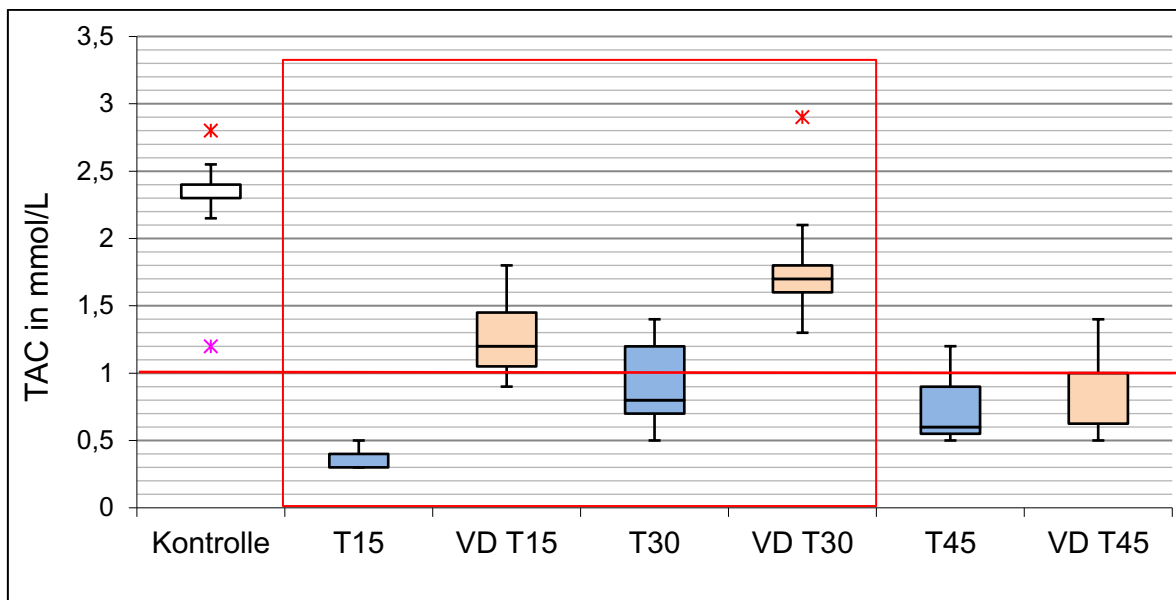


Abb. 6: Darstellung der totalen antioxidativen Kapazität im Zeitverlauf und im Verhältnis zu den Kontrolltieren. T steht für Tag, VD für die Tiere, welche VD bekommen haben. Tag 45 bezeichnet den 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion. Der rote Kasten kennzeichnet die Gruppen, bei denen ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Die rote Linie zeigt den Cut-Off-Wert für die TAC an.

3.3 Oxidative Stressmarker

3.3.1 Cu²⁺-ox-LDL

Zu allen Messzeitpunkten konnte signifikant mehr Cu²⁺-ox-LDL bei der Gruppe ohne, im Vergleich zur Gruppe mit VD-Supplementierung in der immunhistochemischen Färbung der Gewebeschnitte detektiert werden (Tag 15: $p = 0,002$; Tag 30: $p = 0,004$; Tag 15 nach zweiter Injektion: $p = 0,001$). Im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren wurde zu allen Messpunkten signifikant mehr Cu²⁺-ox-LDL bei den Tieren mit VD-Supplementierung festgestellt (Tag 15: $p = 0,003$; Tag 30: $p = 0,004$; Tag 15 nach zweiter Injektion: $p = 0,001$). Des Weiteren war der Wert der Versuchstiere ohne VD-Supplementierung im Vergleich zu der Kontrollgruppe an Tag 15 nach erster ($p = 0,015$) und nach zweiter Zytokininjektion ($p = 0,004$) signifikant höher. Lediglich an Tag 30 ($p = 0,898$) bestand hier kein signifikanter Unterschied.

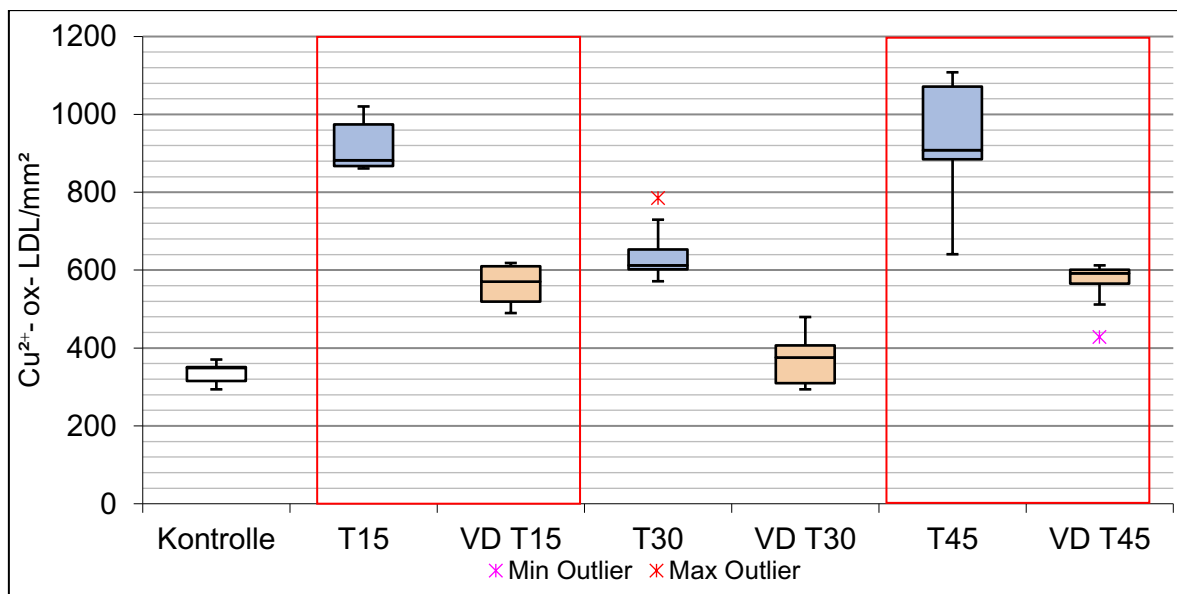


Abb. 7: Grafische Darstellung der Cu²⁺-ox-LDL zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Dies im Verhältnis zur Kontrollgruppe dargestellt. T steht für Tag. Mit Tag 45 ist Tag 15 nach der zweiten Zytokininjektion bezeichnet. Der Vorschub VD steht für Versuchstiere mit VD-Supplementierung.

3.3.2 HOCL-LDL

Des Weiteren wurde HOCL-LDL der Gewebeschnitte immunhistochemisch quantifiziert. Im Vergleich der Gruppen mit Zytokininjektion konnte festgestellt werden, dass HOCL-LDL bei den Versuchstieren mit VD-Supplementierung mit hoher Signifikanz weniger detektiert werden konnte als bei der Gruppe ohne VD (Tag 15: $p = 0,001$; Tag 30: $p = 0,0042$; Tag 15 nach zweiter Injektion: $p = 0,001$). Vergleicht man die gesunden Kontrolltiere mit der Gruppe ohne VD-Supplementierung konnte signifikant weniger HOCL-LDL an Tag 15 nach erster ($p = 0,005$) und nach zweiter ($p = 0,002$) Zytokininjektion bei der gesunden Kontrollgruppe detektiert werden. Im Vergleich dieser Gruppen an Tag 30 ergab dies mit $p = 0,609$ keine signifikante Differenz.

