

Immunmonitoring von Patienten mit schubförmig-remittierender
Multipler Sklerose unter Therapie mit Interferon-beta 1b
(Betaferon®)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Jasmin Tofighi
aus Wuppertal

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
-Neurologische Klinik-
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps
des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. P. Oschmann

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Pralle

Tag der Disputation: 13. Oktober 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Multiple Sklerose als Krankheitsbild	1
1.1.1	Ätiologie und Epidemiologie	1
1.1.2	Klinische Symptome und Verlauf	3
1.1.2.1	Klinische Symptome.....	3
1.1.2.2	Verlaufsformen.....	4
1.1.2.3	Prognose.....	5
1.1.3	Diagnostik	5
1.1.3.1	Diagnosestellung und Diagnosekriterien.....	6
1.1.3.2	Zusatzuntersuchungen	6
1.1.3.2.1	Evozierte Potentiale	6
1.1.3.2.2	Magnetresonanztomographie (MRT).....	7
1.1.3.2.3	Liquorbefunde	8
1.1.3.3	Differentialdiagnose der Multiplen Sklerose.....	9
1.1.3.4	Beurteilung des Verlaufs und der Krankheitsaktivität	9
1.1.4	Therapie	10
1.1.4.1	Symptomatische Therapie.....	10
1.1.4.1.1	Glukokortikoid-Therapie im akuten Schub.....	11
1.1.4.2	Kausale Therapie.....	11
1.1.4.2.1	Immunsupprimierende Therapie.....	12
1.1.4.2.2	Immunmodulierende Therapie	12
1.1.4.2.2.1	Therapie mit Interferon-beta	13
1.1.5	Pathogenese.....	14
1.1.5.1	Pathologie und Histologie	14
1.1.5.2	Das Tiermodell der Multiplen Sklerose: Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis (EAE)	14
1.1.5.3	Immunpathologie	15
1.1.5.3.1	Pathomechanismen im Schub	15
1.2	Die Bedeutung und Funktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen	17
1.2.1	Adhäsionsmoleküle	17
1.2.2	Proinflammatorisch wirkende Zytokine.....	19
1.2.3	Antiinflammatorisch wirkende Zytokine	20

1.3	Zielsetzung	21
2	Material und Methode	22
2.1	Patienten und Probenmaterial	22
2.1.1	Therapierte Patienten und nicht therapierte Patienten	22
2.1.2	Probenmaterial.....	23
2.2	Bestimmung der Zytokine und Adhäsionsmoleküle mittels Enzyme-Linked-Immuno Sorbent Assay (ELISA)	23
2.2.1	Testprinzip.....	23
2.2.2	Testablauf	24
2.3	Magnetresonanztomographie (MRT)	25
2.3.1	Methodik.....	26
2.3.2	Auswertung der MRT-Bilder	26
2.3.2.1	Aktivität der Entzündungsherde im MRT.....	29
2.4	Statistische Analyse der Ergebnisse	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Analyse des Patientenkollektivs	30
3.1.1	Analyse der demographischen Daten	30
3.1.2	Darstellung der Krankheitsverläufe der MS-Patienten	33
3.2	Analyse der Verläufe der Konzentration von Zytokinen bzw. Adhäsionsmolekülen	37
3.2.1	Adhäsionsmoleküle	38
3.2.2	Proinflammatorische Zytokine	42
3.3	Analyse der seriell angefertigten Magnetresonanztomographien	48
3.3.1	Anzahl und Fläche der Herde	49
3.3.2	Anzahl und Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung	50
3.3.3	Anzahl und Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem	52
3.4	Einteilung der Patientengruppen nach definierten Kriterien der Krankheitsaktivität	53
3.4.1	Einteilung nach der Aktivität der Erkrankung anhand der jährlichen Schubrate.....	54
3.4.2	Einteilung nach der Aktivität der Erkrankung mittels Magnetresonanztomographie	54

3.5	Korrelation der Zytokine und Adhäsionsmoleküle mit der Aktivität der Erkrankung.....	55
3.5.1	Korrelation der Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Serum mit der Aktivität der Erkrankung anhand der jährlichen Schubrate.....	56
3.5.2	Korrelation der Konzentration der Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der Aktivität der Erkrankung in der Magnetresonanztomographie	63
4	Diskussion	71
4.1	Bewertung der Methodik	71
4.1.1	Bewertung des Studiendesigns	71
4.1.2	Bewertung der angewendeten statistischen Verfahren	73
4.1.3	Bewertung der quantitativen Messung der immunologischen Parameter mittels ELISA-Tests	73
4.1.4	Bewertung der Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität	75
4.1.5	Bewertung der Magnetresonanztomographie	76
4.1.6	Beurteilung der MRT-Auswertung	77
4.2	Bewertung der immunologischen Marker als Parameter der klinischen und subklinischen Krankheitsaktivität.....	78
4.2.1	Adhäsionsmoleküle	79
4.2.2	Proinflammatorische Zytokine	83
4.2.3	Antiinflammatorische Zytokine.....	87
4.3	Bewertung der immunologischen Marker als prognostischen Wert für den Therapieerfolg.....	89
4.4	Ausblick.....	91
5	Zusammenfassung	93
6	Literaturverzeichnis.....	96
7	Anhang	109
7.1	Tabellen.....	109
7.2	Graphiken	126
7.3	Protokolle	136
7.3.1	Protokoll zur Durchführung des sICAM-1 und des sICAM-3 ELISA.....	136
7.3.2	Protokoll zur Durchführung des sVCAM-1 ELISA.....	137

7.3.3	Protokoll zur Durchführung des IL-10 ultra-sensitive und des IL-4 ultra-sensitive ELISA.....	138
7.3.4	Protokoll zur Durchführung des IFN-gamma ELISA	139
7.3.5	Protokoll zur Durchführung des TNF-beta ELISA.....	140
7.3.6	Protokoll zur Durchführung des sTNF-R I/ sTNF-R II ELISA.....	141
7.4	Herstellernachweis.....	142
7.5	Abkürzungsverzeichnis.....	144
Lebenslauf.....		147
Beteiligung an wissenschaftlichen Arbeiten.....		149
Danksagung		154

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose als Krankheitsbild

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine schubförmige oder chronisch progredient verlaufende, multifokale, entzündliche Entmarkungskrankheit von Gehirn und Rückenmark unbekannter Ätiologie [1]. Die MS betrifft überwiegend jüngere Menschen und führt schon relativ bald bei den Betroffenen zu einer bleibenden Behinderung. Die Erstbeschreibung dieser Erkrankung erfolgte jedoch nicht aus klinischer, sondern aus neuropathologischer Sicht durch Cruveilhier 1835 [2]. Die maßgebende Kennzeichnung der Krankheit erfolgte von Jean Martin Charcot (1825-1893, Paris), der 1868 MS-Herde mikroskopisch und makroskopisch beschrieb. Charcot stellte den Myelinverlust fest und vermutete daraufhin, daß die Impulse über die nackten Axone nicht weitergeleitet werden könnten.

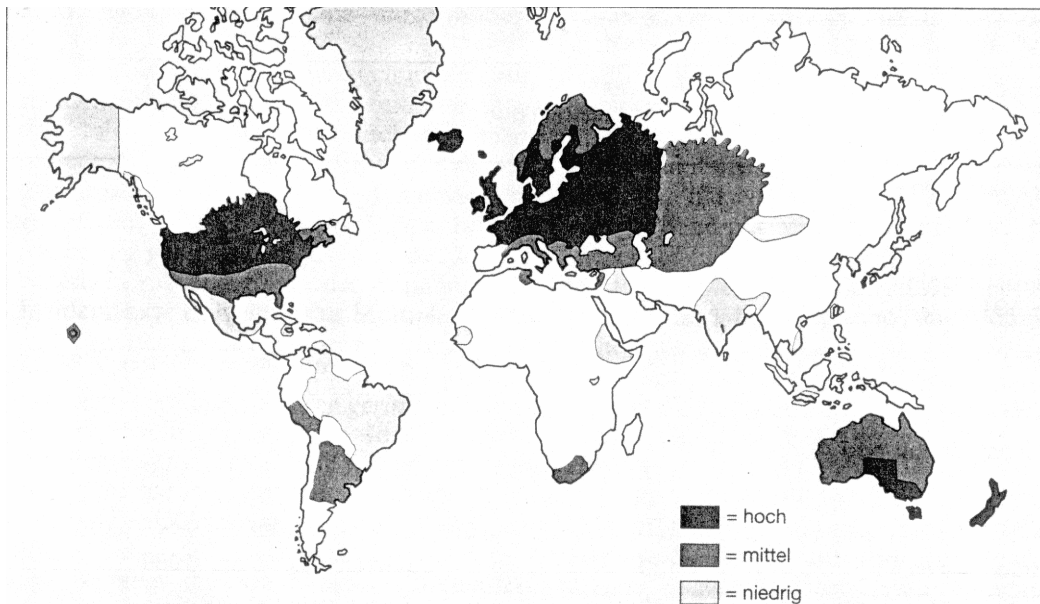
Die MS wird nach dem heutigen Wissenstand als eine Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) angesehen, dabei kommt der Erforschung des neuroimmunologischen Geschehens eine besondere Bedeutung zu.

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Betrachtet man die weltweite Verteilung der MS (s. Abb. 1-1) so fällt ein Zusammenhang zwischen geographischen Breitengraden und der Prävalenz auf. Die Krankheit hat eine Prävalenz von weniger als 1 pro 100000 Einwohner in äquatorialen Gebieten, von ca. 6 bis 14 pro 100000 Einwohner südlich und von ungefähr 30 bis 80 pro 100000 Einwohner nördlich des Äquators [3]. In Deutschland beträgt die Prävalenz nach neusten Erkenntnissen ca. 149 auf 100000 Einwohner [4]. Die Prävalenz der MS ist nicht nur in den verschiedenen geographischen Regionen, sondern auch bei verschiedenen Völkern unterschiedlich: die Erkrankung scheint mit größerer Häufigkeit bei der kaukasischen weißen Bevölkerung aufzutreten [5].

Mehrere epidemiologischen Studien konnten zeigen, daß Emigranten einer "Hochrisikozone" in eine "Niedrigrisikozone" wenigstens einen Teil des Erkrankungsrisikos ihres Ursprungslandes mitbrachten.

So fand sich bei Auswanderern, die nach ihrem 15. Lebensjahr aus einem Land mit niedriger Prävalenz emigrierten, die gleiche Prävalenz an Multipler Sklerose wie im Ursprungsland. Bei Personen, die im jüngeren Alter emigrierten, nahmen dagegen das Risiko des Gastlandes an [6]. Kurtzke et al. bestätigten das mit steigenden geographischen Breitengraden zunehmende Risiko an einer Multiplen Sklerose zu erkranken [3].

Abbildung 1-1: Demographische Verteilung der MS nach Kurtzke

(Heckel R (1994): Multiple Sklerose: Klinik-Differentialdiagnose-Behandlung. Thieme Verlag, Stuttgart)

Die Inzidenz der Erkrankung beträgt ca. 3/100000 Einwohner. Für Frauen ist sie 2-3 mal höher als für Männer. Etwa 2/3 der Erkrankungen beginnen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Der altersspezifische Verlauf des Krankheitsbeginns ähnelt denen vieler Infektionskrankheiten.

Eine familiäre Neigung zur Multiplen Sklerose ist inzwischen gesichert. Sadovnick et al. (1988) konnten in einer Studie zeigen, daß in fast 20% aller Fälle auch ein Verwandter betroffen war. Das größte Risiko bestand dabei für Geschwister. Zwillingsstudien sprechen ebenfalls für eine genetische Prädisposition der Erkrankung. So beträgt die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen 26%, die Konkordanzrate dizygoter Zwillinge entspricht der von normalen Geschwistern [7]. Der Befund, daß bestimmte Histokompatibilitätsantigene (HLA) bei MS-Patienten häufiger sind als bei gesunden Personen, legt ebenfalls einen genetischen Faktor bei der Entstehung der Multiplen Sklerose nahe. Die stärkste Assoziation besteht mit dem HLA-DR 2 oder HLA-DR 3 Antigen [8]. Das Vorhandensein dieses "Markers" soll das individuelle Risiko um den Faktor 3-5 steigern [9].

Diese aus epidemiologischen und genetischen Studien gewonnenen Erkenntnisse sprechen für eine multifaktorielle Genese der Erkrankung, wobei neben einer genetischen Prädisposition auch ethnische Unterschiede und "Umweltfaktoren" eine Rolle spielen [10].

Heute wird allgemein angenommen, daß bei Personen mit einer besonderen, bisher nicht eindeutig identifizierten, genetischen Prädisposition (s.o.) eine nicht näher klassifizierbare Virusinfektion in der Kindheit zu einer Sensibilisierung des Immunsystems führt. Im Rahmen einer sekundären Autoimmunreaktion, die nach Jahren der Latenz die Krankheit entweder hervorrufen oder ursächlich zu ihrer Manifestation beitragen kann, werden dann die Myelinscheiden angegriffen und schließlich zerstört.

1.1.2 Klinische Symptome und Verlauf

Die Multiple Sklerose ist die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters. Die Erkrankung ist in ihrer Ausprägung sehr vielgestaltig; sie kann praktisch alle, aus Läsionen im ZNS begründbaren, neurologischen Ausfälle verursachen [2]. Diese Vielfältigkeit der Symptome beruht auf der unterschiedlichen Lage der Entmarkungsherde in der weißen Substanz. Die Krankheit beginnt häufig mit Gefühls- und Sehstörungen, Schwäche der Extremitäten und Gleichgewichtsstörungen. Die beschriebenen Symptome sind anfangs oft isoliert (monosymptomatisch), können aber auch kombiniert auftreten.

1.1.2.1 Klinische Symptome

Die oft nur sehr schwach ausgeprägten und passager auftretenden Erstsymptome einer MS sind vielen Patienten in der Regel nicht mehr erinnerlich, worauf unterschiedliche Angaben über die Häufigkeit von Erstsymptomen in der Literatur beruhen.

Tabelle 1-1: Häufigkeit verschiedener Symptome bei Erstmanifestation und im weiteren Verlauf

Symptome	Erstmanifestation in %	Verlauf in %
Paresen	44	81
Spastik, Babinski-Phänomen	28	79
Sensible Störungen	42	83
Optikusstörungen	33	60
Gleichgewicht, Koordination	24	75
Augenmotalität	14	34
Blase, Darm, Sexualfunktion	9	57
Hirnleistung, Affekt	4	39

(Lehrbuch für Neurologie, K. Kunze, Thieme Verlag, Stuttgart, 1992)

Häufig auftretende Symptome sind spastische Paresen mit kloniformen Reflexen und positivem Babinski-Phänomen, Parästhesien, Hypästhesien oder Störungen des Lageempfindens. Charakteristisch ist auch das "Lhermitt-Phänomen": bei forcierten Vorbeugen des Kopfes treten für die Dauer von wenigen Sekunden Parästhesien im Rücken oder in den Extremitäten auf.

Störungen des visuellen Systems äußern sich oft in Form einer Retrobulbärneuritis, internukleären Ophthalmoplegie oder Blickparesen mit Nystagmus.

Hinzu kommen zerebelläre Symptome wie Gang- oder Standataxie, Intentionstremor, Dysdiadochokinese und skandierender Sprache. Dabei wird die Kombination von skandierender Sprache, Intentionstremor und Nystagmus auch nach ihrem Erstbeschreiber als "Charcot-Trias" bezeichnet.

Vegetative Symptome treten in Form von Blasenentleerungsstörungen, Stuhlinkontinenz und Sexualstörungen auf. In späteren Stadien der Erkrankung kann es zu Hirnleistungsstörungen sehr unterschiedlicher Art kommen, z.B. Störungen des Kurzzeitgedächtnisses, der Konzentrationsfähigkeit und der Auffassungsgabe.

Für die Quantifizierung der Ausfälle sind verschiedene Skalen erarbeitet worden, so z.B. die Bronx-Skala oder der EDSS (Expanded disability status scale) nach J.F. Kurtzke [11]. Die Bewertung wird dabei auf der Grundlage von 8 funktionellen Systemen vorgenommen (pyramidale, zerebelläre, sensorische und visuelle Funktion, Hirnstammfunktion, Darm- und Blasenfunktion, mentale oder zerebrale Funktion, andere Funktionen). Dabei wird der Schweregrad der neurologischen Ausfälle in den einzelnen Funktionssystemen des ZNS in Schritten von je 0,5 Punkten bewertet. Basierend auf den Ergebnissen, die in den funktionellen Systemen erzielt wurden, wird die Behinderung auf einer Skala von 0 (neurologischer Normalbefund) bis 10 (Tod infolge MS) ausgedrückt (s. Tabelle 7-1).

1.1.2.2 Verlaufsformen

Ein Charakteristikum der MS ist das Vorkommen der Symptome in Schüben, sowie deren Rückbildung (Remission). Dabei ist der Schub definiert als das Auftreten neuer oder die Verschlechterung bereits bestehender Symptome mit einer Mindestdauer von 24 Stunden, ohne das Auftreten von Fieber [12]. Diese Schübe müssen von "Pseudoschüben" oder Exazerbationen abgegrenzt werden, wie sie leicht im Rahmen eines Infektes, begleitet durch Fieber, auftreten können [13]. Etwa 80% der Erkrankung beginnen mit Schüben, wobei mit zunehmender Krankheitsdauer die Häufigkeit von Schüben abnimmt [1].

Es werden 3 Verlaufsformen der Multiplen Sklerose unterschieden. Bei dem schubförmig-remittierenden Verlauf kommt es jeweils zwischen den Schüben zu einer mehr oder weniger vollständigen Rückbildung der Symptome. Es können jedoch auch Ausfallerscheinungen eines Schubes als Residuen bestehenbleiben, die bei den Betroffenen mit den Jahren zu einer wachsenden Behinderung führen können. Ca. 68-85% der Patienten weisen zu Beginn

meist einen schubförmig-remittierenden Verlauf auf. Nach Jahren der Krankheitsdauer kann sich ein sekundär chronisch progredienter Verlauf entwickeln [14]. Dabei steht das Fortschreiten der Erkrankung im Vordergrund, einzelne Schübe können jedoch noch ablaufen. Die dritte Verlaufsform ist der primär chronisch progrediente Verlauf. Dieser ist gekennzeichnet durch ein von Beginn andauerndes Fortschreiten der Erkrankung, ohne daß es dabei zu Schüben kommt [15, 16]. Nur 10-20% der Betroffenen leiden unter diesem Verlauf. Die betroffenen Patienten haben ein höheres Erkrankungsalter und die Behinderung schreitet schneller fort. Wegen dieser Besonderheiten wird der primär chronisch progrediente Verlauf von manchen Autoren auch als eigenständiges Krankheitsbild betrachtet [17].

1.1.2.3 Prognose

Man kann die Verläufe der MS auch nach ihrer Prognose klassifizieren. Dann spricht man von einer gutartigen (benignen) oder bösartigen (malignen) Verlaufsform. Bei der gutartigen Form kommt es über Jahre betrachtet nur zu wenigen Schüben mit einer geringen bleibenden Behinderung [18].

Von den o.a. Verlaufsformen hat der schubförmig-remittierende Verlauf die beste Prognose. Ebenso besteht ein Zusammenhang zwischen den Erstsymptomen und der Prognose. So haben Patienten, bei denen zu Beginn eine Optikusneuritis oder Sensibilitätsstörungen auftreten, eine bessere Prognose als Patienten, deren Initialsymptome aus pyramidalen oder zerebellären Symptomen bestehen [19, 20].

Untersuchungen haben ergeben, daß nach einer isoliert auftretenden Optikusneuritis als Erstsymptom das Risiko, eine Multiple Sklerose zu entwickeln, zwischen 13-80% beträgt [21, 22]. Sind zu diesem Zeitpunkt zusätzlich zu den klinischen Symptomen bereits entzündliche Liquorveränderungen oder kernspintomographische Nachweise einer MS möglich, liegt das Risiko bei über 80%.

Patienten mit nur sehr wenigen Schüben in der Krankheitsgeschichte haben eine bessere Prognose [23], ebenso Patienten mit einem langen Intervall zwischen den ersten beiden Schüben [24].

Kurtzke et al. errechneten eine mittlere Lebenserwartung nach Krankheitsbeginn von ca. 30 Jahren [25, 26].

Valide prognostische Kriterien über den Krankheitsverlauf existieren bisher leider nicht.

1.1.3 Diagnostik

Zu Beginn der Erkrankung kann die Diagnosestellung der Multiplen Sklerose oft schwierig sein. So beträgt der Zeitraum zwischen den ersten Symptomen und der Diagnosestellung ungefähr 2 Jahre. Dies liegt oftmals an den zu Beginn der Erkrankung unspezifischen und

flüchtigen Symptomen. Heute erleichtern jedoch die Magnetresonanztomographie und standardisierte diagnostische Kriterien das Erkennen der Erkrankung. Standardisierte diagnostische Kriterien dienen u.a. dazu, die Wahrscheinlichkeit der Diagnose als klinisch eindeutig, wahrscheinlich oder möglich einzustufen [27].

1.1.3.1 Diagnosestellung und Diagnosekriterien

Die Diagnose "Multiple Sklerose" wird durch die Anamnese, die klinische neurologische Untersuchung sowie durch apparative und laborchemische Zusatzuntersuchungen gestellt. Alle diagnostischen Kriterien beruhen auf der Forderung der "Dissemination der Herde in Ort und Zeit", d.h. es sollten mehrere Schübe abgelaufen sein, die auf mehrere Herde im ZNS schließen lassen.

Die Poser-Kriterien (s. Tabelle 7-2), welche auch Befunde apparativer Untersuchungen (paraklinische Befunde) in die Diagnosestellung mit einbeziehen [28] sind als eine Weiterentwicklung der Schumacher-Kriterien von 1965 zu verstehen, die ausschließlich auf Anamnese und klinischen Befund beruhen [29].

1.1.3.2 Zusatzuntersuchungen

Nach den Poser-Kriterien sind die elektrophysiologischen Untersuchungen (evozierte Potentiale), bildgebende Verfahren (MRT) und Liquoruntersuchungen als Erweiterung der klinischen Untersuchung zu betrachten.

1.1.3.2.1 Evozierte Potentiale

Mit Hilfe dieser elektrophysiologischen Untersuchungen kann man die Leitgeschwindigkeit der Impulse in bestimmten Bahnsystemen messen. Aus der Leitungsverzögerung können Rückschlüsse auf Entmarkungsherde an bestimmten Stellen des ZNS gezogen und damit Hinweise auf die Lokalisation einer Schädigung gewonnen werden [30]. Von besonderer Bedeutung für die Diagnostik ist die Möglichkeit, auf diese Weise klinisch stumme Herde entdecken zu können. In der MS-Diagnostik haben sich vor allem die motorisch evozierten Potentiale (MEP), die visuell evozierten Potentiale (VEP), die somatosensibel Potentiale (SSEP), und die früh akustisch evozierten Potentiale (FAEP) durchgesetzt. Verzögerte evozierte Potentiale sind jedoch nicht typisch für eine MS; sie sind aber hilfreich beim Ausschluß verschiedener Differentialdiagnosen.

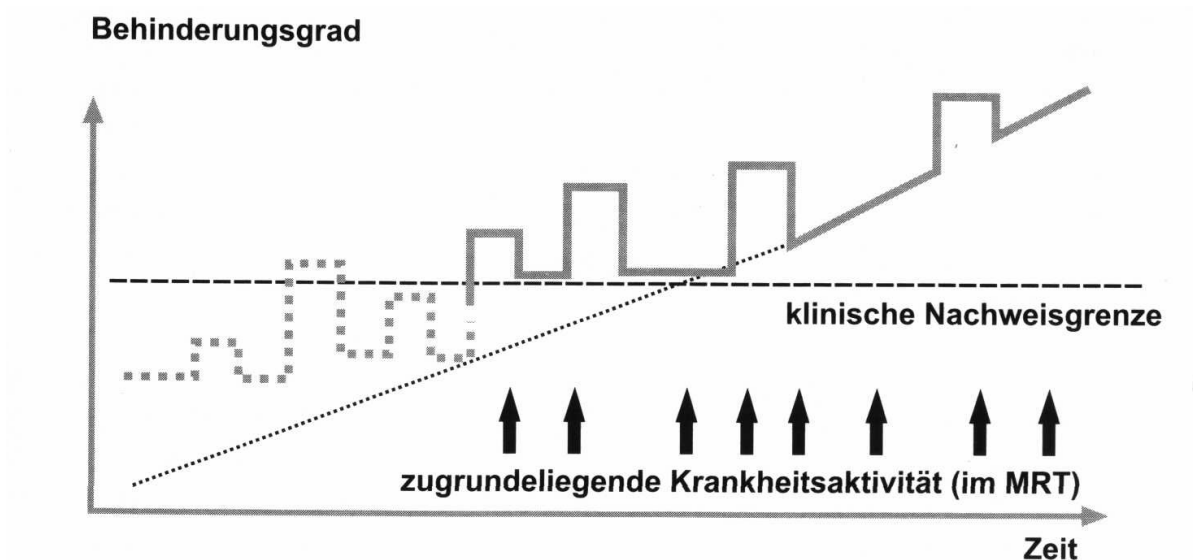
Ein Vergleich neurophysiologischer Untersuchungsmethoden mit der Kernspintomographie bei MS-Patienten ergab pathologische Befunde in dieser Reihenfolge: MRT 88%, MEP 83%, VEP 67%, SEP 63% und FAEP 42% [31].

1.1.3.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Schon bald nach der Einführung der Kernspintomographie zeigte sich, daß mit dieser Untersuchung die substantiellen Veränderungen bei Multipler Sklerose deutlicher als zuvor dargestellt werden konnten [32]. Im wesentlichen zeigen sich bei der Multiplen Sklerose die durch Entzündungsherde bedingten periventrikulären Entmarkungszonen in der MRT.

Wie bei den oben dargestellten apparativen Zusatzuntersuchungen gilt auch hier, daß die kernspintomographischen Veränderungen unspezifisch sind und nur im Rahmen der übrigen Befunde gewertet werden können. 90-97% der Patienten mit gesicherter MS haben sichtbare Entmarkungsherde [33]. Zur Unterscheidung von alten und frischen Läsionen dient die Verwendung von Gadolinium-DTPA als Kontrastmittel. Gadolinium-DTPA ist eine paramagnetische Substanz, die zu einer Signalverstärkung, besonders in den T1-gewichteten Bildern, führt. Die Anreicherung des Kontrastmittels in den neu entstandenen Plaques ist Ausdruck einer gestörten, d.h. durchlässigen Blut-Hirn-Schranke in den ersten Wochen und ist für ca. 4 Wochen nachweisbar. Durch die Gabe von Gadolinium-DTPA lassen sich in der MRT auch solche Entzündungsherde darstellen, die vor Kontrastmittelgabe nicht sichtbar waren. Auf diese Weise läßt sich die "diagnostische Ausbeute" erhöhen. Mit Hilfe der MRT können bei seriellen Verlaufsuntersuchungen auch Läsionen entdeckt werden, die bisher klinisch nicht in Erscheinung getreten sind. Goodkin et al. konnten zeigen, daß Entzündungsherde in der MRT etwa 5-10 mal häufiger auftreten als klinische Symptome [34].

Abbildung 1-2: Korrelation zwischen Krankheitsdynamik, Behinderungsgrad und MRT-Befunden im Verlauf der Multiplen Sklerose



(Therapien der Multiplen Sklerose, Hrsg.: L. Kappos, I. Cornelius, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien, 2000)

In vielen therapeutischen Studien wird die MRT deshalb als Aktivitätsparameter herangezogen [35, 36]. Viele Versuche wurden unternommen standardisierte Verfahren zu entwickeln, welche die Kernspinveränderungen erfassen [37]. Dennoch gibt es bisher keinen allgemein gültigen Konsens über die Kriterien bei der Beurteilung von Kernspinbefunden bei der Multiplen Sklerose [38].

1.1.3.2.3 Liquorbefunde

Obwohl die MRT in den letzten Jahren wesentlich zur Diagnosestellung beigetragen hat, ist eine Liquoruntersuchung dennoch notwendig.

Folgende Veränderungen im Liquor finden sich bei Multipler Sklerose:

1. Der Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese im Liquor mittels des IgG-Index. In mehr als 80% der klinisch gesicherten MS-Fälle liegt dieser Index über 0,7 [39, 40].
2. Oligoklonale Banden (OB) im Liquor, aber nicht im Serum, treten bei 90% der Patienten mit gesicherter MS auf [41].
3. Eine Erhöhung der Liquor und Serumalbuminkonzentrationen, bedingt durch eine Störung der Blut-Liquor-Schranke. Die Erhöhung findet sich jedoch nur bei ca. 20% des Patientenkollektivs.
4. Eine erhöhte Leukozytenzahl im Liquor. Dieser Befund ist bei ca. 50% der Patienten mit MS zu erheben.

Vorteil aller apparativer und laborchemischer Methoden ist, daß die klinisch erhobenen Befunde durch quantifizierbare Meßdaten objektiviert werden können. Zudem können mit den radiologischen und elektrophysiologischen Zusatzuntersuchungen klinisch stumme Herde nachgewiesen werden. Der Nachteil der meisten Verfahren ist jedoch die geringe Spezifität.

Aus diesem Grund ist man bei der Diagnostik der MS weiterhin auf der Suche nach Laborparametern, welche eine hohe Spezifität und zugleich eine hohe Sensivität aufweisen. Darüber hinaus sollten zukünftige Laborparameter möglichst "einfach", also mit möglichst geringen invasiven Methoden zu gewinnen sein und mit nur wenig Beeinträchtigung für den Patienten.

1.1.3.3 Differentialdiagnose der Multiplen Sklerose

Da es für die MS keinen spezifischen Test gibt, ist die Diagnosestellung letztendlich nur unter Berücksichtigung der oben erwähnten diagnostischen Kriterien und unter Zuhilfenahme der geeigneten Zusatzdiagnostik möglich. Gerade initial kann sich die Multiple Sklerose atypisch präsentieren und die differentialdiagnostische Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen des ZNS erfordern. Wegen ihrer Symptomenvielfalt, ihrer Bereitschaft, die Symptome zu wechseln und ihrer verschiedenen Verlaufsformen kann die MS eine Reihe von Krankheiten "kopieren". Besondere Beachtung müssen daher Krankheiten finden, die bestimmte Charakteristika der MS teilen, so z.B. Krankheiten, die ebenfalls einen schubförmigen-remittierenden Verlauf haben. Dazu gehören Vaskulitiden (Lupus erythematodes, Periartriitis nodosa, Sjörgren-Syndrom, Sarkoidose oder Morbus Behçet), und vaskulär bedingte Krankheiten (transistorisch ischämische Attacken oder Hirninfarkte). Ebenso müssen Krankheiten, die einen disseminierten oder diffusen Befall des ZNS (ohne Schübe) hervorrufen können, in die differentialdiagnostischen Überlegungen mit einbezogen werden, z.B. multiple Aneurysmen, Stoffwechselerkrankungen oder erregerbedingte Erkrankungen (etwa die Neuroborreliose). Des weiteren müssen Krankheiten mit chronisch-progredienten Verlauf (z.B. funikuläre Myelose) oder mit akuten bzw. subakuten Verlauf (z.B. subakute sklerosierende Panenzephalitis) sicher ausgeschlossen werden [1].

1.1.3.4 Beurteilung des Verlaufs und der Krankheitsaktivität

Die Befunde aller durchgeführten Untersuchungen, klinische und auch apparative, werden schließlich auch zur Therapieindikation herangezogen. Insbesondere MRT-Befunde wie Kontrastmittel-Anreicherung und perifokales Ödem gelten als Aktivitätsparameter der Erkrankung. Zu beachten ist jedoch, daß das Auftreten klinischer Schübe (klinische Aktivität) und z.B. eine Kontrastmittel-Anreicherung in der MRT, im Sinne eines "klinisch stummen" Krankheitsschubes, zeitlich unabhängig voneinander auftreten können [42, 43].

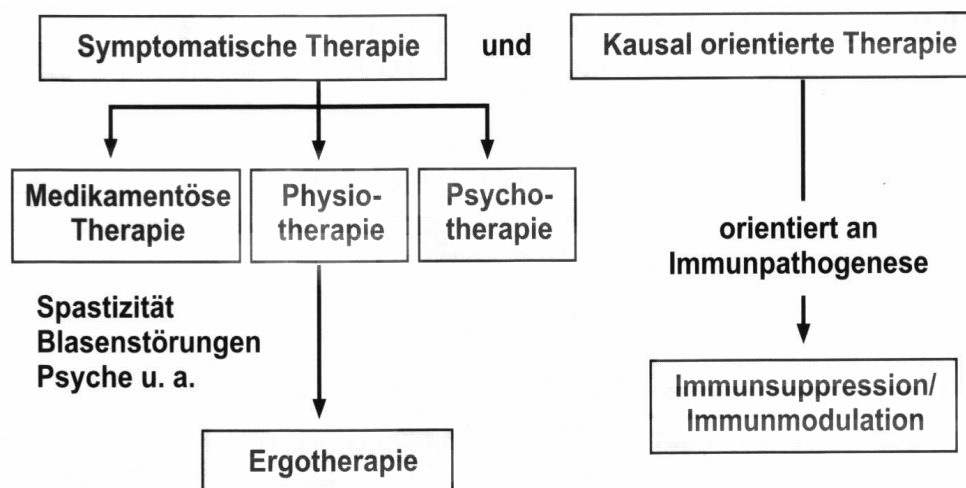
Sowohl für die Objektivierung eines akuten klinischen Schubes als auch für die Beurteilung des Therapieerfolges fehlen zur Zeit einfach zu erhebende Laborparameter, z.B. serielle Blutuntersuchungen, so daß man weiterhin auf die MRT und die Liquoranalysen angewiesen ist.

Zukünftiges Ziel ist daher neben dem Verständnis der Pathogenese der Erkrankung, die Evaluierung spezifischer und sensitiver Laborparameter, die als Aktivitätsparameter und prognostische Marker des Therapieerfolges den oben beschriebenen Ansprüchen gerecht werden.

1.1.4 Therapie

Man kann die zur Zeit üblichen therapeutischen Strategien in 2 Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören verschiedene symptomatische Therapieformen. Die zweite Gruppe besteht aus den kausalitätsbezogenen Behandlungsstrategien.

Abbildung 1-3: **Integratives Therapiekonzept bei der Multiplen Sklerose**



(Therapien der Multiplen Sklerose, Hrsg.: L. Kappos, I. Cornelius, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien, 2000)

1.1.4.1 Symptomatische Therapie

Die symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose beinhaltet u.a. die medikamentöse Therapie primärer (z.B. Spastik, Blasenstörung oder Schmerzen) und sekundärer Symptome (z.B. rezidivierende Blaseninfekte, Kontrakturen und Druckgeschwüre). Begleitend zur medikamentösen Therapie ist eine langfristige physiotherapeutische und ggf. psychotherapeutische Behandlung anzustreben. Ziel ist es, einer möglichen Behinderung

präventiv entgegen zu arbeiten und langfristig die Lebensqualität der Patienten zu erhalten oder zu verbessern.

1.1.4.1.1 Glukokortikoid-Therapie im akuten Schub

Einen besonderen Stellenwert bei der Behandlung eines akuten Schubes hat die Therapie mit hochdosierten intravenös verabreichten Glukokortikoiden (z.B. Methylprednisolon). In mehreren Studien zeigte sich, daß die Gabe von z.B. Methylprednisolon (1g/ Tag i. v. über 5 Tage) im akuten Schub einer Neuritis Nervi Optici die Symptomatik schneller bessern konnte als die niedrigdosierte orale Gabe [44]. Durch diese Therapie ist es jedoch nicht möglich, den Krankheitsverlauf dauerhaft positiv zu beeinflussen [45].

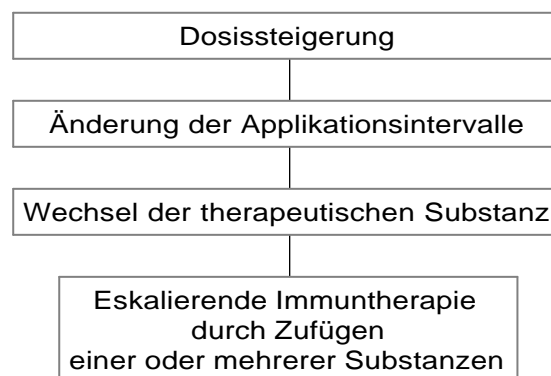
Die hochdosierte Glukokortikoidtherapie im akuten Schub hat jedoch nach wie vor Bedeutung neben den neu entwickelten immunmodulierend wirksamen Medikamenten (Interferone), welche sich inzwischen als Basistherapeutikum etabliert haben.

1.1.4.2 Kausale Therapie

Alle kausalitätsbezogenen Therapien nehmen für sich in Anspruch, in die Pathogenese der Multiplen Sklerose einzugreifen. Ausgehend von den Hypothesen der Immunpathogenese der MS wurden zwei verschiedene Therapiekonzepte verfolgt: der immunsupprimierende Therapieansatz und in der jüngsten Zeit vermehrt der immunmodulierende Therapieansatz. Dabei stehen die beiden Therapiekonzepte nicht nebeneinander, sondern vielmehr kommt es im Rahmen der Stufentherapie zu einem Übergreifen beider Therapieformen ineinander.

Abbildung 1-4: Stufenplan der Eskalationstherapie bei Multipler Sklerose

Immunsuppressive Stufentherapie



(Therapien der Multiplen Sklerose, Hrsg.: L. Kappos, I. Cornelius, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin Wien, 2000)

1.1.4.2.1 Immunsupprimierende Therapie

Die Gruppe der immunsupprimierenden Substanzen beinhaltet Azathioprin, Mitoxantron, Cyclophosphamid und Methotrexat. Alle Substanzen greifen relativ unspezifisch und unselektiv als Hemmstoffe in das Immunsystem ein.

Bei der schubförmig-remittierenden Verlaufsform kann bei weiter bestehender Krankheitsaktivität und nach erfolgloser Dosissteigerung der Interferon-Therapie ein Wechsel der therapeutischen Substanz z.B. auf Mitoxantron [46] indiziert sein. Mehrere Studien an kleinen Patientenkollektiven über die Anwendung von Mitoxantron bei MS konnten erfolgversprechende Daten hierzu vorstellen [47, 48]. Dabei scheint eine Therapie mit Mitoxantron bei Krankheitsverläufen mit einer schnellen Progression der Erkrankung und ausgeprägter zerebellärer Symptomatik besonders effizient zu sein.

Alternativ bietet sich eine Therapie mit Azathioprin an, insbesondere bei Patienten, welche eine parenterale Applikation der Immuntherapie ablehnen oder bei denen Kontraindikationen gegen Beta-Interferone bestehen. Der Wirkungsmechanismus von Azathioprin bedingt jedoch mindestens eine 2-6 monatige, z.T. auch 12 monatige Latenz bis zum Wirkungseintritt [49]. Bei Fortsetzung der Therapie über einen Zeitraum von mehr als 10 Jahren besteht ein erhöhtes Risiko für bösartige Neubildungen [50].

Eine Therapie mit Cyclophosphamid [51] oder Methotrexat (MTX) [52] kommt in erster Linie bei der chronisch-progredienten Verlaufsform zur Anwendung.

1.1.4.2.2 Immunmodulierende Therapie

Der Wissenszuwachs über die Immunpathologie hat in der Folge neue Therapiekonzepte entstehen lassen, die spezifischer und selektiver als bisher in das Immunsystem eingreifen können [53].

Ein besonderes Interesse fanden dabei die Interferone. Für die Interferone sind neben ihrer antiviralen und antiproliferativen Wirkung auf das Tumorstadium auch hemmende Wirkungen auf das Immunsystem beschrieben worden [54]. Die Interferone werden in zwei Klassen eingeteilt: Interferon-alpha und -beta gehören zu den Klasse-I Interferonen, Interferon-gamma zu den Klasse-II Interferonen. Interferon-alpha wird im Organismus hauptsächlich von Leukozyten, Interferon-beta von Fibroblasten und Interferon-gamma von Lymphozyten gebildet [55].

Basierend auf der Annahme einer viralen Genese der MS und aufgrund der bekannten antiviralen Wirkung der Interferone, wurde speziell Interferon-gamma zunächst zur Behandlung der MS eingesetzt. Der Behandlungsversuch mit Interferon-gamma mußte jedoch aufgrund vermehrt auftretender Schübe unter Therapie wieder abgebrochen werden [56].

1.1.4.2.2.1

Therapie mit Interferon-beta

Interferon-beta 1b (Betaferon®) ist ein rekombinantes, in E. Coli hergestelltes, nicht glykolisiertes Beta-Interferon, welches relativ spezifisch in das Immunsystem eingreift. Der genaue Wirkmechanismus, der für die positiven Behandlungseffekte verantwortlich ist, bleibt weiter unbekannt. Folgende Wirkungen und immunmodulierende Eigenschaften wurden bisher beschrieben:

1. Hemmung der Synthese von IFN-gamma durch Antagonismus zu Interferon-gamma [57].
2. Erhöhung der mangelnden Suppressoraktivität bei MS durch Wiederherstellung der gestörten Balance zwischen T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen [58, 59].
3. Inhibition der Expression von Klasse-I Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Antigenen (IFN-gamma vermittelter Effekt) durch Hemmung der Synthese von IFN-gamma.
4. Immunmodulation, z.B. durch verstärkte Produktion von Interleukin 10 [60] und verminderte Produktion von TNF-alpha [61].
5. Hemmung der Migration von T-Lymphozyten durch Basalmembran und extrazelluläre Matrix [62].

Die Ergebnisse der klinischen Studien in den USA und Kanada zeigten, daß es unter Therapie mit Betaferon® (Dosis: 8 Mio. IE. jeden 2.Tag s.c.) zu einer Reduktion der Schubrate, des Schweregrades der Schübe, sowie zu einer Reduktion der Gesamtläsionsfläche ("disease burden") in der MRT kam.

Das Verträglichkeitsprofil wurde im wesentlichen durch grippeähnliche Symptome und durch Hautreaktionen an den Einstichstellen bestimmt. Sowohl die systemischen als auch die lokalen Begleiterscheinungen klingen nach einigen Monaten rasch ab [63, 64]. Aufgrund der o.a. Studienergebnisse ist Betaferon® zur Therapie des schubförmig-remittierenden Verlaufs 1995 und seit 1999 auch für den sekundär chronischen Verlaufstyp der Multiplen Sklerose zugelassen.

Tabelle 1-2: Studienergebnisse der IFNB Multiple Sclerosis Study Group (drei Jahresdaten)

Zielkriterien	Placebo	Betaferon® (8 MIO.I.E.)
A. Schubrate		
jährliche Schubrate	1,21	0,84 (p= 0,0004)
mittlere Zeit (Median) bis zum 1. Schub (Tage)	147	264 (p= 0,028)
B. Behinderungsgrad		
EDSS: Stabil	61%	89%
EDSS: Verschlechtert um mind. 1 Punkt-Wert	39%	27% (p= 0,043)
C. MRT		
Gesamtläsionsfläche in mm ² (Median)	1503	1525
Veränderung der Gesamtläsionsfläche nach 1 Jahr in % vom Ausgangswert	6,7%	- 4,9%

1.1.5 Pathogenese

Epidemiologische und genetische Faktoren, welche die Entwicklung einer MS mitbestimmen können, wurden bereits geschildert. Die "Virushypothese" konnte bis heute nicht bewiesen werden. Es gilt jedoch weiter die Annahme, daß die Ähnlichkeit von Virus-Antigenen mit enzephalitogenen Antigenen eine Autoimmunantwort des Organismus triggern können. So treten Exazerbationen der MS häufiger im zeitlichen Zusammenhang mit Virusinfektionen auf [65, 66]. Eine weitere Hypothese geht von einer Immundysbalance aus, bei der die Balance von Autoimmunmechanismen und ihrer Hemmung gestört ist [67].

1.1.5.1 Pathologie und Histologie

Histopathologisches Korrelat der Multiplen Sklerose sind fleckförmige und disseminierte Entmarkungsherde der weißen Substanz des Gehirns und des Rückenmarks. Die Herde entstehen durch lokalisierten Untergang der Myelinscheiden der Oligodendrozyten (Demyelinisierung), wobei die Axone größtenteils erhalten bleiben. Makroskopisch imponieren die Läsionen als grau-rosa gefärbte Herde, deren Durchmesser von 1 mm bis zu mehreren Zentimeter sehr variabel ist [68]. Die Entmarkungsherde zeigen eine charakteristische topographische Anordnung entlang der subependymalen Venen der Ventrikel (periventrikuläre Lage). Die histologische Erscheinung der Herde ist von deren Alter abhängig. Man teilt diese ein in "aktive" bzw. "akute" Herde, sowie in "chronisch" bzw. "inaktive" Herde. Lichtmikroskopisch findet man in aktiven Läsionen perivaskuläre Infiltrate von Lymphozyten, zumeist T-Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten/ Makrophagen [69]. Die T-Lymphozyten finden sich an den Rändern der aktiven Plaques, während Makrophagen sich in Bereichen finden, in denen die Demyelinisierung stattfindet [70]. Elektronenmikroskopisch lassen sich in den Makrophagen Myelinbestandteile nachweisen. Aktive Herde zeigen zusätzlich als lokale Störung der Blut-Hirn-Schranke ein Ödem. Diese entzündlichen Veränderungen werden von einer Astrozytenproliferation begleitet, die nach Abklingen der Entzündung als Gliose zu der Verhärtung (Sklerose) des Gewebes führt [71]. Dementsprechend bestehen die älteren, inaktiven Herde, aus relativ zellarmen, fibroglialen Gewebe. Man findet eine Mischung aus regelrecht myelinisierten, demyelinisierten und partiell remyelinisierten Axonen [72].

1.1.5.2 Das Tiermodell der Multiplen Sklerose: Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis (EAE)

Viele dieser Theorien und die im folgenden dargestellte Erkenntnisse über die Immunpathologie der MS basieren auf experimentellen Erfahrungen mit dem etablierten Tiermodell der Multiplen Sklerose: der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE).

Obwohl in vieler Hinsicht unterschiedlich, so zeigt z.B. die akute EAE einen monophasischen Verlauf, d.h. eine in einem Schub verlaufende MS, dient dieses Tiermodell zur Erforschung der Pathomechanismen der MS und neuer Therapiestrategien. Nach intravenöser Gabe von ZNS-Antigenen, z.B. das Proteolipidprotein (PLP), das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) und das Myelin-Oligodendrozyten-Protein (MOG) - kombiniert mit einem immunstimmulierenden und die Verweildauer im ZNS verlängernden Zusatz "Freudsches Adjuvans" (inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis*) - kann bei den Versuchstieren durch die Auslösung eines Entzündungsstimulus eine Enzephalitis erzeugt werden [73, 74]. Neben o.a. ZNS-Antigenen können auch aus infizierten Tieren isolierte, aktivierte T-Lymphozyten bei den Versuchstieren einen Krankheitsschub auslösen. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß die Multiple Sklerose eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist [75]. Unterstützt wird diese Theorie durch das Vorhandensein autoreaktiver T-Zellen im Blut von MS-Patienten, die gegen das myelinbasierte Protein (MBP) bzw. das MAG gerichtet sind [76]. Zur Aktivierung der T-Zellen kommt es wahrscheinlich im Rahmen eines Virusinfektes. Den zugrunde liegenden Mechanismus bezeichnet man als "molekulares Mimikry" [77]. Darunter versteht man eine gegen den Körper gerichtete und durch körpereigene Peptide ausgelöste Immunreaktion aufgrund struktureller Ähnlichkeit körpereigener Peptide mit körperfremden (z.B. virale oder bakterielle) Antigenen. Für die Pathogenese der MS wird eine Strukturähnlichkeit zwischen viralen T-Zell-Epitopen und Peptiden des MBP angenommen [78].

1.1.5.3 Immunpathologie

Zahlreiche neue Erkenntnisse über die Immunpathophysiologie der Multiplen Sklerose konnten in den letzten Jahren gewonnen werden.

1.1.5.3.1 Pathomechanismen im Schub

Arason et al. hat folgende Schritte im MS-Schub definiert [79]:

1. Aktivierung
2. Rekrutierung von Entzündungszellen und T-Zell-Proliferation im lymphatischen Gewebe
3. Migration
4. Verstärkte Störung der Blut-Hirn-Schranke und Rekrutierung weiterer Entzündungszellen aus der Peripherie
5. Gewebszerstörung/ Demyelinisierung
6. Suppression der Autoimmunantwort
7. Partielle Remyelinisierung

In der peripheren Zirkulation werden T-Helferzellen durch Makrophagen Autoantigene präsentiert und so zu Beginn eines Schubes aktiviert. Diese aktivierten, myelinreaktiven T-

Zellen durchwandern die Blut-Hirn-Schranke [80]. Der auslösende Mechanismus für diese im Schub vermehrte Einwanderung ist unbekannt. Die so aktivierten T-Zellen reduzieren in den Mikrogefäßen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ihre Geschwindigkeit und rollen verlangsamt entlang der Oberfläche des Gefäßendothels ("rolling"). Durch diesen Stimulus werden auf der Oberfläche der T-Zellen Adhäsionsmoleküle aktiviert, die eine feste Bindung der T-Zelle an das Gefäßendothel ermöglichen ("homing") [81].

An diesem Vorgang sind das in dieser Arbeit untersuchte Intracellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), sein Ligand das Very Late Antigen-4 (VLA-4), das Intracellular Adhesion Molecule-3 (ICAM-3), sein Bindungspartner das Leucocyt Function Antigen-1 (LFA-1), sowie das Vascular Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) beteiligt [82, 83]. Nachdem die T-Zelle über diese Vermittlung an das Endothel gebunden hat, kommt es zu einer Transmigration der Zelle durch die gestörte BHS in das Hirnparenchym oder in den Liquorraum. Diese Transmigration wird ebenfalls durch die oben beschriebenen Adhäsionsmoleküle vermittelt. Jedoch konnte die Transmigration von aktivierten T-Zellen ins Hirnparenchym auch beim Gesunden festgestellt werden, wobei es in diesem Fall aber zu keiner Entzündungsreaktion kommt [84]. Vielmehr müssen die autoreaktiven T-Zellen erneut aktiviert werden, um im Anschluß daran Entzündungsmediatoren produzieren zu können. Dies geschieht, indem antigenpräsentierende Zellen im ZNS, z.B. Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten, Autoantigene aufnehmen und Bruchstücke derselben zusammen mit dem MHC auf der Zelloberfläche präsentieren. T-Zellen "erkennen" diesen trimolekularen Komplex, bestehend aus T-Zell-Rezeptor, Antigen und MHCII-Molekül und werden so reaktiviert. Dieser Interaktion schließt sich eine Entzündungskaskade an, in die weitere T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems mit einbezogen werden. Dabei wird die Entzündungsreaktion durch Zytokine in ihrer Ausprägung und Dauer gesteuert.

T-Helferzellen werden nach Ihrem Zytokinprofil in Th1- und Th2-Zellen unterschieden. Daran beteiligt sind auch die zum Teil in dieser Arbeit untersuchten, von Th1-Zellen sezernierten Zytokine Interleukin-2, Interferon-gamma, Lymphotoxin (TNF-beta) und TNF-alpha. Diese Zytokine haben proinflammatorische und stimulierende Funktionen. Th2-Zellen setzen Interleukin-4 und Interleukin-10 frei. Dies sind Zytokine, die u.a. eine antiinflammatorische Wirkung haben und ebenfalls Gegenstand der Untersuchung der vorliegenden Arbeit sind. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer fortschreitenden Zerstörung der BHS und zu einem unkontrollierten Einwandern von aktivierten Lymphozyten [85]. Durch die oben beschriebenen proinflammatorischen Zytokine, sowie durch im Rahmen der Entzündungsreaktion entstehende freie Sauerstoffradikale und zusätzlicher Aktivierung des Komplementsystems wird eine direkte und indirekte Schädigung der Myelinscheiden hervorgerufen.

