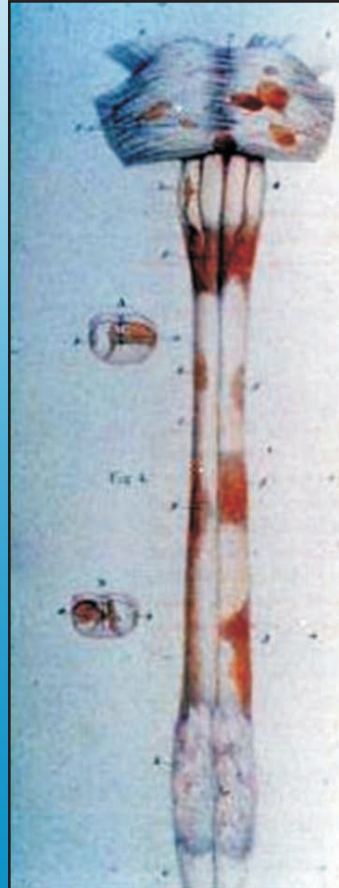


EFFEKTE EINER EINMAL WÖCHENTLICHEN GABE VON INTERFERON BETA-1A (AVONEX®) AUF DIE SERUMSPIEGEL VON ZYTOKINEN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN GEMESSEN MIT ELISA

SABINE MANNES-KEIL

INAUGURALDISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

EFFEKTE EINER EINMAL WÖCHENTLICHEN GABE VON INTERFERON BETA-1A (AVONEX®) AUF DIE SERUMSPIEGEL VON ZYTOKINEN UND ADHÄSIONSMOLEKÜLEN GEMESSEN MIT ELISA

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

**Sabine Rosalia Emma Mannes-Keil,
geb. Mannes**

aus Landsberg am Lech

Gießen, 2009

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

Gutachter: Prof. Dr. med. P. Oschmann

Gutachter: Prof. Dr. med. T. Acker

Tag der Disputation: 26.03.2009

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1.EINLEITUNG	4
1.1 MULTIPLE SKLEROSE	4
1.2 GRUNDLAGEN DER GEMESSENEN PARAMETER.....	21
1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
2 MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1 PATIENTENKOLLEKTIV UND STUDIENDESIGN.....	29
2.2 KLINISCHE PARAMETER	30
2.3 PROBENMATERIAL.....	34
2.4. TESTPRINZIP ELISA.....	34
2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	36
3. ERGEBNISSE.....	37
3.1 DEMOGRAPHISCHE DATEN.....	37
3.2 DISPOSITION DER PATIENTEN	37
3.3 KLINISCHER VERLAUF UNTER THERAPIE MIT INTERFERON BETA-1A (AVONEX®).....	38
3.4 VERTEILUNG IMMUNOLOGISCHER PARAMETER UNTER DER THERAPIE MIT INTERFERON BETA-1A (AVONEX®)	41
3.5 INDIVIDUELLE LINEARE TRENDS IMMUNOLOGISCHER PARAMETER, STRATIFIZIERT NACH NEBENWIRKUNGEN	47
3.6 STRATIFIKATION STATISTISCHER KENNZAHLEN DER IMMUNOLOGISCHEN PARAMETER NACH DEM THERAPIEERFOLG.....	47
3.7 SCHICHTUNG STATISTISCHER KENNZAHLEN DER IMMUNOLOGISCHEN PARAMETER NACH NEBENWIRKUNGEN	48
3.8 STRATIFIKATION STATISTISCHER KENNZAHLEN DER IMMUNOLOGISCHEN PARAMETER NACH DEM AUFTRETEN VON SCHÜBEN	49

3.9 INDIVIDUELLE VARIATION DER IMMUNOLOGISCHEN PARAMETER VOR <-> WÄHREND <-> NACH EINEM SCHUBEREIGNIS	50
3.10 AUSWERTUNG DER SERIELL ANGEFERTIGTEN MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIEN	54
3.11 ANALYTISCHE ASPEKTE DER MRT-BEFUNDE	55
3.11.1 MRT-DATEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES THERAPIEERFOLGES.....	55
3.11.2 MRT- DATEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER SCHUBRATE UNTER THERAPIE MIT AVONEX®	56
3.11.3 MRT-DATEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VON NEBENWIRKUNGEN UNTER THERAPIE MIT AVONEX®	56
3.12 KORRELATION DER MRT-DATEN MIT DEM IMMUNLABOR UND DEM EDSS: BASELINE.....	56
3.13 KORRELATION DER MRT-DATEN MIT DEM IMMUNLABOR UND DEM EDSS: K0, K1 UND K2.	57
4. DISKUSSION.....	59
4.1 KLINISCHE PARAMETER UNTER DER THERAPIE MIT INTERFERON BETA-1A (AVONEX®)	59
4.2 EFFEKTE VON INTERFERON BETA-1A (AVONEX®) AUF DIE SUBKLINISCHE KRANKHEITSAKTIVITÄT – LÄSIONSLAST IN DER KRANIALEN MAGNETRESONANZTOMO- GRAPHISCHEN BILDGEBUNG	61
4.3 IMMUNOLOGISCHE PARAMETER UNTER EINER THERAPIE MIT INTERFERON BETA-1A (AVONEX®) – POTENTIELLE WIRKMECHANISMEN	63
4.3.1 TNF-BETA, sTNF-R1 UND sTNF-R2.....	64
4.3.2 sIL4R.....	66
4.3.3 ADHÄSIONSMOLEKÜLE sICAM-1 UND sVCAM-1	67
4.4. IMMUNOLOGISCHE PARAMETER ALS AKTIVITÄTSMARKER DER MS	69
4.4.1 KORRELATIONEN DER IMMUNOLOGISCHEN SITUATION MIT DEM AUFTRETEN VON KRANKHEITSSCHÜBEN.....	69
4.4.2 KORRELATIONEN DER IMMUNOLOGISCHEN SITUATION MIT DEM AUFTRETEN VON NEBENWIRKUNGEN	73
4.4.3 KORRELATION DER IMMUNOLOGISCHEN PARAMETER MIT DER LÄSIONSLAST IN DER KRANIALEN MAGNETRESONANZTOMOGRAPHISCHEN BILDGEBUNG	73

4.5. UNTERSCHIEDE DER IMMUNOLOGISCHEN PROFILE ZWISCHEN RESPONDERN UND NONRESPONDERN	75
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK / SUMMARY (DEUTSCH/ENGLISCH)	77
SUMMARY	79
6. LITERATURVERZEICHNIS	82
7. ANHANG	101
PROTOKOLLE ZUR DURCHFÜHRUNG DER MESSUNGEN MITTELS ELISA	119
HERSTELLERNACHWEIS.....	126
DANKSAGUNG.....	132
LEBENS LAUF	133

Abkürzungsverzeichnis

<	kleiner als
>	größer als
%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AB	Antibody
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen presenting cell
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIS	clinical isolated Syndrome
CV	Variationskoeffizient
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale nach J.F. Kurtzke
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
EP	evozierte Potentiale
et al.	und andere
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
HRP	horseradish-Peroxidase

IFN-beta	Interferon-beta
IFN-γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin-10
IL-4	Interleukin-4
IL-4R	Interleukin-4-Rezeptor
i.m.	intramuskulär
LFA-1	Leucocyte function antigen-1
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Basisches Myelinprotein
mg	Milligramm
Mio	Millionen
Mio. IU	million international units
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mod.	modifiziert
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Protein
MRT	Magnet-Resonanz-Tomogramm
MS	Multiple Sklerose
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
MW	arithmetischer Mittelwert
l	Liter
N	Anzahl
ng	Nanogramm
NO	Stickoxid
OKB	oligoklonale Banden

pg	Pikogramm
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
PLP	Proteolipidprotein
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannte
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
sICAM-1	solubles interzelluläres Adhäsionsmolekül
sIL-4R	solubler Interleukin-4-Rezeptor
sTNF-R1	solubler Tumor-Nekrose-Faktor Typ1 Rezeptor
sTNF-R2	solubler Tumor-Nekrose-Faktor Typ2 Rezeptor
sVCAM-1	solubles vaskuläres Adhäsionsmolekül
Tab.	Tabelle
Th1-Zellen	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
Th2-Zellen	T-Helfer-Zellen vom Typ 2
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-beta	Tumor-Nekrose-Faktor beta
TVME	Theiler-Virus-Enzephalomyelitis
u.a.	unter anderem
VLA-4	Leukozyten Very Late Antigen-4
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Historischer Rückblick

Die Multiple Sklerose (MS), „Encephalomyelitis disseminata“ oder auch Polysklerose ist eine T-Zell-medierte, chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit unterschiedlicher Ausprägung von Demyelinisierung und axonalem Schaden. Neben der Epilepsie ist sie die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenenalters zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Noseworthy, Lucchinetti et al., 2000).

Erste Beschreibungen des Krankheitsbildes der MS reichen mit den Aufzeichnungen des Holländers Jan van Beieren zurück bis in das 14. Jahrhundert.

Eine der ersten ausführlichen Verlaufsbeobachtungen dieser demyelinisierenden Erkrankung stellen das Tagebuch und die Briefe des Augustus Frederick d'Este (1794-1848), eines Cousins Königin Viktorias dar. Mit den Pathologen Jean Cruveilhier (1791-1873) und Robert Carswell (1793-1857) erfolgten die ersten anatomischen Beschreibungen als „Paraplegie infolge grauer Degeneration der Rückenmarksbahnen“ (Cruveilhier, 1829; Carswell, 1838), der Neurologe Jean Marie Charcot (1825-1873) verfasste nahezu zeitgleich die erste detaillierte klinische, histo- und neuropathologische Beschreibung der MS als „sclérose en plaques“ (Kesselring, 1997) und brachte bereits damals klinische Symptome und pathologische Veränderungen in Korrelation (Logothetis, 1999).

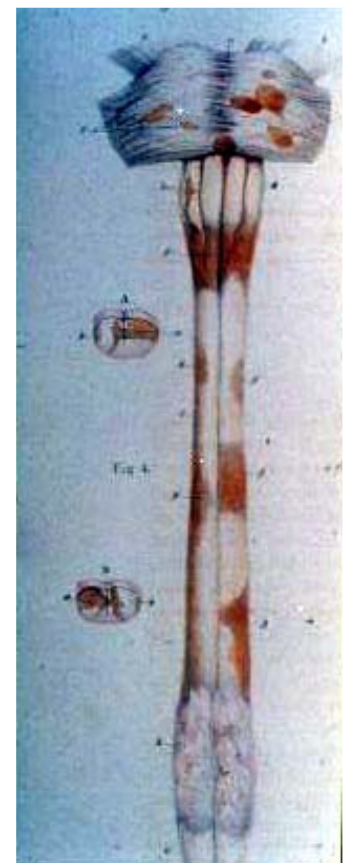


Abbildung 1 Handzeichnung aus Carswells *Pathological Anatomy: Illustrations of the Elementary Forms of Disease*

Die darauffolgenden Jahrzehnte waren geprägt durch Fortschritte in der Diagnostik der MS wie die Gewinnung und Untersuchung des Liquor cerebrospinalis durch den Kieler Internisten H. Quincke 1891 (Quincke, 1891 und 1895) sowie die Abgrenzung verschiedener Verlaufsformen. Einen weiteren Meilenstein stellte die

Etablierung der klinischen Diagnosekriterien nach Schuhmacher et al. (1965) sowie im weiteren Verlauf unter Berücksichtigung der zunehmenden Möglichkeiten im Rahmen der Zusatzdiagnostik mittels typischer Befundkonstellationen im Liquor cerebrospinalis, evozierter Potentiale und neu entwickelter bildgebender Verfahren nach Poser (1983) und McDonald et al. (2001) dar.

Hinsichtlich der Ätiologie der MS wurden bereits seit mehreren Jahrzehnten verschiedene Theorien und Hypothesen aufgestellt, verworfen und basierend auf neueren Untersuchungen wiederaufgegriffen und modifiziert. Unter anderem die Infektionstheorie von Charcot und Pierre Marie (Larner, 1986; Waksman und Reingold, 1986), der von Leyden erstmals 1863 postulierte Zusammenhang mit genetischen Faktoren, sowie das bereits 1938 durch Steiner beschriebene geographische Verteilungsmuster. 1934 gelang es Rivers und Schwendtker (Rivers et al., 1935) im Tiermodell der experimentellen Autoimmunenenzephalitis (EAE) Mechanismen aufzudecken, die für die selektive Zerstörung der Myelinscheiden verantwortlich sind und legten so den Grundstein der Autoimmuntheorie der MS.

Ausgehend von den verschiedenen Theorien und Hypothesen wurden die unterschiedlichsten empirischen Therapien von Bettruhe bis hin zu Quecksilberschmierkuren bereits seit Ende des 18. Jahrhunderts mit mäßigem bis fraglichem Therapieerfolg angewandt. Bahnbrechend und grundlegend in Bezug auf die heutige Immuntherapie der MS zeigten sich unter anderem Studien mit adrenokortikotropem Hormon (ACTH), basierend auf den klinischen und pathologischen Befunden einer chronischen Entzündung bei MS (Andersson et al., 1998).

Epidemiologie und Genetik der MS

Deutschland gehört mit Prävalenzwerten von 80 – 100 pro 100.000 Einwohner (Lauer, 1994) zu den Ländern mit hoher Prävalenz, die Inzidenz und damit die Anzahl der MS-Neuerkrankungen innerhalb eines Jahres in Deutschland wird auf vier pro 100.000 Einwohner geschätzt. Neuere Untersuchungen ergeben Prävalenzraten zwischen 67 und 138 pro 100.000 Einwohner allerdings unter Einbeziehung aller eindeutiger, wahrscheinlicher und auch fraglicher MS-Erkrankungen (Hein und Hopfenmüller, 2000). Bezüglich der Geschlechter-

verteilung zeigt die MS eine deutliche Bevorzugung des weiblichen Geschlechts. Studien erbrachten hierbei Verhältnisse von 1,9 bis 3,1 zu 1 (Gold, Rieckmann, 2000). Die Erstmanifestation erfolgt in zwei Dritteln der Fälle zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, während in seltenen Fällen die Erstdiagnose vor dem 10. und nach dem 59. Lebensjahr gestellt wird.

Noch in der Mitte des 19. Jahrhunderts vermutete Charcot eine Beschränkung des Krankheitsbildes auf Frankreich und Deutschland (Gold, Rieckmann, 2000), in weiterführenden Untersuchungen zeigte sich jedoch ein noch heute gültiges, typisches geographisches Verteilungsmuster der Multiplen Sklerose. Offensichtlich ist hierbei die Abhängigkeit des Erkrankungsrisikos von der geographischen Breite, welches mit zunehmendem Abstand vom Äquator ansteigt. In Äquatornähe wird das Vorkommen einer MS nur selten beobachtet (Kurtzke, 1977).

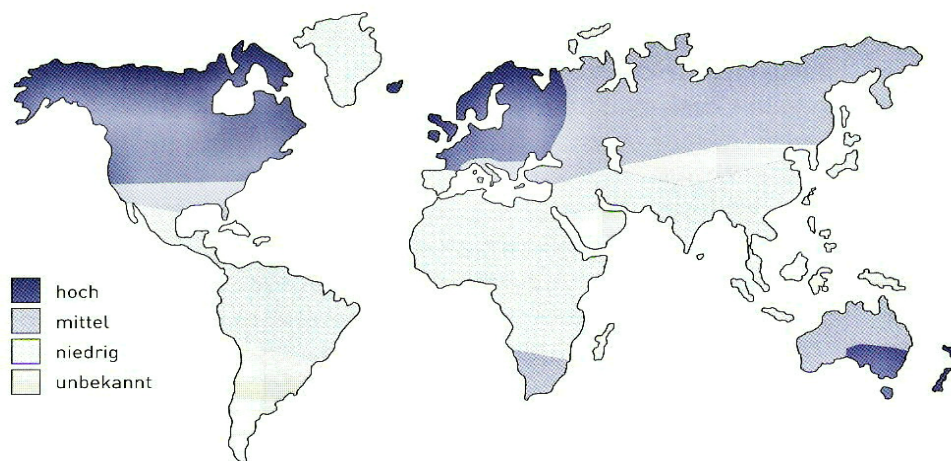


Abbildung 2: Geographische Verteilung der MS-Erkrankungswahrscheinlichkeit

aus Praxishandbuch Langzeittherapie der Multiplen Sklerose mit Interferon beta-1a / i.m.

Zusätzlich berichten zahlreiche Publikationen über Clusterbildung und Epidemien bei einem ungewöhnlich häufigen Auftreten von MS-Fällen in bestimmten Gebieten und Zeiträumen (Compston, 1998; Kurtzke, 1993; Hogancamp et al., 1997).

Migrationsstudien zeigten zudem eine Anpassung des individuellen Erkrankungsrisikos bei Migration vor dem 15. Lebensjahr an die MS-Prävalenz des Ziellandes (Compston et al., 1997), was auf einen zusätzlichen Einfluss von Umweltfaktoren auf die Pathogenese der MS hinweist.

Neben der geographischen Verteilung wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts genetischen Faktoren eine Rolle in der Ätiologie der MS zugeschrieben, nachdem ein gehäuftes Auftreten von Krankheitsfällen innerhalb von Familien, auch über

Generationen hinweg beobachtet werden konnte (Eichorst, 1896; Compston, 1998). Des Weiteren konnte die Hypothese einer genetischen Komponente in Bezug auf die Krankheitsentstehung durch epidemiologische Studien gestützt werden, welche zeigten, dass eine 20 – 40fach höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer MS bei Familienangehörigen von MS-Patienten verglichen mit der Normalbevölkerung (Sadovnick et al., 1988), sowie eine Konkordanzrate von 25-30 % bei monozygoten Zwillinge besteht (Ebers et al., 1995). Letztgenannte Zahl kontrastiert scharf mit der Konkordanzrate von 2,3% bei dizygoten Zwillingspaaren (Ebers et al., 1995).

Auf der Suche nach verantwortlichen Genregionen in verschiedenen Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien konnte die Hypothese postuliert werden, dass nicht nur ein einzelnes Gen, sondern sich eine große Anzahl unterschiedlicher Gene für das Erkrankungsrisiko im Sinne einer polygenetischen Vererbung verantwortlich zeigen (Criswell et al., 2005; Herrera et al., 2003; Holmes et al., 2005; Oksenberg et al., 2001). Des Weiteren wird vermutet, dass „Risikogene“ nicht nur auf die Regulation der Immunantwort Einfluss nehmen, sondern auch Auswirkungen auf die Myelinstruktur (Bates, 2003; Aboul-Enein et al., 2004) sowie den Krankheitsverlauf (Chapman et al., 2001; Fazekas et al., 2001) und das Ansprechen auf MS-spezifische Therapien haben können.

Das klinische Bild der Multiplen Sklerose

Symptomatik der Multiplen Sklerose

Die MS kann jede Region des ZNS befallen, hierbei finden sich charakteristischerweise in Gehirn und Rückenmark multiple, deutlich umschriebene Läsionen, sogenannte „Plaques“ unterschiedlicher Flächenausdehnung, welche sich aus einem entzündlichen Infiltrat, meist im Bereich der Venolen lokalisiert, entwickeln. Prädilektionsstellen in der weißen Substanz sind neben dem Nervus opticus das periventrikuläre Marklager der Großhirnhemisphären sowie die Kleinhirnstiele mit dem angrenzenden zerebellärem Marklager. Daneben zeigt sich auch das

Rückenmark vor allem im Bereich der zervikalen Seitenstränge mit hoher Inzidenz betroffen (Oppenheimer, 1970; Fog, 1950).

Symptom	Häufigkeit des Auftretens bei Erstmanifestation (%)	Häufigkeit des Auftretens im Gesamtverlauf (%)
Spastik oder Babinski-Zeichen	29	85
Paresen	45	85
Hirnstamm o. zerebelläre Symptome	24	79
Sensibilitätsstörungen	42	86
Blasen- o. Darmstörungen	9	61
Optikusneuritis	33	62
Mentale o. psychische Störungen	4	39
Funktionsstörung des N. trigeminus oder N. facialis	10	30
Störung der Okulomotorik	14	36

Tabelle 1: Häufigkeit neurologischer Symptome bei Erstmanifestation und im Gesamtverlauf der MS (nach Poser 1980)

Differentialdiagnose der Multiplen Sklerose

Die Differentialdiagnose der MS, welche auch als „Krankheit mit tausend verschiedenen Gesichtern“ bezeichnet wird, beinhaltet aufgrund der großen Bandbreite an meist relativ unspezifischen Symptomen und dem Fehlen pathognomischer Parameter ein weites Spektrum an Krankheitsbildern entzündlicher oder nicht-entzündlicher Genese. Auch an spezialisierten MS-Zentren wird die Rate der Fehldiagnosen auf ca. 10% geschätzt (Herndon, 1994). Differentialdiagnostisch müssen Krankheiten mit diffusem Befall des ZNS mit oft remittierendem Verlauf (z.B. Vaskulitiden, Sarkoidose, akute disseminierte Enzephalomyelitis), generalisierte Erkrankungen des ZNS mit progredientem Verlauf (z.B. Stoffwechselerkrankungen, Spinozerebelläre Degenerationen) neben lokalisierten Erkrankungen des ZNS mit remittierendem oder progredientem

Verlauf (z.B. Hirntumoren, Lymphome, Tumoren, Arnold-Chiari-Syndrom und Arachnoidalzysten) abgegrenzt werden.

Da jedoch gerade bei der MS die Bedeutung eines frühen Behandlungsbeginnes, insbesondere nach Auftreten eines klinisch isolierten Syndrom (CIS) in verschiedenen experimentellen und klinischen Untersuchungen unterstrichen werden konnte (Comi et al., 2001; Jacobs et al., 2000; Kappos et al., 2005b), erforderte dies die Modifizierung der Diagnosekriterien der MS.

Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose

Noch bis in die 60er Jahre des 20. Jahrhunderts konnte die MS als eine klinische Ausschlussdiagnose gewertet werden. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene positive diagnostische Kriterien aufgestellt und im Zuge der Entwicklung diagnostischer Verfahren weiteren Modifikationen unterworfen. Neben der Diagnosesicherung war auch die Notwendigkeit eine einheitliche Patientengruppe für klinische Studien anhand von standardisierten Diagnosekriterien definieren zu können ein weiterer Beweggrund.

Während die von Schuhmacher et al.(1965) postulierten Kriterien ausschließlich klinische Daten aus Anamnese und neurologischem Befund berücksichtigten trugen die 1983 von Charles Poser aufgestellten Kriterien der MS-Diagnostik neben der Anamnese und den subjektiven Symptomen auch erstmals paraklinischen Befunden Rechnung.

Kategorie	Kriterien			
	Schübe	klinische Herde	paraklinische Herde*	Liquor**
klinisch sichere MS (CDMS)	2	2		
	2	1	1	
klinisch wahrscheinliche MS (CPMS)	2	1		
	1	2	1	
	1	1		
laborgestützt sichere MS (LSDMS)	2	1		+
	2	2	1	+
	1	1	1	+
	1			+
laborgestützt wahrscheinliche MS (LSPMS)	2	0		+

* MRT oder evozierte Potenziale

** autochthone IgG-Produktion

Tabelle 2: Poser Diagnosekriterien der Multiplen Sklerose

aus Praxishandbuch Langzeittherapie der Multiplen Sklerose mit Interferon beta-1a / i.m.

Die zunehmende Bedeutung der Kernspin- oder auch Magnetresonanztomographie in der Diagnostik der MS bedingte eine neuerliche Aktualisierung der Diagnosekriterien durch eine Konsensusgruppe um McDonald et al., (2001), auf deren Grundlage die Diagnosestellung bereits dann erfolgen kann, wenn nach einem ersten Schubereignis mit klinisch nachweisbaren Defiziten in mindestens einem funktionalen System sich MS-typische Veränderungen in der Liquordiagnostik zeigen, sich zwei oder mehr charakteristische Entmarkungsherde im initialen Magnetresonanztomogramm (MRT) nachweisen lassen und in magnetresonanztomographischen Verlaufsuntersuchungen drei Monate nach Schubereignis mehrere entzündliche (floride) Läsionen in definierter Lage vorhanden sind, wobei die Kontrastmittelanreicherung in mindestens einer Läsion gefordert wird. Daneben berücksichtigen diese neuen Diagnosekriterien neben dem schubförmigem Verlauf auch die chronisch-progrediente Verlaufsform der MS und zeichnen sich durch einen hohen prädiktiven Wert für klinisch-isolierte Syndrome (CIS) aus.

Zusatzdiagnostik

Seit Anfang der 80er Jahre ist das MRT eine unverzichtbare und sensitive Untersuchung für die Diagnosestellung und die Verlaufskontrolle der MS. Bei diesem bildgebenden Verfahren werden anstelle von Röntgenstrahlen starke Magnetfelder genutzt, um die Strukturen von Gehirn und Rückenmark schichtweise und ohne zusätzliche Strahlenbelastung darzustellen. Mit einer Sensitivität von über 90% stellt sie somit die wichtigste zusatzdiagnostische Untersuchung zum Nachweis MS-typischer Entmarkungsherde in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems dar (Wallace et al., 1992). Mit ihrer Hilfe lassen sich subklinische Läsionen nachweisen, die den Hauptteil der Läsionslast ausmachen. Daneben erlaubt der Einsatz paramagnetischer Kontrastmittel Aussagen über die Krankheitsaktivität sowie die Affektion der Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch die Kontrastmittelanreicherung aktiver, florider Entmarkungsherde (Mc Farland 1992). Anhand der Liquordiagnostik lassen sich bei der MS charakteristische, jedoch nicht pathognomische Veränderungen im Liquor cerebrospinalis nachweisen

(Tourtelotte, 1985). Die Gesamtproteinkonzentration ist bei etwa einem Viertel der Patienten gegenüber dem Normwert von 45mg/100ml leicht erhöht. Daneben kann in der zytologischen Untersuchung bei ca. 70% der Patienten ein lymphozytäres Zellbild gefunden werden. Hierbei handelt es sich überwiegend um CD8+ und CD4+ T-Lymphozyten, sowie vereinzelt Plasmazellen. Typisch, jedoch nicht spezifisch ist eine im Liquorkompartiment stattfindende (intrathekale) Immunglobulin (Ig)-Synthese, welche bereits 1942 beschrieben wurde (Kabat et al., 1942). Der Nachweis liquorspezifischer oligoklonaler Immunglobulinbanden (OKB) in der isoelektrischen Fokussierung finden sich bei über 95% der MS-Patienten (Tourtelotte et al., 1984) und stehen somit für das häufigste und konstanteste immunologische Phänomen der MS. Sie stellen das Korrelat der Immunantwort (oligo)-klonal expandierter Plasmazellen im Liquor cerebrospinalis dar.

Eine nicht-invasive Methode zum Nachweis subklinischer Entmarkungsherde durch Überprüfung der Leitfähigkeit definierter zentral- und peripherenervöser Funktionssysteme stellt die Bestimmung evozierter Potentiale (EP) im Rahmen der Neuroelektrophysiologie dar. Das Prinzip dieser Untersuchungen besteht in einer wiederholten Applikation von Sinnesreizen und Ableitung der kortikalen Antwort über dem korrespondierenden primär sensorischen Rindenareal des Gehirns. Demyelinisierte Areale können so durch eine Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit, im Vergleich mit normalen Kontrollbefunden aufgedeckt werden (Swanson, 1989). Im Rahmen der Diagnostik der MS kommen hierbei vor allem den visuell evozierten Potentialen (Überprüfung der Sehbahn), den akustisch evozierten Potentialen (Überprüfung der Hörbahn), den somatosensibel evozierten Potentialen (Überprüfung der spinalen Hinterstränge, Lemniscus medialis, Thalamus, sowie sensibler Cortex) neben den motorisch evozierten Potentialen (Tractus corticospinalis lateralis bzw. Tractus corticobulbaris) eine große Bedeutung zu. Neben der MS bieten auch andere Krankheitsbilder eine Verzögerung der Nervenleitgeschwindigkeit, was die Notwendigkeit der Beurteilung im klinischen Gesamtbild und die Wichtigkeit des Ausschlusses von Differentialdiagnosen unterstreicht.

Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

Als „Krankheit mit tausend verschiedenen Gesichtern“ ist auch der Krankheitsverlauf der MS sehr variabel und im Einzelfall nur schwer vorhersehbar. Hierbei kann das Spektrum von einem singulärem Schubereignis ohne nennenswertes neurologisches Defizit bis hin zu einer raschen Krankheitsprogression mit schwerer resultierender Behinderung reichen. Bereits seit den Erstbeschreibungen der MS sind die schubförmige und die chronisch-progrediente Verlaufsform, welche heute nach wie vor als die wesentlichen Verlaufsformen der MS gelten, bekannt.

Als Schubgeschehen werden neurologische Symptome mit Persistenz über 24 bis 48 Stunden gewertet, welche auf einen neuen Entmarkungsherd im ZNS hinweisen oder auf eine Reaktivierung von bereits bestehenden Demyelinisierungsherden mit Wiederauftreten älterer Symptome zurückzuführen sind, definiert. Ebenso wird ein Zeitintervall von 4 Wochen nach einem Schubgeschehen gefordert, um auftretende Beschwerden als erneutes Schubereignis zu bewerten (Poser et al., 1983). Von großer Bedeutung bei der Diagnose eines erneuten Krankheitsschubes ist die Unabhängigkeit der neurologischen Symptomatik unter anderem von Temperaturschwankungen, Infektionen, begleitenden Erkrankungen, körperlicher oder psychischer Belastung. Die Schubsymptomatik kann im Zeitverlauf eine komplette Rückbildung (Remission) oder mit verbleibenden Residuen eine Teilremission der Beschwerden erfahren. Da die Anzahl der Schubereignisse ein wesentliches Kriterium für die Initiierung einer immunmodulatorischen Basistherapie und die weitere Verlaufsbeobachtung unter Therapie (Beurteilung: Therapieresponder / Nonresponder) darstellt ist die exakte Einhaltung der Schubdefinition von großer Bedeutung (Freedman et al., 2005; IWGfTOiMS, 2004; Jeffrey et al., 2002).