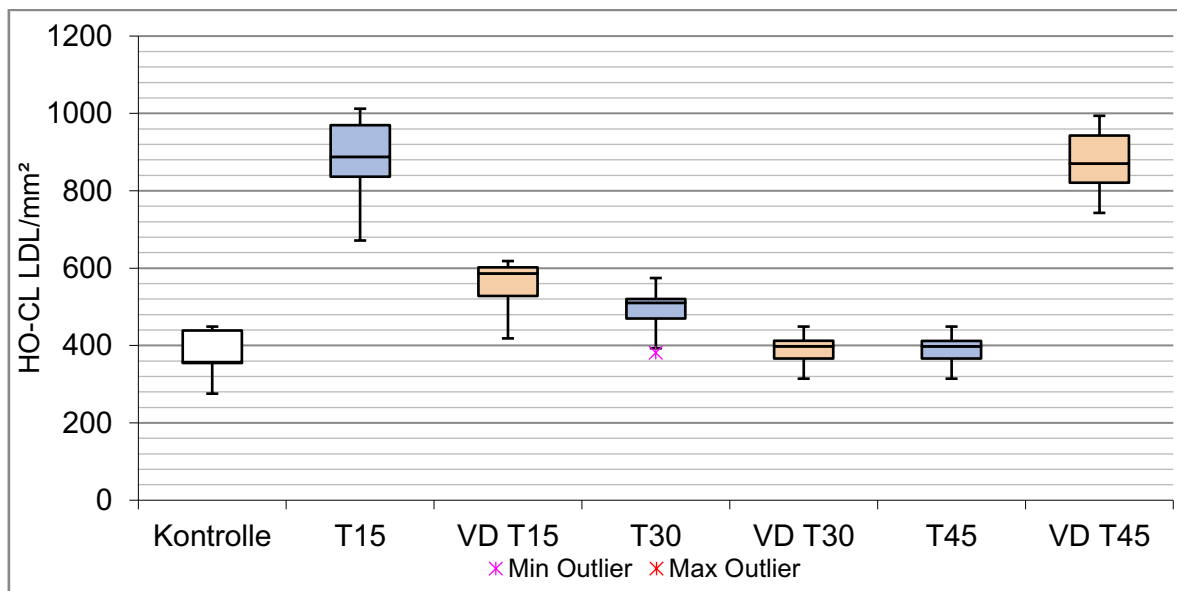


Abb. 8: Grafische Darstellung der HOCL-LDL-Werte der Versuchs- sowie Kontrolltiere, welche mit den verschiedenen Messzeitpunkten ins Verhältnis gesetzt werden. T steht für Tag, VD kennzeichnet die Gruppe mit VD-Supplementierung. Zur grafischen Vereinfachung wird in der Tabelle T45 für den 15. Tag nach der zweiten Zytokininjektion genannt.

4. Diskussion

4.1. Oxidative Kapazität

Wir konnten aufzeigen, dass Tiere mit VD Supplementierung, während des ersten ausgelösten Schubs, ein höheres Polyphenol Serumlevel und Serum TAC im Vergleich zu Versuchstieren ohne VD Supplementierung hatten. Im Gegensatz zu den Versuchstieren ohne VD, blieb die TAC während des ersten Schubes im Mittel immer über dem unteren Grenzwert von 1 mmol/L.

Wir zeigen außerdem, dass ein höherer Schutz vor Oxidation durch VD zu weniger Verlust von PLP führt. Somit wirkt eine höhere oxidative Kapazität protektiv auf Nervenzellen im Tiermodell der kortikalen Demyelinisierung. VD ist eine der vielversprechendsten Substanzen in Bezug auf seine antioxidative Wirkung bei MS. In dieser Studie wurden Polyphenole und TAC betrachtet. Diese Parameter werden neben VD auch durch andere Stoffe beeinflusst. Im Folgenden werde ich auf einige dieser anderen Stoffe eingehen, welche ein Potenzial im Einsatz bei MS zeigen.

Natürlich vorkommende Polyphenole besitzen nicht nur antioxidative Fähigkeiten, sondern verhindern auch Apoptose und Neurodegeneration (28). Zudem regulieren sie durch CYP-Enzyme einen Schritt der VD-Synthese mit (52). Polyphenole kommen beispielsweise in dem Grünteebestandteil Epigallocatechingallat (EGCG) vor. Auch Inhaltsstoffe der Pflanze Myrte besitzen synergistische Eigenschaften mit VD und wirken sich hemmend auf die Oxidation aus. Dies geschieht durch Inhibierung von proinflammatorischen Zytokinen und Reduktion von ROS (124). Das Vitamin B₇ (Biotin) ist in diesem Zusammenhang ebenfalls zu erwähnen. Es gibt Hinweise, dass sich die Gabe von Biotin hemmend auf die Krankheitsprogression der SPMS und PPMS auswirkt (125). Eine Hypothese besagt, dass sich Biotin als Cofaktor von Carboxylasen, auf zahlreiche Stoffwechselfvorgänge, durch die Bereitstellung von Energie und Förderung der Fettsäuresynthese, positiv auf Remyelinisierung auswirkt. Insbesondere konnten positive Auswirkungen auf die Muskelkraft, den Visus und Koordination festgestellt werden (126). In einer Metaanalyse konnte dagegen kein signifikanter Effekt von Biotin auf den Krankheitsverlauf von MS festgestellt werden (127). Auch sollte im Zusammenhang mit Biotin Nutzen und Gefahr abgewogen werden. Biotin interagiert mit bestimmten Laborparametern wie dem wichtigsten Laborparameter der Diagnostik des

Herzinfarktes Troponin. Darauf wurde auch in einem Rote Hand Brief von 2017 hingewiesen (31).

Der zweite Parameter, auf den ich im Folgenden näher eingehen werde, ist die TAC im Serum. Die TAC kann auf mannigfaltige Art und Weise beeinflusst werden. Sport hat eine antioxidative Wirkung beim Menschen. Laut einem systematischen Review werden antioxidative Parameter unabhängig von der Art, Dauer oder Intensität der Betätigung erhöht, wohingegen oxidative Parameter abnehmen. Die Aussage des Reviews ist dennoch mit Vorbehalt zu bewerten, da die hinzugezogenen Studien unterschiedliche Studienprotokolle verwendeten (128). In ersten Studien konnte eine Steigerung der TAC und Superoxid Dismutase durch *Nigella sativa* (Kreuzkümmel) festgestellt werden. Zudem ruft es eine Reduktion von TNF- α hervor. Um eine Konsequenz aus diesen Beobachtungen ziehen zu können, werden aufgrund der bislang unzureichenden Studienlage weitere Untersuchungen benötigt (129).

Bei diätetischer Einnahme antioxidativer Stoffe nimmt der Körper im Zustand moderater Mangelzustände diese vermehrt auf. Infolgedessen steigt die TAC im Serum an. Man geht davon aus, dass dies aufgrund von Erschöpfung der körpereigenen Reserven geschieht und der Körper bei oxidativer Dysbalance empfänglicher für antioxidative Nahrungsmittel ist (130).

Eine wichtige Rolle spielt auf molekularbiologischer Ebene der Zellfaktor NfkappaB. Neben VD gibt es Hinweise auf antiinflammatorische Wirkung von Vitamin B₃ durch Hemmung von NfkappaB. Um therapeutische Konsequenzen zu ziehen, werden weitere Studien benötigt, da die Evidenz zum jetzigen Zeitpunkt unzureichend ist. Im Falle von weiteren positiven Studien über die Effekte von Vitamin B₃ könnte eine Kombinationstherapie mit VD in Erwägung gezogen werden. Wir konnten beweisen, dass durch VD weniger Lipide oxidiert werden. Eine geringere Anzahl oxidiertes Lipide haben wiederum eine geringere Aktivierung von NfkappaB als Folge. NfkappaB wird neben VD, direkt durch Stoffe wie Kurkuma, EGCG und Knoblauch inhibiert. Darüber hinaus besteht bei hohen oxidativen Werten eine hemmende Wirkung auf NfkappaB durch Kaffee (126,131,132). Für die Wirkung von Phyto-pharmaka auf Nrf2 existiert bislang wenig Evidenz. Obwohl einige Studien durchgeführt wurden, haben sie meist ein hohes Risiko für Bias (133). Obwohl Nrf2 im engen Zusammenhang mit NfkappaB steht, sind erst weitere Studien notwendig, um fundierte Hypothesen über eine Wirkung im Zusammenhang mit VD und MS abzuleiten.

VD hat sowohl eine Wirkung auf die TAC, NFkappaB als auch auf oxidative Parameter. Daher kommen Stoffe, welche einen Einfluss auf diese Parameter haben, für eine Kombinationstherapie mit VD nach weiteren positiven Studien in Frage. Wichtig ist hier auch die Frage nach dem optimalen Zeitpunkt des Einsatzes von VD, da der protektive Effekt durch Erhöhung der TAC und PP in unserer Studie nur nach der ersten Zytokininjektion signifikant war.