Parallel dazu kommt es aber auch zu einer Aktivierung antiinflammatorischer Mechanismen, z.B. die Sezernierung antiinflammatorisch wirkender Zytokine IL-4, IL-10 oder TGF-beta durch Th2-Zellen, die dem Entzündungsprozeß entgegenwirken und so den Prozeß zum Stillstand kommen lassen.

Bei Patienten mit Multipler Sklerose ist möglicherweise das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gestört [86]. Erkenntnisse über das genaue Zusammenspiel der Zytokine und ihre mögliche Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose sind zur Zeit jedoch noch sehr ungenau. Möglicherweise kann über die Untersuchung der immunmodulatorische Wirkung des Interferon-beta 1b, bei mit diesem Präparat therapierten Patienten, Rückschlüsse über diese komplexen Interaktionen gewonnen werden.

1.2 Die Bedeutung und Funktion von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen

Die Ätiologie der MS ist vermutlich multifaktoriell bedingt, wobei autoimmunologischen Vorgängen eine besondere pathogenetische Bedeutung zukommt. Zytokine beeinflussen in vielfältiger Weise den Verlauf der Entzündungsreaktion bei Multipler Sklerose. Zytokine sind von Zellen des Immunsystems sezernierte Proteine. Das Zytokinsystem zeichnet sich durch eine große Komplexität aus. Ein einzelnes Zytokin kann im Zusammenspiel mit anderen Faktoren verschiedene Wirkungen vermitteln und die Expression weiterer Zytokine regulieren. Dies führt zu einer Ausbildung von "Zytokin-Netzwerken", deren Funktion und Regulation noch weitestgehend unbekannt ist. Ein Problem bei der Erforschung der Zytokin-Interaktionen ist die kurze, biologische Halbwertszeit. Zytokine wirken in niedrigen Konzentrationen, in autokriner oder parakriner Weise [87]. Sie kommen in löslicher Form und membrangebunden vor und beeinflussen ihre Zielzelle indem sie an bestimmte Rezeptoren binden.

1.2.1 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle vermitteln, wie oben beschrieben, die Bindung einer Zelle an eine andere (Zell-Zell-Interaktion) oder an zelluläre Matrixproteine [88, 89].

Man unterscheidet drei Hauptgruppen:

1. Selektine: E-Selektin, L-Selektin und P-Selektin. Diese vermitteln den initialen Kontakt zwischen den zirkulierenden Leukozyten und dem Endothel.
2. Integrine: LFA-1 und VLA-4. Sie sind für die Wanderung und Aktivierung der Zellen von Bedeutung.
3. Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie: ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1. Die Immunglobulin-Integrin-Interaktion reguliert dabei die feste Adhäsion und die Transmigration der Leukozyten durch das Endothel und wirkt als Co-Stimulator bei der Antigenpräsentation.

Zu den Adhäsionsmolekülen gehören ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule) und ICAM-3, die mit VLA-4 Antigen (Very Late Activation Antigen-4) und LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen-1) interagieren, sowie VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) und sein Reaktionspartner das VLA-4.

ICAM-1 und ICAM-3 werden auf T-Zellen, Makrophagen und Mikroglia exprimiert, VCAM-1 vor allem auf aktivierten Endothel [90].

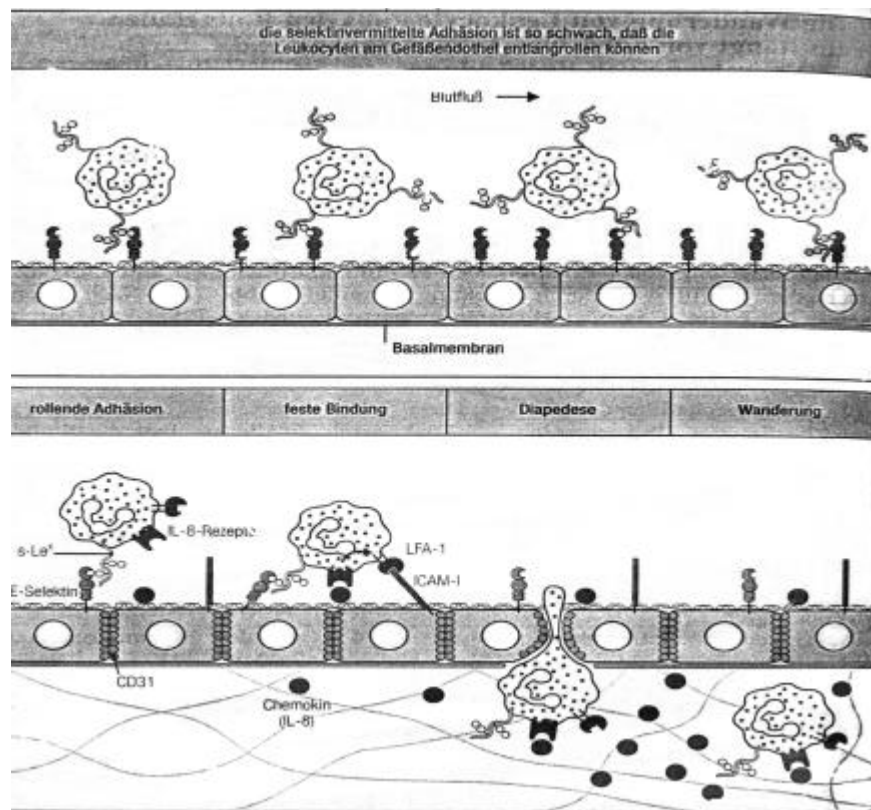
Von allen drei Adhäsionsmolekülen existieren neben einer zellgebundenen Form (als cICAM-1, cICAM-3, cVCAM-1 bezeichnet), auch lösliche (soluble) Formen. Die löslichen Antigene, die von den Zellen durch sogenanntes "shedding" (abstoßen) entstehen, können sowohl im Serum als auch im Liquor nachgewiesen werden [91] und sind daher in dieser Arbeit von besonderem Interesse.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle wird von verschiedenen zellulären und humoralen Faktoren beeinflusst. Sowohl die zellgebundenen als auch die löslichen Formen wurden bei einer Reihe von entzündlichen und tumorösen Erkrankungen vermehrt vorgefunden [92, 93, 94]. Rieckmann et al. (1997) vermuteten, daß sICAM-1 im Bereich der BHS die Extravasation von Leukozyten ins Hirnparenchym bzw. in den Liquor reguliert und somit vielleicht als Indikator einer Schädigung der BHS angesehen werden kann [95].

Erhöhte Serumspiegel für sICAM-3 konnten ebenfalls für verschiedene Krankheiten des autoimmunen Formenkreises (z.B. Multiple Sklerose, Guillain-Barré-Syndrom und systemischer Lupus Erythematodes) gefunden werden [96]. Eine vermehrte Expression von VCAM-1 und von seinem Rezeptor VLA-4 wurden von mehreren Autoren in aktiven und chronischen Läsionen bei MS, ebenso wie bei dem chronischen Verlauf der EAE gefunden [91].

Aktuelle Studien erforschen den Zusammenhang zwischen der Konzentration immunologischer Parameter im Serum oder Liquor und sichtbaren Läsionen in der MRT. So fanden z.B. Rieckmann et al. (1997) einen Zusammenhang eines Liquor/ Serum Quotienten von sICAM-1 und sVCAM-1 mit der Fläche Gadolinium-anreicherender Herde in der MRT bei MS-Patienten [97].

Abbildung 1-5: Die molekularen Mechanismen bei der Transmigration der T-Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke



(Immunologie, Janeway CA, Travers P, 1997, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Oxford, Berlin)

1.2.2 Proinflammatorisch wirkende Zytokine

Zu den Zytokinen, die eine Autoimmunreaktion initiieren oder verstärken können zählen Interferon-gamma, TNF-alpha und TNF-beta.

IFN-gamma induziert die Expression von MHC-I und MHC-II-Molekülen, sowie von ICAM-1 auf einer Vielzahl intrazerebraler Zellen, z.B. auf humanen Astrozyten. IFN-gamma aktiviert u.a. Makrophagen, die weitere immunstimulierende Zytokine (z.B. TNF-alpha und Interleukin-1) sezernieren. Gleichzeitig führt IFN-gamma zu einer Permeabilitätserhöhung des Gefäßendothels.

TNF-alpha wirkt synergistisch mit IFN-gamma. Es wird vor allem von NK-Zellen und Makrophagen produziert. TNF-alpha kann sowohl indirekt als auch direkt zytotoxisch wirken. In der Zellkultur konnte eine TNF-alpha vermittelte Demyelinisierung nachgewiesen werden [98]. Weiterhin fördert TNF-alpha die Proliferation von Astrozyten und kann somit zur reaktiven Gliose beitragen [99]. Über einen möglichen Zusammenhang von im Blut oder Liquor gemessenen Konzentrationen von TNF-alpha und der klinischen Krankheitsaktivität liegen jedoch widersprüchliche Ergebnisse vor [100].

TNF-beta wird im Gegensatz zu TNF-alpha insbesondere von aktivierten T-Lymphozyten gebildet. TNF-beta besitzt eine ausgeprägte Homologie zu TNF-alpha, wirkt über die gleichen Rezeptoren und besitzt nahezu identische Eigenschaften. Beide Zytokine, TNF-alpha und TNF-beta wurden in MS-Plaques nachgewiesen [101]. Diese Zytokine vermitteln ihre Wirkungen über die TNF-Rezeptoren I (55 kDa) und II (75 kDa). Diese werden jedoch in unterschiedlicher Anzahl und unterschiedlichem Verhältnis vornehmlich auf aktivierten CD4 und CD8 positiven T-Zellen expremiert. Lösliche Formen dieser Rezeptoren (sTNF-RI, sTNF-RII) erscheinen nach dem "Shedding" von der Zelloberfläche im Serum, wo sie mit geeigneten Techniken, z.B. mittels ELISA-Tests nachgewiesen werden können.

Sehr wenige Daten über die Serumkonzentration von TNF-beta und seiner beiden Rezeptoren - korreliert mit der klinischen Krankheitsaktivität bei MS - liegen zur Zeit vor, weshalb dieses proinflammatorisch wirkende Zytokin zusammen mit seinen beiden Rezeptoren sTNF-RI und sTNF-RII sowie Interferon-gamma im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit stehen.

1.2.3 Antiinflammatorisch wirkende Zytokine

Zu den immunsuppressiv wirkenden Zytokinen werden u. a. IFN-beta und -alpha, Transforming-Growth-Factor-beta (TGF-beta) sowie Interleukin-10 und -4 gerechnet. Über die Wirkungen des zur Therapie der schubförmig-remittierenden Verlaufsform der Multiplen Sklerose zugelassenen Interferon-beta 1b (Betaferon®) wurden bereits in den oberen Abschnitten berichtet.

IL-10 wird von aktivierten T-Zellen sezerniert und inhibiert die Proliferation derselben sowie die Produktion von IL-2, IL-12 und Interferon-gamma [102].

Bei der Multiplen Sklerose konnte von manchen Autoren ein Anstieg der mRNA von IL-10 in Blutzellen von MS-Patienten mit schubförmig-remittierender MS in stabilen Krankheitsphasen nachgewiesen werden [103].

Interleukin-4 wird ebenso wie Interleukin-10 von Th2-Zellen sezerniert. Interleukin-4 aktiviert Makrophagen und ist als Co-Stimulator der B-Zell- und Mastzellproliferation wirksam. Konzentrationen von IL-4 konnten in MS-Herden gemessen werden [104]. Daneben konnten erhöhte mRNA-Spiegel von IL-4 in peripheren Blutzellen und im Liquor gefunden werden [105]. Eine Korrelation zur Krankheitsaktivität konnte jedoch bisher nicht hergestellt werden [106].

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme einer Beteiligung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 in der Regulation der Immunantwort und in der Immunpathogenese der Multiplen Sklerose.

1.3 Zielsetzung

In allen immunologischen Studien, die zu Erforschung der Immunpathogenese der MS erstellt wurden, sind bislang nur einzelne Parameter der Immunantwort betrachtet worden. Wie komplex und vielgestaltig dabei allein das Zusammenspiel von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen ist, wurde in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben.

In dieser Arbeit wurden daher erstmals eine Vielzahl der beteiligten proinflammatorischen Zytokine (TNF-beta und seine Rezeptoren TNF-RI/ TNF-RII, IFN-gamma), der antiinflammatorischen Zytokine (IL-4, IL-10) und die löslichen Formen der Adhäsionsmoleküle (sICAM-1, sICAM-3, sVCAM-1) im zeitlichen Verlauf über 12 Monate im Serum von MS-Patienten untersucht. Dabei ist auch die immunmodulierende Wirkung von Interferon-beta 1b (Betaferon®) von Interesse, welches zur Therapie der schubförmig-remittierenden Verlaufsform der Multiplen Sklerose zugelassen ist und über dessen genauen Wirkmechanismus noch wenig bekannt ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Unterschiede im Verlauf der immunologischen Parameter (Zytokine und Adhäsionsmoleküle) zwischen einer Therapiegruppe und einer Gruppe nicht therapierter MS-Patienten zu ermitteln, um so Rückschlüsse auf einen möglichen Einfluß von Interferon-beta 1b (Betaferon®) auf die Regulation derselben und auf das immunologische Geschehen bei Multipler Sklerose ziehen zu können.

Zusätzlich wird geprüft, ob eine Korrelation zwischen der Konzentration der Immunparameter im Serum und der klinischen sowie auch subklinischen, in der MRT objektivierbaren, Aktivität der Erkrankung besteht.

Dabei soll der Frage nachgegangen werden, ob die untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle als prognostische Marker bzw. als Parameter der Krankheitsaktivität dienen können, um so zu einer Aussage über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung und den erwünschten Therapieerfolg zu gelangen.

2 Material und Methode

2.1 Patienten und Probenmaterial

2.1.1 Therapierte Patienten und nicht therapierte Patienten

68 Patienten mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose wurden ab März 1997 in diese offene, prospektive und nicht randomisierte Studie aufgenommen und über einen Zeitraum von bis zu 24 Monaten beobachtet. Alle Patienten wurden vor Aufnahme über die Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Studie aufgeklärt. Die bei den Patienten vierteljährlich durchgeführten klinischen Untersuchungen mit Erhebung des EDSS sowie die Blutentnahmen und die halbjährlich angefertigten Magnetresonanztomographien wurden - zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs - im Rahmen der regelmäßigen ambulanten Vorstellung in unserer Klinik durchgeführt.

Alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten hatten einen schubförmig-remittierenden Verlauf der Multiplen Sklerose und erlitten in den letzten zwei Jahren mindestens zwei Schübe, so daß für jeden der Patienten die Indikation zu einer Therapie mit Interferon-beta 1b (Betaferon®, Schering) gegeben war. Die Entscheidung für oder gegen eine immunmodulierende Therapie mit diesem Medikament wurde, nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung und Beratung, von den Patienten getroffen. Da der Verlauf dieser Erkrankung individuell sehr unterschiedlich sein kann und eine Prognose über die Progredienz der Multiplen Sklerose nicht sicher getroffen werden kann, war zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Studie aus ärztlicher Indikationsstellung und unter Berücksichtigung der Wünsche des Patienten, die Umstellung auf ein anderes Interferon-Präparat oder der Beginn einer prophylaktischen immunmodulatorischen Therapie möglich.

Als Einschlußkriterien wurden vor Beginn der Studie eine nach den Kriterien von Poser et al. gesicherte Multiple Sklerose mit einer Krankheitsdauer von mindestens zwei Jahren und zwei Schüben in dieser Zeit gefordert. Ferner, in Anlehnung an die Interferon-beta 1b relevante Zulassungsstudie, sollte der EDSS zwischen 0 - 6,0 und das Alter der Patienten zwischen 18 und 60 Jahren liegen. Ausgeschlossen wurden Patienten, welche 3 Monate vor Aufnahme in die Studie mit immunsupprimierenden Medikamenten oder mit Glukokortikoiden therapiert wurden. Ferner galten alle - für eine Therapie mit Interferonen - bekannten therapeutischen Indikationen und Kontraindikationen.

Als Schub wurde das relativ akute Auftreten von neuen oder die Verschlechterung von bereits bestehenden Symptomen einer MS innerhalb der letzten vier Wochen, für mindestens 24 Stunden, angesehen. Gleichzeitig mußte ein fieberhafter Infekt sicher ausgeschlossen sein. Patienten mit einem gesicherten Schub wurden nach dem allgemein anerkannten Standard auch unter Therapie mit Interferon-beta 1b mit einer hochdosierten Kortikoidtherapie (1000 mg Methylprednisolon/ Tag über einen Zeitraum von 5 Tagen) behandelt.

2.1.2 Probenmaterial

Alle drei Monate wurden Blutproben, jeweils Serum und Plasmaproben, von den Patienten gewonnen, zentrifugiert und aliquotiert (je 300 µl). Zur Lagerung der Proben wurden diese sofort bei minus 20 Grad Celsius eingefroren. Unter dieser in Laboratorien allgemein angewendeten Behandlung der Proben ist ein Einfluß auf die zu messenden Konzentrationen von Zytokinen, bzw. Adhäsionsmolekülen bisher nicht beschrieben worden oder bekannt. Unmittelbar vor der geplanten Durchführung eines ELISA-Tests wurden die Proben schonend bei Raumtemperatur aufgetaut. Einmal bereits aufgetaute Proben wurden verworfen.

2.2 Bestimmung der Zytokine und Adhäsionsmoleküle mittels Enzyme-Linked-Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die Konzentration der löslichen Adhäsionsmoleküle (sVCAM-1, sICAM-1, sICAM-3), der Zytokine (INF-gamma, TNF-beta, Interleukin-4, Interleukin-10), sowie die TNF- Rezeptoren (RI und RII) im Serum und Plasma wurden mittels kommerziell erwerblicher ELISA-Testsets bestimmt (s. Tabelle 7-3).

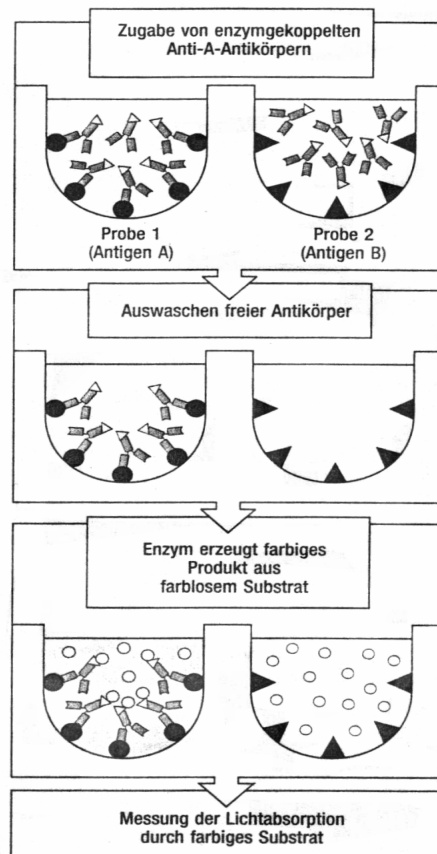
2.2.1 Testprinzip

Bei der in dieser Arbeit zur Bestimmung der Konzentrationen von Zytokinen und löslichen Adhäsionsmolekülen verwendeten Methode handelt es sich um einen Sandwich-ELISA.

Ein ELISA ist ein serologischer, direkter Bindungstest, bei dem man gebundene Antigene oder Antikörper mit Hilfe eines gekoppelten Enzyms, das eine farblose Substanz in eine farbiges Produkt umwandelt, nachweist. Die Menge und die Spezifität von Antikörpern/ Antigenen lassen sich direkt anhand der Antigen/ Antikörperbindung bestimmen. Dabei werden zunächst unmarkierte Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin auf einem Kunststoffträger fixiert (z.B. die Vertiefung einer Mikrotiterplatte). Die Proben, Standards und Kontrollen werden in diese Vertiefungen (Wells) pipettiert und zusammen mit einem gegen das zu untersuchende Zytokinmolekül gerichteten monoklonalen, biotinylierten Antikörper inkubiert. Dadurch wird das zu untersuchende Zytokin bzw. Adhäsionsmolekül wie ein "Sandwich", sowohl von dem am beschichteten Boden haftende, als auch von dem biotinylierten Antikörper gebunden. Nachdem überschüssige, nicht gebundene Antikörper durch Waschen entfernt werden, wird das Enzym Streptavidin-Peroxidase hinzugefügt, welches nun spezifisch an den biotinylierten Antikörper bindet. In einem weiteren Arbeitsschritt wird Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt, welches die Farbreaktion katalysiert und das zuvor farblos gewesene Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt. Dieser enzymabhängige Farbwechsel wird mit einer Säure (z.B. Schwefelsäure) gestoppt und läßt sich nun direkt z.B. mit einem Mehrkanalspektrometer messen. Die Intensität der Farbreaktion bzw. die Extinktion ist dabei proportional zur Konzentration des zu

untersuchenden Zytokins bzw. Adhäsionsmoleküls. Eine Standardkurve erhält man durch die Verwendung bekannter Mengen der unmarkierten Form jenes Antigens. Durch den Vergleich mit dieser Kurve kann man die Antigenmenge in unbekanntem Proben berechnen.

Abbildung 2-1: Testprinzip eines ELISA



(Immunologie, Janeway CA, Travers P, 2. Auflage, Spektrum Verlag, 1997)

Dieses Testprinzip ist hoch spezifisch, da Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen nicht stattfinden. Der Test kann also mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit Konzentrationen von Zytokinen bzw. Adhäsionsmolekülen quantifizieren. Dieses in der Handhabung und Durchführung einfache, gut standardisierte und reproduzierbare Verfahren wurde daher in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Konzentrationen oben genannter Parameter angewendet.

2.2.2 Testablauf

Die ELISA-Tests wurden vollständig nach den Verfahren und Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zur genauen Quantifizierung wurden alle Messungen in Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert als Berechnungsgrundlage angenommen.

Bei einem Test (sICAM-3) wurde zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum jedoch die Inkubationszeit des biotinylierten Antikörpers verlängert.

Dieses hat sich in Vorversuchen als geeignetes Verfahren erwiesen, bei niedrigen Konzentrationen der zu untersuchenden Parameter die Sensitivität zu erhöhen (s. Protokolle 7.3).

Aufgrund der in Vorversuchen gemessenen niedrigen Konzentrationen an Zytokinen mußte bei den ELISA-Tests zur Messung der Konzentration von IL-10, IL-4 und IFN-gamma ein weiterer Verdünnungsschritt in die Standard-Verdünnungsreihe eingeführt werden. Der vom Hersteller als untere Nachweisgrenze angegebene Wert wurde nicht unterschritten. Proben, welche oberhalb der Nachweisgrenze lagen, wurden in einer weiteren Verdünnung nachgemessen (z.B. sICAM-1).

Bei der Durchführung der Tests wurde in Vorversuchen für jedes Zytokin bzw. Adhäsionsmolekül untersucht, ob bei der Messung der Konzentration Unterschiede im Plasma oder Serum auftraten. Da wo sich Unterschiede in den Konzentrationen der gemessenen Parameter zeigten, erfolgte die Messung entweder ausschließlich im Plasma (TNF-RI/ -RII und sVCAM-1) oder ausschließlich im Serum (sICAM-1 und sICAM-3). Unterschiede in den Konzentrationen der Zytokine bedingt durch unterschiedliches Probenmaterial konnten so vermieden werden.

Ein Serumpool, welcher der gleichen Behandlung unterlag wie die zu messenden Proben, diente zur Beurteilung möglicher Veränderungen des Probenmaterials während der Lagerung bei minus 20 Grad Celsius. Gleichzeitig bildete dieser Pool die Grundlage zur Bestimmung der Interassay-Präzision.

Die für jedem Test obligate Standardkurve wurde als "four parameter logistic"-Kurve nach Robard und Hutt berechnet [107]

2.3 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist neben der Klinik und Liquorbefunden einer der drei Grundpfeiler der MS-Diagnostik. Die für diese Arbeit verwendeten Magnetresonanztomographien wurden für die meisten Patienten unter den Bedingungen erstellt, wie sie von der Abteilung für Neuroradiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Routinediagnostik verwendet werden.

Studienpatienten, die auswärtig angefertigte MRT-Aufnahmen mit in die Studie einbrachten, wurden gebeten, im Beobachtungszeitraum dieselbe neuroradiologische Praxis aufzusuchen, um so eine Reproduzierbarkeit der Daten gewährleisten zu können. Insgesamt wurden im Verlauf der Studie 247 MRT-Bilder ausgewertet. Bei der Auswertung der einzelnen Bilder wurden die strukturellen Veränderungen der Erkrankung des jeweiligen Patienten quantifiziert. Dabei kamen die von Paty et al. (1988) und Miller et al. (1994) etablierten Kriterien der Krankheitsaktivität zur Anwendung [108, 109] sowie die Definition der Krankheitsaktivität nach der "IFNB Multiple Sclerosis Study Group" [110]. Die erhaltenen Meßwerte wurden sowohl mit der klinischen Krankheitsaktivität als auch mit den

Konzentrationen der immunologischen Parametern (Zytokine und Adhäsionsmoleküle) korreliert.

2.3.1 Methodik

Zu Beginn der Studie und im weiteren Beobachtungszeitraum wurden halbjährliche MRT-Aufnahmen des Neurokraniums mit dem Gerät "Magnetom SP63" (Firma Siemens, Erlangen) 1,5 Tesla angefertigt. Erstellt wurden jeweils Bilder in T1-Wichtung vor und nach Gadolinium-Injektion (20 Minuten nach intravenöser Gabe von 0,1 mmol/kg KG Gadolinium-DTPA), T2- und protonengewichtete Bilder. Die dazu verwendeten Echozeiten ("Time to echo"; TE) und Repetitionszeiten ("Time to repetition"; TR) sind aus der Tabelle 2-1 ersichtlich. Durch die exakte Repositionierung der Studienpatienten und die Einhaltung der gleichen Spinecho-Sequenzen bei der Fertigung der Folgeaufnahmen, konnten reproduzierbare und vergleichbare MRT-Bilder gewährleistet werden. Für die Auswertung wurde die transversale Schnittführung in der orbitomeatalen Ebene vom Foramen magnum bis zum Vertex herangezogen. Die Schichtdicke betrug jeweils 6mm.

Tabelle 2-1: Echozeit (TE) und Repetitionszeit (TR) bei der Erstellung der verschieden gewichteten MRT-Aufnahmen.

	Spinecho-Sequenzen TE(ms) / TR (ms)	Anzahl der schichten	Matrix
T1-gewichtete Aufnahmen	15 / 600	20	256 X 512
T2-gewichtete Aufnahmen	93 / 3460*	20	256 X 512
Protonen-gewichtete Aufnahmen	3460*	20	256 / 512

* Turbo-Spinecho-Sequenzen mit Doppelecho

2.3.2 Auswertung der MRT-Bilder

Vor Beginn der planimetrischen Auswertung der Bilder mußte entschieden werden, ob eine computergestützte oder eine manuelle semiquantitative Technik verwendet werden sollte. Die erst genannte Methode ist sehr zeitaufwendig und kostenintensiv, und bietet vor allem

Vorteile in der Analyse von multizentrischen Studien mit verschiedenen auswertenden Personen [111, 112].

Die in dieser Studie angefertigten Bilder wurden von zwei Kollegen manuell ausgewertet, die zum damaligen Zeitpunkt der Studie, die Auswertung der MRT-Aufnahmen zum einen im Rahmen einer Tätigkeit als studentische Hilfskraft (O.Fischer) und zum anderen im Rahmen der Erstellung einer Promotionsarbeit (H. Diehl) durchführten. Die Schulung in der Auswertung der MRT-Aufnahmen sowie die prüfende fachliche Betreuung wurden durch einen erfahrenen Neuroradiologen, Dr. A. Kern der neuroradiologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Gießen, gewährleistet. Die beteiligten Kollegen kannten dabei weder den klinischen Verlauf der Erkrankung, noch die jeweilige Therapie der in dieser Studie eingeschlossenen und untersuchten MS-Patienten.

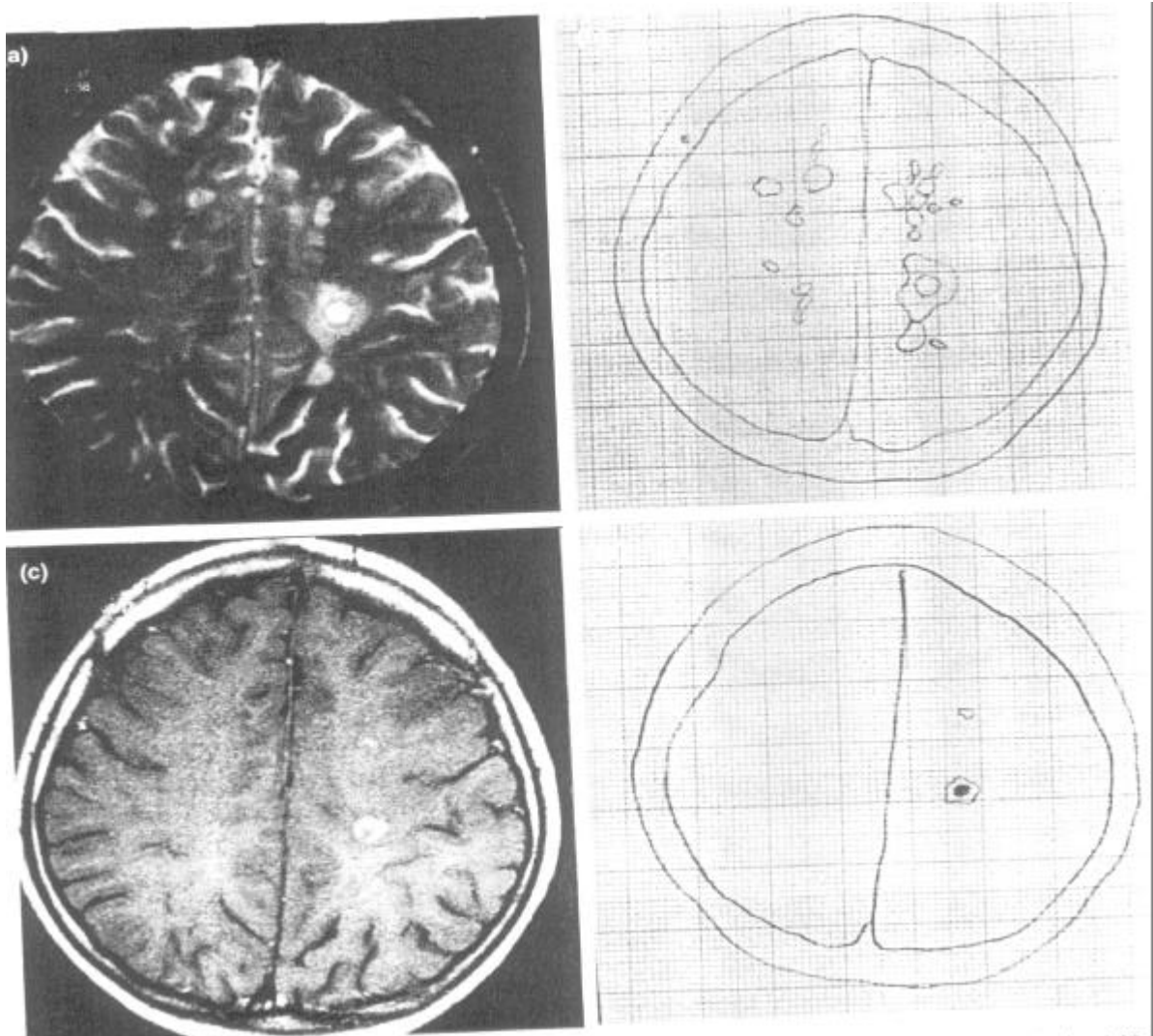
Die Auswertung zur quantitativen und manuellen Bestimmung der MS-Läsionen erfolgte anhand der protonengewichteten Bilder, da diese im Vergleich zu T2-gewichteten Aufnahmen eine bessere Diskriminierung ventrikelnaher MS-Läsionen erlauben. Die T2-gewichteten Bilder wurden ergänzend zur Identifizierung von Entzündungsherden herangezogen. Die so identifizierten Herde wurden auf Millimeterpapier - unter Verwendung von Pauspapier - übertragen und ausgemessen. Auf diese Weise erfolgte die Bestimmung der Größe und Anzahl der Herde. Gadolinium-anreichernde Herde, sowie die einen Herd umgebende Ödemzone, wurden nach dem gleichen Prinzip erfaßt. Die so ermittelte Fläche wurde mit dem Maßstab der jeweiligen Aufnahmen multipliziert. Daraus ließ sich die kumulierte Querschnittsfläche der jeweiligen Entzündungsherde in mm^2 errechnen. Zusätzlich wurden die Veränderungen der Größe und Aktivität zuvor identifizierter Entzündungsherde im Verlauf ermittelt.

Folgende Parameter wurden auf diese Weise erhoben:

1. Kumulierte Querschnittsfläche der Entzündungsherde ("disease burden") [113]
2. Anzahl der Entzündungsherde
3. Fläche und Anzahl der Entzündungsherde mit Gadolinium-Anreicherung
4. Fläche und Anzahl der Entzündungsherde mit Ödem
5. Fläche und Anzahl der Entzündungsherde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem
6. Fläche und Anzahl sich vergrößernder Entzündungsherde
7. Fläche und Anzahl sich verkleinernder Entzündungsherde
8. Fläche und Anzahl verschwundener Entzündungsherde
9. Fläche und Anzahl neu entstandener Entzündungsherde

Abbildung 2-2: Auswertung der MRT-Bilder

MRT-Bilder einer 24-jährigen Patientin mit RR-MS. Man erkennt sowohl im T2-gewichteten Bild (a) um die Herde perifokale Ödeme als auch im T1-gewichteten Bild mit Kontrastmittel-Anreicherung (b) als Zeichen eines Krankheitsschubes. Mittels Millimeterpapier wurde die Querschnittsfläche jedes einzelnen Herdes gemessen. Unter Beachtung des Maßstabes konnte somit die kumulierte Querschnittsfläche inaktiver Herde als auch der Herde mit Aktivitätskriterien (z.B. Kontrastmittel-Anreicherung oder perifokales Ödem) errechnet werden.



(Kraus J, Kuehne B.S, Tofighi J (2002): serum cytokine levels do not correlate with disease activity and severity assessed by brain MRI in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 105, 300-308.)

2.3.2.1 Aktivität der Entzündungsherde im MRT

Für jeden Patienten wurden so die oben genannten Parameter ermittelt. Zusätzlich sollte die Aktivität der Erkrankung bestimmt werden. Dafür wurden als "aktive Entzündungsherde" Läsionen mit folgenden Merkmalen definiert:

1. Entzündungsherde, die als Ausdruck einer Schrankenstörung der Blut-Hirn-Schranke Kontrastmittel anreichern [114]
2. Entzündungsherde mit perifokalem Ödem als Zeichen der akuten Entzündungsreaktion [109]

Von den aktiven Läsionen wurden wie oben beschrieben sowohl die kumulierte Fläche, als auch die Anzahl bestimmt. Die MRT eines Patienten galt als aktiv, wenn mindestens eines der zwei Aktivitätskriterien erfüllt war.

2.4 Statistische Analyse der Ergebnisse

Die Durchführung der statistischen Analyse wurde durch die Firma Schering AG, Berlin, unterstützt und durch einen erfahrenen Statistiker der Firma Biodat-PAREXEL, Berlin durchgeführt.

Zur statistischen Beurteilung der unterschiedlichen Verläufe der Serumkonzentrationen zwischen beiden untersuchten Patientengruppen über den Studienzeitraum wurde der nicht-parametrische ANOVA-Test zur Analyse longitudinaler Daten angewendet [115]. Dabei wurden fehlende Meßwerte durch das anerkannte Verfahren "Last observation carried forward" (LOCF) ergänzt.

Die statistische Analyse der demographischen, klinischen und MRT-Daten erfolgte auf der Grundlage des nicht parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests. Zur Berechnung der "Zeit bis zum ersten Schub" wurde die Kaplan-Meier-Analyse verwendet.

Zur Einteilung der Behandlungsgruppe in "Response" und "Non-Response" wurde die Bestimmung des linearen Trends mittels Regressionsanalyse verwendet.

Für die graphische Darstellung der nicht normalverteilten Daten wurde die Darstellung der relativen Marginaleffekte gewählt. Deren Vorteil liegt in der durch eine Datentransformation erzielten Unabhängigkeit von einer Meßskala.

So kommen alle Werte der gemessenen Serumkonzentrationen der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle beider Patientengruppen zwischen 0 (niedrigster Wert) und 1 (höchster Wert) auf der transformierten Y-Achse zur Darstellung. Dabei bezeichnet der Wert 0,5 auf der Y-Achse den Median aller im gesamten Zeitraum gemessener Serumkonzentrationen beider Patientengruppen. Durch diese Standardisierung wird die Angabe einer nicht parametrischen Größe zum Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen ermöglicht.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse des Patientenkollektivs

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der statistischen Analyse der demographischen Daten der untersuchten Patientenkollektive sowie die klinischen Krankheitsverläufe der an Multipler Sklerose erkrankten Patienten vorgestellt werden.

3.1.1 Analyse der demographischen Daten

Die beiden Patientenkollektive wurden zu Beginn der Studie miteinander verglichen, um so Unterschiede zwischen den Gruppen darzustellen. Zu diesem Zeitpunkt (T0) waren alle an Multipler Sklerose erkrankte Patienten unbehandelt.

Die demographischen Daten sind in der Tabelle 7-4 im Anhang dargestellt.

68 Patienten wurden von März 1996 an bis April 1999 in diese offene, prospektive und nicht randomisierte Studie aufgenommen. 30 Patienten wünschten sich eine intervenierende Immunprophylaxe mit Interferon-beta 1b (Betaferon®, Schering) und wurden folglich der Behandlungsgruppe bzw. Therapiegruppe zugeordnet. Die 38 Patienten, die sich zu diesem Zeitpunkt gegen eine immunmodulierende Therapie entschieden, bildeten demgegenüber die Gruppe der nicht therapierten MS-Patienten.

Durchschnittlich wurde die Behandlungsgruppe über einen Zeitraum von 24 Monaten und die Gruppe der nicht behandelten Patienten über einen Zeitraum von 16 Monaten beobachtet ($p=0,004$).

Die Geschlechtsverteilung ergab für die Behandlungsgruppe einen Anteil von 18 Frauen (60%) und 12 (40%) Männern und für die Gruppe der nicht therapierten Patienten einen Anteil von 34 Frauen (89,5%) und 4 Männern (10,5%). Die Geschlechtsverteilung war in beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ($p=0,004$).

Das Alter der Patienten lag in der Gruppe der therapierten Patienten bei 36 Jahren (Min./Max.: 18/57) und in Gruppe der nicht therapierten Patienten bei 34 Jahren (Min./Max.: 19/51). Ein signifikanter Unterschied lag nicht vor ($p=0,55$).

Die durchschnittliche Dauer der Erkrankung betrug in der Behandlungsgruppe 6,4 Jahre und in der Gruppe der nicht behandelten Patienten 3 Jahre ($p=0,01$).

Als Einschlusskriterium waren mindestens 2 Schübe in den letzten 2 Jahren vor Studienbeginn gefordert. Betrachtet man die Anzahl der Schübe innerhalb des Zeitraumes von 2 Jahren vor Studienbeginn, so traten in diesem Zeitraum in der Behandlungsgruppe 4,5 Schübe (Median) auf und in der nicht behandelten Gruppe von MS-Patienten 3,0 Schübe ($p=0,005$).

Zusätzlich wurde die relative Größe Schubrate/Jahr berechnet. Für diese Berechnung wurden nur Patienten mit mindestens einem Jahr Beobachtungszeit im Rahmen der Studie eingeschlossen. Daraus ergab sich eine Reduktion der ursprünglichen Gruppengrößen, so

daß nunmehr 29 Patienten das Kollektiv der mit Interferon-beta 1b behandelten MS-Patienten bildeten und 28 Patienten die Gruppe der nicht behandelten Patienten bildeten.

Die Schubrate/Jahr vor Beginn der Studie, betrug in der Behandlungsgruppe 1,0 (Min./Max.: 0,2/ 2,5) und in der Gruppe der nicht behandelten Patienten 0,84 (Min./Max.: 0,3/ 3,3). Ein signifikanter Unterschied bestand nicht ($p= 0,60$). Die Schubrate/Jahr im Studienzeitraum betrug in der Behandlungsgruppe 0,99 (Min./Max.: 0/ 2,9) und in der Gruppe der nicht behandelten Patienten 1,54 (Min./Max.: 0/ 4,3).

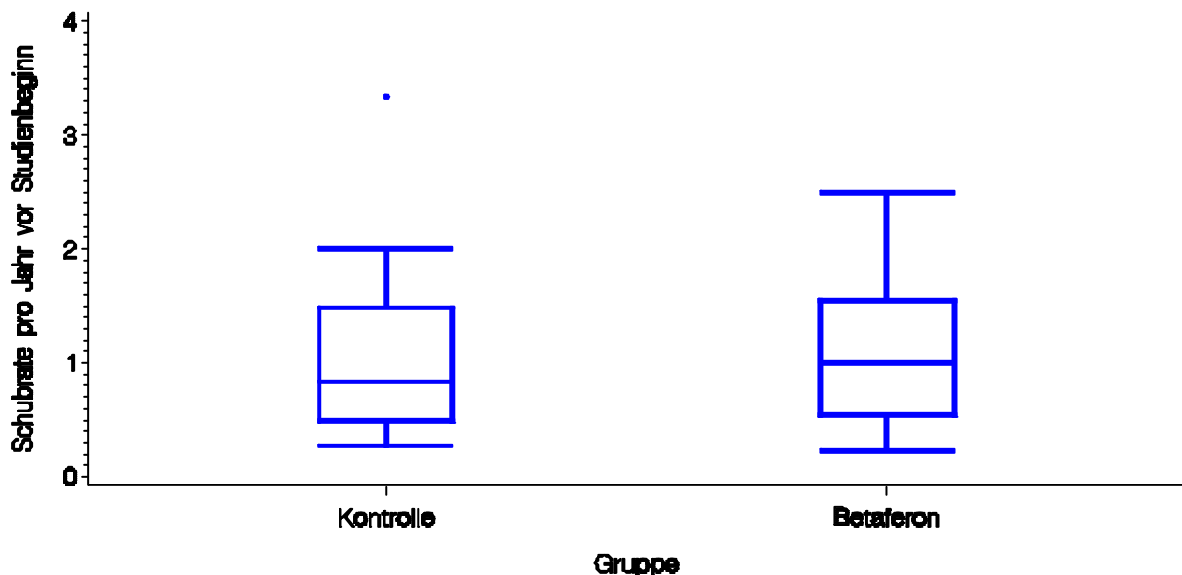
Eine deutliche Reduktion der jährlichen Schubrate in dem mit Interferon-beta 1b behandelten Patientenkollektiv war zu verzeichnen. Die Berechnung der Differenz der Schubrate/Jahr vor Beginn der Studie und im Studienzeitraum zeigte einen statistischen Unterschied zwischen den untersuchten Patientenkollektiven ($p= 0,03$).

In den Abbildungen 3-1 bis 3-3 sind im folgenden die Schubrate/Jahr vor Studienbeginn (Abbildung 3-1), die Schubrate/Jahr im Studienzeitraum (Abbildung 3-2) und die Differenz der Schubrate/Jahr vor Studienbeginn und im Studienzeitraum (Abbildung 3-3) dargestellt.

Für die graphische Darstellung wurden Box-and-Whisker-Blots verwendet.

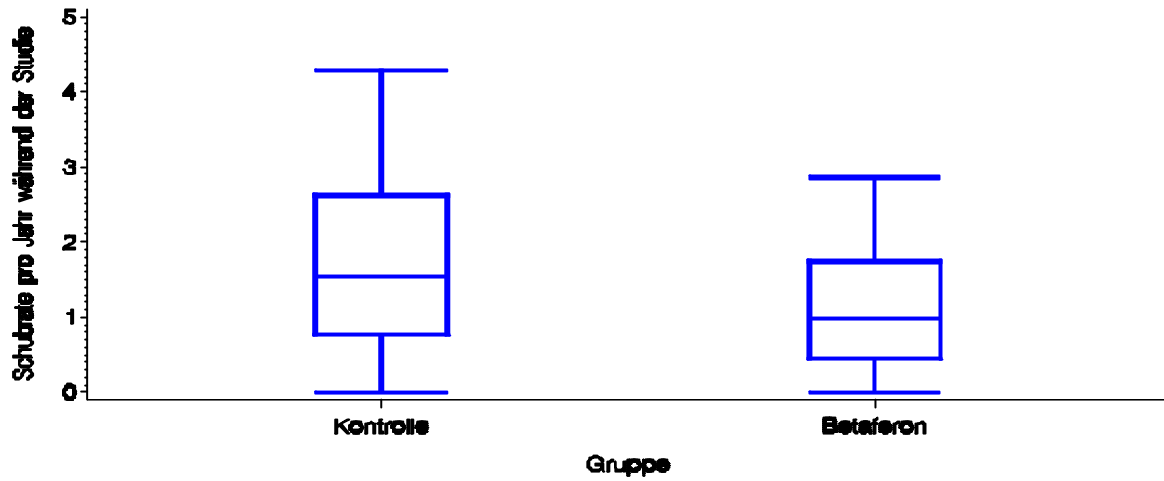
Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung des nicht parametrischen Wilxon-Mann-Whitney-Tests.

Abbildung 3-1: Darstellung der Schubrate/Jahr vor Studienbeginn



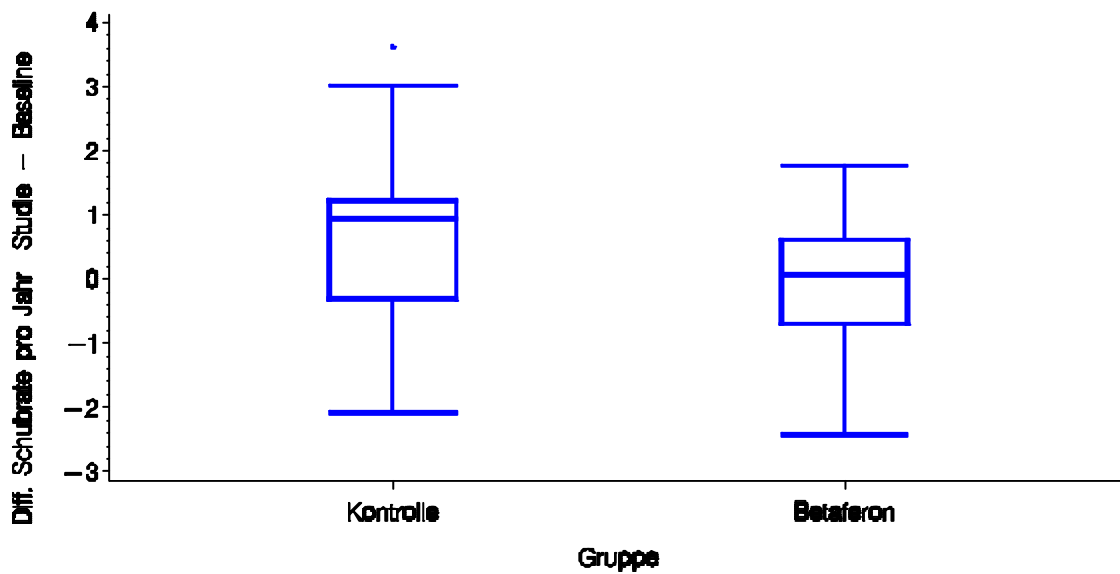
only patients with duration of disease longer than 1 year

Abbildung 3-2: Schubrate/Jahr im Studienzeitraum



only patients with duration of disease longer than 1 year

Abbildung 3-3: Differenz der Schubrate/Jahr vor Studienbeginn und im Studienzeitraum



only patients with duration of disease longer than 1 year

Auf der von 0-10 (0= keine Behinderung; 10= Tod infolge MS) reichenden Skala des Expanded Disability Status (EDSS) nach Kurtzke et al. betrug der Wert für beide Gruppen 2,0. Dies bedeutet, dass vorwiegend Patienten mit einem geringen Behinderungsgrad und erhaltener Gehfähigkeit in die Studie eingeschlossen wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientenkollektiven in Bezug auf den Behinderungsgrad bestand nicht ($p=0,10$).

Zum Beginn der Studie wies die Gruppe, die im Folgenden mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten, eine größere Anzahl von Herden ($m=39$) auf im Vergleich zum nicht behandelten Patientenkollektiv ($m=30$). Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,03$). Ebenso war die Fläche der Herde (in mm^2) unterschiedlich: in der Gruppe der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten konnte eine Gesamtläsionsfläche ("disease burden") von $m=1533 \text{ mm}^2$ (Min./Max.: 66/ 21812 mm^2) gemessen werden. Die Gruppe der nicht behandelten Patienten wies demgegenüber eine Gesamtläsionsfläche von $m=811 \text{ mm}^2$ (Min./Max.: 0/ 9338 mm^2) auf. Die statistische Analyse machte einen signifikanten Unterschied deutlich ($p=0,003$).

3.1.2 Darstellung der Krankheitsverläufe der MS-Patienten

Im folgenden Abschnitt sollen die Krankheitsverläufe der MS-Patienten, die an dieser Studie teilgenommen haben, aus klinischer Sicht dargestellt werden.

-Schübe-

Im Beobachtungszeitraum von 18 Monaten erlitten in der Behandlungsgruppe (30 Patienten) 24 Patienten einen oder mehrere klinische Schübe. Bei den verbleibenden 6 Patienten (20%) trat im Studienzeitraum kein Krankheitsschub auf. In der Gruppe der nicht behandelten MS-Patienten (38) erlitten 31 Patienten einen oder mehrere klinische Schübe, 7 Patienten (18%) blieben ohne Krankheitsschub.

Betrachtet man die Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes in beiden Gruppen, so fällt auf, daß die Zeit bis zum Auftreten eines Krankheitsschubes in der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe länger ist als in der Gruppe der unbehandelten MS-Patienten ($p=0,20$).

Die Untersuchung mittels der Kaplan-Meier-Analyse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt. Dabei wurde zum einen ein Krankheitsschub, welcher innerhalb der ersten 30 Tagen nach Studienbeginn auftrat und zum anderen ein Schub, welcher innerhalb der ersten 90 Tagen nach Studienbeginn auftrat unberücksichtigt gelassen. Die zugrunde liegende Überlegung dieser Untersuchung ist, daß aus der klinischen Erfahrung heraus, eine Reduktion der Schubfrequenz unter einer immunmodulatorischen Therapie mit Interferonen frühestens nach ca. 3 Monaten zu erwarten ist. Zu Beginn einer Interferon-Therapie stellen in diesem frühen Behandlungszeitraum auftretende Schübe oft den natürlichen

Krankheitsverlauf dar, da die Regulation des Immunsystems zu diesem Zeitpunkt klinisch noch nicht in Erscheinung tritt.

In den Abbildungen 34 bis 36 sind im folgenden die Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes nach Studienbeginn (Abb. 34), die Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes ab dem 30. Tag nach Studienbeginn (Abb. 35) und die Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes ab dem 90. Tag nach Studienbeginn (Abb. 36) dargestellt.

Zur graphischen Darstellung wurde die Kaplan-Meier-Kurve verwendet, dabei repräsentiert die gestrichelte Linie die nicht behandelte Gruppe von MS-Patienten und die durchgezogene Linie die mit Betaferon® behandelten MS-Patienten.

