

Diplomarbeit

Liquor Biomarker für axonalen Schaden und Neurodegeneration in Relation zu zerebralen MRT Parametern für Gewebedestruktion bei Multipler Sklerose

eingereicht von

Arthur Mader

Geb.Dat.: 28.04.1988

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Neurologie / Abteilung für Neuroradiologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. Christian Enzinger

&

Priv. Doz. Dr. Michael Khalil, PhD

Ort, Datum

(Unterschrift)

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am

Unterschrift

Anmerkung

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit, habe ich mich dazu entschlossen, alle geschlechtsbezogenen Wörter nur in eingeschlechtlicher Form, der deutschen Sprache gemäß zumeist die männliche, zu verwenden. Selbstredend gelten alle Bezeichnungen gleichwertig für Frauen.

Danksagung

An dieser Stelle darf ich jenen danken, die mich bei der Erstellung dieser Diplomarbeit tatkräftig unterstützt haben:

Allen voran sei mein Betreuer **Christian Enzinger** genannt, der sich mit viel Geduld dieser Arbeit angenommen hat. Internationale Grenzen stellten kein Hindernis dar um mir die bis ins Detail korrigierte Version der Arbeit zukommen zu lassen. Ein derartiges Engagement für seine Studenten, darf nicht als selbstverständlich erachtet werden.

Des Weiteren gilt mein Dank **Michael Khalil**, ebenfalls für die mühevollen und genauen Korrekturen und den Zugang zu der wissenschaftlichen Basis, auf welcher diese Diplomarbeit aufbaut. Außerdem möchte ich **Stefan Ropele** und **Christian Langkammer** danken, für die stets schnelle Beseitigung jeglicher technischer Stolpersteine.

Für die moralische Unterstützung möchte ich meiner Freundin **Franziska** danken, die nicht nur in Zeiten der Flaute für den nötigen Antrieb gesorgt hat, sondern auch geduldig mehrere Male die Arbeit korrigiert hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen **Eltern**, **Geschwistern**, meiner **Schwägerin** und meinem **Schwager**, die mir während meiner gesamten Studienzzeit einen wichtigen Rückhalt und Unterstützung geboten haben. Danke für alles!

Zusammenfassung

Einleitung. Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems die oftmals zu Behinderung führt. Die Vorhersage des individuellen Erkrankungsverlaufs ist schwierig. Das klinisch isolierte Syndrom (CIS) repräsentiert die klinisch fassbare früheste Form der MS. Bereits bei CIS-Patienten lassen sich in der MRT Läsionen und ein reduziertes Gehirnvolumen detektieren. Biomarker, die diese Gewebeschäden bereits zu Beginn der Erkrankung erfassen können, sind von großem klinischen und wissenschaftlichen Interesse, zumal man sich davon Aussagen über den Krankheitsverlauf erhofft. Drei Marker im Liquor cerebrospinalis für Neurodegeneration wurden daher in dieser Arbeit mit oben genannten MRT-Parametern und klinischen Daten verglichen und deren Stellenwert als Prädiktoren für eine Krankheitsprogredienz untersucht.

Methoden. Potenzielle Liquor-Biomarker Neurofilament Light Chain (NF-L), Neurofilament Heavy Chain (NF-H) und N-Acetyl-Aspartat (NAA) wurden bei 67 CIS-Patienten und 18 Patienten mit neuropsychiatrischen Erkrankung und neurologischen Erkrankungen ohne Hinweis auf entzündliche Ätiologie analysiert. CIS-Patienten unterzogen sich einer 3-Tesla MRT-Untersuchung des Gehirns zur Bestimmung des Gehirnvolumens und des T₂-Läsions-Volumens. 28 dieser Patienten wurde zudem nach einem Jahr mittels MRT kontrolluntersucht. Zur Erfassung eines Zusammenhangs zwischen den Biomarkern und der körperlichen Beeinträchtigung, wurde die EDSS (Expanded Disability Status Scale) bei der Auswertung mit einbezogen.

Ergebnis. Verglichen mit der Kontrollgruppe wiesen die CIS-Patienten erhöhte NF-H ($p=0,05$) und NF-L ($p<0,001$) Werte im Liquor auf. Für NAA zeigten sich diesbezüglich keine signifikanten Veränderungen. NF-H Werte bei den CIS-Patienten korrelierten mit dem Grad ihrer Behinderung ($r=0.304$, $p<0.05$). Des Weiteren fand sich ein Zusammenhang zwischen Abnahme des Gehirnvolumens über den einjährigen Verlaufszeitraum und NF-H-Werten ($r=-0.518$, $p<0.01$). Kein Zusammenhang konnte jedoch zwischen den Parametern und der T₂-Läsionslast festgestellt werden.

Schlussfolgerung. Die Ergebnisse belegen erhöhte NF-H Werte bereits bei CIS-Patienten und deuten auf einen Zusammenhang mit dem Behinderungsgrad hin. Der Zusammenhang

der NF-H Werte mit Abnahme des Gehirnvolumens im Krankheitsverlauf nicht aber mit der Veränderung der T2-Läsionslast - wiederum unterstützt die Annahme, dass dieser Marker eine neuronale Schädigung reflektiert.

Abstract

Introduction. Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) and represents a major cause for neurological disability among young adults. The individual disease course is unpredictable. The clinically isolated syndrome (CIS) represents the earliest clinical manifestation of MS. T₂-lesions and brain tissue loss can be detected already in patients with a clinically isolated syndrome (CIS) suggestive of multiple sclerosis. Biomarkers that detect such processes are of great clinical and scientific interest, especially if they (might) predict and reflect disease progression. Within the current diploma thesis, three potential markers for neurodegeneration were compared with clinical data and MRI parameters (T₂-lesion load and brain atrophy) to investigate their role as predictors for disease progression.

Methods. We assessed cerebrospinal fluid (CSF) levels of neurofilament heavy (NF-H), neurofilament light (NF-L) and N-Acetyl-Aspartate (NAA) in 67 patients with CIS and 18 controls with neurologic diseases of non-inflammatory etiology. Patients with CIS underwent magnetic resonance imaging (MRI) at 3T to assess the T₂-lesion load and brain volume. After 1 year a subgroup of 28 patients underwent a follow-up MRI, using the same imaging parameters. To assess the relation of these markers with disability, we correlated the levels with the Expanded Disability Status Scale (EDSS).

Results. Compared to the control patients, CIS-patients had higher NF-H ($p=0.05$) and NF-L ($p<0.001$) levels. No significant group differences were found for NAA. NF-H levels correlated with patients' physical disability ($r=0.304$, $p<0.05$). A further correlation with NF-H was found with the change in brain volume over 1 year of follow-up ($r=-0.518$, $p<0.01$). There were no correlations with the change in T₂ lesion load.

Conclusion. The results suggest increased neurofilament levels already in CIS patients, and a relationship with the level of physical disability. The association of NF-H levels with accumulative brain tissue damage over 1 year as assessed by MRI represents a new finding. These preliminary observations suggest that CSF NF-H protein levels may predict progressive brain damage. This, however, needs to be confirmed by further studies.

Inhaltsverzeichnis

Glossar und Abkürzungen	IX
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellen- und Diagrammverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
2 Einführung in die Thematik	2
2.1 Allgemeines zu Multipler Sklerose	2
2.2 Klinik	3
2.3 Der Schub und das klinisch isolierte Syndrom (CIS).....	4
2.4 Das organische Korrelat und dessen Detektion	6
2.4.1 Läsionen in der MRT	6
2.4.2 Gehirnatrophie.....	10
2.4.3 Liquor Diagnostik	11
2.5 Biomarker	11
2.5.1 Was ist ein Biomarker?	12
2.5.2 Biomarker bei Multipler Sklerose	12
2.5.3 Neurodegeneration und Biomarker	13
2.5.4 Neurofilamente.....	14
2.5.5 N-Acetyl-Aspartat	15
3 Hypothesen.....	16
4 Methodik	17
4.1 Patienten und Kontrollgruppe.....	17
4.2 Patienteneinwilligung	18
4.3 Die Datenerhebung	18
4.3.1 Die EDSS	18
4.3.2 Liquor-Analyse.....	19

4.3.3	Die MRT-Datenerhebung.....	19
4.3.4	T ₂ -Läsions Segmentierung und Volumetrie.....	20
4.3.5	Die Messung des Gehirnvolumens.....	21
4.4	Statistische Verfahren.....	21
5	Ergebnisse.....	21
5.1	Demographische und klinische Charakteristiken.....	21
5.2	CSF NF- und NAA-Werte im Liquor bei CIS-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe.....	22
5.3	NF-H, NF-L, NAA und Krankheitsaktivität.....	24
5.4	NF-H, NF-L, NAA und Alter.....	24
5.5	NF-H, NF-L, NAA und neurologische Beeinträchtigung.....	24
5.6	NF-H, NF-L, NAA und MRT-Parameter.....	24
6	Diskussion.....	26
6.1	Allgemeine Zielsetzungen.....	26
1)	NF-L, NF-H und NAA bei CIS- und Kontroll-Patienten.....	26
2)	NF-L, NF-H und NAA in Bezug auf Krankheitsprogression, neurologische Beeinträchtigung und Alter.....	27
3)	In der MRT ermittelte morphologische Veränderungen und CSF-Marker....	28
4)	Allgemeine Schlussfolgerung.....	29
7	Referenzen.....	31
8	Permissions.....	38

Glossar und Abkürzungen

CIS	-	Clinically Isolated Syndrom (klinisch isoliertes Syndrom)
CSF	-	Cerebro-Spinal-Fluid (Liquor)
DIS	-	Dissemination in space (Örtliche Dissemination)
DIT	-	Dissemination in time (Zeitliche Dissemination)
EDSS	-	Expanded Disability Status Scale
FLAIR	-	Fluid Attenuated Inversion Recovery
FS	-	Funktionssystem
FU	-	Follow-Up (=Verlaufsaufnahme in der MRT)
HLA	-	human leucocyte antigen system (Humanes Leukozyten Antigen System)
T2- Läsionslast	-	T2- Läsions-Volumen
LP	-	Lumbalpunktion
MRT	-	Magnetresonanztomographie
MS	-	Multiple Sklerose
N	-	Zahl der Patienten/Kontrollgruppe
NA	-	nicht anwendbar
NAA	-	N-Acetyl-Aspartat
NF-H	-	Neurofilament Heavy Chain
NF-L	-	Neurofilament Light Chain
PRMS	-	progressive-relapsing Multiple Sclerosis (progressive-schubförmige Multiple Sklerose)
PPMS	-	primary-progressive Multiple Sclerosis (primär-progressive Multiple Sklerose)
RRMS	-	relapsing-remitting Multiple Sclerosis (schubförmig-remittierende Multiple Sklerose)
s.	-	siehe
SPMS	-	secondary-progressive Multiple Sclerosis (sekundär-progressive Multiple Sklerose)
u.a.	-	unter anderem
ZNS	-	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung I: MRT in Transversalebene; Seite 6
- Abbildung II: MRT in Transversalebene, T2-Gewichtung; Seite 7
- Abbildung III: Proteinstruktur von NF-H, NF-M und NF-L (44); Seite 15
- Abbildung IV: 2D-Strukturformel von N-Acetyl-Aspartat (54); Seite 16
- Abbildung V: 3D-Struktur von N-Acetyl-Aspartat (54); Seite 16
- Abbildung VI: MRT in Transversalebene, ROI; Seite 20
- Abbildung VII: NF-L im Vergleich zwischen CIS-Patienten (CIS) und Kontrollpatienten (CO) (78); Seite 23
- Abbildung VIII: NF-H im Vergleich zwischen CIS-Patienten (CIS) und Kontrollpatienten (CO) (78); Seite 23
- Abbildung IX: NAA im Vergleich zwischen CIS-Patienten (CIS) und Kontrollpatienten (CO) (78); Seite 23
- Abbildung X: Zusammenhang der NF-H-Werte der CIS-Patienten mit einer Reduktion an Gehirnvolumen. (78); Seite 25
- Abbildung XI: Permission for: Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis (44); Seite 38
- Abbildung XII: Permission for: CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. (78); Seite 38

Tabellen- und Diagrammverzeichnis

- Tabelle I: Differenzierung zwischen DIS und DIT (25); Seite 4
- Tabelle II: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose, Microsoft Excel 2007;
Seite 5
- Tabelle III: McDonald Kriterien 2010 (24); Seite 8-9
- Tabelle IV: Ursachen für eine Zunahme und eine Abnahme an Gehirnvolumen (31)
Seite 11
- Tabelle V: Biomarker für pathogenetische Prozesse bei MS (35); Seite 13
- Tabelle VI: Demographische und klinische Daten. Seite 22

1 Einleitung

Die Funktion unserer Sinneswahrnehmung, unserer Bewegung und unserer kognitiven Leistungen ist von unseren zentralen Steuerelementen, dem Gehirn und dem Rückenmark, abhängig. Eine entscheidende Rolle für den Transport dieser Information spielen die Leitungsbahnen (Axone), welche eine Nervenzelle (das Neuron) mit einer anderen, oder mehreren über eine Synapse verbinden. Das Axon des Neurons wird durch Myelin ummantelt. Diese Isolation dient dazu, die Faserstruktur des Axons gegenüber den anderen elektrisch zu isolieren um eine funktionelle Integrität der einzelnen Leitungsbahnen zu gewährleisten (1). Werden diese Transportwege gestört, kann der Informationsfluss nicht mehr korrekt ablaufen beziehungsweise nimmt die Nervenleitgeschwindigkeit ab oder es kommt überhaupt zu einem Leitungsblock (2).