4.2 Oxidative Parameter

In Bezug auf die Oxidation körpereigener Stoffe konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass Versuchstiere, die VD verabreicht bekamen, im gesamten beobachteten Zeitraum eine niedrigere Anzahl von Cu²⁺-ox-LDL und HOCL-LDL hatten. Anders als bei Betrachtung der oxidativen Kapazität, zeigte sich auch nach der zweiten Zytokininjektion bei den Versuchstieren mit VD signifikant weniger oxLDL. Daher war die antioxidative Wirkung von VD nicht nur auf den ersten Zeitraum von 30 Tagen beschränkt.

Durch verminderte Expression des Zellfaktors NFkappaB werden weniger proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Die Aktivierung des Faktors durch oxidierte Lipide löst weitere Mechanismen, die die Zellen schädigen aus. Die Unterdrückung dieses Signalwegs durch VD Supplementierung stellt einen Weg dar, wie entzündliche Aktivität bei MS reduziert werden kann. Dieser Mechanismus konnte in einer Studie der EAE bestätigt werden (134). Ein weiterer Punkt, der in Zusammenhang mit der Oxidation von körpereigenen Stoffen steht, ist die Ernährung. So triggert beispielsweise ein erhöhtes Lipidserumlevel die mitochondriale ROS Produktion. Durch Imbalance der antioxidativen Enzyme kommt es zu DNA- Schäden und Lipidoxidation. Diese Mechanismen führen in Folge zu einer systemischen Entzündungsreaktion und einer durchlässigeren BHS. Neben anderen Zellen begünstigt dies auch den Übertritt von autoreaktiven T-Zellen ins Gehirn. Bisher wurden Studien über oxidierte Lipide und fettreicher Ernährung mit Fokus auf Erkrankungen mit kognitiven Einschränkungen wie die vaskuläre oder Alzheimer Demenz durchgeführt. Es wird im Zusammenspiel auch klar, dass ein weiterer Fokus auf die Zusammenhänge von lipidreicher Ernährung und MS sinnvoll ist (135,136). Insbesondere wäre hier interessant, ob die antioxidative Wirkung von VD präventiv oder/und therapeutisch eingesetzt werden kann.

In der SOLAR – Studie konnte festgestellt werden, dass VD Substitution im Vergleich zu Placebo zu weniger Läsionen von MS PatientInnen in der MRT führt (137). Zum jetzigen Zeitpunkt ist es nicht möglich valide Aussagen aufgrund von MRT – Bildern in Bezug auf kortikale Läsionen im hier verwendeten Tierversuch zu treffen. In Zukunft bei verbesserten technischen Möglichkeiten sollte dies ein Bestandteil von EAE Fragestellungen sein. Der klinische Verlauf sowie die Diagnostik beim Menschen könnten dadurch besser analysiert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist es in der EAE an Primaten gelungen, 65% der histologisch ermittelten kortikalen Läsionen in vivo mittels ultrahochauflösender MRT zu detektieren (138).

Die Therapie mit Interferon- β bei SPMS ist seit Jahren fester Bestandteil der evidenzbasierten Behandlung. Es wirkt sich reduzierend auf die Schubrate und positiv auf die Kognition von MS PatientInnen aus. Auf laborchemischer Ebene wirken VD und Interferon- β synergistisch auf die Immunmodulation (110,139,140).

Interessant ist der Vergleich zwischen Personen mit und ohne erhöhtem genetischen Risiko MS zu entwickeln. Menschen mit erhöhtem Risiko haben bei VD-Supplementierung einen signifikant höheren VD-Serumspiegel im Vergleich zur anderen Gruppe (14). Die aktuelle Empfehlung der Leitlinie für MS besagt, dass bei MS PatientInnen mit normwertigen VD-Serumwerten eine Substitution erwogen werden kann (31). Eine Supplementation bei VD – Mangelzuständen wirkt sich bei richtiger Dosierung positiv auf das Outcome bei MS aus (110).

4.3 Marker der antioxidativen Therapie

Möchte man den Effekt von VD auf den Organismus messen, so ist die quantitative Erhebung des Serumlevels von VD allein nicht ausreichend, um alle Effekte zu detektieren. Daher haben wir in diesem Studiendesign auf eine Kombination mehrerer Parameter gesetzt. Mit Messung verschiedener Parameter, welche in Zusammenhang mit dem oxidativen Status stehen, können molekularbiologischen Vorgänge, die sich durch VD verändern, betrachtet werden. Einerseits ermöglicht dies die Erforschung der Vorgänge selbst und hilft andererseits dabei, eine wirksame Dosierung von VD herauszufinden (130).

Die TAC ist ein etablierter Parameter, um die antioxidative Aktivität zu messen. Sie kann isoliert betrachtet keine valide Aussage über den gesamten oxidativen Status treffen, da sie durch zahlreiche Umwelt- und physiologische Faktoren beeinflusst wird. Sinnvoll ist daher eine Kombination aus Ernährungs-, Entzündungsparametern sowie der Zusammensetzung des Darmmikrobioms. Die Aussage über den individuellen Zustand des oxidativen Systems beruht durch die Betrachtung mehrere Parameter auf einer breiteren Basis. Im Zusammenhang mit Erkrankungen des ZNS kommt hier limitierend hinzu, dass die etablierten Methoden meist TAC im Serum messen. Durch die BHS könnte der oxidative Status im ZNS von dem Gemessenen divergieren (130). Polyphenole wurden in unserer Studie ebenfalls im Serum gemessen. Daraus ergeben sich ähnliche Limitationen wie bei Messung der TAC.

Die Bestimmung der oxidierten Lipide mittels immunhistochemischer Verfahren kann bereits stattgefunden chemische Reaktionen detektieren. Mit der Detektion der zwei Moleküle Cu^{2+} -LDL und HOCL-LDL werden zwei Stoffe mit jeweils unterschiedlichen Wirkungen ermittelt. OxLDL wirken nur in hoher Konzentration pro apoptotisch. Da die Schwelle der schädlichen Dosis für Myelinscheiden nicht bekannt ist, wurde das Ausmaß der Demyelinisierung mittels PLP-Verlust ermittelt. Eine Stärke dieser Studie ist die Kombination der Evaluation oxidativer Parameter sowohl im Serum, durch die Messung der TAC und Polyphenole, als auch im ZNS durch immunhistochemische Darstellung von oxidierten Lipiden.

Histologische Methoden zur Evaluation des oxidativen Stresses sind ein wichtiger Bestandteil der Forschung. In der klinischen Diagnostik haben sie jedoch keine Relevanz, da sie nicht am lebenden Organismus durchgeführt werden. Alternativ kann die Messung oxidierter Moleküle im Serum angewandt werden. Die Messung des oxidativen Status ist auch in der klinischen Anwendung wichtig, um einer Überdosierung vorzubeugen. Denn viele antioxidative Stoffe wirken in hoher Dosierung oxidativ (130).

Durch die Komplexität der Beurteilung der oxidativen Kapazität in einem Organismus, ist eine individualisierte Herangehensweise sinnvoll. Im Falle von VD könnten vor allem Serumparameter herangezogen werden. Ein Vorteil von individuellen Dosierungen ist, dass auch auf Männer und Frauen getrennt eingegangen werden kann, da wir wissen, dass es signifikante Unterschiede im Stoffwechsel mit VD gibt. Ein anderer Vorteil ist, dass das Risiko für Nebenwirkungen durch regelmäßige Kontrollen reduziert werden kann. Im Zusammenhang mit MS ist in Zukunft zu klären, was oxidative Parameter im Serum über den Zustand im Gehirn aussagen.

4.4 Nebenwirkungen und Dosierung von VD

Es gibt trotz der vielversprechenden Ansätze der Wirkung von VD auf MS auch gegenteilige Hinweise. In klinischen Studien mit MS PatientInnen wurde kein besseres klinisches Outcome anhand der EDSS und der Schubhäufigkeit im Vergleich zu Placebo gemessen. Trotzdem war ein synergistischer Anstieg von VD und antiinflammatorischen Zytokinen feststellbar (110,141). In unserer experimentellen Studie konnten keine klinischen Messinstrumente hinzugezogen werden, da sich kortikale Demyelinisierung im Versuchstier nur sehr flüchtig und unspezifisch zeigt. Die Erkenntnisse der oben genannten klinischen Studien betonen allerdings die Wichtigkeit der Beurteilung durch ein Zusammenspiel von klinischen und laborchemischen Messparametern, um eine Auswirkung auf MS zu beurteilen. Dies ist ein wichtiger Aspekt, der in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte.