Abbildung 3-4: Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes nach Studienbeginn

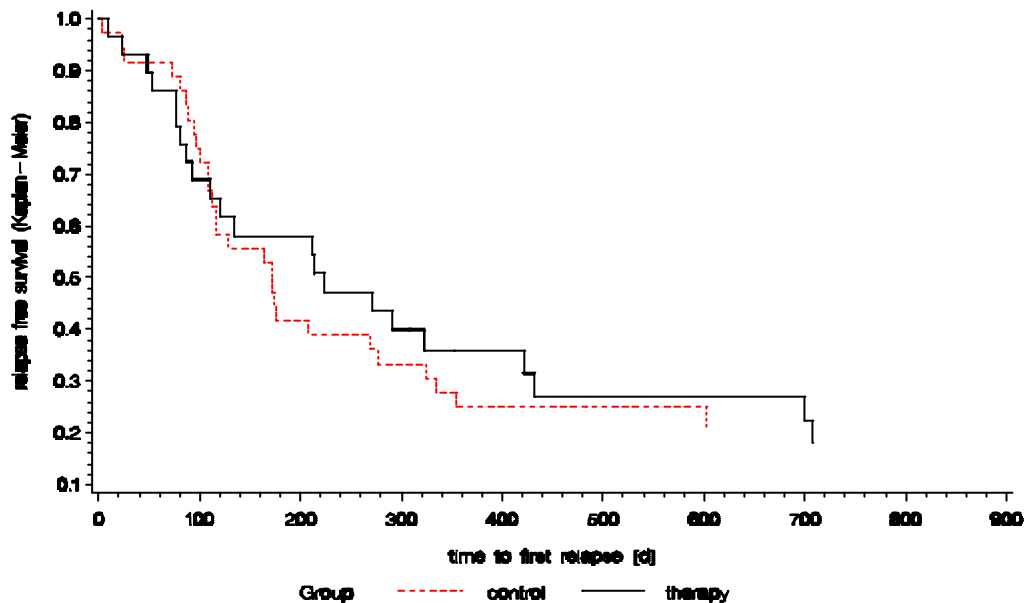
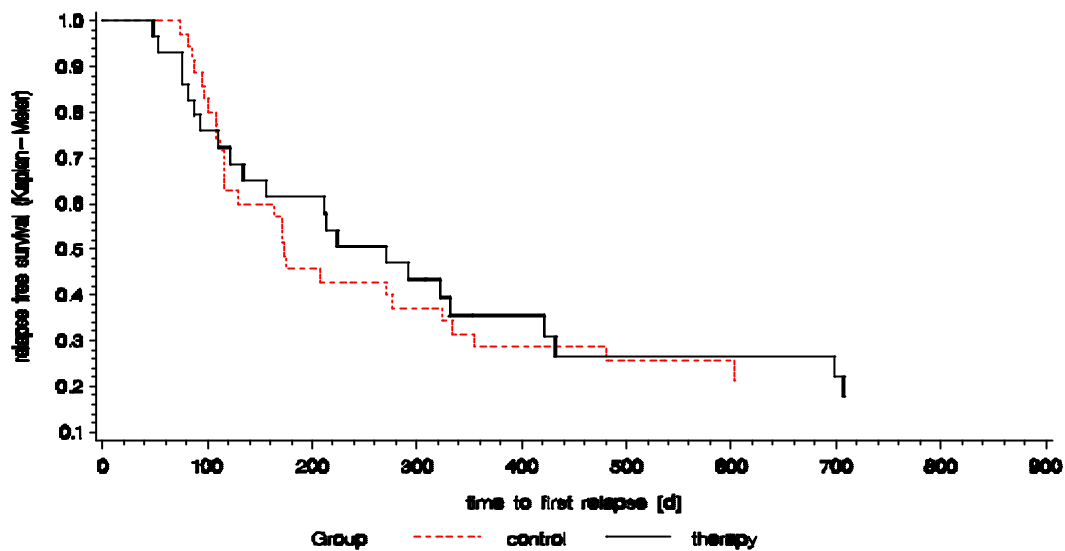
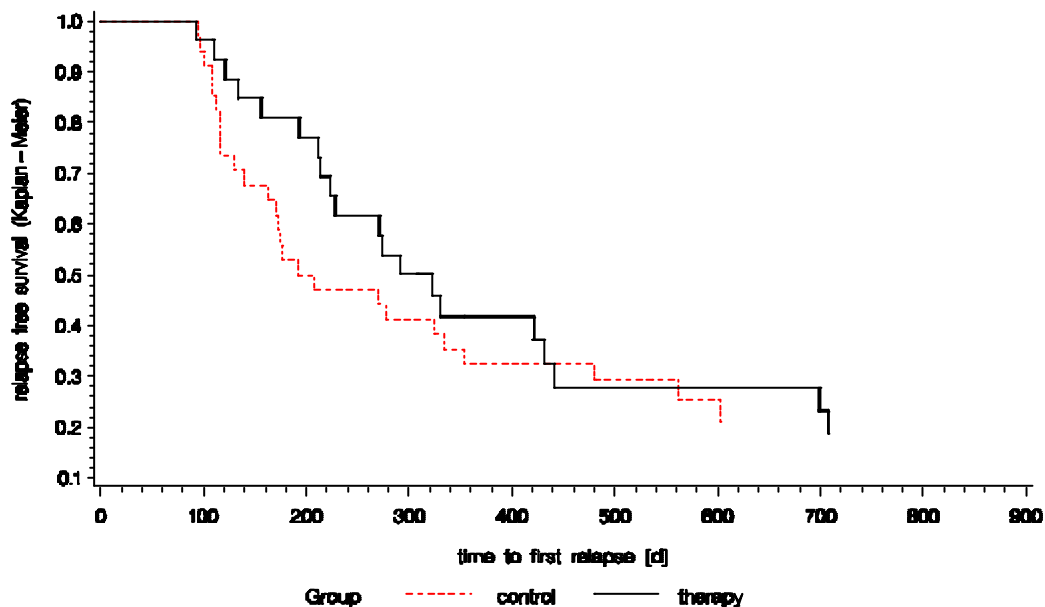


Abbildung 3-5: Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes 30 Tage nach Studienbeginn.



time to first relapse not considered when less than 30 days after start of study

Abbildung 3-6: Zeit bis zum Auftreten des ersten Krankheitsschubes 90 Tage nach Studienbeginn.



time to first relapse not considered when less than 90 days after start of study

-EDSS-

Zur weiteren klinischen Beurteilung des Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose wurden die Veränderungen im EDS-Score nach einem Jahr (T4) und zum Ende des Beobachtungszeitraumes (T6) mit dem EDSS zum Beginn der Studie (T0) miteinander verglichen.

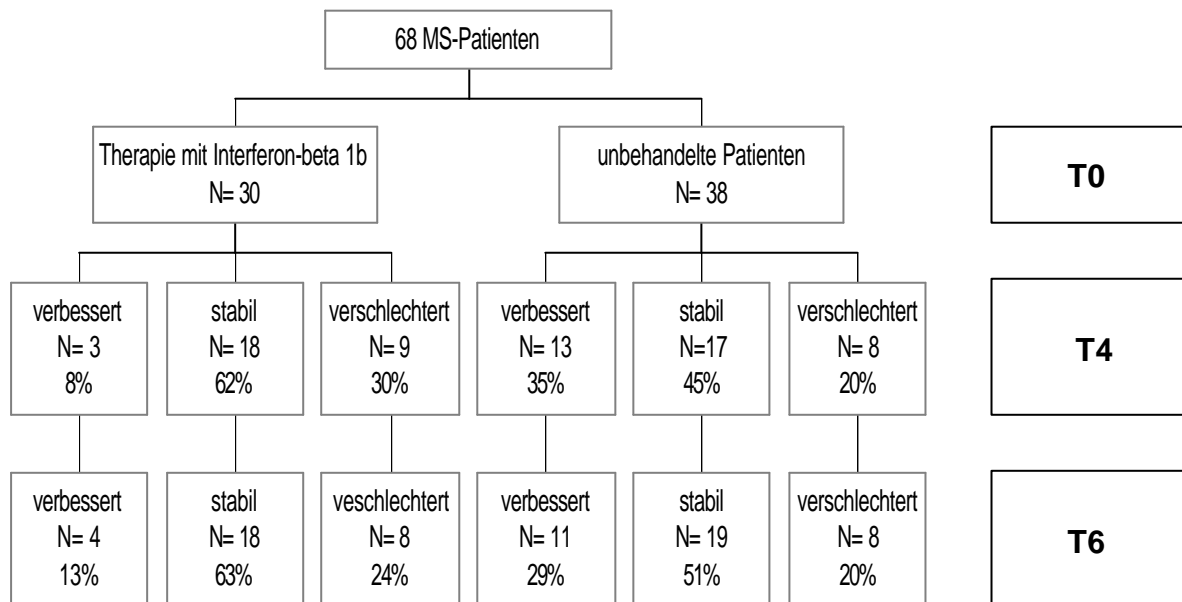
In der Gruppe der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten trat nach einem Jahr (T4) unter Therapie bei 8% der Patienten eine Verbesserung auf, wobei eine Verbesserung bzw. Verschlechterung als eine Abnahme bzw. eine Zunahme um mindestens einem Punkt im EDSS definiert wurde. Bei 30% der Patienten trat eine Verschlechterung auf. Der größte Teil dieser Gruppe (62%) hatte im ersten Behandlungsjahr einen stabilen Krankheitsverlauf, d.h. es kam aus klinischer Sicht zu keiner Veränderung im EDSS.

Am Ende des Beobachtungszeitraums (T6) kam es bei 13% der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten zu einer Verbesserung im EDSS, 24% der Patienten der Therapiegruppe verschlechterten sich. Bei den verbleibenden 63% der Patienten blieb der Krankheitsverlauf weiterhin stabil.

In der Gruppe der nicht behandelten Patienten ließen sich folgende Ergebnisse nach einem Jahr (T4) beobachten: 35% der Patienten verbesserten sich und 20% des Patientenkollektives verschlechterten sich. Bei 45% des Kollektivs konnte keine Veränderung im EDSS festgestellt werden. Diese Patienten hatten also einen stabilen Krankheitsverlauf.

Am Ende der Studie (T6) hatten sich 29% des Patientenkollektivs verbessert und 20% der nicht behandelten MS-Patienten verschlechtert. Der Anteil derer Patienten, die nach der Beurteilung durch den EDSS einen stabilen Krankheitsverlauf hatten, lag bei 51%.

Abbildung 3-7: Graphische Darstellung der Veränderung des Krankheitsverlaufes anhand des EDSS im Studienzeitraum von 18 Monaten.



Die Einteilung erfolgte nach den Kriterien "verbessert", "verschlechtert" und "stabil". Die Definitionen sind im Text angegeben.

-Nebenwirkungen-

Zu Beginn der Studie wurde, wie bereits beschrieben, die Entscheidung für oder gegen eine immunmodulierende Therapie mit Interferon-beta 1b - nach ausführlicher Beratung und in Abstimmung mit dem behandelnden Arzt - von den MS-Patienten selbst getroffen. Der unvorhersehbare Verlauf und das Fortschreiten der Erkrankungen machten es bei manchen dieser Patienten jedoch notwendig, eine prophylaktische Therapie mit immunmodulierenden Substanzen zu beginnen oder bei Patienten, die zuvor schon mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) behandelt wurden, auf ein anderes Interferon-Präparat (z.B. Interferon-beta 1a, z.B. Rebif®) umzustellen.

Die Umstellung auf ein anderes immunmodulierend wirkendes Medikament war innerhalb der Therapiegruppe bei 3 Patienten aufgrund einer Progredienz der Erkrankung indiziert.

In der Gruppe der nicht therapierten Patienten, bei denen aus ärztlicher Sicht bei Studienbeginn zunächst ein Beobachten des natürlichen Krankheitsverlaufs indiziert war, wurde aufgrund von gehäuft auftretenden Schüben und einer beginnenden klinischen Verschlechterung 9 Patienten zu einer prophylaktischen Therapie geraten.

Unter Therapie mit Interferon-beta 1b kam es bei insgesamt 47% der Patienten in den ersten drei Monaten zu den folgenden Nebenwirkungen, wobei mehrfache Nennungen mögliche waren: Grippeähnliche Nebenwirkungen 36%, Blutbildveränderungen 13%, Hautrötungen an den Injektionsstellen 20%, Leuko- bzw. Thrombozytopenie 6% und Hautnekrosen 6%.

Die von vielen Patienten zu Beginn der Interferon-Therapie beklagten grippeähnlichen Symptome besserten sich unter gleichzeitiger Einnahme eines antiphlogistischen Medikaments (z.B. Ibuprofen® 400mg/ Tag) innerhalb weniger Wochen. Ebenso bildeten sich die anderen beschriebenen Nebenwirkungen unter der fortgeführten Therapie vollständig zurück.

3.2 Analyse der Verläufe der Konzentration von Zytokinen bzw. Adhäsionsmolekülen

Zur Beantwortung der Frage, ob ein Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe und der nicht therapierten Gruppe in Bezug auf die im ELISA gemessenen Konzentrationen der Zytokine und Adhäsionsmoleküle vorliegt, wurden diese bis zu einem Zeitpunkt von 18 Monaten nach Studienbeginn (T0/T6) miteinander verglichen.

Zusätzlich wurden die vermuteten Veränderungen in der Konzentration der Zytokine im Serum zwischen den beiden Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten bzw. Zeitintervallen (z.B. T0/T1, T0/T2, bis... T0/T6 und T1/T2, T1/T3, bis... T1/T6, etc. ...) statistisch untersucht. Ziel dieser Analyse sollte es sein, eine frühe Veränderung der Zytokinexpression unter Therapie mit Interferon-beta 1b von einer spät einsetzenden Veränderung zu unterscheiden,

sowie einen passageren Effekt von einem andauernden regulativen Effekt unter Therapie zu differenzieren.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde mittels des nicht parametrischen ANOVA-Tests für Verlaufsbeobachtungen in einem nicht normalverteilten Patientenkollektiv berechnet.

Die Meßwerte, sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse sind in den Tabellen 7-5 bis 7-15 im Anhang zusammengefaßt.

Zur Veranschaulichung der Veränderungen der Konzentration der gemessenen Zytokine erfolgt zusätzlich eine Beschreibung anhand des Median (m). Wo aufgrund der "Trennschärfe" des Median dieser nicht verwendet werden konnte, erfolgt die Beschreibung anhand der Mittelwerte und wird noch einmal ausdrücklich erwähnt.

In den Abbildungen 3-8 bis 3-16 sind die Veränderungen der Serumkonzentrationen der untersuchten Adhäsionsmoleküle und Zytokine graphisch unter Verwendung der Methode der relativen Marginaleffekte dargestellt.

Alle Werte der gemessenen Serumkonzentrationen der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle beider Patientengruppen kommen zwischen 0 (niedrigster Wert) und 1 (höchster Wert) auf der transformierten Y-Achse zur Darstellung.

Dabei bezeichnet der Wert 0,5 auf der Y-Achse den Median aller im gesamten Studienzeitraum gemessener Serumkonzentrationen beider Patientengruppen.

Die so transformierten Werte der Serumkonzentrationen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten (n= 30) sind als durchgezogene Linie dargestellt, die entsprechenden Werte der nicht behandelten Patientengruppe (n= 38) sind als gestrichelte Linie dargestellt.

3.2.1 Adhäsionsmoleküle

Die Messung der Konzentration von sICAM-1, s-ICAM-3 im Serum und von sVCAM-1 im Plasma mittels ELISA lieferte bei allen Patienten Meßwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenzen.

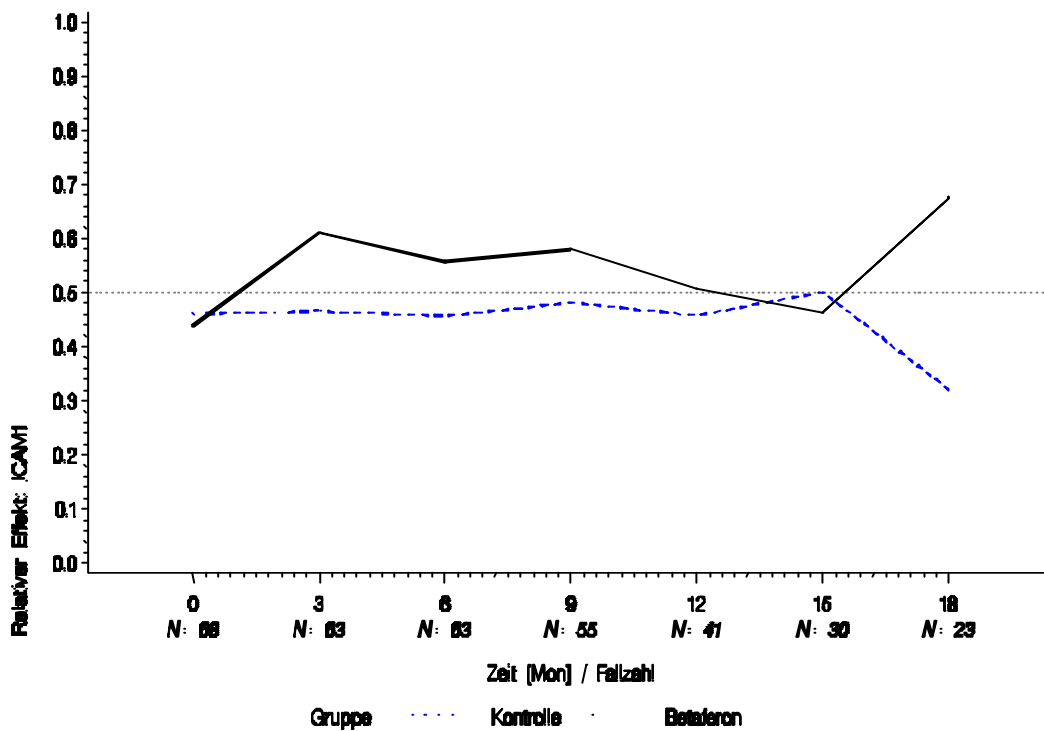
- Intracellular-adhesion-molecule-1, (sICAM-1) -

Die Betrachtung der Veränderungen der Serumkonzentration von sICAM-1 im zeitlichen Verlauf zeigt einen deutlichen Anstieg der Konzentration von sICAM-1 im Serum nach 3 Monaten in der Behandlungsgruppe (T0/T1: m= 530/ 659 ng/ml). Dieser Anstieg blieb auch im zeitlichen Verlauf weiter nachweisbar (T0/T6: m= 530/ 696 ng/ml). Im Gegensatz dazu kam es in der Gruppe der nicht therapierten Patienten zu einem deutlich sichtbaren Abfall der Konzentration von sICAM-1 im zeitlichen Verlauf (T0/T6: m= 570/ 466 ng/ml).

Die statistische Analyse der Konzentration von sICAM-1 im Serum und im zeitlichen Verlauf konnte zwischen der Behandlungsgruppe und der Gruppe der nicht behandelten Patienten einen statistisch signifikanten Unterschied aufzeigen (T0/T6: $p=0,0004$).

Zusätzlich fanden sich signifikante Unterschiede in der Konzentration vom sICAM-1 zwischen den untersuchten Patientenkollektiven in der statistischen Untersuchung folgender Zeitintervalle: T0/T1 ($p=0,02$), T1/T5 ($p=0,05$), T2/T6 ($p=0,003$) und T3/T6 ($p=0,02$).

Abbildung 3-8: Veränderung der Konzentration von sICAM-1 im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



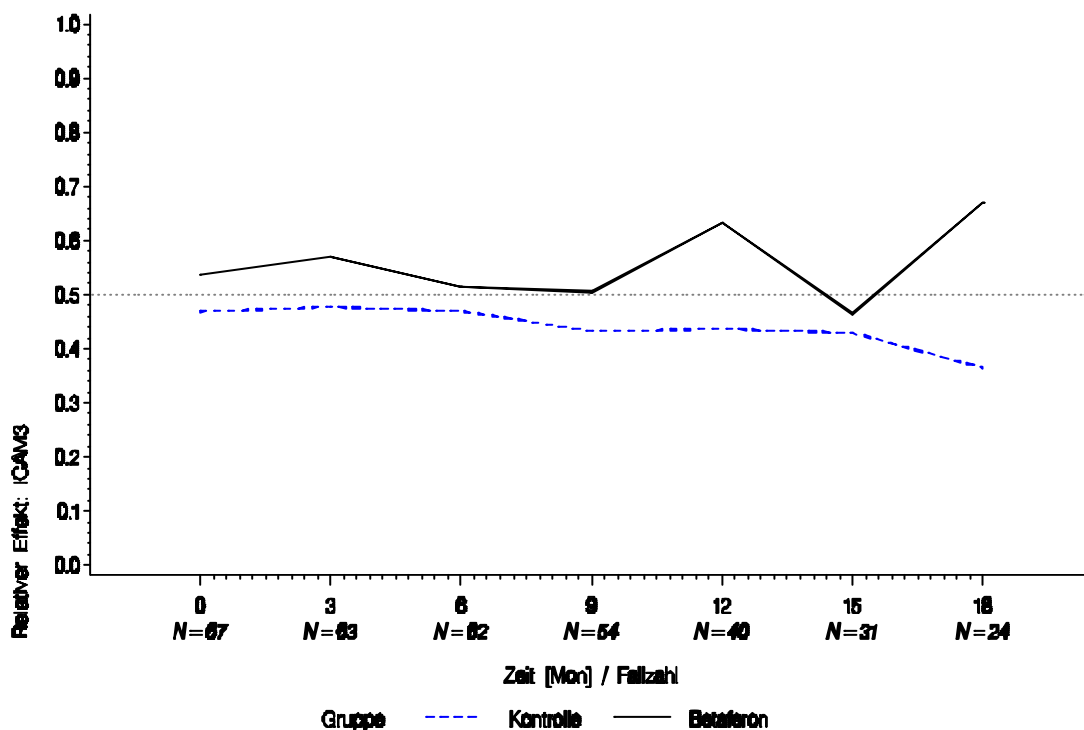
- Intracellular-adhesion-molecule-3, (sICAM-3) -

Betrachtet man die Veränderungen der Serumkonzentration von sICAM-3 so war in der Behandlungsgruppe ein Anstieg von sICAM-3 (T0/T6: m= 296/ 340 ng/ml) feststellbar. Demgegenüber kam es in der Gruppe der unbehandelten Patienten zu einem Absinken der Konzentration von sICAM-3 (T0/T6: m= 270/ 243 ng/ml).

Die Analyse der Veränderung der Konzentrationen dieses Adhäsionsmoleküls im Serum zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und dem nicht behandelten Patientenkollektiv zeigte ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied (T0/T6: $p= 0,01$).

Zudem zeigte die genauere analytische Betrachtung der verschiedenen Intervalle signifikante Unterschiede in der Konzentration vom sICAM-3 im Serum zwischen den beiden Patientenkollektiven (T1/T6: $p= 0,02$; T2/T6: $p= 0,01$; T3/T6: $p= 0,03$ und T5/T6: $p= 0,03$).

Abbildung 3-9: Veränderung der Konzentration von sICAM-3 im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



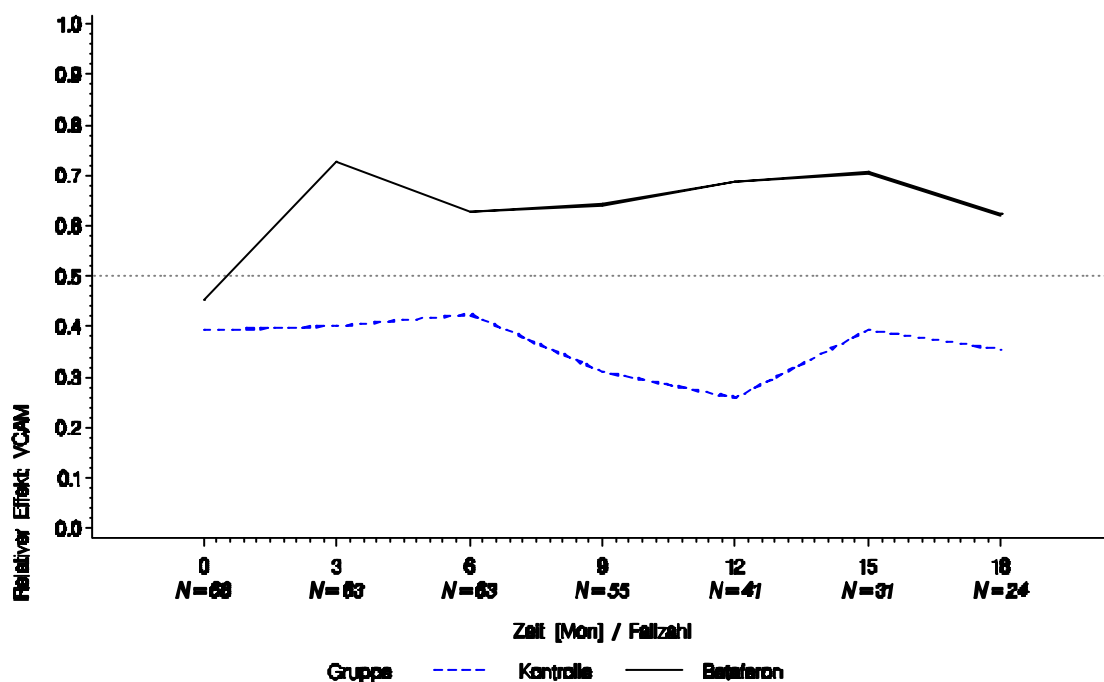
- Vascular-cell-adhesion-molecule-1, (sVCAM-1) -

Betrachtet man die Veränderung der Konzentration von sVCAM-1 im Plasma, so war ein initialer Anstieg der Konzentration von sVCAM-1 nach drei Monaten in der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten (T0/T1: m= 703/ 1047 ng/ml) feststellbar. Im zeitlichen Verlauf bestand zudem eine weiter ansteigende Konzentration über den Ausgangswert hinaus (T0/T6: m= 703/ 950 ng/ml). In der Gruppe der nicht therapierten Patienten kam es dagegen zu einem Abfall der Plasmakonzentration im Beobachtungszeitraum (T0/T6: m= 680/ 644 ng/ml).

In der Analyse der Konzentrationen dieses Adhäsionsmoleküls zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden (T0/T6: p= 0,14).

Die weiterführende Analyse zeigte demgegenüber jedoch signifikante Unterschiede in der Konzentration von sVCAM-1 zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv in der Untersuchung folgender Zeitintervalle: T0/T1 (p= 0,00006), T0/T2 (p= 0,05), T0/T3 (p= 0,0001), T0/T4 (p= 0,000006), T0/T5 (p= 0,002), T1/T2 (p= 0,02) und T2/T3 (p= 0,04).

Abbildung 3-10: Veränderung der Konzentration von sVCAM-1 im Plasma über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



3.2.2 Proinflammatorische Zytokine

- Interferon-gamma, (IFN-gamma) -

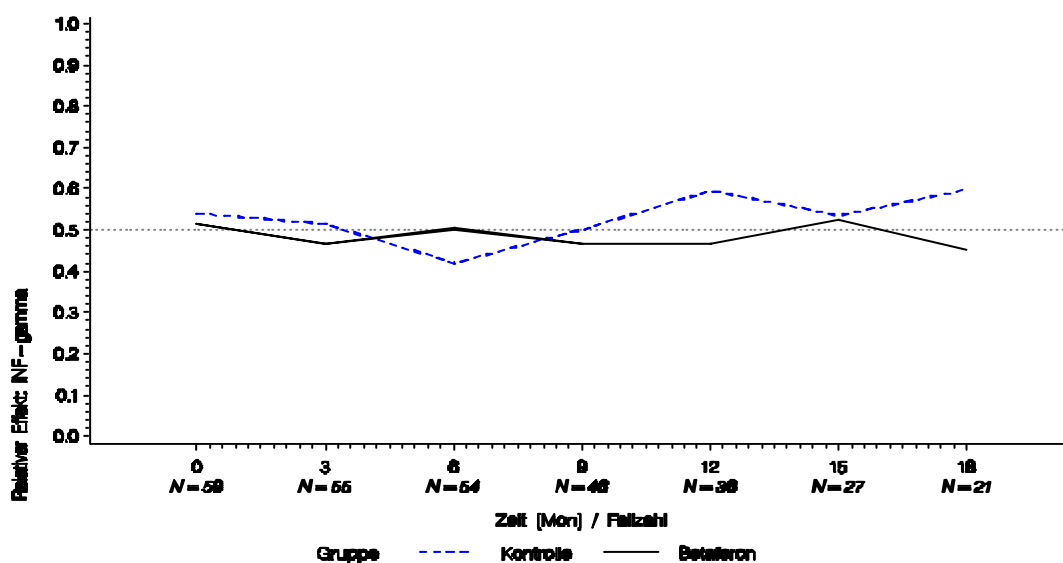
Bei der Messung der Konzentration von IFN-gamma im Serum mittels ELISA lagen 52% der Meßwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenze des angewendeten Testsystems (> 4 pg/ml).

Die Konzentration dieses Zytokins im Serum zeigte im Beobachtungszeitraum in beiden Gruppen einen deutlich fluktuierenden Verlauf. Auffällig war, daß unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Patienten große individuelle Unterschiede in der Expression dieses Zytokins zu finden waren (Mn./Max.: 0/ 436,9 pg/ml).

Die serielle Untersuchung des proinflammatorischen Zytokins Interferon-gamma im Serum bei MS-Patienten lieferte keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration desselben zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv (T0/T6: $p=0,28$).

Die weiterführende Analyse zeigte jedoch einen signifikanten Unterschied in der Konzentration von IFN-gamma zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv zu folgenden Zeitpunkten: T0/T2 ($p=0,05$), T1/T2 ($p=0,004$), T2/T3 ($p=0,03$) und T2/T6 ($p=0,04$).

Abbildung 3-11: Veränderung der Konzentration von Interferon-gamma im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



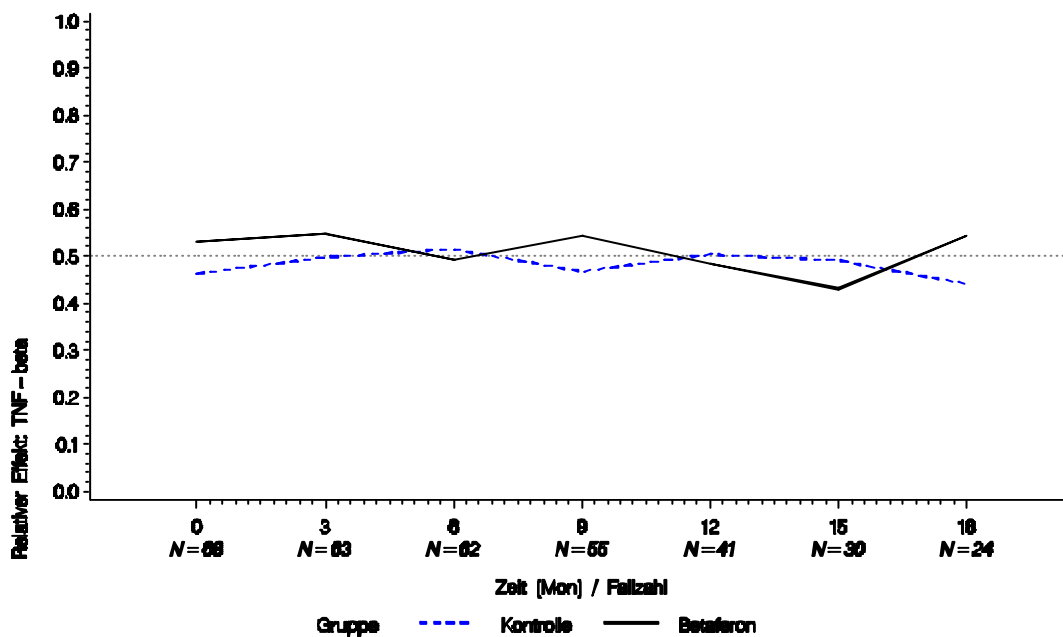
- Tumor-Necrosis-Factor-beta, (TNF-beta) -

Bei der Messung der Konzentration von TNF-beta im Serum mittels ELISA lagen 74% der Meßwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenze (> 7 pg/ml).

Auch bei dem zweiten in dieser Arbeit untersuchten Zytokin mit proinflammatorischer Wirkung auf das Entzündungsgeschehen bei Multipler Sklerose fiel, wie schon zuvor beim IFN-gamma beschrieben, die große Variabilität in der gemessenen Konzentration des TNF-beta im Serum auf (Min./Max.: 0/ 177,6 pg/ml). In der Behandlungsgruppe konnte jedoch ein Absinken der Konzentration von TNF-beta festgestellt werden (T0/T6: m= 13,9/ 9,9 pg/ml). In der statistischen Analyse der Veränderung der Konzentrationen dieses Zytokins im zeitlichen Verlauf zwischen der Behandlungsgruppe und den nicht therapierten Patienten konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (T0/T6: p= 0,35).

Die Untersuchung der verschiedenen Intervalle zeigte einen signifikanten Unterschied in der Konzentration von TNF-beta zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv im Zeitraum von 15 bis 18 Monaten (T5/T6: p= 0,04).

Abbildung 3-12: Veränderung der Konzentration von TNF-beta im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



-TNF-Rezeptor I (p55), (TNF-RI)-

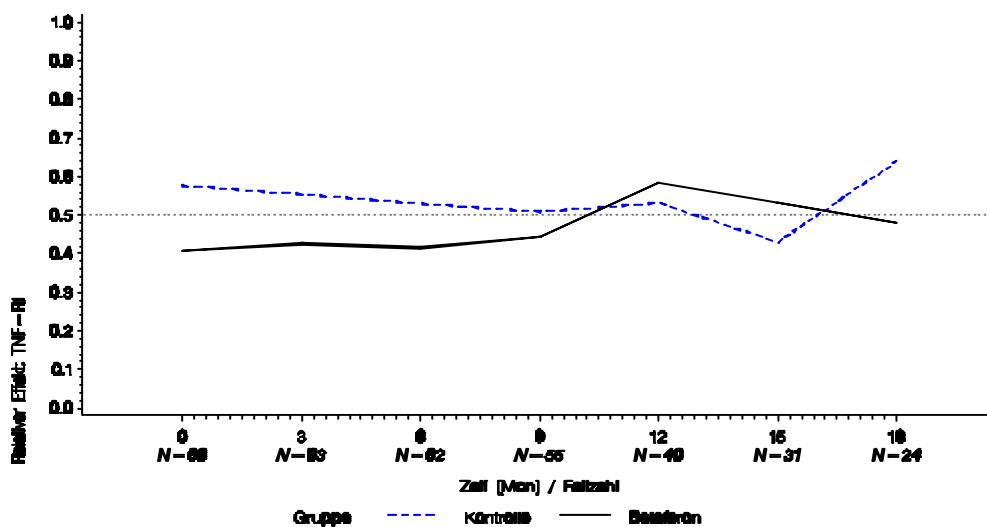
Die Messung der Konzentration der beiden Rezeptoren im Plasma mittels ELISA lieferte bei allen Patienten Meßwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenzen (TNF-RI: > 0,06 ng/ml und TNF-RII: > 0,02 ng/ml).

Die Betrachtung der Veränderung der Konzentration des TNF-RI (p55) im Plasma zeigte in der Behandlungsgruppe nach ca. 12 Monaten unter Therapie einen deutlichen Anstieg (T0/T4: m= 1,0/ 1,4 ng/ml). Die erhöhten Konzentrationen blieben auch am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 18 Monaten erhalten (T0/T6: m= 1,0/ 1,3 ng/ml). Demgegenüber zeigten sich nur geringe Veränderungen in der Konzentration von TNF-RI im Plasma in der Gruppe der nicht therapierten Patienten (T0/T6: m= 1,5 ng/ml).

Die Analyse der Veränderungen der Plasmakonzentration des TNF-RI zwischen der Behandlungsgruppe und der Gruppe der nicht therapierten Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede (T0/T6: p= 0,95).

Die weiterführenden statistischen Untersuchungen machten jedoch signifikante Unterschiede in der Konzentration des TNF-RI zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv bei der Betrachtung folgender Zeitintervalle deutlich: T0/T4 (p= 0,02), T0/T5 (p= 0,01), T1/T5 (p= 0,02), T2/T5 (p= 0,03) und T5/T6 (p= 0,05).

Abbildung 3-13: Veränderung der Konzentration von TNF-RI (p55) im Plasma über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



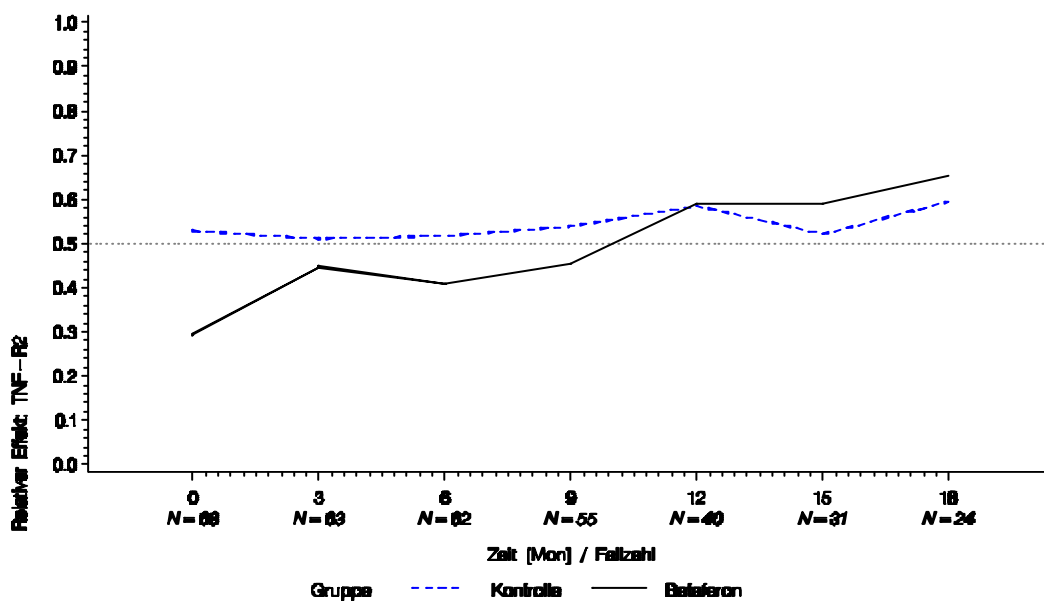
-TNF- Rezeptor II (p75), (TNF-RII)-

Vergleichbar mit den Veränderungen der Konzentration des TNF-RI (p55) im zeitlichen Verlauf konnte in der Gruppe der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten ein deutlicher und früher Anstieg der Plasmakonzentration von TNF-RII (p75) nach 6 Monaten beobachtet werden (T0/T2: m= 2,3/ 2,7 ng/ml). Dieser Anstieg setzte sich kontinuierlich fort und war auch am Ende des Beobachtungszeitraumes noch deutlich nachweisbar (T0/T6: m= 2,3/ 3,6 ng/ml). Demgegenüber zeigten sich nur geringe Veränderungen in der Konzentration von TNF-RII im zeitlichen Verlauf in der Gruppe der nicht therapierten Patienten (T0/T6: m= 3,2/ 3,4 ng/ml).

Jedoch bestand im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen des TNF-RI ein signifikanter Unterschied in der Konzentration von TNF-RII (p75) im Plasma zwischen der Behandlungsgruppe und der Gruppe der nicht therapierten Patienten (T0/T6: p= 0,001).

Zusätzlich zeigte die weiterführende Analyse signifikante Unterschiede in der Konzentration von TNF-RII zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv bezüglich der Untersuchung der Zeitintervalle T0/T1 (p= 0,0003), T0/T2 (p= 0,02), T0/T3 (p= 0,04), T0/T4 (p= 0,005), T0/T5 (p= 0,0007) und T2/T5 (p= 0,05) auf.

Abbildung 3-14: Veränderung der Konzentration von TNF-RII (p75) im Plasma über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



Antiinflammatorische Zytokine

- Interleukin-4, (IL-4) -

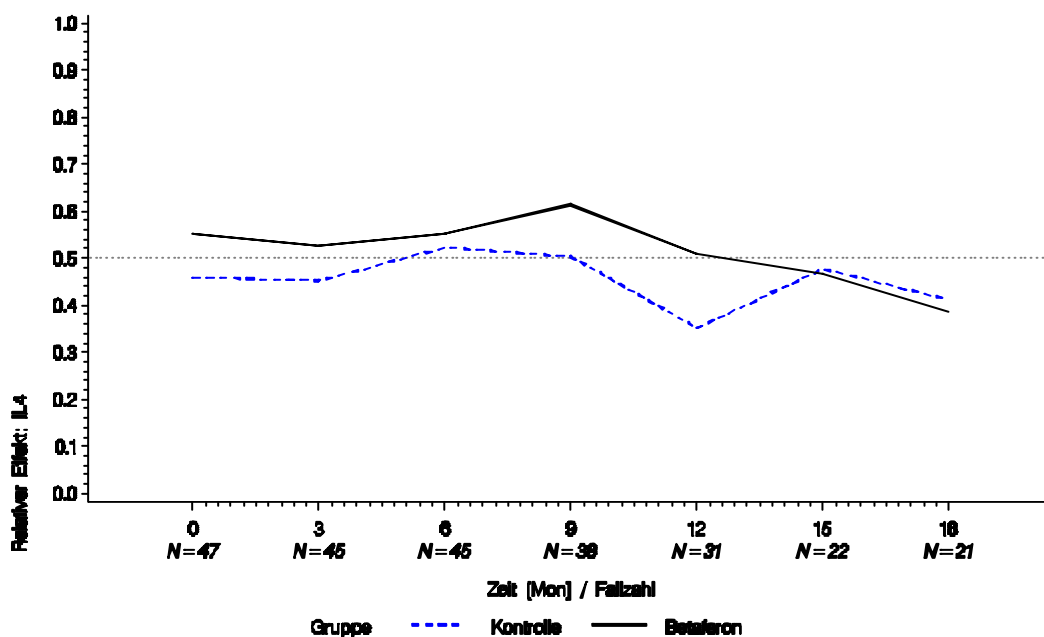
Bei der Messung der Konzentration von Interleukin-4 im Serum mittels ELISA lagen 61% der Meßwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenze des verwendeten Testsystems ($> 0,27$ pg/ml).

Die Betrachtung der gemessenen Serumkonzentrationen von Interleukin-4 zeigte deutlich fluktuierende Konzentrationen im zeitlichen Verlauf, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit (Min./Max.: 0/ 8,0 pg/ml).

Die Analyse der Serumkonzentrationen von Interleukin-4 zwischen den mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten und der Gruppe der nicht behandelten Patienten konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum (T6) keinen statistisch signifikanten Unterschied aufzeigen (T0/T6: $p= 0,23$).

Die Untersuchung der verschiedenen Intervalle machte jedoch einen signifikanten Unterschied in der Konzentration von IL-4 zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv im Zeitraum von 12 bis 18 Monaten deutlich (T4/T6: $p= 0,02$).

Abbildung 3-15: Veränderung der Konzentration von Interleukin-4 im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



- Interleukin-10, (IL-10) -

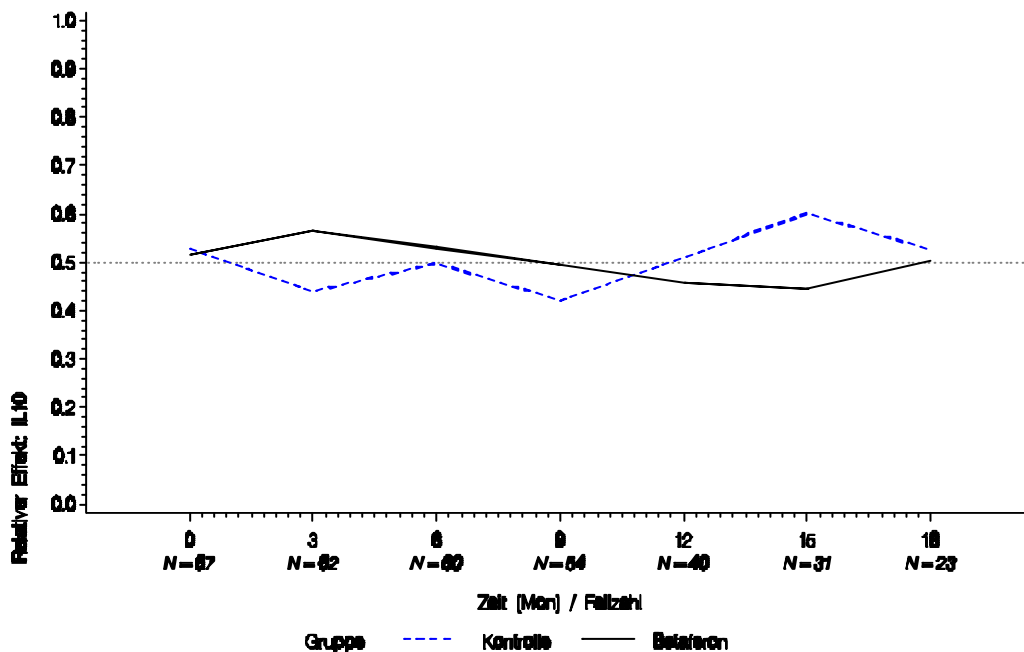
Die Messung der Konzentration von Interleukin-10 im Serum mittels ELISA lieferte bei allen Patienten Meßwerte oberhalb der unteren Nachweisgrenze ($> 0,21$ fg/ml).

Die Betrachtung der Konzentration von IL-10 im zeitlichen Verlauf zeigte innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs starke individuelle Unterschiede, verbunden mit einem stark fluktuierenden Verlauf der Serumkonzentrationen. So konnten bei einigen Patienten unabhängig von der Zugehörigkeit zu einer Gruppe individuell sehr hohe Konzentrationen von IL-10 im Serum gefunden werden (Min./Max.: 0/ 23,1 fg/ml).

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten und der Gruppe der nicht behandelten Patienten bei der Analyse der Konzentration des Interleukin-10 im Serum gefunden (T0/T6: $p= 0,86$).

Die statistische Untersuchung der verschiedenen Zeitintervalle konnte jedoch signifikante Unterschiede in der Konzentration von IL-10 zwischen der Behandlungsgruppe und dem nicht behandelten Patientenkollektiv sichtbar machen: T0/T1 ($p= 0,004$), T1/T4 ($p= 0,03$), T1/T5 ($p= 0,01$) und T3/T5 ($p= 0,03$).

Abbildung 3-16: Veränderung der Konzentration von Interleukin-10 im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



3.3 Analyse der seriell angefertigten Magnetresonanztomographien

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Auswertung der in Abständen von 6 Monaten (Zeitpunkte: T0, T2, T4, T6) angefertigten Magnetresonanztomographien des Kopfes der mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) therapierten Patienten und der nicht behandelten Gruppe von Patienten dargestellt werden.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) wurde mittels des nicht parametrischen ANOVA-Tests für Verlaufsbeobachtungen in einem nicht normalverteilten Patientenkollektiv berechnet.

Auf die Darstellung der zusätzlich im Rahmen dieser Studie erhobenen MRT-Parameter wie 1. Anzahl und Fläche verschwundener Herde, 2. Anzahl und Fläche sich verkleinernder Herde, 3. Anzahl und Fläche sich vergrößernder Herde, 4. Anzahl und Fläche neu aufgetretener Herde wurde verzichtet, da diese Kriterien in der vorliegenden Arbeit nicht für die Einteilung der Gruppe der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten nach der subklinischen Aktivität der Erkrankung herangezogen wurden.

Die genannten Parameter sind jedoch Bestandteil der Promotionsarbeit von H. Diehl, welcher maßgeblich an der Auswertung der MRT-Aufnahmen (s. Abschnitt 2: Material und Methode) beteiligt war und die erhobenen MRT-Parameter unter anderen Aspekten und einer anderen Fragestellung als in der vorliegenden Arbeit untersucht hat.

Die Ergebnisse der Auswertung aller im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen MRT-Parameter sind in den Tabellen 7-16 bis 7-20 im Anhang angeführt.

In den Abbildungen 3-17 bis 3-22 sind im folgenden die Veränderungen der untersuchten MRT-Parameter graphisch, unter Verwendung der bereits zuvor beschriebenen Methode der relativen Marginaleffekte, dargestellt.

Die transformierten Daten der MRT-Parameter in der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten (n= 30) sind als durchgezogene Linie dargestellt, die transformierten Daten der MRT-Parameter der nicht behandelten Patientengruppe (n= 35) als gestrichelte Linie.

3.3.1 Anzahl und Fläche der Herde

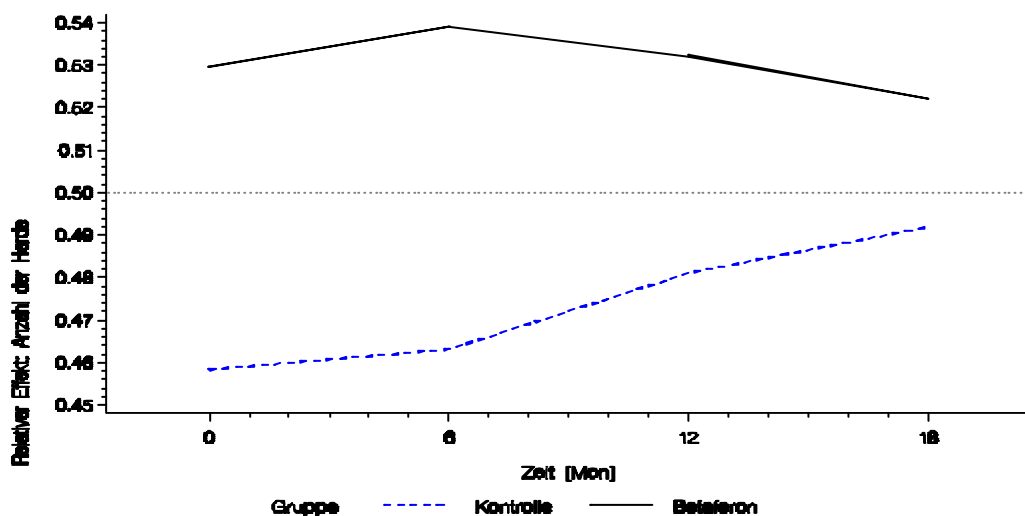
Ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Patientenkollektiven konnte in der statistischen Analyse betreffend der Anzahl der Herde (T0/T6: $p= 0,03$) und der Gesamtfläche der Herde (T0/T6: $p= 0,00009$) gezeigt werden.

Dabei kam es am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 18 Monaten (T6) in der Behandlungsgruppe zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl der Herde (m: T0 = 39, T6 = 36). Mit dieser Reduktion war auch eine deutliche Abnahme der Gesamtläsionsfläche (m: T0 = 1533 mm²; T6 = 955 mm²) zu verzeichnen.

Demgegenüber kam es in der Gruppe der nicht behandelten Patienten zu keiner deutlichen Veränderung betreffend der Anzahl der Herde (m: T0 = 30; T6 = 31,5) und der "disease burden" (m: T0 = 811mm²; T6 = 772 mm²).

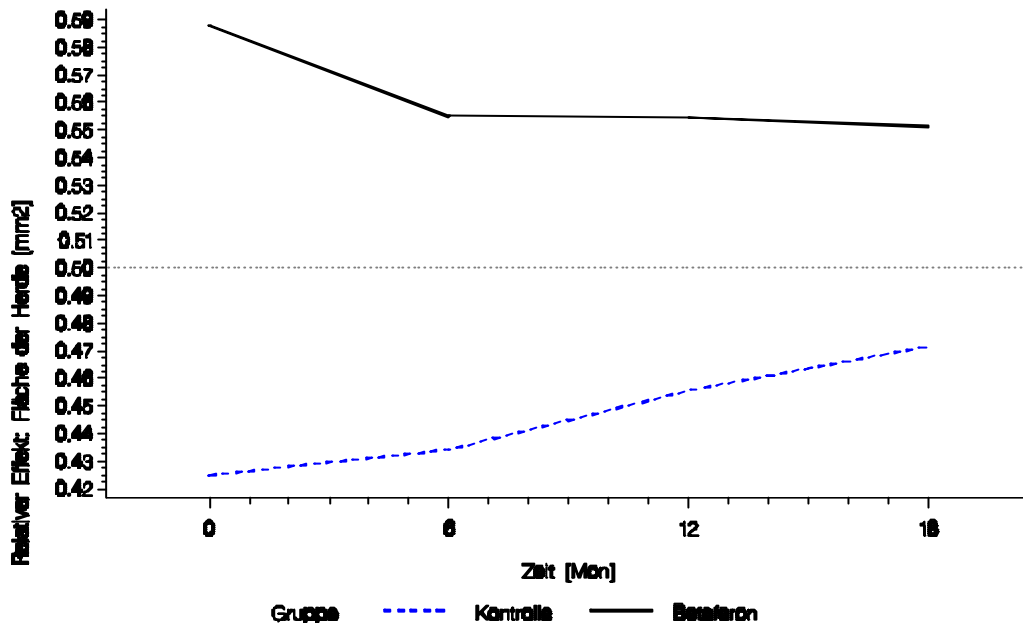
Die genauere Betrachtung der Veränderungen im zeitlichen Verlauf der Studie zeigte, daß es bei dem mit Interferon-beta 1b behandelten Patientenkollektiv zu einem vorübergehenden Anstieg der Anzahl der Herde kam (m: T2 = 42; T4 = 45), bei einer jedoch gleichzeitig zu verzeichnenden Reduktion der "disease burden" (m: T2 = 1234 mm²; T4 = 1120 mm²). In der nicht behandelten Gruppe von Patienten kam es in diesem Zeitraum sowohl zu einer Reduktion der Anzahl der Herde (m: T2 und T4 = 24) als auch zu einer Reduktion der Gesamtläsionsfläche (m: T2 = 620 mm², T4 = 590 mm²).