Die traditionelle Ansicht ist, dass es bei der Multiplen Sklerose (MS) primär durch den entzündlichen Prozess zu einer Demyelinisierung kommt, und in weiterer Folge zu Axon-Schäden und Axon-Verlust (3). Derartige axonale Schäden können bereits in sehr frühen Phasen der MS auftreten (4–6). Der axonale Schaden und die neuronale Degeneration sind Resultat des entzündlichen Prozesses (7,8) und spiegeln sich je nach Lokalisation und Ausprägung im Grad der physischen Beeinträchtigung des Patienten wider (9,10). Ist zwar der entzündliche Prozess der Kern der Erkrankung, so zeigt die MS in ihren unterschiedlichen Verlaufsformen, der variablen Symptomatik und in ihren verschiedenen morphologischen Erscheinungsbildern eine ausgeprägte Heterogenität. Fasst man aktuellere Studien zusammen zeigt sich auch, dass Neurodegeneration unabhängig von entzündlichen Prozessen stattfinden könnte, vor allem bei den progressiven Formen der MS (PPMS) (7). Dies führt besonders in frühen Stadien der Erkrankung zu einer prognostischen Unsicherheit für Patienten, die eine zusätzliche Belastung darstellt.

Aus dem Liquor cerebrospinalis (CSF) gewonnene Biomarker könnten diesbezüglich zur Identifikation von Risikopatienten, die eine progrediente Form der MS entwickeln, beitragen. Neurofilamente (NF) und N-Acetyl-Aspartat (NAA) erscheinen in diesem Zusammenhang vielversprechend um den Grad der axonalen Destruktion zu ermitteln (10) (11), womit deren Einsatz als Prädiktoren für eine Krankheitsprogredienz denkbar wäre (13).

Derzeit ist als Methode zur Erfassung von neuronalen Schäden bei MS lediglich die Magnetresonanztomographie (MRT) verfügbar, die neben den für die Diagnostik entscheidenden Läsionen in der weißen Substanz auch wissenschaftlich interessante Parameter liefert, wie etwa die beschleunigte Abnahme von Gehirnvolumen (14). Bis dato existieren jedoch kaum Daten inwieweit die genannten möglichen Marker für axonalen Schaden und neuronale Degeneration mit den morphologischen in der MRT erkennbaren Schäden in frühen Phasen der MS korrelieren. Mit dieser Arbeit soll diesen Fragen nun nachgegangen werden.

2 Einführung in die Thematik

2.1 Allgemeines zu Multipler Sklerose

Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und betrifft typischerweise junge Erwachsene. Die MS stellt die Hauptursache für eine frühzeitige Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar (15). Die Prävalenz der MS liegt in Österreich bei 95.8/100 000, es sind zu 72% Frauen und zu 28% Männer betroffen. Im Schnitt treten die ersten Symptome (klinisch isoliertes Symptom, CIS) in einem Alter von 30 Jahren auf (16). Auffallend ist ein Nord-Süd Gefälle mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko im Norden Europas und Amerikas. Selten betroffen sind die schwarze Bevölkerung der USA, Indianer und Inuit. Migrationsstudien zeigen, dass eine Exposition mit einem pathogenen Umweltfaktor (z. B. Viren) vor dem 15. Lebensjahr für die spätere Manifestation der MS von entscheidender Bedeutung sein könnte (17). Ein endemisches Auftreten wird auf den Färöer-Inseln beobachtet und steht in direktem Zusammenhang mit der britischen Besatzung um 1940, was für eine übertragbare Genese der Erkrankung sprechen würde (18).

Daraus ergibt sich eine der zentralen Hypothesen zur Entstehung einer MS: das Auftreten von Autoimmunvorgängen nach einer in der Adoleszenz erworbenen Virusinfektion (19). Jedoch sind die Theorien weitreichender. Einen zusätzlichen Faktor soll eine genetische Disposition spielen. Dafür sprechen Zwillingsuntersuchungen, wobei das HLA-System und die MS eindeutige Beziehungen zueinander erkennen lassen (20,21).

Hauptangriffspunkt der Entzündungszellen (vorwiegend T-Lymphozyten) ist die Myelinscheide der Nervenzellen im Gehirn und im Rückenmark. Die T-Lymphozyten

schädigen dabei die Isolation der Nervenbahnen, was wiederum, je nach betroffenem Areal im Gehirn oder Rückenmark, zu mehr oder weniger charakteristischen Ausfallserscheinungen führen kann. Dabei ist zumeist nicht das gesamte Gehirngewebe betroffen, sondern vielmehr einzelne Areale in der weißen und vereinzelt in der grauen Substanz, die stark in ihrer Größe und Lokalisation variieren können (s. Abschnitt 2.4.1: Läsionen in der MRT). An diesen entzündlichen Stellen kommt es zu einer Destruktion der Myelinscheide, der Axone und Neuronen und infolgedessen zu einer Störung der Blut-Hirnschranke, durch die zellgebundene Moleküle in den Liquor (CSF) ausgeschwemmt werden können, die wiederum teilweise über eine Liquoranalyse bestimmbar sind. Daraus ergibt sich ein weiterer logischer Schluss, nämlich dass der Verlust an Myelin, die Degeneration der Axone, der Schaden an Neuronen und anderen Zellen, über den Erkrankungszeitraum zu einem Verlust an Gewebevolumen führt (14).

2.2 Klinik

Die MS ist durch hohe Heterogenität gekennzeichnet, was ein klinisches Problem in Bezug auf Auswahl der Therapie und Prädiktion des Verlaufes darstellt. Die möglichen Symptome können vielfältig sein, dennoch gibt es kennzeichnende Beschwerden, die auf eine MS hinweisend sind.

Patienten weisen oft bei der Erstkonsultation neurologische Symptome auf. Diese können klinisch monofokal, ohne örtliche Dissemination der Läsionen, welche die Symptome und Zeichen erklären könnten, oder multifokal sein, mit örtlicher Dissemination der Läsionen, wobei die Symptome nur erklärt werden können, wenn zumindest zwei Läsionen in unterschiedlichen Regionen im ZNS existieren. Über die Zeit treten sie einmalig, schubförmig, oder progressiv in Erscheinung (22). Im Verlauf von Stunden oder auch von Wochen können die Symptome an Intensität zunehmen und sich wieder zurückbilden (16). Zu Beginn überwiegen oft Symptome wie Missempfindungen an Händen oder Füßen, Paresen einzelner oder aller Gliedmaßen und Sehstörungen. Im zeitlichen Verlauf, bei einer Progredienz der Erkrankung, können zentrale Lähmungen und später Spastiken auftreten. Zuvor zeigen sich eine Steigerung der Eigenreflexe und unwillkürliche Muskelzuckungen. Das Babinski-Zeichen ist anfangs oft einseitig positiv (20).

2.3 Der Schub und das klinisch isolierte Syndrom (CIS)

In Österreich sind etwa 63% der MS Patienten an einer schubhaften remittierenden Form und 28% an einer sekundär progressiven Form erkrankt (16). Typischerweise manifestiert sich die Erkrankung in Form eines Schubes.

Ein Schub ist definitionsgemäß ein vom Patienten selbst beobachtetes oder neurologisch objektivierbares, akutes oder vergangenes Symptom, welches für zumindest 24 Stunden auftritt und typischerweise mit einer zentralen Demyelinisierung vergesellschaftet ist, jedoch in Abwesenheit von Fieber und anderen Zeichen einer Infektion (23). Ein Schub kann wenige Tage bis einige Wochen andauern (20). Tritt die klinische Symptomatik zum ersten Mal auf und steht diese in Zusammenhang mit MRT-Läsionen, spricht man von einem klinisch isolierten Syndrom (CIS). Wie es aus den McDonald Kriterien hervorgeht, erfüllt ein CIS noch nicht die Kriterien einer manifesten MS. Ein CIS, zusammen mit einer MRT-Dynamik über die Zeit oder nebeneinander bestehenden aktiven und chronischen Läsionen, ergeben das Bild einer manifesten MS (24). Entsprechend den Kriterien nach Montalban zur Diagnose einer MS, ausgehend von einem CIS, müssen simultan örtliche (DIS) und zeitliche (DIT) Disseminationen nachweisbar sein (25) (s. Tabelle I).

Tabelle I, Differenzierung zwischen DIS und DIT (25)

DIS (Dissemination in space)	DIT (Dissemination in time)
<p>≥ 1 asymptomatische Läsionen in jeweils ≥ 2 charakteristischen Lokalisationen (periventrikulär, juxtakortikal, posteriore fossa, spinal)</p>	<p>a) Simultan asymptomatische Gadolinium anreichernde und nicht anreichernde Läsion(en)</p> <p>b) Neue T₂ und/oder Gadolinium anreichernde Läsionen in der Follow-Up Untersuchung, unabhängig vom Zeitpunkt des Baseline-MRTs.</p>

Eine häufige Lokalisation bei CIS-Patienten ist der N. opticus (26), einhergehend mit einer Sehverschlechterung als klinisches Korrelat. Die Prozentzahlen der CIS-Patienten, die innerhalb von zwei Jahren einen weiteren Schub erleben (und damit per definitionem an einer MS erkrankt sind) schwanken von Studie zu Studie zwischen 31-77% (26). Die Rückbildung des Symptoms, beziehungsweise die Besserung der Beschwerden bezeichnen

das Ende eines Schubes. Man spricht infolgedessen entweder von einer vollständigen oder einer inkompletten Remission mit einem andauernden neurologischen Defizit. Da Schübe weder zeitlich noch hinsichtlich ihres Schweregrades vorhersehbar sind, ist eine Einschätzung des Krankheitsverlaufes sehr schwierig und führt dementsprechend oft zu einer Verunsicherung des Patienten. Biomarker, gewonnen aus dem Liquor, könnten diesbezüglich hilfreich sein.

In der folgenden Tabelle II sind mögliche Krankheitsverläufe kurz zusammengefasst:

Tabelle II, Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (27)

	<p>RRMS, schubförmig remittierende Form. Die einzelnen Schübe treten weder in regelmäßigen noch in vorhersehbaren Abständen auf; zumindest initial vollständige Rückbildung der Symptome.</p>
	<p>SPMS, sekundär-chronisch-progrediente Verlaufsform; per definitionem ausgehend aus der RRMS; nach längerer Krankheitsdauer zunehmende Krankheitsprogredienz.</p>
	<p>PPMS, primäre chronisch progrediente Verlaufsform: keine abgrenzbaren Schübe, eventuell Plateauphasen, kontinuierliche Krankheitszunahme mit bleibenden Einschränkungen.</p>
	<p>PRMS, progredient-schubförmige Verlaufsform; kontinuierliche Krankheitsprogredienz mit Schüben und nur teilweiser Rückbildung der Symptomatik.</p>

2.4 Das organische Korrelat und dessen Detektion

Neben der klinischen Symptomatik, mit der sich eine MS präsentieren kann, braucht es diagnostische Maßnahmen um den Verdacht zu bestätigen. Die morphologischen Veränderungen im Rahmen des entzündlichen Prozesses, eventuell auch im Sinne einer Störung der Blut-Hirn-Schranke und der Bildung eines lokalen Ödems bei aktiven Läsionen, können mittels Magnetresonanztomographie dargestellt werden.

2.4.1 Läsionen in der MRT

Die charakteristischen Läsionen in der weißen Substanz sind in der MRT mit hoher Sensitivität in T₂-gewichteten FLAIR Sequenzen sichtbar (s. Abbildung I, MRT in Transversalebene) (28). In einer T₂-gewichteten Aufnahme erscheinen Flüssigkeiten hyperintens, folglich bilden sich flüssigkeitsgefüllte Hohlräume signalreicher und heller ab. Um die „white matter lesions“ in der T₂-Gewichtung besser, kontrastreicher und insbesondere vom hellen Signal des Liquors abgrenzen zu können, kann man das Signal, das vom Liquor ausgeht, selektiv unterdrücken. Man nennt diese Aufnahmetechnik „FLAIR“ (Fluid Attenuated Inversion Recovery) (s. Abbildung I, MRT in Transversalebene) (29).