Der schubförmig-remittierende Verlaufstyp (relapsing-remitting MS, RRMS), welcher bei 68 bis 85% der Patienten am häufigsten zu Beginn der Erkrankung auftritt ist charakterisiert durch rezidivierende Krankheitsschübe mit kompletter oder inkompletter Remission der neurologischen Ausfallerscheinungen. Im Verlauf weisen 41% der Patienten mit initial schubförmig-remittierender MS sechs bis zehn Jahre nach Krankheitsbeginn einen Übergang in die sekundär-chronisch progrediente Verlaufsform auf (Weinshenker et al., 1989). Hierbei können sich

aufgelagerte Schubereignisse sowie eine intermittierende Besserung des Beschwerdebildes bieten, insgesamt stellt jedoch die langsame Progression der neurologischen Defizite das charakteristische Merkmal dieser Verlaufsform dar.

Bei der MS vom primär chronisch-progredienten Verlaufstyp findet sich die Manifestation des Krankheitsbildes meist erst im höheren Lebensalter (Confavreux et al., 1980). Insgesamt weisen ca. 10-15% der an MS erkrankten Patienten diese durch eine stetige Zunahme der neurologischen Defizite und resultierender irreversibler Behinderungen gekennzeichnete Verlaufsform auf (Fowler, 1989), deren Prognose als eher ungünstig zu werten ist.

Neben den typische Verlaufsformen der MS wurden spezielle Verlaufstypen unter den Begriffen „benigne Multiple Sklerose“ und „maligne Multiple Sklerose“ definiert. Die Bezeichnung „benigne Multiple Sklerose“ beschreibt schubförmige oder progrediente Krankheitsverläufe, welche in einem Beobachtungszeitraum von 10 (Mc Alpine, 1961) bzw. 15 Jahren (Lublin, 1996) nur einen geringen Behinderungsgrad oder eine sehr langsame Progredienz des Beschwerdebildes aufweisen. Demgegenüber steht die „maligne Multiple Sklerose“, charakterisiert durch einen aggressiven Krankheitsverlauf, welcher innerhalb der ersten fünf Jahre zum Tod der Patienten oder schweren irreversiblen neurologischen Defiziten führt.

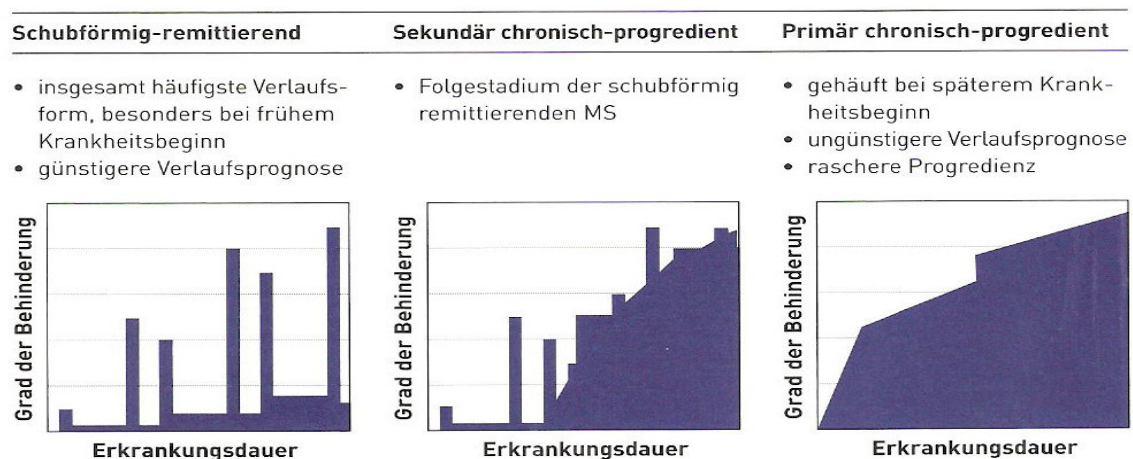


Abbildung 3: Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

aus Praxishandbuch Langzeittherapie der Multiplen Sklerose mit Interferon beta-1a / i.m.

Prognose der Multiplen Sklerose

Bislang ist es nicht möglich den individuellen Krankheitsverlauf anhand von speziellen prognostischen Markern vorauszusagen. Basierend auf zahlreichen Untersuchungen des natürlichen Verlaufes der MS wurde jedoch eine Assoziation bestimmter Krankheitssymptome mit günstigen bzw. ungünstigen Krankheitsverläufen festgestellt.

Als prognostisch günstige Faktoren gelten die Erstmanifestation der Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr, weibliches Geschlecht, schubförmiger und monosymptomatischer Verlauf, sowie die Erstmanifestation in Form von Sensibilitäts- und/oder Visusstörungen (Riise et al., 1992). Des Weiteren wird eine kurze Schubdauer sowie ein langes Intervall zwischen den ersten Krankheitsschüben (Phadke, 1987) als prognostisch günstig bewertet.

Im Gegensatz dazu stehen motorische und zerebelläre Defizite, eine hohe Schubfrequenz bei Erkrankungsbeginn, ein kurzes Zeitintervall zwischen den ersten beiden Schubereignissen, sowie ein erheblicher Behinderungsgrad innerhalb der ersten fünf Jahre nach Diagnosestellung, welche auf eine ungünstige Entwicklung der Krankheitsprogression hinweisen (Weinshenker et al., 1991). Im Rahmen der Entwicklung neuer diagnostischer Parameter lässt auch das Ausmaß der Läsionslast in der magnetresonanztomographischen Bildgebung („disease burden“) prädiktive Aussagen hinsichtlich der Prognose zu.

Nur in den wenigsten Fällen ist die MS selbst unmittelbare Todesursache. Bei mehr als 50% der Fälle bedingen sekundäre Komplikationen im Zuge der Grunderkrankung wie Bronchopneumonien, Polynephritiden, Sepsis, Aspiration oder Urämie den Tod des Patienten (Allen et al., 1978). Daneben nehmen Suizide bei ca. 30% der Todesfälle einen hohen Anteil ein (Stenager et al., 1992).

Pathologie der Multiplen Sklerose

Pathophysiologisches Hauptmerkmal der MS sind neben einer perivenösen Entzündung disseminierte, fokale Entmarkungsherde (Plaques, Läsionen), welche überwiegend in der weißen Substanz von Gehirn und Rückenmark auftreten und

durch eine ausgeprägte Gliose und einen relativen Erhalt der Axone (Prineas, 1985; Lassmann, 1998) gekennzeichnet sind. Histologisch unterscheiden sich die Entmarkungsherde abhängig von Alter und Aktivität des Entmarkungsprozesses. Bei frischen, aktiven Herden dominiert neben der Demyelinisierung eine Infiltration mit Entzündungszellen, deren Hauptbestandteile antigenspezifische autoreaktive T-Zellen und Makrophagen (Martino et al., 1998) darstellen. In deutlich geringerer Zahl finden sich daneben auch Plasmazellen und B-Lymphozyten (Esiri, 1977), welche die diagnostisch wichtige intrathekale Synthese von Immunglobulinen (v.a. IgG) bedingen.

Bei länger bestehenden, inaktiven Entmarkungsherden imponiert der komplette Verlust der Markscheiden, sowie die Reduzierung der Gesamtdichte der Axone neben einer ausgeprägten fibrillären Gliose der Astrogliazellen, deren resultierende Verhärtung (Sklerose) des Gewebes der Krankheit ihren Namen gab. Oft findet man bei Patienten die Koexistenz aktiver und inaktiver Entmarkungsherde (Hauw, 1992). In neueren detaillierten Untersuchungen großer Patientenkollektive konnte eine ausgeprägte Heterogenität der Entmarkungsmuster im Rahmen der MS anhand moderner immunpathologischer Methoden belegt werden. Insgesamt konnten vier sich voneinander deutlich unterscheidender Muster der Myelindestruktion gefunden werden (Lucchinetti et al, 1996 und 2000; Lassmann et al., 2001). Diese Heterogenität wurde zwischen den Läsionen unterschiedlicher Patienten nachgewiesen werden, während die Entmarkungsmuster in multiplen Läsionen des gleichen Patienten sehr ähnlich waren. Hierbei ist allen aktiven Läsionen ein von T-Lymphozyten und Makrophagen geprägter entzündlicher Prozess, der sich jedoch hinsichtlich der Myelin- und /oder der Oligodendrozytenschädigung unterscheidet. Eine klare Zuordnung der unterschiedlichen neuropathologischen Läsionsmuster zum klinischen Phänotyp ist bislang jedoch nicht möglich (Lucchinetti et al. 2000 und 2004).

Daneben hat in den letzten Jahren die Beobachtung der Remyelinisation entmarkter Areale bei einem Teil der MS-Patienten mehr und mehr an Bedeutung gewonnen (Prineas et al., 1993). Insbesondere bei jungen Patienten, sowie in der frühen Erkrankungsphase vor allem bei Nachweis florider Läsionen können neurologische Defizite durch die Remyelinisierung entmarkter Axone durch Oligodendrogliazellen remittieren, während mit zunehmender Chronifizierung der MS dieses Phänomen nur noch selten beobachtet wird und die zunehmende

Anzahl entmarkter Axone über eine kritische Schwelle hinweg zu irreversiblen neurologischen Ausfällen führt (Bjartmar et al., 2000).

Pathogenese der Multiplen Sklerose

Mit dem ständigem Wissenszuwachs über die Pathogenese der MS konnten bislang vielversprechende Surrogatmarker immunologischer Mechanismen an der Blut-Hirn-Schranke, im ZNS und im Blutkompartiment identifiziert werden. Dennoch ist bislang trotz intensiver Forschung die genaue Ätiologie dieser meist in Schüben verlaufenden, chronischen Erkrankung des ZNS ungelöst.

Während im 19. Jahrhundert Cruveilhier im Rahmen seiner Beobachtungen die Ursache der MS in einer „Unterdrückung des Schwitzens“ sah (Cruveilhier, 1829), nimmt man heute, gestützt auf epidemiologische, genetische und immunologische Untersuchungen, eine autoimmun vermittelte Pathogenese der MS an.

Von wesentlicher Bedeutung für das Verständnis immunologischer Prozesse in der Pathogenese der MS sind verschiedene Tiermodelle, insbesondere die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), welche manifeste Hinweise für eine T-Zell-vermittelte Pathogenese lieferte. Die EAE stellt das führende Modell einer induzierten Autoimmunreaktion gegen Myelinbestandteile mit resultierender Entzündung und zum Teil demyelinisierenden Prozessen, ähnlich der MS, im ZNS einiger Tierarten, v.a. Nagetiere und Primaten, dar. Mittels eines Myelin-homogenats oder gereinigtem basischem Myelinprotein (MBP), einem überwiegend im ZNS exprimierten Protein, bzw. Proteolipidprotein (PLP) als wichtigem Bestandteil des Myelins, wird die Sensibilisierung der Versuchstiere unter Zugabe von Freund-Adjuvans (inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis*) induziert (Dal Canto et al., 1995; Wekerle, 1993). Auch durch eine passive Übertragung von aktivierten T-Lymphozyten eines an EAE erkrankten Versuchstieres zusammen mit Freund-Adjuvans wiederum kann eine EAE bei isogenen Empfängertieren ausgelöst werden (Ben-Nun et al., 1981; Pettinelli et al., 1981). In beiden Fällen findet eine Synthese peripher aktivierter myelinspezifischer T-Zellen statt, die in der Lage sind die BHS zu überwinden und über die Aktivierung und Rekrutierung von Entzündungszellen, v.a. Makrophagen und T-Lymphozyten,

eine Entzündungsreaktion zu unterhalten, welche eine Myelindestruktion mit resultierender Gliose und sekundärer Axondegeneration im ZNS bewirkt.

Ein weiteres, der MS durch Entzündungsreaktion, Demyelinisierung und Axondegeneration ähnliches Krankheitsbild stellt die Theiler-Virus-Enzephalomyelitis (TVME) dar. Hierbei wird durch die Viruspersistenz eines Picornavirus (Theiler-Virus), welches natürlich bei Mäusen gefunden wird (Theiler, 1937), eine chronische Demyelinisierung durch aktivierte Makrophagen erzeugt (Miller, 1997), die durch immunsupprimierende Maßnahmen weitgehend verhindert werden kann (Dal Canto, 1982).

Zusammenfassend weisen experimentelle Tiermodelle in der Ursachenforschung der MS einen hohen Stellenwert auf und liefern Argumente, welche für eine T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort sprechen, auch wenn die eigentlichen Effektormechanismen bislang noch ungeklärt sind.

Analog zu Tiermodellen konnte im Serum und Liquor cerebrospinalis von MS-Patienten und in geringerer Anzahl bei gesunden Probanden, autoreaktive T-Lymphozyten gegen Myelinbestandteile wie das MBP, der Hauptkomponente der Marksheiden im humanen ZNS sowie PLP aber auch gegen Nicht-Myelinbestandteile und Oligodendrozyten-Vorläufer nachgewiesen werden (Archelos und Hartung, 2000; Hohlfeld et al., 1995; Martin, 1995; Zhang, 1993). Prinzipiell kann eine periphere Aktivierung von T-Lymphozyten mittels pro-inflammatorischer Zytokine (Panitch et al., 1987), sowie die Quervernetzung von T-Zellrezeptoren und MHC-Molekülen durch Superantigene hervorgerufen werden. Im Rahmen der MS werden jedoch bakterielle Infektionen und v.a. Virusinfektionen als potenteste Aktivatoren gehandelt (Edwards et al., 1998). Dabei steht das Phänomen der

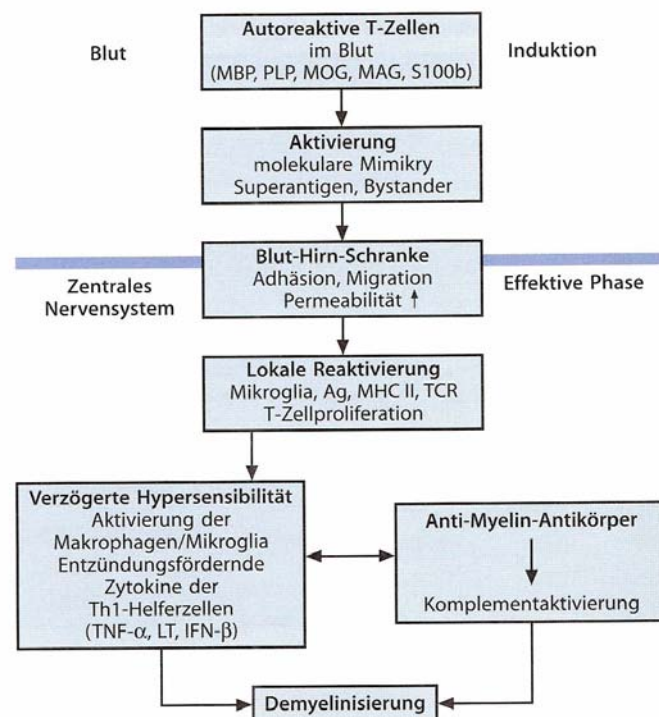


Abbildung 4: Pathophysiologisches Stufenschema der Multiplen Sklerose aus Demyelinisierende Erkrankungen, Steck et al., 2003

Prinzipiell kann eine periphere Aktivierung von T-Lymphozyten mittels pro-inflammatorischer Zytokine (Panitch et al., 1987), sowie die Quervernetzung von T-Zellrezeptoren und MHC-Molekülen durch Superantigene hervorgerufen werden. Im Rahmen der MS werden jedoch bakterielle Infektionen und v.a. Virusinfektionen als potenteste Aktivatoren gehandelt (Edwards et al., 1998). Dabei steht das Phänomen der

molekularen Mimikry im Vordergrund, welches auf zahlreichen Homologien der Aminosäuresequenz verschiedener bakterieller und viraler Proteine im Vergleich zu Eiweißsequenzen der Myelinproteine beruht. Alternativ ist eine direkte unspezifische (Bystander-) Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch eine vermehrte Freisetzung von entzündlichen Botenstoffen, wie z.B. Zytokinen denkbar.

Als das entscheidende Ereignis in der Pathogenese der MS gilt die Penetration peripher aktivierter T-Lymphozyten durch die BHS um so einen entzündlichen Prozess zu initiieren oder zu unterhalten. Die BHS besteht neben einer Basalmembran größtenteils aus den Endothelzellen der Hirnkapillaren, welche über „tight junctions“ (enge Verbindungen) miteinander verbunden sind und für die Impermeabilität gegenüber höhermolekularen Stoffe und Blutzellen von Bedeutung sind. Daneben sind auch Astrozyten über ihre Zellfortsätze, die in direktem Kontakt mit den Endothelzellen stehen am Aufbau der BHS beteiligt.

Aktivierten T-Lymphozyten ist es über eine Wechselwirkung mit Adhäsionsmolekülen, welche auf der Oberfläche zerebraler Endothelzellen exprimiert werden möglich diese Barriere zu überwinden. Hierbei vermitteln einerseits Selektine das sogenannte „Rolling“ der T-Lymphozyten entlang der Gefäßwand, andererseits werden von den aktivierten T-Lymphozyten selbst Integrine exprimiert, die in der Lage sind, sich an bestimmte Endothelimmunglobuline z.B. mit dem Integrin $\beta 1$, VLA-4, an das vasculäre Adhäsionsmolekül (VCAM-1) zu binden, die BHS zu penetrieren und in das Hirnparenchym einzudringen. Die Initiierung eines entzündlichen Prozesses findet dann statt, wenn eine Reaktivierung der T-Lymphozyten durch Präsentation ihres spezifischen Antigens auf MHC-II-Molekülen im ZNS stattfindet. Ist dies der Fall kommt es zur T-Lymphozyten- vermittelten Synthese proinflammatorischer Zytokine, die neben einer massiven Expression von Adhäsionsmolekülen an der Endotheloberfläche der BHS und damit eine massive Störung der BHS bedingen um weitere Entzündungszellen in das ZNS rekrutieren.

Therapie der Multiplen Sklerose mit Interferonen

Bedingt durch das wachsende Verständnis und Erkenntnisse der immunpathologischen Hintergründe hat die immunmodulatorische Behandlung der MS mit Interferonen in den letzten Jahren einen wichtigen Durchbruch erlebt. Daneben stellen die symptomatische Therapie und der etablierte Einsatz von Glukokortikosteroiden aufgrund ihrer immunsuppressiven, anti-inflammatorischen und anti-ödematösen Komponente (durch Stabilisierung der BHS) im Rahmen der Akuttherapie von Krankheitsschüben wichtige Pfeiler in der Behandlung der MS dar.

Vor Etablierung der Interferone in der Basistherapie der MS beschränkte sich die langfristige Therapie auf unspezifisch wirkende Immunsuppressiva wie Azathioprin und Cyclosporin A, sowie auf Chemotherapeutika wie Mitoxantron, Methotrexat und Cyclophosphamid aufgrund ihrer antiproliferativen und zytostatischen Effekte auf autoaggressive immunkompetente Zellen.

Der menschliche Organismus verfügt über ein endogenes Interferon-System als integralen Anteil der körpereigenen Immunabwehr gegenüber Virusinfektionen (Belardelli et al., 1996). Bereits im Frühstadium einer Virusinfektion, noch vor der Bildung spezifischer Antikörper oder zytotoxischer T-Lymphozyten startet das endogene Interferon-System die Viruselimination im Rahmen einer unspezifischen, nicht-adaptiven Immunantwort.

Der therapeutische Einsatz der Interferone in der Therapie der MS fand seinen Ursprung in der Vermutung, dass eine persistierende virale Infektion möglicherweise verantwortlich für die Erstmanifestation dieser chronisch demyelinisierenden Erkrankung sein könnte. Der Name „Interferon“ zeugt hierbei von der Fähigkeit der Interferone spezifische Signalstoffe zu synthetisieren, welche eine Interferenz mit Viren eingehen und dadurch eine reduzierte virale Replikation bedingen. Die Gruppe der Interferone stellt natürlich vorkommende Glykoproteine aus der Familie der Zytokine dar mit antiviralen, immunmodulatorischen und antiproliferativen Eigenschaften, welche nach ihrer genetischen Lokalisation beim Menschen in Interferone vom Typ 1 (alpha, beta und omega, auf dem kurzem Arm des Chromosom 9) und Interferon vom Typ 2 (gamma, auf Chromosom 12) eingeteilt werden. Hinsichtlich seiner immunmodulatorischen Eigenschaften spielt vor allem Interferon-beta (IFN-beta) in der Therapie der MS eine entscheidende

Rolle. In mehreren Untersuchungen konnte die Antagonisierung der IFN- γ -induzierten proinflammatorischen Effekte belegt werden, des Weiteren fördert es die Bildung immunmodulatorischer Zytokine wie IL-10, TGF- β und IL-4 und bedingt eine Hemmung der T-Zellpopulation. Eine Inhibition der Expression von HLA-Klasse-II- und Adhäsionsmolekülen wird durch die Verminderung der IFN- γ -induzierten Expression erzielt. Auch eine gesteigerte T-Suppressoraktivität neben einer Blockierung von Metalloproteinasen und Chemokinen sowie eine Verminderung der Permeabilität der BHS wird zu den Wirkmechanismen von IFN-beta gezählt (Jacobs et al., 1994). Die Entwicklung von Methoden zur gentechnologischen Herstellung von rekombinantem IFN (rIFN) schaffte die Grundlage zur Durchführung großer, plazebokontrollierter Studien mit IFN-beta und Nachweis dessen Wirksamkeit bei verschiedenen Erkrankungsstadien der Multiplen Sklerose. Derzeit werden zwei verschiedene Typen von rekombinantem humanen Interferon-beta im Rahmen der immunmodulatorischen Basistherapie bei Multipler Sklerose eingesetzt hinsichtlich deren immunmodulatorischer Effekte nach den bislang vorliegenden Erkenntnissen keine grundsätzlichen qualitativen Unterschiede bestehen.

- IFN beta-1a (Avonex®, biogen idec ; Rebif® Ares-Serono, Serono International SA)
- IFN beta-1b (Betaferon®, Schering AG)

Interferon beta-1a (Avonex®)

Interferon beta-1a (Avonex®) ist ein 166-Aminosäure-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 22500 Dalton und wird durch rekombinante DNS-Technologie mit Hilfe von Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters, in die das menschliche Interferon beta-Gen eingebaut wurde, hergestellt. Die Aminosäuresequenz entspricht hierbei

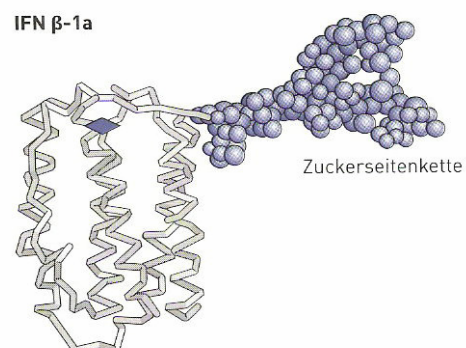


Abbildung 5: Molekulare Struktur von Interferon beta-1a aus Praxishandbuch Langzeittherapie der Multiplen Sklerose mit Interferon beta-1a / i.m.

dem natürlich vorkommenden IFN-beta aus Fibroblasten und weist wie dieses eine einzelne N-gebundene Kohlenhydrat-Seitenkette auf.

In der Zulassungsstudie für die intramuskuläre Gabe von Interferon beta-1a wurde über ein Zeitintervall von zwei Jahren rekombinantes aus Säugetier-Zelllinien gewonnenes glykosiliertes rIFN β 1a, 30 μ g, entsprechend 6 MIU einmal/Woche i.m. verabreicht und versus Placebo bei 301 Patienten getestet (Jacobs et al., 1996). Das Hauptaugenmerk, bzw. der primäre Zielparameter dieser Studie stellte die Krankheitsprogression, gemessen an Veränderungen in der EDSS welche zumindest für 6 Monate anhielten, dar. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verlangsamung der Behinderungsprogression unter Therapie, bei Patienten, die trotz Therapie mit rIFN β 1a eine Progression entwickelten, nahm die Behinderung in deutlich geringerem Maße zu als bei Patienten, die das Placebopräparat erhielten.

1.2 Grundlagen der gemessenen Parameter

Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht möglich verlässliche Aussagen über den individuellen Krankheitsverlauf der einzelnen Patienten anhand klinischer Kriterien abzuleiten. Auch die immunmodulatorische Therapie mit beta-Interferonen lässt die Patienten nicht gleichermaßen hinsichtlich einer Verlangsamung der Krankheitsprogression profitieren. Verantwortlich hierfür kann die Heterogenität der MS gewertet werden, welche allein mit klinischen Parametern nicht ausreichend erfasst werden kann.

Vor allem in letzten Jahren wird daher nach weiteren Parametern / Surrogat-Markern gefahndet, die eine individuelle und sensitivere Prognose hinsichtlich des Ansprechens auf eine Therapie und der Krankheitsprogression zulassen. Bedingt durch die autoimmun vermittelte Pathogenese der MS rückten immunologische Parameter, wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle in das Interesse der Forschung

Bedeutung von Adhäsionsmolekülen im Rahmen der Multiplen Sklerose

Adhäsionsmoleküle spielen im Verlauf von neuroimmunologischen Erkrankungen eine wesentliche Rolle, indem sie Zellkontakte und Zellinteraktionen ermöglichen. Dabei sind einige Adhäsionsmoleküle dauerhaft vorhanden, andere wiederum fordern eine vorausgehende Aktivierung der Zelle durch spezifische Entzündungsmediatoren. Bei lokalen Entzündungsreaktionen oder Gewebeschäden werden Leukozyten aus dem Blut in das betreffende Gewebe rekrutiert und sind hierbei an der zellulären Immunabwehr beteiligt. Zuvor spielt die Adhäsion der Leukozyten mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen am Endothel der Gefäße eine entscheidende Rolle für die Migration der weißen Blutkörperchen (siehe oben). Adhäsionsmoleküle zählen zur Familie der Proteine und werden gemäß ihrer Struktur in Selektine (z.B. leukozytäres L-Selectin sowie die endothelialen Selectine E-Selectin und P-Selectin), Integrine (z.B. LFA-1, VLA-4) und die Superfamilie der Immunglobuline (z.B. ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) unterteilt.

sICAM-1 und sVCAM-1

Bezüglich der Pathogenese der MS wurden die löslichen Adhäsionsmoleküle sVCAM-1 und sICAM-1 nach ihrer Entdeckung im Serum und Liquor cerebrospinalis von Patienten mit MS neben verschiedenen Zytokinen als Surrogatmarker postuliert, nachdem eine Korrelation mit der klinischen Krankheitsprogression sowie der Zahl kontrastmittel-anreichernder Läsionen in der magnetresonanztomographischen Bildgebung gefunden wurde (Hartung et al., 1995). Auch in Entzündungsherden und außerhalb entzündlicher Läsionen konnte eine Überexpression von VCAM-1 und ICAM-1 durch Astrozyten und Endothelzellen mit einem Maximum der Intensität in aktiven chronischen Entzündungsherden nachgewiesen werden (Sobel et al., 1990; Canella et al., 1995; Soilu-Hanninen et al., 2005). Eine Erhöhung der Serumkonzentration von sVCAM-1 konnte des Weiteren unter einer Immunprophylaxe mit Interferon beta-1a verzeichnet werden und wurde im Zusammenhang mit der Reduktion kontrastmittelanreichernder Herde in der magnetresonanztomographischen Bildgebung als abdichtender Effekt der BHS als mögliches Wirkprinzip von IFN-

beta beschrieben (Graber J et al. 2004; Avolio et al. 2003). Die verstärkte Synthese von sICAM-1 während der Remissionsphase einer akuten Entzündungsreaktion wird als regulativer Mechanismus diskutiert. Hierbei wird vermutet, dass die bei der Migration durch die BHS von Th-Zellen sezernierten Metalloproteinasen die enzymatische Ablösung der an den Endothelzellen massenhaft präsentierten Adhäsionsmoleküle bedingen, wodurch eine konsekutive Erhöhung der Konzentration im Serum und Liquor cerebrospinalis resultiert. Die lösliche Form des ICAM-1, das sICAM-1 ist dadurch in der Lage über eine Bindung mit LFA-1, einem Oberflächenmolekül der im Blut zirkulierenden Th-Lymphozyten, die Bindungsstellen für die Adhäsion an die Endothelzelloberfläche zu blockieren und somit eine Reduktion der Invasion autoreaktiver TH-Zellen in das ZNS zu erwirken. Inflammatorische Prozesse erfahren dadurch eine Hemmung bis eine erneute periphere Aktivierung autoreaktiver Th-Zellen diese Kaskade erneut in Gang setzt (Riekman, 1995). Die Gruppe um Flachenecker postulierte sICAM-1 als Surrogatmarker mit erhöhten Serumwerten während Krankheitsschüben und bei nachgewiesener Floridität im MRT, während in stabilen, schubfreien Krankheitsintervallen ohne Veränderungen in der kranialen magnetresonanztomographischen Bildgebung sICAM-1 keine Bedeutung als prognostischer Marker zukommt (Flachenecker et al., 2002). Auch bei anderen autoimmunen Erkrankungen und verschiedenen Infektionskrankheiten wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, Graves`Disease, Asthma bronchiale und bakterieller Meningitis sowie dem Diabetes mellitus Typ-1 konnte ein erhöhter Serumgehalt von sICAM-1 nachgewiesen werden und eine Regulation der Entzündungsreaktion diskutiert. Die Rolle des sVCAM-1 in der Regulation der Zelladhäsion wurde auch im Zusammenhang mit der Atherosklerose als komplexe, chronisch entzündliche Erkrankung beschrieben (Pigott et al., 1992).