Abbildung 3-17: Veränderung der Anzahl der Herde in der MRT über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



LOCF

Abbildung 3-18: Veränderung der Fläche der Herde in der MRT über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



LDCF

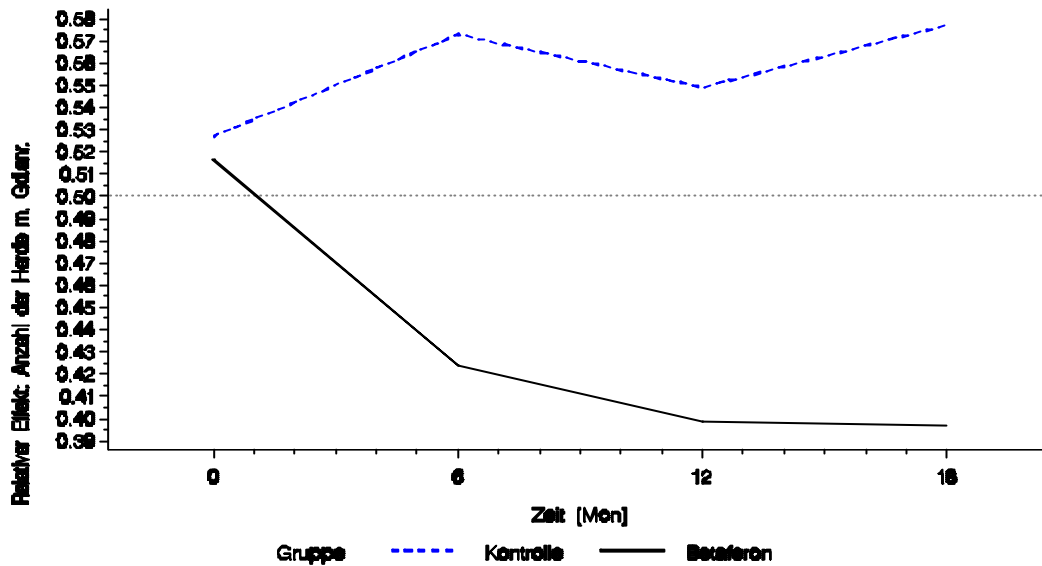
3.3.2 Anzahl und Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung

Einen signifikanten Unterschied zwischen beiden untersuchten MS-Patientenkollektiven zeigte die statistische Analyse der MRT-Parameter "Anzahl und Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung" (T0/T6: $p=0,01$).

Im zeitlichen Verlauf, dessen Beschreibung hier aufgrund der "Trennschärfe" der Medianwerte anhand der Mittelwerte erfolgen soll, kam es zu einer kontinuierlichen Reduktion der Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung in dem mit Interferon-beta 1b therapierten Patientenkollektiv (Mittelwert: T0 = 1,10; T2 = 0,76; T4 = 0,47; T6 = 0,50). Damit einhergehend kam es zeitgleich zu einer ebenfalls kontinuierlichen Reduktion der Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung (Mittelwert: T0 = 189 mm²; T2 = 46 mm²; T4 = 31 mm²; T6 = 16 mm²).

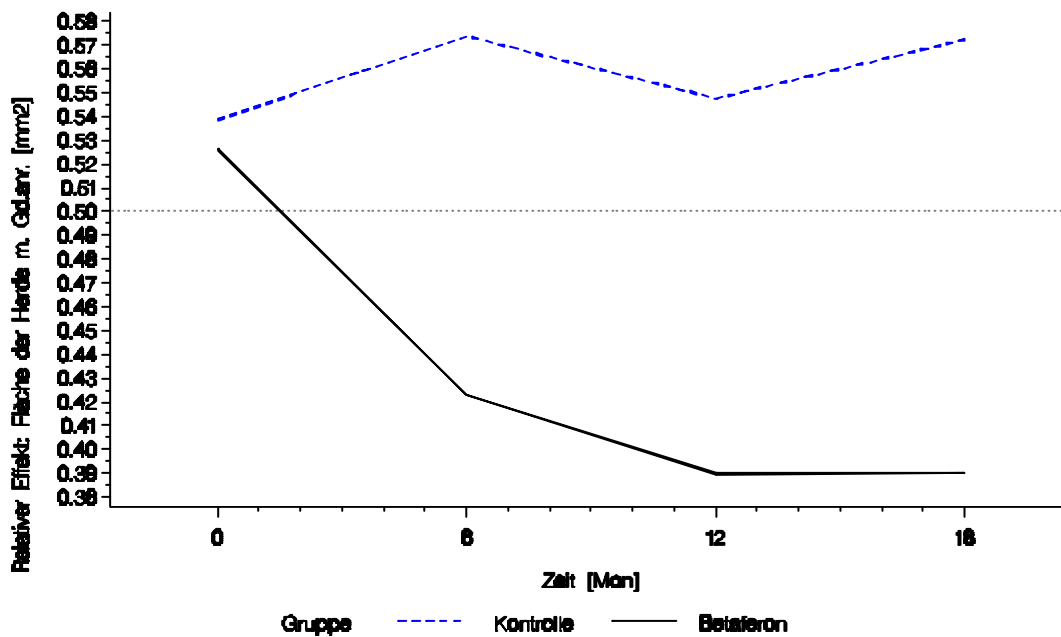
In der Gruppe der nicht behandelten MS-Patienten zeigte sich jedoch ein deutlich fluktuierender Verlauf mit einer Zunahme der Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung nach 6 Monaten und erneut nach 18 Monaten (Mittelwert: T0 = 0,85; T2 = 1,10; T4 = 0,30; T6 = 0,62). Im Vergleich zum Ausgangswert blieb eine geringe Reduktion bestehen. In Bezug auf die Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung kam es nach einer vorübergehenden Reduktion (T2/T4) am Ende der Studie zu einer erneuten Zunahme der Fläche (Mittelwert: T0 = 168 mm²; T2 = 64 mm²; T4 = 10 mm²; T6 = 25 mm²).

Abbildung 3-19: Veränderung der Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung in der MRT über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



LDCF

Abbildung 3-20: Veränderung der Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung in der MRT über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



LDCF

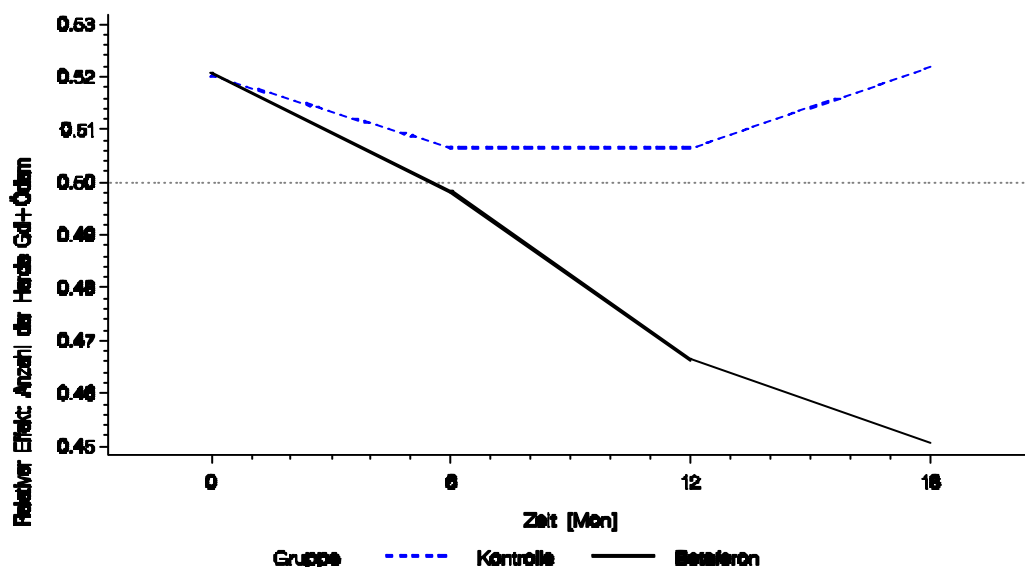
3.3.3 Anzahl und Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem

Keinen signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und dem unbehandelten Patientenkollektiv zeigte die statistische Analyse der MRT-Parameter "Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem" (T0/T6: $p=0,13$) und "Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem" (T0/T6: $p=0,16$).

In der Verlaufsbeobachtung wurde jedoch in der Gruppe der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten eine deutliche und kontinuierliche Reduktion der Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem bemerkbar (Mittelwert: T0 = 0,33; T2 = 0,16; T4 = 0,10; T6 = 0). Korrespondierend dazu war eine deutliche Reduktion der Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem in dieser Gruppe zu verzeichnen (Mittelwert: T0 = 24 mm²; T2 = 14 mm²; T4 = 6 mm²; T6 = 0 mm²).

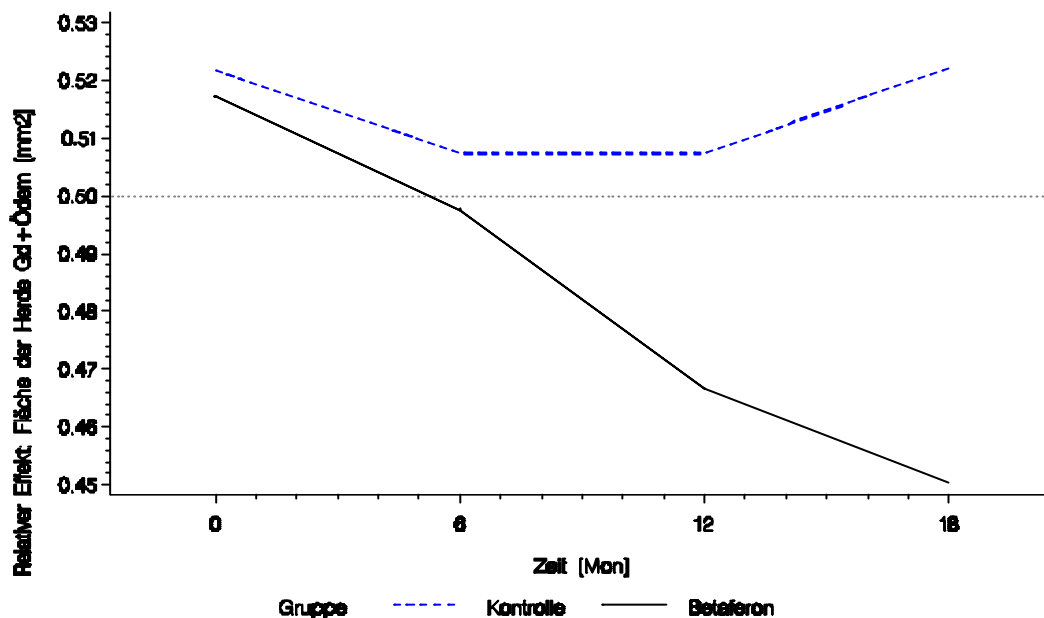
In der Gruppe der nicht behandelten Patienten kam es nach einer initialen Reduktion der Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem zu einer erneuten Zunahme am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 18 Monaten auf den Ausgangswert (Mittelwert: T0 und T6 = 0,25). Die Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem nahm im zeitlichen Verlauf ab, jedoch wurde eine vollständige Reduktion, wie in dem mit Interferon-beta 1b therapierten Patientenkollektiv, hier nicht erreicht (Mittelwert: T0 = 36 mm²; T6 = 20 mm²).

Abbildung 3-21: Veränderung der Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem in der MRT über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



LOCF

Abbildung 3-22: Veränderung der Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem in der MRT über einen Zeitraum von 18 Monaten zwischen dem mit Betaferon® therapierten Patientenkollektiv und den nicht behandelten MS-Patienten.



LDCF

3.4 Einteilung der Patientengruppen nach definierten Kriterien der Krankheitsaktivität

Die erste Einteilung der an schubförmig-remittierender Multipler Sklerose erkrankter Patienten erfolgte, wie im Abschnitt 3.1. beschrieben, in eine mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) therapierte Gruppe (N= 30) und eine nicht behandelte Patientengruppe (N= 38).

Zur Beantwortung der in dieser Arbeit gestellten Fragen, nach einer möglichen Korrelation zwischen der Konzentration der Immunparameter im Serum und der Aktivität der Erkrankung und schließlich der Frage nach einem prognostischen Marker der Krankheitsaktivität, erfolgte eine Unterteilung der mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) therapierten Patientengruppe in ein Patientenkollektiv mit einem "aktiven" und einem "inaktiven" Krankheitsverlauf. Maßstab für die Beurteilung der "Aktivität" bzw. "Inaktivität" der Erkrankung waren zum einen klinische Kriterien anhand der Veränderung der Schubrate/Jahr und zum anderen definierte Kriterien der Krankheitsaktivität in der MRT nach Patty et al..

3.4.1 Einteilung nach der Aktivität der Erkrankung anhand der jährlichen Schubrate

Die Unterteilung der Patienten in eine Subgruppe mit inaktiven bzw. aktiven Krankheitsverlauf erfolgte ausschließlich für die mit Interferon-beta 1b therapierte Gruppe von Patienten.

In diese Unterteilung wurden jedoch nur Patienten mit einem Beobachtungszeitraum von mindestens einem Jahr eingeschlossen, so daß sich die Anzahl der Patienten in der Behandlungsgruppe um einen Patienten reduzierte (N = 29).

Als Kriterium für die klinische Aktivität der Erkrankung wurde die Veränderung der jährlichen Schubrate vor Beginn der Studie und im Studienzeitraum herangezogen. Dabei wurde eine Abnahme der Schubrate im Studienzeitraum im Vergleich zum Studienbeginn als eine klinische Verbesserung gedeutet und die Patienten im folgenden der Subgruppe von therapierten MS-Patienten mit inaktiven Krankheitsverlauf ("Responder") zugeordnet.

Patienten, bei denen es zu keiner Veränderung der Schubrate im Studienzeitraum kam, wurden als klinisch stabil angesehen und ebenfalls der Subgruppe der Responder zugeordnet.

Dementsprechend wurde eine Zunahme der Schubrate im Beobachtungszeitraum im Vergleich zum Studienbeginn als eine klinische Verschlechterung angesehen. Diese Patienten wurden der Subgruppe von therapierten MS-Patienten mit aktiven Krankheitsverlauf ("Non-Responder") zugeteilt.

Nach diesen Kriterien hatten in der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe 14 Patienten (48%) einen inaktiven und 15 Patienten (52%) einen aktiven Verlauf der Erkrankung.

3.4.2 Einteilung nach der Aktivität der Erkrankung mittels Magnetresonanztomographie

Für die Einteilung der mit Interferon-beta 1b therapierten MS-Patienten nach der Aktivität der Erkrankung mittels Magnetresonanztomographie wurden die im Studienverlauf angefertigten MRT-Aufnahmen auf Zeichen der Krankheitsaktivität hin untersucht.

Als Zeichen der Aktivität der Erkrankung in der MRT wurden folgende untersuchten Parameter bestimmt:

1. Veränderung der Anzahl und der Gesamtläsionsfläche ("disease burden") der Herde
2. Veränderung der Anzahl und der Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung
3. Veränderung der Anzahl und der Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung und perifokalem Ödem

Zur Unterteilung des behandelten Patientenkollektivs wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum (T0/T6) der lineare Trend "a" der individuellen Veränderungen o. g. Parameter der Krankheitsaktivität in der MRT mittels Regressionsanalyse bestimmt.

Dabei wurde ein positiver Trend $a < 0$ als "Response" definiert und die Patienten der Gruppe mit geringer subklinischer Krankheitsaktivität bzw. einem inaktiven Krankheitsverlauf ("Responder") zugeteilt.

Demgegenüber wurde ein negativer Trend $a > 0$ in der Regressionsanalyse als "Non-Response" definiert. Diese Patienten wurden dem Kollektiv mit hoher subklinischer Krankheitsaktivität bzw. aktiven Krankheitsverlauf ("Non-Responder") zugeordnet.

Auf der Grundlage dieser Kriterien betrug in der Gruppe der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten (N=30), in Abhängigkeit von dem jeweils untersuchten MRT-Parameter, die Anzahl der Patienten mit einem inaktiven ("Responder; R") bzw. einem aktiven ("Non-Responder; NR") Verlauf der Erkrankung:

1. Veränderung der Anzahl und der Fläche der Herde:

R: N= 14 (46%)
NR: N= 16 (53%)

2. Veränderung der Anzahl und der Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung:

R: N= 13 (43%)
NR: N= 17 (57%)

3. Veränderung der Anzahl und Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung und perifokalem Ödem:

R: N= 8 (26%)
NR: N= 22 (74%)

Die Einteilung bezüglich der MRT-Parameter "Anzahl und Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung und perifokalem Ödem" ergab eine deutlich unterschiedliche Anzahl von Patienten innerhalb der Gruppen. Da sich dieses möglicherweise negativ auf die Validität und Reliabilität der Ergebnisse auswirkt, wurde auf die weitere Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

3.5 Korrelation der Zytokine und Adhäsionsmoleküle mit der Aktivität der Erkrankung

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, erfolgte nach zuvor definierten Kriterien eine Einteilung der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten in ein Patientenkollektiv mit geringer Krankheitsaktivität ("Responder") und in ein Patientenkollektiv mit hoher Krankheitsaktivität ("Non-Responder").

Im folgenden Abschnitt sollen die Ergebnisse der Korrelation der immunologischen Parameter, der pro- und antiinflammatorischen Zytokine und der Adhäsionsmoleküle, mit den Kriterien der Aktivität der Erkrankung dargestellt werden.

3.5.1 Korrelation der Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Serum mit der Aktivität der Erkrankung anhand der jährlichen Schubrate

Die Korrelation der Konzentration im Serum der untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der klinischen Krankheitsaktivität, definiert anhand der Veränderung der jährlichen Schubrate vor Studienbeginn und im Beobachtungszeitraum, konnte für alle untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle keine statistisch signifikanten Ergebnisse aufzeigen.

Alle Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 7-21 im Anhang angeführt.

Dennoch sollen einige interessante Ergebnisse dargestellt werden. Dabei sollen vor allen jene Adhäsionsmoleküle und Zytokine in der Betrachtung weiter verfolgt werden, bei welchen in den vorangegangenen Abschnitten bereits interessante Veränderungen unter Interferon-Therapie beobachtet werden konnten.

Dies sind im folgenden sICAM-1, sICAM-3, sVCAM-1 sowie die TNF-Rezeptoren RI und RII.

In den Abbildungen 3-23 bis 3-27 sind die Veränderungen der Serumkonzentrationen der untersuchten Adhäsionsmoleküle und Zytokine in den Subgruppen der "Responder" und "Non-Responder" graphisch unter Verwendung der Methode der relativen Marginaleffekte dargestellt.

Alle Werte der gemessenen Serumkonzentrationen der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle beider Patientengruppen kommen zwischen 0 (niedrigster Wert) und 1 (höchster Wert) auf der transformierten Y-Achse zur Darstellung. Dabei bezeichnet der Wert 0,5 auf der Y-Achse den Median aller im gesamten Studienzeitraum gemessener Serumkonzentrationen beider Subgruppen.

Die so transformierten Werte der Serumkonzentrationen der Zytokine und Adhäsionsmoleküle der Patienten, die im Beobachtungszeitraum von 18 Monaten eine Abnahme (bzw. keine Änderung der Schubrate) der Schubrate zeigten (Responder, N= 14), sind als durchgezogene Linie dargestellt.

Die entsprechenden Werte jener Patienten, welche unter einer Interferon-Therapie eine Zunahme der Schubrate im Studienzeitraum zeigten (Non-Responder, N=15), sind als gestrichelte Linie dargestellt.

- Intracellular-adhesion-molecule-1, (sICAM-1) -

Bereits zuvor konnte ein signifikanter Unterschied der Konzentration von sICAM-1 im Serum und im zeitlichen Verlauf über 18 Monate (T6) zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppen von MS-Patienten und der nicht behandelten Gruppe von MS-Patienten gezeigt werden ($p=0,0004$).

Betrachtet man die Veränderung der Konzentration von sICAM-1 im Serum, nachdem anhand von klinischen Kriterien eine Unterteilung der mit Interferon-beta behandelten Gruppe von MS-Patienten in eine Subgruppe von Respondern und eine Subgruppe von Non-Respondern vorgenommen wurde, so zeigt sich in beiden Subgruppen, der bereits zuvor für das Gesamtkollektiv der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten beschriebene, Anstieg der Serumkonzentration von sICAM-1 nach 3 Monaten (T1) erneut.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 Monaten (T6) kam es in der Gruppe der Responder und in der Gruppe der Non-Responder zu einem Anstieg der Serumkonzentration von sICAM-1 über das Ausgangsniveau hinaus.

Man gewinnt jedoch den Eindruck, daß in der Subgruppe der Responder eine Regulation der Serumkonzentration von sICAM-1 auf einem höheren Niveau stattfindet als in der Gruppe der Non-Responder (graphisch liegt die Kurve der Responder über der Kurve der Non-Responder). Dieser Effekt ist nach 15 Monaten (T5) noch deutlich sichtbar, verliert sich jedoch am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 18 Monaten, möglicherweise aufgrund einer deutlichen Reduktion der Gruppengröße des gesamten untersuchten Patientenkollektives zu diesem Zeitpunkt (T0: N= 29; T6: N=14).

- Intracellular-adhesion-molecule-3, (sICAM-3) -

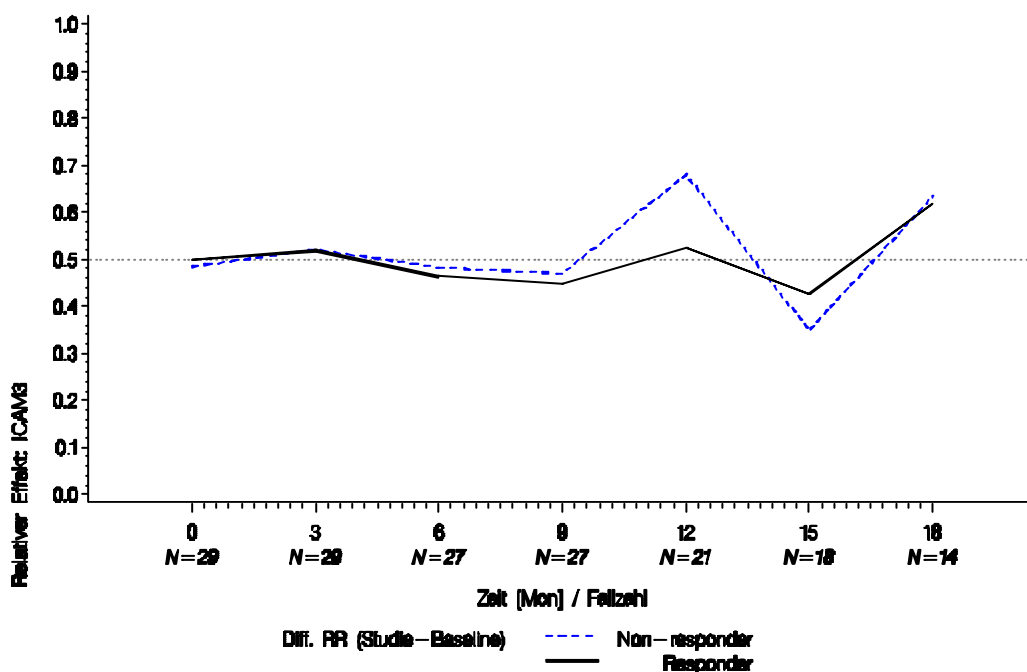
Ein signifikanter Unterschied der Konzentration von sICAM-1 im Serum und im zeitlichen Verlauf über 18 Monate (T6) konnte zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und der nicht behandelten Gruppe von MS-Patienten gezeigt werden ($p=0,01$).

Bei der Betrachtung der Veränderung der Konzentration von sICAM-3 finden sich vergleichbare Veränderungen wie schon zuvor beim sICAM-1 beschrieben. Auch hier zeigt sich für beide Subgruppen ein Anstieg der Serumkonzentration von sICAM-3 im gesamten Beobachtungszeitraum.

Dabei treten in der Subgruppe der Non-Responder vermehrt Fluktuationen auf im Vergleich zur Subgruppe der Responder.

Darüber hinaus sind bei der Untersuchung dieses Adhäsionsmoleküls keine weiteren bemerkenswerten Veränderungen innerhalb der Subgruppen festzustellen.

Abbildung 3-24: Veränderung der Konzentration von sICAM-3 im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten (T6) nach der klinischen Unterteilung der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten in eine Subgruppe der Responder und eine Subgruppe der Non-Responder.



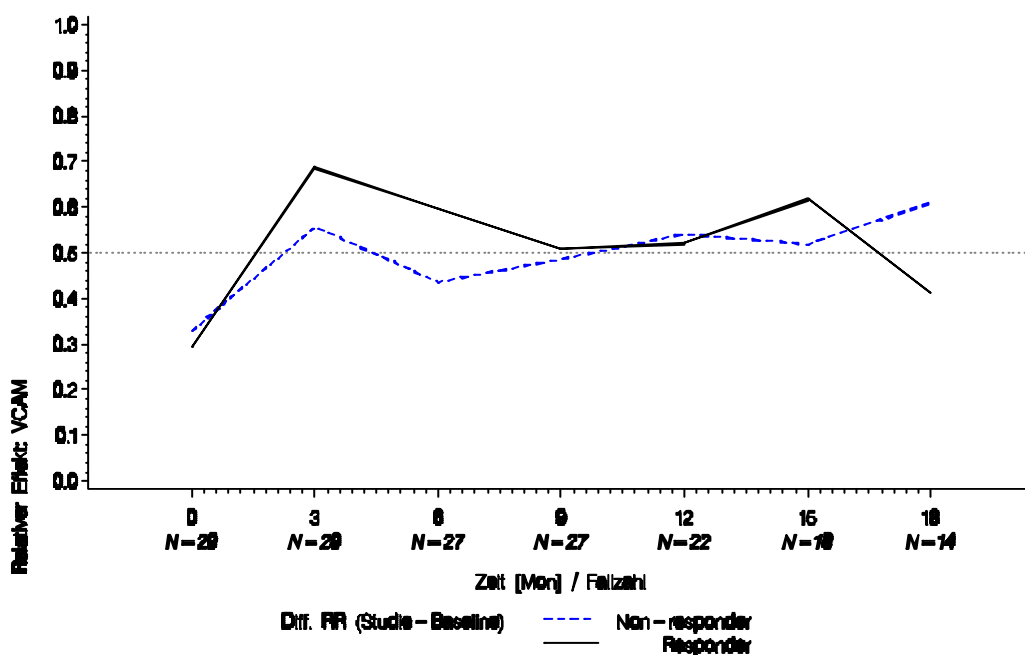
- Vascular-cell-adhesion-molecule-1, (sVCAM-1)

Die Verläufe von sICAM-1 und sVCAM-1 stellen sich graphisch sehr ähnlich dar. In beiden Subgruppen kommt es wie bereits zuvor für das Gesamtkollektiv der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten beschrieben, zu einem deutlichen Anstieg der Plasmakonzentration von sVCAM-1 in den ersten 3 Monaten (T1).

Dieser initiale Anstieg setzte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 Monaten (T6) in beiden Gruppen fort, so daß am Ende des Beobachtungszeitraumes eine vermehrte Plasmakonzentration von sVCAM-1 über das Ausgangsniveau hinaus nachweisbar bleibt.

Vergleichbar mit den oben beschriebenen Veränderungen der Serumkonzentration von sICAM-1, kommt auch beim sVCAM-1 graphisch die Kurve der Plasmakonzentration der Gruppe der Responder oberhalb der Kurve der Plasmakonzentration der Gruppe der Non-Responder zu liegen. Dieser Effekt verliert sich jedoch ebenfalls wieder am Ende des Beobachtungszeitraumes nach 18 Monaten (T6).

Abbildung 3-25: Veränderung der Konzentration von sVCAM-1 im Plasma über einen Zeitraum von 18 Monaten (T6) nach der klinischen Unterteilung der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten in eine Subgruppe der Responder und eine Subgruppe der Non-Responder.

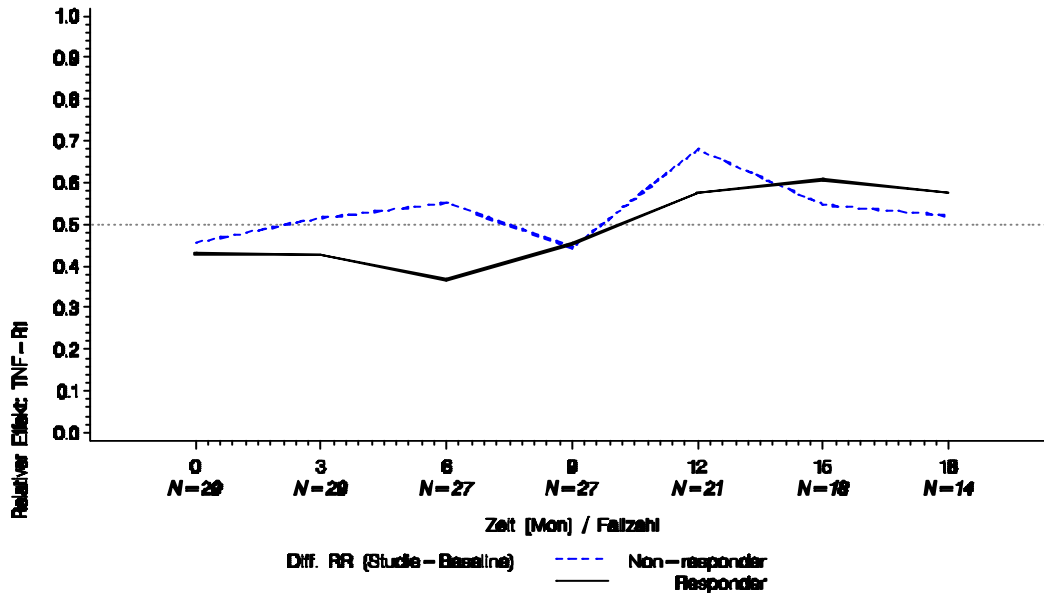


- TNF-Rezeptor I (p55), (TNF-RI)-

In den vorangegangenen Abschnitten konnte bereits ein signifikanter Unterschied der Konzentration des TNF-RI im Plasma und im zeitlichen Verlauf über 15 Monate (T5), nicht jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum (T6) zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und der nicht behandelten Gruppe von MS-Patienten gezeigt werden (T0/T5: $p=0,01$, T0/T6: $p=0,95$).

Die Betrachtung der Veränderung der Konzentration von TNF-RI (p55) zeigt in beiden Subgruppen nach 9 Monaten (T3) unter Therapie mit Interferon-beta 1b ein Angleichen der Plasmakonzentrationen. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einem Anstieg der Plasmakonzentration in der Subgruppe der Responder (N=14).

Abbildung 3-26: Veränderung der Konzentration von TNF-RI (p55) im Plasma über einen Zeitraum von 18 Monaten (T6) nach der klinischen Unterteilung der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten in eine Subgruppe der Responder und eine Subgruppe der Non-Responder.



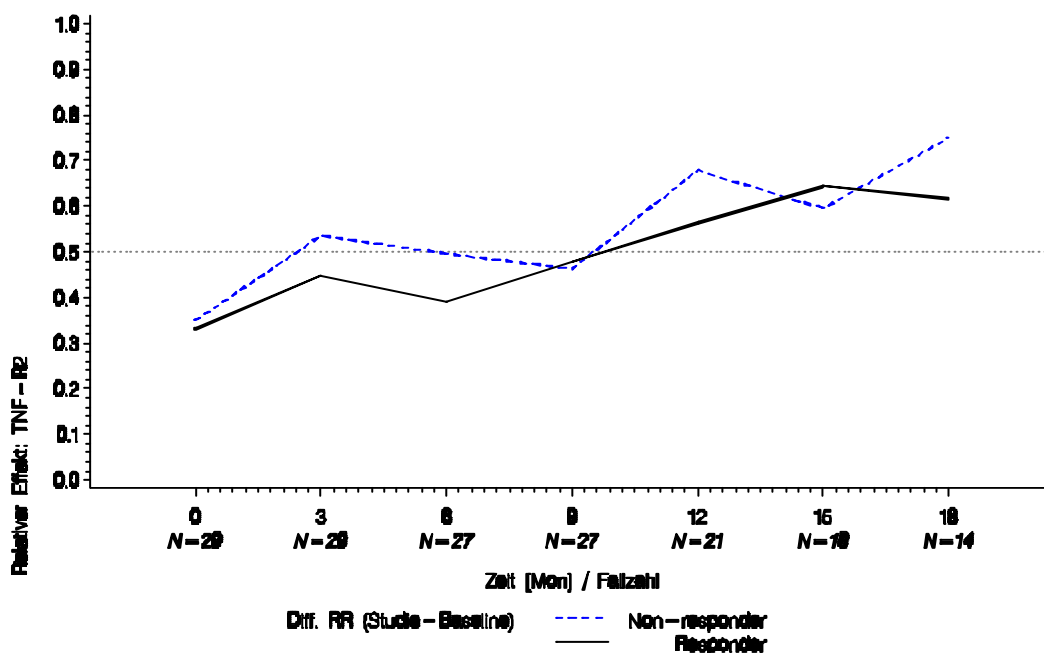
- TNF-Rezeptor II (p75), (TNF-RII)-

In den vorangegangenen Abschnitten konnte bereits ein signifikanter Unterschied der Konzentration des TNF-RII im Plasma und im zeitlichen Verlauf über 18 Monate zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und der nicht behandelten Gruppe von MS-Patienten gezeigt werden ($p=0,001$).

Nach der klinischen Unterteilung anhand der Veränderung der Schubrate im Studienzeitraum der mit Betaferon® behandelten Gruppe in eine Subgruppe von Responder und eine Subgruppe von Non-Respondern, zeigt die Betrachtung der Veränderung der Konzentration von TNF-RII (p75) im Verlauf über 18 Monate (T6) einen deutlichen Anstieg der Plasmakonzentration in beiden Subgruppen.

Ähnlich wie beim TNF-RI gewinnt man auch hier den Eindruck eines stabilen Verlaufes der Plasmakonzentration des TNF-RII in der Subgruppe der Responder im Vergleich zu einem wesentlich stärker fluktuierenden Verlauf in der Gruppe der Non-Responder.

Abbildung 3-27: Veränderung der Konzentration von TNF-RII (p75) im Plasma über einen Zeitraum von 18 Monaten nach der klinischen Unterteilung der mit Interferon-beta 1b behandelten Patienten in eine Subgruppe der Responder und eine Subgruppe der Non-Responder.



3.5.2 Korrelation der Konzentration der Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der Aktivität der Erkrankung in der Magnetresonanztomographie

Die Korrelation der Konzentration im Serum der untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der in der MRT erkennbaren Aktivität der Erkrankung, bestimmt durch den linearen Trend "a" mittels Regressionsanalyse, konnte für alle untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle keine statistisch signifikanten Ergebnisse aufzeigen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-22 dargestellt. Die Graphiken, soweit nicht hier dargestellt, sind im Anhang (s. Abbildungen 3.40 - 3.98) beigefügt.

Dennoch soll auch hier auf die Darstellung einiger interessanter Ergebnisse dieser Untersuchung nicht verzichtet werden. Dabei soll jedoch auf eine Gesamtdarstellung aller untersuchten Parameter verzichtet werden und vielmehr anhand von einzelnen Beispielen der untersuchten Adhäsionsmoleküle (sICAM-1, sICAM-3 und sVCAM-1), Zytokine (TNF-RI und TNF-RII, TNF-beta) und MRT-Parameter (Anzahl und Fläche der Herde, Anzahl und Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung) versucht werden, einen Trend innerhalb der Gruppen der Responder und Non-Responder darzustellen.

- Veränderungen der Anzahl der Herde und der Gesamtläsionsfläche -

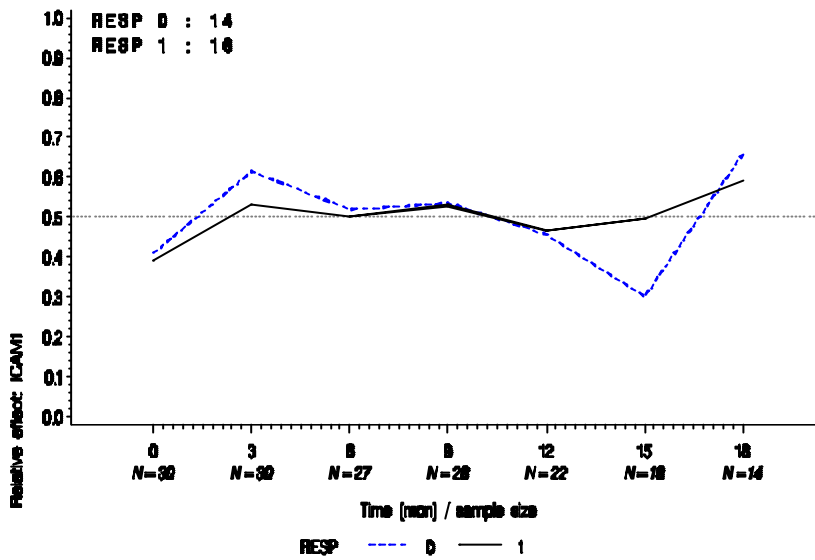
Als Kriterium der subklinischen in der MRT erkennbaren Krankheitsaktivität wurden, wie zuvor beschrieben, unter anderem Veränderungen der Anzahl der Herde und der Gesamtläsionsfläche ("disease burden") definiert. Nach der Unterteilung der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten anhand der subklinischen Krankheitsaktivität bildeten 14 Patienten die Gruppe der Responder, d.h. bei diesen Patienten kam es zu einer Abnahme der Anzahl und der Fläche der Herde in der MRT. Demgegenüber zeigten 16 Patienten eine Zunahme der Anzahl und Fläche der Herde unter Therapie (Non-Responder).

Betrachtet man nun die untersuchten Adhäsionsmoleküle und Zytokine, so lässt sich graphisch ein Trend zu höheren Serumkonzentrationen in der Subgruppe der Non-Responder im Vergleich zur Subgruppe der Responder erkennen. Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung der Veränderung der Serumkonzentration von TNF-beta. Hingegen zeigt die graphische Darstellung der Veränderung der Serumkonzentration von sVCAM-1 und TNF-RII kaum Unterschiede zwischen der Subgruppe der Responder und Non-Responder der mit Interferon-beta 1b therapierten MS-Patienten.

Im Folgenden sollen einige Ergebnisse, welche den Trend zu höheren Serumkonzentrationen in der Subgruppe der Non-Responder (gestrichelte Linie) zeigen,

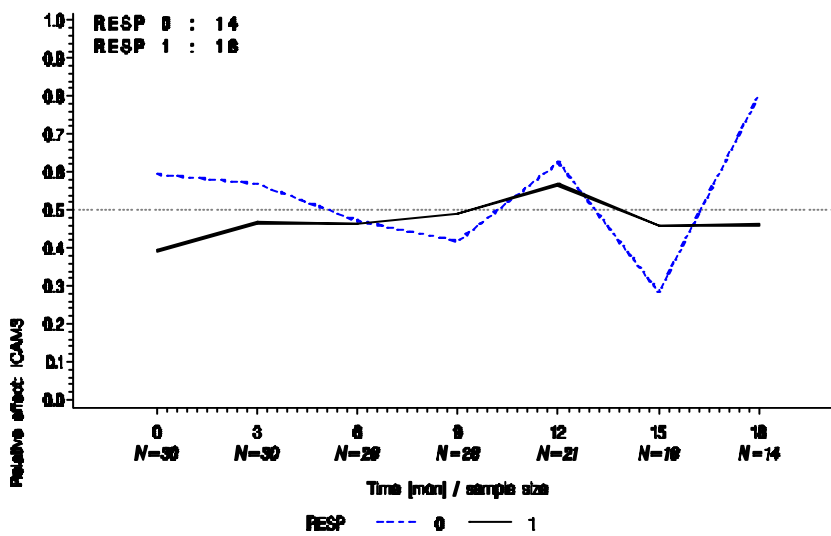
graphisch am Beispiel der Adhäsionsmoleküle sowie der TNF-Rezeptoren I und II und TNF-beta für die Korrelation mit der Gesamtläsionsfläche ("disease burden") gezeigt werden.

Abbildung 3-28: sICAM-1/ Gesamtläsionsfläche



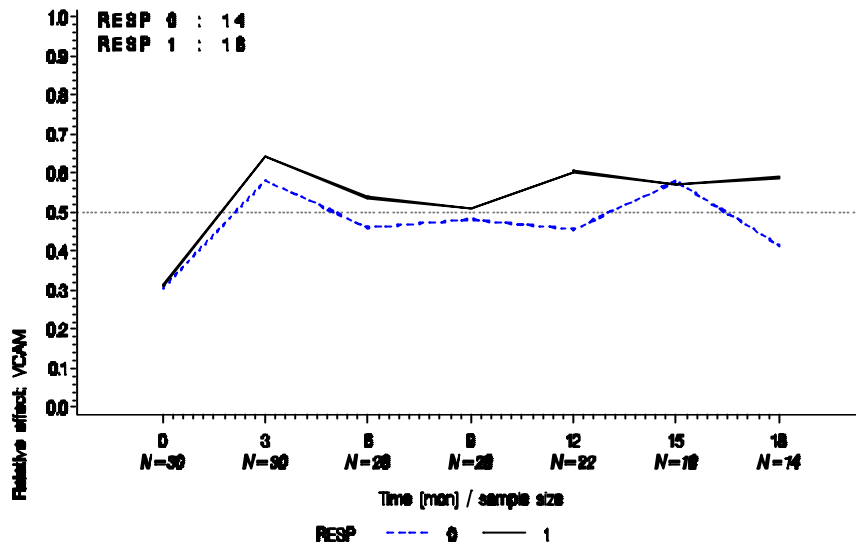
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions [mm²]

Abbildung 3-29: sICAM-3/ Gesamtläsionsfläche



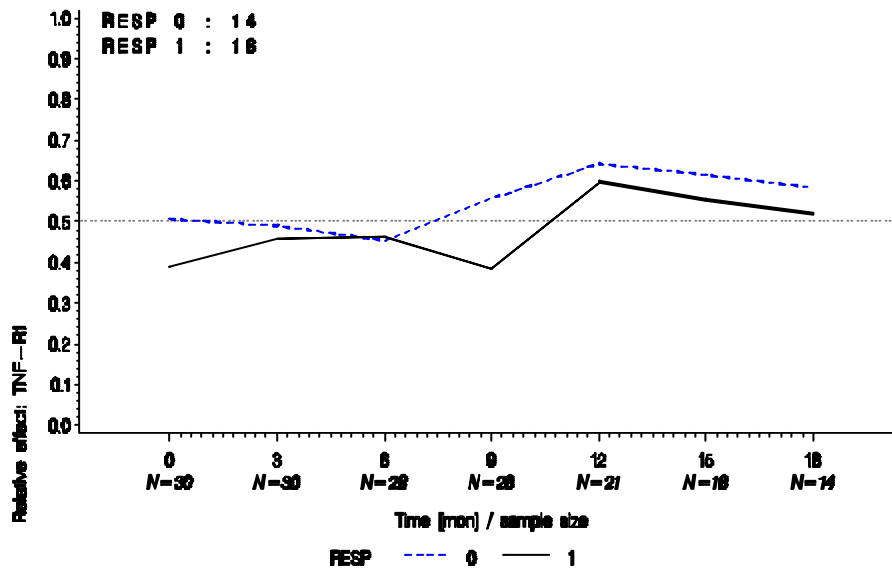
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions [mm²]

Abbildung 3-30: sVCAM-1/ Gesamtläsionsfläche



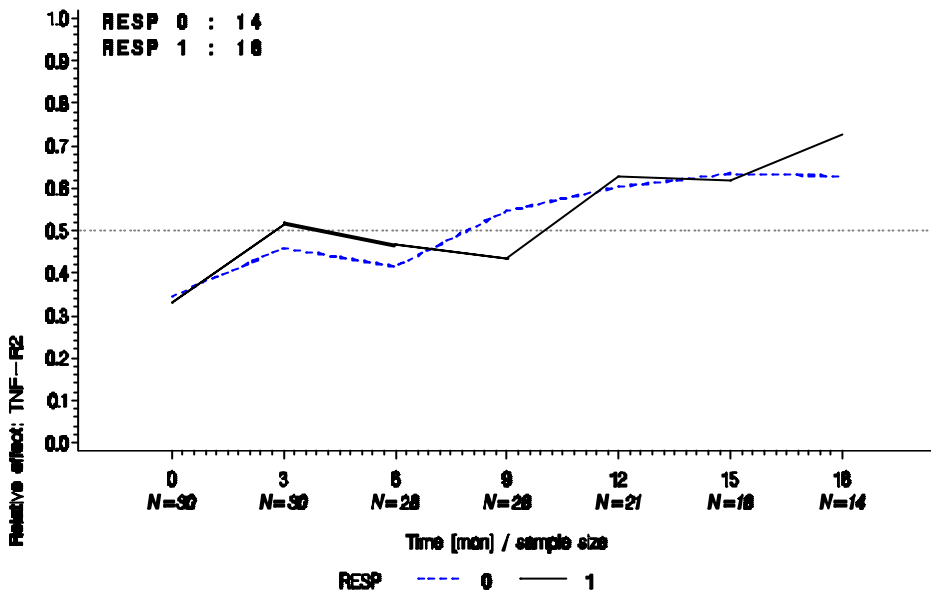
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions [mm²]

Abbildung 3-31: TNF-RI/ Gesamtläsionsfläche



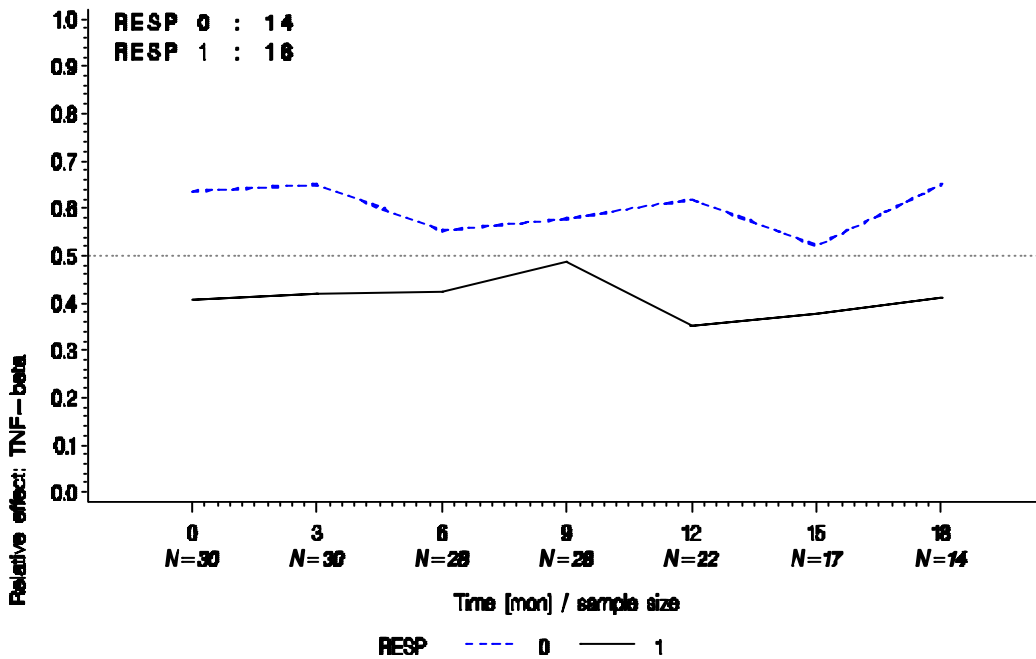
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions [mm²]

Abbildung 3-32: TNF-RII/ Gesamtläsionsfläche



Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions [mm²]

Abbildung 3-33: TNF-beta/ Gesamtläsionsfläche



Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions [mm²]

- Anzahl und Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung -

Nach Unterteilung der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe von MS-Patienten anhand dieses MRT-Parameters der Krankheitsaktivität, bildeten 13 Patienten die Gruppe der Responder und 17 MS-Patienten die Gruppe der Non-Responder.

Beurteilt man die Serumkonzentrationen der untersuchten Adhäsionsmoleküle und Zytokine nach der Unterteilung der Behandlungsgruppe anhand der "Anzahl und Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung" in eine Subgruppe von Respondern und Non-Respondern so zeigt sich hier - im Gegensatz zu dem vorherigen Aktivitätsparameter - graphisch ein Trend zu höheren Werten in der Subgruppe der Responder.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt sollen an dieser Stelle wiederum einige Ergebnisse, welche den Trend zu höheren Serumkonzentrationen, diesmal jedoch in der Subgruppe der Responder (durchgezogene Linie) zeigen, graphisch demonstriert werden. Als Beispiele wurden erneut die Adhäsionsmoleküle sowie die TNF-Rezeptoren I und II und TNF-beta für die Korrelation mit der Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung gewählt.