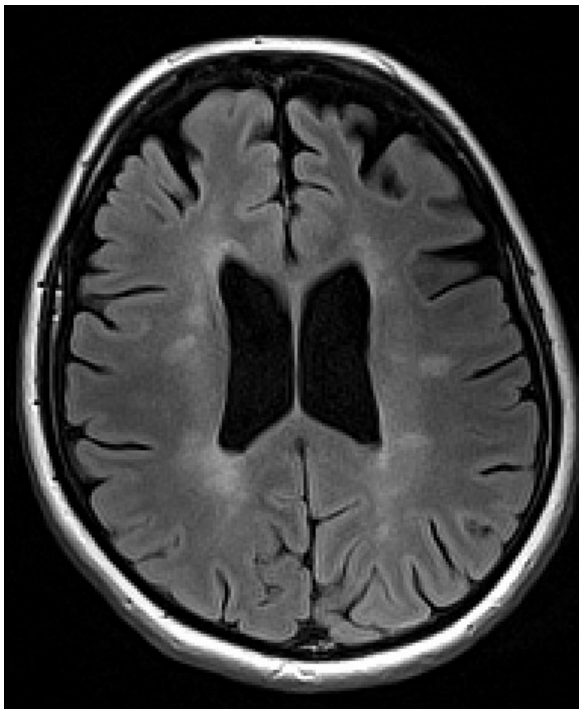


Abbildung I, MRT in Transversalebene.

Man erkennt an der Cella media der beiden Seitenventrikel, in der weißen Substanz dieser FLAIR gewichteten Darstellung (Liquor ist unterdrückt, d.h. schwarz) eines Gehirns in Transversalebene hyperintense Areale. Diese entsprechen Läsionen, wie sie typischerweise bei MS vorkommen.

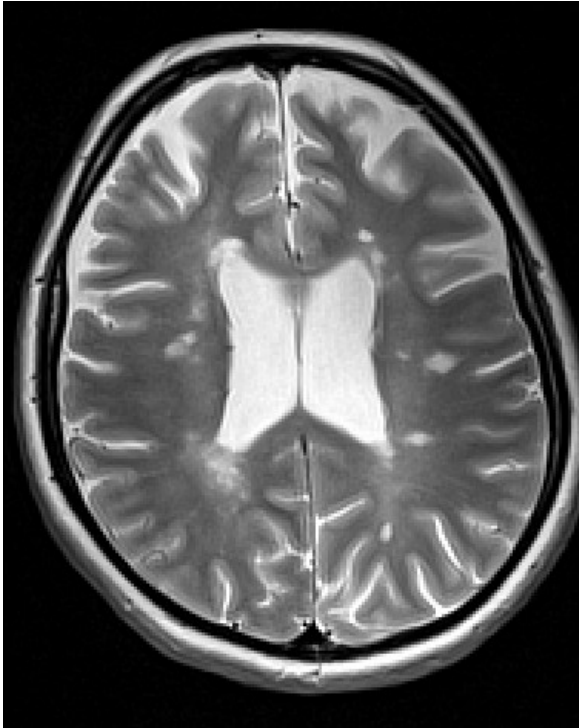


Abbildung II, MRT in Transversalebene, T2-Gewichtung. Flüssigkeiten wie Liquor erscheinen signalreich (hyperintens). Besonders liquornahe Läsionen sind vom Liquor und „Black-Holes“ von anderen Läsionen schwerer abgrenzbar (29).

Typischerweise finden sich multiple, asymmetrisch über die weiße Substanz (Marklager) verteilte, herdförmige Anhebungen der Signalintensität. In der Regel sind diese Läsionen scharf begrenzt. Bei ausgeprägten großen Läsionen können diese konfluieren und flächige Zonen der Demyelinisierung darstellen. Bevorzugt findet man die Läsionen periventrikulär, entlang der Seitenventrikel und vereinzelt auch im Bereich der Capsula interna und externa. Typisch sind auch Läsionen im Bereich des Zervikalmarks. Im akuten Stadium nehmen diese Herde, aufgrund einer Störung der Blut-Hirnschranke, Kontrastmittel auf (30).

Im späteren Verlauf kann sich, bedingt durch das entzündliche Geschehen, eine Läsion in ein so genanntes „Black-Hole“ umwandeln. Dabei handelt es sich vermutlich um ein bereits vollständig entmarktes, sklerosiertes Areal mit einem kompletten Verlust der Axone und einer narbigen Umstrukturierung des Gewebes. In T1-Gewichtung imponieren diese Areale hypointens, vergleichbar mit Cortex oder isointens zum Liquor der Seitenventrikel (30).

Bis vor wenigen Jahren wurde MS als eine Erkrankung angesehen, die sich exklusiv in der weißen Substanz manifestiert. Durch die Weiterentwicklung der MRT (und die immer besser werdende Auflösung) hat sich gezeigt, dass es auch in der grauen Substanz, kortikal und subkortikal, zu einer Demyelinisierung, axonalem Schaden und Neuronenverlust kommt (31). In konventionellen T₂-gewichteten Aufnahmen werden diese Läsionen

übersehen, weil sie eine längere Relaxationszeit haben als Läsionen der weißen Substanz, was wiederum zu einer schlechten Kontrastierung und einer mangelhaften Darstellung führt (24). Moderne Geräte mit höheren Feldstärken (etwa 3.0 Tesla oder mehr) können bei der Detektion Abhilfe schaffen. Der Einsatz neuer MRT-Technik mit neuen Rechenprogrammen ermöglicht die Erfassung zusätzlicher Vorgänge, wie etwa den Rückgang an Gehirnvolumen.

Der hohe diagnostische Stellenwert der MRT geht aus den ständigen Überarbeitungen der McDonald Kriterien hervor (23,32,33) (s. dazu Tabelle III, McDonald Kriterien (23)).

Tabelle III, McDonald Kriterien 2010 (23)

Klinik	Zusätzlich notwendige Daten zur Diagnostik einer MS
<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 Attacken • Eindeutiger klinischer Beweis für ≥ 2 Läsionen • Eindeutiger klinischer Beweis für 1 Läsion mit klarem Hinweis auf eine vorangegangene Attacke 	Keine
<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 Attacken • Eindeutiger klinischer Beweis für 1 Läsion 	Örtliche Dissemination im ZNS: <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 T₂ Läsion in zumindest 2 von 4 typischen Regionen des ZNS* • oder Abwarten einer weiteren klinischen Attacke mit Dissemination in einer anderen Region des ZNS
<ul style="list-style-type: none"> • 1 Attacke • Eindeutiger klinischer Beweis für ≥ 2 Läsionen 	zeitliche Dissemination: <ul style="list-style-type: none"> • Gleichzeitige Anwesenheit von asymptomatischen Gadolinium-anreichernden und nicht anreichernden Läsionen zu jeder Zeit • oder eine neue T₂ und/oder Gadolinium-anreichernde Läsion/en in der MRT Verlaufsaufnahme, unabhängig von dessen

	<p>zeitlichen Auftreten im Bezug auf den Baseline-Scan</p> <ul style="list-style-type: none"> • oder Abwarten einer zweiten Attacke.
<ul style="list-style-type: none"> • 1 Attacke • Eindeutiger klinischer Beweis für 1 Läsion (clinically isolated syndrome) 	<p>Veränderung über die Zeit und den Raum:</p> <p>für DIS:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 T₂ Läsion in zumindest 2 von 4 typischen MS-Regionen im ZNS* • oder Abwarten einer zweiten klinischen Attacke, eine andere Region im ZNS betreffend <p>für DIT:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gleichzeitige Anwesenheit von asymptomatischen Gadolinium-aufnehmenden und nicht-aufnehmenden zu jeder Zeit, • oder eine neue T₂ und/oder Gadolinium-aufnehmende Läsion/en im Verlaufs-MRT, unabhängig vom Timing im Bezug auf den Baseline-Scan, • oder Abwarten einer zweiten klinischen Attacke
<ul style="list-style-type: none"> • Kontinuierliche neurologische Verschlechterungen mit Verdacht auf MS (PPMS) 	<p>1 Jahr mit fortschreitender Erkrankung (retrospektiv oder prospektiv beurteilt) plus 2 von 3 der folgenden Kriterien:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Beweis von DIS im Gehirn basierend auf ≥ 1 T₂ Läsionen in den MS-charakteristischen Regionen* 2. Beweis einer DIS im Rückenmark basierend auf ≥ 2 T₂ Läsionen 3. Positive Liquor Untersuchung (Oligoklonale Banden und/oder eine Erhöhung des IgG-Wertes)
<p>*(Periventriculär, Juxtacortical, Infratentoriell, oder im Rückenmark), MS = Multiple Sklerose, ZNS = Zentralnervensystem, PPMS = primary progressive multiple sclerosis MRT = Magnetresonanztomographie, DIS = Dissemination in space, DIT = Dissemination in time.</p>	

2.4.2 *Gehirnatrophie*

Eine vereinfachte Vorstellung wäre, dass der Verlust an Myelin in den Läsionen zu einem Rückgang an Gewebenvolumen führt. Die Pathologie dahinter und das Ausmaß der Volumensänderung sind allerdings umfangreicher. Selbst in der weißen Substanz, in der Myelin am konzentriertesten vorkommt, gibt es Axone, Gliazellen, Blutgefäße, Blut und Gewebsflüssigkeit, die bei der Berechnung des Volumens mit einbezogen werden müssen (14). Post mortem durchgeführte histologische Untersuchungen bei MS Patienten haben gezeigt, dass es, neben dem Verlust an Myelin, zu einem neuronalen und axonalen Schaden kommt (10). Des Weiteren sprechen erniedrigte NAA-Werte in den Läsionen per se, aber auch in der gesund erscheinenden weißen Substanz und in der grauen Substanz, wie unten beschrieben, für einen ausgeprägten Neuronen-Untergang (34).

Eine weitere Konsequenz aus dem axonalen Schaden ist eine Waller'sche Degeneration, entlang der axonalen Bahnen. Dabei führt ein Schaden an der Nervenbahn distal der Schädigungsstelle zu einer intrinsischen Degeneration der freistehenden, nicht mehr verbundenen Axone (35). Daher kann man annehmen, dass der axonale Schaden einen zusätzlichen Hauptfaktor in der Entstehung einer Gehirnatrophie darstellt und zwar in zweierlei Hinsicht: 1) Gewebsverlust in der Läsion selbst und 2) Waller'sche Degeneration entlang des Faserverlaufs (14).

Im Gegensatz zum entzündlichen Prozess ist der neuro-axonale Schaden irreversibel und eine verlässliche Messung scheint einen relevanten Marker für die MS Pathologie darzustellen, vor allem in Hinblick auf die Entwicklung einer Behinderung (36).

Für die Messung von Gehirnvolumen kann die MRT in vivo herangezogen werden. Je nach Bedarf und Fragestellung gibt es unterschiedliche Messverfahren. Da es sich bei CIS-Patienten um verhältnismäßig kleine Volumenänderungen über die Zeit handelt, bedarf es sensitiver Messmethoden. Dabei ist es zielführend Verfahren zu wählen, die automatisiert funktionieren um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu erlangen und um zeitraubende Prozesse möglichst zu reduzieren (14). Folgende Tabelle IV gibt einen Überblick über Faktoren, die eine Zu- sowie Abnahme an Gehirnvolumen bedingen.

Tabelle IV, Ursachen für eine Zunahme und eine Abnahme an Gehirnvolumen (36).

Faktoren die eine „Erhöhung“ des Gehirnvolumens bedingen können	Faktoren die eine „Reduktion“ des Gehirnvolumens bedingen können
<ul style="list-style-type: none"> • Ödem • Entzündung • Gliose (Ansammlung von Gliazellen) • Remyelinisierung 	<ul style="list-style-type: none"> • Axonen Verlust • Waller'sche Degeneration • Rückgang der Entzündung und des Ödems • Gliose (Rückzug von Gliazellen und Vernarbung) • Demyelinisierung • Dehydratation • Anti-Inflammatorische Therapie • Normaler Alterungsprozess

2.4.3 Liquor Diagnostik

Wie aus den McDonald Kriterien hervorgeht, bedarf die Diagnostik einer MS prinzipiell keiner zusätzlichen Laboruntersuchungen, sofern neurologische Defizite und verteilte Läsionen (Disseminationen) über die Zeit und den Raum feststellbar sind und etwaige Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden können (37,38). Dennoch wird in der klinischen Praxis oft auf die Liquoranalyse zurückgegriffen um erregerbedingte entzündliche Prozesse (z.B. Neuroborreliose) auszuschließen oder auch um oligoklonalen IgG-Banden nachzuweisen, welche zu einem hohen Prozentsatz (70%) bei der MS zu finden sind (39–41). Bislang existiert kein in der klinischen Routine etablierter Marker der MS. Das wissenschaftliche Interesse daran ist dennoch sehr groß, zumal man sich eine diagnostische und auch prognostische Aussagekraft erhofft.