Eine relevante Nebenwirkung von VD ist die Hyperkalzämie. An vielen Zellen, unter anderem den Lymphozyten, wirkt Kalzium als second messenger. Es wirkt unter anderem auf dem Signalweg der Proteinkinase mTOR (mechanistic target of Rapamycin – Signalweg). Meist wird mTOR in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen, dem Alterungsprozess oder Tumoren gebracht. Doch wird neben seiner zentralen Rolle im Zellwachstum durch die Aktivierung des oben genannten Signalwegs auch die Immunkaskade ausgelöst. Infolgedessen kommt es zum Wachstum und zur Proliferation von T-Zellen (142,143). Durch die aktivierten T-Zellen steigen proinflammatorische Zytokine an und verstärken so die Krankheitsaktivität bei MS (144). Obwohl es für die weitere Erforschung eines Nutzens der VD – Therapie wichtig ist, diese Nebenwirkung zu betrachten, tritt eine Hyperkalzämie laut aktuellem Stand selten auf (145).

Die Kenntnis der Dosierung von Substanzen, die dem Körper künstlich zugeführt werden, ist für die systematische Erforschung der Wirkung essenziell. Im Falle von VD ist die Dosierung aktuell Gegenstand von wissenschaftlichen Diskussionen. Die Dosierungsangaben werden überwiegend in niedrige, moderate und hohe Dosen unterteilt. In der Literatur existieren dazu keine einheitlichen Werte; sie werden meist innerhalb einer Studie festgelegt. Bei einer Dosierung von 500 – 2000 IU/d kann von einer therapeutischen Dosis mit protektiver Wirkung vor MS ausgegangen werden. In den dazugehörigen Studien wird dies als moderate Dosis bezeichnet (144,145). Eine Langzeitstudie mit hospitalisierten PatientInnen bewertet eine Dosis zwischen 5000 und 50000 IU/d als sicher (146).

Die Wichtigkeit klarer Dosierungsempfehlungen wird deutlich, wenn man den Trend einer in Eigenregie eingenommenen ultrahochdosierten Therapie mit VD unter MS PatientInnen betrachtet. In Internetforen wird dies als Heilung bei MS angepriesen, ohne sich dabei auf evidenzbasierte und wissenschaftliche Informationen zu stützen. In der aktuell laufenden Studie, welches sich auf das Coimbra Protokoll stützt, werden ProbandInnen mit MS bis zu 1000 IU/d/kg KG VD verabreicht. Die Studie stützt sich auf die Hypothese der Ersteller des Coimbra Protokolls, dass Autoimmunerkrankungen durch eine VD Resistenz hervorgerufen werden können (147). Vergleichbare Studien, welche eine Aussage über eine ähnlich hohe Dosierung treffen, existieren bislang nicht. Laut Empfehlung der aktueller Leitlinien sollte von einer hochdosierten Therapie mit VD aufgrund der potenziellen Nebenwirkungen abgesehen werden (31).

Eine Kombinationstherapie mehrerer Substanzen zielt auf eine Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen ab. Daneben kann es durch synergistische Wirkmechanismen zu einer Effektivitätssteigerung einer Therapie kommen (148). Für eine Kombinationstherapie von VD und anderen Substanzen existieren bereits einige wenige Studien. Beispielsweise könnte die Kombination von niedrig dosiertem Vitamin A und VD vielversprechend sein. Durch die niedrige Dosis könnte das Risiko, dass toxischen Effekte im Rahmen der Vitamin A Supplementierung auftreten, verringert werden. Berichtet wird von toxischen Effekten wie Leberversagen, psychiatrische Auffälligkeiten und zerebrale Ödeme berichtet (126).

Eine weitere relevante Fragestellung zum Einsatz von VD ist jene, zu welchem Zeitpunkt es optimalerweise verabreicht werden sollte. Darüber hinaus ist es wichtig zu wissen, welche Effekte VD im zeitlichen Verlauf im Zusammenhang mit MS zeigt. Aufgrund der unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgänge in unterschiedlichen Phasen der MS erscheint die gesonderte Betrachtung präventiver und therapeutischer Anwendung sinnvoll. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eine schwache Tendenz zu einer höheren Effektivität im frühen Krankheitsverlauf, da TAC und PP lediglich nach der ersten Zytokininjektion signifikant höher sind als die der Vergleichstiere. Daher empfiehlt sich eine priorisierte Untersuchung von VD im Zusammenhang mit frühen Krankheitsstadien oder der Prävention. Generell gewinnt die Prävention von Erkrankungen an Bedeutung. Aufgrund der starken Nebenwirkungen der Medikamente, die bei MS eingesetzt werden, versucht die neue Leitlinie Handlungswege aufzuzeigen, wie Therapien wieder beendet werden könnten (31). Auch diese Phase, im Sinne der tertiären Prävention könnte für den Einsatz von VD interessant sein.

Das hier verwendete Modell der kortikalen Demyelinisierung bildet wichtige Charakteristika der progredienten MS ab. Daher lassen sich Aussagen für die schubförmige MS besser anhand anderer Studien treffen.

Die Forschung an Tiermodellen wird die Frage nach einer adäquaten Dosierung und dem geeigneten Zeitpunkt der Verabreichung aufgrund der unterschiedlichen Stoffwechselfvorgänge nicht beantworten können. Die Ratten in unserer Studie wurden ab Entwöhnung von den Muttertieren mit 400 IU/Woche gefüttert. Zur genaueren Bestimmung wurden die Ausgangswerte von VD im Serum gemessen. Für die Frage nach Dosierung werden weitere Studien mit menschlichen ProbandInnen benötigt.

4.5 Geschlechterunterschiede

Ein signifikanter Unterschied im Zusammenhang mit der antioxidativen Kapazität zwischen Männchen und Weibchen bestand in unserem Versuch an Tag 15 nach der ersten Zytokininjektion. Bei den weiblichen Versuchstieren konnten zu diesem Zeitpunkt sowohl höhere antioxidative Parameter gemessen werden als auch weniger PLP-Verlust. Da sich die Ausgangswerte von VD bei Männchen und Weibchen nicht signifikant unterschieden, beruhen die erhöhte antioxidative Kapazität sowie der Schutz vor Demyelinisierung auf divergierende Verwertung des supplementierten VD.

Diesem Unterschied könnten mehrere Mechanismen zugrunde liegen. Die Aufnahme von VD könnte bei Weibchen effizienter erfolgen als bei männlichen Tieren. Es könnte auch sein, dass bei gleicher Effektivität der VD-Aufnahme eine höhere Sensibilität der VDR auf VD bei Weibchen im Vergleich zu Männchen besteht. Daraus folgend würde sich die Effektivität von VD erhöhen.

Betrachtet man den PLP-Verlust gesondert, so fällt auf, dass alle weiblichen Versuchstiere über den gesamten Zeitraum signifikant weniger PLP-Verlust hatten. Es konnte eine stärkere Signifikanz bei den Versuchstieren ohne VD Supplementation beobachtet werden. Dieser Unterschied könnte sich durch die niedrigeren VD-Spiegel bei Männchen erklären lassen. Unser Befund, dass Weibchen besser auf VD ansprechen als Männchen, deckt sich mit Ergebnissen einer Studie, in der herausgefunden wurde, dass Frauen in Sommermonaten weniger häufig als Männer erkranken. Im Winter kehrt sich dieser Effekt um (117).

Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die bisherigen Beobachtungen bei MS im Zusammenhang mit dem Geschlecht. Denn Frauen erkranken zwar häufiger als Männer. Bei Männern besteht jedoch ein höheres Risiko eines fulminanten und stärker einschränkenden Verlaufs (119). Wir konnten auch beweisen, dass VD die gemessenen Parameter in unserem experimentellen Aufbau bei beiden Geschlechtern positiv beeinflusst. Das unterschiedliche Ansprechen unterstreicht hier wiederum den Nutzen einer individualisierten Therapie.