Bedeutung von Zytokinen im Rahmen der Multiplen Sklerose

Eine zentrale Rolle in der Regulation von Funktionen des peripheren und zentralen Nervensystems wird den Zytokinen zugeschrieben. Unter dem Begriff Zytokine fasst man eine heterogene Gruppe von Polypeptiden zusammen, die von einer

großen Bandbreite an Zellen, im Zentralen Nervensystem v.a. durch Astrozyten, Mikroglia- und Schwann-Zellen sowie durch eingewanderte Immunzellen, synthetisiert werden können und eine entscheidende Rolle in der Regulierung von Zellaktivität und Zellwachstum spielen. Die Sekretion von Zytokinen erfolgt zeitlich begrenzt, wobei bereits niedrige Konzentrationen ausreichen um auf parakriner, autokriner (Paul, 1994) und auch endokriner Ebene ihre pleiotrope Wirkung (die Fähigkeit auf unterschiedliche Zelltypen einzuwirken) über spezifische Oberflächenrezeptoren zu entfalten. Auch untereinander stehen Zytokine über ein komplexes Netzwerk in Verbindung, worüber sie sich gegenseitig induzieren und sowohl synergistisch und additiv, als auch antagonistisch die Wirkung anderer Zytokine beeinflussen können.

Ihre Einteilung erfolgt meist anhand ihrer Effekte im Rahmen einer Immunantwort in entzündungsfördernde (pro-inflammatorische) und entzündungshemmende (anti-inflammatorische) Zytokine.

Neben der Zytokinproduktion ist auch die spezifische Rezeptorendichte regulativen Mechanismen unterworfen. Hierbei sind einige Zytokine dazu befähigt die Expression ihres spezifischen (autologen) Rezeptors oder auch eines heterologen Rezeptors zu induzieren. Die Rezeptoren der meisten Zytokine weisen in ihrer Struktur eine ligandenbindende alpha-Untereinheit neben einer signal-induzierenden beta-Untereinheit auf, welche nach Bindung des entsprechenden Zytokins eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt. Neben membran-gebundenen Rezeptoren existiert eine Vielzahl an sogenannten löslichen Rezeptoren, die entweder das Produkt einer Abspaltung membranständiger Rezeptoren darstellen oder deren Synthese im Rahmen einer Zellaktivierung induziert wird und oftmals eine Korrelation mit der Aktivität immunvermittelter Prozesse aufzeigen (Ibelgaufs, 1995).

Eine klare Einteilung der Zytokine in Gruppen ist aufgrund ihrer Pleiotropie und damit verbundenen unterschiedlichsten Funktionen nicht möglich. Gerade im Hinblick auf das Krankheitsbild der MS erscheint die Einteilung der beteiligten Zytokine nach ihrem Effekt im Rahmen der Immunantwort in entzündungsfördernde (pro-inflammatorische) und entzündungshemmende (anti-inflammatorische) Zytokine, welche auch eine direkte antagonistische Wirkung gegenüber pro-inflammatorischen Zytokinen besitzen, angemessen. Insbesondere das

Zusammenspiel dieser beiden großen Zytokingruppen scheint eine entscheidende Rolle bezüglich des Ausmaßes der Entzündungsreaktion zu spielen.

sTNF-R1, sTNF-R2 und TNF-beta

Neben TNF-alpha gehört TNF-beta zur Familie der pro-inflammatorischen Zytokine. Beide Zytokine werden in enger Nachbarschaft zu dem HLA-Gen auf Chromosom 6 kodiert, besitzen strukturelle Ähnlichkeiten und üben über gemeinsame TNF-Rezeptoren ihre vergleichbare Wirkung aus. TNF-beta wird im Gegensatz zu TNF-alpha von bestimmten T-Zellen sezerniert und aktiviert Makrophagen die ihrerseits mit einer Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF-alpha reagieren und so zu einer Exazerbation der Entzündungsreaktion und Demyelinisierung im Rahmen der Multiplen Sklerose führen (Plant et al. 2005).

Tumornekrosefaktoren üben ihre entscheidende Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose über ihre Zytotoxizität gegenüber Oligodendrozyten, den Myelinproduzierenden Zellen aus und sind somit an der Zerstörung der Myelinscheiden beteiligt (Selmaj K, Raine C; 1988). In Demyelinisierungsherden konnten verschiedenen Zellen nachgewiesen werden, welche u.a. TNF-alpha exprimieren. Es wird vermutet, dass diese Moleküle die Sekretion von Adhäsionsmolekülen bedingen und damit eine wichtige Rolle in der Auslösung und Unterhaltung von entzündlichen Prozessen im Zentralen Nervensystem spielen (Canella B, Raine C 1995; Plant et al. 2005).

Lösliche Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (sTNF-R1 und sTNF-R2) sind natürlich vorkommende, zirkulierende Inhibitoren von TNF-alpha, die stimuliert durch die Ausschüttung von Tumornekrosefaktoren mittels proteolytischer Spaltung („shedding“) von membranständigen Rezeptoren abgestoßen werden. Da ihre Induktion als Ergebnis einer Zellaktivierung gesehen werden kann, korreliert ihre Konzentration mit der Aktivität von immunvermittelten Erkrankungen. Bei den spezifischen, löslichen TNF-Rezeptoren unterscheidet man zwei Formen, den sTNF-R1 (p55) und den sTNF-R2 (p75) – beide besitzen strukturelle Ähnlichkeiten und sind in der Lage als hochaffine Rezeptoren TNF-alpha und TNF-beta in vitro und in vivo zu binden um so deren biologische Aktivität kompetitiv durch Konkurrenz um freie Liganden auf den Zielzellen zu hemmen und

Entzündungsreaktionen so zu regulieren. Liganden dieser Rezeptorgruppe sind Zytokine der TNF-Familie, die als lösliche oder membrangebundene Proteine vorliegen. Die wichtigsten Vertreter sind hierbei die obenbeschriebenen Tumornekrosefaktoren TNF-alpha und TNF-beta, wichtige Mediatoren für lokale Entzündungsreaktionen.

sIL-4R

IL-4 stellt ein pleiotropes, anti-inflammatorisches Zytokin dar, welches eine wichtige Rolle im Rahmen der Homöostase des Immunsystems ausübt indem es überschießende Entzündungsreaktionen inhibiert. Weitere Funktionen sind die Stimulierung der B-Zellaktivierung sowie die IgE-Produktion. Vor allem letztgenannte Funktion rückte IL-4 in das medizinische Interesse im Hinblick auf atopische Krankheitsbilder bei denen man sich durch die spezifische Inhibierung des Interleukin-4-Rezeptorsystems einen neuen Ansatz zur Entwicklung von Therapiestrategien gegen Allergien und Asthma bronchiale verspricht. Im Modell der EAE konnte eine Schutzfunktion des IL-4 nachgewiesen werden, so verminderte die Gabe von IL-4 die Demyelinisation bei einer bereits bestehenden EAE, die Auslösung einer EAE konnte durch die vorherige Applikation von IL-4 sogar unterbunden werden (Racke et al., 1994).

Die biologische Aktivität von IL-4 wird durch die spezifische Bindung an den IL-4-Rezeptor (IL-4R) gesteuert, dieser setzt sich aus 2 Ketten zusammen und kann in löslicher (sIL-4R) oder membrangebundener Form vorliegen, wobei die Bildung des löslichen Rezeptors ausschließlich durch das sogenannte „shedding,“ die proteolytische Spaltung des membrangebundenen Rezeptors, erfolgt (Gessner et al., 2000). Dieser Prozess der sIL-4R Produktion wird durch die Aktivität von Metalloproteinasen, Aktivierung von T-Lymphozyten sowie der Produktion von IL-4 und IFN- γ reguliert (Jung et al., 1999). Die jeweilige Funktion des sIL-4R ist abhängig von seiner Konzentration im Serum. Während niedrige Konzentrationen die IL-4 gesteuerte Hemmung der Produktion von IFN- γ durch aktivierte T-Zellen fördern bedingen hohe sIL-4R Konzentrationen im Serum die Neutralisierung von IL4 wodurch es zu einer vermehrten Bildung von IFN- γ kommt. Somit bietet sich

abhängig von der jeweiligen Konzentration eine anti- und pro-inflammatorische Wirkung des sIL-4R.

In Bezug auf die MS wird die vermehrte Synthese von IL-4 und seinem Rezeptor unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit Interferon beta-1a beschrieben (Sega et al., 2004). Zum gleichen Ergebnis kamen weitere Untersuchungen die eine vermehrte Synthese anti-inflammatorischer Th2-Zytokine zu denen neben IL-10 auch IL-4 zählt nachwiesen (Yong, 2002). In vorangehenden Studien unserer Forschungsgruppe wurde eine mögliche Bedeutung des sIL-4R als prognostischer Marker unter der Immunprophylaxe mit Interferon-beta herausgestellt.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnissen hinsichtlich der Immunpathogenese der MS wurde erstmalig ein serielles, engmaschiges Immunmonitoring MS-relevanter Parameter bei Patienten mit MS vom schubförmig-remittierenden Verlaufstyp unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) durchgeführt. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf wenige, meist Monate auseinanderliegende Messzeitpunkte, so dass eine höhere Blutentnahmefrequenz mit resultierend höherer Anzahl an Messzeitpunkten mögliche Hinweise auf den Wirkmechanismus von Interferon beta-1a geben könnte.

Von besonderem Interesse sind hierbei Auswirkungen auf die Serumkonzentrationen von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF-beta), Zytokin-Zytokinrezeptor Wechselwirkungen (sIL-4R, sTNF-R1, sTNF-R2) und Prozesse an der BHS (sICAM-1, sVCAM-1) gemessen durch ELISA-Testverfahren mit dem Ziel einen prognostischen Biomarker hinsichtlich des weiteren Krankheitsverlaufes detektieren zu können.

Des Weiteren sollte die Frage geklärt werden, ob längerfristig persistierende Nebenwirkungen unter einer Immunprophylaxe mit IFN beta-1a (AVONEX®) im Vergleich zu kurzfristig vorhandenen systemischen und lokalen Begleiterscheinungen Einfluss auf obengenannte immunologische Parameter nehmen.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Korrelation immunologischer Parameter mit klinisch erhobenen Daten (EDSS, Schubfrequenz) und der subklinischen Krankheitsaktivität um Aussagen über das individuelle Ansprechen der Patienten auf die Immunprophylaxe mit IFN beta-1a (AVONEX) treffen zu können, um so ein Testverfahren entwickeln zu können, welches relativ zeitnah zum Therapiebeginn eine Therapieresponse durch Einteilung der Patienten in „Responder“ und „Nonresponder“ erkennen lässt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Studiendesign

In eine prospektive, offene und nicht randomisierte Längsschnittstudie wurden von April 2000 bis Mai 2003 38 Patienten (29 Frauen, 9 Männer) eingeschlossen, welche die von Poser et al. (1983) formulierten Diagnosekriterien einer klinisch sicheren MS vom schubförmig-remittierenden Verlaufstyp aufwiesen.

Alle untersuchten Patienten wurden vor Aufnahme über die Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und erklärten ihr ausdrückliches Einverständnis gegenüber zusätzlicher Blutentnahmen. Ein positives Votum der zuständigen Ethik-Kommission konnte vor Beginn der Studie eingeholt werden.

Im Vorfeld der Einstellung auf eine immunmodulatorische Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) wiesen alle Patienten mindestens zwei Krankheitsschübe in den letzten 24 Monaten vor Therapiebeginn auf, so dass aus neurologischer Sicht die Indikation zum Beginn einer Immunprophylaxe gegeben war. Vor Einstellung der Patienten erfolgte die ausführliche Darlegung anderer anerkannter Therapieoptionen des schubförmig-remittierenden Verlaufes mit Interferonen und Glatirameracetat, sowie die Besprechung der möglichen unerwünschten lokalen und systemischen Begleiterscheinungen der jeweiligen Therapieformen.

Neben einer Schubrate von mindestens zwei Krankheitsereignissen in den letzten 24 Monaten vor Therapie wurde als Einschlusskriterium die Therapienaivität bezüglich der Immunprophylaxe mit anderen Interferonen oder Glatirameracetat, sowie ein Zeitraum von 8 Wochen zu eventuell vorausgegangenen Kortikosteroidbehandlungen gefordert. Hinsichtlich des Behinderungsgrades sollten die Werte auf der Expanded Disability Status Scale (EDSS) (siehe unten) zwischen 0 und 5 liegen. Alle rekrutierten Patienten wiesen zu Studienbeginn EDSS-Werte zwischen 0 und 4,5 auf (Mittelwert $m=1,64$; Standardabweichung $SD \pm 1,15$). Des Weiteren zählte die konsequente und adäquate Kontrazeption unter Therapie zu den Einschlusskriterien.

Im Rahmen der Studie wurde einmalig vor Beginn einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®), sowie im Verlauf in zweiwöchigen oder dreimonatigen Abständen Blutproben der Patienten gewonnen. Hinsichtlich der Fragestellung, ob eine mögliche Korrelation der Proteinkonzentrationen der

löslichen Zytokine, Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle mit klinischen Parametern besteht, wurde im Rahmen der Blutentnahmen die jeweilige Ausprägung des Nebenwirkungsprofils unter IFN beta-1a erhoben sowie in vierteljährlichen Abständen eine klinisch-neurologische Kontrolluntersuchung im Rahmen der MS-Sprechstunde der Neurologischen Klinik der Justus-Liebig-Universität, Gießen, zur Erhebung des EDSS-Wertes unter Interferontherapie durchgeführt. Des Weiteren wurden auftretende Schubereignisse dokumentiert. In sechsmonatigen Intervallen erfolgte zur Beurteilung der subklinischen Krankheitsaktivität die Durchführung einer kranialen magnetresonanztomographischen Bildgebung mit Kontrastmittel.

2.2 Klinische Parameter

Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Zur Beurteilung und Quantifizierung des neurologischen Defizits eines MS-Patienten wurden bisher verschiedene Dokumentationssysteme entwickelt, von denen sich bislang keines gegen die von John F. Kurtzke aufgestellte Expanded Disability Status Scale (EDSS) durchsetzen konnte. Es handelt sich hierbei um eine Ordinalskala mit Werten zwischen 0 (unauffälliger neurologischer Status) und 10 (Tod durch MS) mit Zwischenstufen, welche den neurologischen Status eines Patienten hinsichtlich sieben definierter Funktionssysteme (Motorik, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensibilität, Vegetativum, Visus und Psyche) beschreibt. Dennoch existieren Nachteile. Während die verschiedenen Funktionssysteme im EDSS-Bereich von 0 - 3,5 weitestgehend gleichwertig berücksichtigt werden, zeigt sich ab einem Punktwert von 4,0 ein dominierender Einfluss der Motorik, bewertet durch die maximale Gehfähigkeit des Patienten. Einschränkungen in anderen Systemen rücken dadurch in den Hintergrund. Kognitive Defizite, welche ein häufiges Symptom der MS darstellen, sowie Funktionseinschränkungen der oberen Extremitäten werden hierbei kaum oder nur qualitativ erfasst und zeigen praktisch keine Auswirkung auf den EDSS-Wert.

Im Rahmen der Studie wurde eine klinisch-neurologische Untersuchung zur Erhebung des EDSS-Wertes bei allen Patienten einmalig vor Studienbeginn und im weiteren Verlauf in dreimonatigen Abständen durchgeführt.

EDSS	Grad der Behinderung
0	Normaler neurologischer Befund
1	Keine Behinderung, minimal abnorme Untersuchungsbefunde
2	Minimale Behinderung in nur einem der folgenden funktionellen Systeme: Muskelkraft, Koordination, Sensibilität, Blase, Sehen, mental
3	Unabhängig gehfähig, aber mäßiggradige Behinderung in einem der funktionellen Systeme
4	Unabhängiges Gehen mindestens 500m, aber schwere Behinderung in einem der funktionellen Systeme
5	Gehfähig, ohne Hilfe über 200m, aber Behinderung so schwer, dass volle Arbeitsfähigkeit nicht mehr möglich
6	Stock, Krücke oder Schiene benötigt um 100 m zu gehen
7	Gehfähigkeit höchstens 5m mit Hilfe, aktiver Rollstuhlfahrer, Transfer ohne Hilfe
8	An Rollstuhl gebunden, Transfer nur mit Hilfe, Arme funktionell einsetzbar
9	Hilflos, weitgehend bettlägerig, Arme funktionell nicht einsetzbar
10	Tod infolge MS

Tabelle 3: Vereinfachte Darstellung der Behinderungsskala nach Kurtzke (EDSS, 1983)

Krankheitsschübe

Bei allen rekrutierten Patienten wurden anamnestisch eruierbare und mittels der vorhandener Krankenakten retrospektive Schubereignisse über ein Zeitintervall von 24 Monaten vor Studien- und Therapiebeginn erfasst. Anhand dieser erhobenen Daten wurde die Schubrate (durchschnittliche Anzahl der Schübe pro Jahr) ermittelt. Als Krankheitsschub wurden gemäß der oben beschriebenen Definition

neurologische Symptome mit Persistenz über ein Zeitintervall von 24 bis 48 Stunden gewertet, welche unabhängig von Temperaturschwankungen, Infektionen, begleitenden Erkrankungen sowie körperlicher oder psychischer Belastung auftraten.

Nebenwirkungen

Das Nebenwirkungsprofil von IFN beta-1a (AVONEX®) unterscheidet sich nicht von den unerwünschten Begleiterscheinungen anderer Interferonpräparate und umfasst u.a. lokale und systemische Symptome wie Veränderungen an den Injektionsstellen, das Auftreten grippeähnlicher Symptome sowie Blutbildveränderungen. Die jeweilige Ausprägung des Nebenwirkungsprofils wurde im Rahmen der regelmäßigen Blutentnahmen erhoben und der Bedarf einer antiphlogistischen Begleitmedikation (z.B. mit Ibuprofen oder Paracetamol) zur Kupierung grippeähnlicher Symptome erfasst. Da überwiegend systemische Begleiterscheinungen mit grippaler Symptomatik im Patientenkollektiv zu verzeichnen waren, wurde die Schwere der Nebenwirkungen über den Bedarf einer antiphlogistischen Begleitmedikation definiert.

Magnetresonanztomographie (MRT)

Zur Beurteilung der subklinischen Krankheitsaktivität wurden kraniale MRT-Aufnahmen vor Studien- und Therapiebeginn sowie nach 6 Monaten und 12 Monaten unter der immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) in der Neuroradiologischen Abteilung der Universitätsklinik Gießen, angefertigt. Hierbei wurden T2- und Protonen-gewichtete sowie T1-gewichtete Aufnahmen vor und nach der intravenösen Applikation von Gadolinium-Diethylenetriaminepentaacetat (Gd-DTPA) mit dem Gerät „Magnetom SP63“ (Siemens, Erlangen) vorgenommen. Um eine bestmögliche Vergleichbarkeit der Bilder zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten eines einzelnen Patienten

zu gewährleisten wurden die MRT-Untersuchungen unter exakt den gleichen Untersuchungsbedingungen hinsichtlich der Relaxations- und Aussendezeit, Positionierung des Kopfes und Auswahl der Schichtdicke durchgeführt.

Wichtung	Relaxationszeit	Aussendezeit
T1	500ms	10 bzw. 15ms
T2	3460ms	93ms
Protonen	3460ms	19ms

Patienten, die über auswärtige Bilder vor Studienbeginn verfügten wurden im Rahmen der weiteren Kontrolluntersuchungen zur besseren Reproduzierbarkeit angehalten diese in derselben neuroradiologischen Praxis durchführen zu lassen.

Die Auswertung der MRT-Bilder erfolgte im Rahmen einer eigenständigen Diplomarbeit durch Susanne Pohle, die Ergebnisse der Auswertung wurden dankenswerter Weise für diese Studie zur Verfügung gestellt.

Hierbei wurden für jeden Patienten sowohl die Anzahl als auch die kumulierte planimetrierte Querschnittsfläche („disease burden“) aller Läsionen in T2-gewichteten Aufnahmen gemessen. Gleiches geschah mit „aktiven Läsionen“ zur Erfassung der Krankheitsaktivität in T1-gewichteten Bildsequenzen.

„Aktive Läsionen“ wurden definiert als :

- Herde, die als Ausdruck der Schrankenstörung der BHS Kontrastmittel anreichern
- Herde mit perifokalem Ödem als Zeichen der Entzündungsreaktion
- im Vergleich zum Vor-MRT neu aufgetretene, bzw. größer gewordene Herde

Die jeweiligen Herde wurden in korrespondierende Schnitte durch ein „Normal-Hirn“ übertragen und mittels Millimeterpapier die Querschnittsfläche jeder einzelnen Läsion gemessen, wodurch unter Beachtung des Maßstabes die kumulierte Querschnittsfläche in mm² errechnet werden konnte.

2.3 Probenmaterial

Bei 17 Patienten erfolgten engmaschige Blutentnahmen in vierzehntägigen Abständen, bei 21 Patienten im Rahmen der alle drei Monate stattfindenden klinisch-neurologischen Untersuchung.

Zur Vorbereitung für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen löslicher Zytokine und Zytokinrezeptoren sowie löslicher Adhäsionsmoleküle mit dem ELISA-Testverfahren wurden Blutproben in mit Koagulans präparierten Serum-Röhrchen entnommen.

Um intra- und interindividuell vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten wurden folgende Kriterien bei der Probenentnahme bzw. Probenverarbeitung eingehalten:

- Verwendung eines Blutentnahmesystems (Serum-Monovetten)
- einheitliche Zentrifugationsbedingungen (10 Minuten bei 4000 rpm)
- abtrennen des Überstandes (Serum) und einfrieren der Proben bei -20°C in Aliquots à 600 μl
- Vermeidung des erneuten Einfrierens und Wiederverwendens bereits aufgetauter Proben

2.4. Testprinzip ELISA

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen löslicher Zytokine (TNF-beta), Zytokinrezeptoren (sTNF-R1, sTNF-R2, sIL-4R) und Adhäsionsmoleküle im Serum von Patienten mit schubförmig remittierend verlaufender MS wurden „Sandwich-ELISA“-Systeme der Firmen Diaclone (Besancon, Frankreich), Biosource Deutschland GmbH (Solingen) und Bender MedSystems (Wien, Österreich) verwendet.

Das Testprinzip des ELISA stellt ein schnell durchführbares, spezifisches und sehr sensitives diagnostisches Verfahren dar. Hierbei werden die Reaktionsverteilungen von Mikrotiterplatten mit einem primären, spezifischen monoklonalen Antikörper

(„Coating“-Antikörper) beschichtet. Im Anschluss wird mit Hilfe einer nichtspezifischen Proteinlösung die Fläche zwischen den in der Vertiefung der Mikrotiterplatte adsorbierten Antikörpern aufgefüllt, um eine Adsorption des zu messenden Proteins an das Plattenmaterial zu verhindern, um so daraus resultierenden hohen unspezifischen Hintergrundwerten vorzubeugen. Nach Zugabe des Patientenserums sowie der spezifischen Standards und Kontrollen des jeweiligen ELISA-Systems resultiert der erste Antikörper-Antigen Komplex mit dem „Coating“-Antikörper. Nach dem Auswaschen ungebundener Antigen-Proteine wird ein zweiter Antikörper („Detecting“-Antikörper), welcher zur Sandwich-Bildung erforderlich ist, zugegeben. Im Rahmen der nun folgenden kolorimetrischen Detektion wird die Mikrotiterplatte mit einem Enzym-Konjugat (Peroxidase-Streptavidin) inkubiert, wobei in diesem Fall der sekundäre Antikörper mit Biotin konjugiert ist (sVCAM-1, sIL-4R, sTNF-R1, sTNF-R2). Alternativ finden aber auch Antikörper, welche das Enzym direkt tragen (TNF-beta, sICAM1) Anwendung. Nach nochmaligem Auswaschen nicht gebundener Antikörper wird ein Enzym-Substrat welches aus Tetramethylbenzidin und H_2O_2 besteht hinzugegeben. Dadurch kann das konjugierte Enzym und somit wiederum das interessierende Antigen-Protein durch Messung des Produkts aus der kolorimetrischen Reaktion, nach Zugabe einer Stopplösung (z.B. Schwefelsäure), welche die Reaktion limitiert, in einem Photometer bei 450nm gegen 620nm detektiert werden. Die Intensität der Farbreaktion bzw. die Extinktion ist hierbei proportional zur Konzentration des zu analysierenden Proteins.

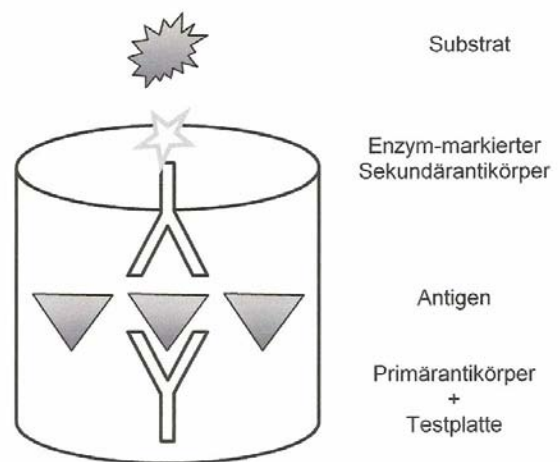


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISA modifiziert nach LAPPIN, 2000

2.5 Statistische Auswertung

Die biometrische Auswertung der erhobenen Daten und Parameter wurde im Institut für angewandte Statistik Dr. Jörg Schnitker GmbH, Bielefeld, durchgeführt. Für die Analyse der Ergebnisse wurden folgende statistische Verfahren angewendet:

- Minimum, Maximum, Median, Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler (SEM)
- Häufigkeitsverteilungen
- Pearson Korrelationskoeffizient r /Test auf $r = 0$
- U-Test (nicht-parametrischer Intergruppenvergleich)
- Wilcoxon-Test (nicht-parametrischer Intragruppenvergleich)
- Page-Test (nicht-parametrischer Test auf monotonen Trend)

Bei einem Signifikanzniveau von α gleich 0,05 konnten p-Werte kleiner 0,15 als statistisch auffällig diskutiert werden.

3. Ergebnisse

3.1 Demographische Daten

Im Rahmen dieser prospektiven, offenen und nicht randomisierten Längsschnittstudie wurden 38 Patienten rekrutiert, wovon 34 Patienten hinsichtlich klinischer und immunologischer Parameter unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) untersucht werden konnten.

Das durchschnittliche Alter der 29 (76,3%) weiblichen und 9 (23,7%) männlichen Patienten betrug 34,5 Jahre ($SD \pm 8,6$). Die Erhebung des Behinderungsgrades vor Therapiebeginn mittels der EDSS nach Kurtzke et al. ergab einen Mittelwert von 1,64 ($SD \pm 1,15$). Als Einschlusskriterium wurde eine Schubfrequenz von mindestens 2 Schüben in einem Zeitraum von 24 Monaten vor Therapiebeginn gefordert – die Schubrate pro Jahr vor Studienbeginn betrug hierbei im Mittel 1,4 ($SD \pm 1,0$). Hinsichtlich der Anzahl MS-typischer Läsionen in der kranialen magnetresonanztomographischen Bildgebung konnte ein Mittelwert von 2,0 ($SD \pm 18,2$) errechnet werden, die Gesamtfläche der Läsionen betrug hierbei im Mittel $446,82 \text{ mm}^2$ ($SD \pm 380,65$), die Fläche einer einzelnen Läsion $16,15 \text{ mm}^2$ ($SD \pm 7,73$). Kontrastmittelanreichernde, floride Läsionen wurden in 17 Fällen mit einem Mittelwert von 2,5 ($SD \pm 7,73$) dokumentiert.

3.2 Disposition der Patienten

Insgesamt konnten 26 Patienten über den kompletten Zeitraum von 12 Monaten unter Therapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) beobachtet werden, bei acht Patienten führte das Auftreten intolerabler systemischer und lokaler Begleiterscheinungen der Immunprophylaxe zum Therapieabbruch.

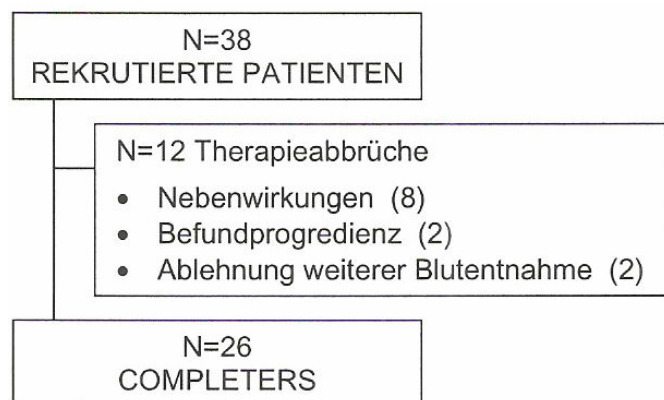


Abbildung 7: Disposition der Patienten

Bei zwei Patienten erfolgte aufgrund einer klinischen Befundprogredienz die Umstellung auf ein anderes, in der Therapie der schubförmig-remittierenden MS anerkanntes Medikament, zwei weitere Patienten lehnten bereits zu Beginn des Studienverlaufes weitere Blutentnahmen ab und wurden in der statistischen Auswertung ebenfalls als Therapieabbrüche gewertet.

Eine Neuerung in der Untersuchung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen unter einer immunmodulatorischen Basistherapie stellten engmaschige, 14-tägige Blutentnahmen dar, die bei 17 Patienten erhoben werden konnten und hiervon bei 13 Patienten über den Beobachtungszeitraum von mindestens 6 Monaten bis zu einem Jahr mit mindestens 10 Messwerten durchgeführt wurden. Bei 19 Patienten erfolgten regelmäßige Blutentnahmen im Rahmen einer alle drei Monate stattfindenden klinisch-neurologischen Kontrolluntersuchung über ein Zeitintervall von 12 Monaten.

3.3 Klinischer Verlauf unter Therapie mit Interferon beta-1a (AVONEX®)

Gemäß des Studienprotokolls erfolgte bei allen Patienten die wöchentliche, intramuskuläre Applikation von 6 Mio. IU IFN beta-1a (AVONEX®). Im Rahmen der engmaschigen 14-tägigen Blutentnahmen, bzw. innerhalb der regelmäßigen neurologischen Kontrolluntersuchungen wurde eine Befragung bezüglich auftretender oder persistierender Nebenwirkungen neben Schubereignissen unter Therapie durchgeführt sowie alle drei Monate der Behinderungsgrad mittels der EDSS in einer klinisch neurologischen Untersuchung im Rahmen der MS-Sprechstunde erhoben.