2.5 Biomarker

Wie bereits erörtert beschränken sich die diagnostischen Maßnahmen auf die MRT und die Liquoranalyse (s. McDonald Kriterien). Prognostisch lassen sich aus diesen Modalitäten nur bedingt und individuell unzureichende Schlüsse ziehen. Aus diesem Grund wurde und wird in den letzten Jahren intensiv an Biomarkern geforscht, um die Differenzierung der einzelnen Verlaufsformen zu verbessern, um einen Prädiktor für eine

Krankheitsprogredienz zu bekommen und um den therapeutischen Erfolg zu objektivieren (42).

2.5.1 *Was ist ein Biomarker?*

Ein Biomarker ist ein Charakteristikum, das objektiv messbar und auswertbar ist, und einen Indikator für einen normalen biologischen Prozess, einen pathogenetischen Prozess oder eine pharmakologische Reaktion auf eine therapeutische Intervention darstellt (43). Die Anforderungen an einen Biomarker sind 1) eine starke Korrelation zwischen dem Biomarker und dem klinischen Endpunkt und, 2) dass der Biomarker den vollen Nettoeffekt einer therapeutischen Intervention auf den wahren klinischen Endpunkt erfasst. Ein klinischer Endpunkt stellt ein klinisch sinnvolles Maß dafür dar, wie ein Patient fühlt, funktioniert oder überlebt (43). Ein Biomarker ist somit idealerweise ein Surrogat, also ein Ersatz für einen klinisch relevanten Endpunkt, der damit auch die Wirkung einer therapeutischen Intervention vorhersagt (43).

Potentielle Biomarker müssen, bis deren klinische Nutzbarkeit erfasst ist, in epidemiologischen Studien und in mehreren Zentren umfassenden doppel-blinden Studien evaluiert werden (43). Realistischerweise muss man davon ausgehen, dass es höchstwahrscheinlich keinen solchen Biomarker gibt, der all die oben angeführten Eigenschaften erfüllt.

2.5.2 *Biomarker bei Multipler Sklerose*

Vor dem Hintergrund der pathophysiologischen Prozesse und der Pathogenese der MS hat man gewisse Surrogat-Marker identifiziert und untersucht, die die unten angeführten Prozesse detektieren könnten (s. Tabelle V, Biomarker für pathogenetische Prozesse bei MS) (19):

- Entzündung und Immundysfunktion in der systemischen Zirkulation und im ZNS
- Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke
- Demyelinisierung
- Remyelinisierung
- Gliose
- **Neurodegeneration** (hier behandelte Marker)

Tabelle V, Biomarker für pathogenetische Prozesse bei MS (19).

Pathogenetischer Prozess	Biomarker (Beispiele)
Entzündung und Immundysfunktion in der systemischen Zirkulation	pro- und antiinflammatorische Zytokine, Zytokinrezeptoren, Chemokine, Antikörper, Komplement bzw. T-Zellen (CD8, CD4, CD45), B-Zellen, Monozyten
Entzündung und Immundysfunktion im ZNS	Zytokine, Zytokinrezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Antikörper gegen multiple ZNS-Antigene, Neopterin, Komplement
Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke	Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM, Selektine, Integrine), Metalloproteinasen (MMP-9, MMP-2, MMP-3, MMP-7), ko-stimulatorische Moleküle (B7-1, B7-2)
Demyelinisierung	Myelinabbauprodukte (MBP, MBP-LM, PLP, MOG)
Remyelinisierung	Wachstumsfaktoren (N-CAM, CNTF, NGF, NT-3, BDNF)
Gliose	Proteine aus Astrozyten (GFAP, S-100b)
<u>Neurodegeneration</u>	Proteine aus Neuronen und Axonen (τ -Protein, NF-L , NF-H , NSE, NAA, 14-3-3)

Wie aus Tabelle V ersichtlich, fokussiert sich die gegenwertige Arbeit auf Aspekte der Neurodegeneration. Darauf soll in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen werden.

2.5.3 Neurodegeneration und Biomarker

Im Zuge der entzündlichen Gewebsschädigung werden Moleküle aus dem neuronalen Zytoplasma, der Membran oder dem Zellkern in die extrazellulären ZNS-Kompartimente ausgeschwemmt. Die nachfolgenden Stoffwechsel-, Transport- und Wiederaufnahmemechanismen, Interaktionen mit dem ZNS-Gewebe und der tatsächliche Gewebeschaden determinieren dabei die Menge dieser Moleküle im Liquor (12). Für

Erkrankungen des Gehirns stellt Liquor somit das Medium der Wahl dar, da er durch den direkten Kontakt mit dem Gewebe pathologische Vorgänge am ehesten reflektiert (44).

In dieser Arbeit wird das Hauptaugenmerk auf drei Marker gelegt, die eine vermehrte Neurodegeneration anzeigen könnten: Neurofilament Heavy Chain (NF-H), Neurofilament Light Chain (NF-L) und N-Acetyl-Aspartat (NAA).

Zwei aktuelle Studien zeigen, dass Neurofilament-Werte bereits in frühen Stadien der Erkrankung erhöht sind (11,13) und weitere Studien mit Bezug auf NAA deuten eher darauf hin, dass es sich um einen Marker für die progressive Form der MS handelt (11). Diese Ergebnisse rechtfertigen eine genauere Erforschung dieser Marker.

2.5.4 Neurofilamente

Neurofilamente (NF) sind der Hauptbestandteil der axonalen Zytoskelett-Proteine und spielen eine entscheidende Rolle in der Stabilisierung des Axons. Man findet NF ausschließlich in Neuronen, was den Rückschluss ermöglicht, dass deren Nachweis im Blut oder im CSF für eine Neuronen-, beziehungsweise spezieller eine Axonschädigung spricht (45), wie sie etwa bei der MS, aber auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen vorkommt (38). Neurofilamente kann man nach ihrem Aufbau, in NF-H (Neurofilament-Heavy-Chain, 190-210 kDa), NF-M (Neurofilament-Medium-Chain, 150 kDa) und NF-L (Neurofilament-Light-Chain, 68 kDa) unterteilen (46).

Jede NF-Untereinheit setzt sich aus einer doppelläufigen Alpha-Helix zusammen, die einerseits durch einen N-Terminus und andererseits durch einen C-Terminus begrenzt werden (46) (s. unten: Abbildung III, Proteinstruktur von NF-H, NF-M und NF-L (44)). Sie sind phosphoryliert und der Grad an Phosphorylierung bestimmt wiederum den Durchmesser des Axons (47). Die kleinste Untereinheit (NF-L) ist am häufigsten und am stärksten löslich, allerdings auch am anfälligsten gegenüber Proteasen (46). NF-H ist ein größeres Molekül, es ist stärker phosphoryliert und stabiler gegenüber Proteasen (48,49). Man geht davon aus, dass NF-H am ehesten einen Indikator für 1) axonalen Schaden darstellt (45), 2) vor allem bei der progressiven Form der MS erhöht ist (50) und 3) mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf eine bleibende Behinderung einhergeht (50).

Im Vergleich zu NF-H diffundiert NF-L aufgrund des niedrigeren Molekulargewichts und/oder der niedrigeren Phosphorylierungsrate eher aus dem Parenchym in den Liquor und kann dort auch schneller abgebaut werden (11).

Neurofilamente dürften damit einerseits Indikatoren für die Krankheitsaktivität, andererseits aber auch für die Neurodegeneration darstellen (50–52). Da diese Prozesse zumindest partiell auch in-vivo anhand der MRT quantifizierbar sind, darf ein Zusammenhang angenommen werden.

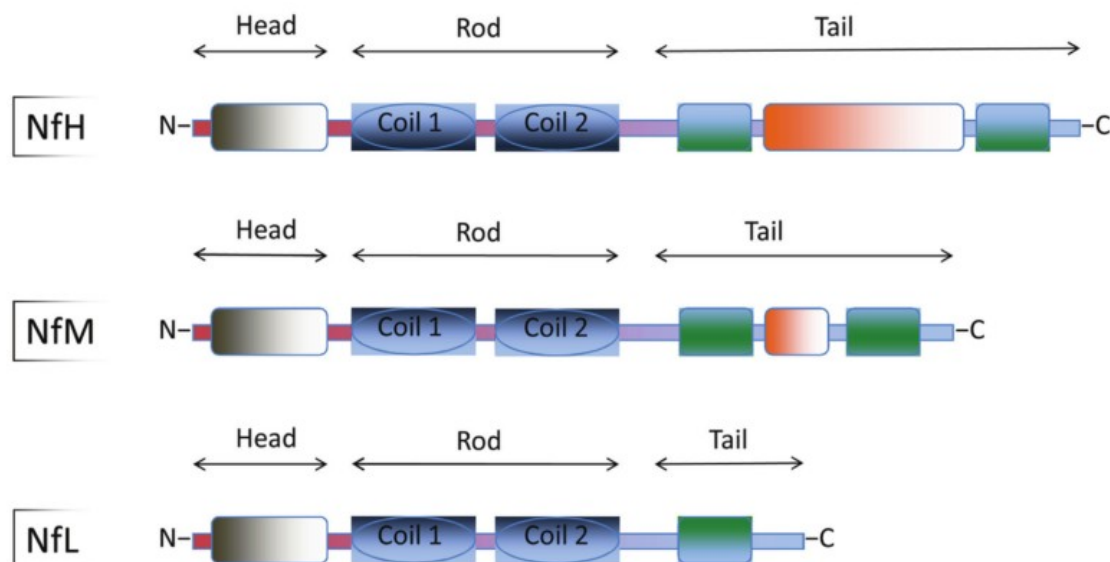


Abbildung III, Proteinstruktur von NF-H, NF-M und NF-L (44).

Eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Neurofilament-Untereinheiten. NF-H: Neurofilament heavy chain; NF-L: Neurofilament light chain; NF-M: neurofilament intermediate chain; N: N-Terminus; C: C-Terminus

2.5.5 N-Acetyl-Aspartat

N-Acetyl-Aspartat (NAA) stellt einen weiteren Indikator für Neurodegeneration dar. NAA ist eine Aminosäure, die nahezu ausschließlich in Neuronen aus Aspartat und Acetyl-Coenzym-A synthetisiert wird (53) (s. Abbildung III & IV, 2D und 3D Struktur von N-Acetyl-Aspartat (54)). Zudem ist es eines der häufigsten Moleküle des ZNS, mit einer Konzentration von bis zu 10 mM in manchen Gehirnarealen (55). NAA wird mit zahlreichen Stoffwechselfvorgängen in Verbindung gebracht, unter anderem mit der Lipid-Biosynthese, der Energiegewinnung im ZNS, der osmotischen Regulation und dem Metabolismus einiger Neurotransmitter (9). Diese Eigenschaften machen NAA zu einem entscheidenden Parameter für die funktionelle Integrität eines Neurons.

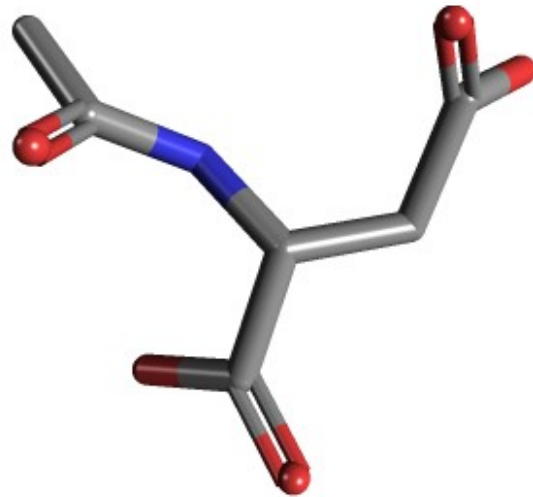
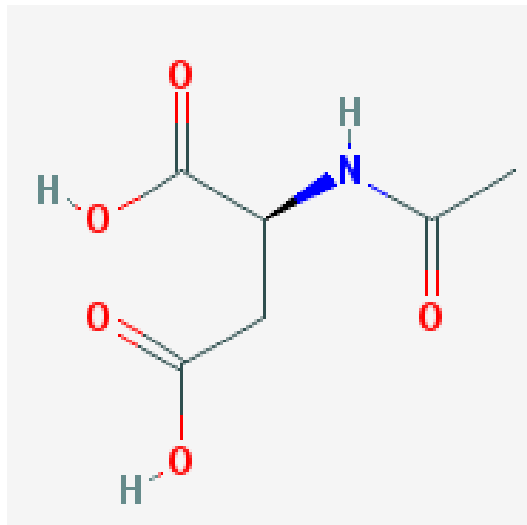


Abbildung IV, 2D-Strukturformel von N-Acetyl-Aspartat (54). Summenformel: $C_6H_9NO_5$,

Abbildung V, 3D-Struktur von N-Acetyl-Aspartat (54).