4.6 Ethische Fragen des Tiermodells

Es ergibt sich die ethische Frage nach Alternativen für die Forschung an Lebewesen. Eine zukünftige Möglichkeit könnten Organoide des Gehirns sein. Diese hätten mehrere Vorteile: Es würde die Forschung an Tieren teilweise überflüssig machen. Zudem würden Organoide aus menschlichen Zellen eine höhere Vergleichbarkeit mit menschlichen Mechanismen aufweisen. Dies würde zudem einen weiteren Nachteil von Forschung an Tieren umgehen.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind Organoide des Gehirns als eine Gruppe von Zellen, welche sich selbständig in verschiedene Subeinheiten organisieren, definiert. Den Ursprung stellen meist menschliche pluripotente Stammzellen dar. Die Subeinheiten bilden über neuronale Verbindungen ein Netzwerk aus. Somit bilden sie Anteile eines fetalen Gehirns nach. Hieraus wiederum ergeben sich Forschungsmöglichkeiten für frühe neuronale Entwicklungsvorgänge sowie Pathologien in diesen Stadien. Insbesondere die Auswirkung von Viren auf die Entwicklung wird derzeit untersucht. Zudem wurde ein Modell entwickelt, an dem es möglich ist Störungen der Myelinisierung quantitativ zu untersuchen (149–151).

In Zukunft könnte die Forschung an Organoiden des Gehirns auch für MS möglich sein. Essenziell dafür ist zum einen die Reproduzierbarkeit, um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. Zum anderen existiert die Herausforderung der Versorgung des Organoides mit Sauerstoff und Nährstoffen, da keine Blutgefäße vorhanden sind. Hier gibt es bereits erste Lösungsansätze. In einem Versuch wurden Organoide erfolgreich in Gehirne von Mäusen implantiert. Dabei sind Blutgefäße der Mäuse in das implantierte Organoid eingesprossen und konnten es so versorgen (152,153).

Bei näherer Betrachtung stellen sich bei Verwendung von Organoiden des Gehirns neue ethische Fragestellungen. Wie kann die Wissenschaft damit umgehen, falls die Organoide

ein Bewusstsein entwickeln? Wie würde man dies detektieren? Welche Konsequenzen würde man daraus ziehen? Es empfiehlt sich hier internationale Standards zu etablieren. Anhaltspunkte könnten hier bereits etablierte Standards der Forschung an Tieren oder Menschen bieten (150,151). In Zukunft könnte die Verwendung von Organoiden im Zusammenhang mit MS und der Auswirkung von VD – Supplementierung bei Induktion einer kortikalen Demyelinisierung eine Rolle spielen. Die Frage nach einer präventiv oder therapeutisch schützenden Funktion von VD bei MS könnte so weiter untersucht werden. Auch könnte der therapeutische Einsatz von Organoiden in Zukunft eine Rolle spielen. Ein anderer Ansatz wäre, abgestorbenes Gewebe mit Organoiden aus körpereigenen Stammzellen zu substituieren.

Das hier verwendete Tiermodell bildet nahezu alle histopathologischen Veränderungen aus, welche in Autopsien von Menschen mit progredienter MS detektiert werden können. Ein Vorteil dieses Modells ist auch die Persistenz der Pathologien über 30 Tage hinaus. Die längere Dauer der Erkrankung im Vergleich zu anderen etablierten Tiermodellen ist eine Stärke. Ein genereller Vorteil der Forschung an Tiermodellen ist die engmaschigere und zeitlich planbare histologische Evaluation. Histologische Lebenduntersuchungen am Gehirn sind bislang nicht möglich. Im Zusammenhang mit VD ist ein weiterer Vorteil der Tierversuche die standardisierten Umweltbedingungen, da die Tiere, neben der Verabreichung von VD, der gleichen Menge an Sonnenlicht ausgesetzt werden können. In diesem Zusammenhang ist es auch wichtig zu erwähnen, dass MS als eine Erkrankung, die sich nicht auf das Gehirn beschränkt, besser in einem Organismus als dem isolierten Gehirn oder Organoid des Gehirns untersuchen lässt.

Die Remyelinisierung kann anhand anderer Modelle wie dem Cuprizone-Mausmodell oder an Zebrafischen besser untersucht werden. Diese Eigenschaft ist für die momentane Erforschung von RRMS von größerer Bedeutung als bei progredienten Formen. Im Sinne des besseren Verständnisses der pathophysiologischen Vorgänge ist die Betrachtung der Remyelinisierung bei progredienten Formen der MS ebenfalls von zukünftigem Interesse. MS ist eine Erkrankung, welche nur beim Menschen bekannt ist. Daher stellt die Induktion der MS in Tiermodellen einen höchst künstlichen Eingriff in den Organismus dar. Die Forschung an Tieren in Grundlagenforschung stellt einen wichtigen Baustein dar. Für konkrete Aussagen über Therapien und Vorgänge im menschlichen Organismus können Tierstudien lediglich einen Anhaltspunkt geben. Daher sind in Zukunft weitere Studien mit Menschen wichtig.

5. Fazit

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die schützende Wirkung von VD vor kortikaler Demyelinisierung und der Oxidation körpereigener Stoffe im hier verwendeten Tiermodell. Dies zeigt sich besonders im Zeitraum von 30 Tagen nach der ersten Zytokininjektion.

Die Erkenntnisse dieser Studie legen nahe, dass VD im weiblichen Organismus besser wirkt. Männer erkranken dahingegen häufiger an progredienter MS und profitieren somit in Summe mehr vom Schutz vor Demyelinisierung. Über individuelle Bestimmung der oxidativen Parameter und des VD Spiegels könnten auf den einzelnen Menschen angepasste Dosierungen bestimmt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich VD Supplementierung in dem hier verwendeten Rattenmodell protektive Auswirkungen zeigt. Die schützenden Wirkungen beziehen sich vor allem auf ein elementares Charakteristikum der progredienten MS – dem Myelinverlust des Kortex.

Für die Frage nach therapeutischem oder präventivem Nutzen von VD sind weitere Studien notwendig. Zum einen sind die zu Grunde liegenden Mechanismen der progredienten MS noch nicht in Gänze bekannt. Zum anderen werden klinische Studien benötigt, um die optimale Dosis und Zeitpunkt für den Einsatz von VD zu bestimmen.

6. Literaturverzeichnis

1. Söllner. DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS. 2014;4–9.
2. Cotsapas C, Mitrovic M, Hafler D. Multiple sclerosis. 1st ed. Vol. 148, Handbook of Clinical Neurology. Elsevier B.V.; 2018. 723–730 p.
3. Vardi G, Merrick J. Neurological disorders. Public health challenges. J Policy Pract Intellect Disabil [Internet]. 2007;4(3):215–215. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1741-1130.2007.00122.x>
4. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. Mult Scler [Internet]. 2020;26(14):1816–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1352458520970841>
5. Tobore TO. Towards a comprehensive etiopathogenetic and pathophysiological theory of multiple sclerosis. Int J Neurosci [Internet]. 2020;130(3):279–300. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2019.1677648>
6. Correale J, Gaitán MI, Ysraelit MC, Fiol MP. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. Brain [Internet]. 2016;aww258. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aww258>
7. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, et al. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: The radiologically isolated syndrome. Neurology [Internet]. 2009;72(9):800–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000335764.14513.1a>
8. George IC, El Mendili MM, Inglese M, Azevedo CJ, Kantarci O, Lebrun C, et al. Cerebellar volume loss in radiologically isolated syndrome. Mult Scler [Internet]. 2021;27(1):130–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1352458519887346>
9. Lorscheider J, Buzzard K, Jokubaitis V, Spelman T, Havrdova E, Horakova D, et al. Defining secondary progressive multiple sclerosis. Brain [Internet]. 2016;139(9):2395–405. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/aww173>
10. DGN / KKNMS Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS | Enhanced Reader [Internet]. [cited 2020 Mar 11]. Available from: moz-extension://fd5ae8c4-39cb-4504-96a5-78edb16cc48f/enhanced-reader.html?openApp&pdf=http%3A%2F%2Fwww.kompetenznetz-multiplesklerose.de%2Fwp-content%2Fuploads%2F2016%2F02%2Fdgn-kknms_ms-ll_20140813.pdf
11. Masuhr. Multiple Sklerose. In: Duale Reihe Neurologie. Georg Thieme Verlag KG; 2013. p. 276–7.
12. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet [Internet]. 2013;45(11):1353–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2770>
13. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. Lancet Neurol [Internet]. 2015;14(4):406–19. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(14\)70305-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(14)70305-9)