Abbildung 3-34: sICAM-1/ Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung

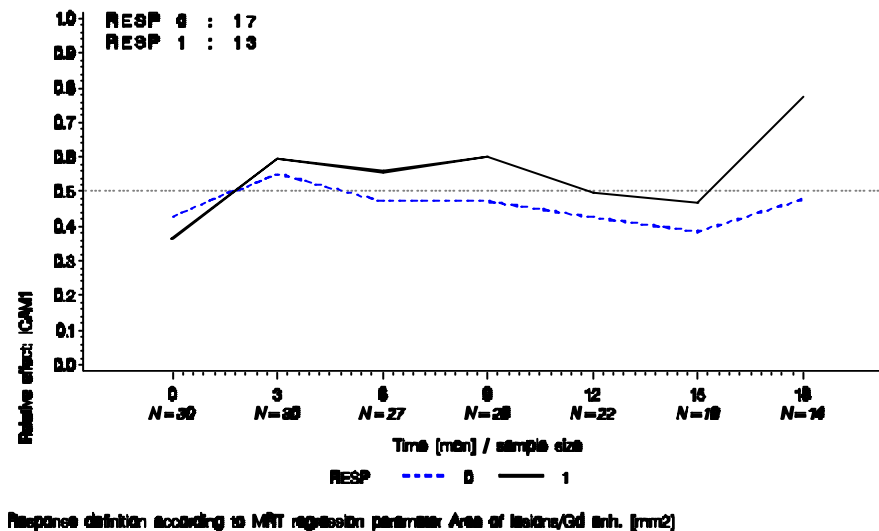
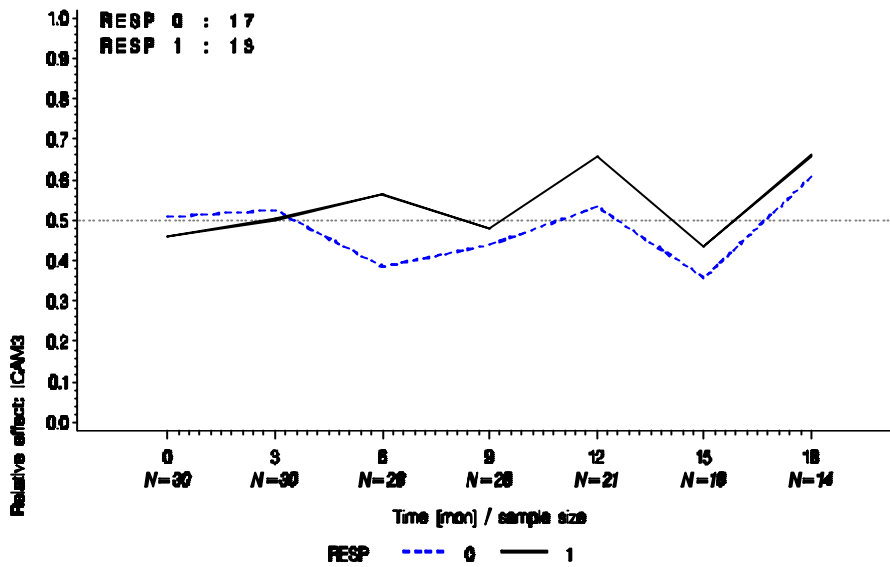
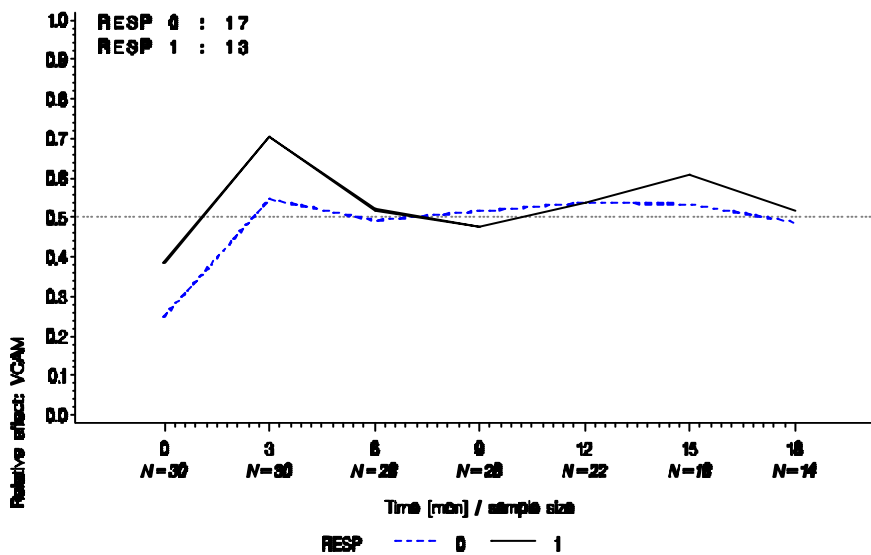


Abbildung 3-35: sICAM-3/ Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung



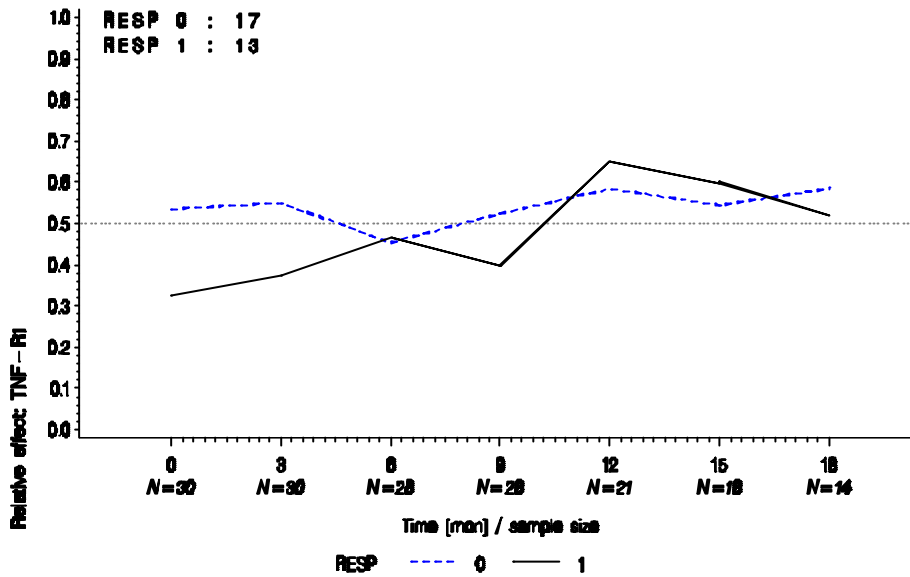
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions/Gd enh. [mm²]

Abbildung 3-36: sVCAM-1/ Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung



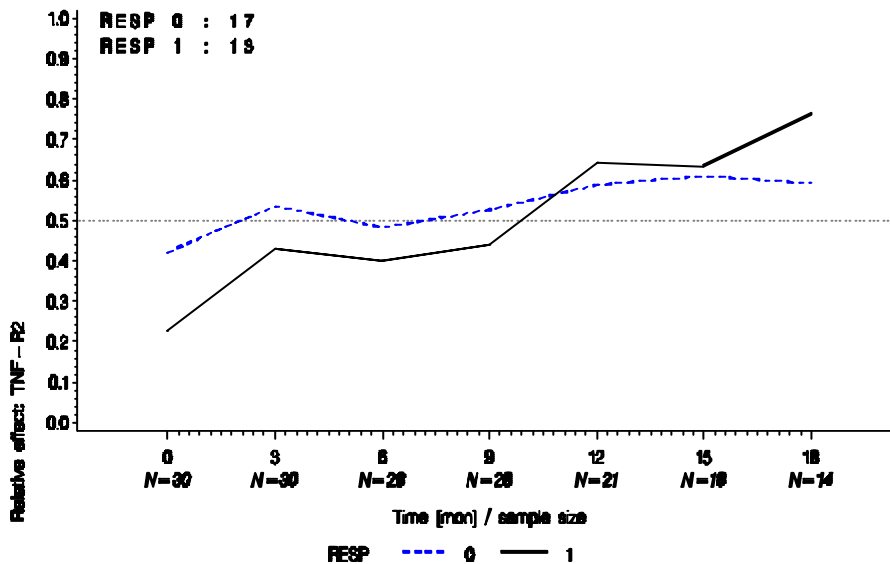
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions/Gd enh. [mm²]

Abbildung 3-37: TNF-RI/ Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung



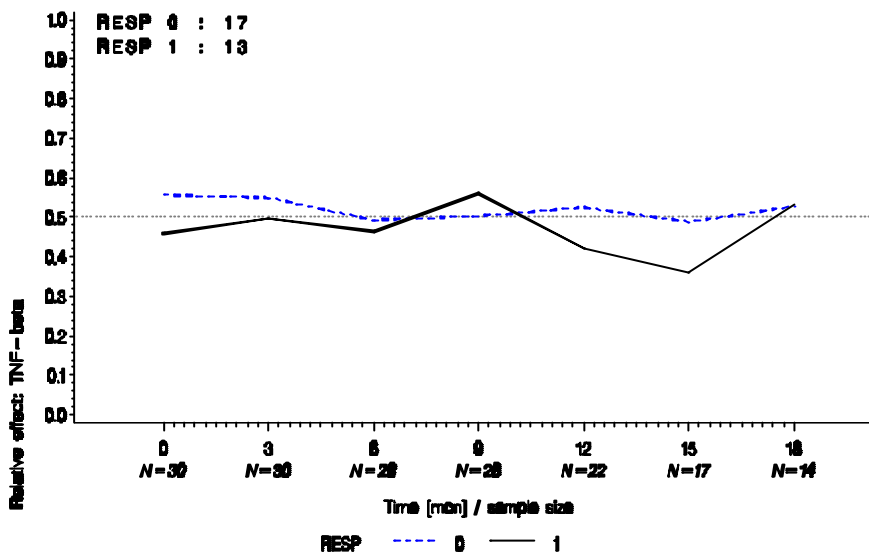
Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions/Gd enh. [mm2]

Abbildung 3-38: TNF-R1I/ Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung



Response definition according to MRT regression parameter Area of lesions/Gd enh. [mm2]

Abbildung 3-39: TNF-beta/ Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung



Response definition according to MRT regression parameter: Area of lesions/Gd enh. [mm²]

Zusammenfassend ergab die Betrachtung der Korrelation der Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Serum, in der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe von MS-Patienten mit der Aktivität der Erkrankung anhand der jährlichen Schubrate und der in der MRT sichtbaren subklinischen Aktivität der Erkrankung, keine deutlichen Veränderungen in den untersuchten Subgruppen.

Vielmehr waren die zuvor beschriebenen Veränderungen der Serumkonzentrationen der untersuchten Parameter des mit Interferon-beta 1b behandelten Patientenkollektives in beiden Subgruppen nachvollziehbar. Eindeutige Unterschiede zwischen der Patientengruppe der Responder und der Patientengruppe der Non-Responder konnten jedoch nicht gezeigt werden.

Somit muß auch eine Aussage darüber, ob die untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle als prognostischer Marker der Krankheitsaktivität der Multiplen Sklerose dienen können und eine Aussage über die Effizienz einer Therapie mit Interferonen zulassen können, eher negativ beantwortet werden.

4 Diskussion

Im folgenden Abschnitt sollen ausführlich die angewendeten Methoden und die im vorangegangenen Abschnitt dargestellten Ergebnisse diskutiert werden.

4.1 Bewertung der Methodik

4.1.1 Bewertung des Studiendesigns

Dieser Arbeit liegt eine offene, prospektive, nicht randomisierte Längsschnittstudie zugrunde, in der zwei Parallelgruppen über einen Zeitraum von bis zu 24 Monaten beobachtet wurden. 68 an Multipler Sklerose leidende Patienten wurden in diese Studie aufgenommen, 30 Patienten bildeten die mit Interferon-beta 1b therapierte Gruppe, 38 Patienten bildeten die Gruppe der nicht therapierten Patienten.

Alle Patienten litten an einem schubförmig-remittierenden Verlauf einer Multiplen Sklerose und hatten in den letzten zwei Jahren mindestens zwei Krankheitsschübe, so daß für alle Patienten die gleichen Voraussetzungen galten und für jeden Patienten prinzipiell die Indikation für eine Therapie mit Interferon-beta 1b gegeben war.

Die Entscheidung für oder gegen eine immunmodulierende Therapie wurde nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung und Beratung von den Patienten getroffen. Da der Verlauf der Multiplen Sklerose individuell sehr unterschiedlich ist und eine Prognose über das Fortschreiten der Erkrankung bislang nicht sicher getroffen werden kann, war zu jedem Zeitpunkt innerhalb der Studie aus ärztlicher Indikation und unter der Berücksichtigung der Wünsche des Patienten die Umstellung auf ein anderes Interferon-Präparat oder der Beginn einer immunmodulierenden Therapie möglich.

Die vierteljährlichen Blutentnahmen sowie die halbjährlich angefertigten Magnetresonanztomographien wurden im Rahmen der klinischen Untersuchung zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs durchgeführt. Es wurde darauf verzichtet, den Patienten mit zusätzlichen invasiven Untersuchungen zu belasten, so daß alle erforderlichen Untersuchungen für diese Arbeit im Rahmen der regelmäßigen Vorstellungstermine in unserer neurologischen Ambulanz erfolgten.

Bedingt durch die Progression der Erkrankung und damit verbunden einem aus ärztlicher Sicht notwendigen Beginn einer Therapie, war in der Gruppe der nicht therapierten MS-Patienten die Beobachtungszeit kürzer, so daß sich die statistische Auswertung der erhobenen Daten auf einen Zeitraum von 18 Monaten (T6) bezieht.

Die statistische Analyse zeigte Unterschiede zwischen den beiden Patientenkollektiven zum Beginn der Studie in bezug auf:

1. die Geschlechtsverteilung ($p= 0,004$)
2. die Dauer der Erkrankung vor Studienbeginn ($p= 0,01$)
3. die Anzahl aller Schübe vor Studienbeginn ($p= 0,005$) und
4. die Gesamtläsionsfläche ("disease burden") in der MRT ($p= 0,03$).

Das deutliche Überwiegen des weiblichen Geschlechts in den untersuchten Patientenkollektiven erklärt sich aus der 2-3fach erhöhten Inzidenz für Frauen, gemessen an der Gesamtbevölkerung, an einer Multiplen Sklerose zu erkranken und spiegelt sich auch in den großen Zulassungsstudien für Interferone wieder, z.B. PRISMS [116]. Eine Beeinflussung der Ergebnisse ist hierdurch nicht nachvollziehbar.

In der mit Interferon-beta 1b behandelten Patientengruppe bestand eine längere Dauer der Erkrankung verbunden mit einer vermehrten Anzahl von Schüben vor Studienbeginn. Dabei ist jedoch anzumerken, daß es sich bei den Angaben zur Dauer der Erkrankung und der Anzahl der Schübe vor Studienbeginn um retrospektiv erhobene Daten handelt, welche zudem vielfach nur auf der Aussage und der subjektiven Einschätzung des Patienten beruhen. Aus diesem Grund wurde zur Beurteilung der klinischen Krankheitsaktivität die Veränderung der Schubrate/Jahr herangezogen. In bezug auf diesen klinischen Parameter zeigte die statistische Analyse keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Patientengruppen ($p= 0,60$).

Die Unterschiede zwischen den untersuchten Patientenkollektiven in bezug auf die Dauer der Erkrankung und der Anzahl der Schübe, resultierten jedoch nicht in einen Unterschied im EDSS (als Maß für den Grad der erworbenen Behinderung) zwischen den untersuchten Patientenkollektiven ($p= 0,10$), so daß auch hier anzunehmen ist, daß die Vergleichbarkeit der Gruppe nicht wesentlich beeinträchtigt wurde.

Ebenso konnten bislang in vielen publizierten Arbeiten, die eine Korrelation zwischen MRT-Parametern und klinischen Parameter der Krankheitsaktivität untersuchten, keine eindeutige Korrelation zwischen der Gesamtfläche der Herde und der Krankheitsaktivität bzw. dem EDSS aufzeigen [117, 118]. Dies bedeutet, daß eine große "disease burden" beim einzelnen Patienten, aber auch im Gesamtkollektiv, nicht zwingend zu einer deutlichen Behinderung im EDSS führen muß und damit ebenfalls nicht zwingend auf einen klinisch relevanten Unterschied zwischen den Gruppen hindeuten muß.

Für die statistische Analyse wurde ein Verfahren (ANOVA) verwendet, welches die Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen zu Beginn der Studie berücksichtigt, so daß die Ergebnisse durch diese Unterschiede nicht verzerrten wurden.

4.1.2 Bewertung der angewendeten statistischen Verfahren

Zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde der nicht parametrische ANOVA-Test zur Analyse seriell erhobener Daten angewendet. Das anerkannte Verfahren findet Anwendung in nahezu allen klinischen Studien der Phase III (z.B. PRISMS) [116].

Das Verfahren bietet den Vorteil einer guten Approximation für kleine Stichprobenumfänge. Ein weiterer Vorteil der ANOVA-Analyse ist, daß ein eventuelles "statistisches Ungleichgewicht" der Daten durch dieses Verfahren berücksichtigt wird, so daß z.B. ein "Ungleichgewicht" in der Zytokinkonzentration oder der Gesamtläsionsfläche in der MRT zwischen den untersuchten Kollektiven zu Beginn der Untersuchung, keinen Einfluß auf das Ergebnis (p-Wert) hat. Ein Nachteil der ANOVA-Analyse ist, daß das Verfahren keine fehlenden Werte toleriert.

Daher wurden fehlende Meßwerte durch das anerkannte Verfahren "Last observation carried forward" (LOCF) ergänzt. Dies bedeutet, daß der fehlende Wert durch den letzten vorhandenen Meßwert ersetzt wird.

Diese Vorgehensweise ist sinnvoll, da auf diese Weise Patienten, die wegen eines "schlechten" Ergebnisses nicht mehr zur Untersuchung kommen, auch weiterhin als "schlecht" eingestuft werden. Auf der anderen Seite werden Patienten, die wegen eines "guten" Ergebnisses nicht mehr kommen, auch weiterhin als "gut" eingestuft werden. Die Methode wird daher als "neutral" angesehen.

Dennoch dürfen diese "Annahmen" nicht darüber hinweg täuschen, daß eine nicht vorhandene Information durch eine Vermutung ersetzt wird. Es kommt hinzu, daß hierbei die Zahl der Beobachtungen größer wird, ohne daß eine entsprechende Information vorhanden ist. Wählt man die andere Möglichkeit, nur Patienten in die Analyse einzuschließen, deren Verlaufsdaten vollständig sind, dann fügt man zwar keine "vermuteten Information" hinzu und erhöht nicht in unzulässiger Weise die Anzahl der Beobachtungen, muß man aber damit rechnen, daß ein stark selektiertes Kollektiv von Individuen vorliegt. Die Therapieabbrüche können sowohl durch besonders "gute" als auch durch besonders "schlechte" Therapieergebnisse zustande kommen oder rein zufälliger Natur sein.

4.1.3 Bewertung der quantitativen Messung der immunologischen Parameter mittels ELISA-Tests

Methoden, welche in klinischen Studien zur Anwendung kommen, sollten folgenden Ansprüchen genügen:

1. die Methode sollte informativ sein
2. reproduzierbar sein
3. kosteneffektiv sein
4. genügend sensitiv sein, Veränderungen im Verlauf darzustellen und

5. in der Lage sein, Behandlungseffekte aufzuzeigen, bzw. einen klinischen Vorhersagewert haben (z.B. über das Risiko, eine MS zu entwickeln oder eine Prognose über den zu erwartenden Behinderungsgrad zu geben).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen Laborparameter als prognostischen Marker der Krankheitsaktivität im Blut von MS-Patienten zu finden, der mit möglichst einfachen und für den Patienten wenig invasiven Methoden, zu gewinnen ist.

Da eine direkte Detektion von Zytokinen im ZNS bei an Multipler Sklerose erkrankter Patienten nicht möglich ist, ist man darauf angewiesen, diese im Blut oder Liquor mit geeigneten Methoden nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Konzentrationen der untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle im Blut quantitativ mittels kommerzieller ELISA-Tests gemessen.

Die Verwendung von ELISA-Tests zum Nachweis von Zytokinen erfüllt die Forderung nach einer gut standardisierten und gut reproduzierbaren Methode mit einer hohen Sensitivität, Spezifität und Präzision. Zusätzlich wird die Verwendung eines ELISA-Test als eine einfach durchführbare und praktikable, in der täglichen Laborpraxis geeignete Methode angesehen, welche zudem die Untersuchung einer großen Anzahl von Serumproben ermöglicht.

Bei der Quantifizierung von Zytokinen ist jedoch zu beachten, daß Zytokine vornehmlich in autokriner und parakriner Weise wirken und eine kurze Halbwertszeit besitzen. Um ihre Wirkung zu vermitteln binden die Zytokine an zirkulierende Rezeptoren. Mittels ELISA im Blut oder Liquor gemessene Serumspiegel von Zytokinen repräsentieren also letztendlich nur den Anteil, der nach der Produktion und Absorption noch in der peripheren Zirkulation vorhanden ist. Zudem konnte eine Untersuchung von Corti et al. zeigen, daß z.B. die Messung von TNF-alpha im ELISA beeinflusst wurde durch die schnelle Dissoziation des TNF-alpha/ TNF-R-Komplex während der Inkubationszeit [119].

Die andere Möglichkeit besteht darin, die Konzentration von Zytokinen auf zellulärer Ebene zu bestimmen. Als Verfahren stehen z.B. die Detektion von Zytokin-mRNA mittels reverser-Transkriptase-Kettenreaktion (rt-PCR) dar, der Northern-Blot oder die in-situ-Hybridisierung. Der Nachweis von Zytokin-mRNA bedeutet, daß eine Synthese stattgefunden hat und nicht, daß es auch gleichzeitig zur Sekretion des synthetisierten Zytokins kommen muß. Denkbar ist z.B. eine post-transkriptionale Regulation der Translation von Zytokin-mRNA oder eine andere Regulation der Zytokin-Sekretion.

Der Nachweis einer intrazellulärer Zytokin-Produktion kann z.B. durch immunzytochemische oder immunfluoreszierende Verfahren gelingen. Auch diese Methode macht aber nicht deutlich, ob die intrazellulär angereicherten Zytokine sezerniert werden.

Insgesamt erlauben die zur Verfügung stehenden Methoden zur Quantifizierung von Zytokinen nur die Betrachtung eines einzelnen Ausschnittes des gesamten Netzwerkes und des zugrunde liegenden komplexen Regulationsmechanismus. Von einer Über- bzw. Unterlegenheit einer Methode kann nicht gesprochen werden.

Letztendlich muß unabhängig von der Methode auch berücksichtigt werden, daß alle im peripheren Blut gefundenen Konzentrationen von Zytokinen nicht repräsentativ für ein entzündliches Geschehen im ZNS sein müssen.

Die erforderlichen Blutentnahmen zur Gewinnung des Probenmaterials fanden immer im Verlauf des Vormittags statt. Eine genauere Standardisierung der Blutentnahmen (z.B. Einhaltung einer genauen Uhrzeit der Blutentnahme oder eine Blutentnahme am nüchternen Patienten) wäre sicher vorteilhaft gewesen, da bisher nicht bekannt ist, ob die Zytokin-Sekretion einem zirkadianen Rhythmus - ähnlich dem der Hormonsekretion - unterliegt. Prinzipiell ist daher vorstellbar, daß natürliche Phänomene, wie z.B. periodische Schwankungen, die gemessene Konzentration der Zytokine in dieser Arbeit beeinflußt haben. Auf der anderen Seite ist jedoch auch anzunehmen, daß sich durch die nicht vorgenommene Standardisierung eine Gleichverteilung der Meßwerte ergibt und dadurch wiederum sich möglicherweise bestehende Unterschiede in der gemessenen Konzentration der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle minimieren.

Ein Vergleich der Konzentrationen der Zytokine im Blut von MS-Patienten mit einem gesunden Patientenkollektiv wäre wünschenswert gewesen. Dazu wäre es jedoch notwendig gewesen, bei gesunden Probanden, entsprechend dem Studiendesign, regelmäßige, serielle Blutentnahmen über fast 24 Monate durchzuführen. Ohne eine zwingende medizinische Indikation zu regelmäßigen Blutuntersuchungen ist dies keinem gesunden Probanden zumutbar.

4.1.4 Bewertung der Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität

Die Schubrate und das Fortschreiten der Behinderung sind in vielen therapeutischen MS-Studien klinische Endpunkte zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Medikaments. Dabei wird der Grad der Behinderung und die Progredienz der Erkrankung anhand des EDSS beurteilt. Bei der Verwendung dieses Scores werden folgende Punkte häufig kritisiert:

1. Die subjektive Einschätzung des Untersuchers bei der Ermittlung des Skalenwertes: in der Folge davon können "Inter-rater"- Fehler auftreten.
2. Der nicht lineare Verlauf des Scores: dies bedeutet, daß sich eine neu aufgetretene Behinderung, im Bereich höherer Werte der Skala, die eine Gehunfähigkeit des Patienten ausdrücken, wesentlich deutlicher bemerkbar macht.
3. Die stärkere Veränderung des EDSS durch eine Schädigung des lokomotorischen Systems als durch eine Schädigung anderer funktioneller Systeme (z. B. der Kognition).
4. Die unzureichende Erfassung einer langsamen oder schleichenden Veränderung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Veränderungen des EDSS im Studienzeitraum ebenfalls ermittelt, jedoch aus oben genannten Gründen nicht zur Beurteilung der Aktivität der Erkrankung herangezogen.

Besser geeignet zur Beurteilung der klinischen Krankheitsaktivität, da unabhängig von der Bewertung durch den behandelnden Arzt und unabhängig von dem betroffenen funktionellen System, ist die Verwendung der Schubrate/Jahr bzw. die Veränderung derselben.

4.1.5 Bewertung der Magnetresonanztomographie

Wie am Anfang dieses Kapitels bereits erwähnt, sollte eine Methode zur Beurteilung der Krankheitsaktivität informativ, gut reproduzierbar und sensitiv genug sein, Veränderungen im Verlauf darzustellen. Wünschenswert wäre zudem noch eine Methode, welche in der Lage ist, Behandlungseffekte aufzuzeigen, bzw. eine Methode, die einen klinischen Vorhersagewert hat, z.B. über das Risiko eine MS zu entwickeln. Von besonderem Interesse wäre zudem noch eine Methode, welche in der Lage ist, eine Prognose über den zu erwartenden Behinderungsgrad zu geben.

Bis auf die letzte Forderung erfüllt die Magnetresonanztomographie diese Ansprüche. Die Verwendung der Magnetresonanztomographie ist daher in klinischen Studien der Phase III, z.B. der nordamerikanischen Interferon-beta 1b Studie, ein fester Bestandteil geworden. Veränderungen in der MRT werden ebenfalls als primärer Endpunkt von klinischen Phase II Studien herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher auf die Erstellung seriell angefertigter Magnetresonanztomographien zur Beurteilung der subklinischen Krankheitsaktivität Wert gelegt.

Zu beachten ist jedoch, daß die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird:

1. Von der Repositionierung des Patienten in der MRT. Eine Studie von Rovaris et al. (1998) konnte zeigen, daß eine exakte Repositionierung eines Patienten in der MRT (COV: 8,9%, $p=0,01$) sich stärker auf die Gesamtläsionsfläche auswirkt als die "intra-rater"-Variabilität (COV: 4,9%) [120].
2. Von der Verwendung geeigneter Pulssequenzen bzw. Aquisitionparameter (TE/TR) [121]. Als Goldstandard gilt die Verwendung einer "langen" TR (> 1500 ms) und einer "kurzen" TE-Sequenz (< 30 ms).
3. Von dem Verfahren zur Vermessung der Läsionsfläche, z.B. der manuellen oder semiquantitativen Methode (s.u.) [122].

Ferner muß berücksichtigt werden, daß durch eine unzureichende Spezifität der MRT, die pathologische Heterogenität der Läsionen, welcher z.B. ein Ödem, eine Entzündung, eine Gliose, eine Demyelinisierung oder einen Axonverlust zugrunde liegen kann, nicht erfaßt wird [123]. Die pathologischen Veränderungen in der MRT müssen daher immer im Zusammenhang mit anderen klinischen Befunden gewertet werden.

In einigen bislang veröffentlichten Studien wurde untersucht, ob eine positive Korrelation der Krankheitsaktivität - gemessen an klinischen Parametern wie der Veränderung im EDSS - mit der Magnetresonanztomographie besteht. Insgesamt zeigt sich, daß die Ergebnisse dieser Studien sehr variabel sind und eine Korrelation u.a. abhängig ist von der verwendeten Aquisitionstechnik (Auswertung von T1-, T2- oder protonengewichteten Bildern), des untersuchten Patientenkollektives (sekundär chronische MS oder schubförmig-remittierende

MS) und den herangezogenen klinischen Parametern ("rating-scales", Veränderung der Schubrate etc.) [124].

Folgende Punkte müssen daher berücksichtigt werden, wenn ein Zusammenhang zwischen der klinischen Krankheitsaktivität und Veränderungen in der MRT hergestellt werden soll:

1. Die limitierte Aussagekraft von "rating-scales" wie z.B. des EDSS.
2. Die Bestimmung der Art des funktionellen Defizits (Lokomotorik versus Kognition, bzw. akuter Schub versus chronische Progredienz) in Abhängigkeit von der Größe und Lokalisation des Entmarkungsherd.
3. Die Pathologie der Läsion: vollständige Demyelinisierung mit oder ohne Fähigkeit zur Remyelinisierung, Axonverlust, "Normal Appearing White Matter" (NAWM), und klinisch stumme Herde und die geringe Spezifität diesbezüglich in der Magnetresonanztomographie [125].
4. Die Fähigkeit zur kortikalen Readaption und damit Reduktion des klinischen Defizits.

Insgesamt kann man sagen, daß die in dieser Arbeit angewendeten Methoden - insbesondere die Messung der Zytokine im ELISA als auch die Verwendung der Magnetresonanztomographie - die eingangs dieses Kapitels gestellten Anforderungen erfüllen. Die Methoden wurden deshalb hier so ausführlich diskutiert, weil auf ihrer Grundlage die Einteilung der Gruppen nach der Aktivität der Erkrankung vorgenommen wurde.

4.1.6 Beurteilung der MRT-Auswertung

Bei den MRT-Aufnahmen dieser Studie handelt es sich um Aufnahmen wie sie im Rahmen der Routinediagnostik in der neuroradiologischen Abteilung der JLU angefertigt werden (s. Abschnitt 2 "Material und Methode").

Zur Quantifizierung der Gesamtläsionsfläche oder "disease burden" kommen zwei unterschiedliche Verfahren in Betracht: die manuelle und die semiquantitative, computergestützte Auswertung.

Bei der manuellen Auswertung wird die Kontur des Entmarkungsherd mit einem Stift umfahren. Dabei findet eine Übertragung auf Millimeterpapier statt und anschließend erfolgt die Berechnung der Fläche in mm^2 . Diese valide Methode fand vornehmlich ihre Anwendung bis 1994 und wurde auch in der nordamerikanischen Interferon-beta 1b Zulassungsstudie von 1993 angewendet.

Die "Intra-rater"-Präzision dieser Methode lag nach einer Studie von Molyneux et al. (1998) bei: Kovarianz-Quotient (COV): 7,6%, Mittelwert +/- Standardabweichung: 9,0 +/- 5,2, Min./Max.: 0,4/ 18,5. Die "Inter-rater"-Präzision lag demgegenüber bei COV: 6,1%, Mittelwert +/- Standardabweichung: 11,0 +/- 5,8, Min./Max.: 4,9/ 21,7.

In wiederholten Auswertung ist jedoch auch eine "Intra-rater"-COV von 3,3% und eine "Inter-rater"-COV von 3,7% erreicht worden [126, 127]. Der Nachteil dieser Methode ist der hohe

Zeitaufwand, der bei der Untersuchung eines umfangreichen Patientenkollektivs erforderlich wird und die Abhängigkeit der Güte der Auswertung von den individuellen Erfahrungen und dem Können des Auswerterers.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die planimetrische Auswertung der MRT-Bilder manuell (s. Abschnitt 2: Material und Methode). Durch die voneinander unabhängigen Messungen durch zwei Auswerter konnte für diese Arbeit ein großes Maß an Genauigkeit und Reproduzierbarkeit gewährleistet werden. So betragen die "Inter-rater"-Varianz 6,71% und die "Intra-rater"-Varianz 4,62% und lagen damit im Toleranzbereich (Auswertungen von O. Fischer und H. Diehl).

Das zweite in klinischen Studien angewendete Verfahren ist die computergestützte Analyse, welche die Läsionen aufgrund einzelner Pixels von unterschiedlichen Intensitäten klassifiziert. Molyneux et al (1998) fand bei der Anwendung dieser Methode eine deutlich geringere "Intra-rater"-Varianz (COV): 3,2%; Mittelwert +/- Standardabweichung: 2,5 +/- 2,1, Min./Max.: 0,1/ 7,7 und eine ebenfalls geringere "Inter-rater"-Varianz (COV): 3,8%, Mittelwert +/- Standardabweichung: 4,5 +/- 1,6, Min./Max.: 1,8/ 6,6.

Im Vergleich der Methoden kann durch die Anwendung der semiquantitativen computergestützten Analyse eine Verbesserung der "Intra-rater" und "Inter-rater"-Präzision erzielt werden. Dennoch ist auch bei Anwendung dieser Technik noch eine manuelle "Nachbearbeitung" bzw. Auswertung in bis zu 25% der untersuchten Entmarkungsherde notwendig (Grimaud et al., 1996). Zudem ist dieses Verfahren sehr kostenintensiv, so daß die Anwendung der Methode auf Auswertungen im Rahmen von großen Studien beschränkt ist.

Beide Methoden kommen in vielen Studien zur Anwendung, z.B. der bereits mehrfach zitierten nordamerikanischen Zulassungsstudie für Interferon-beta 1b, häufig sogar simultan als "Hybrid-Verfahren", da eine sichere Überlegenheit der einen oder anderen Methode nicht gegeben ist [128].

4.2 Bewertung der immunologischen Marker als Parameter der klinischen und subklinischen Krankheitsaktivität

Die in den vorangegangenen Kapiteln vorgestellte Arbeit sollte klären, ob Unterschiede im Verlauf der immunologischen Parameter zwischen einer mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und einer Gruppe nicht behandelter Patienten besteht, um so Rückschlüsse über einen möglichen Einfluß von Interferon-beta 1b auf die Regulation des immunologischen Geschehen bei Multipler Sklerose ziehen zu können. Eine weitere Frage war, ob die untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle als prognostische Marker oder Parameter der Aktivität der Erkrankung dienen können, um so zu einer Aussage über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung und den Therapieerfolg zu gelangen.

Nach dem aktuellen Verständnis der Pathogenese der MS und der Regulation der Immunantwort auf das Entzündungsgeschehen spielen Th1- und Th2-Zellen sowie die von

diesen Zellen sezernierten Zytokine eine entscheidende Rolle. Th1-Zellen regulieren durch die von ihnen produzierten Zytokine (proinflammatorische Zytokine) die zelluläre Immunantwort, Th2-Zellen und ihre Zytokine (antiinflammatorische Zytokine) kontrollieren dagegen vornehmlich die humorale Immunität. Eine optimale Balance zwischen diesen T-Zell-Subtypen scheint für eine erfolgreiche Immunantwort notwendig zu sein. Aufgrund der oben beschriebenen Erklärungen, eine strenge Dichtotomie von Th1- und Th2-Zellen anzunehmen und die MS als eine primär durch Th1-Lymphozyten hervorgerufene Erkrankung zu erachten, wäre jedoch eine zu eingeschränkte Betrachtungsweise. Vielmehr ist sowohl die gegenseitige Regulation, als auch die Regulation der durch B-Zellen vermittelten Immunantwort von Bedeutung und ist für das Verständnis der Pathogenese der MS von besonderem Interesse.

4.2.1 Adhäsionsmoleküle

- sICAM-1/ sICAM-3/ sVCAM-1 -

Adhäsionsmoleküle spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der MS. Die Regulation derselben erfolgt dabei durch Zytokine, besonders durch Th-1 sezernierte Zytokine. So bewirken z. B. TNF-alpha und Interferon-gamma eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke [129]. LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen-1) und VLA-4 (Very Late Antigen-4) stellen die Liganden der Adhäsionsmoleküle auf den T-Lymphozyten bzw. Leukozyten dar. Auf den Endothelzellen werden die passenden Adhäsionsmoleküle exprimiert, die mit LFA-1 und VLA-4 interagieren und das Anheften ("homing") dieser Zellen bewirken. Dazu gehören ICAM-1 und ICAM-3, die mit LFA-1 interagiert und VCAM-1, welches mit VLA-4 interagiert. ICAM-1 wird auf B-Zellen, T-Zellen, Endothelzellen, Makrophagen und Mikrogliazellen, VCAM-1 wird auf Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. ICAM-3 konnte histopathologisch in MS-Herden nachgewiesen werden, jedoch dabei ausschließlich auf infiltrierenden Leukozyten, nicht dagegen auf Endothel oder Gliazellen [130].

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen konnte auch ICAM-1 in aktiven Plaques bei MS nachgewiesen werden [82].

Adhäsionsmoleküle sind maßgeblich an der Bindung der T-Zelle an die antigenpräsentierende Zelle beteiligt [131]. Eine wesentliche Voraussetzung für das Eindringen in das Parenchym von zuvor in der Peripherie aktivierten T-Lymphozyten ist die Adhäsion an die Endothelzellen der BHS. Dem Anheften an die Endothelzelle ("homing") folgt die transendotheliale Migration. Nach erfolgter Migration werden die Adhäsionsmoleküle von den aktivierten Endothelzellen, Lymphozyten oder Monozyten abgestoßen ("Shedding") und sind nun als lösliche Formen ("soluble") in Körperflüssigkeiten, z.B. im Liquor oder Blut nachweisbar [132].

Bezüglich der Wirkung von Interferon-beta 1b auf die Regulation von sICAM-1 sind in der Literatur sehr unterschiedliche Ergebnisse beschrieben worden. In einer Studie konnte

gezeigt werden, daß bei MS-Patienten nach einem Jahr unter Therapie mit Betaferon® erhöhte Serumspiegel von sICAM-1 meßbar waren [133]. Dem gegenüber konnte eine andere Studie keine Veränderungen der Serumkonzentration von sICAM-1 unter Therapie mit Betaferon® nachweisen [134].

Vor einer erneuten Exazerbation konnten vermehrt zirkulierende Adhäsionsmoleküle (s.u.) nachgewiesen werden [135]. Dies wurde als Indikator für eine vermehrte Expression auf den Endothelien der BHS einerseits und aktivierten Zellen andererseits angesehen. So wurden z.B. erhöhte Serum und Liquorkonzentrationen von sICAM-1 vor einer erneuten Exazerbation der Erkrankung von Patienten mit aktiver MS gefunden [136]. Ebenso wurden erhöhte Konzentrationen von ICAM-1 bei Patienten mit aktiven Gadolinium-anreichernden Läsionen in der MRT ermittelt [137]. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß erhöhte Serumspiegel von ICAM-1 als Marker einer akuten Entzündung nützlich sein können und assoziiert sind mit einem erneuten klinischen Schub [138].

In keiner der oben zitierten Studien wurde jedoch die Wirkung von Interferon-beta 1b auf die Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1 sowie sICAM-3 an einem Patientenkollektiv von 68 MS-Patienten, wie es in vorliegenden Arbeit der Fall ist, untersucht. Zudem war die Beobachtungszeit in den genannten Studie wesentlich kürzer.

Die Ergebnisse bisheriger Studien unserer Arbeitsgruppe ließen vermuten, daß die zellulär gebundene Form der Adhäsionsmoleküle cICAM-1 und cICAM-3 im Liquor und im Serum als mögliche Marker der Krankheitsaktivität bei Multipler Sklerose dienen könnten [139, 140]. In diesen Untersuchungen konnte auch eine inverse Korrelation von cICAM-1 auf periphere Monozyten mit MR-tomographischen Parametern der Krankheitsaktivität bei MS-Patienten gezeigt werden [141].

Nur sehr wenige Studien beschäftigten sich bislang mit der Wirkung von Interferon-beta 1b auf die Regulation von sICAM-3 bei an Multipler Sklerose erkrankter Patienten [135]. In einer Studie von Martin et al. konnte auch für sICAM-3 eine erhöhte Serumkonzentration bei Patienten mit Multipler Sklerose im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden [96].

In der vorliegenden Arbeit erfolgt daher erstmals bei 68 an Multipler Sklerose erkrankter Patienten eine Betrachtung der Veränderungen von sICAM-3 im Serum über einen Zeitraum von 18 Monaten.

sVCAM-1 ist bei unbehandelten Patienten mit aktiver MS im Serum erhöht und korreliert mit der Anzahl Gadolinium-anreichernder Läsionen, dessen Nachweis als Ausdruck einer Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke angesehen werden [142]. Einige Studien an mit Interferon-beta 1b behandelten MS-Patienten konnten erhöhte Serumkonzentrationen von sVCAM-1 nachweisen [143].

Calabresi et al. (1997) beschrieben dagegen erhöhte Serumspiegel von sVCAM-1, (nicht aber von anderen Adhäsionsmolekülen) bei mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten, die mit einer Abnahme der Anzahl Gadolinium-anreichernder Läsionen in der MRT korrelierten [144].

Diese interessanten Ergebnisse führten zu der Überlegung, ob auch die löslichen Formen der Adhäsionsmoleküle bei MS-Patienten unter Therapie mit Interferon-beta 1b als prognostische Marker der Krankheitsaktivität dienen können, bzw. als Marker der Effizienz einer Interferon-Therapie.

In der vorliegenden Arbeit ergaben die seriellen Messung der Konzentrationen von sICAM-1, sICAM-3 im Serum und von sVCAM-1 im Plasma von MS-Patienten über 18 Monate signifikante Unterschied zwischen der Behandlungsgruppe und der Gruppe der nicht therapierten Patienten für sICAM-1 ($p=0,0004$) und sICAM-3 ($p=0,01$) und für sVCAM-1 bis zum Untersuchungszeitpunkt von 15 Monaten (T5: $p=0,002$). Am Ende des gesamten Beobachtungszeitraumes nach 18 Monaten (T6) war für den untersuchten Parameter sVCAM-1 ($p=0,14$) ein deutlicher Unterschied nicht mehr nachweisbar, möglicherweise bedingt durch die Reduktion der Gruppengrößen zu diesem Zeitpunkt. Zudem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß es in der Gruppe der therapierten Patienten frühzeitig zu einem deutlichen Anstieg der Konzentration von sICAM-1 und sVCAM-1 kommt und dieser regulatorische Effekt über den gesamten Beobachtungszeitraum erhalten bleibt. Bei der Betrachtung der Ergebnisse des Verlaufs von sICAM-3 gewinnt man dagegen eher den Eindruck, daß eine, im Vergleich zu den anderen beiden Adhäsionsmolekülen, zeitlich verzögerte Regulation unter Therapie einsetzt (s. Abb. 3.8- 3.10).

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, besitzt Interferon-beta 1b eine immunmodulierende und regulatorische Wirkung auf Zytokine und Adhäsionsmoleküle.

Die oben beschriebene Induktion der Adhäsionsmoleküle kann daher als möglicher Effekt der Therapie mit Interferon-beta 1b verstanden werden.

Der genaue Wirkmechanismus von Interferon-beta ist bisher jedoch nicht bekannt. Frühere Studien an unbehandelten MS-Patienten zeigten, wie oben beschrieben, einen vermehrten Anstieg der Adhäsionsmoleküle im akuten Schub oder in Phasen vermehrter klinischer Krankheitsaktivität. Es ist bekannt, daß es unter Therapie mit Interferon-beta 1b zu einer Wiederherstellung der Integrität der gestörten Blut-Hirn-Schranke kommt. In der MRT erkennt man eine Reduktion Kontrastmittel-anreichernder Herde. Klinisch zeigt sich dies durch eine reduzierte Schubrate und damit einhergehend durch eine verminderte Progression der Erkrankung.

Die Bedeutung von ICAM-1 liegt u.a. in der Initiierung des Entzündungsgeschehens, indem durch cICAM-1 die Migration von zuvor in der Peripherie aktivierten T-Zellen vermittelt wird. Von cVCAM-1 wird hingegen angenommen, daß es durch die Rekrutierung von nicht spezifischen T-Zellen und Makrophagen das Entzündungsgeschehen unterhält und verstärkt [131]. Eine mögliche Erklärung für die im Serum von MS-Patienten unter Interferon-Therapie erhöhte nachgewiesenen Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle besteht in der Annahme, daß durch Interferon-beta 1b eine Wiederherstellung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke, welche insbesondere im akuten Schub eine vermehrte Permeabilität aufweist, herbeigeführt wird. Als zugrundeliegenden Mechanismus ist denkbar, daß die an den Endothelzellen gebundenen Adhäsionsmoleküle (cICAM-1, c-VCAM-1 und cICAM-3) durch Interferon beta-1b herabreguliert werden und die vormals an der Zelloberfläche gebundenen

Adhäsionsmoleküle abgespalten werden ("Shedding"). In der Folge ließen sich diese nun löslichen Formen der Adhäsionsmoleküle (s-ICAM-1, sVCAM-1 und sICAM-3) im Serum von MS-Patienten vermehrt nachweisen. Diese Theorie wird durch Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen gestützt. [97,135]. Dies würde bedeuten, daß erhöhte Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle im Serum bei MS-Patienten unter Interferon-Therapie als Zeichen einer wiederhergestellten Integrität der Blut-Hirn-Schranke betrachtet werden können und auf diese Weise eine Limitierung des Entzündungsgeschehen herbeigeführt werden könnte.

Eine weitere mögliche Wirkung kann sein, daß Interferon-beta direkt oder indirekt über eine Herabregulation der Expression der Liganden der Adhäsionsmoleküle (MHC-II, VLA-4 und LFA-1) wirkt und dadurch den Anteil von freien, nicht an den Liganden gebundenen VCAM-1 und ICAM-1 erhöht und diese somit vermehrt im Serum nachweisbar werden. Im Zusammenhang mit der vorherigen Vermutung über den Wirkmechanismus von Betaferon® auf die untersuchten Adhäsionsmoleküle ist aber auch denkbar, daß wiederum durch die vermehrt im Serum nachweisbaren und erhöhten Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle, die Liganden von sICAM-1 (LFA-1, MAC-1), sVCAM-1 (VLA-4) und sICAM-3 (LFA-1) geblockt werden.

Beide Effekte würden ebenfalls zu einer verminderten Adhäsion und Transmigration von aktivierten T-Lymphozyten ins ZNS führen. Frühere Untersuchungen zeigten diesbezüglich kontroverse Ergebnisse. In einer Studie konnte nach einem Jahr unter Therapie mit Interferon-beta 1b eine vermehrte Expression von VLA-4 auf der Zelloberfläche zirkulierender Monozyten im Blut von MS-Patienten nachgewiesen werden [135]. Im Gegensatz dazu fanden Calabresi et al. eine signifikante Reduktion der Expression von VLA-4 auf aktivierten Lymphozyten nach ca. 10 Monaten unter Therapie mit Interferonen [145].

Auf der anderen Seite ist bekannt, daß es zu Beginn einer Therapie mit Interferon-beta zu einer Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine Interferon-gamma und TNF-alpha kommt [146]. Von diesen beiden Zytokinen ist bekannt, daß diese wiederum zu einem vermehrten Anstieg von Adhäsionsmolekülen führen. Unabhängig von den oben beschriebenen Wirkmechanismen ist daher ein Anstieg der Adhäsionsmoleküle unter Therapie mit Interferon-beta auch über eine indirekte Interferon-gamma vermittelte Induktion denkbar.

Ein Nebeneinander mehrerer Wirkungsmechanismen ist gut vorstellbar. Denkbar ist, daß z.B. der initiale Anstieg der Adhäsionsmoleküle nach 3 Monaten unter Therapie, wie in dieser Arbeit und weiteren Studien gezeigt werden konnte, die Interferon-gamma vermittelte Induktion widerspiegelt.

Dagegen könnte die langfristige, nach 18 Monaten und zu einem Zeitpunkt, bei welchem eine vermehrte Induktion von Interferon-gamma unter Therapie mit Interferon-beta 1b nicht mehr nachweisbar ist, noch anhaltende Hochregulation der Adhäsionsmoleküle über den Mechanismus des vermehrten "Shedding" erklärt werden.

Ob der beschriebene Effekt eines vermehrten Auftretens der Adhäsionsmoleküle im Serum von MS-Patienten unter Interferon-Therapie tatsächlich wie angenommen als "protektiv" gelten kann, kann mit dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden.

Schließlich muß auch in Betracht gezogen werden, daß es sich bei den Beobachtungen möglicherweise um Nebeneffekte einer Interferon-Therapie handelt, welche keine Rückschlüsse auf die Wirkung des Medikaments zulassen. So könnten z.B. die unter Therapie vermehrt im Serum von MS-Patienten nachgewiesenen Adhäsionsmoleküle, Ausdruck eines akuten entzündlichen Geschehens im Sinne der bekannten grippeähnlichen Nebenwirkungen sein.

Es ist anzunehmen, daß durch die gegenseitige Regulation von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen immer mehrere Wirkungen vermittelt werden können und somit auch gewünschte und nicht erwünschte Wirkungen nebeneinander vorkommen.

4.2.2 Proinflammatorische Zytokine

-IFN-gamma-

IFN-gamma wird von Th1-Zellen und natürlichen Killerzellen gebildet. Es besitzt antivirale und antiproliferative Wirkung. Seine immunstimulierende Wirkung beruht u.a. auf einer Aktivierung von Makrophagen und T-Lymphozyten. Makrophagen wiederum sind an dem Prozeß der Demyelinisierung sowie direkt und indirekt an der Schädigung von Oligodendrozyten bei der MS beteiligt. Zusätzlich produzieren, durch Interferon-gamma aktivierte Makrophagen, vermehrt TNF-alpha [99], ein weiteres von Th1-Zellen produziertes proinflammatorisches Zytokin mit z.T. synergistischen Effekten zum Interferon-gamma.

Desweiteren fördert IFN-gamma die Differenzierung von B-Zellen und induziert die Expression von MHC-I und MHC-II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen [147]. Wie bereits oben beschrieben, führt Interferon-gamma zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen u.a. auf den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke [148]. Immunhistochemisch konnten in den typischen MS-Plaques T-Zellen nachgewiesen werden, die vermehrt dieses Zytokin synthetisieren [149].

Interferon-gamma führte in einer Pilotstudie zum vermehrten Auftreten von klinischen Schüben bei Multipler Sklerose [150]. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß dieses Zytokin unmittelbar an der Auslösung von MS-Schüben beteiligt ist. Die Erkenntnis, daß Interferon-beta 1b einen Teil seiner Wirksamkeit durch einen antagonisierenden Effekt zum IFN-gamma vermittelt, ist inzwischen allgemein anerkannt [151, 152].

Die Intention dieser Studie war es, durch serielle Messungen im Blut von MS-Patienten immunologische Langzeiteffekte einer Therapie mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) festzustellen.

Die Ergebnisse der Messung der Konzentration von Interferon-gamma im Blut von MS-Patienten mittels ELISA über einen Zeitraum von 18 Monaten konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und dem nicht therapierten Patientenkollektiv feststellen ($p=0,28$).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam eine Untersuchung von Van Oosten et al. (1998), in welcher ebenfalls kein Anstieg der Konzentration von Interferon-gamma im Serum von MS-Patienten ermittelt werden konnte [153]. Die Autoren beschreiben in ihrer Studie jedoch eine ausgeprägte individuelle Variation der IFN-gamma-Konzentration im untersuchten Patientenkollektiv. Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit gemacht werden. Es zeigte sich, daß die individuellen Unterschiede in der Konzentration von Interferon-gamma unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auftraten.

Im Gegensatz dazu, konnte in anderen Studien ein Anstieg von freien IFN-gamma und von IFN-gamma produzierender Zellen im Liquor von MS-Patienten nachgewiesen werden [154]. Eine weitere Studie hatte im Serum von MS-Patienten nach - in vitro Stimulation - einen Anstieg der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IFN-gamma, TNF-alpha und IL-2 vor dem Auftreten von klinischen Schüben beobachtet [155]. Diese Beobachtung wurden dahingehend gedeutet, daß Interferon-gamma als Schubparameter dienen könnte.

Aufgrund unseres Studiendesigns ist die Beantwortung der Frage, ob IFN-gamma als Schubparameter dienen kann, nicht möglich. Es wurde vielmehr versucht, anhand der Veränderung der Serumkonzentration der Zytokine und Adhäsionsmoleküle zu verschiedenen Zeitintervallen, zwischen einer vorübergehenden Beeinflussung der Immunantwort und einem langfristigen regulatorischen Effekt einer Interferon-Therapie zu differenzieren, um so zu einem Verständnis zu gelangen, wie Interferon-beta 1b seine Wirkung vermittelt.

Hier zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit signifikante Unterschiede in der Konzentration des Zytokins zwischen den beiden Gruppen zu verschiedenen Zeitintervallen (T0/T2: $p=0,05$; T1/T2: $p=0,004$; T2/T3: $p=0,03$; T2/T6: $p=0,04$).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Ergebnisse der anderen oben zitierten Studien sprechen dafür, daß eine Beeinflussung des Immunsystems durch Interferon-beta 1b insbesondere zu Beginn der Therapie stattfindet. Diese Beobachtung wird durch die klinische Erfahrung gestützt, daß die Wirksamkeit der Interferon-Therapie, gemessen an dem Auftreten von klinischen Krankheitsschüben, erst nach ca. 36 Monaten unter Therapie einsetzt. Bisweilen kommt es in der Initialphase einer Therapie mit Interferon-beta 1b zum vermehrten Auftreten von Schüben. Eine Erklärung hierfür besteht möglicherweise in der bekannten Induktion des proinflammatorischen Zytokin Interferon-gamma in einer frühen Phase der Therapie mit Betaferon® und seiner schubauslösenden Wirkung.