Einen wissenschaftlichen Nutzen erfüllt NAA unter anderem als Zielmolekül bei der in vivo Magnetresonanzspektroskopie (MRS). Die Signalentstehung bei der MRS stützt sich, im Gegensatz zur MRT, nicht auf Wasserstoffprotonen, sondern auf Protonen anderer gewebebeständiger Moleküle (u.a. Phosphor, Natrium, Kalium, Stickstoff, Kohlenstoff oder Fluor) (56). Dadurch lassen sich Molekülkonzentrationen in bestimmten Gehirnregionen berechnen. Die MRS ist demzufolge eine bildgebende Technik mit der Möglichkeit biochemische Mechanismen in vivo in einem gezielten Volumen darzustellen (56). Dieses Verfahren ermöglicht die Berechnung von NAA in unterschiedlichen Gehirnarealen. Dadurch können über NAA-Reduktionen vermutlich Areale erhöhter axonaler Schädigung nachgewiesen werden (9).

In einer limitierten Anzahl von Studien wurde auch gezeigt, dass die CSF NAA-Werte mit dem Grad neurologischer Behinderung, Gehirnatrophie und mit beschleunigter Krankheitsprogression vergesellschaftet sein könnten (11,57)(57).

3 Hypothesen

Vor dem Hintergrund der erörterten Themen können folgende Hypothesen generiert und getestet werden:

- 1) NF-L, NF-H und NAA im CSF als mögliche Marker einer Neurodegeneration zeigen sich bereits bei CIS-Patienten im Vergleich zu neurologischen Kontrollen verändert.
- 2) Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den Markern, dem klinischem Schweregrad der Erkrankung (gemessen an der EDSS-Skala) und der Krankheitsprogression bereits bei CIS-Patienten.
- 3) MRT-Marker für globale und fokale zerebrale Veränderungen (Läsionslast und Gehirnatrophie) korrelieren mit den untersuchten CSF-Markern.

4 Methodik

4.1 Patienten und Kontrollgruppe

Für diese Studie wählten wir 67 Patienten unserer Multiple Sklerose – Ambulanz mit einem „klinisch isolierten Syndrom“ (CIS-Patienten) hinweisend auf eine MS (22) (Tabelle VI, Demographische und klinische Daten). Diese Patienten unterzogen sich einer genauen klinischen Untersuchung, einer Lumbalpunktion zur Marker-Analyse und einer 3-Tesla MRT Untersuchung. Die gesammelten demographischen und klinischen Daten der Patienten beinhalteten das Alter, das Alter bei klinischer Erstmanifestation, die Krankheitsdauer, den „EDSS-Score“ (58) (Expanded Disability Status Scale, s. unten), das Auftreten von Schüben und die Art der laufenden Therapie.

Ein Schub wurde definiert als Neu- beziehungsweise Wiederauftreten von zumindest einem neurologischen Symptom oder als die Verschlechterung eines bereits bestehenden Symptoms, das für MS typisch ist und für zumindest 24 Stunden anhält. Diesem Zustandsbild musste ein stabiler oder sich verbessernder neurologischer Status für zumindest 30 Tage vorangegangen sein (59).

Klinische Verlaufsdaten (Follow-Up) waren von 46 Patienten vorhanden (Table VI, Demographische und klinische Daten). Keiner der CIS-Patienten hat eine spezifische MS-Therapie zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion erhalten.

Des Weiteren inkludierten wir als Kontrollgruppe 18 Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen, nicht entzündlicher Ätiologie und normalen Liquor-Parametern (Table VI, Demographische und klinische Daten). Diese Gruppe setzte sich zusammen aus zehn Patienten mit Kopfschmerzen, zwei Patienten mit peripherer Fazialisparese, einem Patienten mit Depression, einem Patienten mit Schmerzen, einem Patienten mit einer

Polyneuropathie, einem Patienten mit Schwindel, einem Patienten mit einer peripherer Nervenlähmung und einem Patienten mit subjektiven Sensibilitätsstörungen.

4.2 Patienteneinwilligung

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt. Alle Beteiligten haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

4.3 Die Datenerhebung

4.3.1 Die EDSS

Um den Grad an Behinderung objektivieren zu können bedienen wir uns in dieser Studie der EDSS. Dabei handelt es sich um eine Leistungs-Skala, die den Grad an körperlicher Behinderung bei MS-Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung ermittelt (58). Die Skala beginnt bei 0,0 (keine Beeinträchtigung) und endet bei 10,0 (Tod durch MS). Die Skala berücksichtigt neben den Funktionssystemen Pyramidenbahn, Zerebellum, Hirnstamm, Sensibilität, Blase und Mastdarm, Visus, mentale Funktion und Andere, auch den Grad der Einschränkung des Gehvermögens. Die acht Funktionssysteme (FS) wurden mit 0-6 Punkten bewertet: 0 = normal, 1 = abnorme Zeichen ohne Behinderung, 2 = leichte Behinderung, 3-6 = mäßige bis schwere Behinderung.

Der Grad der Einschränkung des Gehvermögens wird ab einem Wert von 4,0 mit einbezogen. Somit beschreibt eine EDSS von < 4.0 Patienten, die weitgehend uneingeschränkt mobil sind, während Patienten mit einem EDSS ≥ 4.0 in Abhängigkeit von der Einschränkung der Gehstrecke beurteilt werden (19,58) Beispiel (19):

- Eine EDSS von 2,5 bedeutet eine minimale Behinderung in zwei Funktionssystemen (zwei FS 2 Punkte, andere 0 oder 1 Punkt)
- Eine EDSS von 7,0 bedeutet, dass der Patient unfähig ist, mehr als ein paar Schritte zu gehen, an den Rollstuhl gebunden ist, allerdings diesen selbständig fahren kann und etwa 12 Stunden am Tag im Rollstuhl sitzen kann. (mehr als ein FS in Kombination > 4 Punkte, selten ausschließlich nur die Pyramidenbahn 5 Punkte)
- Ein EDSS von 9,5 beschreibt einen bettlägerigen Patienten; unfähig zu kommunizieren, essen/schlucken. (fast alle FS in Kombination > 4 Punkte)

4.3.2 Liquor-Analyse

Bei der Lumbalpunktion wurde eine Gesamtmenge von 6-10 ml Liquor entnommen. Der gewonnene Liquor wurde im Anschluss an die diagnostischen Maßnahmen bis zur folgenden Analyse der Biomarker bei -80 °C gemäß internationalen Richtlinien (60) aufbewahrt. Die Analysen erfolgten an der Abteilung für klinische Chemie und dem Neurologischen Labor der VUMC Amsterdam und im neurologischen Liquorlabor der Medizinischen Universität Graz. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden für diese wissenschaftliche Arbeit zur statistischen Auswertung herangezogen. Alle CSF Analysen wurden von trainierten Technikern und Biochemikern, ohne Zugang zu klinischen Informationen, durchgeführt. Bei 46 Patienten (68,7%) wurde die Lumbalpunktion während dem ersten klinischen Schub durchgeführt. Bei 21 Patienten (31,3%) wurde der Liquor in der Phase der Remission, also nach dem ersten Schub, gewonnen.

NF-H Levels wurde anhand eines, an der VUMC Amsterdam entwickelten, Multiplex-Assay's gemessen (61). Alle Analysen wurden in zweifacher Ausführung und normalisiert durchgeführt. Der Inter-Assay Variationskoeffizient betrug 17,9% und der Intra-Assay-Variationskoeffizient betrug 3,9%. Der Hook-Effekt (62), der durch Neurofilament Aggregate verursacht wird, konnte durch zusätzliche Verdünnung der Proben reduziert werden, was wiederum eine genauere Bewertung des Immunoassays ermöglichte.

Die NF-L (Neurofilament Light Chain) Konzentrationen wurden mit einem kommerziell nutzbaren ELISA Kit von Uman-Diagnostics AB (63) berechnet. Dieser ELISA Kit wurde unlängst im Rahmen von mehreren Zentren umfassenden Studien evaluiert (64). Aufgrund eines Mangels an CSF-Material wurden die NF-L Konzentrationen von 47 Patienten und 15 Kontrollpatienten untersucht.

Die NAA Werte wurden mittels massenspektrometrischer Isotopenverdünnungsanalyse ermittelt (11,57).

4.3.3 Die MRT-Datenerhebung

Alle Patienten unterzogen sich einer 3 Tesla MRT Untersuchung am selben Gerät nach identem Protokoll an der Abteilung für Neuroradiologie Graz (Siemens Tim Trio, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Es wurde mit einer 12 Kanal Kopfspule gearbeitet (65,66). Zwischen der Lumbalpunktion und der MRT lag ein mittleres Zeitintervall von 3,2 (IQR 1,2-6,2) Monaten. Eine Verlaufs-MRT (Follow-Up), mit identem Protokoll am

selben Gerät wurde bei 28 Patienten nach einem Jahr durchgeführt (s. Tabelle VI, Demographische und klinische Daten). Die MRT-Bildaufnahmen wurden, geblindet zur klinischen Information, nach entsprechendem Training von Diplomanten unter Supervision erfahrener Beurteiler ausgewertet. Die hyperintense T_2 Läsionslast wurden wie unten beschrieben ermittelt. Das Gehirnvolumen (normiert auf die Kopfgröße des Patienten), das Volumen der grauen Substanz, der weißen Substanz, der kortikalen grauen Substanz und des ventrikulären Liquors wurden mit dem Programm SIENAX, das einen Teil der FSL-Software darstellt (67), berechnet.

4.3.4 T_2 -Läsions Segmentierung und Volumetrie

Um einen Zusammenhang der Läsionslast mit den erhobenen Daten festzustellen und um eine Änderung der Läsionslast über die Zeit ermitteln zu können, musste von jedem Patienten das Gesamtvolumen der Läsionen gemessen werden. Bei denjenigen Patienten mit vorhandener Follow-Up-Aufnahme wurden die beiden Ergebnisse gegenübergestellt. Mit einer Modifikation des Programms „DISPImage“ (DISPImage Version 5.0, (C) 2004-2009, S. Ropele, MedUniGraz) wurden die Läsionen markiert, automatisch Masken erstellt und deren Fläche mit der Schichtdicke multipliziert (s. Abbildung VI, MRT in Transversalebene, ROI).

Intra-Rater-Reliabilität: Um ein möglichst hohes Maß an Objektivität zu gewährleisten wurden alle Läsionen unter Supervision von derselben Person ausgewertet.

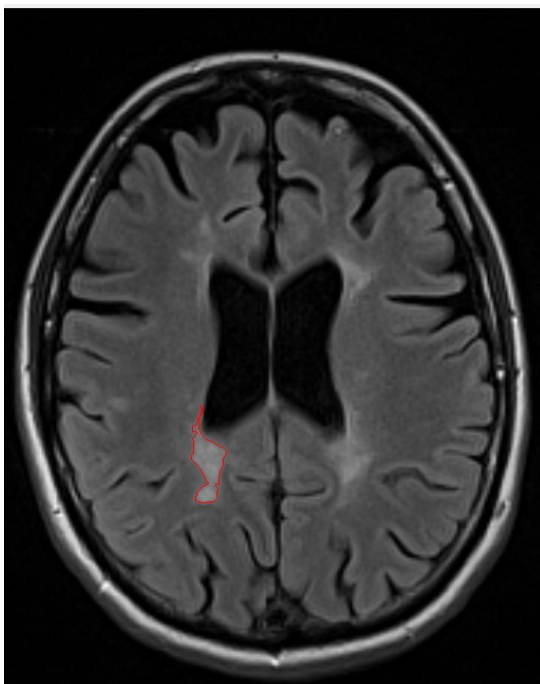


Abbildung VI, MRT in Transversalebene, ROI.

T_2 -Gewichtete Aufnahme in FLAIR-Sequenz. Die Läsionen wurden für jede Schicht manuell markiert und automatisch umrahmt (Regions of Interest, ROIs). Aus der Summe der ROIs konnte die Läsionslast errechnet werden.

4.3.5 Die Messung des Gehirnvolumens

Zur Berechnung des Gehirnvolumens wurde das Programm SIENAX® (Structural Image Evaluation, Using Normalisation, of Atrophy for Cross-sectional measurement) (67,68) eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein Programm des FSL-Software Pakets der Universität Oxford (67,69). Im ersten Schritt führt SIENAX eine Segmentierung durch und trennt das Gehirngewebe von anderen Strukturen (68). Das dabei generierte Bild des Gehirns wird mit einer 152 Bilddaten umfassenden Datenbank (MNI152) verglichen (70,71), um das Gehirnvolumen normalisiert auf die Schädelgröße errechnen zu können. Im nächsten Schritt werden aus einer Gewebs-Typ-Segmentierung die Teilvolumen geschätzt (72) um daraus schlussendlich das gesamte Gehirnvolumen zu ermitteln. Dieser Prozess liefert gleichzeitig separate Volumendaten für die graue Substanz, weiße Substanz, periphere graue Substanz und den ventrikulären Liquor (66). Die verwendete Einheit ist Kubikmillimeter (mm^3).