Nebenwirkungen

Das Auftreten von systemischen und/oder lokalen Begleiterscheinungen zu Beginn der immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) konnte bei 34 Patienten (94,4%) beobachtet werden und indizierten bei acht Patienten im

weiteren Verlauf das Absetzen der Medikation. Anhand des Ausprägungsgrades und des Bedarfes einer antiphlogistischen Begleitmedikation (Ibuprofen® oder Paracetamol®) erfolgte die Klassifikation der Nebenwirkungen in leicht, mittelschwer und schwer.

Als leichte Nebenwirkungen, wie sie bei 19 Patienten zu eruieren waren, wurden hierbei tolerable systemische und lokale Begleiterscheinungen meist in Form grippaler Symptome und dezenten Rötungen an den Injektionsstellen gewertet, die keine oder nur eine gelegentliche antiphlogistische Medikation erforderten und sich im Zeitverlauf der ersten drei Monate gut rückläufig zeigten.

Mittelschwere Nebenwirkungen traten bei acht Patienten mit stärkeren Hautreaktionen wie z.B. Indurationen an den Injektionsstellen und permanenten grippalen Symptomen über ein Zeitintervall von drei Monaten hinaus auf und bedingten dabei die regelmäßige Einnahme einer antiphlogistischen Begleitmedikation vor IFN-Applikation.

Unter die Gruppe schwerer Nebenwirkungen wurden starke Hautreaktionen, sowie stärkste grippale Begleiterscheinungen trotz antiphlogistischer supportiver Medikation, signifikante Blutbildveränderungen und mit der Interferongabe assoziierte Blutungsanomalien gezählt. Insgesamt zeigten sich sieben Patienten davon betroffen.

Die Zahl der Therapieabbrüche bedingt durch Nebenwirkungen im Verlauf der Studie erfolgte in einem Fall bei leichten, in zwei Fällen bei mittelschweren und in fünf Fällen aufgrund von schweren Begleiterscheinungen.

Krankheitsschübe

Die Schubfrequenz der rekrutierten Patienten wurde anamnestisch vor Studien- und somit Therapiebeginn erhoben – als Einschlusskriterium wurden mindestens zwei dokumentierte Schubereignisse in den letzten 24 Monaten vor Studienbeginn gefordert und mit der Anzahl von Schubereignissen im Rahmen der Studienteilnahme verglichen.

Die Schubzahl der letzten 24 Monate vor Therapiebeginn variierte hierbei zwischen zwei und sechs klinischen Schüben, die der letzten 12 Monate zwischen keinem und drei Schubereignissen.

Hinsichtlich der „Schubrate“ im Referenzintervall (= Anzahl der Schübe im Intervall vor Therapiebeginn, welches dem Behandlungszeitraum entspricht) ließen sich im Patientenkollektiv zwischen 0 und 3 Schubereignisse bei einem Median von 1 erheben.

Schubrate unter Therapie – gesamtes Prüfkollektiv –	0	25	(65.8%)
	1	11	(28.9%)
	2	2	(5.3%)
Vergleich mit der Schubrate vor Therapie	Abnahme	26	(68.4%)
	keine Änderung	10	(26.3%)
	Zunahme	2	(5.3%)
Vergleich mit der Häufigkeit im Referenzintervall	Abnahme	31	(81.6%)
	keine Änderung	–	
	Zunahme	7	(18.4%)

Abbildung 8: Anzahl der Krankheitsschübe unter Therapie mit AVONEX®

Insgesamt wurde unter Therapie bei 68,4% (N=26) der Patienten eine Abnahme der Schubrate dokumentiert. Im Rahmen der proportionalen Umrechnung der anamnestischen Schubzahl auf den Zeitraum, welcher dem späteren Behandlungszeitraum entspricht (das Auftreten intolerabler lokaler oder systemischer Begleiterscheinungen unter Therapie, eine deutliche Krankheitsprogredienz sowie vorzeitiger Studienabbruch aus persönlichen Gründen führte bei N=12 Patienten zu einem Beobachtungsintervall < 12 Monate), konnte ein vermindertes Auftreten von Schubereignissen bei Vergleich mit dem Referenzintervall bei 81,6% (N=31) der Patienten ermittelt werden.

EDSS

Hinsichtlich der Expanded Disability Status Scale wurde ein Wert zwischen 0 und 5 als Einschlusskriterium gefordert. Auch hierbei wurden die Punktwerte vor Therapiebeginn und nach Ende des Beobachtungszeitraumes ähnlich der Schubzahl mittels eines Referenzintervalles miteinander verglichen. Der EDSS

zeigt im Prä-Post-Vergleich nur geringe Änderungen, auch die kategorialen Änderungen zeigten sich mit sechs Abnahmen und fünf Zunahmen ebenfalls statistisch unauffällig.

Vor Therapie	Nach Therapie / nach 12 Monaten			
	0	0,5 – 2,0	2,5 – 4,0	> 4,0
EDSS = 0 (n = 5)	4	1	-	-
EDSS = 0,5 - 2,0 (n = 25)	3	20	2	-
EDSS = 2,5 - 4,0 (n = 7)	-	3	2	2
EDSS > 4,0 (n = 1)	-	-	-	1

Abbildung 9: Shift-Tabelle der EDSS

3.4 Verteilung immunologischer Parameter unter der Therapie mit Interferon beta-1a (AVONEX®)

Im Prüfkollektiv wurden hinsichtlich der Erhebung immunologischer Parameter 36 Patienten berücksichtigt.

Die Verteilungen der immunologischen Parameter im Gesamtkollektiv werden in Tabelle 4 (siehe Anhang) durch

- Vorbefunde (Baseline)
- Minima unter Therapie
- Maxima unter Therapie
- Postbefunde

charakterisiert. Im Prä-Post-Vergleich fanden sich im Mittel $\pm$ SD folgende Veränderungen:

- sTNF-R1 : 39,12 $\pm$ 309,26 pg/ml (p = 0,6776)
- sTNF-R2 : 195,44 $\pm$ 1087,43 pg/ml (p = 0,0147)
- TNF-beta : -1,66 $\pm$ 82,44 pg/ml (p = 0,6954)
- sICAM-1 : -37,80 $\pm$ 357,80 ng/ml (p = 0,9571)
- sVCAM-1 : -78,23 $\pm$ 284,95 ng/ml (p = 0,2134)
- sIL-4R : -70,17 $\pm$ 155,37 pg/ml (p = 0,0162)

Im Wilcoxon-Test wurden hierbei signifikante Trends für sTNF-R2 mit ansteigender und sIL-4R mit abnehmender Tendenz gefunden.

Bedingt durch die unterschiedlichen Therapieintervalle im Rahmen vorzeitiger Therapieabbrüche aufgrund von Nebenwirkungen und Therapieumstellungen bei signifikanter Befundprogredienz erfolgte weiterhin die Einteilung in zwei Gruppen mit Therapiedauer < 6 Monate (N=7) und ≥ 6 Monate (N=29).

Für Patienten mit ca. einjähriger Beobachtungsdauer werden die Erhebungen nach 3,6,9 und 12 Monaten durch

- Mittelwerte des Intervalls Tag 48 bis Tag 135
- Mittelwerte des Intervalls Tag 139 bis Tag 228
- Mittelwerte des Intervalls Tag 230 bis Tag 319
- Mittelwerte des Intervalls Tag 323 bis Tag 393

repräsentiert.

Die Tests auf monotonen Trend (Page-Test) ergaben hierbei :

- sTNF-R1 : p = 0,4971
- sTNF-R2 : p = 0,0153
- TNF-beta : p = 0,3748
- sICAM-1 : p = 0,0653
- sVCAM-1 : p = 0,7710
- sIL-4R : p = 0,9613

Damit ließ sich nur für sTNF-R2 eine signifikante zunehmende Tendenz über den Zeitverlauf nachweisen. Die Zunahme des sICAM-1 zeigte sich hierbei grenzwertig signifikant.

Die resultierenden Verläufe werden in den folgenden Abbildungen (Abbildung 10 - 15) dargestellt.

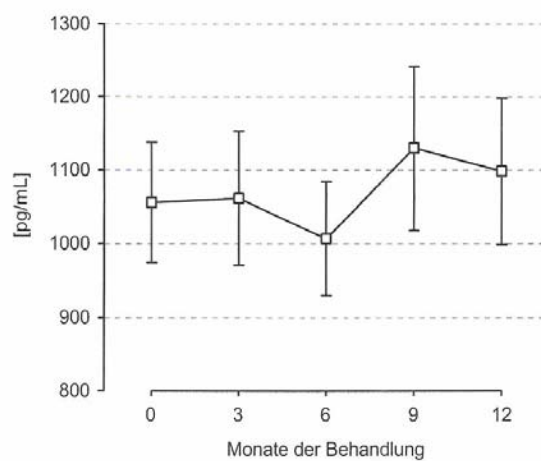


Abbildung 10: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sTNF-R1 [pg/ml]

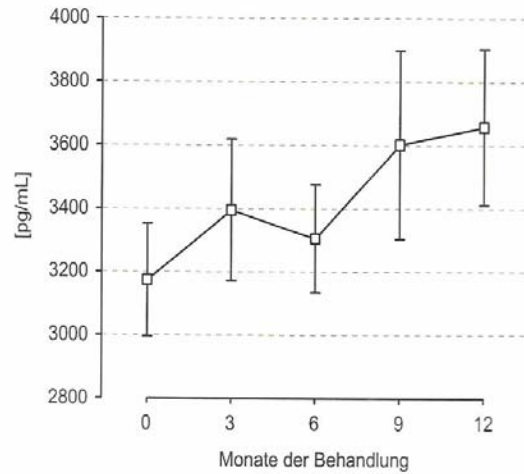


Abbildung 11: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sTNF-R2 [pg/ml]

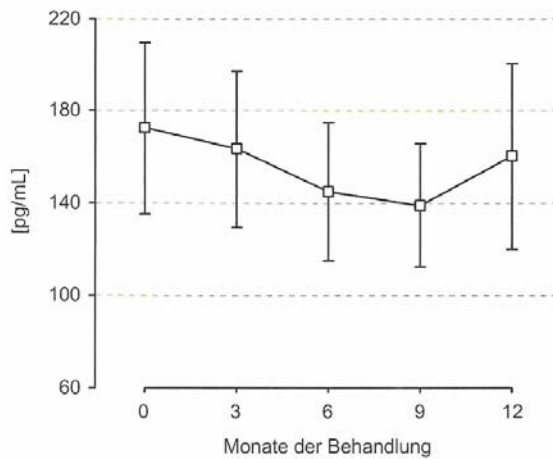


Abbildung 12: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sTNF-beta [pg/ml]

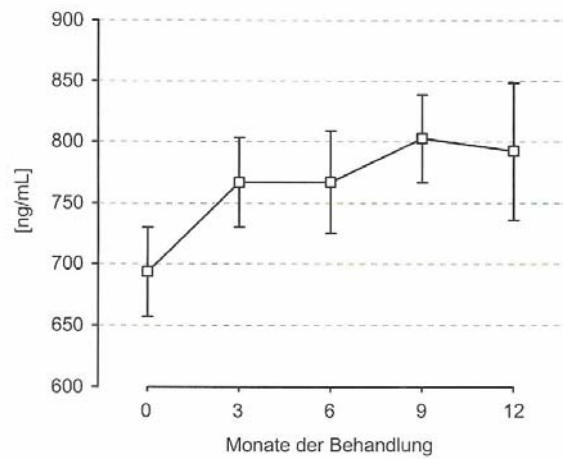


Abbildung 13: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sICAM-1 [ng/ml]

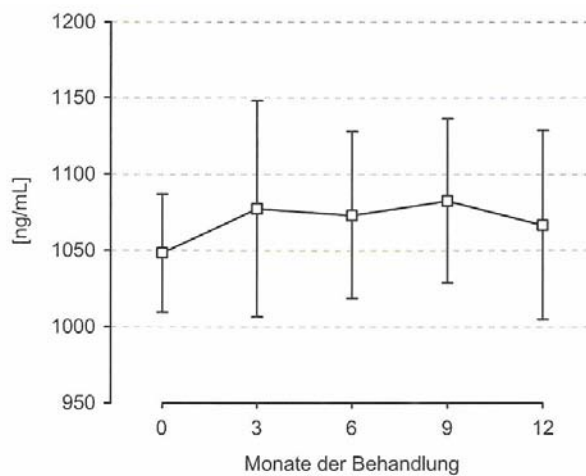


Abbildung 14: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sVCAM-1 [ng/ml]

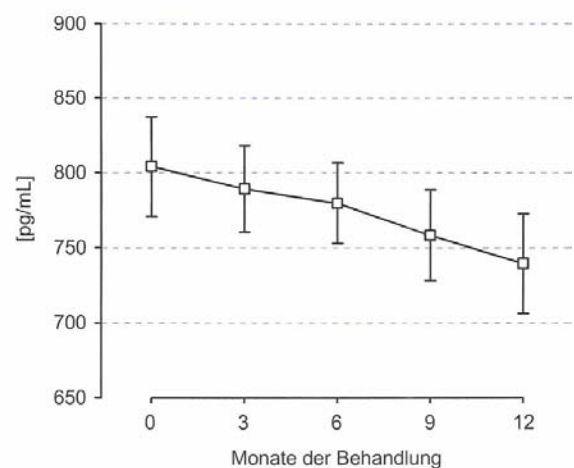


Abbildung 15: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sIL-4R [pg/ml]

Auf der Suche nach signifikanten „Schwankungen“ der einzelnen immunologischen Parameter im Zeitverlauf über 12 Monate wurden die erhobenen Daten von 13 Patienten gesondert berücksichtigt. Bei diesen Patienten lagen 14-tägige Blutentnahmen über ein Zeitintervall von nahezu einem Jahr vor. Signifikante Tendenzen fanden sich hierbei nicht.

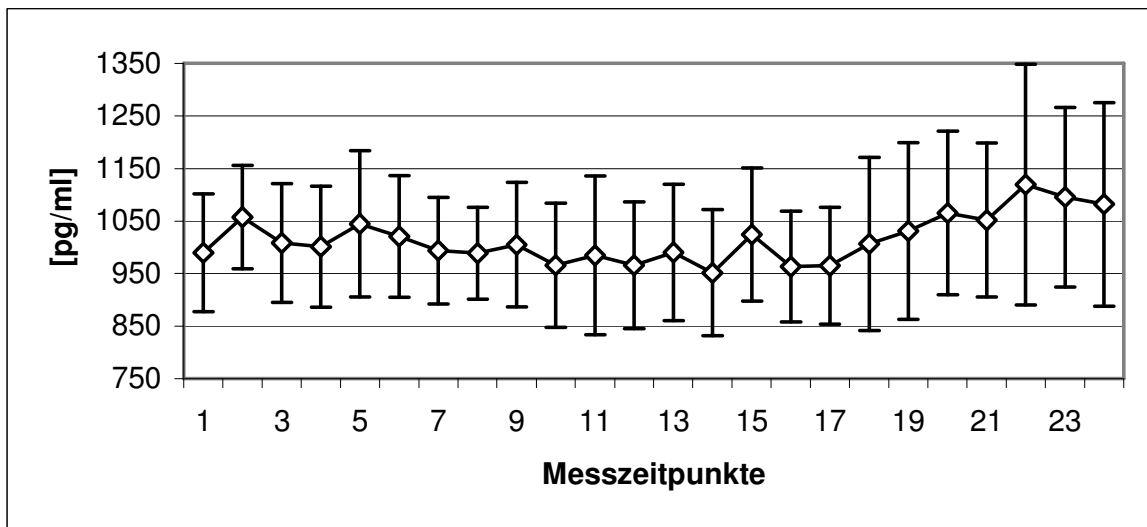


Abbildung 16: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sTNF-R1 [pg/ml]; Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen;

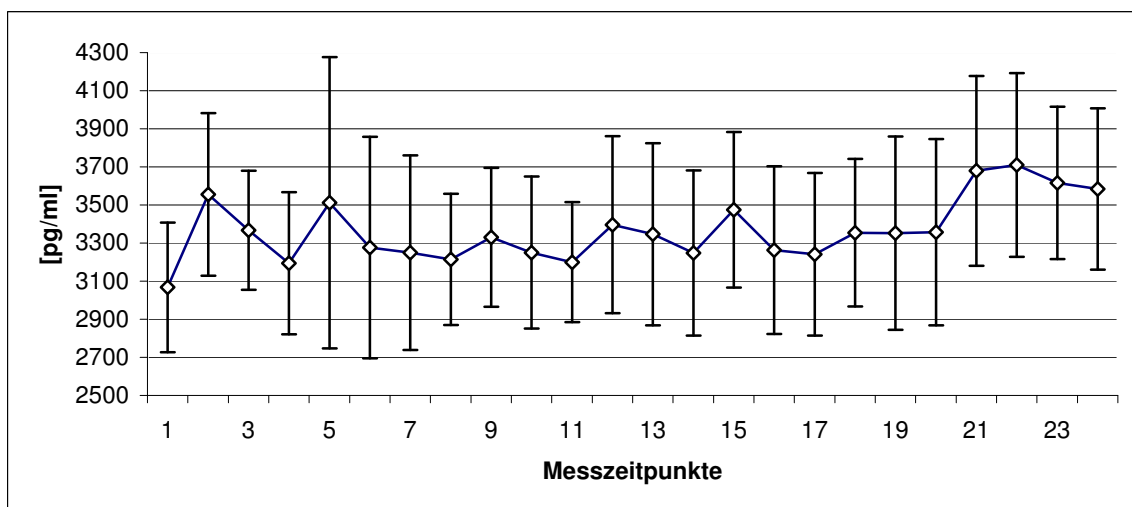


Abbildung 17: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sTNF-R2 [pg/ml]; Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen;

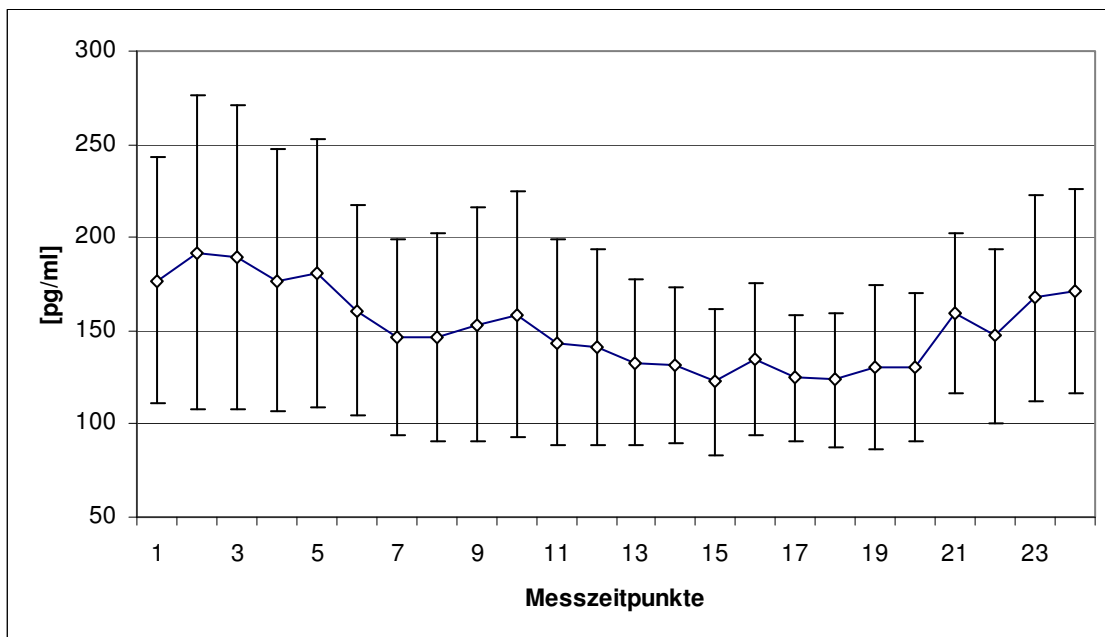


Abbildung 18: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des TNF-beta [pg/ml]; Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen;

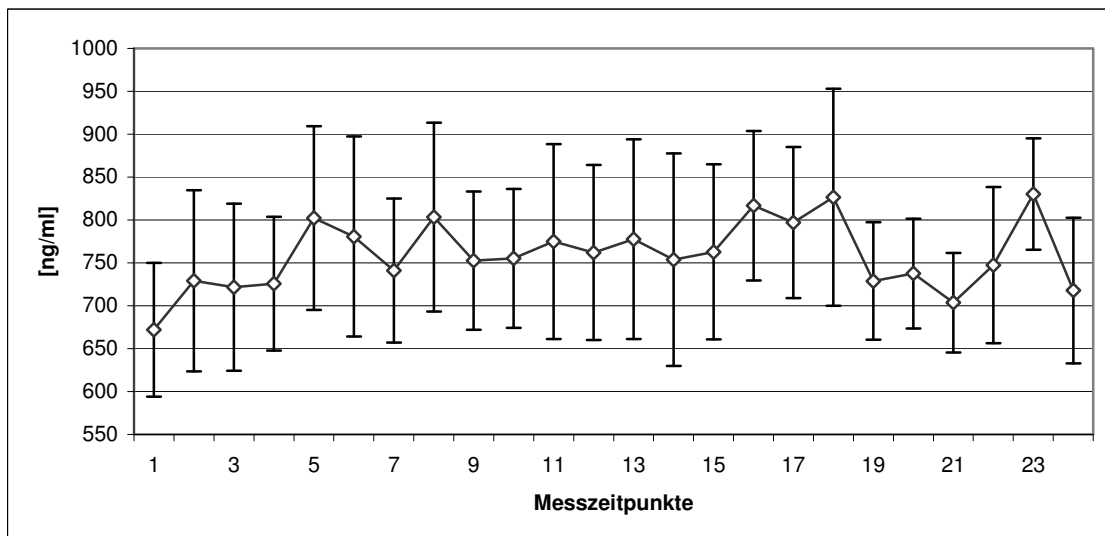


Abbildung 19: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von sICAM-1 [ng/ml]; Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen;

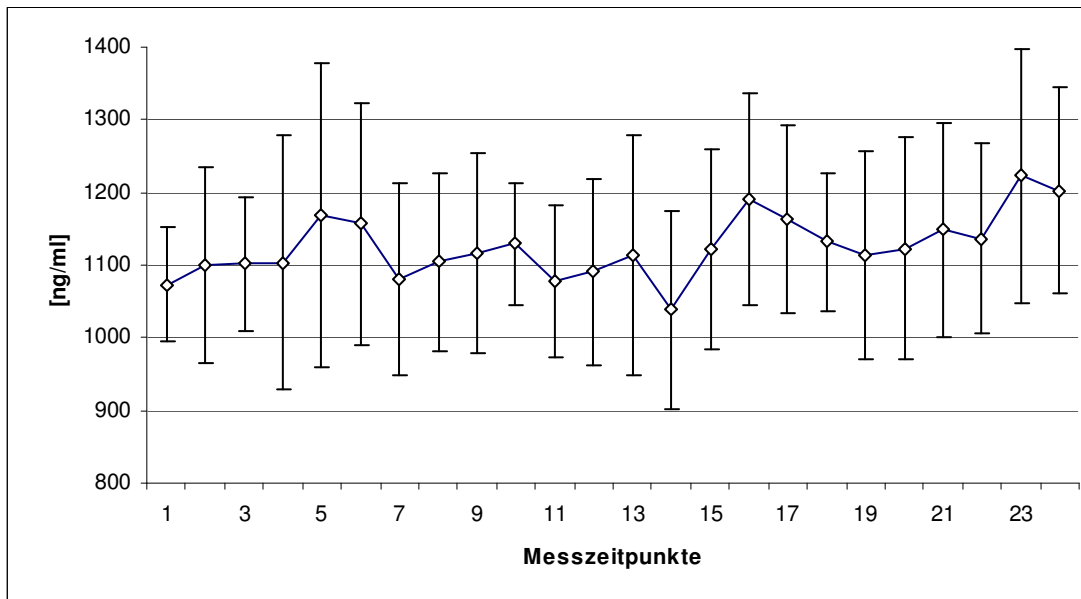


Abbildung 20: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sVCAM-1 [ng/ml]; Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen;

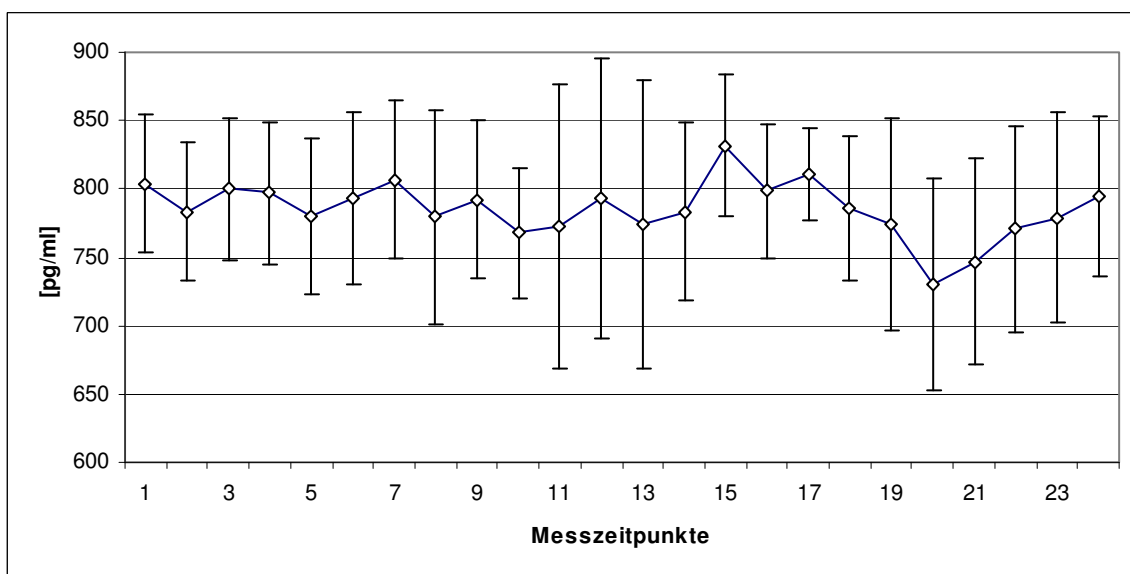


Abbildung 21: Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen des sIL-4R [pg/ml]; Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen;

3.5 Individuelle lineare Trends immunologischer Parameter, stratifiziert nach Nebenwirkungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad des Nebenwirkungsprofils mit linearen Trends der immunologischen Parameter besteht (Tabelle 5 siehe Anhang).

Hierbei wurden Trends getrennt für Patienten mit maximal leichten bzw. mindestens mittelschweren Nebenwirkungen untersucht. Es boten sich leichte Unterschiede, die bei geringer Fallzahl jedoch nur zurückhaltend interpretiert werden dürfen. Dabei zeigten sich lediglich signifikante Abnahmen bei Patienten mit maximal leichten Nebenwirkungen hinsichtlich sIL-4R.

3.6 Stratifikation statistischer Kennzahlen der immunologischen Parameter nach dem Therapieerfolg

Nicht alle MS-Patienten profitieren zwangsläufig von einer Interferontherapie, deren Intention die Reduktion der Behinderungsprogression im Krankheitsverlauf darstellt. Neben dem subjektiven Empfinden des Patienten zeigen sich vor allem eine Verminderung der Schubrate neben einer Reduktion der Krankheitsaktivität und Läsionslast in der kranialen und spinalen magnetresonanztomographischen Bildgebung als objektive Werkzeuge den Therapieerfolg zu messen geeignet. In dieser Studie wurde die Therapieresponse definiert durch eine Reduktion der Schubzahl unter der Therapie mit IFN beta-1a verglichen mit der Schubrate zum korrespondierenden therapienaiven Intervall.

Insgesamt konnte bei 29 Patienten eine Reduktion der Schubrate verzeichnet und damit in die Gruppe der „Therapieresponder“ eingeordnet werden, bei sieben Patienten bot sich hingegen eine Zunahme der Schubfrequenz mit resultierender Zuordnung in die Gruppe der „Nonresponder“ (siehe Tabelle 6 im Anhang).

Im Rahmen der Auswertung der intraindividuellen Mittelwerte für das Prüfkollektiv von 36 Patienten unter der Berücksichtigung der Einteilung in „Responder“ und „Nonresponder“ konnte ein durchschnittlich höheres Niveau von sICAM-1 bei der Gruppe der „Respondern“ nachgewiesen werden ($p=0,0603$).

Hinsichtlich der intraindividuellen Standardabweichungen der gemessenen immunologischen Parameter ergab sich ein höhere, statistisch nicht signifikante Streuung des sTNF-R1 bei Nonrespondern ($p=0,1191$) neben einer höheren Streuung bei Respondern bezüglich sTNF-R2 ($p=0,1088$).

Im Rahmen der intraindividuellen Variationskoeffizienten der immunologischen Parameter konnten zudem höhere Variationskoeffizienten bei Nonrespondern hinsichtlich sTNF-R1 ($p=0,1088$) und sTNF-R2 ($p=0,0992$) erhoben werden.

3.7 Schichtung statistischer Kennzahlen der immunologischen Parameter nach Nebenwirkungen

Im Hinblick auf Nebenwirkungen unter einer Interferontherapie existieren viele lokale und systemische Begleiterscheinungen. Um festzustellen, ob die Ausprägung des Nebenwirkungsprofils Einfluss auf die untersuchten immunologischen Parameter nimmt fand zuvor eine Einteilung der Patienten in drei Gruppen – leichte, mittelschwere und schwere Nebenwirkungen - statt. Auch hierbei wurde zum einen das gesamte Prüfkollektiv sowie im Anschluss die Gruppe der Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen und mindestens zehn Messwerten untersucht um mögliche Schwankungsbreiten zu erkennen.