14. Mimpen M, Rolf L, Poelmans G, van den Ouweland J, Hupperts R, Damoiseaux J, et al. Vitamin D related genetic polymorphisms affect serological response to high-dose vitamin D supplementation in multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(12):e0261097. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0261097>
15. Bach J-F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* [Internet]. 2002;347(12):911–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra020100>
16. Langer-Gould A, Wu J, Lucas R, Smith J, Gonzales E, Amezcua L, et al. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and multiple sclerosis susceptibility: A multiethnic study. *Neurology* [Internet]. 2017;89(13):1330–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000004412>
17. Rice EM, Thakolwiboon S, Avila M. Geographic heterogeneity in the association of varicella-zoster virus seropositivity and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2021;53(103024):103024. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2021.103024>
18. Wallin MT, Culpepper WJ, Campbell JD, Nelson LM, Langer-Gould A, Marrie RA, et al. The prevalence of MS in the United States: A population-based estimate using health claims data. *Neurology* [Internet]. 2019;92(10):e1029–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000007035>
19. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2011;82(10):1132–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.2011.240432>
20. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* [Internet]. 1995;47(4–5):425–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00033-x](http://dx.doi.org/10.1016/0301-0082(95)00033-x)
21. Magalhaes S, Pugliatti M, Riise T, Myhr K-M, Ciampi A, Bjornevik K, et al. Shedding light on the link between early life sun exposure and risk of multiple sclerosis: results from the ENVIMS Study. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2019;48(4):1073–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/ije/dyy269>
22. Tremlett H, Zhu F, Ascherio A, Munger KL. Sun exposure over the life course and associations with multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2018;90(14):e1191–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000005257>
23. Rhead B, Bäärnhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, et al. Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurol Genet* [Internet]. 2016;2(5):e97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/nxg.0000000000000097>
24. Simpson S Jr, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby A-L, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in MS. *Ann Neurol* [Internet]. 2010; Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.22043>
25. Nali LH, Olival GS, Sousa FTG, de Oliveira ACS, Montenegro H, da Silva IT, et al. Whole transcriptome analysis of multiple Sclerosis patients reveals active inflammatory profile in re-

- lapsing patients and downregulation of neurological repair pathways in secondary progressive cases. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2020;44(102243):102243. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2020.102243>
26. Benedict RHB, Tomic D, Cree BA, Fox R, Giovannoni G, Bar-Or A, et al. Siponimod and cognition in secondary progressive multiple sclerosis: EXPAND secondary analyses. *Neurology* [Internet]. 2021;96(3):e376–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000011275>
 27. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus interferon beta-1a in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2017;376(3):221–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1601277>
 28. Mimura LAN, Chiuso-Minicucci F, Fraga-Silva TFC, Zorzella-Pezavento SFG, França TGD, Ishikawa LLW, et al. Association of myelin peptide with vitamin D prevents autoimmune encephalomyelitis development. *Neuroscience* [Internet]. 2016;317:130–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.053>
 29. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(9):545–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3871>
 30. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D.ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2018;25(2):215–37.
 31. Hemmer BD. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose , Neuromyelitis-optica- Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen Deutschen Gesellschaft für Neurologie Beteiligte Fachgesellschaften und Organisationen. 2021;
 32. Wiendl H, Gold R, Berger T, Derfuss T, Linker R, Mäurer M, et al. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG): position statement on disease-modifying therapies for multiple sclerosis (white paper). *Ther Adv Neurol Disord* [Internet]. 2021;14:175628642110396. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/17562864211039648>
 33. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2017;114(40):10719–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1711233114>
 34. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* [Internet]. 2011;479(7374):538–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10554>
 35. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple sclerosis: Mechanisms and immunotherapy. *Neuron* [Internet]. 2018;97(4):742–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>
 36. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, et al. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2011;134(Pt 9):2755–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awr182>
 37. Hoch L von. Struktur-Funktionsanalyse des Myelin Oligodendrozyten Glykoproteins durch Gen-Ablation mittels homologer Rekombination. 2004;

38. Dal-Bianco A, Grabner G, Kronnerwetter C, Weber M, Höftberger R, Berger T, et al. Slow expansion of multiple sclerosis iron rim lesions: pathology and 7 T magnetic resonance imaging. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2017;133(1):25–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1636-z>
39. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Brück W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica*. 2016;133(1):13–24.
40. Eshaghi A, Marinescu RV, Young AL, Firth NC, Prados F, Jorge Cardoso M, et al. Progression of regional grey matter atrophy in multiple sclerosis. *Brain* [Internet]. 2018;141(6):1665–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awy088>
41. Elliott C, Wolinsky JS, Hauser SL, Kappos L, Barkhof F, Bernasconi C. Slowly expanding / evolving lesions as a magnetic resonance imaging marker of chronic active multiple sclerosis lesions. 2019;1915–25.
42. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. Vol. 14. Lancet Publishing Group; 2015.
43. Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MBH. Cell signaling pathways in the neuroprotective actions of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: implications for neurodegenerative diseases: Signaling pathways in EGCG neuroprotection. *J Neurochem* [Internet]. 2004;88(6):1555–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02291.x>
44. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res* [Internet]. 2017;39(1):73–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
45. Leden V, Yauger RE, Khayrullina YJ, Byrnes G. Central Nervous System Injury and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase: Oxidative Stress and Therapeutic Targets. *Journal of Neurotrauma*. 2017;34(4):755–64.
46. Azcoitia I, Barreto GE, Garcia-Segura LM. Molecular mechanisms and cellular events involved in the neuroprotective actions of estradiol. Analysis of sex differences. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2019;55.
47. Mossakowski AA, Pohlan J, Bremer D, Lindquist R, Millward JM, Bock M, et al. Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2015;130(6):799–814. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1497-x>
48. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*. 2012;135(3):886–99.
49. Buccellato FR, D’Anca M, Fenoglio C, Scarpini E, Galimberti D. Role of oxidative damage in Alzheimer’s disease and neurodegeneration: From pathogenic mechanisms to biomarker discovery. *Antioxidants (Basel)* [Internet]. 2021;10(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox10091353>
50. Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, et al. Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective

- study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2018;17(10):870–84. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30245-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30245-X)
51. Hochmeister S. Overview of promising rat models for cortical lesion research- 2006 until now. *J Neurol Neuromedicine* [Internet]. 2018;3(5):8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.29245/2572.942x/2018/5.1218>
 52. Kutzelnigg A, Lassmann H. Cortical demyelination in multiple sclerosis: A substrate for cognitive deficits? *Journal of the Neurological Sciences*. 2006;245(1–2):123–6.
 53. Scalfari A, Romualdi C, Nicholas RS, Mattosio M, Magliozzi R, Morra A, et al. The cortical damage, early relapses, and onset of the progressive phase in multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2018;90(24):e2107–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/wnl.0000000000005685>
 54. Geisseler O, Pflugshaupt T, Bezzola L, Reuter K, Weller D, Schuknecht B, et al. The relevance of cortical lesions in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol* [Internet]. 2016;16(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12883-016-0718-9>
 55. Wanna A, Noble JH, Carlson ML, Gifford H, Dietrich MS, Haynes DS. Multiple sclerosis animal models: A clinical and histopathological perspective. *Brain*. 2014;49(0):2–31.
 56. Kabat A. Rapid Production of Acute Disseminated. *Science*. 1946;
 57. Bjelobaba I, Begovic-Kupresanin V, Pekovic S, Lavrnja I. Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* [Internet]. 2018;96(6):1021–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.24224>
 58. Bittner S, Afzali AM, Wiendl H, Meuth SG. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. *J Vis Exp* [Internet]. 2014;(86). Available from: <http://dx.doi.org/10.3791/51275>
 59. da Silva APB, Silva RBM, Goi LDS, Molina RD, Machado DC, Sato DK. Experimental models of neuroimmunological disorders: A review. *Front Neurol* [Internet]. 2020;11:389. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2020.00389>
 60. Mashayekhi F, Salehi Z. Administration of Vitamin D3 induces CNPase and myelin oligodendrocyte glycoprotein expression in the cerebral cortex of the murine model of cuprizone-induced demyelination. *Folia Neuropathologica*. 2016;54(3):259–64.
 61. Avşar T, Erdem GÇ, Terzioğlu G, Turanlı ET. Investigation of neuro-inflammatory parameters in a cuprizone induced mouse model of multiple sclerosis. *Turk J Biol* [Internet]. 2021; Available from: <http://dx.doi.org/10.3906/biy-2104-88>
 62. Gardner C, Magliozzi R, Durrenberger PF, Howell OW, Rundle J, Reynolds R. Cortical grey matter demyelination can be induced by elevated pro-inflammatory cytokines in the subarachnoid space of MOG-immunized rats. *Brain*. 2013;136(12):3596–608.
 63. Merkler D, Ernsting T, Kerschensteiner M, Brück W, Stadelmann C. A new focal EAE model of cortical demyelination: Multiple sclerosis-like lesions with rapid resolution of inflammation and extensive remyelination. *Brain*. 2006;129(8):1972–83.

64. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 Years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006;129(8):1953–71.
65. Silva BA, Leal MC, Fariás MI, Avalos JC, Besada CH, Pitossi FJ. A new focal model resembling features of cortical pathology of the progressive forms of multiple sclerosis: Influence of innate immunity. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2018;69:515–31.
66. Üçal M, Haindl MT, Adzemovic MZ, Strasser J, Theisl L, Zeitelhofer M. Widespread cortical demyelination of both hemispheres can be induced by injection of pro-inflammatory cytokines via an implanted catheter in the cortex of MOG-immunized rats. *Experimental Neurology*. 2017;294:32–44.
67. Carr F. Neurodegeneration: selective vulnerability: Neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2015;16(3):123. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3920>
68. Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019;20(3):148–60.
69. Duan X, Wen Z, Shen H, Shen M, Chen G. Intracerebral hemorrhage, oxidative stress, and antioxidant therapy. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016;2016:1203285. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1203285>
70. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;443(7113):787–95.
71. W. X, A.M. G, Y. L, L. B, C.L. C. Nrf2 promotes neuron survival in mouse models of neurodegeneration and acute nerve damage. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2015;56(7):3188.
72. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem* [Internet]. 2016;139:216–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13731>
73. Bolaños JP. Bioenergetics and redox adaptations of astrocytes to neuronal activity. *J Neurochem* [Internet]. 2016;139(S2):115–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13486>
74. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(4):251–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3311>
75. Kubben N, Zhang W, Wang L, Voss TC, Yang J, Qu J, et al. Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging. *Cell* [Internet]. 2016;165(6):1361–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.017>
76. Amirinejad R, Shirvani-Farsani Z, Gargari N, Sahraian B, Soltani M, Behmanesh B. Vitamin D changes expression of DNA repair genes in the patients with multiple sclerosis. *Gene*. 2021;781.
77. Michaličková D, Hrnčíř T, Canová NK, Slanař O. Targeting Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway in multiple sclerosis. *European Journal of Pharmacology*. 2020;873(September 2019).

78. Sivandzade F, Prasad S, Bhalerao A, Cucullo L. NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biology*. 2018;21.
79. Zhang C, Tong T, Miao D-C, Wang L-F. Vitamin D inhibits TNF- α induced apoptosis of human nucleus pulposus cells through regulation of NF- κ B signaling pathway. *J Orthop Surg Res* [Internet]. 2021;16(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13018-021-02545-9>
80. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Res* [Internet]. 2020;30(4):300–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-0291-z>
81. Cerina M, Narayanan V, Delank A, Meuth P, Graebenitz S, Göbel K, et al. Protective potential of dimethyl fumarate in a mouse model of thalamocortical demyelination. *Brain Struct Funct* [Internet]. 2018;223(7):3091–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00429-018-1680-7>
82. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J* [Internet]. 2010;24(4):1023–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-141978>
83. Behl T, Bungau S, Kumar K, Zengin G, Khan F, Kumar A, et al. Pleiotropic effects of polyphenols in cardiovascular system. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020;130(110714):110714. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110714>
84. Ding S, Jiang H, Fang J. Regulation of immune function by polyphenols. *J Immunol Res* [Internet]. 2018;2018:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/1264074>
85. Radhika A, Sudhakaran PR. Upregulation of macrophage-specific functions by oxidized LDL: lysosomal degradation-dependent and -independent pathways. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2013;372(1–2):181–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-012-1459-8>
86. Radhika A, Jacob SS, Sudhakaran PR. Influence of oxidatively modified LDL on monocyte-macrophage differentiation. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2007;305(1–2):133–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-007-9536-0>
87. Robert-Koch-Institut. Oxidativer stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission "Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2008;51(12):1464–82.
88. Elitt MS, Barbar L, Shick HE, Powers BE, Maeno -. Y., Madhavan M. Merzbacher disease. 2021;585:397–403.
89. Bivona G, Gambino CM, Iacolino G, Ciaccio M. Vitamin D and the nervous system. *Neurol Res* [Internet]. 2019;41(9):827–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2019.1622872>
90. Horn. *Biochemie des Menschen*. In Georg Thieme Verlag KG; 2019.

91. Lee SM, Meyer MB, Benkusky NA, O'Brien CA, Pike JW. The impact of VDR expression and regulation in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2018;177:36–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.06.002>
92. Máčková L, Bičíková M, Ostatníková D, Hill M, Stárka L. Vitamin D, neurosteroids and autism. *Physiol Res* [Internet]. 2017;66(Suppl 3):S333–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.33549/physiolres.933721>
93. Bleizgys A. Vitamin D Dosing : Basic Principles and a Brief Algorithm. 2021;1–11
94. Zheng C, He L, Liu L, Zhu J, Jin T. The efficacy of vitamin D in multiple sclerosis: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2018;23:56–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2018.05.008>
95. Shoemaker TJ, Mowry EM. A review of vitamin D supplementation as disease-modifying therapy. *Mult Scler* [Internet]. 2018;24(1):6–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1352458517738131>
96. Hedström AK, Olsson T, Kockum I, Hillert J, Alfredsson L. Low sun exposure increases multiple sclerosis risk both directly and indirectly. *Journal of Neurology*. 2020;267(4):1045–52.
97. Mokry LE, Ross S, Ahmad OS, Forgetta V, Smith GD, Goltzman D, et al. Vitamin D and risk of multiple sclerosis: A Mendelian randomization study. *PLoS Med* [Internet]. 2015;12(8):e1001866. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001866>
98. Munger KL, Köchert K, Simon KC, Kappos L, Polman CH, Freedman MS, et al. Molecular mechanism underlying the impact of vitamin D on disease activity of MS. *Ann Clin Transl Neurol* [Internet]. 2014;1(8):605–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/acn3.91>
99. Ueda P, Rafatnia F, Bäärnhielm M, Fröbom R, Korzunowicz G, Lönnerbro R, et al. Neonatal vitamin D status and risk of multiple sclerosis: Neonatal Vitamin D and MS. *Ann Neurol* [Internet]. 2014;76(3):338–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.24210>
100. Malik MT, Healy B, Benson L, Kivisakk P, Musallam A, Weiner H. Factor affecting recovery from acute optic neuritis in multiple sclerosis patients. *Neurology*. 2014;82(10).
101. Spanier JA, Nashold FE, Mayne CG, Nelson CD, Hayes CE. Vitamin D and estrogen synergy in Vdr-expressing CD4+ T cells is essential to induce Helios+FoxP3+ T cells and prevent auto-immune demyelinating disease. *Journal of Neuroimmunology*. 2015;286:48–58.
102. Ghareghani M, Reiter RJ, Zibara K, Farhadi N. Vitamin D, Melatonin, and Gut Microbiota Act in Concert to Initiate Multiple Sclerosis: A. *Frontiers in immunology NLM (Medline)*. 2018;9.
103. Spanier JA, Nashold FE, Nelson CD, Praska CE, Hayes CE. Vitamin D 3 -mediated resistance to a multiple sclerosis model disease depends on myeloid cell 1 , 25-dihydroxyvitamin D 3 synthesis and correlates with increased CD4 + T cell CTLA-4 expression. *Journal of Neuroimmunology*. 2019;338.
104. Bartosik-Psujek H, Psujek M. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* [Internet]. 2019;53(2):113–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.5603/PJNNS.a2019.0015>

105. Hawker K, Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Annals of Neurology*. 2009;66(4):460–71.
106. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiological Reviews*. 2015;96(1):365–408.
107. Yamini P, Ray RS, Chopra K. Vitamin D3 attenuates cognitive deficits and neuroinflammatory responses in ICV-STZ induced sporadic Alzheimer’s disease. *Inflammopharmacology*. 2018;26(1):39–55.
108. Esposito S, Bonavita S, Sparaco M, Gallo A, Tedeschi G. The role of diet in multiple sclerosis: A review. *Nutr Neurosci* [Internet]. 2018;21(6):377–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/1028415X.2017.1303016>
109. Thouvenot E, Orsini M, Daures J-P, Camu W. Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Neurol* [Internet]. 2015;22(3):564–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/ene.12617>
110. Berezowska M, Coe S, Dawes H. Effectiveness of vitamin D supplementation in the management of multiple sclerosis: A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(6).
111. Orton S-M, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2006;5(11):932–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70581-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70581-6)
112. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010;9(5):520–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70064-8](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70064-8)
113. Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2012;8(5):255–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.43>
114. Melcangi RC, Giatti S, Garcia-Segura LM. Levels and actions of neuroactive steroids in the nervous system under physiological and pathological conditions: Sex-specific features. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2016;67:25–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.09.023>
115. Benedek G, Zhang J, Bodhankar S, Nguyen H, Kent G, Jordan K, et al. Estrogen induces multiple regulatory B cell subtypes and promotes M2 microglia and neuroprotection during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2016;293:45–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.02.009>
116. Voskuhl RR, Wang HJ, Wu TCJ, Sicotte NL, Nakamura K, Kurth F, et al. Estradiol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: A randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*. 2016;15(1):35–46.