4.4 Statistische Verfahren

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm SPSS 18.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov Tests wurde die Normalverteilung der Daten überprüft. Die Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test verglichen. Wir verwendeten den T-Test um das mittlere Alter der einzelnen Gruppen untereinander zu vergleichen. Die Spearman-Korrelationen dienten zur Ermittlung des Korrelationskoeffizienten zwischen dem CSF, den Bildern und den klinischen Daten. Pearson's partieller Korrelationstest wurde bei Rangvariablen angewandt um die Ergebnisse für das Alter zu korrigieren.

5 Ergebnisse

5.1 Demographische und klinische Charakteristiken

Die CIS-Patienten und die Kontrollgruppe hatten nahezu dasselbe Durchschnittsalter und dieselbe Geschlechtsverteilung (s. Tabelle VI, Demographische und klinische Daten). Im Mittel waren die CIS-Patienten 33.3 Jahre alt, wobei die Krankheitsdauer im Schnitt 0.3 Monate betrug. Die ermittelte EDSS bei Lumbalpunktion war 1.0, folglich bestand

mehrheitlich keine körperliche Behinderung und es waren nur minimale Symptome in einem Funktionssystem vorhanden. Von 46 Patienten gab es nach durchschnittlich 2.3 Jahren Verlaufsuntersuchungen (FU, Follow-UP), 69.6% davon waren weiblich. 17 (37%) dieser Patienten hatten in diesem FU-Zeitraum einen weiteren Schub und wurden somit RRMS diagnostiziert. Von 28 Patienten (64.3% weiblich) wurde nach durchschnittlich einem Jahr eine FU-MRT durchgeführt.

Table VI, Demographische und klinische Daten

	CIS	Kontrollgruppe	p-value
N (% weiblich)	67 (70.1)	18 (66.7)	n.s.
Alter bei der Lumbalpunktion (in Jahren) *	33.4 (9.9)	34.7 (13.9)	n.s.
Alter bei Krankheitsbeginn (in Jahren) *	33.3 (9.9)	NA	
Krankheitsdauer bei Lumbalpunktion (in Monaten) **	0.3 (0.2-1.3)	NA	
EDSS bei LP in Remission **	1.0 (0.0-2.0)	NA	
N (% weiblich) mit klinischem FU	46 (69.6)	NA	
Klinisches FU (in Jahren) **	2.3 (1.4-3.4)	NA	
EDSS bei FU in Remission **	1.0 (0.0-2.0)	NA	
N (%) Patienten, die während des FU-Zeitraums zu einer RRMS transformierten	17 (37.0)	NA	
N (% weiblich) mit einem FU – MRT	28 (64.3)	NA	
MRT FU (in Jahren) **	1.0 (1.0-1.1)	NA	

N – Zahl der Patienten/Kontrollgruppe; LP – Lumbalpunktion; EDSS – expanded disability status scale; FU – Follow-Up; CIS – Clinically Isolated Syndrome; RRMS – Relapsing Remitting Multiple Sklerose; NA – nicht anwendbar; Werte werden als Zahlen dargestellt (%); * Mittelwert (Standard Deviation) oder ** Median (Quartilsabstand).

5.2 CSF NF- und NAA-Werte im Liquor bei CIS-Patienten im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Der mediane Wert des im CSF gemessenen NF-L war bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom 2.3-mal und der mittlere NF-H Wert 1.5-mal höher (NF-L: 1228.0 (IQR: 687.0-3015.0) ng/L; NF-H: 710.4 (IQR: 440.7-1381.1) pg/mL) als im Vergleich mit Patienten der

Kontrollgruppe (NF-L: 532.0 (IQR: 378.0-777.0) ng/L; NF-H 469.5 (IQR: 373.6-718.7) pg/mL). Die NAA Werte unterschieden sich nicht signifikant (NAA 0.446 (IQR: 0.363-0.544) $\mu\text{mol/L}$) (s. Abbildungen VII-IX).

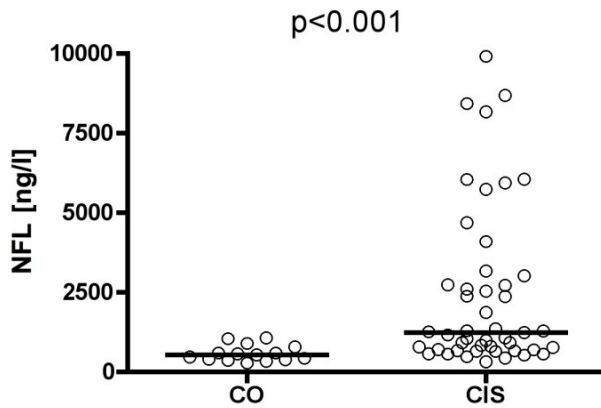


Abbildung VII, NFL im Vergleich zwischen CIS-Patienten (CIS) und Kontrollpatienten (CO) (78). ($p < 0.001$)

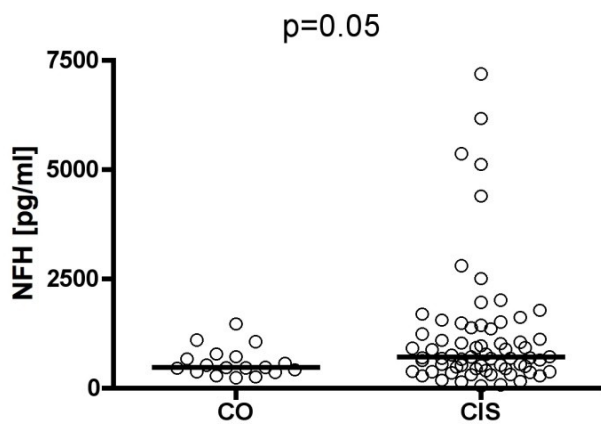


Abbildung VIII, NFH im Vergleich zwischen CIS-Patienten (CIS) und Kontrollpatienten (CO) (78). ($p = 0.05$)

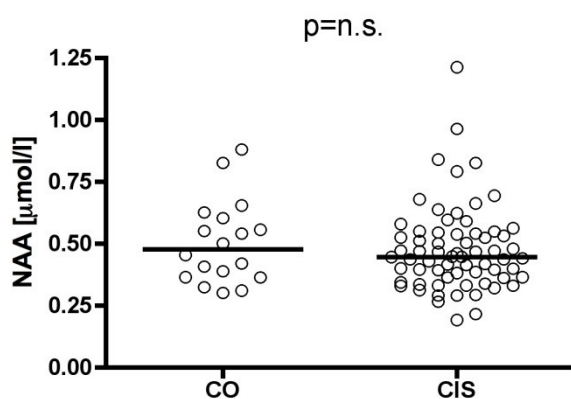


Abbildung IX, (78) NAA im Vergleich zwischen CIS-Patienten (CIS) und Kontrollpatienten (CO). ($p = \text{n.s.}$)

Abbildungslegende zu Abb. VII-IX: CO = Kontrollpatienten, CIS = CIS-Patienten, schwarze Linie = Median; Kreise = Proben, p = Wahrscheinlichkeit, n.s. = nicht signifikant

5.3 NF-H, NF-L, NAA und Krankheitsaktivität

Die CSF-Werte für NF-H, NF-L und NAA der Patienten in Remission unterschieden sich nicht signifikant von den Patienten, die sich in einem akuten Schub befanden (nicht abgebildet).

Die NF-H-, NF-L- und NAA-Werte der CIS-Patienten, die im Verlauf der Studie einen weiteren Schub erlitten, waren mit den Werten der Patienten ohne neuerlichen Schub, nicht signifikant verändert (kein Diagramm).

5.4 NF-H, NF-L, NAA und Alter

In der Kontrollgruppe korrelierten die Werte von NF-L ($r=0.929$, $p<0.001$) und NF-H ($r=0.713$, $p<0.005$) mit dem Alter. Bei Patienten mit klinisch isolierten Syndrom war die Korrelation für NF-H ($r=0.325$, $p<0.01$) weniger stark ausgeprägt und für die NF-L Werte ($r=0.145$, $p>0.05$) nicht vorhanden. Die NAA Werte korrelierten zur Zeit der Lumbalpunktion nicht mit dem Alter.

5.5 NF-H, NF-L, NAA und neurologische Beeinträchtigung

Die EDSS bei der ersten Bewertung korrelierte mit den NF-H- ($r=0.362$, $p<0.01$), NF-L- ($r=0.324$, $p<0.05$) und NAA- ($r=0.284$, $p<0.05$) Werten. Nach der Anpassung der Ergebnisse mit dem Alter blieb die Korrelation für NF-H ($r=0.304$, $p<0.05$; angepasst an das Alter) und NAA ($r=0.308$, $p<0.05$; angepasst an das Alter) bestehen.

5.6 NF-H, NF-L, NAA und MRT-Parameter

Die NAA und NF-Werte wiesen keine signifikanten Korrelationen mit dem im Baseline-MRT gemessenen, normalisierten Volumen des gesamten Gehirns, der grauen Substanz, der weißen Substanz, der kortikalen grauen Substanz und dem ventrikulären Liquor (adaptiert an das Alter) auf.

Höhere NF-H Werte korrelierten allerdings mit einer beschleunigten Volumenreduktion des Gehirns, über einen mittleren zeitlichen Abstand von 1.0 Jahren ($r=-0.518$, $p<0.01$; adaptiert an das Alter) (Abbildung X, Zusammenhang der NF-H-Werte der CIS-Patienten

mit einer Reduktion an Gehirnvolumen (78)). Es zeigten sich weder signifikante Korrelationen der NF-L, NF-H und NAA Werte mit dem T₂-Läsionsvolumen bei Erstuntersuchung, noch über den FU-Zeitraum.

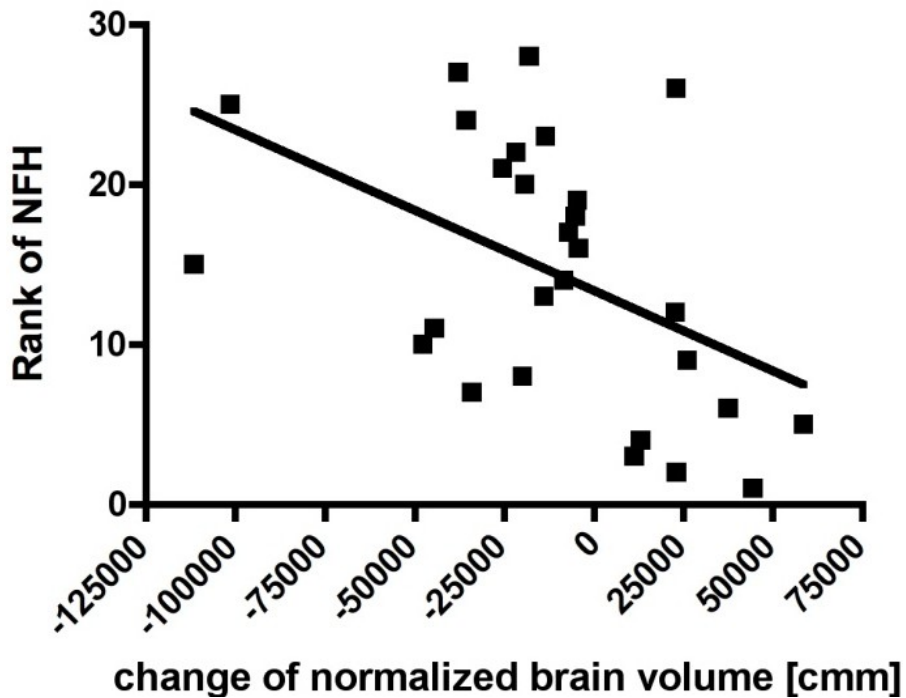


Abbildung X: Zusammenhang der NF-H-Werte der CIS-Patienten mit einer Reduktion an Gehirnvolumen (78).

6 Diskussion

6.1 Allgemeine Zielsetzungen

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin Marker für Neurodegeneration in Hinblick auf deren klinische Nutzbarkeit zu überprüfen. Dazu wurden quantitative MRT-Parameter, wie die Läsionslast und das Gehirnvolumen, sowie klinische Daten (u.a. EDSS-Skala) mit den Liquor-Markern von CIS-Patienten verglichen. Folgende Hypothesen wurden dazu von uns überprüft:

1. NF-L, NF-H und NAA im CSF als mögliche Marker einer Neurodegeneration zeigen sich bereits bei CIS-Patienten im Vergleich zu neurologischen Kontrollen verändert.
2. Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den Markern, dem klinischem Schweregrad der Erkrankung (gemessen an der EDSS-Skala) und der Krankheitsprogression bereits bei CIS-Patienten.
3. MRT-Marker für globale und fokale zerebrale Veränderungen (Läsionslast und Gehirnatrophie) korrelieren mit den untersuchten CSF-Markern.