Interessant ist auch die Frage, warum bei einigen Patienten hohe Konzentrationen von Interferon-gamma im Serum gemessen werden konnten. Da die erhöhten Konzentrationen konstant im zeitlichen Verlauf der Messungen zu beobachten waren, erscheint in diesem Fall ein Zusammenhang eines Anstiegs von Interferon-gamma und der Auslösung eines akuten Schubes, nicht plausibel. Eine mögliche Überlegung besteht darin, bei diesen Patienten mit persistierend hohen Konzentrationen von Interferon-gamma, einen aktiven Verlauf der Erkrankung anzunehmen.

Auf der anderen Seite konnte jedoch in dieser Arbeit, wie weiter unten beschrieben, keine Korrelation der Konzentration von Interferon-gamma mit der Aktivität der Erkrankung innerhalb des mit Interferon-beta 1b therapierten Patientenkollektives gezeigt werden.

Zur Beantwortung der oben gestellten Frage ist daher vielleicht die individuelle Betrachtung der Krankheitsverläufe entscheidend.

- TNF-beta und TNF-R I/- II -

Zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine werden auch der Tumor-Necrosis-Factor-alpha (TNF-alpha) und beta (TNF-beta) gezählt. Das in dieser Arbeit untersuchte TNF-beta (Lymphotoxin) ist dem TNF-alpha strukturell verwandt und vermittelt seine, dem TNF-alpha vergleichbare Wirkung, über die gleichen Rezeptoren. Diese sind der TNF-RI (p55) und der TNF-RII (p75), welche ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurden. Das Zytokin und seine Rezeptoren sollen daher in diesem Abschnitt im Zusammenhang beschrieben werden.

TNF-alpha aktiviert zytotoxische T-Zellen und Makrophagen, deren Bedeutung für die Pathogenese der MS bereits geschildert wurde. Das Zytokin induziert ferner, wie Interferon-gamma, die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Expression von MHC-I-Molekülen, sowie außerdem das Enzym NO-Synthetase. Über die Produktion von NO (Stickstoffmonoxid) vermittelt TNF-alpha eine direkte zytotoxische Wirkung. In vitro konnte ein demyelinisierender Effekt auf Nervenzellkulturen nachgewiesen werden [156]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß monoklonale Antikörper gegen TNF-alpha den Ausbruch der EAE inhibieren.

Bei der Multiplen Sklerose wurden im Liquor und im Blut erhöhte Konzentrationen von TNF-alpha nachgewiesen [157, 158]. Bisherige Studien konnten zeigen, daß es vor einem Schub zu einer vermehrten Expression dieses Zytokins in peripheren Lymphozyten kommt. Desweiteren ließen sich bei Patienten mit klinisch aktiven Krankheitsverlauf, im Unterschied zu MS-Patienten mit einem klinisch stabilen Krankheitsverlauf, erhöhte TNF-alpha mRNA-Spiegel, gemessen in peripheren Monozyten, nachweisen [159].

Andere Studien wiederum untersuchten Veränderungen in der Konzentration der beiden Rezeptoren von TNF-alpha bei an Multipler Sklerose erkrankter Patienten.

In diesem Zusammenhang zeigten Studien von Rieckmann et al. (1994) und Hartung et al. (1995) fluktuierende Serumspiegel von TNF-RI bei MS-Patienten sowie eine vermehrte Konzentration von TNF-RI im Serum, vier Wochen nach einer klinischen Exazerbation [160].

In keiner bislang publizierten Arbeit wurden jedoch die Veränderungen der Konzentration von TNF-beta und seiner beiden Rezeptoren, TNF-RI und TNF-RII, über einen Zeitraum von 18 Monaten unter Therapie mit Interferon-beta bei MS-Patienten studiert.

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von TNF-beta zwischen der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe von MS-Patienten und der nicht behandelten Gruppe von MS-Patienten beobachtet werden ($p=0,35$).

Der Effekt der Bindungspartner auf die Konzentration und Wirkung von TNF-alpha und -beta ist ebenfalls verschiedentlich untersucht worden. Die Vermutung ist, daß eine

konzentrationsabhängige Wirkung der TNF-Rezeptoren auf TNF-alpha/ -beta vorliegt [161]. Die Annahme ist, daß niedrige Konzentrationen der Rezeptoren TNF-RI und -RII die biologische Aktivität von TNF-alpha und -beta stabilisieren, indem sie die Dissoziation des Zytokins in inaktive Monomere verhindern und so eine verlängerte Halbwertszeit des proinflammatorischen Zytokins bewirken [162]. Dies würde bedeuten, daß sich niedrige Konzentrationen der TNF-Rezeptoren negativ auf das Entzündungsgeschehen bei Multipler Sklerose auswirken, indem sie zu einer Unterhaltung der proinflammatorischen Wirkung des TNF-alpha/ -beta beitragen.

Demgegenüber sollen hohe Konzentrationen der TNF-Rezeptoren durch die Bindung von TNF-alpha/ -beta die biologische Aktivität durch Neutralisierung des Zytokins vermindern. Dies würde bedeuten, daß die TNF-Rezeptoren, indem sie dem Entzündungsgeschehen auf diese Weise entgegenwirken, indirekt antiinflammatorisch wirken. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen am Modell der EAE gestützt, welche zeigen konnten, daß die TNF-Rezeptoren potente Inhibitoren der EAE sind [163, 164].

Terlizzese et al. (1996) konnten zeigen, daß die inhibitorische Wirkung der Rezeptoren dabei vermehrt über den TNF-RII vermittelt [165].

Interessant ist, daß in der vorliegenden Arbeit über den Beobachtungszeitraum von 18 Monaten (T6) ein signifikanter Unterschied zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und dem nicht behandelten Patientenkollektiv für die Konzentration von TNF-RII ($p=0,001$) gefunden werden konnte, sowie auch für die Konzentration von TNF-RI bis zu einem Zeitpunkt von 15 Monaten ($p=0,01$). Dabei zeigte sich auch, daß in der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe eine höhere Konzentration der Rezeptoren im Plasma gemessen werden konnte.

Das nach 18 Monaten zwischen den untersuchten Patientenkollektiven kein signifikanter Unterschied in der Konzentration des TNF-RI mehr nachweisbar war (T6: $p=0,95$), kann an der deutlichen Reduktion der Gruppengröße zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin liegen.

Zusätzlich zeigen die Untersuchungen der Veränderung der Plasmakonzentration der beiden Rezeptoren des TNF-beta zu verschiedenen Zeitintervallen, daß beim TNF-Rezeptor II eine frühe und anhaltende Beeinflussung unter Therapie mit Interferon-beta 1b stattfindet (s. Abb. 3.13-3.14). Im Gegensatz dazu zeigt die Untersuchung des TNF-RI einen zeitlich verzögert einsetzenden Effekt unter Therapie mit Betaferon®.

Die Ergebnisse dieser und früherer Arbeiten unserer Forschungsgruppe, bei welchen ebenfalls eine vermehrte Expression von TNF-RI (p55) und TNF-RII (p75) unter Therapie mit Interferon-beta 1b gesehen werden konnte [166], führten zu der Annahme, daß Interferon-beta 1b einen Teil seiner immunmodulierenden und protektiven Wirkung durch eine frühe und lang anhaltende Regulation der TNF-Rezeptoren vermittelt. Der in dieser Arbeit beobachtete deutliche Anstieg der Konzentration der TNF-Rezeptoren, besonders von TNF-RII, in dem mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) behandelten Patientenkollektiv kann aufgrund der indirekten antiinflammatorischen Wirkung der Aktivität der Erkrankung entgegenwirken und so den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen.

Der Mechanismus, mit dem Interferon-beta 1b die Regulation bzw. Expression der Rezeptoren beeinflusst, ist jedoch nicht vollständig bekannt. Möglicherweise erfolgt die Induktion der Rezeptoren dabei indirekt über eine Interferon-beta vermittelte Induktion von Interleukin-10 [167]. Es ist bekannt, daß IL-10 über eine Hochregulation der Transkription der Gene von TNF-RII die Expression von TNF-RII auf der Zelloberfläche von Monozyten induziert [168]. Höhere Spiegel von TNF-RII-mRNA korrelierten dabei direkt mit dem Anstieg des Plasmaspiegels von TNF-RII in Zellkulturen, die mit IL-10 behandelt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher auch Veränderungen der Konzentration der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und Interleukin-10 im Blut von MS-Patienten unter Therapie mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) über einen Studienzeitraum von 18 Monaten untersucht.

4.2.3 Antiinflammatorische Zytokine

- Interleukin-4

Die Beteiligung von Interleukin-4 in der Pathogenese der MS, als ein die Immunantwort regulierendes Zytokin, konnte durch verschiedene Untersuchungen gesichert werden. Interleukin-4 ist ein von Th2-Zellen produziertes Zytokin mit antiinflammatorischer Wirkung, das gleichzeitig B-Zellen zur Antikörperproduktion stimuliert. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine höhere IL-4 Expression am Rand von MS-Läsion und auf Mikroglia-Zellen nachgewiesen werden [104].

Gallo et al. (1991) konnten erniedrigte Konzentrationen von IL-4 im Blut und im Liquor von unbehandelten MS-Patienten nachweisen [169]. Ein Anstieg von IL-4 sezernierenden mononukleären Zellen konnte im Blut [170] und im Liquor [105] von MS-Patienten nachgewiesen werden. Hohnoki et al. (1998) fanden mittels ELISA-Messungen erhöhte Konzentrationen von IL-4, TNF-alpha und IFN-gamma im Serum bei MS-Patienten, nicht aber von IL-10 [171]. Eine Korrelation zwischen der Konzentration von Interleukin-4-mRNA und der Aktivität der Erkrankung (Auftreten von Schüben versus kein Schub) konnte jedoch nicht ermittelt werden [105].

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels serieller Messungen der Konzentration von Interleukin-4 im Serum kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten und dem unbehandelten Patientenkollektiv gefunden werden ($p=0,23$).

Dabei muß bedacht werden, daß nur 61% der Meßwerte über der unteren Nachweisgrenze lagen, so daß das vorliegende Ergebnis möglicherweise nicht repräsentativ ist für das gesamte Patientenkollektiv. Zu bedenken ist auch, ob die in dieser Arbeit angewendete Methode mittels ELISA-Messungen genügend sensitiv war, die bei MS-Patienten systematisch erniedrigten Konzentrationen der Zytokine zu quantifizieren.

Unabhängig von dem methodischen Problem der Quantifizierung von Zytokinen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch ausgeprägte individuelle Unterschiede in der Konzentration von Interleukin-4. Möglicherweise deutet diese individuelle Variabilität auch auf eine genetisch bedingte Ursache hin.

- Interleukin-10-

Interleukin-10 wird wie Interleukin-4 vornehmlich von Th2-Zellen, aber auch von Th1-Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen, sezerniert und besitzt ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung. Interleukin-10 wirkt inhibitorisch auf die T-Zell-Proliferation und die Zytokin-Synthese von Th1-Zellen (IFN-gamma, TNF-alpha und TNF-beta). Ein weiterer durch Interleukin-10 vermittelter Effekt ist die verminderte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen. Es antagonisiert somit direkt die Wirkung von Interferon-gamma.

Zu Beginn der Erkrankung wurden erniedrigte Spiegel von Interleukin-10-mRNA bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden [172]. Dieses konnte durch Salmaggi et al. (1996) mittels ELISA-Messungen bestätigt werden [173].

Rieckmann et al. (1994) konnten mittels rt-PCR eine vermehrte Produktion von IL-10-mRNA in mononukleären Zellen im Blut von MS-Patienten in Phasen der Krankheitsremission nachweisen. In weiteren anderen Studie wurde ein Absinken der IL-10-mRNA vor Beginn eines neuen Krankheitsschubes beschrieben [174, 175].

Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, daß Interleukin-10 an der Induktion der Remission bei MS maßgeblich beteiligt ist. Im Tierversuch konnte zudem gezeigt werden, daß IL-10 der Ausbildung einer EAE präventiv entgegen wirkt [176, 177].

Bei MS-Patienten unter Therapie mit Interferon-beta 1b konnte eine vermehrte Expression von IL-10 mittels rt-PCR sowie auch eine vermehrte Sekretion, mittels ELISA, von IL-10 in beschrieben werden [178, 179]. Die Administration von Anti-IL-10-Antikörpern wiederum reduzierte den zuvor beschriebenen Effekt eines Anstiegs von IL-10 unter Therapie mit rekombinanten Interferon-beta [180]. Özenci et al. (1999) konnten mittels ELISPOT-Messungen feststellen, daß die Anzahl IL-10 sezernierender Zellen im Blut der mit Interferon-beta 1b behandelten MS-Patienten höher war als bei unbehandelten MS-Patienten. Durch eine Einteilung der Patienten nach dem klinischen Verlauf, der Dauer der Erkrankung oder dem Behinderungsgrad konnten jedoch in derselben Studie keine Unterschiede ermittelt werden [181].

Neben den oben beschriebenen Studien findet man in der Literatur aber auch Studien mit z.T. widersprüchlichen Ergebnissen. In der bereits oben zitierten Studie von Hohnoki et al. ließen sich z.B. keine erhöhten Konzentrationen von Interleukin-10 im Serum von MS-Patienten beobachten.

In der vorliegenden Arbeit wurde kein Unterschied zwischen den untersuchten Patientengruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 Monaten gefunden ($p=0,86$). Signifikante Unterschiede zwischen der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe

von MS-Patienten und dem nicht therapierten Patientenkollektiv zeigte jedoch bei Analyse der verschiedenen Zeitintervalle (T0/T1: $p=0,004$; T1/T4 $p=0,03$; T1/T5 $p=0,01$; T3/T5. $p=0,03$). Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, daß gerade zu Beginn einer Therapie mit Interferon-beta 1b eine Regulation der Immunantwort hin zu einer erhöhten Konzentration von Interleukin-10 im Serum in dem behandelten Patientenkollektiv stattfindet, wie es auch in anderen Studien, jedoch deutlicher als hier, gezeigt werden konnte.

Insgesamt betrachtet unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Annahme einer Beteiligung der Th2-sezernierten Zytokine IL-4 und IL-10 bei der Regulation der Immunantwort. Die bei MS-Patienten systematisch erniedrigten Spiegel von IL-10 und IL-4 sprechen für die Hypothese einer Th1/Th2-Dysbalance. Zu einem weiteren Absinken der Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-10 kommt es im akuten Schub. In stabilen Krankheitsphasen oder in der Remission ist dann wieder ein Anstieg zu verzeichnen.

Ein möglicher Wirkmechanismus von Interferon-beta 1b könnte, wie weiter oben beschrieben, über eine Modulation von IL-10 auf der transkriptionalen Ebene erfolgen. Eine Hochregulation der Th2-Zytokine würde die bestehende Dysbalance der T-Zellen wieder zugunsten der antiinflammatorischen Zytokine verschieben. Die Annahme ist, daß auf diesem Wege gleichzeitig eine Hochregulation der TNF-Rezeptoren stattfindet (s.o.), so daß unter einer Interferon-Therapie mehrere Wirkungsmechanismen dazu beitragen, das Entzündungsgeschehen zu limitieren und auf diese Weise günstig den Verlauf der Erkrankung beeinflussen.

4.3 Bewertung der immunologischen Marker als prognostischen Wert für den Therapieerfolg

Neben der Diagnosestellung und der Beurteilung der Aktivität der Erkrankung, ist die Einschätzung der Prognose ein weiteres Problem bei der Behandlung der Multiplen Sklerose. Zum einen wäre es wertvoll zu wissen, welchen Verlauf die Erkrankung beim einzelnen Patienten nimmt. Dadurch könnte frühzeitig eine für den einzelnen Patienten individuell geeignete und optimale Therapieform, z.B. immunmodulierend oder immunsupprimierend, initiiert werden. Andererseits wäre es vorteilhaft, den Behandlungserfolg durch einen geeigneten Marker abschätzen zu können, um so frühzeitig ein "Nicht-Ansprechen" einer Therapie erkennen zu können und auf diese Weise, z.B. durch eine Therapieumstellung, einer weiteren Progression der Erkrankung entgegenwirken zu können.

Verschiedene Autoren untersuchten daher die Korrelation von MRT-Parametern mit klinischen Parametern der Krankheitsaktivität (s.o.). Dabei wurden die meisten Studien aber nur an sehr kleinen Patientenkollektiven durchgeführt, die untersuchten Patientenkollektive unterschieden sich deutlich im Grad der Behinderung (EDSS) und schließlich sind die gewählten Definitionen der Krankheitsaktivität sehr heterogen.

Klinische Parameter, anhand derer häufig die Aktivität der Erkrankung und auch die Effizienz einer immunmodulierenden Therapie ermittelt wird, sind wie oben beschrieben die Reduktion der Schubrate und die Schwere und das Fortschreiten der Behinderung gemessen an "rating-scales" wie z.B. den EDSS.

Zudem dient die Magnetresonanztomographie als Monitoring-Instrument für akute (z.B. neue bzw. sich vergrößernde oder verkleinernde Läsionen) oder chronische (z.B. Gesamtläsionsfläche), morphologische Veränderungen im Krankheitsverlauf.

Viele Studien konnten zeigen, daß die subklinische Aktivität der Erkrankung, gemessen an neu auftretenden Gadolinium-anreichernden Läsionen in seriell angefertigten MRT-Aufnahmen, höher ist als die durch die klinische Untersuchung ermittelte Aktivität der Erkrankung [182].

Eine andere Methode, die subklinische Aktivität zu beurteilen, besteht möglicherweise in der seriellen Messung immunologischer Parameter, wie z.B. Zytokinen oder Adhäsionsmolekülen, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde. Bislang erfolgte in keiner veröffentlichten Studie eine Korrelation der Krankheitsaktivität nach klinischen Kriterien und nach MR-tomographischen Kriterien mit der Veränderung der Konzentration von immunologischen Parametern wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle. Mit dieser Arbeit wurde daher versucht, durch die Korrelation der Konzentration der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle mit der Krankheitsaktivität einen prognostischen Marker zu ermitteln.

Zusammenfassend ergab die Korrelation der Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Serum, in der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe von MS-Patienten, mit der Aktivität der Erkrankung anhand der jährlichen Schubrate und der in der MRT sichtbaren subklinischen Aktivität der Erkrankung, keine deutlichen Veränderungen in den untersuchten Subgruppen. Vielmehr waren die zuvor beschriebenen Veränderungen der Serumkonzentrationen der untersuchten Parameter in dem mit Interferon-beta 1b behandelten Patientenkollektiv nach erfolgter Unterteilung der Behandlungsgruppe anhand der Veränderung der Schubrate auch in beiden Subgruppen nachvollziehbar. Eindeutige Unterschiede zwischen der Patientengruppe der Responder und der Patientengruppe der Non-Responder konnten jedoch nicht gezeigt werden.

Nach der Einteilung des mit Interferon-beta 1b therapierten Patientenkollektives in eine Subgruppe von Respondern und Non-Respondern anhand des MRT-Parameters "Veränderungen der Anzahl und der Fläche der Herde", konnte ein Trend hin zu höheren Konzentrationen von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen in der Gruppe der Non-Responder festgestellt werden. Dies bedeutet, das bei einem Fortschreiten der Erkrankung verbunden mit einer Zunahme der Anzahl und der Fläche der Herde höhere Konzentrationen von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen im Blut dieser Patienten mit einer nachweisbaren Krankheitsaktivität in der MRT, meßbar sind. Die erhöhten Serumkonzentrationen können somit möglicherweise als Zeichen eines anhaltenden Entzündungsgeschehen gesehen werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind jedoch nicht ausreichend belegt, so daß eine abschließende Deutung derselben nicht möglich ist.

Umgekehrt zeigte die Untersuchung der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe von MS-Patienten und nach erneuter Unterteilung derselben anhand des MRT-Parameters "Anzahl und Fläche der Herde mit Kontrastmittel-Anreicherung" einen Trend hin zu höheren Serumkonzentrationen in der Subgruppe der Responder.

Dies bedeutet, daß in der Gruppe jener MS-Patienten, welche MR-tomographisch eine "Verbesserung" zeigen und diese "Verbesserung" möglicherweise auf ein Ansprechen der Interferon-Therapie zurückzuführen ist, sich dennoch erhöhte Konzentrationen von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen im Blut nachweisen lassen. Eine mögliche Begründung für diese Beobachtung ist, daß eine MRT-Untersuchung, bei welcher es zu einer Kontrastmittel-Anreicherung als Zeichen der gestörten Blut-Hirn-Schranke kommt, ein akutes und aktives Entzündungsgeschehen repräsentiert. Nicht auszuschließen ist, daß das akute Entzündungsgeschehen - mit einer erhöhten Konzentration der Zytokine und Adhäsionsmoleküle - langfristige unter Therapie mit Interferon-beta 1b zu beobachtende Veränderungen (z.B. der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg der Adhäsionsmoleküle in der Behandlungsgruppe) überlagert bzw. maskiert.

Somit erlaubt auch diese Untersuchung keine Rückschlüsse darüber, ob die beobachteten Veränderungen definitiv einem Ansprechen auf eine Interferon-Therapie zuzuordnen sind.

Abschließend muß daher festgehalten werden, daß die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine Aussage darüber erlauben, ob die untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle als prognostische Marker der Krankheitsaktivität und der Effizienz einer Interferon-Therapie dienen können. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

4.4 Ausblick

In der Konsequenz sollte zur Steigerung der Validität zukünftiger klinischer Studien, aber auch zur Verbesserung der Vergleichbarkeit, eine weitere Standardisierung der Aquisitionsparameter der Magnetresonanztomographie, aber auch eine Standardisierung der Definition von "Aktivität" der Erkrankung in der MRT angestrebt werden.

Im Sinne multivarianter Untersuchungen sind auch die Anwendung verschiedenster MRT-Sequenzen ("Fast-Fluid-Attenuated-Inversion-Recovery"-Sequenzen oder "Echo-planar-Imaging"-Sequenzen) oder verschiedener Techniken bzw. die Anwendung von funktionellem MRT (fMRT), MTR ("magnetisation transfer imaging) oder MRS ("magnetic resonance spectroscopy") ein vielversprechender Ansatz.

So können durch die Nutzung verschiedener Techniken der unterschiedlichen Pathologie und der Heterogenität der Erkrankung Rechnung getragen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen, die auch in anderen Studien gezeigte Tatsache, daß individuelle Unterschiede in der Regulation der Immunantwort bestehen und diese vielleicht mehr als bisher angenommen von Bedeutung sein können. Als viel versprechender

Ansatz wird daher die Einteilung der Patienten aufgrund einer genetischen Klassifikation vorgeschlagen, um so Unterschiede im Patientenkollektiv zu minimieren.

Hilfreich sind weiterführende Erkenntnisse über die Wirkung und Regulation von Zytokinen, z.B. genauere Kenntnisse über einen möglicherweise vorhandenen zirkadianen Rhythmus der Zytokinsekretion, um eine Standardisierung der Messungen (vergleichbar mit der Bestimmung von Hormonspiegel) zu erzielen. Messungen der Zytokinkonzentrationen an ein und demselben Patientenkollektiv auf verschiedenen regulativen Ebenen (z.B. unter paralleler Anwendung von intra/ und extrazellulären Methoden) tragen ebenfalls dazu bei, die Kenntnisse über die Regulation von Zytokinen zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems mit multifokalen Entmarkungsherden und unterschiedlichen zeitlichen Verlaufsformen. Die häufigste Verlaufsform, welche insbesondere oft am Anfang der Erkrankung steht, ist der schubförmig-remittierende Verlauf. Die unterschiedliche Lokalisation der Entmarkungsherde in der weißen Substanz bedingt eine unterschiedliche klinische Symptomatik. Häufige Symptome sind Nystagmus, skandierende Sprache, und Intentionstremor (Charcot-Trias) sowie zentrale Paresen, Sensibilitätsstörungen und Optikusneuritiden.

Die Multiple Sklerose wird nach dem heutigen Wissensstand als eine T-Zell- vermittelte Autoimmunerkrankung des ZNS angesehen. Demnach soll bei entsprechender genetischer Prädisposition eine bislang unbekannte virale Infektion in der Kindheit zu einer Sensibilisierung der T-Lymphozyten im peripheren Blut und nachfolgend über eine Kreuzreaktion zu einer Autoimmunreaktion gegen Bestandteile der Myelinscheiden führen. Im Zusammenspiel mit verschiedenen Umweltfaktoren kann im Erwachsenenalter dieser Autoimmunprozeß reaktiviert werden, der die Erkrankung dann zum Ausbruch bringen kann. Dabei werden die sensibilisierten T-Zellen, nachdem sie die Blut-Hirn-Schranke durchwandert haben, erneut aktiviert, um schließlich einen Entzündungsprozeß gegen Proteine der Myelinscheide in Gang zu setzen. An diesem Entzündungsprozeß sind verschiedene Mediatoren, Zytokine und Adhäsionsmoleküle in einem komplexen Zusammenspiel beteiligt, wobei die Regulation dieses "Netzwerkes" sowie auch die einzelne Wirkungsweise bislang nicht vollständig geklärt ist.

Daher gilt der Erforschung des neuroimmunologischen Geschehens sowie der Entwicklung neuer Therapiekonzepte ein besonderes Interesse.

Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede im zeitlichen Verlauf der immunologischen Parameter (Zytokine und Adhäsionsmoleküle) zwischen der Therapiegruppe und der Gruppe der nicht behandelten MS-Patienten zu ermitteln, um so einen möglichen Einfluß von Interferon-beta 1b auf die Regulation derselben und auf das immunologische Geschehen bei Multipler Sklerose ziehen zu können. Zusätzlich wurde geprüft ob, eine Korrelation zwischen der Konzentration der Immunparameter im Serum und der klinischen sowie auch subklinischen, in der MRT objektivierbaren, Aktivität der Erkrankung besteht.

Dabei sollte der Frage nachgegangen werden, ob die untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle als prognostische Marker oder als Parameter der Krankheitsaktivität dienen können, um so eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Erkrankung und den erwünschten Therapieerfolg treffen zu können.

68 Patienten mit schubförmig-remittierender Multipler Sklerose und mindestens 2 Krankheitsschüben im Jahr vor Beginn der Studie wurden in diese offene, prospektive und nicht randomisierte Studie über bis zu 24 Monaten beobachtet. 30 Patienten bildeten die mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) therapierte Gruppe, die verbleibenden 38 MS-Patienten bildeten das nicht behandelte Patientenkollektiv. Das Studiendesign sah vierteljährliche

klinische Untersuchungen vor, mit Klassifikation des Grades der Behinderung nach dem EDSS und Evaluierung von klinischen Schüben, verbunden mit vierteljährlich Blutentnahmen. In halbjährlichen Abständen wurden magnetresonanztomographische Aufnahmen des Kopfes angefertigt. Die quantitative Messung der Zytokine (TNF-beta, TNF-RI, TNF-RII, INF-gamma, IL-4, IL-10) und Adhäsionsmoleküle im Serum (sICAM-1, sICAM-3, sVCAM-1) erfolgte mittels kommerzieller ELISA.

Folgende Ergebnisse konnten gefunden werden:

1. Unter Therapie mit Interferon-beta 1b kam es zu einer deutlichen Reduktion der Schubrate/Jahr ($p=0,03$).
2. Die Zeit bis zum Auftreten eines Krankheitsschubes im Studienzeitraum war in der mit Interferon-beta 1b therapierten Gruppe von MS-Patienten länger als im unbehandelten Patientenkollektiv ($p=0,20$).
3. Die Magnetresonanztomographie zeigte eine signifikante Reduktion der Fläche der Herde ($p=0,00009$) in der Therapiegruppe (T0/ T6: $m=1533\text{mm}^2/955\text{mm}^2$) gegenüber dem unbehandelten Kollektiv (T0/ T6: $m=811\text{mm}^2/772\text{mm}^2$).
4. Signifikante Reduktion der Anzahl der Herde ($p=0,03$) in der Therapiegruppe (T0/ T6: $m=39/36$) gegenüber dem unbehandelten Kollektiv (T0/ T6: $m=30/31,5$).
5. Signifikante Reduktion der Fläche ($p=0,01$) und Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung ($p=0,01$) in der MRT.
6. Ein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen zwischen der mit Interferon-beta 1b behandelten Gruppe von MS-Patienten und nicht behandelten Patientengruppe in bezug auf folgende untersuchten immunologischen Parameter: sICAM-1 (T0/T6: $p=0,0004$); sICAM-3 (T0/T6: $p=0,01$), TNF-RII (T0/T6: $p=0,001$), sowie sVCAM-1 (T0/T5: $p=0,002$) und TNF-RI (T0/T5: $p=0,01$).
7. Die weiterführende Analyse der Serumkonzentrationen der Zytokine und Adhäsionsmoleküle zeigte zwischen den beiden Patientenkollektiven weitere signifikante Unterschiede bei der Betrachtung unterschiedlich langer Zeitintervalle.
8. Die Korrelation der Konzentration im Serum der untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der klinischen Krankheitsaktivität, definiert anhand der Veränderung der jährlichen Schubrate vor Studienbeginn und im Beobachtungszeitraum, konnte für alle untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle keine statistisch signifikanten Ergebnisse aufzeigen.
9. Die Korrelation der Konzentration im Serum der untersuchten Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der in der MRT erkennbaren Aktivität der Erkrankung, bestimmt durch den linearen Trend "a" der individuellen Veränderungen o. g. MRT-Parameter mittels Regressionsanalyse, konnte für alle untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse aufzeigen.

Aus diesen Ergebnissen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

Diese Studie konnte an einem kleinen Patientenkollektiv zeigen, daß es aus klinischer Sicht unter einer Therapie mit Interferon-beta 1b zu einer Reduktion der Schubrate kommt und daß das Auftreten eines Krankheitsschubes unter Therapie deutlich verzögert wird. Betrachtet man die Veränderungen in der Magnetresonanztomographie, so konnte gezeigt werden, daß es unter der Interferon-Therapie zu einer deutlichen Reduktion der "disease burden" und der Anzahl der Herde kommt, sowie auch zu einer Reduktion der Anzahl und Fläche der Herde mit Gadolinium-Anreicherung als Ausdruck einer akuten Schrankenstörung der Blut-Hirn-Schranke.

Die Resultate der vorliegenden Studie sind vergleichbar mit den Ergebnissen, welche in der Interferon-beta 1b Studie der Phase III zur Medikamentenzulassung erzielt wurden, so daß prinzipiell auch eine Übertragbarkeit der hier gewonnenen Erkenntnisse angenommen werden kann.

Insgesamt konnte hier gezeigt werden, daß es unter einer Therapie mit Interferon-beta 1b zu einem deutlichen Eingriff in die Regulation der Immunantwort kommt, wobei z.T. Langzeiteffekte einer Therapie mit Interferon erkennbar scheinen. Unter Interferon-Therapie kommt es zu einem deutlichen Anstieg der löslichen Adhäsionsmoleküle im Serum, welches als ein Zeichen der vermehrten Integrität der BHS angesehen werden kann und somit als ein protektiver Wirkmechanismus von Interferon-beta 1b gedeutet werden kann. Der in dieser Arbeit beobachtete deutliche Anstieg der Konzentration der TNF-Rezeptoren, besonders von TNF-RII, in dem mit Interferon-beta 1b (Betaferon®) behandelten Patientenkollektiv kann aufgrund der indirekten antiinflammatorischen Wirkung, welche denkbar ist durch, z.B. Neutralisation des Bindungspartners TNF-beta, der Aktivität der Erkrankung entgegenwirken und so den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen. Eine anhaltende Beeinflussung, im Sinn einer Hochregulation der antiinflammatorischen Zytokine unter Therapie, konnte leider nicht gezeigt werden.

Mit dieser Arbeit konnten verschiedene Erkenntnisse über die komplexe immunologische Regulation des Entzündungsgeschehens bei Multipler Sklerose und Aspekte des Wirkungsmechanismus einer Therapie mit Interferon-beta 1b gewonnen werden. Die Frage nach einem prognostischen Marker der Aktivität der Erkrankung und Effizienz einer Interferon-Therapie konnte jedoch nicht abschließend beantwortet werden. Hierzu sind weitere klinische und immunologische Studien notwendig, welche vielleicht auch mit Hilfe neuer Techniken und eines multivarianten Ansatzes zur Beantwortung dieser Fragen beitragen können.

Aus diesem Grund kann zunächst weiterhin auf die klinische Beobachtung des Krankheitsverlaufes und auf die Beurteilung der Effizienz einer immunmodulatorischen Therapie anhand klinischer Parameter bzw. MRT-Parameter, z.B. Reduktion der Schubrate und der "disease burden", nicht verzichtet werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Kunze K (1992): Lehrbuch für Neurologie, Thieme-Verlag, Stuttgart.
2. Heckel R (1994): Multiple Sklerose: Klinik- Differentialdiagnose- Behandlung. Thieme-Verlag, Stuttgart.
3. Kurtzke JF (1980): Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* 62 (2), 65-80.
4. Hein T, Hopfenmüller W (2000): Hochrechnung der Zahl an Multipler Sklerose erkrankter Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71 (4), 288-294.
5. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE jr. et al. (1979): Epidemiology of multiple sclerosis in U.S. veterans: I. Race, sex and geographic distribution. *Neurology* 29 (Pt 1), 1228-1235.
6. Dean G, Kurtzke JF (1971): On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3 (777), 725-729.
7. Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH et al. (1988): Multiple sclerosis: Updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29 (3), 533-541.
8. Batchelor JR, Compston A, McDonald WI (1978): The significance of the association between HLA and Multiple sclerosis. *Brit med bull* 34 (3), 279-284.
9. Poser S, Adams RD, Victor M et al. (1996): Taschenbuch der Multiplen Sklerose. Blackwell- Verlag, Berlin- Wien.
10. Hartung HP et al. (1995): Pathogenese der Multiplen Sklerose. Beilage: Der Nervenarzt, Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg- New York, 3-5.
11. Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33 (11), 1444-1452.
12. Compston A, Lassmann H, McDonald I et al. (1998): *Mc Alpine's Multiple Sclerosis: A Reappraisal*. 3rd edition, Churchill-Livingstone, London.
13. Schumacher GA, Beebe GW, Kibler RF et al. (1965): Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: Report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N.Y. Acad Sci* 122, 552-568.
14. Weinshenker BG, Bass B, Rice GP et al. (1989): The natural history of multiple sclerosis: A geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 (Pt 1), 133-146.
15. Poser S, Wikström J, Bauer HJ (1979): Clinical data and the identification of special forms of multiple sclerosis in 1271 cases studied with standardized documentation system. *J Neurol Sci* 40 (2-3), 159-168.
16. Fowler TJ et al (1989): Demyelinating diseases of the central nervous system. In: *Clinical Neurology* (Marsden CD, Fowler TJ), Edward Arnold, London, 344- 352.

17. Thompson AJ, Mc Donald I et al. (1992): Multiple sclerosis and its pathophysiology. In: Diseases of the Nervous Systems (Asbury AK, Mc Khann GM, Mc Donald WI), Saunders, Philadelphia, 1209-1228.
18. McAlpine D (1961): The benign form of multiple sclerosis: based on 241 cases seen within three years of onset and followed up till the tenth year or more of the disease. *Brain* 116, 135-146.
19. Phadke JG (1990): Clinical aspects of multiple sclerosis in north-east Scotland with particular reference to its course and prognosis. *Brain* 113 (Pt 6), 1597-1628.
20. Riise T, Gronning M, Fernandez O et al. (1992): Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study. *Acta Neurol Scand* 85 (3), 212-218.
21. Francis DA, Compston DA, Batchelor JR et al. (1987): A reassessment of the risk of multiple sclerosis developing in patients with optic neuritis after extended follow-up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50 (6), 758-765.
22. Rizzo JF, Lessell S (1988): Risk of developing multiple sclerosis after uncomplicated optic neuritis: a long-term prospective study. *Neurology* 38, (2), 185-190.
23. Weinshenker BG, Rice GP, Noseworthy JH et al. (1991): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* 144 (Pt 2), 1045-1056.
24. Phadke JG (1987): Survival pattern and cause of death in patients with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in north-east Scotland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50 (5), 523-531.
25. Kurtzke JF, Beebe GW, Nagler B et al. (1970): Studies on the natural history of multiple sclerosis. Longterm survival in young men. *Arch Neurol* 22 (3), 215-225.
26. Poser S, Kurtzke JF, Poser W et al. (1989): Survival in multiple sclerosis. *J Clin Epidemiol* 42 (2), 159-168.
27. Bauer HJ et al. (1972): Communication to: Judgement of the validity of a clinical MS-diagnosis. *Int. Multiple Sclerosis*, Göteborg.
28. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L et al. (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13 (3), 227-231.
29. Schumacher GA (1966): Multiple sclerosis. *Arch Neurol* 14 (6), 571-573.
30. Swanson JW (1989): Multiple sclerosis: update in diagnosis and review of prognostic factors. *Mayo Clin Proc* 64 (5), 577-586.
31. Ravnborg M, Liguori R, Christiansen P et al. (1992): The diagnostic reliability of magnetically evoked motor potentials in multiple sclerosis. *Neurology* 42 (7), 1296-1301.
32. Young IR, Hall AS, Pallis CA et al. (1981): Nuclear magnetic resonance imaging of the brain in multiple sclerosis. *Lancet* 2 (8255), 1063-1066.
33. Wallace CJ, Seland TP, Fong TC (1992): Multiple sclerosis: The impact of MR imaging. *Am J Roentgenol* 158 (4), 849-857.

-
34. Goodkin DE, Rudick RA, Ross JS (1994): The use of brain magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51(5), 505-516.
 35. Miller DH (1994): Magnetic resonance in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 (Suppl), 91-94.
 36. Paty DW, Li DK, Oger JJ et al. (1994): Magnetic resonance imaging in the evaluation of clinical trials in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 (Suppl), 95-96.
 37. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S et al. (1988): Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology* 38 (12), 1822-1825.
 38. Arnold DL, Matthews PM (2002): MRI in the diagnosis and management of multiple sclerosis. *Neurology* 58 (8, Suppl 4): 23-31.
 39. Metha PD (1991): Diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 28 (3), 233-251.
 40. Correale J, de Los Milagros Bassani Molinas M (2002): Oligoclonal bands nad antibody response in Multiple sclerosis. *J Neurol* 249 (4), 375-389.
 41. McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ (1990): A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the log IgG index. *Brain* 113 (Pt 5), 1269-1289.
 42. Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P et al. (1990): Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain* 113 (Pt 5), 1477-1489.
 43. Thompson AJ, Miller D, Youl B et al. (1992): Serial gadolinium enhanced MRI in relapsing/remitting Multiple sclerosis of varying disease duration. *Neurology* 42 (1), 60-63.
 44. Beck RW, Cleary PA Anderson MM Jr. et al. (1992): A randomized, controlled trial of corticosteroids in the treatment of acute optic neuritis. The optic neuritis study group. *N Engl J Med* 326 (9), 581-588.
 45. The Optic Neuritis Study Group (1997): The 5-year risk of MS after optic neuritis. Experience of the Optic Neuritis Treatment Trial. *Neurology* 49 (5), 1404-1413.
 46. Hartung HP, Gonsette R, MIMS-Study Group (1999): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: A placebo-controlled, randomized, observer blind phase III trial. *Neurology* 52 (Suppl.2), A 290.
 47. Cursiefen S, Flachenecker P, Rieckmann P et al. (1999): Mitoxantrone (Novantrone) in therapy of severe multiple sclerosis. A retrospective study of 15 patients. *Nervenarzt* 70 (8), 723-731.
 48. Van de Wyngaert FA, Beguin C, D'Hooghe MB et al (2001): A double blind trial of mitoxantrone versus methylprednisolone in relapsing, secondary progressive multiple sclerosis. *Acta Neurol Belg* 101 (4), 210-216.
 49. Yudkin P, Ellison GW, Ghezzi A et al. (1991): Overview of azathioprine treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 338 (8784), 1051-1055.

-
50. Confavreux C, Saddinger P, Grimaud J et al. (1996): Risk of cancer from azathioprine therapy in multiple sclerosis: a case-control study. *Neurology* 46 (6), 1607-1612.
 51. Canadian Co-operative Multiple Sclerosis Study Group (1991): The Canadian co-operative trial of cyclophosphamide and plasma exchange in progressive multiple sclerosis. *Lancet* 337, 441-446.
 52. Goodkin DE, Rudick RA, VanderBurg Medentrop S et al. (1987): Low-dose (7,5mg) oral methotrexate reduces the rate of progression in chronic progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 37 (1), 30-40.
 53. Arnason BG, Reder AT et al (1994): Review: Interferons and multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacology* 17, 495-547.
 54. Janeway CA, Travers P (1997): Immunabwehr von Infektionen. In: *Immunologie*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
 55. Reder A (1997): Interferon-therapy in multiple sclerosis, Verlag Marcel Dekker Inc., New York, Basel.
 56. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J et al. (1987): Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbation associated with activation of the immune system. *Neurology* 37 (7), 1097-1102.
 57. Panitch HS, Folus JS, Johnson KP et al. (1987): Recombinant beta interferon inhibits gamma interferon production in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 22 (1), 39 (Abstract).
 58. Noronha A, Toscas A, Jensen MA (1991): IFN-beta down-regulates IFN gamma production by activated T cells in MS. *Neurology* 41 (Suppl), 219
 59. Noronha A, Toscas A, Jensen MA (1990): Interferon beta augments suppressor cell function in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 27 (2), 207-210.
 60. Rudick RA, Ransohoff RM, Pepler R et al. (1996): Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 40 (4), 618-627.
 61. Brod SA, Marshall GD Jr, Henninger EM et al. (1996): Interferon-beta 1b treatment decreases tumor necrosis factor-alpha and increases interleukin-6 production in multiple sclerosis. *Neurology* 46 (6), 1633-1638.
 62. Stuve O, Dooley NP, Uhm HJ et al. (1996): Interferon beta-1b decreases the migration of T lymphocytes in vitro: effects on matrix metalloproteinase-9. *Ann Neurol* 40 (6), 846-863.
 63. IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1995): Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 45 (7), 1277-1285.
 64. Paty DW, Li DK (1993): Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43 (4), 662-667.
 65. Sibley WA, Bamford CR, Clark K (1985): Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1 (8441), 1313-1315.

-
66. Panitch HS, Bever CT, Katz E et al. (1991): Upper respiratory tract infections trigger attacks of multiple sclerosis in patients treated with interferon-beta. *J Neuroimmunol* 35 (Suppl), 125.
 67. Hohlfeld R, Meinl E, Weber F et al. (1995): The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* 45 (Suppl), 33-38.
 68. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE (1992): Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10, 153-187.
 69. Halfer DA, Weiner HL (1989): MS: a CNS and systemic autoimmune disease. *Immunol Today* 10 (3), 104-107.
 70. Hartung HP (1993): Immune-mediated demyelination. *Ann Neurol* 33 (6), 563-567.
 71. Weber F, Meinl E, Aloisi F et al. (1994): Human astrocytes are only partially competent antigen presenting cells. Possible implications for lesion development in multiple sclerosis. *Brain* 117 (Pt 1), 59-69.
 72. Prineas JW, Connell F (1979): Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5 (1), 21-31.
 73. Lassmann H (1993): Chronic relapsing allergic encephalomyelitis: its value as an experimental model for multiple sclerosis. *J Neurol* 229 (4), 207-220.
 74. Paterson PY et al. (1960): Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111, 119.
 75. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS (1993): Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol* 4 (3), 201-221.
 76. Raine CS (1991): Multiple sclerosis: a pivotal role for the T cell in lesion development. *Neuropathol. Appl Neurobiol* 17 (4), 265-274.
 77. Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995): Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80 (5), 695-705.
 78. Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C et al. (1996): Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39 (2), 233-240.
 79. Arnason B. (1995): The role of cytokines in multiple sclerosis. *Neurology* 45, (6, Suppl 6): 54-55.
 80. Hickey WF (1991): Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1 (2), 97-105.
 81. Hartung HP, Reiners K, Archelos JJ et al. (1995): Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 38 (2), 186-193.

-
82. Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B (1994): Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system of the SJL/J mouse. *Am J Pathol* 145 (1), 189-201.
 83. Romanic AM, Graesser D, Baron JL et al. (1997): T cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix is modulated upon transendothelial cell migration. *Lab Invest* 76 (1), 11-23.
 84. Meyermann R, Lampert PW, Korr H et al. (1987): The blood-brain-barrier a strict border to lymphoid cells? In: *Stroke and Microcirculation*, Raven, New York, 289-298.
 85. Lassmann H, Suchanek G, Ozawa K (1994): Histopathology and the blood-cerebrospinal fluid barrier in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 (Suppl), 42-46.
 86. Hartung HP, Archelos JJ, Zielasek J et al. (1995): Circulating adhesion molecules and cytokines in inflammatory demyelination: a review. *Neurology* 45 (6, Suppl 6), 22-32.
 87. Woodroffe MN (1995): Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45 (6, Suppl 6), 6-10.
 88. Mally M, Schade M (1991): Adhäsionsmoleküle steuern die Kommunikation der Zellen. *Lab med* 15, 391-399.
 89. Springer TA (1990): Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 (6283), 425-434.
 90. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Bogue DT (1991): Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol* 147 (9), 2913-2921.
 91. Becker JC, Dummer R, Hartmann AA et al. (1991): Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor- alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 147 (12), 4398-4401.
 92. Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK et al. (1991): Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 68 (1), 122-124.
 93. Seth R, Raymond FD, Makgoba MW (1991): Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* 338 (8759), 83-84.
 94. Gearing AJ, Newman W (1993): Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 14 (10), 506-512.
 95. Rieckmann P, Nunke K, Burchhardt M et al. (1993): Soluble intercellular adhesion molecule-1 in cerebrospinal fluid: an indicator for the inflammatory impairment of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Neuroimmunol* 47 (2), 133-140.
 96. Martin S, Rieckmann P, Melchers I et al. (1995): Circulating forms of ICAM-3 (cICAM-3). Elevated levels in autoimmune diseases and lack of association with cICAM-1. *J Immunol* 154 (4), 1951-1955.

-
97. Rieckmann P, Altenhofen B, Riegel A et al. (1997): Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 41 (3), 326-333.
 98. Selmaj KW, Raine CS (1988): Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23 (4), 339-346.
 99. Gelati M, Corsini E, Dufour A et al (1999): Immunological effects of in vivo interferon-beta 1b treatment in ten patients with multiple sclerosis: a 1-year follow-up. *J Neurol* 246 (7), 569-573.
 100. Sharief MK, Hentges R (1991): Association between tumor necrosis factor and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Eng J Med* 325, 467-472.
 101. Selmaj KW, Raine CS, Cannella B et al. (1991): Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87 (3), 949-954.
 102. Taga K, Tosato G (1992): IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148 (4), 1143-1148.
 103. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B et al. (1994): Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 44 (8), 1523-1526.
 104. Cannella BC, Raine CS (1995): The adhesion molecules and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37 (4), 424-435.
 105. Link J, Söderström M, Olsson T et al. (1994): Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 (3), 379-386.
 106. Gallo P, Picciono MG, Tavalato B et al (1991): A longitudinal study on IL-2, sIL-2R, IL-4 and IFN-gamma in multiple sclerosis CSF and serum. *J Neurol Sci* 101 (2), 227-232.
 107. Robard and Hutt (1974): Statistical analysis of radioimmunoassays and immunoradiometric (labeled antibody) assays: a generalized, weighted, iterative least square method for logistic curve fitting. *Proceedings, Radioimmunoassay and related Procedures in Medicine* 1.
 108. Paty DW (1988): Magnetic resonance imaging in the assessment of disease activity in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 15 (3), 266-272.
 109. Miller DH (1994): Magnetic resonance in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 (Suppl), 91-94.
 110. IFNB Multiple Sclerosis Study Group (1993): Interferon-beta 1b ist wirksam bei schubförmig-remittierender multipler Sklerose: II. Ergebnisse. *Neurology* 43, 662-667.
 111. Mitchell JR, Karlik SJ, Lee DH et al. (1996): The variability of manual and computer assisted quantification of multiple sclerosis lesion volume. *Med Phys* 23 (1), 85-97.
 112. Filippi M, Horsfield MA, Bressi S et al. (1995): Intra- and inter-observer agreement of brain MRI lesion volume measurements in multiple sclerosis. Comparison of techniques. *Brain* 118 (Pt 6), 1593-1600.

-
113. Lublin FD, Whitaker JN, Eidelman BH et al (1996): Management of patients receiving interferon beta-1b for multiple sclerosis: report of a consensus conference. *Neurology* 46 (1), 12-18.
 114. Gonzalez-Scarano F, Grossman RI, Galetta S et al (1987): Multiple sclerosis disease activity correlates with gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 21 (3), 300-306.
 115. Brunner E, Puri ML, Sun S et al. (1995): Nonparametric methods for stratified two sample designs with application to multi clinical trials. *Journal of the american statistical association* 90, 1004-1014.
 116. PRISMS (Prevention of relapses and disability by Interferon- beta 1a s.c in multiple sclerosis)-Study Group (1998): Randomized double-blind placebo controlled study of interferon-beta 1a in RR-MS. *Lancet* 352 (9139), 1498-1504
 117. Harris JO, Frank JA, Patronas N et al. (1991): Serial gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging scans in patients with early, relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for clinical trials and natural history. *Ann Neurol* 31 (1), 116-117.
 118. Frank JA, Stone LA, Smith ME et al. (1994): Serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis: implications for treatment trials. *Ann Neurol* 36 (Suppl), 86-90.
 119. Corti A, Poesi C, Merli S et al. (1994): Tumor necrosis factor (TNF) alpha quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF alpha-soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubation. *J Immunol Methods* 177 (1-2), 191-198.
 120. Rovaris M, Gawne-Cain ML, Sormani MP et al (1998): The effect of repositioning on brain MRI lesion load assessment in multiple sclerosis: reliability of subjective quality criteria. *J Neurol* 245 (5), 273-275.
 121. Filippi M, Horsfield MA, Campi A et al. (1995): Resolution-dependent estimates of lesion volume measurements in magnetic resonance imaging study of the brain in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 38 (5), 749-754.
 122. Miller DH, Grossman RI, Reingold SC et al. (1998): The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 1), 3-24.
 123. Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG et al. (1990): Patterns of disease activity in multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging study. *Brit Med J* 300 (6725), 631-634.
 124. Khoury SJ, Weiner HL (1998): Multiple sclerosis: what have we learned from magnetic resonance imaging studies. *Arch intern Med* 158 (6), 565-573.
 125. Barbosa S, Blumhardt LD, Roberts N et al. (1994): Magnetic resonance relaxation time mapping in multiple sclerosis: normal appearing white matter and the „Invisible“ lesion load. *Magn Reson Imaging* 12 (1), 33-42.

-
126. Molyneux PD, Tofts PS, Fletcher A et al.(1998): Precision and reliability for measurement of change in MRI lesion volume in multiple sclerosis: a comparison of two computer assisted techniques. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65 (1), 42-47.
 127. Grimaud J, Lai M, Thorpe J et al. (1996): Quantification of MRI lesion load in multiple sclerosis: a comparison of three computer-assisted techniques. *Mag Reson Imaging* 14 (5), 495-505.
 128. The IFNB Study Group (1995): Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of randomized, controlled trial. *Neurology* 45 (7), 1277-1285.
 129. Springer TA (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multiple step paradigm. *Cell* 76 (2), 301-314.
 130. Bo L, Peterson JW, Mork S et al. (1996): Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3 and the beta-2 integrin-LFA in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55 (10), 1060-1072.
 131. Raine CS (1994): Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 53 (4), 328-337.
 132. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH et al. (1992): Soluble forms of E- selectin, ICAM-1, and VCAM-1 are present in the supernatant of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 187 (2), 584-589.
 133. Trojano M, Defazio G, Avolio C, et al. (2000): Effects of rIFN-beta-1b on serum circulating ICAM-1 in relapsing remitting multiple sclerosis and on the membrane-bound ICAM-1 expression on the brain microvascular endothelial cells. *J Neurovirol* 6 (Suppl), 47-51.
 134. Gelati M, Corsini E, Dufour A et al (1999): Immunological effects of in vivo interferon-beta 1b treatment in ten patients with multiple sclerosis: a 1-year follow-up. *J Neurol* 246 (7), 569-573.
 135. Hartung HP, Archelos JJ, Zielasek J et al. (1995). Circulating adhesion molecules and cytokines in inflammatory demyelination: a review. *Neurology* 45 (suppl.6), 22-32.
 136. Sharief MK, Noori MA, Ciardi M et al. (1993): Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *J Neuroimmunol* 43 (1-2), 15-21.
 137. Hartung HP, Michels M, Reiners K et al. (1993): Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology* 43 (11), 2331-2335.
 138. Rieckmann P, Martin S, Weichselbaum I et al. (1994): Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology* 44 (12), 2367-2372.
 139. Kraus J, Oschmann P, Engelhardt B et al. (2000): Soluble and cell surface ICAM-3 in blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis: influence of methylprednisolone treatment and relevance as markers for disease activity. *Acta Neurol Scand*, 101 (2), 135-139.