117. Orton S-M, Wald L, Confavreux C, Vukusic S, Krohn JP, Ramagopalan SV, et al. Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. *Neurology* [Internet]. 2011;76(5):425–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0b013e31820a0a9f>
118. Pasing Y, Fenton CG, Jorde R, Paulssen RH. Changes in the human transcriptome upon vitamin D supplementation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2017;173:93–9.
119. Ysraelit MC, Correale J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology* [Internet]. 2019;156(1):9–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/imm.13004>
120. Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: A model for MS pathogenesis. *PLoS One* [Internet]. 2009;4(2):e4565. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004565>
121. Swerdloff RS, Voskuhl RR. Testosterone Treatment in Multiple Sclerosis. 2015;64(May 2007).
122. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol* [Internet]. 2007;61(4):288–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/ana.21117>
123. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010;9(6):599–612. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70086-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70086-7)
124. Cruciani S, Santaniello S, Garroni G, Fadda A, Balzano F, Bellu E. Myrtus polyphenols, from antioxidants to anti-inflammatory molecules: Exploring a network involving cytochromes P450 and Vitamin D. *Molecules*. 2019;24(8):1–14.
125. Mische LJ, Mowry EM. The evidence for dietary interventions and nutritional supplements as treatment options in multiple sclerosis: A review. *Curr Treat Options Neurol* [Internet]. 2018;20(4):8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11940-018-0494-5>
126. Evans E, Piccio L, Cross AH. Use of vitamins and dietary supplements by patients with multiple sclerosis: A review. *JAMA Neurol* [Internet]. 2018;75(8):1013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.0611>
127. Espiritu AI, Remalante-Rayco P. High-dose biotin for multiple sclerosis: A systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*. 2021;55.
128. De Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, Lewis JE, De Andrade RV, Simões HG. The Antioxidant Effect of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Medicine*. 2017;47(2):277–93.
129. Montazeri RS, Fatahi S, Sohoulı MH, Abu-Zaid A, Santos HO, Găman M-A, et al. The effect of nigella sativa on biomarkers of inflammation and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Food Biochem* [Internet]. 2021;45(4):e13625. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13625>

130. Pellegrini N, Vitaglione P, Granato D, Fogliano V. Twenty-five years of total antioxidant capacity measurement of foods and biological fluids: merits and limitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2020;100(14):5064–78.
131. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2016;13(1):26–36.
132. Paur I, Balstad TR, Kolberg M, Pedersen MK, Austenaa LM, Jacobs DR. Extract of oregano, coffee, thyme, clove, and walnuts inhibits NF- κ B in monocytes and in transgenic reporter mice. *Cancer Prevention Research*. 2010;3(5):653–63.
133. Clifford T, Acton JP, Cocksedge SP, Davies K, Bailey SJ. The effect of dietary phytochemicals on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation: a systematic review of human intervention trials. *Molecular Biology Reports*. 2021;48(2):1745–61.
134. Zhang D, Qiao L, Fu T. Paricalcitol improves experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by suppressing inflammation via NF- κ B signaling. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2020;125(109528):109528. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109528>
135. Tan BL, Norhaizan ME. Effect of high-fat diets on oxidative stress, cellular inflammatory response and cognitive function. *Nutrients*. 2019;11(11):1–22.
136. Iqbal G, Ahmed T. Co-exposure of metals and high fat diet causes aging like neuropathological changes in non-aged mice brain. *Brain Research Bulletin*. 2019;147:148–58.
137. Smolders J, Torkildsen Ø, Camu W, Holmøy T. An update on vitamin D and disease activity in multiple sclerosis. *CNS Drugs* [Internet]. 2019;33(12):1187–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s40263-019-00674-8>
138. Donadieu M, Kelly H, Di S, Lin JP, Song Y, Yen C. Ultrahigh-resolution MRI Reveals Extensive Cortical Demyelination in a Nonhuman Primate Model of Multiple Sclerosis. *Cerebral Cortex*. 2021;31(1):439–47.
139. Li H, Hu F, Zhang Y, Li K. Comparative efficacy and acceptability of disease-modifying therapies in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review and network meta-analysis. *Journal of Neurology*. 2020;267(12):3489–98.
140. Landmeyer NC, Bürkner P-C, Wiendl H, Ruck T, Hartung H-P, Holling H, et al. Disease-modifying treatments and cognition in relapsing-remitting multiple sclerosis: A meta-analysis: A meta-analysis. *Neurology* [Internet]. 2020;94(22):e2373–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000009522>
141. Feige J, Moser T, Bieler L, Schwenker K, Hauer L, Sellner J. Vitamin D supplementation in multiple sclerosis: A critical analysis of potentials and threats. *Nutrients* [Internet]. 2020;12(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/nu12030783>
142. Wang Y-H, Tao AY, Vaeth M, Feske S. Calcium regulation of T cell metabolism. *Curr Opin Physiol* [Internet]. 2020;17:207–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cophys.2020.07.016>
143. Hall MN. MTOR—what does it do? *Transplant Proc* [Internet]. 2008;40(10):S5–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.10.009>

144. Häusler D, Torke S, Peelen E, Bertsch T, Djukic M, Nau R, et al. High dose vitamin D exacerbates central nervous system autoimmunity by raising T-cell excitatory calcium. *Brain* [Internet]. 2019;142(9):2737–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awz190>
145. McLaughlin L, Clarke L, Khalilidehkordi E, Butzkueven H, Taylor B, Broadley SA. Vitamin D for the treatment of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol* [Internet]. 2018;265(12):2893–905. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-018-9074-6>
146. McCullough PJ, Lehrer DS, Amend J. Daily oral dosing of vitamin D3 using 5000 TO 50,000 international units a day in long-term hospitalized patients: Insights from a seven year experience. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;189:228–39.
147. Lemke D, Klement RJ, Schweiger F, Schweiger B, Spitz J. Vitamin D Resistance as a Possible Cause of Autoimmune Diseases: A Hypothesis Confirmed by a Therapeutic High-Dose Vitamin D Protocol. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:1–11.
148. Martinelli V. Combination therapy. *Neurol Sci* [Internet]. 2006;27 Suppl 5(S5):S350-4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10072-006-0692-x>
149. Chesnut M, Paschoud H, Repond C, Smirnova L, Hartung T, Zurich M-G, et al. Human iPSC-derived model to study myelin disruption. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(17):9473. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22179473>
150. Lavazza A. Potential ethical problems with human cerebral organoids: Consciousness and moral status of future brains in a dish. *Brain Res* [Internet]. 2021;1750(147146):147146. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147146>
151. Felsen G. Research ethics in conscious subjects: Old questions, new contexts. *J Law Med Ethics* [Internet]. 2019;47(4):768–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/1073110519897790>
152. Mitrečić D, Hribljan V, Jagečić D, Isaković J, Lamberto F, Horánszky A, et al. Regenerative neurology and regenerative cardiology: Shared hurdles and achievements. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022;23(2):855. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23020855>
153. Eremeev AV, Lebedeva OS, Bogomiakova ME, Lagarkova MA, Bogomazova AN. Cerebral organoids-challenges to establish a brain prototype. *Cells* [Internet]. 2021;10(7):1790. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10071790>