1) NF-L, NF-H und NAA bei CIS- und Kontroll-Patienten

Wie bereits früher beschrieben sind Neurofilamente die bedeutendsten axonalen Zytoskelett-Proteine (12). Kommt es zu einem axonalen Schaden, werden diese Proteine in den freien Extrazellularraum ausgeschwemmt und gelangen daraufhin in den Liquor und den peripheren Blutkreislauf (46). Ihre Konzentration in Blut und Liquor wäre damit ein Indikator für den axonalen Schaden.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass NF-H und NF-L im Liquor bereits bei CIS-Patienten erhöht sein können. Dies deutet darauf hin, dass es bereits in einem sehr frühen Stadium der Erkrankung zu einer Erhöhung der Neurofilamente kommen kann, womit wir auch zwei bereits publizierte Studien bestätigen (11,13). Neuro-pathologische Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, dass es schon sehr früh zu einem derartigen Gewebsschaden kommen kann (4). Dienlich für weitere Studienzwecke einerseits und zur einfacheren Verlaufskontrolle andererseits, wäre die Bestimmung der NF-Werte aus dem

peripheren Blut. Zwei Studien zeigten, dass NF-H bereits aus dem Blut bestimmt werden kann (3,73). Bezüglich der NF-L Werte gibt es noch keine derartigen Publikationen.

Das Potential der Neurofilamente als klinischer Marker bei MS zeigt sich in zwei weiteren Studien. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass Neurofilamente aus dem Liquor einen Indikator für einen positiven Effekt bei der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Natalizumab darstellen (74) und gleichzeitig auch einen neurotoxischen Effekt durch zu aggressive Behandlungsregime anzeigen können (75).

N-Acetyl-Aspartat stellt einen weiteren Marker für einen neuro-axonalen Schaden dar (12). Man vermutet, dass neuronal synthetisiertes NAA über Astrozyten in das Blut gelangt (55,76). Es gibt bereits mehrere Studien, die zeigen, dass eine Erhöhung der Serum- und Liquor NAA-Werte vergesellschaftet ist mit einem höheren Grad an Behinderung bei Patienten mit RRMS (57,77). In unserer Studie waren die Liquor NAA-Werte der CIS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht erhöht. Dies bestätigt wiederum vergangene Studien, die erhöhte NAA-Werte erst in späteren Stadien der MS, etwa bei der SPMS, zeigten (11).

2) *NF-L, NF-H und NAA in Bezug auf Krankheitsprogression, neurologische Beeinträchtigung und Alter*

In unserer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen den NF-H Werten und dem, über den Verlauf von einem Jahr gesehenen, Rückgang an Gehirnvolumen festgestellt werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass man die im Liquor gemessenen NF-H Werte mit einem progressiven axonalen Gewebeschaden in Verbindung bringen kann.

Außerdem hat sich gezeigt, dass NF-L und NF-H aber nicht die NAA, mit der Leukozytenzahl im Liquor zu korrelieren scheinen (78). NF-L und NF-H könnten daher mit einer entzündlichen Krankheitsaktivität vergesellschaftet sein (79,80). Ähnliche Ergebnisse konnten bereits bezüglich der NF-L Werte (81), aber nicht bezüglich der NF-H-Werte (13) und NAA-Werte (11,57) erzielt werden.

In der Kontrollgruppe konnten wir einen engen Zusammenhang der NF-L und NF-H Werte mit dem Alter erkennen. Diese Korrelation war für die NF-H-Werte, bei CIS-Patienten, weniger stark und für die NF-L-Werte überhaupt nicht vorhanden. In Übereinstimmung mit einer kürzlich erschienen Publikation (13), kann man aus diesen Untersuchungen schlussfolgern, dass die sich über Lebensjahre verändernden NF-Werte im Liquor mit einer altersbedingten Neurodegeneration vergesellschaftet sind. Im Kontrast dazu scheint dieser

„Alterungseffekt“ durch pathologische Prozesse kaschiert zu werden, bei denen der zusätzliche Gewebeschaden zu noch höheren NF-Werten im Liquor führt. Aufgrund des Zusammenhangs der NF-Werte mit dem Alter muss man, um bei statistischen Auswertungen ein adäquates, klinisch brauchbares Ergebnis zu erhalten, die Variablen einer Korrektur unterziehen (13). Nach der Anpassung der Daten an das Alter der Patienten, wurden die NF-H- und NAA-Werte mit dem jeweiligen EDSS-Score (ermittelt bei Patienten unter Remission nach der ersten Attacke) verglichen. Es bestand eine Korrelation, allerdings war diese nicht sehr ausgeprägt. Ähnliche Resultate ergaben sich bei diversen anderen Untersuchungen (11,13,75,80). Bezüglich NF-L fand sich bei uns keine Korrelation mit dem EDSS-Score, was wiederum die Ergebnisse anderer Studien kontrastiert (11,81). Allerdings müssen unsere Ergebnisse diesbezüglich differenziert betrachtet werden, da die Kohorte an CIS-Patienten mit erfasstem EDSS-Score relativ klein war und bei CIS-Patienten der EDSS ohnehin im Mittel niedriger ist als bei Patienten mit einer fortgeschrittenen MS, wodurch sich bei den Ergebnissen nur eine geringe Spannweite ergibt. Daher sind statistische Aussagen diesbezüglich nur bedingt zulässig und betreffen auch nur CIS-Patienten und nicht das gesamte MS-Kollektiv.

Bezüglich der NAA-Werte konnten keine Gruppenunterschiede festgestellt werden. Allerdings korrelieren höhere NAA-Werte mit dem EDSS-Score. Dies spricht für eine zeitliche Dynamik der NAA-Werte, wie bereits zuvor beschrieben wurde (9). Während in frühen Phasen der Erkrankung die Liquor NAA-Werte bei axonalem Schaden erhöht sind, sind diese Werte im fortgeschrittenen Stadium reduziert (11,57).

3) *In der MRT ermittelte morphologische Veränderungen und CSF-Marker*

Eine wichtige Erkenntnis unserer Studie ist, dass NF-H bei CIS-Patienten einen Indikator für eine Volumenreduktion darzustellen scheint, und das in einem verhältnismäßig kurzem Zeitraum von nur einem Jahr. In der Literatur findet sich bis dato kein derartiges Ergebnis. Eine Studie beschreibt einen Zusammenhang mit dem Liquor/Serum Index von Antikörpern gegen die NF-L-Proteine (anti-NF-L) und einer Gehirnatrophie. Allerdings inkludiert diese Studie keine CIS-Patienten, sondern nur Patienten mit RRMS, SPMS und PPMS und es konnte auch kein Zusammenhang mit NF-Proteinen per se festgestellt werden (82). Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass es keine signifikante Korrelation zwischen NAA- und NF-Werten und der im Baseline-MRT gemessenen Gehirnvolumina gibt. Des Weiteren konnte kein untersuchter Marker mit der T2-Läsionslast in Verbindung

gebracht werden, weder in der Baseline-, noch in der Follow-Up Aufnahme. Was sich allerdings gezeigt hat und damit eine neue Entdeckung darstellt, ist, dass die NF-H Werte signifikant mit einer beschleunigten Volumenreduktion des Gehirns über den von uns gemessenen Zeitraum von einem Jahr in Zusammenhang gebracht werden können.

Der Stellenwert der Gehirnatrophie als Parameter für eine Krankheitsprogression ist aktuell noch nicht eindeutig belegt. Tatsächlich könnte das Atrophie-Ausmaß einen nützlichen prognostischen Parameter bei CIS-Patienten oder in frühen MS-Phasen darstellen, in Hinblick auf die neurologische Beeinträchtigung und Geschwindigkeit der Krankheitsprogression. Dazu benötigt es allerdings noch längere Follow-Up Untersuchungen in Zusammenhang mit klinischen Charakteristika in diesen Kohorten (36). In unserer Studie konnte keiner der im Liquor gemessenen Marker für axonalen Schaden in Zusammenhang mit der T2 Läsionslast gebracht werden, weder im Baseline-MRT, noch im Follow-Up-MRT. Dies kontrastiert zum Teil das Ergebnis einer anderen Studie mit einer kombinierten Studienpopulation aus CIS-Patienten und Patienten mit manifester MS, bei der die NF-L Werte auch mit der Zahl der T2-Läsionen im Zusammenhang zu stehen scheinen (11). Generell muss man allerdings sagen, dass die Läsionslast und damit die statistische Spannweite bei CIS Patienten generell niedriger ist als bei Patienten mit einer manifesten MS, ähnlich den Ergebnissen in Zusammenhang mit der EDSS.

Charakteristisch sind bei der MS fokale demyelinisierende Läsionen der weißen Substanz. Alleine diese scheinen jedoch nicht für die zunehmende körperliche und kognitive Beeinträchtigung verantwortlich zu sein. Die primär progrediente Form der MS ist zum Beispiel charakterisiert durch ein hohes Maß an Behinderung zu einem verhältnismäßig gering ausgeprägten Grad an Läsionen der weißen Substanz (83). Betrachtet man auch die kognitive Beeinträchtigung, wie sie bei 40-60% der MS Patienten vorkommt, kann diese nicht alleine auf die Läsionen der weißen Substanz zurückgeführt werden (84).

4) *Allgemeine Schlussfolgerung*

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Analyse beider NF-Einheiten (NF-L und NF-H) im Liquor bei CIS-Patienten von Relevanz ist, weil deren Bedeutung bei klinischen und paraklinischen Befunden unterschiedlich ist. Während NF-L mehr als NF-H auf einen entzündlichen Prozess hindeutet, wie etwa deren Zusammenhang mit der Leukozytenzahl im Liquor und dem IgG-Index zeigen, spiegelt NF-H eher den chronischen axonalen Schaden und die Neurodegeneration wider. Dieser ist wiederum vergesellschaftet mit dem

Grad der neurologischen Beeinträchtigung (vgl. EDSS-Score) und dem Verlust an Gehirnvolumen über einen gewissen Zeitraum. Daher könnte eine Analyse der NF-Werte aus dem Liquor von CIS-Patienten bei der Wahl der richtigen Therapiestrategie eine Rolle spielen, insbesondere bei Patienten mit einem aggressiven Krankheitsverlauf. Des Weiteren gibt es bereits Ergebnisse für NAA-Marker aus dem Liquor in Zusammenhang mit dem axonalen Schaden bei der gesicherten und den progressiven Formen der MS (11). Unsere Studie hat ergeben, dass NAA eine untergeordnete Rolle bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom spielt. Bis dato existieren jedoch kaum Daten wie sich die NAA-Werte in bereits sehr frühen Phasen der MS und bei CIS-Patienten verhalten und inwiefern diese mit gehirnmorphologischen Veränderungen, wie etwa der Gehirnatrophie und der Läsionslast, zusammenhängen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass hinter den besprochenen Markern ein großes Potential, vor allem hinsichtlich prognostischer Möglichkeiten, steckt. Bis es allerdings zu einer klinischen Einsetzbarkeit kommen kann, ist noch einiges an Forschungsarbeit notwendig, unter anderem mit längeren Untersuchungszeiträumen und deren Analyse in randomisierten klinischen Studien.

7 Referenzen

1. Schünke M, Schulte E, Schuhmacher U. Prometheus, Kopf und Neuroanatomie. 1. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2006. p. 420.
2. Klinker R. Reizverarbeitung in neuronalen Netzwerken. In: Klinker R, Pape H, Silbernagel S, editors. Physiologie. 4. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2005. p. 611ff.
3. Petzold A, Brassat D, Mas P, Rejdak K, Keir G, Giovannoni G, et al. Treatment response in relation to inflammatory and axonal surrogate marker in multiple sclerosis. Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England). 2004 Jun;10(3):281–3.
4. Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. Brain : a journal of neurology. 2002 Oct;125(Pt 10):2202–12.
5. Rovaris M, Gambini A, Gallo A, Falini A, Ghezzi A, Benedetti B, et al. Axonal injury in early multiple sclerosis is irreversible and independent of the short-term disease evolution. Neurology. 2005 Nov 22;65(10):1626–30.
6. Wattjes MP, Harzheim M, Lutterbey GG, Klotz L, Schild HH, Träber F. Axonal damage but no increased glial cell activity in the normal-appearing white matter of patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy. AJNR. American journal of neuroradiology. 2007 Sep;28(8):1517–22.
7. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain : a journal of neurology. 2009 May;132(Pt 5):1175–89.
8. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. The New England journal of medicine. 1998 Jan 29;338(5):278–85.
9. Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. Annals of neurology. 2000 Dec;48(6):893–901.
10. Van Waesberghe JH, Kamphorst W, De Groot CJ, van Walderveen MA, Castelijns JA, Ravid R, et al. Axonal loss in multiple sclerosis lesions: magnetic resonance imaging insights into substrates of disability. Annals of neurology. 1999 Nov;46(5):747–54.
11. Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, Brundin L, Norgren N, Koel-Simmelink MJ a, et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. Neurology. 2009 Apr 14;72(15):1322–9.