In der Untersuchung des gesamten Prüfkollektivs [$N=36$] zeigte sich ein höheres durchschnittliches Niveau der Mittelwerte für sTNF-R1 bei Patienten mit maximal leichten Nebenwirkungen ($p= 0,1888$) sowie ein höheres durchschnittliches Niveau für TNF-beta bei Patienten mit mittelgradigen oder schweren Begleiterscheinungen unter der Medikation mit IFN beta-1a ($p=0,0089$). Siehe Tabelle 7 im Anhang.

Die weitere Untersuchung der Patienten [$N=13$] mit engmaschigen Blutentnahmen bot ein durchschnittlich höheres Niveau der Mittelwerte für Patienten mit maximal leichten Nebenwirkungen hinsichtlich sICAM-1 ($p=0,0673$) und sIL-4R ($p=0,1243$). Siehe Tabelle 8 im Anhang.

Im gesamten Prüfkollektiv konnte im Hinblick auf die intraindividuellen Standardabweichungen eine höhere Streuung hinsichtlich sTNF-R1 ($p=0,1779$) und TNF-beta ($p=0,1320$) bei Patienten mit maximal leichten Nebenwirkungen erhoben werden. Demgegenüber fand sich eine höhere Maßzahl für die Breite der Zufalls-

verteilung bei Patienten mit engmaschigen Blutentnahmen bezüglich sICAM-1 ($p=0,1243$).

Bei der analogen Auswertung der Variationskoeffizienten konnte im gesamten Prüfkollektiv ein höherer Variationskoeffizient bei sTNF-R1 und sTNF-R2 für Patienten mit maximal leichten Nebenwirkungen nachgewiesen werden. Die Gruppe der Patienten mit engmaschigen Blutentnahmen zeigte hierbei höhere Variationskoeffizienten bei sVCAM-1 für Patienten mit mittelgradigen bis schweren Nebenwirkungen (Tabelle 9 siehe Anhang). Statistisch auffällige Signifikanzen ergaben sich nicht.

3.8 Stratifikation statistischer Kennzahlen der immunologischen Parameter nach dem Auftreten von Schüben

Als Einschlusskriterium wurden im Vorfeld der Einstellung der Patienten auf eine immunmodulatorische Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) mindestens zwei Krankheitsschübe in den letzten 24 Monaten vor Therapiebeginn gefordert.

Auch diesbezüglich wurde zum einen das gesamte Patientenkollektiv [$N=36$] untersucht und zum anderen erneut eine gesonderte Untersuchung der Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen und mindestens zehn Messwerten vorgenommen. Hierbei konnte im gesamten Prüfkollektiv ein höheres durchschnittliches Niveau der Mittelwerte bezüglich sTNF-R1 ($p=0,1216$) und signifikant bei sICAM-1 ($p=0,0069$) bei Patienten ohne Krankheitsschübe im untersuchten Behandlungszeitraum nachgewiesen werden (siehe Tabelle 10 im Anhang). In der Patientengruppe mit engmaschigen Blutentnahmen und mindestens zehn Messwerten konnte ein höheres durchschnittliches Niveau hinsichtlich sTNF-R2 ($p=0,1747$) und TNF-beta ($p=0,1709$) bei Patienten mit dokumentierten Schubereignissen verzeichnet werden (siehe Tabelle 11 im Anhang).

Bei der Betrachtung der Standardabweichungen der immunologischen Parameter zeigte sich eine höhere Streuung der individuellen Standardabweichungen bezüglich sVCAM-1 ($p=0,0744$) für Patienten ohne Schübe unter Therapie im gesamten Patientenkollektiv (siehe Tabelle 12 im Anhang). Demgegenüber zeigte sich in der Auswertung der Patienten mit engmaschigen Blutentnahmen eine

höhere Streuung hinsichtlich des TNF-beta ($p=0,0828$) bei Patienten ohne dokumentierte Schubereignisse (Tabelle 13 siehe Anhang).

Bei der analogen Auswertung der Variationskoeffizienten imponierte im gesamten Prüfkollektiv eine höhere mediane Variation bei Vorliegen von Schüben unter Therapie hinsichtlich sVCAM-1 ($p=0,0869$), daneben konnte ebenso eine höhere Variation des sTNF-R1 ($p=0,1766$) in diesem Patientenkollektiv ebenfalls bei dokumentierten Krankheitsschüben erhoben werden (Tabelle 14 siehe Anhang).

In der gesonderten Betrachtung der Patientengruppe mit 14-tägigen Blutentnahmen und mindestens zehn Messwerten zeigten sich diesbezüglich keine Auffälligkeiten.

3.9 Individuelle Variation der immunologischen Parameter vor <-> während <-> nach einem Schubereignis

Im Rahmen der regelmäßigen Dokumentation und engmaschigen 14-tägigen Blutentnahmen konnten für neun Schubereignisse die immunologischen Parameter vor, während und nach dem Schubereignis verfolgt werden. Das Zeitintervall vor einem Krankheitsschub umfasst hierbei vier Wochen vor dem Schub gleiches gilt für das Zeitintervall nach einem Krankheitsschub. Die Dauer der Krankheitsschübe betrug zwischen 10 und 25 Tagen. Da bei den Patienten mit engmaschigen, 14-tägigen Blutentnahmen mehrere Messungen in den genannten Zeiträumen erfolgten wurde hierbei der früheste Messzeitpunkt vor dem Schub und der späteste nach dem Schubereignis innerhalb des 4-Wochenintervalls verwendet. Bei mehreren Messungen während des Schubes wurde der Mittelwert der erhobenen Messwerte herangezogen.

Hinsichtlich des Parameters TNF-beta lagen bei zwei Schubereignissen die Serumkonzentrationen unter dem vom Hersteller angegebenen Mindestwert, so dass TNF-beta-Werte nur bei sieben Schubereignissen erhoben werden konnten (Tabelle 15 siehe Anhang).

Bei der Betrachtung der einzelnen Parameter ließen sich folgende Tendenzen erheben:

- sTNF-R1: Während der Krankheitsschübe werden zwar die höchsten Minima und Maxima registriert, im Mittel findet sich jedoch eine abnehmende Tendenz. Im Median zeigen sich keine wesentlichen Veränderungen. Nach einem Schubereignis findet sich eine reduzierte Streuung.

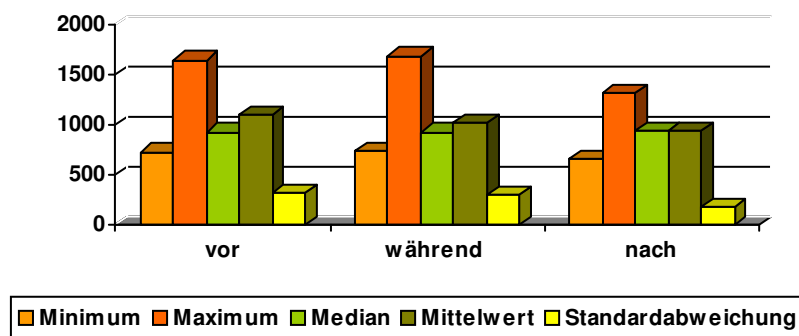


Abbildung 22: Darstellung der Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte sowie der Standardabweichung in den Zeitintervallen vier Wochen vor, während und vier Wochen nach einem dokumentiertem Schubereignis des sTNF-R1

- sTNF-R2: Im Verlauf „vor ↔ während ↔ nach einem Schubereignis“ werden keine wesentlichen / keine einheitlichen Tendenzen verzeichnet.

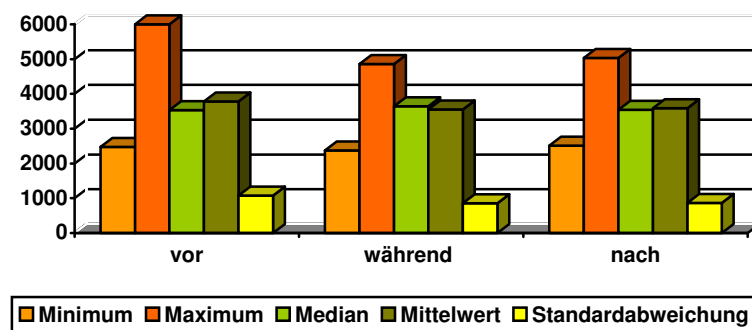


Abbildung 23: Darstellung der Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte sowie der Standardabweichung in den Zeitintervallen vier Wochen vor, während und vier Wochen nach einem dokumentiertem Schubereignis des sTNF-R2

- TNFbeta: Hierbei finden sich abnehmende Tendenzen im Mittel, Median, Maximum sowie in der Standardabweichung.

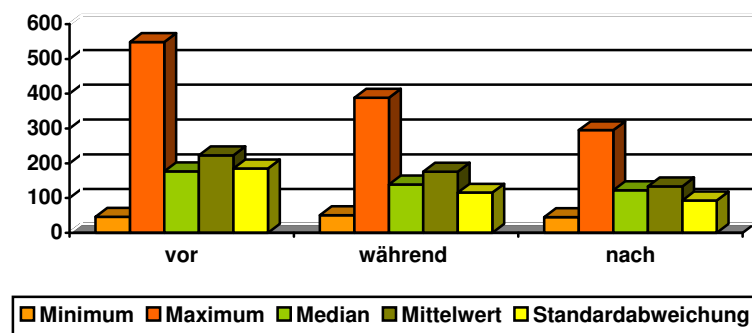


Abbildung 24: Darstellung der Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte sowie der Standardabweichung in den Zeitintervallen vier Wochen vor, während und vier Wochen nach einem dokumentiertem Schubereignis des TNF-beta

- sICAM-1: Während der Krankheitsschübe werden im Minimum, Maximum und im Mittel die höchsten Werte registriert, jedoch lässt der Median hierbei eher eine abnehmende Tendenz vermuten.

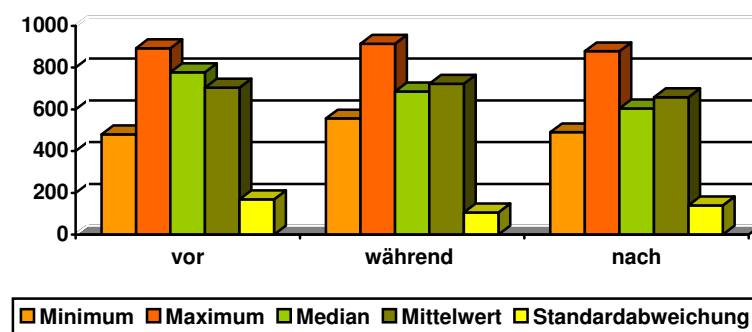


Abbildung 25: Darstellung der Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte sowie der Standardabweichung in den Zeitintervallen vier Wochen vor, während und vier Wochen nach einem dokumentiertem Schubereignis des sICAM-1

- sVCAM-1: Hinsichtlich des Median findet sich eine leichte Zunahme der Messwerte im Rahmen eines Schubereignisses.

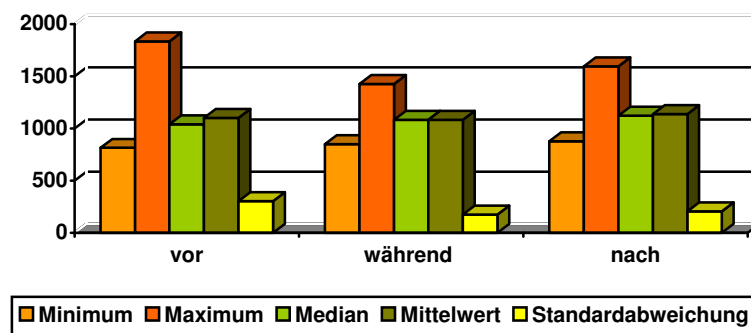


Abbildung 26: Darstellung der Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte sowie der Standardabweichung in den Zeitintervallen vier Wochen vor, während und vier Wochen nach einem dokumentiertem Schubereignis des sVCAM-1

- sIL-4R: Ähnlich des sICAM-1 werden während der Krankheitsschübe die höchsten Maxima und Minima registriert, im Median und im Mittel finden sich jedoch geringere Werte verglichen mit dem Zeitintervall vor dem Schubereignis. Die Streuung von sIL-4R nimmt im Zeitverlauf „vor ↔ während ↔ nach einem Schubereignis“ ab.

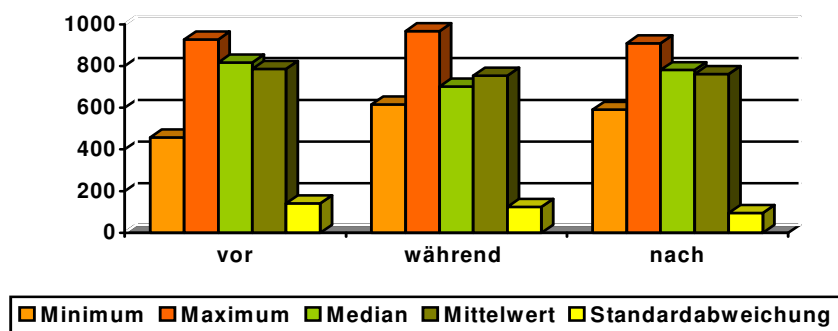


Abbildung 27: Darstellung der Minima, Maxima, Mediane, Mittelwerte sowie der Standardabweichung in den Zeitintervallen vier Wochen vor, während und vier Wochen nach einem dokumentiertem Schubereignis des sIL-4R

In der Zusammenschau fällt auf, dass im Mittel/Median überwiegend nur geringe Veränderungen zwischen den drei Intervallen vorgefunden werden. Allerdings konnte vor einem Schubereignis in der Regel die höchsten Streuungen ermittelt

werden, gefolgt von abnehmenden Tendenzen bzw. minimalen Messwerten während eines Krankheitsschubes.

3.10 Auswertung der seriell angefertigten Magnetresonanztomographien

Zur Beurteilung der subklinischen Krankheitsaktivität wurden kraniale MRT-Aufnahmen vor Studien- und Therapiebeginn (k0) sowie nach Zeitintervallen von sechs (k1) und 12 Monaten (k2) unter der immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN-beta 1a (AVONEX®) in der Neuroradiologischen Abteilung der Universitätsklinik Giessen, angefertigt. Insgesamt konnten von 26 Patienten MRT-Daten erhoben werden, die einen Prä-Post-Vergleich hinsichtlich der Anzahl und Fläche der Läsionen sowie der mittleren Läsionsfläche und der Anzahl der kontrastmittelanreichernden Demyelinisierungsherde zuließen.

Die resultierenden Ergebnisse werden in Tabelle 16 im Anhang dargestellt.

- Anzahl der Läsionen: Abnahme von 28,0 auf 26,5 um $1,5 \pm$ Läsionen ($x \pm SD$; Wilcoxon-Test: $p=0,2313$)
- Fläche der Läsionen: Abnahme von 446,82 auf 411,76 um $35,06 \pm 127,89 \text{ mm}^2$ (Wilcoxon-Test: $p=0,4646$)
- Mittlere Läsionsfläche: Zunahme von 16,15 auf 16,40 um $0,25 \pm 5,70 \text{ mm}^2$ (Wilcoxon-Test: $p=0,6123$)
- Anzahl der kontrastmittelanreichernden Herde: Abnahme von 2,5 auf 1,2 um $1,3 \pm 2,1$ Läsionen (Wilcoxon-Test: $p=0,0047$)

Im Prä-Post-Vergleich konnten nur geringe Veränderungen der obengenannten Parameter registriert werden, abgesehen von der Anzahl der kontrastmittelaufnehmenden Läsionen, die mit $p=0,0047$ eine statistisch signifikante Abnahme boten.

3.11 Analytische Aspekte der MRT-Befunde

3.11.1 MRT-Daten unter Berücksichtigung des Therapieerfolges

Bei 26 Patienten, die einen Prä-Post-Vergleich der MRT-Daten zuließen, konnten 21 Responder (charakterisiert durch eine Reduktion der Schubrate unter Therapie) und fünf Nonresponder (Zunahme der Schubfrequenz) weiter differenziert werden. Im Rahmen der Auswertung wurden die MRT-Daten nach der Outcome-Variablen „Response“ stratifiziert (siehe Tabelle 15 im Anhang).

Hierbei ergab sich für „Nonresponder“ eine erhöhte Gesamtzahl der identifizierten Läsionen, bei geringer Fallzahl blieb jedoch der Unterschied gegenüber den „Respondern“ statistisch unauffällig.

Bezüglich der kontrastmittelaufnehmenden Herde lag das Niveau in der Responder-Gruppe signifikant über dem entsprechenden Niveau der Nonresponder-Gruppe. Im Prä-Post-Vergleich bot sich zudem eine abnehmende Tendenz für Responder, während die Gruppe der Nonresponder eine geringe Zunahme der kontrastmittelanreichernden Herde aufwies.

Im qualitativen Prä-Post-Vergleich der Anzahl der kontrastmittelanreichernden Herde unter Berücksichtigung des Therapieerfolges fanden sich jedoch keine klaren statistischen Diskriminierungen.

Prä-Post-Vergleich	Schubrate = 0	Schubrate > 0	Wilcoxon (p-Wert)
Anzahl der Patienten	17	9	
unverändert Null	3 (18.8%)	2 (22.2%)	0.4320
verschwunden	3 (18.8%)	4 (44.4%)	
abgenommen	6 (37.5%)	1 (11.1%)	
unverändert positiv	2 (12.5%)	1 (11.1%)	
zugenommen	2 (12.5%)	1 (11.1%)	
fehlende Angaben	1	—	

Tabelle 18: Qualitative Änderung der Anzahl KM-anreichernder Läsionen unter Berücksichtigung der Schubrate

3.11.2 MRT- Daten unter Berücksichtigung der Schubrate unter Therapie mit AVONEX®

Unter den 26 Patienten, die einen Prä-Post-Vergleich der MRT-Daten zuließen, befanden sich 17 Fälle ohne sowie neun Fälle mit einem (N=8) bzw. zwei (N=1) Schubereignissen unter der immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®). In den Tabellen 19 und 20 im Anhang werden die MRT-Daten hinsichtlich der Outcome-Variablen „Schubrate =0/>0“ stratifiziert. Im Vergleich der beiden Kohorten boten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, es fanden sich lediglich grenzwertige oder – bei hoher Streuung – statistisch irrelevante Tendenzen.

3.11.3 MRT-Daten unter Berücksichtigung von Nebenwirkungen unter Therapie mit AVONEX®

In der Gruppe der 26 Patienten fanden sich 18 Fälle mit maximal leichten und acht Fälle mit mittelgradigen bis schweren systemischen und lokalen Begleiterscheinungen unter der Immunprophylaxe mit AVONEX®. Tabelle 21 und 22 im Anhang stratifiziert die erhobenen MRT-Daten nach der Outcome-Variablen „keine bis leichte Nebenwirkungen / mittelschwere bis schwere Nebenwirkungen“. Insgesamt konnte hierbei gezeigt werden, dass Patienten mit mittelschweren bis schweren Nebenwirkungen durch eine deutlich geringere Läsions-/mittlere Läsionsfläche auffielen.

3.12 Korrelation der MRT-Daten mit dem Immunlabor und dem EDSS: Baseline

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den immunologischen Parametern, dem Grad der Behinderung gemessen an der EDSS und der erhobenen MRT-

Daten zu untersuchen, wurden die Baseline-Daten der obengenannten Parameter in Korrelation gesetzt.

Parameter	Anzahl der Läsionen		Fläche der Läsionen		Mittlere Läsionsfläche	
	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
TNF-RI [N=26]	-0.268	0.1863	-0.003	0.9865	0.316	0.1155
TNF-RII [N=26]	-0.271	0.1804	-0.108	0.5988	0.230	0.2591
TNF- β [N=22]	0.400	0.0652	-0.073	0.7466	-0.442	0.0392
s-ICAM1 [N=26]	-0.101	0.6233	0.047	0.8178	0.101	0.6223
s-VCAM1 [N=26]	-0.088	0.6706	0.014	0.9457	0.055	0.7907
sIL-4R [N=26]	0.189	0.3554	0.007	0.9740	-0.157	0.4432
EDSS [N=26]	0.383	0.0534	0.343	0.0863	0.082	0.6894

Tabelle 23: Korrelation zwischen MRT und Immunlabor / EDSS: Baseline / k0

Hierbei wies die Gesamtfläche der Läsionen keinerlei Korrelation mit den gemessenen immunologischen Parametern auf. Gegensinnige Korrelationen konnten sowohl zwischen der Anzahl der Entzündungsherde und dem Immunlabor als auch zwischen der mittleren Läsionsfläche und den immunologischen Parametern erhoben werden, statistisch zeigte sich jedoch auch hier keine Signifikanz. Statistisch noch auffällige Korrelationen konnten nur bei TNF-beta bezüglich der Läsionsanzahl und der mittleren Läsionsfläche und der EDSS-Werte hinsichtlich der Anzahl und Fläche der Läsionen erhoben werden.

3.13 Korrelation der MRT-Daten mit dem Immunlabor und dem EDSS: k0, k1 und k2

Ergänzend wurde der Zusammenhang zwischen den immunologischen Parametern, den EDSS-Werten und der erhobenen MRT-Daten an den Zeitpunkten k0 (Baseline). k1 (nach sechs Monaten) und k2 (nach 12 Monaten) untersucht (Tabelle 24).

Parameter	Anzahl der Läsionen		Fläche der Läsionen		Mittlere Läsionsfläche	
	r	p-Wert	r	p-Wert	r	p-Wert
TNF-RI [N=71]	-0.116	0.3360	0.060	0.6217	0.215	0.0715
TNF-RII [N=71]	-0.135	0.2629	-0.006	0.9572	0.269	0.0231
TNF- β [N=62]	0.261	0.0408	-0.152	0.2396	-0.413	0.0008
s-ICAM1 [N=71]	-0.039	0.7489	0.088	0.4666	0.120	0.3194
s-VCAM1 [N=71]	-0.010	0.9326	-0.087	0.4717	-0.026	0.8268
sIL-4R [N=71]	0.116	0.3341	-0.077	0.5214	-0.207	0.0835
EDSS [N=40]	0.148	0.3614	0.208	0.1979	0.008	0.9598

Tabelle 24: Korrelationen zwischen MRT und Immunlabor / EDSS: Alle Kontrollen k0 / k1 / k2

Auch hierbei konnte eine positive Korrelation zwischen TNF-beta und der Anzahl der Läsionen sowie der mittleren Läsionsfläche ermittelt werden. Daneben boten sich statistisch auffällige Korrelationen hinsichtlich sTNF-R1 versus mittlere Läsionsfläche, sTNF-R2 versus mittlere Läsionsfläche und sIL-4R versus mittlere Läsionsfläche. Die positiven Korrelationen zwischen den EDSS-Werten und der Anzahl sowie der Fläche der Läsionen zeigten sich weniger deutlich ausgeprägt als in der Korrelation der Baseline-Werte zu erheben war.

4. Diskussion

Basierend auf immunpathogenetischen Konzepten wird die MS zu den autoimmunologischen Erkrankungen gezählt. Bereits in mehreren Studien wurde dabei die tragende Rolle der Zytokine und Adhäsionsmoleküle als Mediatoren der immunologischen und inflammatorischen Prozesse im Rahmen der MS hervorgehoben. Hinsichtlich der Zytokine ist hierbei eine erhöhte Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen produziert durch Th1-Zellen und eine erniedrigte Konzentration an anti-inflammatorischen Zytokinen, welche von Th2-Zellen synthetisiert werden, charakteristisch. Unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit Interferon-beta ließ sich in mehreren Studien eine Verschiebung des Zytokinmusters von Th1 zu Th2- synthetisierten Zytokinen nachweisen (Sega et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden Biomarker der MS in einem engmaschigen Immunmonitoring unter dem Einfluss einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) untersucht. Hierbei wurden Zytokinrezeptoren (sIL-4R, sTNF-R1, sTNF-R2) neben Zytokinen (TNF-beta) und Adhäsionsmolekülen (sICAM-1, sVCAM-1), gemessen durch kommerziell verfügbare ELISA-Testverfahren, ausgewählt. Allen genannten Parametern ist gemeinsam, dass ihnen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben wird.

Des Weiteren wurde nach Korrelationen zwischen den immunologischen Profilen mit klinischen und neuroradiologischen Parametern gefahndet, um Aussagen über das individuelle Ansprechen der Patienten auf die bestehende Immunprophylaxe treffen zu können, um so ein Testverfahren entwickeln zu können, welches zeitnah zum Therapiebeginn eine Therapieresponse erkennen lassen könnte.

4.1 Klinische Parameter unter der Therapie mit Interferon beta-1a (AVONEX®)

In Bezug auf die klinische Wirksamkeit einer Immunprophylaxe mit IFN beta-1a (AVONEX®) konnten bereits in zwei großen prospektiven Doppelblindstudien signifikante Effekte auf die Behinderungsprogression, Schubrate, kognitive Defizite, Entzündungsaktivität und Läsionslast im MRT sowie auf die Hirnatrophie gezeigt werden (Clanet et al., 2002; Jacobs et al., 1996).

In einer multizentrischen placebokontrollierten randomisierten Doppelblindstudie (Jacobs et al., 1996) wurden 301 Patienten mit schubförmig-remittierender MS eingeschlossen und über ein Zeitintervall von zwei Jahren mit IFN beta-1a (AVONEX®) bzw. Placebo therapiert. Im Rahmen des Beobachtungszeitraumes über 24 Monaten lag der Anteil der Patienten, die ein Fortschreiten der Behinderung als primäres Zielkriterium dieser Studie im Sinne einer Punkterhöhung auf der EDSS zeigten, mit 37% in der Verumgruppe niedriger als in der Placebogruppe. Auch der Anteil der Patienten die über den Beobachtungszeitraum von zwei Jahren keinerlei Behinderungsprogression boten, lag mit 78,1% in der Verumgruppe signifikant höher als in der Placebogruppe.

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser zu erwartende Trend ebenso beobachtet werden, der EDSS-Wert zeigte im Prä-Post-Vergleich nur geringe Änderungen, was einer Verlangsamung der Behinderungsprogression unter einer Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) entspricht. An dieser Stelle soll auch darauf hingewiesen werden, dass sich Punktwerte auf der EDSS in der Regel langsam verändern, und eine subjektive Komponente in der Erhebung des EDSS trotz standardisierter Untersuchung nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Des Weiteren konnte Jacobs in seiner Studie eine signifikante Reduktion der Schubrate über das Beobachtungsintervall von zwei Jahren als zweiten wesentlichen Wirksamkeitsparameter einer Interferon-Dauertherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) bei MS zeigen. Hierbei lag die jährliche Schubrate in der Verumgruppe durchschnittlich um 32% niedriger als in der Placebogruppe, 38% der mit Interferon therapierten Patienten erlitten keinen Krankheitsschub demgegenüber stehen 26% schubfreie Patienten der Placebogruppe.

Dieser Wirksamkeitsaspekt einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) konnte ebenso in der vorliegenden Arbeit mit Abnahme der Schubfrequenz bei insgesamt 68,4% der Patienten gefunden werden. Unter Berücksichtigung vorzeitiger Studienabbrüche und Vergleich der Schubrate unter immunmodulatorischer Basistherapie mit dem korrespondierenden Referenzintervall vor Therapiebeginn konnte sogar eine Reduktion der Schubfrequenz bei 81,6% der Patienten ermittelt werden. Jedoch muss letztere Zahl kritisch betrachtet werden, da hierbei zum Teil die Zeitintervalle bedingt durch vorzeitige Studienabbrüche sehr eng gefasst waren.

4.2 Effekte von Interferon beta-1a (AVONEX®) auf die subklinische Krankheitsaktivität – Läsionslast in der kranialen magnetresonanztomographischen Bildgebung

Neben dem individuellen Behinderungsgrad der Patienten gemessen an den in der klinisch-neurologischen Untersuchung eruierbaren Defiziten spielt ein weiteres Charakteristikum der MS vom schubförmig-remitierenden Verlaufstyp, die Anzahl und Ausprägung der Entmarkungsherde der weißen Substanz des ZNS als pathologisch-anatomischer Befund, eine entscheidende Rolle. Diesbezüglich nimmt die Magnetresonanztomographie eine wichtige Stellung in der Diagnoseerhebung und Verlaufsbeobachtung der MS ein (Castelijns u. Barkhof, 1999; McFarland, 1999; Filippi, 2001). Daneben wird der prognostische Wert der Bildgebung diskutiert (Barkhof, 1995; Paty, 1990). Die Bedeutung der magnetresonanztomographischen Bildgebung als diagnostisches Hilfsmittel bei der MS wurde zusätzlich durch die 2001 veröffentlichten Diagnosekriterien nach McDonald unterstrichen.

Im Rahmen der Routinediagnostik richtet sich das Hauptaugenmerk auf die Zahl und das Volumen von Läsionen in der T2-gewichteten Bildgebung sowie das Auftreten von Gadolinium-anreichernden Läsionen. Daneben finden auch chronische hypointense Läsionen in den T1-gewichteten Sequenzen, sog. „black holes“ Beachtung. Die über den Zeitverlauf nachweisbare Hirnatrophie, welche bereits in frühen Krankheitsphasen beobachtet werden kann, nimmt als globaler Marker von Gewebeverlust ebenso eine wichtige Stellung ein (Jagust et al. 2000). Die Entstehung von T2-Läsionen wird als Resultat einer akuten Entzündung diskutiert. Des Weiteren wird das Persistieren einer T2-Läsion als Beweis einer bleibenden Demyelinisierung und der daraus resultierenden Glianarben gesehen. Neben der hohen Sensitivität dieser Sequenz im Hinblick auf die Detektion von MS-Läsionen muss jedoch der diagnostische Nutzen aufgrund der geringen Spezifität als eingeschränkt bewertet werden, da verschiedenartige neurologische Erkrankungen mitunter ein sehr ähnliches Signalmuster aufweisen. O’Riordan et al. beschrieben 1998 die prognostische Bedeutung der Anzahl an T2-Läsionen bei Erkrankungsbeginn, so ist bei Patienten, welche mehr als neun T2-Läsionen aufweisen von einem höheren Risiko einen zweiten Krankheitsschub im Zeit-

intervall der nächsten fünf bis zehn Jahre und im weiteren Verlauf eine deutliche Behinderung zu entwickeln auszugehen.