-
140. Kraus J, Oschmann P, Engelhardt B et al. (1998): Soluble and cell surface ICAM-1 as marker for disease activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, 98 (2), 102-109.
 141. Kraus J, Engelhardt B, Chatzimanolis N et al. (2002): Cell surface bound and soluble adhesion molecule in CSF and blood in multiple sclerosis: correlation with MRI-Measures of subclinical disease severity and activity. *J Neuroimmunol*, submitted.
 142. Baraczka K, Pozsonyi T, Szongoth M et al. (1999): A study of increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule -1 (sVCAM-1) in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Acta Neurol Scand* 99 (2), 95-99.
 143. Matusевич D, Kivisakk P, Navikas V et al. (1998): Influence of IFN-beta 1b (Betaferon) on cytokine mRNA profiles in blood mononuclear cells and plasma levels of soluble VCAM-1 in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 5 (3), 265-275.
 144. Calabresi PA, Tranquill L, Dambrosia JM et al. (1997): Increases in soluble VCAM-1 correlate with a decreases in MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon-beta 1b. *Ann Neurol* 41 (5), 669-674.
 145. Calabresi PA, Pelfrey CM, Tranquill LR et al. (1997): VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta. *Neurology* 49 (4), 1111-1116.
 146. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F (2000): Short-term treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis patients with interferon (IFN)-beta 1B transiently increases the blood levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and IFN-gamma without significantly modifying those of IL-1 beta, IL-2, IL-4 and tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine* 12 (6), 682-687.
 147. Basham TY, Merigan TC (1983): Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J Immunol* 130 (4), 1492-1494.
 148. Huynh HK, Dorovini-Zis K et al. (1993): Effects of interferon-gamma on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. *Am J Pathol* 142 (4), 1265-1278.
 149. Traugott U, Lebon P (1988): Demonstration of alpha, beta, and gamma interferon in active chronic multiple sclerosis lesions. *Ann NY Acad Sci* 540, 309-311.
 150. Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J et al. (1987): Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbation associated with activation of the immune system. *Neurology* 37 (7), 1097-1102.
 151. Panitch HS, Folus JS, Johnson K et al. (1987): Recombinant beta interferon inhibits gamma interferon production in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 22 (1) 39-43.
 152. Noronha A, Toscas A, Jensen MA (1991): IFN-beta downregulates IFN-gamma production by activated T-cells in MS. *Neurology* 41(suppl.), 219.
 153. Van Oosten BW, Barkhof F, Scholten PE et al. (1998): Increased production of tumor necrosis factor alpha, and not of interferon gamma, preceding disease activity in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 55 (6), 793-798.

-
154. Olsson T, Wang WZ, Höjeberg B et al. (1990): Autoreactive T-lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon- gamma. *J Clin Invest* 86 (4), 981-985.
 155. Philippe J, Debruyne J, Leroux-Roels G et al. (1996): In vitro TNF-alpha, IL-2 and IFN-gamma production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 98 (4), 286-290.
 156. Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H et al (1997): Nitric acid via an isoform of nitric acid synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 73 (1-2) 107-116.
 157. Tsukada N, Miyagi K, Matsuda M et al. (1991): Tumor necrosis factor and interleukin-1 in the CSF and sera of patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 104 (2), 230-234.
 158. Matsuda M, Tsukada N, Miyagi K et al. (1994): Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptor in patients with multiple sclerosis and HTLV-1 associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 52 (1), 33-40.
 159. Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B et al. (1995): Tumor necrosis factor alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 37 (1), 82-88.
 160. Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I et al. (1994): Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF-receptor in serum from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 44, 2367-2372.
 161. Seckinger P, Isaacs S, Dayer JM (1989): Purification and biologic characterisation of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. *J Biol Chem* 264 (20), 11966-11973.
 162. Aderka D, Engelmann H, Maor Y et al. (1992): Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *J Exp Med* 175 (2), 323-329.
 163. Selmaj K, Papierz W, Glabinski A et al. (1995): Prevention of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by soluble tumor necrosis factor receptor I. *J Neuroimmunol* 56 (2), 135-141.
 164. Selmaj K, Raine CS et al. (1995): Experimental autoimmune encephalomyelitis: immunotherapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* 45 (suppl), 44-49.
 165. Terlizese M, Simoni P, Antonetti F (1996): In vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF receptor p75 (TBP II) versus TNF-receptor p55 (TBPI) against TNF-alpha and TNF-beta. *J Interferon and Cytokine research* 16 (12), 1047-1053.
 166. Laske C, Oschmann P, Tofighi J et al (2001): Induction of sTNF-R1 and sTNF-R2 by interferon beta-1b in correlation with clinical and MRI activity. *Acta Neurol Scand* 103 (2), 105-113.

-
167. Rep MH, Schrijver HM, Van Lopik T et al. (1999): Interferon (IFN)-beta treatment enhances CD 95 and interleukin 10 expression but reduces interferon-gamma producing T cells in MS-patients. *J Neuroimmunol* 96 (1), 92-100.
 168. Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF et al. (1997): Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood* 90 (10), 4162-4171.
 169. Gallo P, Piccinno MG, Tavolato B et al. (1991): A longitudinal study of IL-2, sIL-2, IL-4 and gamma-IFN in multiple sclerosis CSF and serum. *J Neurol Sci* 101 (2), 227-232.
 170. Lu CZ, Jensen MA, Arnason BG (1993): Interferon gamma and interleukin-4 secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 46 (1-2), 123-128.
 171. Hohnoki K, Inoue A, Koh CS (1998): Elevated serum levels of IFN- gamma, IL- 4 and TNF-alpha/ unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating disease during the acute stage. *J of Neuroimmunol* 87 (1-2), 27-32.
 172. Musette P, Benveniste O, Lim A et al. (1996): The pattern of production of cytokine mRNAs is markedly altered at the onset of multiple sclerosis. *Res Immunol* 147 (7), 435-441.
 173. Salmaggi A, Dufour A, Eoli M et al. (1996): Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression? *J Neurol* 243 (1), 13-17.
 174. Navikas V, Link J, Palasik W et al. (1995): Increased mRNA expression of IL- 10 in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis. *Scand J Immunol* 41 (2), 171-178.
 175. Brod SA, Nelson LD, Khan M et al. (1997): Increased in vitro induced CD4+ and CD8+ T cell IFN-gamma and CD4+ T cell IL-10 production in stable relapsing-remitting multiple sclerosis. *Int J Neurosci* 90 (3-4), 187-202.
 176. Rott O, Fleischer B, Cash E (1994): Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 24 (6), 1434-1440.
 177. Bai XF, Zhu J, Zang GX et al. (1997): IL-10 suppresses experimental autoimmune neuritis and down-regulates Th1-type immune responses. *Clin Immunol Immunopathol* 83 (2), 117-126.
 178. Rudick RA, Carpenter CS, Cookfair DL et al. (1993): In vitro and in vivo inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology* 43 (10), 2080-2087.
 179. Rep MH, Hintzen RQ, Polman CH et al. (1996): Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J of Neuroimmunol* 67 (2), 111-118.
 180. Porrini AM, De Luca G, Gambi D et al. (1998): Effects of an anti-IL-10 monoclonal antibody on rIFN beta-1b-mediated immune modulation. Relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 81 (1-2), 109-115.

-
181. Özenci V, Kouwenhoven M, Huang YM et al. (1999): Multiple sclerosis: Levels of Interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during Interferon-beta-1b treatment. *Scand J Immunol* 49 (5), 554-561
 182. Issac C, Li DK, Genton M et al. (1988): Multiple sclerosis: A serial study using MRI in relapsing patients. *Neurology* 38 (10), 1511-1515.

7 Anhang

7.1 Tabellen

Tabelle 7-1: Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke Skala)

Punkte:	Behinderung:
0,0	Normale neurologische Untersuchung (Grad 0 in allen funktionellen Systemen)
1,0	keine Behinderung, minimale Abnormität in einem funktionellen System (FS)
1,5	keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem funktionellen System (FS)
2,0	minimale Behinderung in einem FS (ein FS Grad 2, andere 0 oder 1)
2,5	minimale Behinderung in zwei FS (zwei FS Grad 2, andere 0 oder 1)
3,0	mäßiggradige Behinderung in einem FS (ein FS Grad 3, andere 0 oder 1) oder leichte Behinderung in drei oder vier FS (3 oder 4 FS Grad 2, andere 0 oder 1), aber voll gehfähig
3,5	voll gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem FS (Grad3) und ein oder zwei FS Grad 2; oder zwei FS Grad 3; oder fünf FS Grad 2 (andere 0 oder 1)
4,0	gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 Meter. Aktiv während 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung (ein FS Grad 4, andere 0 oder 1)
4,5	gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 Meter. Ganztägig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität, benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung (ein FS Grad 4, übrige 0 oder 1)
5,0	gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 200 Meter. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen. Ein FS Grad 5, übrige 0 oder 1; oder Kombination niedrigerer Grade, die aber über die Stufe 4,0 geltenden Angaben hinausgehen.
5,5	Gehfähig ohne Hilfen und Rast für für etwa 100 Meter. Behinderung schwer genug um normale tägliche Aktivität zu verunmöglichen. (FS -Äquivalente wie Stufe 5,0)
6,0	bedarf intermittierend, oder auf einer Seite konstant, der Unterstützung (Krücke, Stock, Schiene) um etwa 100 Meter ohne Rast zu gehen. FS-Äquivalente: Kombination von mehr als zwei FS Grad 3 plus).
6,5	benötigt konstant beidsseits Hilfsmittel, um etwa 20 Meter ohne Rast zu gehen. FS-Äquivalente wie 6,0
7,0	unfähig, selbst mit Hilfe, mehr als 5 Meter zu gehen. Weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt Rollstuhl selbst und transferiert ohne Hilfe (FS-Äquivalent: Kombination von mehr als zwei FS Grad 4 plus, selten Pyramidenbahn Grad 5 allein).
7,5	unfähig mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für denTtransfer. Bewegt Rollstuhl selbst, vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen. Benötigt eventuell motorisierten Rollstuhl (FS-Äquivalente wie 7,0)
8,0	Weitgehend ans Bett oder Rollstuhl gebunden, pflegt sich weitgehend selbstständig. Meist guter Gebrauch der Arme (FS-Äquivalente: Kombination meist von Grad 4 plus in mehreren Systemen)
8,5	Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einiger nützlicher Gebrauch der Arme, einige Selbstpflege möglich (FS-Äquivalente wie 8,0)
9,0	hilfloser Patient im Bett. Kann essen und kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen, meist Grad 4 plus).
9,5	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu schlucken oder zu kommunizieren (FS-Äquivalente sind Kombinationen von fast lauter Grad 4 plus.
10,0	Tod infolge MS.

Tabelle 7-2: Möglichkeiten der Diagnosestellung nach Poser et al.

Kategorie	Schübe	Nachweis separater Läsionen		
		Klinisch	paraklinisch	Liquor: OB/IgG
A. Klinisch gesicherte MS				
A1	2	2		
A2	2	1	1	
B. Laborunterstützt gesicherte MS				
B1	2	1	oder 1	positiv
B2	1	2		positiv
B3	1	1	1	positiv
C. Klinisch wahrscheinliche MS				
C1	2	1		
C2	1	2		
C3	1	1	1	
D. Laborunterstützt wahrscheinliche MS				
D1	2			positiv

Tabelle 7-3: Zusammenstellung charakteristischer Daten der ELISA-Tests nach den Herstellerangaben

ELISA-Test	Intra-Assay-Präzision SD / %CV	Inter-Assay-Präzision SD / %CV	untere Nachweisgrenze	normale Serumwerte Min./Max.
IL-10	0,3- 1,0 / 2,3- 7,5	0,3- 1,7 / 3,7- 7,6	> 208 fg/ml	
IL-4	0,2- 0,7 / 2,7- 5,3	0,3- 0,9 / 4,1- 8,6	> 0,27 pg/ml	
IFN-gamma	10,5- 52,8 / 5,2- 5,9	11,5- 52,8 / 6,0- 6,1	> 4,0 pg/ml	
TNF-beta	/ 7,3- 8,5	/ 8,7- 10,6	> 7,0 pg/ml	1,0- 1125 pg/ml
TNF-RI	7,4 / 6,8		> 0,06 ng/ml	0,3- 2,9 ng/ml
TNF-RII	5,9 / 11,0		> 0,02 ng/ml	1,9- 8,5 ng/ml
sVCAM-1	0,7- 2,7 / 4,3- 5,9	1,0- 4,4/ 8,5- 10,2	> 2 ng/ml	395- 714 ng/ml
sICAM-1	0,03- 0,1 / 1,0- 2,8	0,1- 0,3 / 3,9- 8,2	>0,1 ng/ml	219- 1042 ng/ml
sICAM-3	0,1- 0,2 / 0,9- 3,5	0,2- 0,4 / 2,0- 6,3	>0,3 ng/ml	155- 727 ng/ml

Tabelle 7-4: Demographische Daten des Patientenkollektives

Gruppe		therapierte Patienten	nicht therapierte Patienten	p
Anzahl		30	38	
Alter	Median	36	34	
	Min./ Max.	19- 51	18- 57	p= 0,55
Geschlecht	Männlich	12	4	
	Weiblich	18	34	p= 0,004*
Erkrankungsdauer in Jahren	Median	6,4	3	
	Min./ Max.	0,9- 35,3	0,1 -25,2	p= 0,01
EDSS	Median	2	2	
	Min./ Max.	0- 5,0	0- 4,0	p= 0,10
Beobachtungszeitraum in Monaten	Median	24,3	16,3	
	Min./ Max.	3,6- 27,8	2,8- 31,7	p= 0,004
MRT:"Disease Burden" [mm ²] zu Beginn	Median	1533	811	
	Min./ Max.	66/ 21812	0/ 9338	p= 0,003
Schubanzahl vor Studienbeginn	Median	4,0	3,0	
	Min./ Max.	2,0- 70,0	1,0- 14,0	p= 0,005
		(N= 29)**	(N=28)**	
Schubrate/Jahr vor Studienbeginn	Median	1	0,8	
	Min./ Max.	0,2- 2,5	0,3- 3,3	p= 0,60
Schubanzahl im Beobachtungszeitraum	Median	1,5	1,0	
	Min./ Max.	0- 4,0	0- 3,0	
		(N=29)**	(N= 28)**	
Schubrate/Jahr im Beobachtungszeitraum	Median	1,0	1,54	
	Min./ Max.	0- 2,9	0- 4,3	
Die statistischen Analyse erfolgte unter Anwendung des Wilcoxon-Test				
* Chi-Square-Test.				
** Nur Patienten mit > 1 Jahr Beobachtungsdauer				

Tabelle 7-5: Deskriptive Statistik der Konzentrationen der immunologischen Parameter im Blut.

Gruppe therapierter MS-Patienten

Parameter		Zeitpunkt							
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
sICAM-1	n	30	30	27	28	22	18	14	
	ng/ml	Median	531	659	608	633	578	570	697
		Min./Max.	340/1351	242/1336	440/1599	385/2640	359/1022	329/1069	502/1156
sICAM-3	n	30	30	28	28	21	18	14	
	ng/ml	Median	296	297	301	290	339	285	340
		Min./Max.	171/544	64/554	155/450	163/517	187/971	200/652	195/699
sVCAM-1	n	30	30	28	28	22	18	14	
	ng/ml	Median	703	1047	902	934	884	975	950
		Min./Max.	472/1361	467/1981	489/1693	552/1536	625/1415	636/1928	498/1579
IL-10	n	30	30	28	28	22	18	13	
	pg/ml	Median	1,5	1,7	1,7	1,4	1,3	1,2	1,9
		Min./Max.	0,2/23,7	0,2/17,4	0/13	0/11	0,2/11,9	0/21,1	0,1/5
IL-4	n	24	24	23	24	19	18	13	
	pg/ml	Median	0	0	0	0	0	0	
		Min./Max.	0/6,6	0/2,2	0/8,8	0/4,8	0/1,7	0/0,2	0/0,2
IFN-g	n	26	26	25	26	20	17	13	
	pg/ml	Median	0	0	0	0	0	0	
		Min./Max.	0/402	0/436	0/376	0/375	0/393	0/74	0/171
TNF-beta	n	30	30	28	28	22	17	14	
	pg/ml	Median	13,3	14,3	8,9	11,6	6,9	4	9,9
		Min./Max.	0,7/152	0,6/132	0/122	1/112	0/174	1,6/142	1,5/97
TNF-RI	n	30	30	28	28	21	18	14	
	ng/ml	Median	1	1,1	1	1	1,4	1,4	1,3
		Min./Max.	0,5/2,6	0,5/10,5	0,5/2,2	0,5/2,6	0,7/2,6	0,6/2,1	0,7/2,4
TNF-RII	n	30	30	28	28	21	18	14	
	ng/ml	Median	2,3	2,5	2,7	2,7	3,6	3,4	3,6
		Min./Max.	1,2/19,8	1,5/14,1	1,2/11,7	1,2/11,5	1,2/10,4	2/6	2,2/9,2

Tabelle 7-6: Deskriptive Statistik der Konzentrationen der immunologischen Parameter im Blut.

Gruppe nicht therapierter MS-Patienten

Parameter		Zeitpunkt							
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	
sICAM-1	n	38	33	36	27	19	12	9	
	ng/ml	Median	570	557	551	569	570	580	466
		Min./Max.	234/1184	376/947	295/883	382/929	388/986	422/740	386/687
sICAM-3	n	37	33	34	26	19	13	10	
	ng/ml	Median	270	268	284	247	233	260	243
		Min./Max.	107/618	156/625	156/862	179/971	187/771	197/439	198/445
sVCAM-1	n	38	33	35	27	19	13	10	
	ng/ml	Median	681	662	681	612	561	651	644
		Min./Max.	400/1168	440/1422	330/1325	344/985	376/1102	460/1270	353/970
IL-10	n	37	32	32	26	18	13	10	
	pg/ml	Median	1,6	1,1	1,6	0,9	1,2	2,0	1,9
		Min./Max.	0/58,7	0/59,2	0/231	0/84,5	0/115	0,2/4,9	0/3,3
IL-4	n	23	21	22	14	12	4	8	
	pg/ml	Median	0	0	0	0	0	0	
		Min./Max.	0/3	0/1,5	0/1,5	0/2,5	0/0	0/0,3	0/0,3
IFN-g	n	33	29	29	20	16	10	8	
	pg/ml	Median	0	0	0	0	0,1	0	0,6
		Min./Max.	0/321	0/115	0/138	0/135	0/217	0/37	0/33
TNF-beta	n	38	33	34	27	19	13	10	
	pg/ml	Median	8,5	9,9	10	9,2	7,3	11,1	9,6
		Min./Max.	0,8/97	0/92	0/121	0,8/137	0,4/118	0,4/50	0,5/39
TNF-RI	n	38	33	34	27	19	13	10	
	ng/ml	Median	1,5	1,4	1,3	1,4	1,4	1,2	1,5
		Min./Max.	0,5/2,1	0,7/2,2	0,7/2,3	0,7/1,9	0,6/2,2	0,7/2,1	0,9/2,2
TNF-RII	n	38	33	34	27	19	13	10	
	ng/ml	Median	3,2	3,2	3,2	3,3	3,6	2,9	3,4
		Min./Max.	1,5/9,2	1,3/7,8	1,4/7,6	1,7/7,4	1,9/7,5	1,9/7,2	2,4/4,6

Zeitpunktswise Tests auf Unterschiede (p) der Serumkonzentrationen von Zytokinen in der Behandlungsgruppe und der unbehandelten Gruppe von MS-Patienten

Tabelle 7-7: sICAM-1

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,02	0,10	0,25	0,4	0,73	0,0004
Zeitpunkt		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,51	0,52	0,24	0,05	0,06
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,96	0,62	0,23	0,003
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,60	0,33	0,02
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,32	0,29
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,77

Tabelle 7-8: sICAM-3

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,78	0,71	0,94	0,21	0,82	0,01
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,53	0,83	0,30	0,64	0,02
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,77	0,19	0,94	0,01
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,29	0,72	0,03
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,25	0,39
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,03

Tabelle 7-9: sVCAM-1

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,00006	0,05	0,0001	0,000006	0,002	0,14
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,02	0,96	0,29	0,79	0,56
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,04	0,62	0,23	0,69
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,27	0,85	0,56
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,26	0,29
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,77

Tabelle 7-10: TNF-RI

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,41	0,52	0,32	0,02	0,01	0,95
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,96	0,52	0,08	0,02	0,99
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,61	0,09	0,03	0,79
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,31	0,14	0,44
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,68	0,07
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,05

Tabelle 7-11: TNF-RII

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,0003	0,02	0,04	0,005	0,0007	0,001
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,33	0,63	0,51	0,15	0,26
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,65	0,24	0,05	0,09
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,39	0,16	0,24
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,55	0,57
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,89

Tabelle 7-12: TNF-beta

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,62	0,06	0,76	0,36	0,23	0,75
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,06	0,78	0,36	0,19	0,77
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,10	0,93	0,68	0,23
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,24	0,24	0,74
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,54	0,33
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,04

Tabelle 7-13: IL-4

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,79	0,43	0,86	0,35	0,55	0,23
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,56	0,73	0,27	0,59	0,23
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,45	0,12	0,75	0,52
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,57	0,30	0,13
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,26	0,02
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,23

Tabelle 7-14: IL-10

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,004	0,43	0,15	0,61	0,23	0,86
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,08	0,45	0,03	0,01	0,27
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,64	0,39	0,07	0,72
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,21	0,03	0,62
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,32	0,88
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,23

Tabelle 7-15: INF- gamma

Zeitpunkte	T0-T1	T0-T2	T0-T3	T0-T4	T0-T5	T0-T6
p	0,64	0,05	0,86	0,21	0,86	0,28
Zeitpunkte		T1-T2	T1-T3	T1-T4	T1-T5	T1-T6
p		0,004	0,87	0,31	0,73	0,43
Zeitpunkte			T2-T3	T2-T4	T2-T5	T2-T6
p			0,03	0,006	0,35	0,04
Zeitpunkte				T3-T4	T3-T5	T3-T6
p				0,33	0,77	0,35
Zeitpunkte					T4-T5	T4-T6
p					0,28	0,86
Zeitpunkte						T5-T6
p						0,10

Tabelle 7-16: Deskriptive Statistik zur MRT-Auswertung

Gruppe nicht therapierter MS-Patienten

Parameter	Zeitpunkt				
		T0	T2	T4	T6
Anzahl	<i>n</i>	35	19	10	8
Anzahl der Herde	Median	30	24	24	31,5
	Min./Max.	0/92	0/71	3/71	3/72
Anzahl Gd.- anreichernder Herde	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/6	0/5	0/2	0/3
Anzahl der Herde mit Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/4	0/0	0/0	0/0
Anzahl der Herde mit Gd.-Anreicherung u. Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/3	0/0	0/0	0/2
Anzahl neuer Herde	Median	0	3	2,5	5,5
	Min./Max.	0/0	0/22	1/22	0/17
Anzahl sich vergrößernder Herde	Median	0	10	8,5	14,5
	Min./Max.	0/0	0/36	2/28	1/53
Anzahl sich verkleinernder Herde	Median	0	8	8,5	6
	Min./Max.	0/0	0/24	0/26	2/16
Anzahl verschwundener Herde	Median	0	2	1,5	3,5
	Min./Max.	0/0	0/13	0/9	0/9

Tabelle 7-17: Deskriptive Statistik zur MRT-Auswertung.

Gruppe nicht therapierter MS-Patienten

Parameter	Zeitpunkt				
		T0	T2	T4	T6
Anzahl	<i>n</i>	35	19	10	8
Fläche [mm ²] der Herde	Median	811	620	590	772
	Min./Max.	0/9338	0/9171	34/3088	27/4758
Fläche [mm ²] Gd.-anreichernder Herde	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/3632	0/758	0/75	0/167
Fläche [mm ²] der Herde mit Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/192	0/0	0/0	0/0
Fläche [mm ²] der Herde mit Gd.-Anreicherung u. Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/763	0/0	0/0	0/162
Fläche [mm ²] neuer Herde	Median	0	26	42,5	83
	Min./Max.	0/0	0/346	3/1300	0/205
Fläche [mm ²] sich vergrößernder Herde	Median	0	69	77	140,5
	Min./Max.	0/0	0/743	1/407	1/1127
Fläche [mm ²] sich verkleinernder Herde	Median	0	90	52,5	23,5
	Min./Max.	0/0	0/431	0/217	8/136
Fläche [mm ²] verschwundener Herde	Median	0	9	12	27,5
	Min./Max.	0/0	0/153	0/95	0/113

Tabelle 7-18: Deskriptive Statistik zur MRT-Auswertung.

Gruppe therapierter MS-Patienten

Parameter	Zeitpunkt				
		T0	T2	T4	T6
Anzahl	<i>n</i>	30	25	19	12
Anzahl der Herde	Median	39	42	45	36
	Min./Max.	1/77	1/72	1/63	1/62
Anzahl Gd.- anreichernder Herde	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/9	0/6	0/4	0/3
Anzahl der Herde mit Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/1	0/1	0/0	0/0
Anzahl der Herde mit Gd.-Anreicherung u. Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/4	0/1	0/1	0/0
Anzahl neuer Herde	Median	0	3	4	3
	Min./Max.	0/0	0/27	0/19	0/18
Anzahl sich vergrößernder Herde	Median	0	12	15	15,5
	Min./Max.	0/0	0/26	0/27	1/28
Anzahl sich verkleinernder Herde	Median	0	20	17	17
	Min./Max.	0/0	1/49	1/37	0/29
Anzahl verschwundener Herde	Median	0	3	4	5,5
	Min./Max.	0/0	0/17	0/23	0/17

Tabelle 7-19: Deskriptive Statistik zur MRT-Auswertung.

Gruppe therapierter MS-Patienten

Parameter	Zeitpunkt				
		T0	T2	T4	T6
<i>Anzahl</i>	<i>n</i>	30	25	19	12
Fläche [mm ²] der Herde	Median	1533	1234	1102	955
	Min./Max.	66/21812	52/21087	42/22413	46/2749
Fläche [mm ²] Gd. anreichernder Herde	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/2834	0/812	0/553	0/135
Fläche [mm ²] der Herde mit Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/106	0/222	0/0	0/0
Fläche [mm ²] der Herde mit Gd.-Anreicherung u. Ödem	Median	0	0	0	0
	Min./Max.	0/424	0/300	0/58	0/0
Fläche [mm ²] neuer Herde	Median	0	31	42	34,5
	Min./Max.	0/0	0/379	0/259	0/251
Fläche [mm ²] sich vergrößernder Herde	Median	0	78	116	101,5
	Min./Max.	0/0	0/1224	0/2196	4/385
Fläche [mm ²] sich verkleinernder Herde	Median	0	242	210	121,5
	Min./Max.	0/0	11/3307	1/870	0/657
Fläche [mm ²] verschwundener Herde	Median	0	32	70	58,5
	Min./Max.	0/0	0/496	0/272	0/233

Tabelle 7-20: Statistische Analyse der Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe und der nicht therapierten Gruppe von MS-Patienten bzgl. der untersuchten MRT-Parameter über 18 Monate

MRT-Parameter	p-Wert
Fläche der Herde [mm ²]	0,00009
Anzahl der Herde	0,03
Fläche der Herde [mm ²] mit Gadolinium-Anreicherung	0,01
Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung	0,01
Fläche der Herde [mm ²] mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem	0,16
Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem	0,13

Tabelle 7-21: Statistische Analyse der Serumwerte der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle nach Einteilung der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten nach dem klinischen Kriterium "Schubrate/Jahr".

Test auf Responder/ Non-Responder unter Therapie

Zytokin/ Adhäsionsmolekül	p-Wert
sICAM-1	0,05
sICAM-3	0,81
sVCAM1	0,15
IL-10	0,14
IL-4	0,94
IFN-gamma	0,40
TNF-beta	0,64
TNF-RI	0,53
TNF-RII	0,52

Responder: Schubrate/Jahr < Schubrate vor Studienbeginn; N= 14

Non-Responder: Schubrate/Jahr > Schubrate vor Studienbeginn; N= 15

Tabelle 7-22: Statistische Analyse der Serumwerte der untersuchten Zytokine und Adhäsionsmoleküle nach Einteilung der mit Interferon-beta 1b therapierten Patienten nach dem linearen Trend mittels Regressionsanalyse bzgl. der Veränderungen im MRT.

Test auf Responder/ Non-Responder unter Therapie

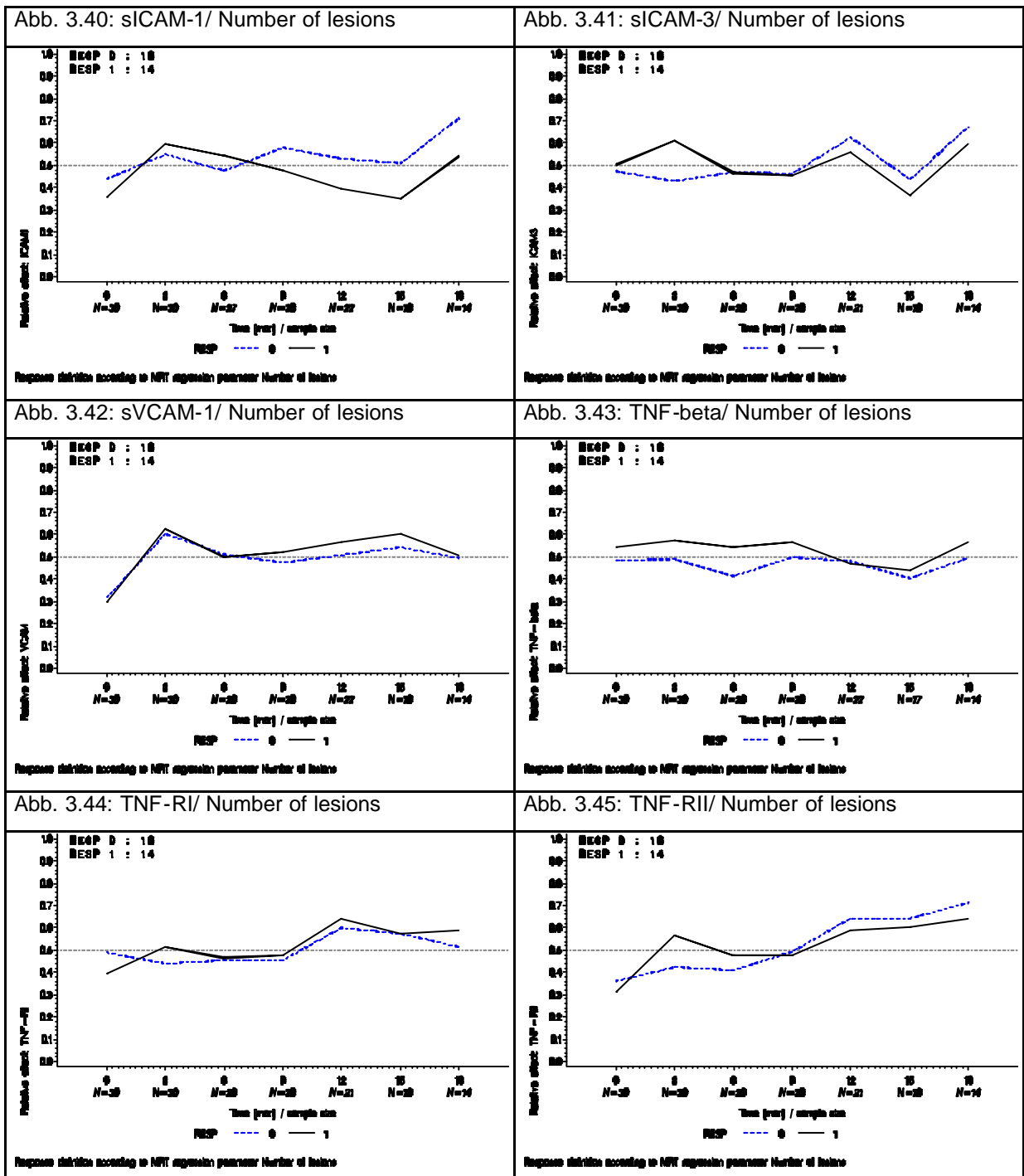
Zytokin/AM	sICAM-1	sICAM-3	sVCAM-1	IL-10	INF-gamma	TNF-beta	TNF-RI	TNF-RII
MRT								
Anzahl der Herde	0,69	0,74	0,99	0,59	0,96	0,99	0,95	0,78
Fläche der Herde [mm ²]	0,73	0,04	0,89	0,77	0,98	0,9	0,94	0,88
Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung	0,53	0,84	0,87	0,87	0,91	0,93	0,44	0,22
Fläche der Herde [mm ²] mit Gadolinium-Anreicherung	0,53	0,84	0,87	0,87	0,91	0,93	0,44	0,22
Anzahl der Herde mit Ödem	0,9	0,98	0,83	0,12		0,96	0,72	0,43
Fläche der Herde [mm ²] mit Ödem	0,9	0,98	0,83			0,96	0,72	0,43
Anzahl der Herde mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem	0,92	0,66	0,6	0,09	0,89	0,93	0,73	0,95
Fläche der Herde [mm ²] mit Gadolinium-Anreicherung und Ödem	0,97	0,77	0,8	0,01	0,97	0,93	0,5	0,9

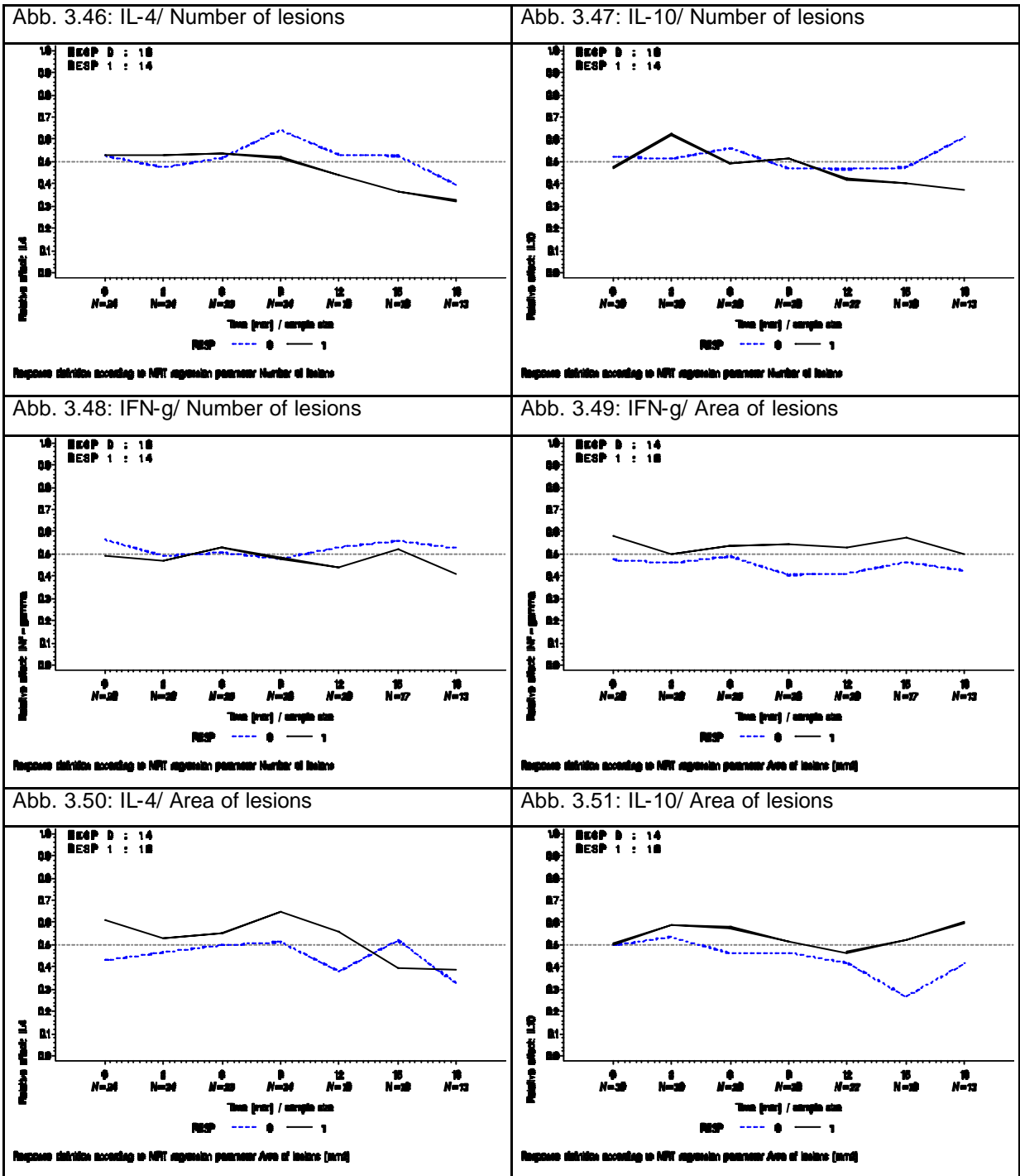
Response: MRT-Variable = 1 (positive Tendenz)

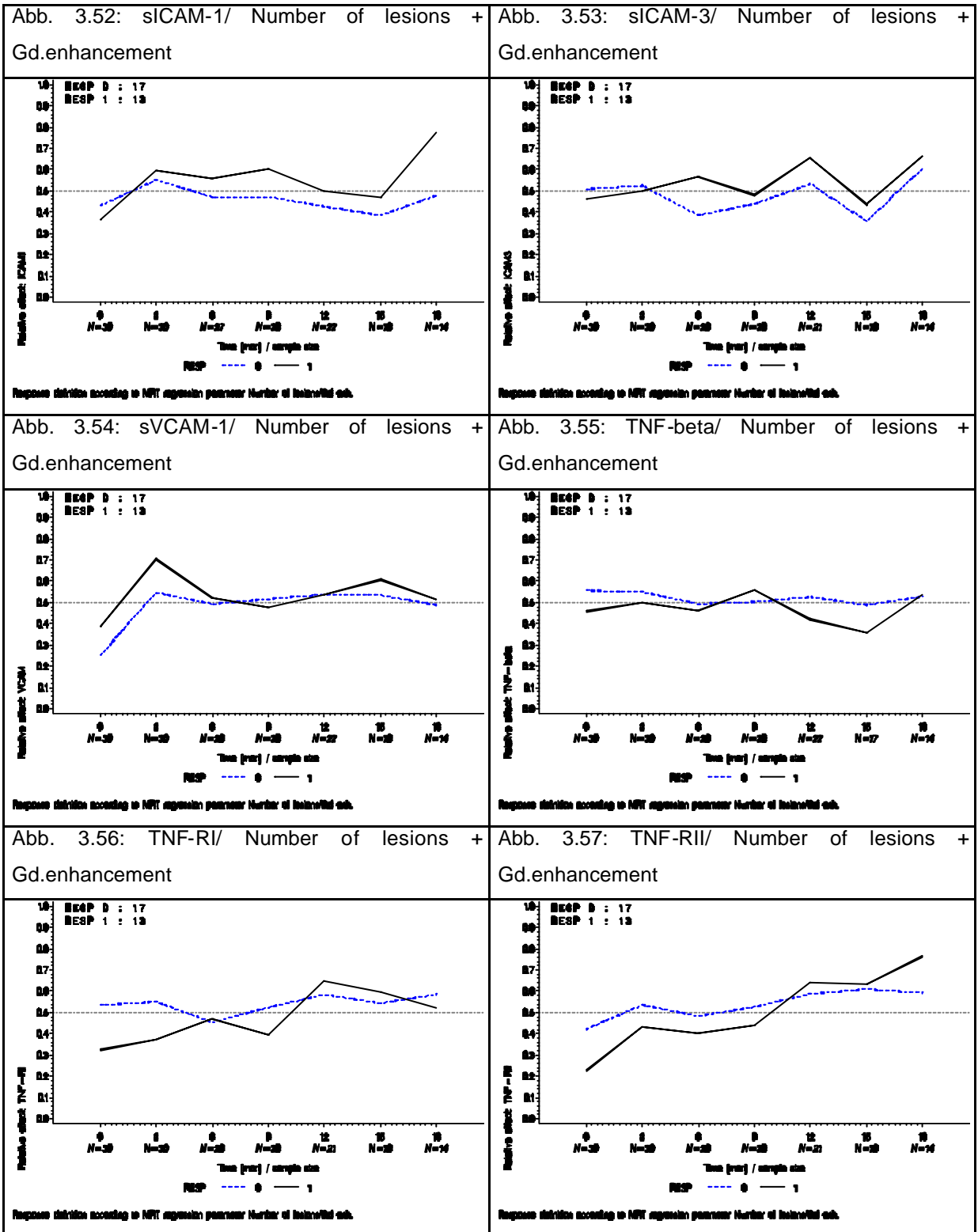
Non- Response: MRT-Variable < 0 (negative Tendenz)

7.2 Graphiken

Abbildungen 3.40- 3.98 zeigen die Korrelation der Konzentration der Zytokine bzw. Adhäsionsmoleküle mit der Aktivität der Erkrankung anhand der MRT und nach Einteilung der Behandlungsgruppe in Responder und Non-Responder







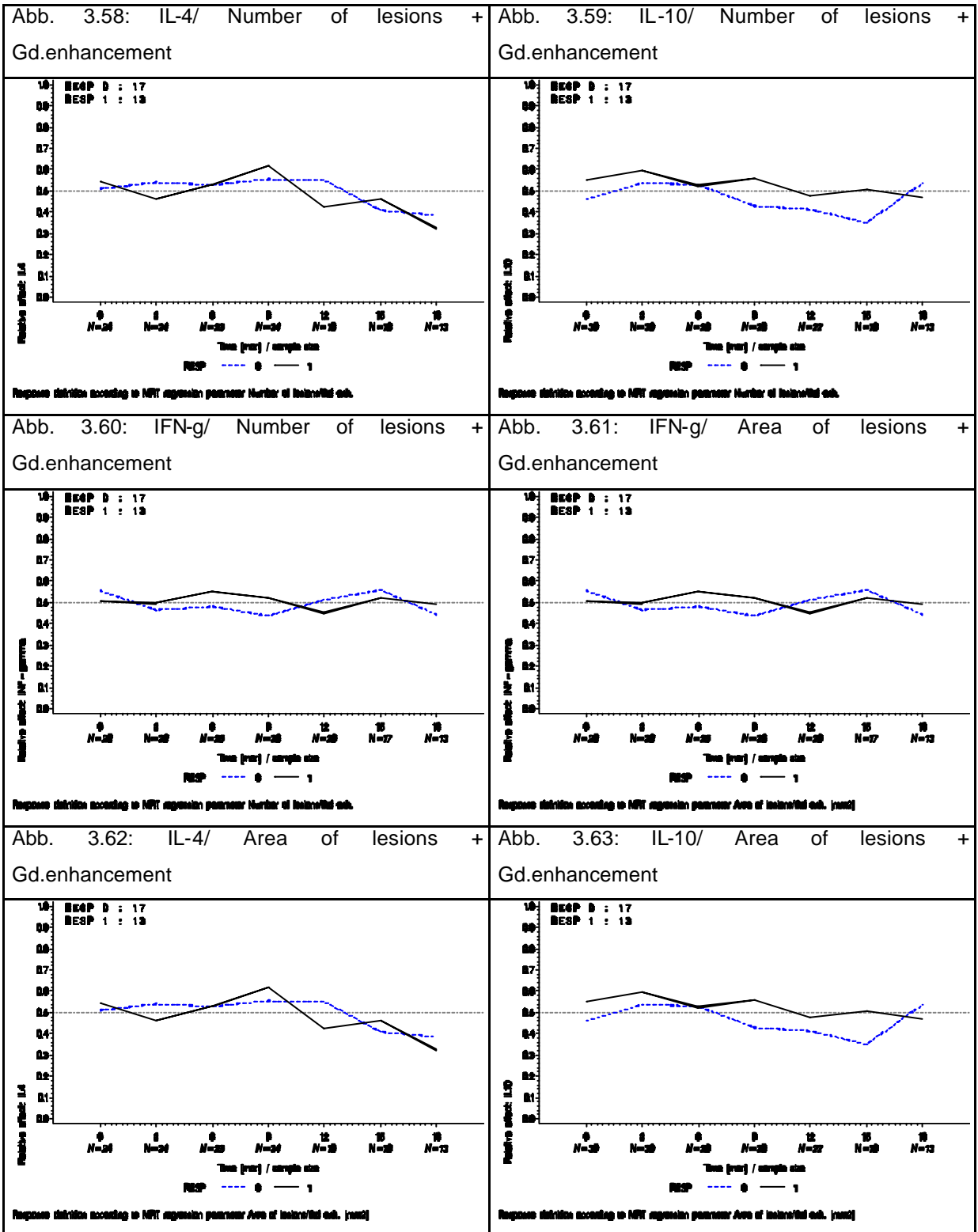


Abb. 3.64: sICAM-1/ Number of lesions + edema

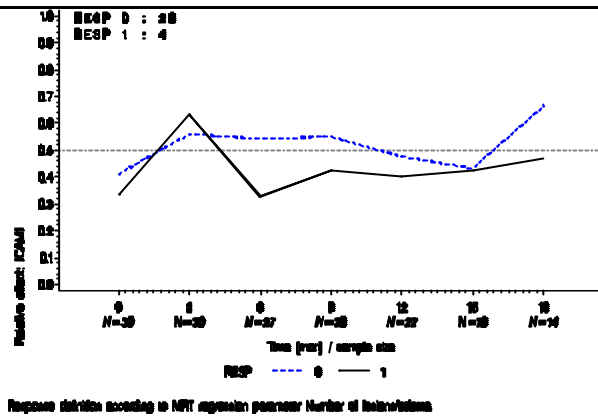


Abb. 3.65: sICAM-3/ Number of lesions + edema

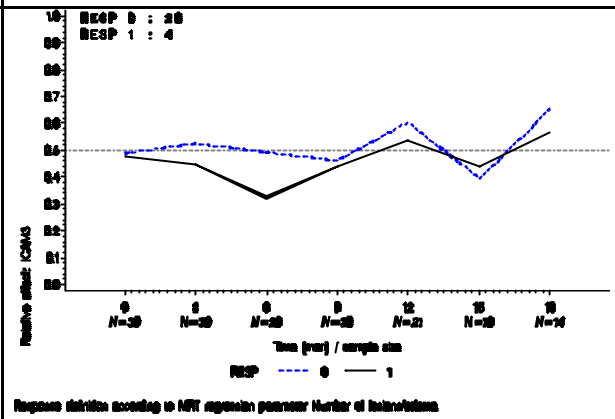


Abb. 3.66: sVCAM-1/ Number of lesions + edema

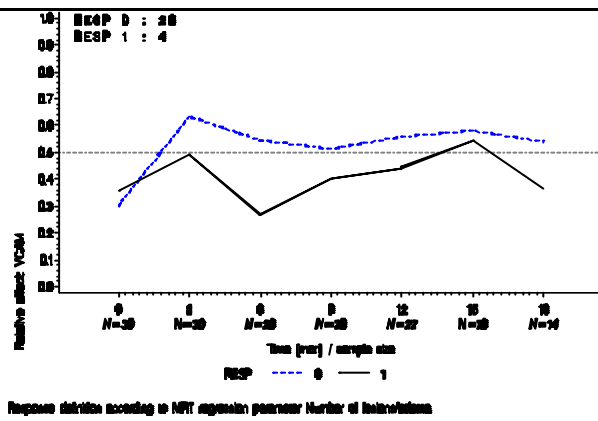


Abb. 3.67: TNF-beta/ Number of lesions + edema

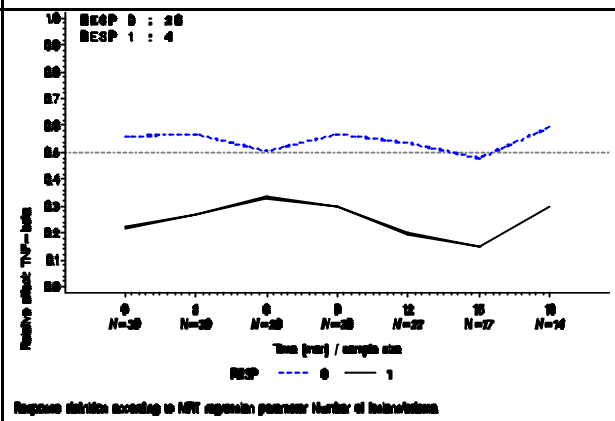


Abb. 3.68: TNF-RI/ Number of lesions + edema

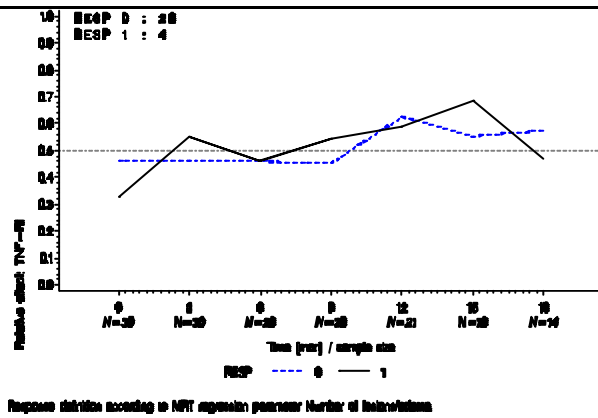
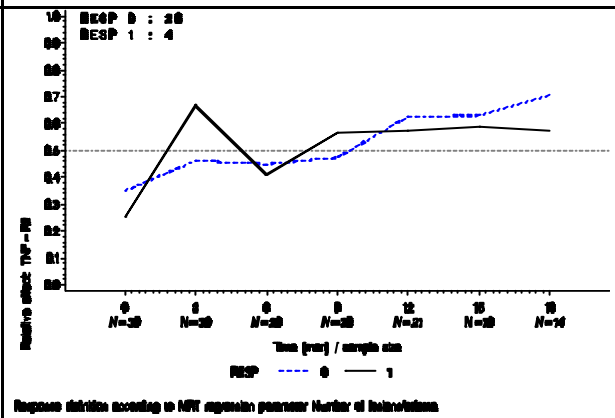