12. Teunissen CE, Dijkstra C, Polman C. Biological markers in CSF and blood for axonal degeneration in multiple sclerosis. *Lancet neurology*. 2005 Jan;4(1):32–41.
13. Kuhle J, Leppert D, Petzold A, Regeniter A, Schindler C, Mehling M, et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 2011 Apr 5;76(14):1206–13.
14. Miller DH, Barkhof F, Frank J a, Parker GJM, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain : a journal of neurology*. 2002 Aug;125(Pt 8):1676–95.
15. Wiendl H, Weißert R, Limmroth V, Hohlfeld R. Multiple Sklerose und andere demyelinisierende Erkrankungen. In: Brandt T, Dichgans J, Diener H, editors. *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*. 5. Auflage. Stuttgart: Kohlhammer; 2007. p. 654 ff.
16. Baumhackl U, Eibl G, Ganzinger U, Hartung HP, Mamoli B, Pfeiffer KP, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Austria. Results of a nationwide survey. *Neuroepidemiology*. 2002;21(5):226–34.
17. Kurtzke JF. Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta neurologica Scandinavica*. 1980 Aug;62(2):65–80.
18. Kurtzke JF, Hyllested K. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and epidemiological features. *Annals of neurology*. 1979 Jan;5(1):6–21.
19. Schmidt R, Hoffmann F. *Multiple Sklerose*. 5. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; 2012. p. 120ff.
20. Masuhr K, Neumann M. *Multiple Sklerose*. Neurologie. 6. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2007. p. 300ff.
21. Ramagopalan S V, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet neurology*. 2010 Jul;9(7):727–39.
22. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen J a, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2008 Nov;14(9):1157–74.
23. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen J a, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011 Feb;69(2):292–302.
24. Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen I V, Revesz T. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1999 Jan;122 (Pt 1):17–26.

25. Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, et al. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2010 Feb 2;74(5):427–34.
26. Rocca M a, Agosta F, Sormani MP, Fernando K, Tintorè M, Korteweg T, et al. A three-year, multi-parametric MRI study in patients at presentation with CIS. *Journal of neurology*. 2008 May;255(5):683–91.
27. Baumhackl U. Multiple Sklerose - Erkennen und Behandeln in der klinischen Praxis. 1. Auflage. Bremen: Uni-Med; 2009. p. 95.
28. Reimer P, Parizel P, Meaney J, Stichnoth F. *Clinical MR Imaging*. 3. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2010. p. 850, 171ff.
29. Hajnal J V, Bryant DJ, Kasuboski L, Pattany PM, De Coene B, Lewis PD, et al. Use of fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) pulse sequences in MRI of the brain. *Journal of computer assisted tomography*. 16(6):841–4.
30. Uhlenbrock D, Forsting M. MRT und MRA des Kopfes: Indikationsstellung ; Wahl der Untersuchungsparameter; Befundinterpretation. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2006. p. 486.
31. Calabrese M, Filippi M, Gallo P. Cortical lesions in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*. 2010 Aug;6(8):438–44.
32. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2001 Jul;50(1):121–7.
33. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Annals of neurology*. 2005 Dec;58(6):840–6.
34. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Archives of neurology*. 2001 Jan;58(1):65–70.
35. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of neuroinflammation*. 2011 Jan;8:110.
36. Anderson VM, Fox NC, Miller DH. Magnetic resonance imaging measures of brain atrophy in multiple sclerosis. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. 2006 May;23(5):605–18.
37. Awad A, Hemmer B, Hartung H-P, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. Elsevier B.V.; 2010 Feb 26;219(1-2):1–7.

38. Deisenhammer F, Egg R, Giovannoni G, Hemmer B, Petzold A, Sellebjerg F, et al. EFNS guidelines on disease-specific CSF investigations. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2009 Jun;16(6):760–70.
39. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *Journal of neuroimmunology*. 2006 Nov;180(1-2):17–28.
40. Petzold A. Intrathecal oligoclonal IgG synthesis in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2013 Jul 25;
41. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology*. 2005 Jun;62(6):865–70.
42. Tumani H, Hartung H-P, Hemmer B, Teunissen C, Deisenhammer F, Giovannoni G, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*. 2009 Aug;35(2):117–27.
43. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*. 2004 Jul;127(Pt 7):1463–78.
44. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2012 May;18(5):552–6.
45. Gresle MM, Shaw G, Jarrott B, Alexandrou EN, Friedhuber A, Kilpatrick TJ, et al. Validation of a novel biomarker for acute axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroscience research*. 2008 Dec;86(16):3548–55.
46. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *Journal of the neurological sciences*. 2005 Jun 15;233(1-2):183–98.
47. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science (New York, N.Y.)*. 1998 Jan 23;279(5350):514–9.
48. Goldstein ME, Sternberger NH, Sternberger LA. Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis. *Journal of neuroimmunology*. 1987 Mar;14(2):149–60.
49. Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 1998 Jan;61:1–23.
50. Petzold a, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RHC, Polman CH, et al. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2005 Feb;76(2):206–11.

51. Dujmovic I. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers of neuroaxonal damage in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis international*. 2011 Jan;2011:767083.
52. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1998 Mar;64(3):402–4.
53. Bjartmar C, Battistuta J, Terada N, Dupree E, Trapp BD. N-acetylaspartate is an axon-specific marker of mature white matter in vivo: a biochemical and immunohistochemical study on the rat optic nerve. *Annals of neurology*. 2002 Jan;51(1):51–8.
54. Wang Y, Xiao J, Suzek TO, Zhang J, Wang J, Zhou Z, et al. PubChem’s BioAssay Database. *Nucleic acids research*. 2012 Jan;40(Database issue):D400–12.
55. Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, Namboodiri AM a. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Progress in neurobiology*. 2007 Feb;81(2):89–131.
56. Ross B, Bluml S. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain. *The Anatomical record*. 2001 Apr;265(2):54–84.
57. Jasperse B, Jakobs C, Eikelenboom MJ, Dijkstra CD, Uitdehaag BMJ, Barkhof F, et al. N-acetylaspartic acid in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients determined by gas-chromatography-mass spectrometry. *Journal of neurology*. 2007 May;254(5):631–7.
58. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444–52.
59. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907–11.
60. Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, et al. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*. *AAN Enterprises*; 2009 Dec 1;73(22):1914–22.
61. Kester MI, Scheffer PG, Koel-Simmelink MJ, Twaalfhoven H, Verwey NA, Veerhuis R, et al. Serial CSF sampling in Alzheimer’s disease: specific versus non-specific markers. *Neurobiology of aging*. 2012 Aug;33(8):1591–8.
62. Lu C-H, Kalmar B, Malaspina A, Greensmith L, Petzold A. A method to solubilise protein aggregates for immunoassay quantification which overcomes the neurofilament “hook” effect. *Journal of neuroscience methods*. Elsevier B.V.; 2011 Feb 15;195(2):143–50.

63. Uman Diagnostics AB [Internet]. [cited 2012 Jan 23]. Available from: www.umandiagnosics.com
64. Petzold A, Altintas A, Andreoni L, Bartos A, Berthele A, Blankenstein MA, et al. Neurofilament ELISA validation. *Journal of immunological methods*. 2010 Jan 31;352(1-2):23–31.
65. Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, Tscherner M, Wallner-Blazek M, Jehna M, et al. Quantitative assessment of brain iron by R(2)* relaxometry in patients with clinically isolated syndrome and relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple sclerosis Houndmills Basingstoke England*. 2009 p. 1048–54.
66. Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, Petrovic K, Loitfelder M, Tscherner M, et al. Cognitive impairment in relation to MRI metrics in patients with clinically isolated syndrome. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2011 Feb;17(2):173–80.
67. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, Johansen-Berg H, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage*. 2004;23 Suppl 1:S208–S219.
68. Smith SM. Fast robust automated brain extraction. *Human brain mapping*. 2002 Nov;17(3):143–55.
69. Analysis Group, FMRI, Oxford U. FMRI Software Library v5.0 [Internet]. 2012 [cited 2012 Feb 1]. Available from: www.fmrib.ox.ac.uk/fsl
70. Jenkinson M, Bannister P, Brady M, Smith S. Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *NeuroImage*. 2002;17:825–41.
71. Jenkinson M, Smith S. A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Medical Image Analysis*. 2001;5:143–56.
72. Zhang Y, Brady M, Smith S. Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Transactions on Medical Imaging*. 2001;20:45–57.
73. Petzold A, Rejdak K, Plant GT. Axonal degeneration and inflammation in acute optic neuritis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2004 Aug;75(8):1178–80.
74. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Annals of neurology*. 2011 Jan;69(1):83–9.
75. Petzold A, Mondria T, Kuhle J, Rocca MA, Cornelissen J, te Boekhorst P, et al. Evidence for acute neurotoxicity after chemotherapy. *Annals of neurology*. 2010 Dec;68(6):806–15.

76. Benarroch EE. N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate: neurobiology and clinical significance. *Neurology*. 2008 Apr 15;70(16):1353–7.
77. Tortorella C, Ruggieri M, Di Monte E, Ceci E, Iaffaldano P, Drenzo V, et al. Serum and CSF N-acetyl aspartate levels differ in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011 Dec;82(12):1355–9.
78. Khalil M, Enzinger C, Langkammer C, Ropele S, Mader A, Trentini A, et al. CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2013 Apr 23;19(4):436–42.
79. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1998 Mar;64(3):402–4.
80. Lim ET, Sellebjerg F, Jensen C V, Altmann DR, Grant D, Keir G, et al. Acute axonal damage predicts clinical outcome in patients with multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2005 Oct;11(5):532–6.
81. Norgren N, Sundström P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology*. 2004 Nov 9;63(9):1586–90.
82. Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RHC, Silber E, Sharief M, Thompson EJ, et al. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology*. 2003 Jan 28;60(2):219–23.
83. Sanfilippo MP, Benedict RHB, Weinstock-Guttman B, Bakshi R. Gray and white matter brain atrophy and neuropsychological impairment in multiple sclerosis. *Neurology*. 2006 Mar 14;66(5):685–92.
84. Molyneux PD, Kappos L, Polman C, Pozzilli C, Barkhof F, Filippi M, et al. The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on Interferon beta-1b in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2000 Nov;123 (Pt 1):2256–63.

8 Permissions

Abbildung XI, Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis (44)

The screenshot shows the RightsLink interface. At the top left is the Copyright Clearance Center logo. The main header features the SAGE logo and the RightsLink logo. Navigation buttons for 'Home', 'Create Account', and 'Help' are in the top right. The central area displays the following metadata:

- Title:** Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis:
- Author:** Charlotte E Teunissen, Michael Khalil
- Publication:** Multiple Sclerosis
- Publisher:** SAGE Publications
- Date:** May 1, 2012
- Copyright © 2012, SAGE Publications

To the right is a login form with fields for 'User ID' and 'Password'. It includes an 'Enable Auto Login' checkbox, a 'LOGIN' button, and a 'Forgot Password/User ID?' link. Below the form is a note: 'If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to learn more?' with a 'learn more?' link.

Gratis

Permission is granted at no cost for sole use in a Master's Thesis and/or Doctoral Dissertation. Additional permission is also granted for the selection to be included in the printing of said scholarly work as part of UMI's "Books on Demand" program. For any further usage or publication, please contact the publisher.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2013 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com

Abbildung XII, CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome. (78)

The screenshot shows the RightsLink interface. At the top left is the Copyright Clearance Center logo. The main header features the SAGE logo and the RightsLink logo. Navigation buttons for 'Home', 'Create Account', and 'Help' are in the top right. The central area displays the following metadata:

- Title:** CSF neurofilament and N-acetylaspartate related brain changes in clinically isolated syndrome:
- Author:** M Khalil, C Enzinger, C Langkammer, S Ropele, A Mader, A Trentini, MLG Vane, M Wallner-Blazek, G Bachmaier, J-J Archelos, MJA Koel-Simmelink, MA Blankenstein, S Fuchs, F Fazekas, CE Teunissen
- Publication:** Multiple Sclerosis
- Publisher:** SAGE Publications
- Date:** Apr 1, 2013
- Copyright © 2013, SAGE Publications

To the right is a login form with fields for 'User ID' and 'Password'. It includes an 'Enable Auto Login' checkbox, a 'LOGIN' button, and a 'Forgot Password/User ID?' link. Below the form is a note: 'If you're a copyright.com user, you can login to RightsLink using your copyright.com credentials. Already a RightsLink user or want to learn more?' with a 'learn more?' link.

Gratis

Permission is granted at no cost for sole use in a Master's Thesis and/or Doctoral Dissertation. Additional permission is also granted for the selection to be included in the printing of said scholarly work as part of UMI's "Books on Demand" program. For any further usage or publication, please contact the publisher.

BACK

CLOSE WINDOW

Copyright © 2013 Copyright Clearance Center, Inc. All Rights Reserved. [Privacy statement](#).
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at customercare@copyright.com