Hypointense Läsionen in T1-gewichteten Sequenzen gelten im akuten Stadium als pathologisches Substrat eines Ödems, im chronischen Stadium stellen sie mit den sog. „black holes“ die Gewebedestruktion durch den Untergang axonaler Strukturen dar (Bitsch et al., 2001). Zur Beurteilung der subklinischen Krankheitsaktivität wird die Gabe eines paramagnetischen Kontrastmittels (Gadolinium) in Verbindung mit einer T1-gewichteten Aufnahme durchgeführt. Die dabei nachweisbare Anreicherung mit Kontrastmittel in akut entzündlichen Läsionen sog. „aktive Plaques“ lässt sich mit der Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke erklären und wird mit der entzündlichen Komponente der Pathogenese der MS in Verbindung gebracht und somit als initiales Ereignis der Läsionsentstehung gesehen.

Eine signifikante Reduktion der kontrastmittelanreichernden Entmarkungsherde bezüglich ihrer Anzahl und ihres Volumens konnte in der zulassungsrelevanten Phase-III-Studie (Jacobs et al., 1996), einer Post-hoc-Analyse (Galetta et al., 2002) und im Rahmen einer dreijährigen Dosisvergleichsstudie mit Interferon beta-1a (AVONEX®) (Clanet et al., 2002) aufgezeigt werden. Auch Calabresi et al. konnten unter der Immunprophylaxe mit IFN-beta bereits nach einem Beobachtungszeitraum von wenigen Wochen eine signifikante Reduktion der T1-Gd-Läsionen nachweisen, was den direkten Interferon-Effekt auf die BHS unterstreicht (Calabresi et al. 1997).

Die Auswertung der diesbezüglich in dieser Arbeit ermittelten MRT-Daten spiegelte bei den auswertbaren Patienten, die einen Prä-Post-Vergleich zuließen, ein erwartungsgemäßes Verhalten wider. Es ergaben sich nur geringe Veränderungen hinsichtlich der gemessenen Läsionslast vor und während der Immunprophylaxe mit IFN beta-1a (AVONEX®), während die Anzahl der kontrastmittelanreichernden Herde und damit die floriden Läsionen als wesentlicher Verlaufsparemeter bei der schubförmig-remittierenden MS eine statistisch signifikante Abnahme aufwiesen.

4.3 Immunologische Parameter unter einer Therapie mit Interferon beta-1a (AVONEX®) – potentielle Wirkmechanismen

1997 wurde IFN beta-1a (AVONEX®) zur Behandlung von Patienten mit MS vom schubförmig-remittierenden Verlaufstyp zugelassen. Die Effekte dieser immunmodulatorischen Basistherapie werden als antiviral, antiproliferativ und immunregulatorisch charakterisiert, die Wirkung in Hinblick auf die MS ist jedoch bislang noch nicht eindeutig geklärt, jedoch wurden in verschiedenen Studien der Einfluss von IFN-beta auf antigen-präsentierende Zellen und T-Lymphozyten durch Bindung an den Interferonrezeptor auf den entsprechenden Zielzellen als wichtiger Aspekt sowie ein „Abdichten“ der Blut-Hirn-Schranke in Bezug auf pro-inflammatorische T-Lymphozyten diskutiert. Resultat der Rezeptorbindung ist das in Gang setzen einer intrazellulären Signalkaskade.

2002 befasste sich Yong genauer mit der immunmodulatorischen Wirkung von IFN-beta und stellte hierbei die Hemmung der Antigenpräsentation, die Verminderung der Zahl autoreaktiver T-Zellen, die Verschiebung des Zytokinmusters von einem pro-inflammatorischen zu einem anti-inflammatorischen Profil neben der Inhibition der Leukozytenmigration durch die BHS in den Vordergrund. Die Hemmung der Antigenpräsentation wird als Effekt einer Downregulation von Proteinen wie MHC-Klasse- II und B7 auf antigen-präsentierenden Zellen sowie CD28 auf T-Lymphozyten beschrieben, welche für die Antigenpräsentation neben der antigenspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten benötigt werden. Die Verminderung der Anzahl autoreaktiver T-Zellen wird durch die Inhibition der klonalen Expansion autoreaktiver T-Zellen bewirkt. Diskutiert wird hierbei zusätzlich die verstärkte Apoptose autoreaktiver T-Zellen. Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist die Verschiebung von einem pro-inflammatorischen zu einem anti-inflammatorischen Zytokinprofiles zum einen bedingt durch die vermehrte Synthese anti-inflammatorischer Th2-Zytokine wie z.B. IL-10 und IL-4 und zum anderen bewirkt durch die Reduktion der Syntheserate von pro-inflammatorischen Th1-Zytokinen zu denen IL-12, TNF-alpha und IFN- γ zählen. Die Untersuchung des Zytokinmusters ist Inhalt mehrerer Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen, deren experimentelle Daten zu teilweise widersprüchliche Ergebnissen führten. Ein weiterer Aspekt der von Yong diskutiert wurde, ist die Inhibition der Leukozytenmigration durch die BHS wobei die entscheidende Rolle der vermehrten

Konversion zellständiger Adhäsionsmoleküle in die lösliche (soluble) Form neben der verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. der Integrine auf VLA-4 und LFA-1 auf T-Lymphozyten sowie VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen, zugeschrieben wird. Des Weiteren wird die Inhibition der Leukozytenmigration durch die Reduktion der Expression von Chemokinrezeptoren, Matrix-Metalloproteasen und die verminderte Anzahl von Matrix-Metalloproteasen-exprimierender Zellen diesbezüglich unterstützend beschrieben.

Im Gegensatz zu den meisten Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit engmaschige Blutentnahmen angestrebt um frühzeitig relevante Schwankungen (Fluktuationen) der Immunparameter anhand von Variationskoeffizienten zu detektieren.

4.3.1 TNF-beta, sTNF-R1 und sTNF-R2

Bei den sTNF-Rezeptoren ist ihre Rolle im Rahmen der Pathogenese der MS zu großen Teilen noch nicht geklärt, jedoch konnte bereits in mehreren Studien die These einer Modulation der durch TNF-alpha vermittelten Entzündungsreaktion und damit Zeichen eines Therapieerfolges vermutet werden. Im Rahmen von Untersuchungen bezüglich der EAE konnte im Tiermodell der MS eine Inhibition der Demyelinisierung unter der Gabe von TNF-Rezeptoren nachgewiesen werden (Glabinski AR et al., 2004; Selmaj et al., 1995, Stoll et al., 1993). In weiteren Untersuchungen konnten im Liquor cerebrospinalis und im Serum von Patienten mit MS erhöhte Konzentrationen von löslichen TNF-Rezeptoren nachgewiesen werden, dies vor allem zwischen zwei Schubereignissen mit Maximum vier Wochen nach erlittenem Krankheitsschub, was die Vermutung einer negativen Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und der Bildung von sTNF-Rezeptoren nahe legt (Puccini-Sohler et al., 1995; Spuler et al., 1996; Bongianini et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Perini beschrieb einen langfristigen und zugleich signifikanten Anstieg der Konzentration von sTNF-R1 und sTNF-R2 unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a über ein beobachtetes Zeitintervall von 12 Monaten (Perini et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte im Prä-Post-Vergleich ebenso eine signifikante Zunahme der Konzentration von sTNF-R2 im Serum gefunden, hinsichtlich des Serumspiegels von sTNF-R1 jedoch keine signifikante Tendenz verzeichnet werden. Bereits in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde ein deutlicher Anstieg der Serumkonzentration von sTNF-R1 und sTNF-R2 unter einer Immunprophylaxe mit Interferon beschrieben (Laske et al., 2001), jedoch können in anderen Untersuchungen differierende Ergebnisse diesbezüglich gefunden werden. Auf der Suche nach einer Erklärung für die erhöhte Serumkonzentration von sTNF-R2 unter einer immunmodulatorischen Basistherapie konnte bislang kein Zusammenhang erhoben werden. Denkbar wäre hierbei eine indirekte Wirkung von IFN beta-1a über einen Konzentrationsanstieg von IL-10, den sog. Zytokinsynthese-Inhibitionsfaktor, welcher u.a. von aktivierten B-Zellen und Makrophagen produziert wird. IL-10 bewirkt eine verminderte Bildung von antigenpräsentierenden Zellen mittels einer reduzierten Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche und hat somit eine Hemmung der T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion als anti-inflammatorischen Effekt zur Folge. Im Hinblick auf sTNF-R2 vermittelt IL-10 dessen Expression auf der Oberfläche von Monozyten.

Bezüglich TNF-beta, welcher bei der MS als pro-inflammatorisches Zytokin fungiert und als einer der Initiatoren der Entzündungsreaktion gehandelt wird konnte im Prä-Post-Vergleich keine statistisch signifikante Ab- oder Zunahme in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Hierbei muss kritisch angemerkt werden, dass bei einem Teil der untersuchten Patienten TNF-beta unter dem Detektionslimit des ELISA-Testsystems lag und somit die Aussagekraft als eingeschränkt gewertet werden muss. Zytokine besitzen nur eine sehr kurze biologische Halbwertszeit, die den Nachweis im Serum wie auch im Liquor cerebrospinalis erschweren oder sogar unmöglich machen kann (Weber und Rieckmann, 1995).

Die Betrachtung der Variationskoeffizienten bei Patienten mit engmaschigen Blutentnahmen lieferte weder bei den löslichen TNF-Rezeptoren, noch bei der Auswertung von TNF-beta Hinweise auf statistisch signifikante Schwankungen der Proteinkonzentrationen im Serum unter einer immunmodulierenden Therapie.

4.3.2 sIL4R

In Bezug auf die MS finden sich nur wenige Veröffentlichungen die den Zusammenhang der Pathogenese der MS mit der Expression von Interleukin-4 und seinem korrespondierenden Rezeptor untersuchen.

IL-4 wird von basophilen Granulozyten, Mastzellen und vorzugsweise von Th2-Zellen gebildet und vermittelt u.a. die T- und B-Zellproliferation neben der vermehrten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen (Chomarat und Banchereau, 1998; Davey et al., 1998). Der Immunhistochemische Nachweis von IL-4 in MS-Läsionen (Canella und Raine, 1995) und IL-4-sezernierender Zellen im Blut von MS-Patienten (Link et al., 1994) sprechen für eine Involvierung dieses Zytokins in die Immunpathogenese der MS. Zudem konnte im EAE-Modell der Krankheitsausbruch durch die Vorbehandlung der Ratten mit IL-4 und IL-10 verhindert werden (Olsson, 1995). Die Forschungsgruppe um Racke konnte 1996 durch die Applikation von IL-4 kurz nach Induktion der EAE das klinische Bild der Versuchstiere verbessern, des Weiteren konnte hierbei eine Inhibition proinflammatorischer Zytokine im ZNS neben einer Reduktion der Demyelinisierung erzielt werden. Ferner konnte in Studien gezeigt werden, dass die Freisetzung von IL-4 und IL-10 von antigenpräsentierenden Zellen die Aktivität autoreaktiver Lymphozyten suprimiert (Müller et al., 1996).

Wie in der Einleitung beschrieben wird die biologische Aktivität von IL-4 über spezifische Oberflächenrezeptoren wie dem IL-4R, einem Mitglied der Hematopoietin Receptor Superfamily, gesteuert. Durch die Bindung von IL-4 an den IL-4R wird dessen Halbwertszeit verlängert, da IL-4 in dieser gebundenen Form weniger schnell abgebaut wird (Fernandez-Botran et al., 1991). Die lösliche Form (sIL-4R) entsteht ausschließlich durch das sogenannte „shedding“, die proteolytische Spaltung des membrangebundenen Rezeptors (Gessner et al., 2000). Regulierend in der sIL-4R Produktion greifen Metalloproteinasen ein (Jung et al., 1999).

Die Funktionen und Wirkungsweise des sIL-4R sind erstaunlicherweise abhängig von seiner Konzentration (Jung et al., 1999). Eine geringe Konzentration an sIL-4R verstärkt die antagonistische Aktivität des IL-4 gegenüber IFN- γ -Produktion, während hohe Konzentrationen von sIL-4R die Neutralisierung von IL-4 bedingen.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Prä-Post-Vergleich eine signifikant abnehmende Tendenz der Konzentration von sIL-4R im Serum unter der Immunprophylaxe mit IFN beta-1a (AVONEX®) nachgewiesen werden. Die Abnahme der Serumkonzentration an sIL-4R zeigt hierbei die anti-inflammatorische Wirkung und lässt hypothetisch eine Therapieresponse der Patienten vermuten. Die Korrelation mit klinischen Parametern wird an entsprechender Stelle im Verlauf diskutiert.

Die Untersuchung der Variationskoeffizienten bei Patienten mit engmaschigen, 14-tägigen Blutentnahmen bot auch hierbei keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

4.3.3 Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) stellt ein einfachkettiges 76 bis 114 kD schweres Zelloberflächenglykoprotein aus der Superfamilie der Immunglobuline dar (Staunton et al., 1988). Auch das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), welches aus sieben Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht wird zu den Mitgliedern der Superfamilie der Immunglobuline gerechnet (Hession et al., 1991).

Beide Adhäsionsmoleküle sind über eine Interaktion mit ihren entsprechenden Liganden (LFA-1, VLA-4) in der Lage aktivierte autoreaktive T-Lymphozyten an das Gefäßendothel der BHS zu binden. Dieser Prozess wiederum ermöglicht die Penetration autoaggressiver Zellen in das ZNS und stellt mitunter einer der wichtigsten Voraussetzungen im Entzündungsprozess der MS dar.

Unter dem Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine (IFN- γ , TNF-alpha) wird die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in den Endothelzellen hochreguliert. Durch das sich anschließende, sogenannte „shedding“ entstehen jeweils die löslichen Formen (sICAM-1 und sVCAM-1) welche indirekt die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 an der Zelloberfläche der Endothelzellen widerspiegeln (Archelos und Hartung, 1997).

Einer der immunmodulatorischen Wirkungsaspekte einer Therapie mit IFN-beta bei MS stellt die Inhibition der Leukozytenmigration durch die BHS dar. Es wird vermutet, dass dies durch eine Verminderung der Expression von

Adhäsionsmolekülen (Integrine VLA-4 und LFA-1 auf T-Lymphozyten; VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen) neben einer verstärkten Konversion zellständiger in lösliche Adhäsionsmoleküle erzielt wird (Yong, 2002).

Bedingt durch ihre prozessdominierende Rolle an der BHS und die Tatsache, dass der Nachweis von sICAM-1 und sVCAM-1 im Serum gut gelingt, legte Spekulationen nahe, dass sowohl sICAM-1 als auch sVCAM-1 zu den seit langer Zeit vergeblich gesuchten Aktivitätsmarkern der MS gehören könnten (Sorensen 1999).

In verschiedenen Untersuchungen unter einer Therapie mit IFN-beta-1b konnte eine Zunahme der Serumkonzentration von sICAM-1 (Trojano et al., 2000) als auch von sVCAM-1 (Ossege et al., 1998; Calabresi et al., 1997) nachgewiesen werden. Graber et al. untersuchten 2005 das Verhalten von sVCAM-1 unter einer immunmodulatorischen Therapie mit IFN beta-1a, hierbei konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Konzentration im Serum dieses Adhäsionsmoleküles gezeigt werden.

Im Rahmen der statistischen Auswertung der vorliegenden Arbeit ließ sich bezogen auf die Konzentration der Adhäsionsmoleküle im Serum nur eine statistisch grenzwertige Zunahme von sICAM-1 bei Patienten mit einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr nachweisen. Auch für sVCAM-1 ergaben die Messungen eine wenn auch nur geringfügige, jedoch nicht statistisch signifikante Zunahme. Beides deutet darauf hin, dass es auch unter dem Therapieeinfluss von IFN-beta-1a (AVONEX®) zu einem vermehrten „Shedding“ der Adhäsionsmoleküle kommt und somit durch eine denkbare kompetitive Inhibition der Liganden auf autoreaktiven T- Lymphozyten eine weitere Bindung an die BHS verhindert und damit einem Entzündungsprozess entgegengewirkt wird.

Ein statistisch signifikantes Ergebnis in der Untersuchung der Variationskoeffizienten bei Patienten mit 14-tägigen Blutentnahmen konnte auch hier nicht erhoben werden.

4.4. Immunologische Parameter als Aktivitätsmarker der MS

Um die therapeutischen und die diagnostischen Maßnahmen bei der MS zu optimieren sind zuverlässige biologische Marker zur objektiven Messung der Krankheitsaktivität wünschenswert. Unterstützend kann die Aktivität der MS-Erkrankung eines einzelnen Patienten anhand verschiedener klinischer Parameter beschrieben werden. Hierzu zählt die Anzahl der erlittenen Schubereignisse. In der vorliegenden Arbeit wurden immunologische Parameter mit diesem klinischen Parametern korreliert. Zusätzlich wurde das unter der Immunprophylaxe mit IFN-beta-1a (AVONEX®) auftretende Nebenwirkungsprofil mit dem Expressionsprofil der immunologischen Parameter in Korrelation gesetzt. Des Weiteren wurden magnetresonanztomographische Befunde mit der immunologischen Situation der Patienten in Beziehung gesetzt.

4.4.1 Korrelationen der immunologischen Situation mit dem Auftreten von Krankheitsschüben

Bedingt durch engmaschige Blutentnahmen, welche bei 17 Patienten durchgeführt werden konnten gelang der Vergleich der immunologischen Parameter vor, während und nach einem Krankheitsschub bei insgesamt neun dokumentierten Ereignissen. Die Zeitintervalle „vor“ und „nach“ einem Krankheitsschub betrugen hierbei jeweils vier Wochen, die Messwerte „während“ eines Schubereignisses wurden innerhalb der dokumentierten Schubdauer, welche zwischen 10 und 35 Tagen variierte, ermittelt.

Vereinfachend ist der auslösende Mechanismus eines Schubereignisses im Rahmen der MS die Aktivierung von im Blut zirkulierender „ruhender“ autoreaktiver T-Lymphozyten, wodurch die Penetration der BHS ermöglicht wird. Die Aktivierung der T-Lymphozyten erfordert hierbei einerseits die Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit antigenpräsentierenden Zellen (APZ), welche das Antigen im Kontext mit MHC-II-Molekülen präsentieren und andererseits die Bindung kostimulierender Moleküle auf APZ an ihre Liganden auf den T-Lymphozyten (Hartung, 1996; Mitrovic et al., 1999). Als mögliche Trigger kommen virale und bakterielle Superantigene,

molekulares Mimikry neben pro-inflammatorischen Zytokinen in Betracht (Hartung, 1996; Wucherpfennig und Strominger, 1995). Die Überwindung der BHS erfolgt mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen und Metalloproteinasen (Leppert et al., 1995). Um nun im ZNS eine lokale Entzündungsreaktion initiieren zu können, muss eine Reaktivierung der eingewanderten T-Lymphozyten stattfinden. Diese erneute Aktivierung erfolgt durch APZ des Gehirns (Mikrogliazellen und Astrozyten), welche die entsprechenden antigenen Epitope (Myelinbestandteile) zusammen mit MHC-II-Molekülen präsentieren (Aloisi et al., 2000). Nach Wiedererkennen ihrer Zielantigene und anschließender Proliferation werden von den eingewanderten autoreaktiven T-Lymphozyten Zytokine freigesetzt, durch welche eine Entzündungskaskade mit Aktivierung von Astrozyten, Makrophagen, Mikroglia und Endothelzellen ausgelöst wird. Der Hauptanteil dieser T-Lymphozyten kann der CD4+Th1-Subpopulation zugerechnet werden. Th1-Zellen sezernieren pro-inflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF- α , TNF- β) frei. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Produktion an Monokinen und Chemokinen durch Makrophagen und Mikrogliazellen. Die Folge ist eine weitere Rekrutierung immunkompetenter Zellen durch eine Erhöhung der Anzahl von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche der Endothelzellen und schließlich der Zusammenbruch der BHS. Ein Teil dieser Adhäsionsmoleküle wird nach ihrer Aktivierung von der Zelloberfläche abgelöst und sind anschließend als lösliche Moleküle im Blut z.B. mittels ELISA nachweisbar. Die Konzentration der zirkulierenden Adhäsionsmoleküle sowie ihrer Rezeptoren gelten als Indikatoren für die Dysfunktion der BHS.

Verschiedene Untersuchungen konnten den Zusammenhang einer Zunahme der Serumkonzentration von sICAM-1 und auch von sVCAM-1 im Rahmen akuter Krankheitsschübe zeigen (Rieckmann et al., 1994; Sharief et al., 1993; Hartung et al., 1993; Khoury et al., 1999; Matsuda et al., 1995). Kallmann et al. postulierten 2000, dass die Konzentrationsanstiege von sICAM-1 und sVCAM-1 während eines Schubereignisses als endogene Regulationsmechanismen zur Verminderung der Adhäsion angesehen werden können. In einer Untersuchung über einen Zeitraum von 12 Monaten und engmaschigen Blutuntersuchungen konnte Rieckmann 1994 erhöhte Serumkonzentrationen von sICAM-1 während eines Schubes, verglichen mit Patienten ohne Schubereignis nachweisen (Rieckmann et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Bezug auf sICAM-1 im Minimum, Maximum und hinsichtlich des Mittelwertes ebenso, wenn auch nicht signifikant, die höchsten

Konzentrationen im Serum während der registrierten Krankheitsschübe nachgewiesen werden, der Median lässt hierbei eher eine insgesamt abnehmende Tendenz vermuten. Interessanterweise konnte in der Untersuchung des gesamten Prüfkollektives signifikant höhere Serumkonzentrationen bei Patienten ohne Schubereignis unter Therapie mit IFN-beta 1a gefunden werden.

Bei s-VCAM-1 fiel allenfalls eine leichte, statistisch jedoch nicht signifikante Zunahme des Medians während und vier Wochen nach erlittenem Schubereignis auf.

Bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion im Rahmen der MS spielen die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF-alpha neben dem in dieser Arbeit gemessenem TNF-beta eine entscheidende Rolle. Daneben sind diese bedingt durch ihre Zytotoxizität gegen Oligodendrozyten an der Zerstörung der Myelinscheiden mit großem Einfluss beteiligt (Selmaj et al., 1988). Ihre biologische Aktivität wird über spezifische Zelloberflächenrezeptoren, TNF-R1 (p55) und TNF-R2 (p75), vermittelt. Ebenso wie die Adhäsionsmoleküle entstehen die löslichen Formen der beiden Rezeptoren (sTNF-R1 und sTNF-R2) durch das sog. „shedding“, wodurch sie im Serum nachgewiesen werden können (Porteu et al., 1990). Sie sind in der Lage, konzentrationsabhängig zirkulierendes TNF-alpha und TNF-beta zu neutralisieren (Seckinger et al., 1989). Hierbei wird angenommen, dass niedrige Serum-konzentrationen von sTNF-R1 und sTNF-R2 eine verlängerte Halbwertszeit von TNF-alpha und TNF-beta bewirken, indem sie die Dissoziation dieser pro-inflammatorischen Zytokine in inaktive Monomere verhindern (Aderka et al., 1992; Bongianni et al., 1997). Rückfolgernd wirken sich niedrige Konzentrationen an sTNF-R1 und sTNF-R2 negativ auf das Entzündungsgeschehen der MS durch Unterhaltung der Wirkung pro-inflammatorischer Zytokine aus, während hohe Konzentrationen dem Entzündungsprozess entgegenwirken. Unterstützend konnte im Modell der EAE die Rolle von sTNF-R1 (p55) und sTNF-R2 (p75) als Inhibitoren der Demyelinisierung nachgewiesen werden (Glabinski AR et al., 2004; Selmaj et al., 1995, Stoll et al., 1993), wobei die inhibitorische Wirkung vermehrt über sTNF-R2 vermittelt wird (Terlizzese et al., 1996).

Die Rolle der löslichen TNF-Rezeptoren in der Pathogenese der MS rückte diese auf der Suche nach Surrogatmarkern von Schubereignissen in den Mittelpunkt verschiedener Untersuchungen. Rieckmann et al. wiesen 1994 bei Patienten erhöhte Serumkonzentrationen von sTNF-R1 vier Wochen nach Beginn eines

Krankheitsschubes nach und folgerten daraus, dass sTNF-R1 mit einer Remission der MS assoziierbar ist. Diese Beobachtung konnte in weiteren Untersuchungen im Liquor cerebrospinalis und im Serum von Patienten mit MS bestätigt werden, was die Vermutung einer negativen Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und der Bildung von sTNF-Rezeptoren unterstreicht (Puccini-Sohler et al., 1995; Spuler et al., 1996; Bongiani et al., 1997).

Der Vergleich der Expressionsprofile immunologischer Parameter im Rahmen dokumentierter Schubereignisse zeigte in der statistischen Auswertung hinsichtlich des sTNF-R1 während den Schubintervallen im Mittel eine abnehmende Tendenz, im Median jedoch keine wesentlichen Veränderungen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch die Gruppe um Biliska 2002. Hierbei wurden die Serumkonzentrationen von sTNF-R1 zu Beginn und nach einem Schubereignis mit ELISA gemessen, wobei weder ein signifikanter Anstieg, noch eine signifikante Zunahme gefunden werden konnte. Auch bei sTNF-R2 boten sich in der vorliegenden Arbeit keine statistisch relevanten Auffälligkeiten, jedoch konnte für Patienten mit engmaschigen Blutentnahmen ein höheres durchschnittliches Niveau während Schubereignissen nachgewiesen werden.

TNF-beta fand bislang in Untersuchungen des Zytokinmusters während eines Schubereignisses wenig Beachtung. Glabinski et al. konnten 1991 eine erhöhte Serumkonzentration dieses pro-inflammatorischen, zytotoxischen Zytokins während eines Krankheitsschubes nachweisen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine abnehmende Tendenz während einer klinischen Exazerbation, allerdings muss hierbei kritisch angemerkt werden, dass bei einem Teil der Patienten die Serumkonzentrationen dieses Parameters unterhalb des Detektionslimits des ELISA-Testsystems lagen, so dass von einer verminderten Aussagekraft der Ergebnisse ausgegangen werden muss.

Entgegengesetzt aller Erwartungen konnten rückblickend keine signifikanten Korrelationen zwischen der immunologischen Situation und dem Auftreten von Krankheitsschüben gefunden werden. Denkbar ist, dass beispielsweise intraindividuellen Schwankungen der Patienten aufgrund der geringen Anzahl eine höhere Gewichtung verglichen mit einem größerem Patientenkollektiv zukommt und dadurch bedingt Signifikanzen schwerer zu ermitteln sind. Des Weiteren kann auch die Wahl des ELISA-Testverfahrens eine Rolle spielen, da die kurze

Halbwertszeit der Zytokine sowie uncharakteristische Schwankungen zu Ungenauigkeiten führen können (Sivieri, 1998; Link 1998).

4.4.2 Korrelationen der immunologischen Situation mit dem Auftreten von Nebenwirkungen

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war eine Korrelation der einzelnen immunologischen Parameter mit dem Nebenwirkungsprofil unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit IFN beta-1a (AVONEX®) zu detektieren. Das Nebenwirkungsprofil umfasst vor allem grippale Begleiterscheinungen neben Blutbildveränderungen und Irritationen an den Injektionsstellen, welche vor allem zu Therapiebeginn auftreten und im Zeitverlauf eine rückläufige Tendenz des Ausprägungsgrades erkennen lassen. In der Auswertung der erhobenen Daten konnten keine statistisch signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden, jedoch ein durchschnittlich höheres Niveau der Serumkonzentrationen von sTNF-R1 und sICAM-1 bei Patienten mit leichten Nebenwirkungen und TNF-beta bei Patienten mit einer mittelgradigen bis schweren Ausprägung des Nebenwirkungsprofils erhoben werden. Da mit dem Auftreten von Nebenwirkungen bei einer Zahl von Patienten die zusätzliche Medikation mit antiphlogistischen Präparaten zu eruieren war, kann ein hierdurch bedingter Einfluss auf das individuelle immunologische Profil nicht von der Hand gewiesen werden.

4.4.3 Korrelation der immunologischen Parameter mit der Läsionslast in der kranialen magnetresonanztomographischen Bildgebung

Die Magnetresonanztomographie ist eine seit langem etablierte hochsensitive Methode um Veränderungen im ZNS wie sie bei der MS zu finden sind, nachzuweisen. In mehreren Untersuchungen wurden bereits die, für die Pathogenese der MS-signifikanten immunologischen Parameter mit der Anzahl und

dem Auftreten neuer, z.T. kontrastmittelanreichernder Läsionen in Korrelation gesetzt.

Die Schädigung der BHS durch peripher aktivierte T-Lymphozyten wird als das entscheidende Ereignis der Pathogenese der MS gewertet. Mit Hilfe der Applikation von Kontrastmittel (Gadolinium-DTPA) kann die Dysfunktion der BHS bildmorphologisch sichtbar gemacht und eine entzündliche Aktivität 5-10 mal häufiger und damit sensitiver als in klinischen Untersuchungen nachgewiesen werden (Miller et al., 1993). Querschnitts- und Längsschnittuntersuchungen zeigten, dass bei Patienten mit klinisch fortschreitender Erkrankung und einer Zunahme der Läsionslast die Adhäsionsmoleküle sICAM-1 und sVCAM-1 sowohl im Serum, als auch im Liquor erhöht waren (Droogan et al., 1996). Eine positive Korrelation konnte in Bezug auf die Läsionsfläche und den Serum- und Liquorkonzentrationen von sICAM-1 und sVCAM-1 gefunden werden (Rieckmann et al., 1997). Hartung et al. konnten 1995 ebenso eine positive Korrelation der löslichen Adhäsionsmoleküle mit der Anzahl aktiver, Gadolinium aufnehmender Herde im MRT nachweisen. Eine Erhöhung der Serumkonzentration von sVCAM-1 konnte des Weiteren unter einer Immunprophylaxe mit Interferon beta-1a verzeichnet werden und wurde im Zusammenhang mit der Reduktion kontrastmittel-anreichernder Herde im MRT als abdichtender Effekt der Blut-Hirn-Schranke als mögliches Wirkprinzip von IFN-beta beschrieben (Graber J et al. 2005; Avolio et al. 2003). Des Weiteren konnte eine Überexpression von VCAM-1 und ICAM-1 durch Astrozyten und Endothelzellen mit einem Maximum der Intensität in aktiven chronischen Entzündungsherden nachgewiesen werden (Sobel et al., 1990; Canella et al., 1995; Soilu-Hanninen et al., 2005). Daneben wies Khoury 1999 eine deutliche Zunahme der Konzentration im Serum von sICAM-1 bei Patienten der schubförmigen Verlaufsform bei Auftreten kontrastmittel-anreichernder Läsionen nach.