Abb. 3.69: TNF-RII/ Number of lesions + edema



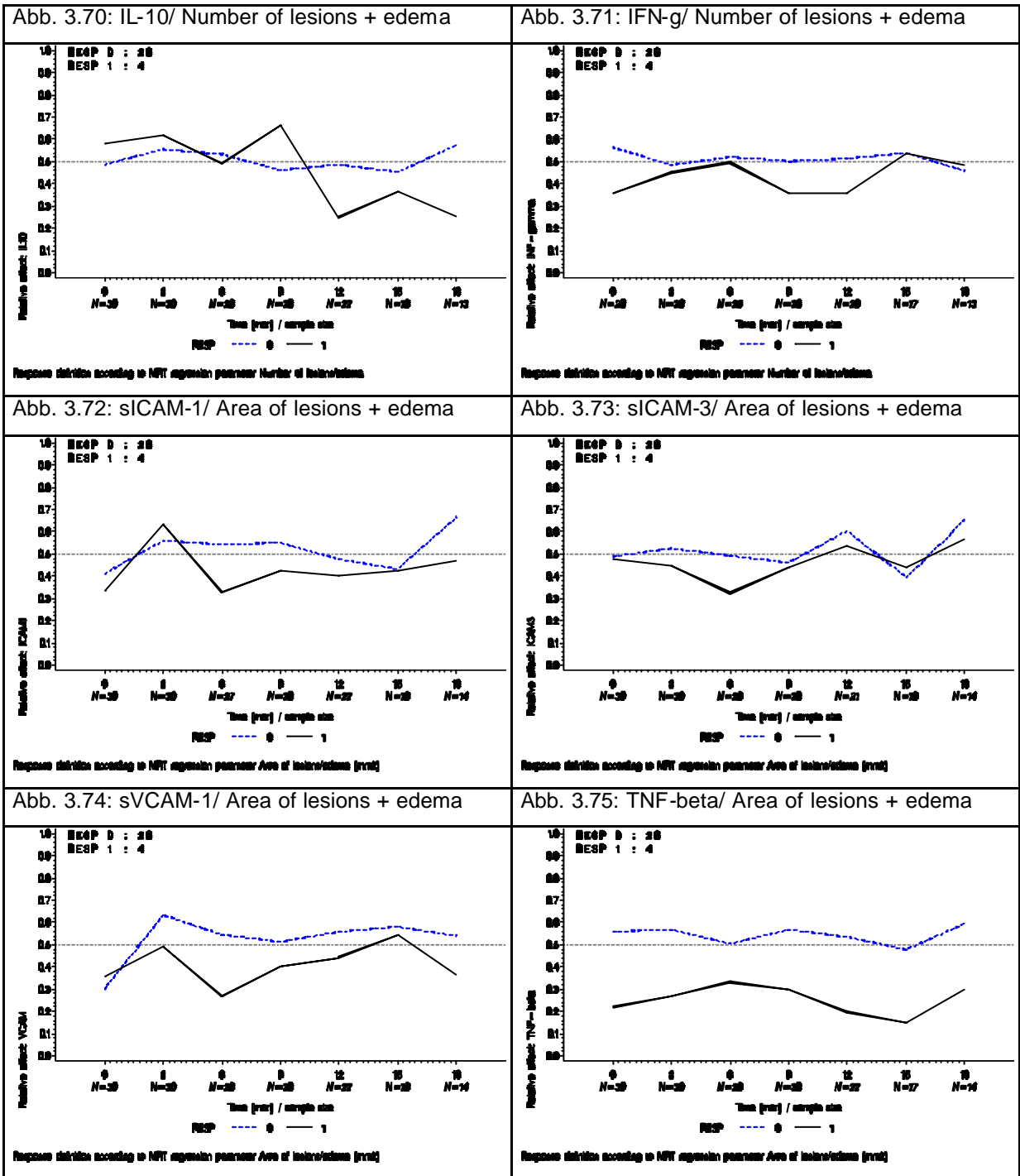


Abb. 3.76: TNF-RI/ Area of lesions + edema

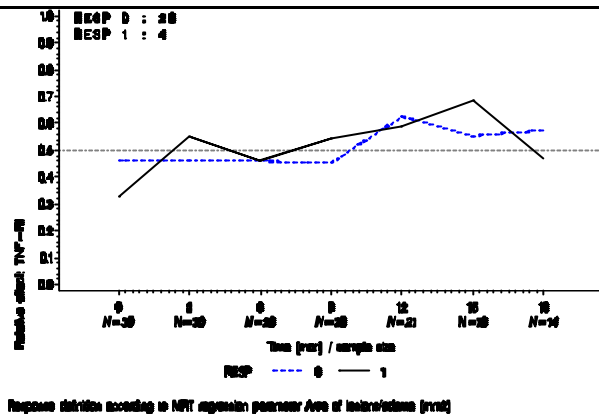


Abb. 3.77: TNF-RII/ Area of lesions + edema

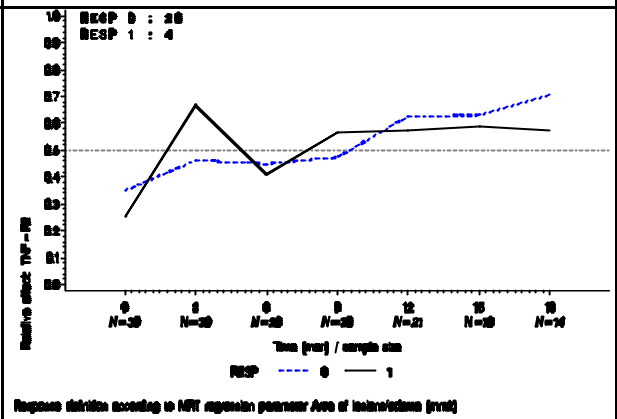


Abb. 3.78: IL-4/ Area of lesions + edema

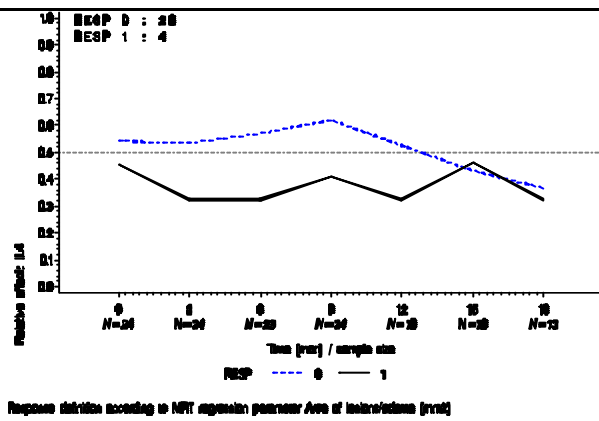


Abb. 3.79: IL-10/ Area of lesions + edema

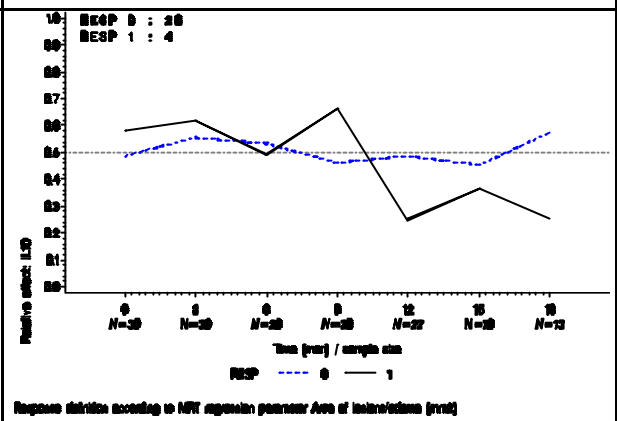


Abb. 3.80: IFN-g/ Area of lesions + edema

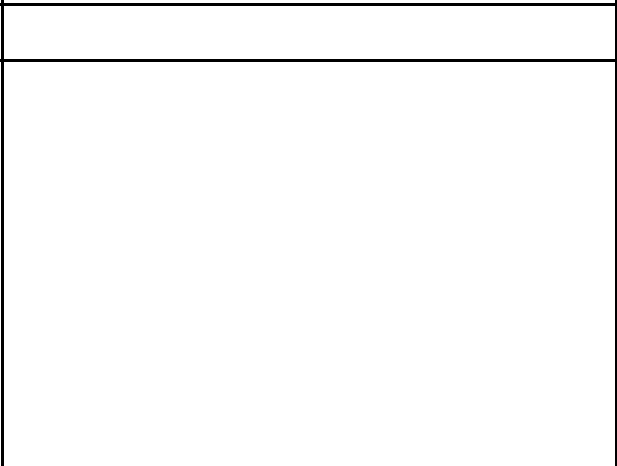
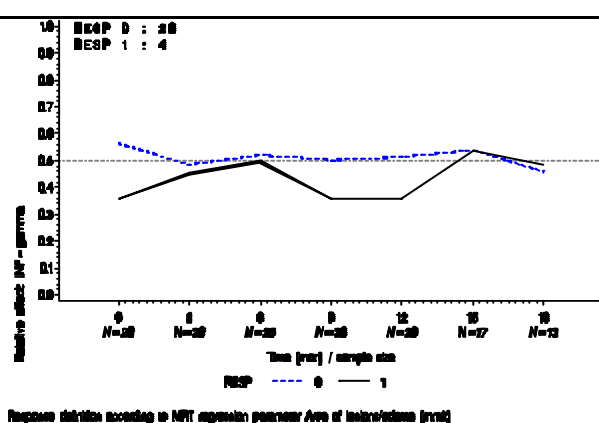


Abb. 3.81: sICAM-1/ Number of lesions + Gd.enhancement + edema

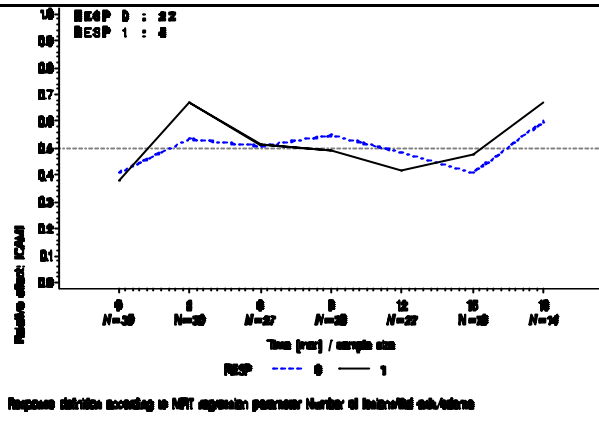


Abb. 3.82: sICAM-3/ Number of lesions + Gd.enhancement + edema

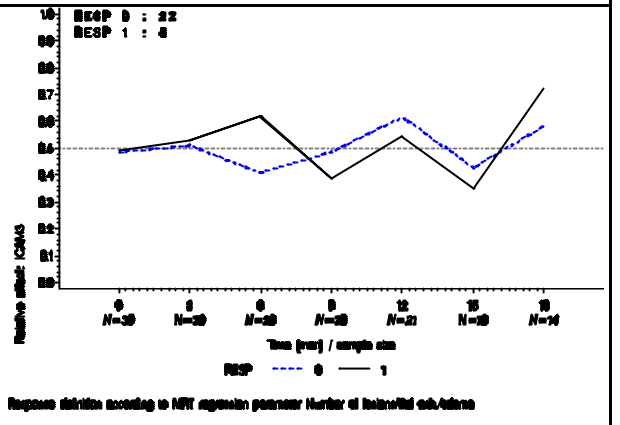


Abb. 3.83: sVCAM-1/ Number of lesions + Gd.enhancement + edema

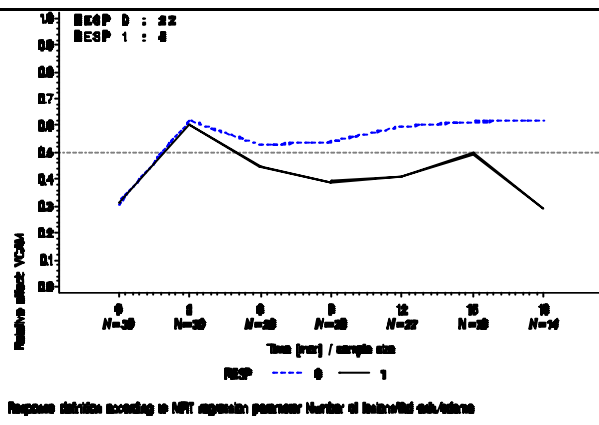


Abb. 3.84: TNF-beta/ Number of lesions + Gd.enhancement + edema

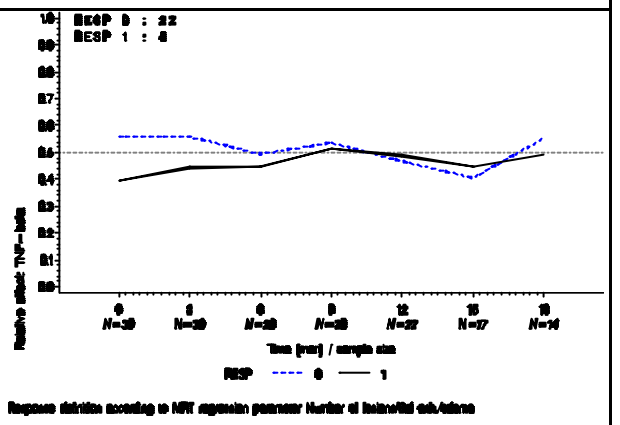


Abb. 3.85: TNF-RI/ Number of lesions + Gd.enhancement + edema

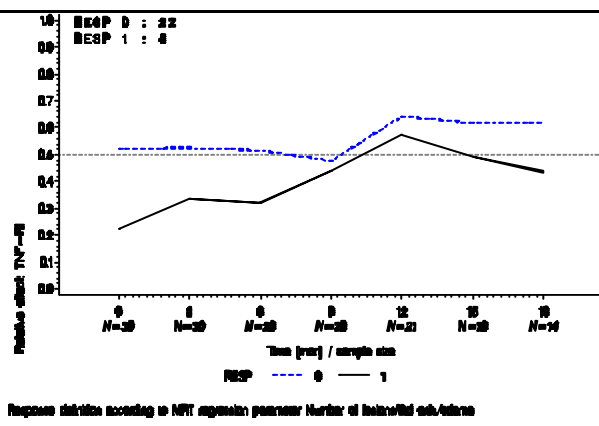
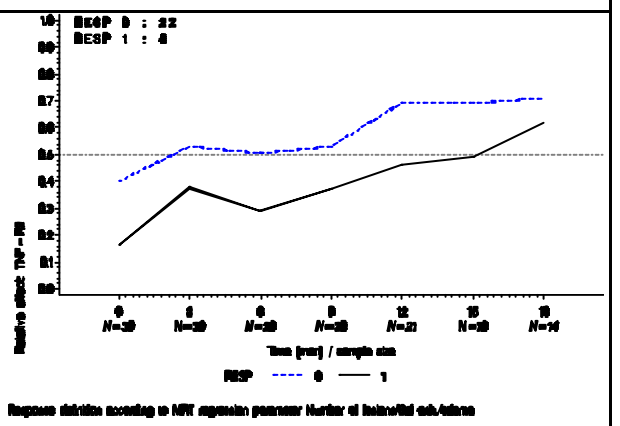


Abb. 3.86: TNF-RII/ Number of lesions + Gd.enhancement + edema



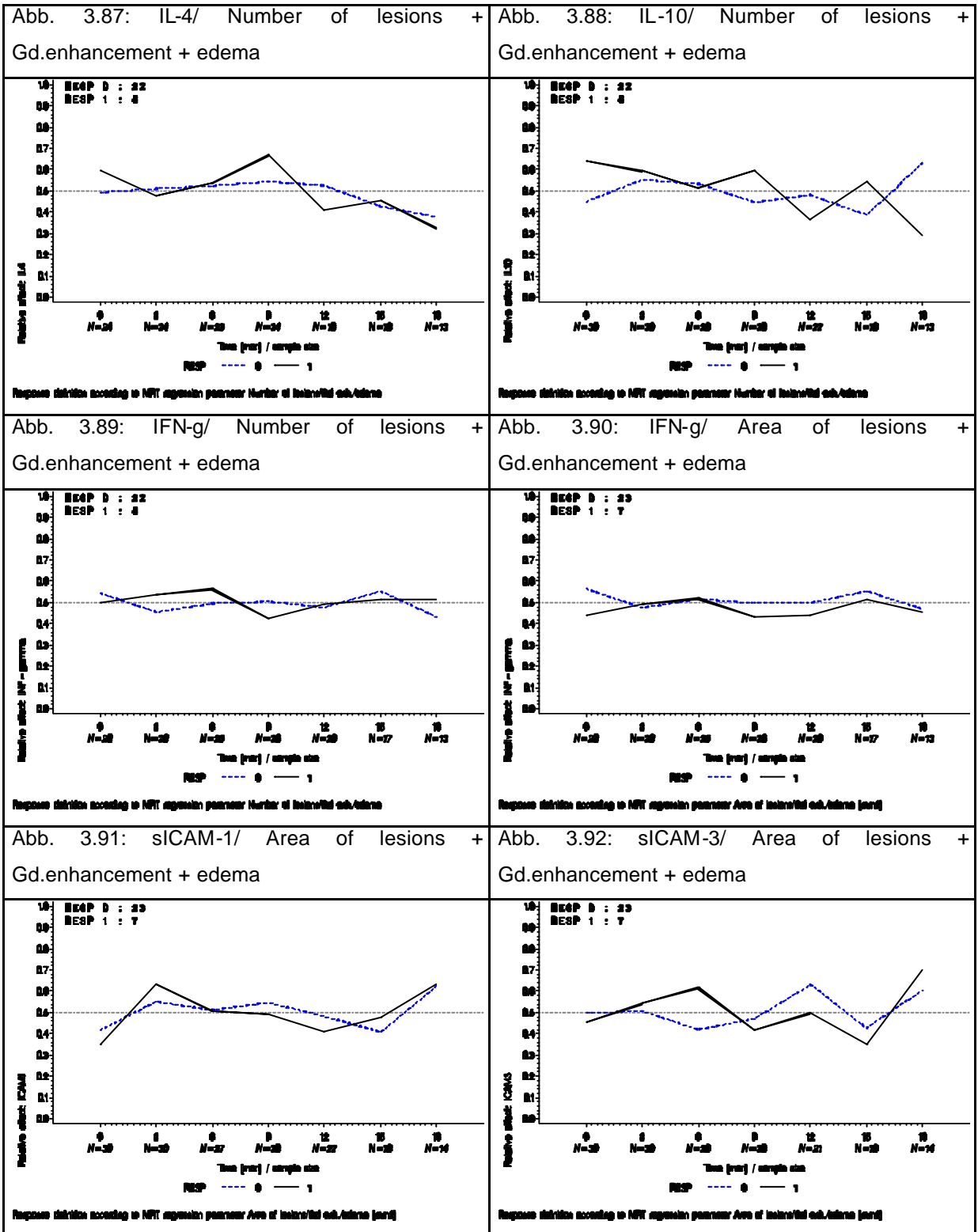


Abb. 3.93: sVCAM-1/ Area of lesions + Gd.enhancement + edema

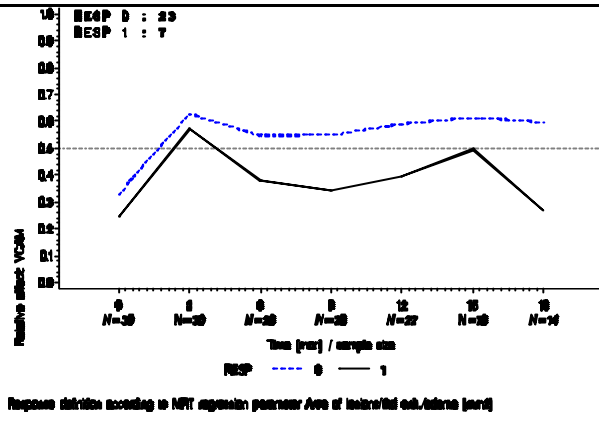


Abb. 3.94: TNF-beta/ Area of lesions + Gd.enhancement + edema

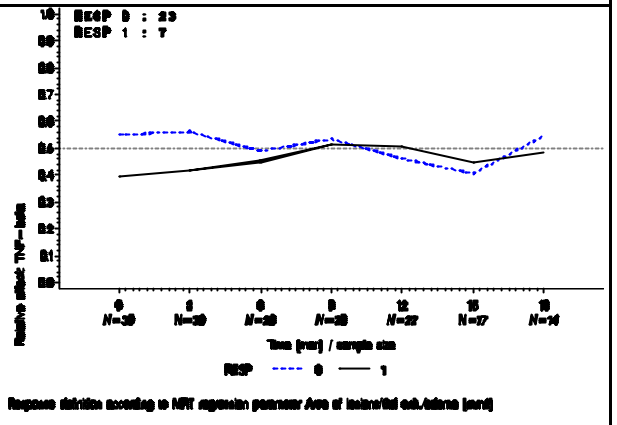


Abb. 3.95: TNF-R1/ Area of lesions + Gd.enhancement + edema

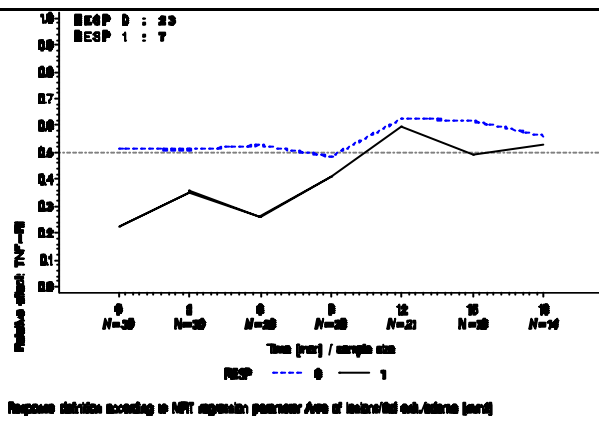


Abb. 3.96: TNF-R2/ Area of lesions + Gd.enhancement + edema

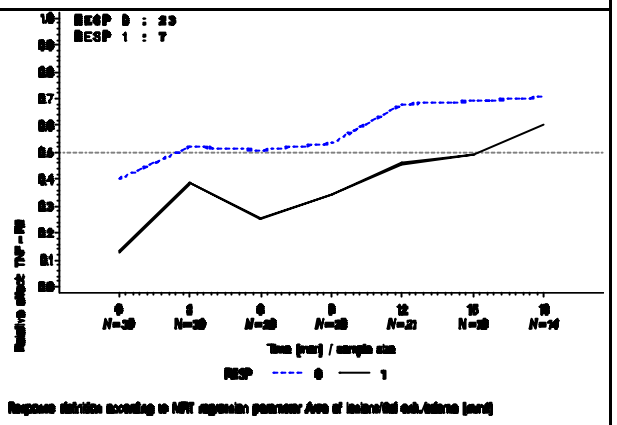


Abb. 3.97: IL-4/ Area of lesions + Gd.enhancement + edema

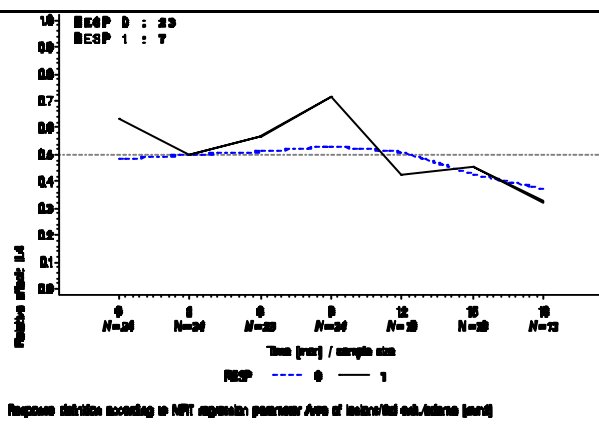
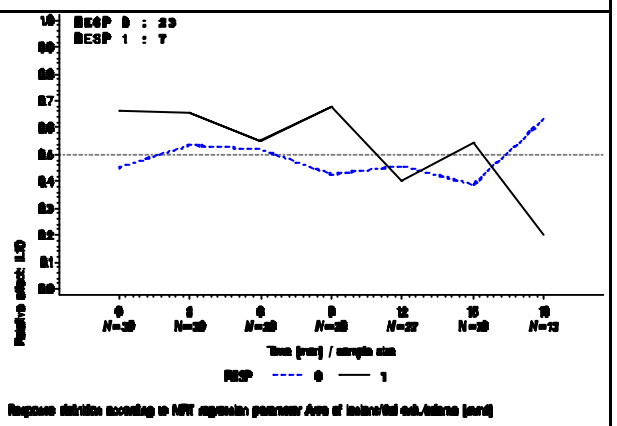


Abb. 3.98: IL-10/ Area of lesions + Gd.enhancement + edema



7.3 Protokolle

7.3.1 Protokoll zur Durchführung des sICAM-1 und des sICAM-3 ELISA

1. Herstellung der Wasch-Lösung: 10 ml des konzentrierten Puffers mit 2 Liter Aqua bidest. auffüllen.
2. Die Standard-Puffer-Lösung wurde durch 10fache Verdünnung des konzentrierten Standardpuffers mit Aqua bidest. hergestellt.
3. Standard und Kontrollen wurden durch Auflösen mit 1 bzw. 0,3 ml Aqua bidest. hergestellt.
4. Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe: Die Standardproben (sICAM-1: $c = 8$ ng/ml, sICAM-3: $c = 20$ ng/ml) wurden jeweils 1:2 verdünnt bis zu einer Konzentration von 0,25 ng/ml (sICAM-1) bzw. 0,62 ng/ml (sICAM-3). Als Nullwert ("Blank") diente die Standardpuffer-Lösung.
5. Die zu messenden Serumproben wurden 1:50 (sICAM-3) und 1:100 (sICAM-1) mit Standardpuffer-Lösung verdünnt. Die Kontrollen wurden entsprechen der Herstellerangaben verdünnt.
6. Es wurden 100 μ l Standardpuffer-Lösung in jedes Well pipettiert.
7. Herstellung der Antikörper-Lösung durch Verdünnung von 240 μ l der biotinylierten Antikörper-Lösung mit 6360 μ l spezifischer Verdünnungslösung.
8. Die Proben, Standards und Kontrollen wurden in Doppelbestimmungen zu je 100 μ l in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert und mit je 50 μ l Antikörper-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert (sICAM-1: 3 Stunden; sICAM-3: 18 Stunden).
9. Dreimaliges Waschen der Proben.
10. Präparation der Enzym-Lösung durch Auflösen von 150 μ l der Streptavidin-HRP-Lösung in 10 ml spezifischer Verdünnungslösung.
11. Es wurden jeweils 100 μ l Enzym-Lösung pro Well pipettiert, erneut für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut 3 mal gewaschen.
12. Pipettieren von 100 μ l TMB-Farbsubstrat-Lösung und 20 Minuten Inkubation unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur.
13. Stoppen der Farbreaktion durch pipettieren von 100 μ l 1,8 N H_2SO_4 in jedes Well.
14. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450 und 620 nm.

7.3.2 Protokoll zur Durchführung des sVCAM-1 ELISA

1. Herstellung der Wasch-Lösung: Verdünnung von 20 ml der konzentrierten Lösung mit 480 ml Aqua bidest..
2. Präparation des sVCAM-1 Konjugat-Konzentrats: Mischen von 250 µl der konzentrierten Antikörper-Lösung mit 11 ml der spezifischen Verdünnungs-Lösung.
3. Pipettieren von 100 µl sVCAM-1 Konjugat-Lösung in jedes Well.
4. Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe: Direkt vor Gebrauch Verdünnung der sVCAM-1 Standards (gebrauchsfertige Konzentrationen von $c=75,78$ ng/ml bis $c=0$ ng/ml) mit je 800 µl Aqua bidest..
5. Verdünnung der sVCAM1-Kontrolle mit 500 µl Aqua bidest. und weitere 50fache Verdünnung der Kontrollen und der Serumproben mit der Probenverdünnungs-Lösung.
6. Pipettieren von je 100 µl Standard, Kontrolle und Proben in Doppelbestimmung in jedes Well und Inkubation bei Raumtemperatur für 1Stunde und 30 Minuten.
7. Automatisiertes Waschen der Mikrotiterplatte mit 300 µl pro Well verdünnter Wasch-Lösung. Sechsmalige Wiederholung des Waschvorganges. Nach dem letzten Waschvorgang vorsichtiges Abschlagen noch verbleibender Flüssigkeit von der Mikrotiterplatte.
8. Sofortiges Hinzufügen von 100 µl der gebrauchsfertigen Substrat-Lösung in jedes Well und Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur für 20 Minuten.
9. Pipettieren von 100 µl der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung (Säure) in jedes Well.
10. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450 und 620 nm.

7.3.3 Protokoll zur Durchführung des IL-10 ultra-sensitive und des IL-4 ultra-sensitive ELISA

1. Herstellung der Wasch-Lösung: 25fache Verdünnung der konzentrierten Wasch-Lösung mit Aqua bidest..
2. Verdünnung des konzentrierten Standards mit der spezifischen Standard-Verdünnungs-Lösung nach den Anweisungen auf den jeweiligen Labeln (IL-10: $c = 5000$ pg/ml; IL-4: $c = 2500$ pg/ml). In mehreren Schritten weitere 100fache Verdünnung bis zu einer Konzentration von 50 pg/ ml (IL-10) bzw. 25 pg/ml (IL-4).
3. Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe: Die Standardproben wurden jeweils 1:2 verdünnt bis zu einer Konzentration von 0,39 pg/ml. Als Nullwert diente die Standardpuffer-Lösung.
4. Wells, die für den "Blank-Wert" vorgesehen sind, bleiben leer.
5. Pipettieren von je 100 μ l Standard und Proben in Doppelbestimmung in jedes Well und Inkubation (IL-10: im Inkubator für 3 Stunden; IL-4: bei Raumtemperatur für 1 Stunde und 30 Minuten).
6. Automatisiertes Waschen der Mikrotiterplatte mit 400 μ l pro Well der Wasch-Lösung. Sechsmalige Wiederholung des Waschvorganges. Nach dem letzten Waschvorgang vorsichtiges Abschlagen noch verbleibender Flüssigkeit von der Mikrotiterplatte.
7. Hinzufügen von 100 μ l der Antikörper-Lösung in jedes Well und erneute Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur für 1 Stunde.
8. Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorganges.
9. Herstellung der Enzymlösung: Verdünnung der 100fach konzentrierten Lösung (Streptavidin-HRP) mit der spezifischen Verdünnungs-Lösung nach Angaben des Herstellers.
10. Pipettieren von 100 μ l der verdünnten Enzym-Lösung in jedes Well und Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur (IL-10: 1 Stunde; IL-4: 30 Minuten).
11. Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorganges
12. Hinzufügen von 100 μ l der Farbsubstrat-Lösung in alle Wells und erneute Inkubation der abgedeckten Platte unter Lichtausschluß und bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
13. Pipettieren von 100 μ l der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung (Säure) in alle Wells.
14. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450 und 620 nm. Als Referenzwert dient der "Blank-Wert", der sich aus der Farbsubstrat-Lösung und der Stopp-Lösung zusammensetzt.

7.3.4 Protokoll zur Durchführung des IFN-gamma ELISA

1. Herstellung der Wasch-Lösung: 25fache Verdünnung des Konzentrats mit Aqua bidest. auf 2,5 Liter.
2. Verdünnung des konzentrierten Standards mit der spezifischen Standard-Verdünnungs-Lösung nach den Anweisungen auf dem Labeln ($c = 5000 \text{ pg/ml}$). In mehreren Schritten weitere 50fache Verdünnung bis zu einer Konzentration von 1000 pg/ml .
3. Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe: Die Standardproben wurden jeweils 1:2 verdünnt bis zu einer Konzentration von $8,0 \text{ pg/ml}$. Als Nullwert dient die Standard-Verdünnungs-Lösung.
4. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ Standard-Verdünnungs-Lösung in Doppelbestimmung als Nullwert.
5. Wells, die für den "Blank-Wert" vorgesehen sind, bleiben leer.
6. Pipettieren von je $50 \mu\text{l}$ Standard und Proben in Doppelbestimmung in jedes Well.
7. Hinzufügen von $50 \mu\text{l}$ der biotinylierten Antikörper-Lösung in jedes Well.
8. Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur für 1 Stunde und 30 Minuten.
9. Automatisiertes Waschen der Mikrotitrierplatte mit $400 \mu\text{l}$ pro Well verdünnter Wasch-Lösung. Viermalige Wiederholung des Waschvorganges. Nach dem letzten Waschvorgang vorsichtiges Abschlagen noch verbleibender Flüssigkeit von der Mikrotitrierplatte.
10. Herstellung der Enzym-Lösung (Streptavidin-HRP): 100fache Verdünnung der konzentrierten Lösung entsprechend der Herstellerempfehlung mit der spezifischen Verdünnungs-Lösung.
11. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ der Enzym-Lösung in jedes Well und Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur für 45 Minuten.
12. Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorganges.
13. Hinzufügen von $100 \mu\text{l}$ der Farbsubstrat-Lösung (TMB-Lösung) in alle Wells (einschließlich des "Blank-Wells") und Inkubation der abgedeckten Platte unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
14. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung (Säure) in alle Wells.
15. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450 und 620 nm . Als Referenzwert dient der "Blank-Wert", der sich aus der Farbsubstrat-Lösung und der Stopp-Lösung zusammensetzt.

7.3.5 Protokoll zur Durchführung des TNF-beta ELISA

1. Herstellung der Wasch-Lösung: 20fache Verdünnung der konzentrierten Wasch-Lösung mit Aqua bidest. auf 1,0 Liter.
2. Verdünnung des konzentrierten Standards nach den Angaben des Herstellers mit der gebrauchsfertigen Standard-Verdünnungs-Lösung ($c = 1000 \text{ pg/ml}$).
3. Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe: Die Standardproben wurden jeweils 1:2 verdünnt bis zu einer Konzentration von $8,0 \text{ pg/ml}$. Als Nullwert diente die Standard-Verdünnungs-Lösung.
4. Automatisiertes Waschen der Mikrotiterplatte mit $300 \mu\text{l}$ Wasch-Lösung pro Well. Zweimalige Wiederholung des Waschvorganges. Nach dem letzten Waschvorgang vorsichtiges Abschlagen noch verbleibender Flüssigkeit von der Mikrotiterplatte.
5. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ Standard-Verdünnungs-Lösung in Doppelbestimmung.
6. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ Standard und Proben in Doppelbestimmung in jedes Well.
7. Präparation der "Assay-Buffer"-Lösung durch Verdünnung des Konzentrats mit Aqua bidest. nach den Herstellerangaben und Erstellung der Enzym-Lösung (HRP-Streptavidin) durch 100fache Verdünnung konzentrierten Lösung mit der "Assay-Buffer"-Lösung.
8. Pipettieren von $50 \mu\text{l}$ der Enzym-Lösung in alle Wells und Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur für 4 Stunden auf einem Rotator bei 100 rpm .
9. Erneutes dreimaliges automatisiertes Waschen der Mikrotiterplatte.
10. Präparation der Farbsubstrat-Lösung (TMB-Lösung) unter Lichtausschluß: Mischen von 6 ml der Farbsubstrat-Lösung 1 mit 6 ml der Farbsubstrat-Lösung 2.
11. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ der so erstellten TMB-Lösung in jedes Well und Inkubation der abgedeckten Platte unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf einem Rotator bei 100 rpm .
12. Herstellung der Stopp-Lösung: 2 ml konzentrierte 36N Schwefelsäure werden mit 16 ml destilliertes Wasser verdünnt.
13. Pipettieren von $100 \mu\text{l}$ der $4\text{N H}_2\text{SO}_4$ -Säure in alle Wells.
14. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450 und 620 nm .

7.3.6 Protokoll zur Durchführung des sTNF-R I/ sTNF-R II ELISA

1. Herstellung der Wasch-Lösung: 10 ml der konzentrierten Wasch-Lösung mit 2,0 Liter Aqua bidest. auffüllen.
2. Herstellung der Lösung A : Verdünnung der konzentrierten Lösung in 6 ml destilliertes Wasser.
3. Verdünnung der sTNF-RI und sTNF-RII-Kontrollen mit 2 ml Aqua bidest..
4. Verdünnen der konzentrierten Standard-Lösung mit 0,5 ml Aqua bidest. und weitere 40fache Verdünnung der Standar-Lösung mit Lösung A .
5. Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe: Die Standardproben wurden jeweils 1:2 verdünnt, durch pipettieren von 0,500 µl Standard und 0,500 µl der Lösung A (sTNF-RI: c= 11,6 ng/ml; sTNF-RII: c= 12,5 ng/ml). Als Nullwert diente die Lösung A.
6. Pipettieren von 50 µl der gebrauchsfertigen Lösung B in alle Wells.
7. Pipettieren von 200 µl Standard, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmung in jedes Well.
8. Hinzugeben von 50 µl der gebrauchsfertigen sTNF-RI HRP-Enzymlösung in alle Wells und Inkubation der abgedeckten Platte bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf einem Rotator bei 300 rpm..
9. Automatisiertes Waschen der Mikrotitrierplatte mit 400 µl pro Well verdünnter Wasch-Lösung. Dreimalige Wiederholung des Waschvorganges. Nach dem letzten Waschvorgang vorsichtiges Abschlagen noch verbleibender Flüssigkeit von der Mikrotitrierplatte.
10. Hinzufügen von 200 µl der Farbsubstrat-Lösung (TMB-Lösung) in jedes Well und erneute Inkubation der abgedeckten Platte unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf einem Rotator bei 300 rpm..
11. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 650 nm und als Referenzfilter 450nm.
12. Pipettieren von 100 µl der gebrauchsfertigen Enzym (HRP)-Killer-Lösung in alle Wells und Inkubation wie oben beschrieben.
13. Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorgangs.
14. Pipettieren von 100 µl Lösung A in alle Wells und hinzugeben von 100 µl sTNF-RII-HRP-Enzymlösung in alle Wells.
15. Inkubation der abgedeckten Platte unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur für 60 Minuten auf einem Rotator bei 300 rpm..
16. Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorgangs.
17. Hinzufügen von 200 µl der TMB-Farbsubstrat-Lösung in alle Wells und Inkubation der abgedeckten Platte unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf einem Rotator bei 300 rpm..
18. Pipettieren von 100 µl der gebrauchsfertigen Stopp-Lösung in alle Wells.
19. Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450 nm und als Referenzfilter 650nm.

7.4 Herstellernachweis

ELISA-Test

- | | | |
|----|---|--|
| 1. | Combo sTNF-RI/ sTNF-RII | MEDGENIX
BioSource Europe S.A.
Zoning Industriel
B-6220 Fleurus, Belgium |
| 2. | hu IFN-gamma,
hu IL-10 us,
hu IL-4 us | CYTOSCREEN™- Immunoassay-Kit
BioSource International, Inc.
820 Flynn Road
Camarillo, California 93012 USA |
| 3. | Human sVCAM-1 | R & D Systems GmbH
Borsigstr.7
65205 Wiesbaden-Nordenstadt, Germany |
| 4. | s ICAM-1/ s ICAM-3 | Diaclone Research
1, Bd A. Fleming
BP 1985
25020 Besançon, France |
| 5. | TNF-beta | Bender Med Systems
Bender + Co GmbH,
Dr. Boehringer-Gasse 5-11
P.O. Box 73
1121 Vienna, Austria |

Geräte

1. Pipetten

- | | | |
|----|-----------------------|--|
| a. | Variopette-Eppendorf: | Eppendorf Nethler-Hinz GmbH
Im Borkhausenweg 1
22339 Hamburg |
|----|-----------------------|--|

2. Probenröhrchen

- | | | |
|----|------------------------|---|
| a. | Nunc Cyro Tube™ Vials: | Nunc™ Brand Products
Hagenauerstraße 21 a
65203 Wiesbaden-Bieberich |
|----|------------------------|---|

b. Cellstar PR-Röhrchen: Greiner Labortechnik GmbH
Maybachstraße 2
72636 Frickenhausen

3. Zentrifuge

a. Hettich Rotaxia/ RP: Hettich Zentrifugen
Gartenstraße 100
78532 Tuttlingen

4. CO₂-Inkubator

a. Cellstar Nunc Intermed: Nunc™ Brand Products
Hagenauerstraße 21 a
65203 Wiesbaden-Bieberich

5. Automatischer Wascher

Medgenix Diagnostic
Biosource GmbH
Lise- Meitner Straße 4a
40878 Ratingen

6. Mehrkanalsektrometer

a. Kinetic microplate reader: Molecular Devices
USA

7. Automatischer Shaker

a. Elisa Shaker: Medgenix Diagnostic
Biosource GmbH
Lise-Meitner Straße 4a
40878 Ratingen

Software

1. ELISA-Programme: Medgenix Diagnostic
Biosource GmbH
Lise-Meitner Straße 4a
40878 Ratingen

7.5 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	zirka
CD	Diffrenzierungscluster
CT	Computertomogramm
CV	Co-Varianz
d.h.	das heißt
EAE	Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMD	Encephalomyelitis disseminata
FAEP	Früh akustisch evozierte Potentiale
g	Gramm
GD-DTPA	Gadolinium-diethylenetriamin-penta-acetic-acid
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HRP	Horseradish Peroxidase
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IE.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IFNB	Interferon-beta
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iv.	intravenös
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo- Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel

LFA	Leukocyte Function Antigen
LT	Lymphotoxin
M	Median
m	Mittelwert
MAG	Myelin-assoziierte Glykoprotein
Max.	Maximum
MBP	basisches Myelinprotein
MEP	Motorisch evozierte Potentiale
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minimum
min.	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mmol	Milli-Mol
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
MRT	Magnetresonanztomogramm
MS	Multiple Sklerose
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
o.a.	oben angeführt
OB	Oligiklonale Banden
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pg	Pikogramm
PLP	Proteolipidprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotation pro Minute
s	Sekunde
sc.	Subkutan
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt
SSEP	Somatosensibel evozierte Potentiale
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TE	Aussendezeit im MRT
TGF- β	Transforming Growth Factor $-\beta$
Th	T-Helferzelle

TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor Receptor
TR	Relaxationszeit im MRT
u.a.	unter anderem
us	ultra-sensitiv
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEP	Visuell evozierte Potentiale
VLA	Very Late Antigen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Lebenslauf**Lebenslauf**

<u>Persönliche Daten:</u>	Name:	Jasmin Tofighi
	Geburtsdatum:	13.05.1972
	Geburtsort:	Wuppertal
	Familienstand:	ledig
	Konfession:	evangelisch
	Staatsangehörigkeit:	deutsch
<u>Bildungsweg:</u>	1978- 1982	Grundschule Hagen-Halden
	1982- 1991	Ricadrda-Huch-Gymnasium Hagen, Schulabschluß der Allgemeinen Hochschulreife
	1991- 1992	Freiwilliges Soziales Jahr beim Paritätischen Wohlfahrtsverband e.V., Hagen
	1992- 1993	Pfelgepraktikum im St. Johannes Hospital, Hagen
	1993- 2000	Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen
	Prüfungen:	
	1995	Ärztliche Vorprüfung
	1996	1. Staatsexamen
	1998	2. Staatsexamen
	2000	3. Staatsexamen
<u>Berufliche Tätigkeit:</u>	1998-2000	Studentische Hilfskraft, Neurologische Klinik der Justus- Liebig-Universität, Gießen, Arbeitsgruppe: Multiple Sklerose

11/2000-4/2002	Ärztin im Praktikum, Neurologischen Klinik der Justus- Liebig Universität, Gießen
5/2002-1/2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Abteilung für Neuroradiologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen
2/2003	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Abteilung für diagnostische Radiologie der Justus-Liebig- Universität, Gießen

Beteiligung an wissenschaftlichen Arbeiten**Vorträge:**

P. Oschmann, R. Bauer, J. Tofighi, B. Engelhardt, C. Schiel, J. Kraus, C. Hornig, A. Kern, H. Traupe, W. Dorndorf

Immunmonitoring bei Interferon-beta 1b-therapierten Patienten - FACS-Analysen ICAM-1 und -3-positiver Zellen.

4. Liquor-Symposium der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Leipzig, 28.-29. November 1997.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

CD45RA+ ICAM-3+ lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood as diagnostic and activity markers in Multiple Sclerosis.

Ninth Meeting of the European Neurological Society, Mailand (Italien), 5.-9. Juni 1999.

B.S. Kühne, P. Oschmann, E. Sindern, J. Tofighi, L.M. Ossege, J. Kraus, C. Laske, B. Engelhardt, W. Dorndorf

Immunmonitoring of patients with RR MS under therapy with interferon-beta 1b (IFN β -1b): Influence of IFN β -1b on soluble, bioactive forms of VCAM-1, ICAM-1 and ICAM-3 – preliminary results.

Ninth Meeting of the European Neurological Society, Mailand (Italien), 5.-9. Juni 1999.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

Coincidence of CD45RA+ ICAM-3+ lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood in patients with multiple sclerosis.

Fourth Congress of the European Federation of Neurological Societies, Lissabon (Portugal), 7.- 11. September 1999.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

Einfluß einer hochdosierten Methylprednisolontherapie auf zellgebundene und lösliche Adhäsionsmoleküle bei MS-Patienten.

6. Liquor-Symposium der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie, Magdeburg, 29.-30. September 1999.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, B.S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, R. Bauer, H. Diehl, C. Laske, E. Stolz, C. Schäfer, H. Traupe, M. Kaps

Correlation of adhesion molecules in blood with disease burden in multiple sclerosis assessed by cranial MRI imaging.

Submitted for Tenth Meeting of the European Neurological Society, Jerusalem (Israel), 18.-22.6. 2000.

Poster:

P. Oschmann, R. Bauer, J. Tofighi, B. Engelhardt, C. Schiel, J. Kraus, C. Hornig, A. Kern, H. Traupe, W. Dorndorf

Immunmonitoring bei Interferon-beta 1b therapierten Patienten - FACS-Analysen ICAM-1 und -3-positiver Zellen.

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Dresden, 2.-4. Oktober 1997.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

Influence of high-dose methylprednisolone treatment on the expression of adhesion molecules in Multiple Sclerosis.

Ninth Meeting of the European Neurological Society, Mailand (Italien), 5.-9. Juni 1999.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis: influence on the expression of cellular and soluble ICAM-1 and -3.

Fourth Congress of the European Federation of Neurological Societies, Lissabon (Portugal), 7.-11. September 1999.

B.S. Kühne, P. Oschmann, E. Sindern, J. Tofighi, L.M. Ossege, J. Kraus, C. Laske, B. Engelhardt, W. Dorndorf

Immunmonitoring of patients with RR MS under therapy with interferon-beta 1b (IFN β -1b): Influence of IFN β -1b on soluble, bioactive forms of VCAM-1, ICAM-1 and ICAM-3 – preliminary results.

Fourth Congress of the European Federation of Neurological Societies, Lissabon (Portugal), 7.-11. September 1999.

C. Laske, P. Oschmann, J. Tofighi, B.S. Kühne, H. Diehl, J. Kraus, N. Chatzimanolis, R. Bauer, B. Engelhardt, A. Kern, H. Traupe, W. Dorndorf

Immunomodulatory effects of interferon-beta 1b in vivo: induction of soluble tumor necrosis factor-receptor 1 (sTNF-R1) and sTNF-R2.

ausgezeichnet mit dem Posterpreis anlässlich 72. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Magdeburg, 30. September – 3. Oktober 1999.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, B.S. Kuehne, N. Chatzimanolis, R. Bauer, J. Tofighi, H. Diehl, C. Laske, E. Stolz, C. Schaefer, H. Traupe, M. Kaps

CSF levels of soluble ICAM-1 correlate with disease activity of multiple Sclerosis assessed by cranial MRI imaging.

Tenth Meeting of the European Neurological Society, Jerusalem (Israel), 18.-22.6. 2000.

J. Kraus, P. Oschmann, B.S. Kühne, H. Diehl, R. Bauer, N. Chatzimanolis, J. Tofighi, C. Laske, E. Stolz, B. Engelhardt, C. Schäfer, H. Traupe, M. Kaps

Are cytokine levels in serum useful parameters to determine disease progression or activity in MS patients?

Tenth Meeting of the European Neurological Society, Jerusalem (Israel), 18.-22.6. 2000.

N. Chatzimanolis, R. Bauer, B. Engelhardt, J. Kraus, B.S. Kühne, J. Tofighi, M. Kaps, P. Oschmann

Long Term Effects of Interferon-beta 1b-Therapy on c-ICAM-1 and -3.

Tenth Meeting of the European Neurological Society, Jerusalem (Israel), 18.-22.6. 2000.

Tofighi J., Kühne B.S., Kraus J., Laske C., Chatzimanolis N., Krasenbrink I., Traupe H., Brengener T., Kaps M., Oschmann P.

Long-term observation of adhesion molecules and cytokines in the serum of MS-patients treated by Interferon-beta 1b: preliminary results.

Seventeenth Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Dublin (Ireland), 11.-15.9.2001.

Publizierte Abstracts:

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

CD45RA+ ICAM-3+ lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood as diagnostic and activity markers in Multiple Sclerosis

Journal of Neurology 1999: 246 (suppl 1): 14.

B.S. Kühne, P. Oschmann, E. Sindern, J. Tofighi, L.M. Ossege, J. Kraus, C. Laske, B. Engelhardt, W. Dorndorf

Immunmonitoring of patients with RR MS under therapy with interferon-beta 1b (IFN β -1b): Influence of IFN β -1b on soluble, bioactive forms of VCAM-1, ICAM-1 and ICAM-3 – preliminary results.

Journal of Neurology 1999: 246 (suppl 1): 16.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

Influence of high-dose methylprednisolone treatment on the expression of adhesion molecules in Multiple Sclerosis

Journal of Neurology 1999: 246 (suppl 1): 55.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

High-dose methylprednisolone therapy in Multiple Sclerosis: influence on the expression of cellular and soluble ICAM-1 and -3

European Journal of Neurology 1999: 6 (suppl 3): 24.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

Coincidence of CD45RA+ ICAM-3+ lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood in patients with Multiple Sclerosis

European Journal of Neurology 1999: 6 (suppl 3): 80.

B.S. Kühne, P. Oschmann, E. Sindern, J. Tofighi, L.M. Ossege, J. Kraus, C. Laske, B. Engelhardt, W. Dorndorf

Immunmonitoring of patients with RR MS under therapy with interferon-beta 1b (IFN β -1b): Influence of IFN β -1b on soluble, bioactive forms of VCAM-1, ICAM-1 and ICAM-3 – preliminary results.

European Journal of Neurology 1999: 6 (suppl 3): 108.

J. Kraus, P. Oschmann, B. Engelhardt, S. Kühne, J. Tofighi, N. Chatzimanolis, C. Laske, A. Kern, W. Dorndorf

Einfluß einer hochdosierten Methylprednisolontherapie auf zellgebundene und lösliche Adhäsionsmoleküle bei MS-Patienten

Aktuelle Neurologie 1999: 26 (suppl): 3.

C. Laske, P. Oschmann, J. Tofighi, B.S. Kühne, H. Diehl, J. Kraus, N. Chatzimanolis, R. Bauer, B. Engelhardt, A. Kern, H. Traupe, W. Dorndorf

Immunomodulatory effects of interferon-beta 1b in vivo: induction of soluble tumor necrosis factor-receptor 1 (sTNF-R1) and sTNF-R2

Aktuelle Neurologie 1999: 26 (suppl): 126.

Veröffentlichungen:

Laske C., Oschmann P., Tofighi J., Kühne B.S., Diehl H., Bregenzer T., Kraus J., Chatzimanolis N., Bauer R., Kern A., H. Traupe, Kaps M.

Induction of sTNF-R1 and sTNF-R2 by interferon-beta 1b in correlation with clinical and MRI activity.

Acta Neurol Scand. 2001, 103 (2): 105-13.

Kraus J., Engelhardt B., Chatzimanolis N., Bauer R., Tofighi J., Kühne B.S., Laske C., Stolz E., Frielinghaus P., Schäfer C., Blaes F., Traupe H., Kaps M., Oschmann P.

Cell surface bound and soluble adhesion molecules in CSF and blood in multiple sclerosis: correlation with MRI-measures of subclinical disease severity and activity.

Journal of Neuroimmunology 2002 ;122: 175 -85.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. P. Oschmann für die kompetente und unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich danke ihm für die anregenden Diskussionen und hilfreichen Vorschläge während dieser Zeit.

Der Firma Schering AG Deutschland, insbesondere Frau Dr. G. Schröder, danke ich für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Durchführung und Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Für die statistische Aufarbeitung und Auswertung der Ergebnisse bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. T. Bregenzler der Firma Parexcel/ Berlin.

Ich bedanke mich bei Herrn Fischer und Herrn Diehl für die Unterstützung bei der Auswertung der MRT-Bilder, sowie bei meinen Kollegen der Abteilung für Neuroradiologie für die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein herzlichster Dank gilt dem Team vom Liquorlabor der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität Giessen: Cornelia Roth, Helga Weiser-Fichtner, Marita Hölz, Edith Löffler und Ingeborg Berg. Die freundliche Aufnahme, die hilfreiche Anleitung und tatkräftige praktische Unterstützung haben dazu beigetragen, daß ich immer sehr wohl gefühlt habe.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich zudem an alle richten, die mir durch Korrektur oder sonstige Hilfestellungen, wertvolle Tips bei der Niederschrift dieser Arbeit gaben: Dipl. Ing. Rolf Dudeck, Dr. Jörg Kraus und Dr. Claudia Schäfer.

Mein aufrichtiger und herzlichster Dank gilt zudem meiner Familie.