Im Hinblick auf Zytokine und ihre Rezeptoren finden sich in der Literatur im Vergleich zu den Adhäsionsmolekülen nur wenige Untersuchungen. Khoury et al. konnten eine deutliche Erhöhung der Serumkonzentration von sTNF-R1 mit einer Zunahme der Läsionslast im MRT bei Patienten der chronischen Verlaufsform in Zusammenhang bringen (Khoury et al., 1999). TNF-beta konnte als ein an der Zerstörung der Myelinscheiden im Rahmen der MS beteiligtes, pro-

inflammatorisches Zytokin in chronischen und akuten Läsionen im ZNS nachgewiesen werden (Selmaj et al., 1991; Canella et al., 1995).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante Abnahme der kontrastmittelanreichernden Herde in der Prä-Post-Analyse nachgewiesen werden. In der Korrelation mit den immunologischen Parametern zeigte sich signifikant eine negative Korrelation zwischen der mittleren Läsionsfläche und TNF-beta.

Das Auftreten kontrastmittelanreichernder Läsionen bot entgegengesetzt der Erwartungen keinerlei signifikante Korrelation mit den gemessenen immunologischen Parametern.

Auch hier muss erneut die geringe Patientenzahl als mögliche Ursache der Ergebnislage neben möglichen Unterschieden in den Untersuchungsprotokollen verschiedener radiologischer Abteilungen (bei einigen Patienten standen zur MRT-Auswertung nur Fremdaufnahmen verschiedener radiologischer Praxen zur Verfügung) diskutiert werden. Bereits geringfügige Abweichungen in der Schichtführung, Schichtdicke und Positionierung des Patienten können die Vergleichbarkeit der Verlaufsuntersuchungen vehement reduzieren.

4.5. Unterschiede der immunologischen Profile zwischen Respondern und Nonrespondern

Keine der heute in der Therapie der MS zugelassene Therapieform kommt dem Idealziel nahe die klinische Progression und Krankheitsschübe langfristig zu verhindern und wenige Nebenwirkungen zu haben. Allein die Heterogenität der Erkrankung sowie die Individualität des einzelnen Patienten und die gewonnenen Erfahrungen aus verschiedenen klinischen und pharmakologischen Studien lehren, dass neben der wünschenswerten Therapieresponse viele Patienten nicht von einer immunmodulatorischen Basistherapie profitieren.

Als Therapie-Responder wurden Patienten klassifiziert, welche unter einer immunmodulatorischen Basistherapie mit Interferon beta-1a (AVONEX®) keine weiteren Krankheitsschübe und keinen Progress auf der EDSS aufwiesen. Demgegenüber stehen die Nonresponder, Patienten mit nachgewiesenen Schubereignissen und Krankheitsprogression unter Therapie.

Zur Einteilung der Patienten in die Gruppen der Responder und Nonresponder erfolgte ein Vergleich der Schubrate im therapienaiven Intervall mit der Anzahl der Krankheitsschübe im Beobachtungszeitraum dieser Studie über 12 Monate. Da bedingt durch vorzeitige Studienabbrüche aus unterschiedlichen Gründen bei einigen Patienten der Beobachtungszeitraum von einem Jahr nicht verifiziert werden konnte, wurde hierbei ein sogenanntes „Referenzintervall“ ermittelt, wobei die Anzahl der Schubereignisse der letzten 12 Monate vor Therapiebeginn für jeden Patienten mit der Beobachtungsdauer/Behandlung in Tagen proportional auf ein Intervall gleicher Länge umgerechnet wurde.

Insgesamt konnte bei 29 Patienten eine Reduktion der Schubrate unter Therapie verzeichnet und diese in die Gruppe der „Therapieresponder“ eingeordnet werden, bei sieben Patienten bot sich hingegen eine Zunahme der Schubfrequenz mit resultierender Zuordnung in die Gruppe der „Nonresponder“.

Als statistisch signifikant zeigte sich Im Gesamtkollektiv bei den Respondern eine erhöhte Serumkonzentration an sICAM-1 was die funktionell relevante Rolle der Adhäsionsmoleküle als Mediator der IFN-beta-Wirkung in der Pathogenese der Multiplen Sklerose unterstreicht.

Interessanterweise konnte im Rahmen der MRT-Auswertung bei Respondern eine signifikant höhere Anzahl an kontrastmittelanreichernden Läsionen gefunden werden, allerdings muss hier kritisch beachtet werden, dass die Gruppe der Responder 29 Patienten gegenüber sieben Patienten in der Gruppe der Nonresponder enthält.

Da es wünschenswert ist möglichst frühzeitig eine Aussage über die Therapieresponse eines MS-Patienten treffen zu können, lag das Hauptaugenmerk auf Veränderungen der Serumkonzentrationen der immunologischen Parameter bei den Patienten die engmaschige Blutuntersuchungen zuließen – die Untersuchung der Messwerte dieser Patienten bot diesbezüglich jedoch keine Auffälligkeiten.

5. Zusammenfassung und Ausblick / Summary (Deutsch/Englisch)

Die MS zählt zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen, die bereits im frühen Erwachsenenalter zu einer dauerhaften Behinderung führen kann. Sie stellt eine chronisch entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des ZNS dar, deren klinischer und subklinischer Verlauf einer breiten Heterogenität unterliegt und deren Ätiologie trotz Fortschritten in den medizinischen Bereichen der Neuroimmunologie, der Neurogenetik und der bildgebenden Verfahren bislang ungeklärt ist. Neuere Untersuchungen sprechen dafür, dass die Immunpathogenese der MS komplexer als bisher angenommen zu sein scheint.

Das Wissen um die Tatsache, dass irreversible Schädigungen der Nervenzellen bereits frühzeitig im Krankheitsverlauf auftreten, legt die Forderung nach einer verlässlichen Diagnosestellung und therapeutischen Intervention im Frühstadium der MS nahe. Die aktuellen Modifizierungen der MS-Kriterien erlauben es, eine frühzeitige Diagnose anhand klinischer und magnetresonanztomographischer Parameter zu stellen. Hinsichtlich des bislang führenden Therapieregimes mit immun-modulatorischen Substanzen, zu denen auch IFN-beta 1a (AVONEX®) zählt, ist bekannt, dass nicht alle Patienten gleichermaßen von einer Immunprophylaxe profitieren. Wünschenswert wäre es zeitnah zu Therapiebeginn eine Aussage über die Therapieresponse und den Krankheitsverlauf eines jeden MS-Patienten anhand biologischer Marker treffen zu können. Die subklinische Krankheitsaktivität lässt sich zwar mit der Magnetresonanztomographie sensitiv ermitteln, jedoch lassen sich hierdurch keine Aussagen über die zugrunde liegenden Pathomechanismen treffen und zudem spielt der Kostenfaktor engmaschige MRT-Untersuchungen eine große Rolle.

Im Serum und Liquor von MS-Patienten wurden bislang vielversprechende Marker untersucht, die zum einen eine Erfassung der Krankheitsaktivität und des Therapieerfolges ermöglichen und auch die unterschiedlichen Aspekte der MS-Pathogenese reflektieren. Hierzu zählen v.a. Adhäsionsmoleküle und Zytokine neben Myelinabbauprodukten und glialen und neuronalen Proteinen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Immunparameter wurden aufgrund der bislang bekannten Pathomechanismen im Rahmen der MS ausgewählt und ihre Konzentration im Serum mittels ELISA-Testverfahren ermittelt. Um zeitnah zu Therapiebeginn eine Aussage über das Ansprechen der Therapie treffen zu können, wurden engmaschige Blutentnahmen über das Beobachtungs-

intervall von 12 Monaten angestrebt, was sich jedoch nicht bei allen rekrutierten Patienten aus verschiedenen Gründen realisieren ließ. Das Ziel hierbei war es Fluktuationen der gemessenen Serumkonzentrationen der Immunparameter aufzudecken. Zudem wurden klinische Parameter neben paraklinischen Parametern mit dem Immunlabor in Beziehung gesetzt und die Einteilung der Patienten in „Responder“ und „Nonresponder“ berücksichtigt.

Derzeit existiert kein einzelner Marker, der die für einen Surrogatmarker erforderlichen Kriterien erfüllt. Erschwerend kommt hinzu, das bisherige, diesbezüglich ausgelegte Untersuchungen z.T. kontroverse Ergebnisse lieferten. Daraus resultiert die Forderung nach einem standardisiertem Vorgehen bei der Gewinnung, Bearbeitung und Lagerung des Probenmaterials sowie die Kombination unterschiedlicher Messverfahren neben einer unabdingbaren einheitlichen Definition der klinischen Verlaufsformen und der Krankheitsaktivität. Ebenso könnten Studienprotokolle mit eindeutigen Einschluss- und Ausschlusskriterien und standardisierten klinischen Scores neben der Korrelation von biologischen Markern und bildgebenden Verfahren sowie die Kombination von Parametern aus verschiedenen Körperflüssigkeiten entscheidend bei der Suche nach Surrogatmarkern beitragen.

Mittels des in dieser Arbeit durchgeführten anwendungsorientierten Screenings MS-relevanter immunologischer Parameter ergaben sich interessante Einblicke in die immunologische Situation von MS-Patienten unter einer immunmodulierenden Basistherapie mit IFN-beta 1a (AVONEX®):

- Im Prä-Post-Vergleich zeigte sich im gesamten Patientenkollektiv eine signifikante Zunahme der Serumkonzentration von sTNF-R2 neben einer signifikanten Abnahme von der Konzentration von sIL-4R unter der Therapie mit IFN-beta 1a (AVONEX®).
- Bei der Korrelation der immunologischen Parameter mit dem Nebenwirkungsprofil bot sich eine signifikante Abnahme der Serumkonzentration des sIL-4R bei Patienten mit leichten Nebenwirkungen. Bei Patienten mit mittelgradiger oder schwerer Ausprägung des Nebenwirkungsprofils zeigte sich TNF-beta signifikant erhöht. Bei Patienten mit engmaschigen, 14-

tägigen Blutentnahmen konnten signifikant höhere Serumkonzentrationen von sICAM-1 ermittelt werden.

- In der Untersuchung der Therapieresponse konnte ein signifikant höheres Niveau der Serumkonzentrationen von sICAM-1 in der Gruppe der Responder gezeigt werden.
- Im gesamten Prüfkollektiv konnten signifikant höhere Konzentrationen im Serum von sICAM-1 bei schubfreien Patienten gefunden werden.
- In der Auswertung der MRT-Befunde ließ sich eine signifikante Abnahme der kontrastmittelanreichernden Läsionen nachweisen.

Summary

Multiple sclerosis is one of the most neurological diseases which may lead to a permanent disability at the early adult age. It represents a chronic demyelinating disease of the central nervous system showing a broad variety of its clinical course. Despite progress in the medical fields like neuroimmunology, neurological genetics and the development of magnetic resonance imaging the precise etiology of multiple sclerosis is still unknown. In new studies it is suggested that the immunologic pathogenesis of multiple sclerosis is more complex as it was supposed so far.

The knowledge of the appearance of irreversible damages of the nerve cells in the beginning of disease claims a reliable diagnosis and therapeutic measures at the early stage of multiple sclerosis. The updated diagnosis-criteria of the multiple sclerosis allow a reliable diagnosis at an early stage of disease with the help of clinical parameters and the results of the magnetic resonance imaging. It is known, concerning the immune-modulating therapies of multiple sclerosis, including IFN-beta 1a (AVONEX®) that not all patients profit equally from immune-modulating therapies. It would be desirable to pre-estimate the response of each patient to an immune-modulating therapy as well as the course of disease using biological

markers. The events in the central nervous system can be visualized sensitively by magnetic resonance imaging but this method is not able to elucidate the pathological pathways involved in immune-mediated disorders such as multiple sclerosis. Furthermore a frequent magnetic resonance imaging is very expensive. In blood samples and spinal fluid of patients suffering multiple sclerosis promising markers which may reflect the clinical disease activity, response to immune-modulating therapy as well as the different aspects of the pathogenesis of multiple sclerosis were examined. These includes above all adhesion molecules, cytokines among dismantling products of myelin as well as glial and neuronal proteins.

The immune parameters in this study measured by ELISA were specifically selected for the pathogenesis of multiple sclerosis. To pre-estimate the response to therapy more earlier frequent blood sampling was done over a period of one 12 months but due to several reasons could not be realised in all patients. The aim was to discover fluctuations in the measured serum levels of immune parameters. Besides clinical parameters and para-clinical parameters were correlated with the results of the immune parameters considering the patients disposition in “responders” and “nonresponders”.

At present there is no individual marker which fullfills the criteria necessary for a surrogate marker. Above all further studies concerning possible markers showed controversy of results. The outcome of this is the call for a standardised procedure concerning extraction, development and storage of the blood samples as well as the combination of different measuring procedures and standardised definition of the clinical course and disease activity. In the same way definite inclusion and exclusion criteria for all studies, standardised clinical scores apart from the correlation of biological markers and picture-giving procedures as well as the combination of parameters from different body fluids could play an important role in the search for surrogate markers.

In this study immune parameters specifically selected for the pathogenesis of multiple sclerosis were determined and gave following interesting views of the immunological situation of patients suffering multiple sclerosis under the treatment with IFN-beta 1a (AVONEX®):

- In all patients the comparison of serum levels at baseline and after the observation period under therapy showed a significant increase of sTNF-R2 apart from a significant decrease of sIL-4R.
- With the correlation of the immune parameters with the side effects a significant decrease of sIL-4R in patients with low side effects. Patients with side effects at least at the medium or severe level the concentration of TNF-beta was significantly increased. In patients with biweekly blood sampling significant higher serum levels of sICAM-1 could be found.
- Concerning therapy-response a significant higher serum level of sICAM-1 in the group of therapy responders was found.
- In all patients, patients without relapses showed a significant higher serum levels of sICAM-1.
- In the evaluation of the MRI-findings a significant decrease of gadolinium-enhancing lesions was proved.

6. Literaturverzeichnis

Aboul-Enein F, Bauer J, Klein M et al. (2004) Selective and antigen-dependent effects of myelin degeneration on central nervous system inflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 1284-1296

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

Allen IV, Millar JHD, Hutchinson MJ (1978) General disease in necropsy-proven cases of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* (1978), 4: 279-284

Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21: 141-147

Andersson PB, Goodkin DE (1998) Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J Neurol Sci* 18:16-25

Archelos JJ, Hartung HP (1997) The role of adhesion molecules in multiple sclerosis: biology, pathogenesis and therapeutic implications. *Mol. Med. Today* 3: 310-321

Archelos JJ, Hartung HP (2000) Pathogenetic role of autoantibodies in neurological diseases. *Trends. Neurosci* (2000), 23: 317-327

Avolio C, Guilani F, Liuzzi GM, Ruggieri M, Paolicelli D, Riccio P, Livrea P, Trojano M (2003) Adhesion molecules and matrix metalloproteinases in Multiple Sclerosis: effects induced by Interferon-beta. *Brain Res Bull* 2003. 61 (3): 357-364

Babinski J (1889) Recherches sur l'anatomie pathologique de la sclérose en plaques et étude comparative des diverses variétés de sclérose de la moelle. *Arch physiol (Paris)* 5-6 (series 3), (1885), 186-207

Barkhof F, Filippi M (1995) Can MRI be a predictor of long-term clinical outcome for MS? *Int MSJ* 2: 4-9

Bates IR, Harauz G (2003) Molecular dynamics exposes alpha-helices in myelin basic protein. *J Mol Model* 9: 290-297

Belardelli F, Gresser I (1996) The neglected role of Type I Interferons in the T-cell response: Implications for its clinical use. *Immunol. Today* 17:369-372

Ben-Nun A et al. (1981): Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature* (1981), 292 (5818): 60-61

Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD (2000). Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* (2000), 48: 893-901

Biliska M, Frydecka I, Podemski R, Gruszka E (2002) Serum levels of sTNFR-1 and sFas in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Med Sci Monit* (2002, Oct); 8 10:CR720-3

Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, Lassmann H, Lucchinetti C, Brück W (2001) A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; 49: 793-796

Bongianni J, Meucci T (1997) T-cell TNF-R binding in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 48 (1997): 826-831

Calabresi PA, Stone LA, Bash CN, Frank JA, Mc Farland HF. Interferon beta results in immediate reduction of contrast-enhanced MRI lesions in multiple sclerosis patients followed by weekly MRI. *Neurology* 1997; 48: 1446-1448

Calabresi PA, Tranquill LR, Dambrosia JM, Stone LA, Maloni H, Bash CN, Frank JA, Mc Farland HF (1997) Increases of soluble VCAM correlate with decrease in

MRI lesions in multiple sclerosis treated with interferon- β -1b. *Ann Neurol* 41: 669-674

Canella B, Raine C (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37: 424-435

Carlos TM, Harlan JM (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, 84: 2068-2101

Castelijns JA, Barkhof F (1999) Magnetic resonance (MR) imaging as a marker for multiple sclerosis. *Biomed Pharmacother* 1999; 53: 351-357

Carswell R (1838) *Pathological anatomy. Illustrations of the elementary forms of disease.* Longman, Orme, Brown, Green and Longmann, London

Cazzato G, Mesiano T, Antonello R, et al. (1995) Double-blind, placebo-controlled, randomized, crossover trial of high-dose methylprednisolone in patients with chronic progressive form of multiple sclerosis. *Eur Neurol* (1995), 35: 193-198

Chapman J, Vinokurov S, Achiron A et al. (2001) APOE genotype is a major predictor of long-term progression of disability in MS. *Neurol* 56: 312-316

Charcot JM (1868) *Histologie de la sclérose en plaques.* *Gaz. Hôpital (Paris)* 41 : 554

Chomarat P, Banchereau J (1998) Interleukin-4 and Interleukin-13. Their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol*, 17: 1-52

Clanet M, Radue EW, Kappos L, Hartung HP et al (2002) European IFN beta-1a (Avonex®) Dose-Comparison Study Investigators: A randomised, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2002; 59: 1507-1517

Comi G, Filippi M (1999) The effect of Glatiramer Acetate (Copaxone) on disease activity as measured by cerebral MRI in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* (1999), 52 (Suppl.), A 289

Comi G, Filippi M, Barkhof F et al. (2001) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357: 1576-1582

Compston A (1998) The story of multiple sclerosis, Mc'Alpines Multiple Sclerosis, 3rd Edition, Churchill Livingstone;)

Compston A (1997) Genetic epidemiology of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62; 553-561

Confavreux C, Aimard G, Devic M (1980) Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* (1980), 103: 281-300

Criswell LA, Pfeiffer KA, Lum RF et al. (2005) Analysis of families in the Multiple Autoimmune Disease Consortium (MADGS) Collection : the PTPN22 620W Allele Associates with Multiple Autoimmune Phenotypes. *Am J Hum Genet* 76: 561-571

Cruveilhier J (1829) Anatomie pathologique du corps humain: description avec figures lithographiées et coloriées des diverses altérations morbides dont le corps humains est susceptible. Baillière, Paris, p 42

Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J et al. (1999) Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. *Brain* (1999), 122: 871-882

Dal Canto MC, Rabinowitz SG (1982). Experimental models of virus induced demyelination of the central nervous system. *Ann Neurol* (1982), 11: 109-127

Dal Canto MC, Melvold RW, Kim BS, Miller SD (1995): Two models of multiple sclerosis: Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison. *Microsc Res Tech* (1995), 32: 215-229

Davey EJ, Thyberg J, Conrad DH, Severinson E (1998) Regulation and cell morphology in B Lymphocytes by IL-4: Evidence for induced cytoskeletal changes. *J Immunol*, 160: 5366-5373

Droogan A, McMillan S, Douglas J, Hawkins S (1996) Serum and cerebrospinal fluid levels of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: predominant intrathecal release of vascular cell adhesion molecule-1. *J Neuroimmunol* 64: 185-191

Ebers GC, Sadovnick AD, Rische NJ, The Canadian Collaborative Study Group (1995) A genetic basis for familial aggregation in MS. *Nature* 377; 150-151

Edwards S, Zvartau M, Clarke H, Irving W, Blumhardt LD (1998). Clinical relapses and disease activity on magnetic resonance imaging associated with viral upper respiratory tract infections in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (1998), 64: 736-741

Eichorst H (1886) Über infantile und hereditäre Multiple Sklerose. *Virchows Arch Path Anat* 146: 172-192

Esiri MM (1977) Immunglobulin-containing cells in multiple sclerosis plaques. *Lancet* (1977), 2: 478-480

Fazekas F, Strasser-Fuchs S, Kolleger H et al. (2001) Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with rapid progression of multiple sclerosis. *Neurol* 57: 853-857

Fernandez-Botran R, Vitetta ES (1991) Evidence that natural murine soluble interleukin 4 receptors may act as transport proteins. *J Exp Med* 174 (3): 673- 681

Filippi M (2001) Linking structural, metabolic and functional changes in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2001; 8: 291-297

Flachenecker P, Jung S, Rieckmann P, Toyka KV (2002) sICAM-1 is not a marker for disease activity in the relapse-free interval of multiple sclerosis – across-sectional pilot study. *J Neurol* (2002) 249: 1001-1003

Fog T (1950) Topographic distribution of plaques in the spinal cord in multiple sclerosis. *Arch Neurol* (1950), 63, 382-414

Fowler TJ (1989) Demyelinating disease of the central nervous system. In: Marsden CD, Fowler TJ (Eds.). *Clinical Neurology*. London: Edward Arnold (1989): 344-352

Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F et al. (2005) Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: A consensus report. *Arch Neurol* 62: 865-870

Galetta SL, Markowitz C, Lee AG (2002): Immunomodulatory agents for the treatment of relapsing multiple sclerosis: a systematic review. *Arch Intern Med* 2002; 162: 2161-2169

Gessner A, Rollinghoff M (2000) Biologic functions and signalling of the interleukin-4 receptor complexes. *Immunology* 201, 285-307

Gearing AJH, Newman W (1993). Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology. Today*, 14: 506-512

Glabinski AR, Bielecki B, Kawczak JA, Tuohy VK, Selmaj K, Ransohoff RM (2004) Treatment with soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFR): Fc/p80 fusion protein ameliorates relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis and decreases chemokine expression. *Autoimmunity* (2004) Sep-Nov; 37 (6-7): 465-471

Glabinski AR, Pokoca L, Tchorzewski H, Selmaj K (1991) Lymphotoxin production in multiple sclerosis patients. Arch Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 39, 285-290

Gold R, Rieckmann P (2000) Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose , 2.Auflage, UNI-MED Verlag AG, Bremen

Goodkin DE, Kinkel RP, Weinstock-Guttman B et al. (1998) A phase II study of i.v. methylprednisolone in secondary-progressive multiple sclerosis. Neurology (1998), 51: 239-245

Graber J, Zhan M, Ford D, Kursch F, Francis G, Bever C, Panitch H, Calabresi PA, Dhib-Jalbut S (2005) Interferon- β -1a induces increases in vascular cell adhesion molecule: implications for its mode of action in multiple sclerosis. Journal of Neuroimmunology 161 Issues1-2, (2005) 169-176

Grauer O, Offenhauser M, Schmidt J, Toyka KV, Gold R (2001): Glucocorticosteroid therapy in optic neuritis and multiple sclerosis. Evidence from clinical studies and practical recommendations. Nervenarzt (2001), 72: 577-589

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: 186-193

Hartung HP (1996) Pathogenese der Multiplen Sklerose: Stand der Forschung. Wien. Med Wschr 146: 520-527

Hartung HP, Michels M, Reiners K, Selldrayers P, Archelos JJ, Toyka KV (1993) Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. Neurology 43: 2331-2335

Haupts M, Pöhlau D, v Schayck R, Storch-Hagenlocher B, Sartor K, Gehlen W (2001). Neue Aspekte der MS-Therapie mit Glatirameracetat – eine aktuelle Übersicht. Akt Neurologie (2001), 28: 12-16

Hauw JJ, Delaère P, Seilhean D, Cornu P (1992) Morphology of demyelination in the human central nervous system. *J Neuroimmunol* (1992), 40: 139-152

Hein T, Hopfenmüller W (2000) Hochrechnung der Zahl an Multipler Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt* 71: 288-294

Herndon RM (1994) The changing pattern of misdiagnosis in multiple sclerosis. In: Herndon RM, Seil FJ (eds.) *Multiple sclerosis: current status of research and treatment*. New York: Demos 1994: 149-155

Herrera BM, Ebers GC (2003) Progress in deciphering the genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 16: 253-258

Hession C, Tizard R, Vassallo C, Schiffer SB, Goff D, Moy P, Chi-Rosso G, Luhowskyi S, Lobb R, Osborn L (1991) Cloning of an alternate form of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 266: 6682-6685

Hogancamp WE, Rodriguez M, Weinshenker BG (1997) The epidemiology of multiple sclerosis. *Mayo Clin Proc* 72: 871-878

Hohlfeld R, Meinl E, Weber F, Zipp F, Schmidt S, Sotglu S, Goebels N, Voltz R, Spuler S, Iglesias A, et al. (1995). The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* (1995), 45: 33-38

Holmes S, Siebold C, Jones EY et al. (2005) Multiple sclerosis: MHC associations and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* 7: 1-17

Ibelgaufts H (1993) *Gentechnologie von A-Z*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim

International Working Group for Treatment Optimization in MS (IWGfTOiMS) (2004) Treatment optimisation in multiple sclerosis: report of an international consensus meeting. *Eur J Neurol* 11: 43-47

Jacobs LD, Johnson KP (1994) A brief history of the use of interferons as treatment of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51: 1245-1252

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA et al (1996). Intramuscular interferon beta –1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 39: 285-294

Jacobs LD, Beck RW, Simon JH et al. (2000) Intramuscular interferon β -1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 34: 898-904

Jagust WJ, Noseworthy JH (2000) Brain atrophy as a surrogate marker in MS. Faster simpler, better? *Neurology* 2000; 54: 782-783

Jeffrey D, Bashir K, Buchwald L et al. (2002) Optimizing immunomodulatory Therapy for MS patients: an integrated management model. *J Neurological Scienc* 202: 89-90

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP et al. (1995) Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* (1995), 50: 701-708

Jung T, Schrader N, Hellwig M, Enssle KH, Neumann C (1999) Soluble human interleukin-4 receptor is produced by activated T-cells under the control of metalloproteinases. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 119, 23-30

Kabat EA, Moore DH, Landow H (1942) An electrophoretic study of the protein components in the cerebrospinal fluid and their relationship to serum proteins. *J Clin Invest* (1942), 21: 571-577

Kallmann BA, Hummel V, Lindenlaub T et al. (2000) Cytokine-induced modulation of cellular adhesion to human cerebral endothelial cells is mediated by soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Brain* 123: 687-697

Kappos L, Polman C, Freedman MS et al. (2005b) Betaferon in newly emerging MS for initial treatment (Benefit): clinical results. (Presentation at ECTRIMS, Saloniki 2005.) Mult Scler 11 (S1): 10

Kesselring J (1997) Multiple Sklerose, 3. überarbeitete Auflage , Kohlhammer Verlag, Stuttgart, Berlin, Köln

Khoury SJ, Orav EJ, Guttman CR, Kikinis R, Jolesz FA, Weiner HL (1999) Changes in serum levels of ICAM and TNF-R correlate with disease activity in multiple sclerosis. Neurology 1999 Sep 11; 53 (4): 758-764

Kurtzke JF (1977) Geography in multiple sclerosis. Neurology 29:1228-1235

Kurtzke JF (1993) Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. Clin Microbiol Rev 6: 382-427

Larner AJ (1986) Aetiological role of viruses in multiple sclerosis: a review. J R Soc Med (1986), 79, 412-417

Laske C, Oschmann P, Tofighi J, Kühne BS, Diehl H, Bregenzer T, Kraus J, Bauer R, Chatzimanolis N, Kern A, Traupe H, Kaps M (2001) Induction of sTNF-R1 and sTNF-R2 by interferon beta-1b in correlation with clinical and MRI activity. Acta Neurol Scand 103:105-113

Lassmann H (1998) Pathology of multiple sclerosis. In: Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Matthews B, Wekerle H (eds). McAlpine's Multiple Sclerosis. London: Churchill Livingstone, 1998: 323-358

Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001) Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. Trends Mol Med 7: 115-121

Lauer K (1994) Multiple sclerosis in the old world: the new old map. In: Multiple Sclerosis in Europe. An Epidemiological Update. Edited by W Firnhaber, K Lauer. Darmstadt: LTV Press. 14-27

Leppert D, Waubant E, Galaray R, Bunnett NW, Hauser SL (1995) T cell gelatinases mediate basement membrane migration in-vitro. J Immunol, 154: 4379-4389

Link J, Söderström M, Olsson T, Bo H, Ljungdahl A, Link H (1994) Increased transforming growth factor- β , interleukin-4 and interferon- γ in multiple sclerosis. Ann Neurol, 36: 379-386

Link H (1998) The cytokine storm in MS. In Mult sclera 4, 1998, S.12-13

Logothetis J (1999) A Historical Review of Multiple Sclerosis; Neurology, Psychiatry and Brain Research (1999) 7: 1-8; Universitätsverlag Ulm GmbH 1999

Lublin FD et al. (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis : Results of an international survey. Neurology (1996), 46: 907-911

Lucchinetti CF, Brück W, Lassmann H (2004) Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. Ann Neurol 56: 308

Lucchinetti CF, Brück W, Parisi J et al. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 47: 707-717

Lucchinetti CF, Brück W, Rodriguez M et al. (1996) Distinct patterns of Multiple Sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. Brain Pathol.6: 259-274

Martin R, McFarland HF (1995). Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. Crit Rev Clin Lab Sci (1995), 32: 121- 182

Martino G, Grohovaz F, Brambilla E, Codazzi F, Consiglio A, Clementi E, Filippi M, Comi G, Grimaldi L.M.E; Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients. Ann Neurol. 43 (1998): 340-349

Matsuda M, Tsukada N, Miyagi K, Yanagisawa N (1995) Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in the cerebrospinal fluid and sera of patients with multiple sclerosis and human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.* 59: 35-40

Mc Alpine D (1961) The benign form of multiple sclerosis: a study based on 241 cases seen within three years of onset and followed up until the tenth year or more of the disease. *Brain* (1961), 84: 186-203

McDonald W, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H, Lublin F (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis; Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* (2001), 50: 121-127

McFarland HF, Frand JA, Alberts PS, et al. (1992) Using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging lesions to monitor disease activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* (1992) 32: 758-766

McFarland HF (1999) Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 20: 1777-1778

Miller SD et al. (1997). Persistent infection with TMEV leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* (1997), 3: 1133-1136

Mitrovic B, Stock G, Perez DH, Dinter H (1999) Molekulare Aspekte der Behandlung der Multiplen Sklerose. *Handbuch der molekularen Medizin*, Band 5, 411-449, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg

Müller R, Krah T, Sarvetnick N (1996) Pancreatic expression of IL-4 abrogates insulinitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med*, 184: 1093-1099

Myers LW (1992) Treatment of multiple sclerosis with ACTH and corticosteroids. In: Rudick RA, Goodkin DE (eds.) Treatment of Multiple Sclerosis: trial Design, Results, and Future Perspectives. London: Springer-Verlag (1992): 135-156

Navikas V, Link H (1996) Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. J. Neurosci. Res. 45, 322-333

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG: Multiple sclerosis, N Engl J Med 343 (2000) 938-952

Oksenberg JR, Begovich AB, Erlich HA, Steinmann L (1993) Genetic factors in Multiple Sclerosis. JAMA 270: 2362-2369

Oksenberg JR, Baranzini SE, Barcellos LF, Hauser SL (2001) Multiple sclerosis: genomic rewards. J Neuroimmunol 113: 171-184

Olsson T (1995) Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. Neurology, 45 (suppl) 6: 11-15

Oppenheimer DR (1978) The cervical cord in multiple sclerosis. Neuropath Appl Neurobiol (1978), 4, 151-162

O'Riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DP et al. The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. Brain 1998; 121: 495-503

Ossege LM, Sindern E, Patzold T, Malin J-P (1998) Immunomodulatory effects of interferon- β -1b in vivo: induction of the expression of transforming growth factor- β 1 and its receptor type II. J Neuroimmunol 91: 73-81

Panitch HS, Haley AS, Hirsch RL, Johnson KP (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. Lancet (1987), I: 893

Paty DW (1990) Neuroimaging in multiple sclerosis. In: Cook SD (ed) Handbook of multiple sclerosis. Marcel Dekker, New York Basel, pp 291-316

Paul WE, Seder RA (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* (1994), 76: 241-251

Perini P, Tiberio M, Sivieri S, Facchinetti A, Biasi G, Gallo P (2000) Interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor- α receptor type I and II and soluble E-selectin serum levels in multiple sclerosis patients receiving weekly intramuscular injections of interferon beta-1a. *Eur Cytokine Netw* 11 (1) (2000) ; 81-86

Pettinelli CB et al. (1981): Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vivo activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+2-lymphocytes. *Journal of Immunology* (1981), 127 (4): 1420-1423

Phadke JG (1987) Survival pattern and cause of death in patients with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in North East Scotland. *L. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (1987), 50: 523-531

Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ (1992) Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187: 584-589

Plant SR, Arnett HA, Ting JP (2005) Astroglial-derived lymphotoxin- α exacerbates inflammation and demyelination, but not remyelination. *Glia*. 2005 Jan 1; 49 (1): 1-14

Porteu T, Nathan C (1990) Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med* 172: 599-607

Poser CM, Paty DW, Scheinberg LC et al. (1983) New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13 (1983): 227-231

Poser S, Ritter G (1980) Multiple Sklerose in Forschung, Klinik und Praxis. Schattauer, Stuttgart-New York

Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES (1993). Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* (1993), 33: 137-151

Prineas JW (1985) The neuropathology of multiple sclerosis. In: Koetsier JC (ed.). *Demyelinating Diseases*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1985: 213-257

Puccini-Sohler, Rieckmann (1995) A soluble form of TNF-Receptors in CSF and serum of HTLV-1 associated myelopathy and other neurological diseases 242 (1995): 239-242

Quincke H (1891) Die Lumbalpunktion des Hydrocephalus. *Berl Klin Wschr* 32: 861-862 u. 929-933

Quincke H (1895) Über Lumbalpunktion. *Berl Klin Wochenschr* 32: 889-891

Racke MK, Bonomo A, Scott DE, Canella B, Levine A, Raine CS, Shevach EM, Roeken M (1996) Cytokine –induced immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 180;5; 1961-1966

Rieckmann P et al. (1995) Soluble forms of ICAM-1 block lymphocyte attachment to cerebral endothelial cells. *J Neuroimmun.* (1995), 60:9-15

Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Brooks A, Luer W, Helwig A (1994) Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum of patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology* 44: 2367-2372

Rieckmann P, Althofen 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: 326-333

Riise T, Gronning M, Fernández O, Lauer K, Midgard R, Minderhoud JM, Nyland H, Pálffy G, Poser G, Aarli J (1992) Early prognostic factors for disability in multiple sclerosis, a European multicenter study. *Acta Neurol. Scand.* (1992), 85: 212-218

Rivers TM, Schwendtker FF (1935) Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *Exper Med* 61: 689-702

Rodriguez M, Lennon VA (1990) Immunglobulins promote remyelination in the central nervous system. *Ann Neurol* 27: 12-17

Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH (1988) Multiple Sclerosis: updated risks for relatives. *Am. J. Med. Genetics* 29: 533-541

Schuhmacher G, Beebe G, Kibler R, 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 NY Acad Sci* (1965), 122: 552-568

Seckinger P, Isaaz S, Dayer JM (1989) Purification and biologic characterisation of a specific tumor necrosis factor alpha inhibitor. *J Biol Chem* 264 (20): 11966-11973

Sega S, Wraber B, Mesec A, Horvat A Ihan A (2004) IFN-beta 1a and IFN-beta 1b have different patterns of influence on cytokines. *Clin Neurol Neurosurg.* 106 (3): 255-258

Selmaj KW, Raine CS (1995) Experimental autoimmune encephalomyelitis: immuno-therapy with anti-tumor necrosis factor antibodies and soluble tumor necrosis factor receptors. *Neurology* 45: 44-49

Selmaj K, Raine C (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* 23: 339-346

Sharief MK, Noori MA, Ciardi M, Cirelli A, Thompson EJ (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. of Neuroimmunol.* 43: 44-49

Sivieri S, Ferrarini AM, Gallo P (1998) MS: IL-2 and sIL-2R levels in cerebrospinal fluid and serum. Review of literature and critical analysis of ELISA pitfalls. *Mult Scler* 4, 1998, S. 7-11

Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Hanninen A, Eralinna JP, Panelius M (2005) Downregulation of VLA-4 on T cells as marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *Journal of Neuroimmunology* 167 (1-2): 175-182

Sobel R, Mitchell M, Fondren G (1990) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am J Pathol* 136: 1309-1316

Sorensen PS (1999) Biological markers in body fluids for activity and progression in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5 (4): 287-290

Spuler, Yoursy (1996) MS: prospective analysis of $\text{TNF}\alpha$ and 55Kda TNF-R in CSF and serum with clinical and MRI activity. *J Neuroimmunol* 66 (1996): 57-64

Stangel M, Hartung HP, Marx P, Gold R (1998) Intravenous immunoglobulin treatment of neurological autoimmune disorders. *J Neurol Sci* 153: 203-214

Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52: 925-933

Stenager EN, Stenager E, Koch-Henriksen N et al. (1992) Suicide and multiple Sclerosis: an epidemiological investigation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 542-545

Stoll G, Jung S, Jander S, van der Meide P, Hartung HP (1993) Tumor necrosis factor-alpha in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 45 (1993): 1277-1285

Swanson JW (1989) Multiple sclerosis: update in diagnosis and review of prognostic factors. Mayo Clin Proc (1989) May, 64(5): 577-586. Review

Teitelbaum D, Webb C, Meshorer A, Arnon R, Sela M (1972). Protection against experimental allergic encephalomyelitis. Nature (1972), 240: 564-566

Terlizzese M, Simoni P, Antonetti F (1996) In vitro comparison of inhibiting ability of soluble TNF-receptor p75 (TBP II) versus TNF-receptor p55 (TBP I) against TNF-alpha and TNF-beta. J Interferon and Cytokine research 16 (12): 1047-1053

Theiler M (1937). Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. J Exp Med (1937), 65: 705-719

Thompson AJ, Kermode AG, MacMagnus DG, Kendall BE, Kingsley DP, Moseley IF et al. Patterns of disease activity in multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging study. Br Med J 1990; 300:631-634

Tourtellotte WW (1985) The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. In: Handbook of Clinical Neurology, ed Vinken P, Bruyn GW, Klawans H, Koetsier Y. Amsterdam: Elsevier, vol 47, 79-130

Tourtellotte WW, Walsh MJ, Baumhefner RW, Staugaitis SM, Shapshak P (1984) The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. Ann N Y Acad Sci (1984), 436: 52-67

Trojano M, Defazio G, Avolio C, Paolicelli D, Giuliani F, Girelli M, Livrea P (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 brain microvascular endothelial cells. J of Neurovirol 6(2): 47-51

Waksman BH, Rheingold SC (1986) Viral etiology of multiple sclerosis: where does the truth lie? TINS (1986), 9, 388-391

Wallace CJ et al. (1992) Multiple sclerosis : the impact of MRI imaging. AJR Am J Roentgenol. (1992)Apr, 158 (4): 849-857. Review

Weber F, Rieckmann P (1995) Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose. Die Rolle der Zytokine. Nervenarzt 66, 150-155

Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989) The natural history of multiple sclerosis: A geographically based study. 1. Clinical course and disability. Brain (1989) 112: 133-146

Weinshenker BG, Rice GPA, Noseworthy JH, Carriere W, Baskervill J, Ebers GC (1991) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. Brain (1991), 114: 1045-1056

Wekerle H (1993). Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immunemediated CNS disease. Current opinion in Neurobiology (1993), 3: 779-784

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: 695-705

Yong VW (2002): Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetat in MS. Neurology 2002; 59: 802-808.

Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J et al. (2003): Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. Lancet (2003), 362: 1517-1526

Zhang Y, Burger D, Saruhan G et al. (1993). The lymphocyte response against myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. Neurology (1993), 43 : 403-407

7. Anhang

TNF-RI [pg/mL]					
Statistische Kennzahl	Prä	Minimum	Maximum	Post	Differenz
N	36	36	36	36	36
Minimum	546.08	451.80	624.40	488.68	-496.88
Maximum	1992.68	1711.88	2534.64	2006.12	686.80
Median	1056.48	858.42	1283.31	1031.12	-2.94
Mittelwert	1104.35	894.35	1367.48	1143.47	39.12
Standardabweichung	368.65	264.19	428.76	375.26	309.26

TNF-RII [pg/mL]					
Statistische Kennzahl	Prä	Minimum	Maximum	Post	Differenz
N	36	36	36	36	36
Minimum	1894.20	1193.48	2762.76	1797.84	-3432.48
Maximum	8125.68	4566.00	8009.72	5672.32	1640.28
Median	3142.66	3175.98	4560.28	3666.56	361.96
Mittelwert	3544.97	3096.22	4559.30	3740.41	195.44
Standardabweichung	1402.73	721.64	1178.61	919.01	1087.43

TNF-β [pg/mL]					
Statistische Kennzahl	Prä	Minimum	Maximum	Post	Differenz
N	30	30	30	30	30
Minimum	12.81	10.22	17.86	15.49	-308.13
Maximum	447.85	258.63	564.76	512.13	244.14
Median	84.50	49.99	72.29	67.24	-0.13
Mittelwert	112.57	76.70	138.40	110.91	-1.66
Standardabweichung	107.19	73.18	140.53	112.05	82.44

s-ICAM1 [ng/mL]					
Statistische Kennzahl	Prä	Minimum	Maximum	Post	Differenz
N	36	36	36	36	36
Minimum	376	412	596	416	-1444
Maximum	2204	1260	1948	1948	696
Median	729.0	614.0	993.0	775.0	9.0
Mittelwert	867.4	678.6	1032.8	829.6	-37.8
Standardabweichung	415.8	214.2	281.3	285.8	357.8

s-VCAM1 [ng/mL]					
Statistische Kennzahl	Prä	Minimum	Maximum	Post	Differenz
N	36	36	36	36	36
Minimum	590.25	489.50	716.25	641.50	-1160.75
Maximum	2000.75	1424.75	2535.25	1716.75	381.50
Median	990.13	810.13	1152.00	930.75	-43.88
Mittelwert	1049.13	847.45	1203.30	970.90	-78.23
Standardabweichung	285.60	193.36	365.79	227.04	284.95

sIL-4R [pg/mL]					
Statistische Kennzahl	Prä	Minimum	Maximum	Post	Differenz
N	36	36	36	36	36
Minimum	419.64	191.44	427.44	191.44	-511.00
Maximum	1034.40	918.80	1072.08	1015.48	183.72
Median	797.16	634.14	893.00	746.04	-45.66
Mittelwert	772.98	639.87	843.93	702.81	-70.17
Standardabweichung	157.14	173.03	158.74	187.15	155.37

Tabelle 4: Immunologische Parameter unter der Therapie mit Avonex ®

Tabelle 5: Linearer Trend der immunologischen Parameter unter der Berücksichtigung von Nebenwirkungen

Parameter / Trend		Nebenwirkungen	
		keine / leicht	mittel / schwer
Anzahl der Patienten		22	14
TNF-RI:	Abnahme, signifikant	2 (9.1%)	2 (14.3%)
	Abnahme, nicht signifikant	9 (40.9%)	6 (42.9%)
	Zunahme, nicht signifikant	8 (36.4%)	5 (35.7%)
	Zunahme, signifikant	3 (13.6%)	1 (7.1%)
TNF-RII:	Abnahme, signifikant	2 (9.1%)	1 (7.1%)
	Abnahme, nicht signifikant	6 (27.3%)	4 (28.6%)
	Zunahme, nicht signifikant	9 (40.9%)	8 (57.1%)
	Zunahme, signifikant	5 (22.7%)	1 (7.1%)
TNF-β:	Abnahme, signifikant	2 (10.5%)	1 (9.1%)
	Abnahme, nicht signifikant	10 (52.6%)	5 (45.5%)
	Zunahme, nicht signifikant	4 (21.1%)	5 (45.5%)
	Zunahme, signifikant	3 (15.8%)	—
	----- fehlende Angaben	3	3
s-ICAM1:	Abnahme, signifikant	—	—
	Abnahme, nicht signifikant	9 (40.9%)	4 (28.6%)
	Zunahme, nicht signifikant	12 (54.5%)	8 (57.1%)
	Zunahme, signifikant	1 (4.5%)	2 (14.3%)
s-VCAM1:	Abnahme, signifikant	1 (4.5%)	—
	Abnahme, nicht signifikant	15 (68.2%)	6 (42.9%)
	Zunahme, nicht signifikant	5 (22.7%)	7 (50.0%)
	Zunahme, signifikant	1 (4.5%)	1 (7.1%)
sIL-4R:	Abnahme, signifikant	5 (22.7%)	—
	Abnahme, nicht signifikant	9 (40.9%)	7 (50.0%)
	Zunahme, nicht signifikant	8 (36.4%)	6 (42.9%)
	Zunahme, signifikant	—	1 (7.1%)

Tabelle 6: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Mittelwerte unter Berücksichtigung des Therapieerfolges

Gesamtes Prüfkollektiv [N=36]					
Parameter			Responder	Nonresponder	U-Test
Anzahl der Patienten			29	7	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		520.69	917.19	p=0.6602
	Maximum		2060.77	1316.72	
	Median		1044.26	967.73	
	Mittelwert		1091.83	1037.75	
	Standardabw.		318.68	143.33	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		2384.87	3307.97	p=0.4718
	Maximum		5275.12	4243.75	
	Median		3562.66	3860.99	
	Mittelwert		3641.57	3806.72	
	Standardabw.		808.52	324.03	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		16.45	17.86	p=0.8775
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		65.14	56.02	
	Mittelwert		98.33	83.55	
	Standardabw.		95.06	78.21	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe					
fehlende Angaben			3	–	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		0.00	17.86	p=1.0000
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		59.34	50.32	
	Mittelwert		86.89	76.25	
	Standardabw.		95.84	81.29	
nicht bestimmbar = 0					
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		566.00	616.00	p=0.0603
	Maximum		1507.14	826.80	
	Median		846.63	703.3	
	Mittelwert		865.64	706.25	
	Standardabw.		216.49	72.08	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		660.50	763.33	p=0.8416
	Maximum		1732.92	1244.00	
	Median		941.19	1011.30	
	Mittelwert		1002.08	995.55	
	Standardabw.		235.23	163.71	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		404.12	368.13	p=0.3792
	Maximum		940.29	918.03	
	Median		799.26	849.47	
	Mittelwert		754.95	776.14	
	Standardabw.		140.09	190.71	

Tabelle 7: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Mittelwerte unter Berücksichtigung von Nebenwirkungen

Gesamtes Prüfkollektiv [N=36]					
Parameter			Nebenwirkungen		U-Test
			keine / leicht	mittel / schwer	
Anzahl der Patienten			22	14	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		520.69	719.64	p=0.1888
	Maximum		1578.68	2060.77	
	Median		1063.40	966.41	
	Mittelwert		1106.06	1042.43	
	Standardabw.		274.66	323.97	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		2384.87	2475.29	p=0.3223
	Maximum		4773.12	5275.12	
	Median		3802.48	3407.14	
	Mittelwert		3744.70	3562.08	
	Standardabw.		690.61	822.10	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		16.45	48.93	p=0.0089
	Maximum		351.84	322.65	
	Median		37.18	107.78	
	Mittelwert		72.90	139.78	
	Standardabw.		84.08	90.88	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe fehlende Angaben			–	3	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		5.22	0.00	p=0.2114
	Maximum		351.84	322.65	
	Median		30.16	86.23	
	Mittelwert		68.91	109.83	
	Standardabw.		85.78	99.47	
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		566.00	603.08	p=0.2493
	Maximum		1507.14	968.00	
	Median		872.49	756.35	
	Mittelwert		878.19	766.23	
	Standardabw.		239.85	114.82	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		660.50	811.67	p=0.4653
	Maximum		1428.29	1732.92	
	Median		938.33	1002.53	
	Mittelwert		978.42	1035.99	
	Standardabw.		222.04	223.04	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		368.13	613.81	p=0.5924
	Maximum		940.29	931.30	
	Median		798.63	813.21	
	Mittelwert		738.27	791.77	
	Standardabw.		171.84	98.31	

Tabelle 8: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Mittelwerte unter Berücksichtigung von Nebenwirkungen

Patienten mit 14-tägiger Blutentnahme und mindestens 10 Messwerten [N=13]					
Parameter			Nebenwirkungen		U-Test
			keine / leicht	mittel / schwer	
Anzahl der Patienten			5	8	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		920.45	719.64	p=0.5101
	Maximum		1514.82	1126.87	
	Median		986.82	946.26	
	Mittelwert		1083.87	931.34	
	Standardabw.		248.80	146.44	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		2562.94	2475.29	p=0.5101
	Maximum		3723.07	5275.12	
	Median		3283.30	3496.31	
	Mittelwert		3157.71	3502.02	
	Standardabw.		441.32	914.84	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		27.43	59.34	p=0.4113
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		96.03	116.20	
	Mittelwert		121.86	139.25	
	Standardabw.		133.66	73.06	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe					
fehlende Angaben			–	2	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		5.22	0.00	p=1.0000
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		96.03	97.90	
	Mittelwert		117.42	104.44	
	Standardabw.		137.88	89.26	
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		703.55	603.08	p=0.0673
	Maximum		969.90	826.80	
	Median		898.35	703.29	
	Mittelwert		852.18	715.07	
	Standardabw.		125.00	82.30	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		864.35	892.65	p=0.9417
	Maximum		1428.29	1732.92	
	Median		1063.64	1044.98	
	Mittelwert		1107.16	1107.25	
	Standardabw.		204.98	267.00	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		769.33	613.81	p=0.1243
	Maximum		940.29	849.47	
	Median		842.12	757.50	
	Mittelwert		839.96	753.80	
	Standardabw.		68.65	86.90	

Tabelle 9: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Variationskoeffizienten [%] unter Berücksichtigung von Nebenwirkungen

Gesamtes Prüfkollektiv [N=34]					
Parameter			Nebenwirkungen		U-Test
			keine / leicht	mittel / schwer	
Anzahl der Patienten			20	14	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum	0.67	2.57	p=0.1669	
	Maximum	42.33	28.16		
	Median	15.66	11.75		
	Mittelwert	18.03	12.71		
	Standardabw.	10.75	6.49		
TNF-RII [pg/mL]	Minimum	2.86	0.19	p=0.1669	
	Maximum	40.98	31.50		
	Median	14.01	11.93		
	Mittelwert	15.95	12.78		
	Standardabw.	7.89	7.05		
TNF-β [pg/mL]	Minimum	2.45	5.82	p=0.5468	
	Maximum	92.61	58.47		
	Median	26.36	17.18		
	Mittelwert	31.41	23.34		
	Standardabw.	25.41	16.95		
	fehlende Angaben	1	3		
TNF-β [pg/mL]	Minimum	2.45	5.82	p=0.3319	
	Maximum	236.94	58.47		
	Median	27.43	17.18		
	Mittelwert	53.77	23.34		
	Standardabw.	64.81	16.95		
	fehlende Angaben	–	3		
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum	0.55	2.05	p=0.9860	
	Maximum	34.45	22.17		
	Median	15.75	16.30		
	Mittelwert	15.72	14.84		
	Standardabw.	7.96	5.89		
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum	5.29	2.38	p=0.9860	
	Maximum	39.81	21.47		
	Median	10.31	11.96		
	Mittelwert	13.21	11.31		
	Standardabw.	8.37	5.17		
sIL-4R [pg/mL]	Minimum	1.22	1.90	p=0.2858	
	Maximum	43.40	21.22		
	Median	8.70	7.18		
	Mittelwert	13.41	7.60		
	Standardabw.	11.37	4.71		

Tabelle 10: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Mittelwerte unter Berücksichtigung von Schüben unter Therapie

Gesamtes Prüfkollektiv [N=36]					
Parameter			Schub unter Therapie		U-Test
			nein	ja	
Anzahl der Patienten			23	13	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		520.69	719.64	p=0.1216
	Maximum		2060.77	1316.72	
	Median		1089.97	966.72	
	Mittelwert		1135.66	985.18	
	Standardabw.		336.12	160.64	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		2384.87	2665.60	p=0.8177
	Maximum		4773.12	5275.12	
	Median		3753.56	3723.07	
	Mittelwert		3694.64	3636.59	
	Standardabw.		766.64	714.68	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		16.45	17.86	p=0.5874
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		59.34	82.32	
	Mittelwert		95.78	94.17	
	Standardabw.		101.62	72.16	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe					
fehlende Angaben			2	1	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		0.00	0.00	p=0.7171
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		48.93	56.02	
	Mittelwert		85.85	82.99	
	Standardabw.		101.91	75.78	
nicht bestimmbar = 0					
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		566.00	603.08	p=0.0069
	Maximum		1507.14	826.80	
	Median		910.00	703.33	
	Mittelwert		904.59	710.92	
	Standardabw.		225.27	69.95	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		660.50	763.33	p=0.2919
	Maximum		1428.29	1732.92	
	Median		935.46	1027.42	
	Mittelwert		970.41	1054.60	
	Standardabw.		208.82	240.17	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		404.12	368.13	p=0.9475
	Maximum		940.29	918.03	
	Median		799.95	826.46	
	Mittelwert		757.97	761.03	
	Standardabw.		152.44	146.90	

Tabelle 11: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Mittelwerte unter Berücksichtigung von Schüben unter Therapie

Patienten mit 14-tägiger Blutentnahme und mindestens 10 Messwerten [N=13]					
Parameter			Schub unter Therapie		U-Test
			nein	ja	
Anzahl der Patienten			6	7	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		733.05	719.64	p=0.9431
	Maximum		1514.82	1126.87	
	Median		955.24	965.10	
	Mittelwert		1028.13	957.33	
	Standardabw.		265.32	129.84	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		2475.29	2665.60	p=0.1747
	Maximum		3753.56	5275.12	
	Median		3093.21	3503.92	
	Mittelwert		3049.05	3644.34	
	Standardabw.		491.80	880.16	
TNF-β [pg/mL] nicht bestimmbar = fehlende Angabe	Minimum		27.43	88.02	p=0.1709
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		59.34	116.20	
	Mittelwert		112.62	146.94	
	Standardabw.		136.63	64.94	
fehlende Angaben			1	1	
TNF-β [pg/mL] nicht bestimmbar = 0	Minimum		0.00	0.00	p=0.2524
	Maximum		351.84	247.51	
	Median		43.92	107.78	
	Mittelwert		90.15	125.95	
	Standardabw.		133.12	81.24	
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		636.87	603.08	p=0.3531
	Maximum		969.90	826.80	
	Median		808.07	734.33	
	Mittelwert		813.54	728.61	
	Standardabw.		144.27	82.04	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		864.35	892.65	p=0.8303
	Maximum		1428.29	1732.92	
	Median		1089.75	1063.64	
	Mittelwert		1098.39	1114.78	
	Standardabw.		191.24	283.83	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		690.97	613.81	p=0.2840
	Maximum		940.29	849.47	
	Median		820.69	769.33	
	Mittelwert		820.12	758.50	
	Standardabw.		84.09	88.44	

Tabelle 12: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Standardabweichungen unter Berücksichtigung von Schüben unter Therapie

Gesamtes Prüfkollektiv [N=34]					
Parameter			Schub unter Therapie		U-Test
			nein	ja	
Anzahl der Patienten			22	12	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		25.64	4.89	p=0.3581
	Maximum		435.56	474.87	
	Median		117.25	149.38	
	Mittelwert		162.61	199.70	
	Standardabw.		111.45	137.13	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		6.36	77.32	p=0.6013
	Maximum		1956.24	1164.64	
	Median		494.75	552.44	
	Mittelwert		540.09	554.05	
	Standardabw.		372.54	281.96	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		1.65	2.97	p=0.2120
	Maximum		126.50	144.73	
	Median		13.19	18.52	
	Mittelwert		20.88	29.91	
	Standardabw.		28.02	39.52	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe fehlende Angaben			3	1	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		0.00	0.00	p=0.2272
	Maximum		126.50	144.73	
	Median		12.47	17.46	
	Mittelwert		18.51	28.38	
	Standardabw.		26.71	38.85	
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		5.66	65.77	p=0.5050
	Maximum		400.65	173.54	
	Median		126.27	115.15	
	Mittelwert		136.35	114.84	
	Standardabw.		91.57	31.17	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		21.04	50.76	p=0.0744
	Maximum		381.91	256.22	
	Median		92.80	130.00	
	Mittelwert		116.49	134.56	
	Standardabw.		85.06	48.84	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		6.53	25.87	p=0.5283
	Maximum		297.86	166.35	
	Median		48.94	65.28	
	Mittelwert		81.28	75.66	
	Standardabw.		71.64	44.51	

Tabelle 13: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Standardabweichungen unter Berücksichtigung von Schüben unter Therapie

Patienten mit 14-tägiger Blutentnahme und mindestens 10 Messwerten [N=13]					
Parameter			Schub unter Therapie		U-Test
			nein	ja	
Anzahl der Patienten			6	7	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		88.51	71.54	p=1.0000
	Maximum		309.19	317.27	
	Median		133.75	128.70	
	Mittelwert		161.69	158.12	
	Standardabw.		83.57	82.92	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		281.08	267.05	p=0.6171
	Maximum		779.84	809.19	
	Median		386.07	562.67	
	Mittelwert		465.60	534.83	
	Standardabw.		203.70	188.12	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		8.20	16.39	p=0.0828
	Maximum		43.10	144.73	
	Median		12.97	19.98	
	Mittelwert		17.65	43.74	
	Standardabw.		14.45	50.42	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe					
fehlende Angaben			1	1	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		0.00	0.00	p=0.1526
	Maximum		43.10	144.73	
	Median		10.95	19.50	
	Mittelwert		14.36	37.49	
	Standardabw.		14.83	48.91	
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		115.19	65.77	p=0.2840
	Maximum		234.36	173.54	
	Median		136.62	118.18	
	Mittelwert		149.96	120.42	
	Standardabw.		45.23	33.97	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		80.46	105.33	p=0.9431
	Maximum		210.43	256.22	
	Median		148.88	137.73	
	Mittelwert		146.94	149.80	
	Standardabw.		51.47	52.52	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		30.77	25.87	p=1.0000
	Maximum		192.10	74.74	
	Median		48.78	64.31	
	Mittelwert		72.27	56.06	
	Standardabw.		60.94	17.78	

Tabelle 14: Intraindividuelle statistische Kennzahlen der immunologischen Parameter: Variationskoeffizienten [%] unter Berücksichtigung von Schüben unter Therapie

Gesamtes Prüfkollektiv [N=34]					
Parameter			Schub unter Therapie		U-Test
			nein	ja	
Anzahl der Patienten			22	12	
TNF-RI [pg/mL]	Minimum		2.57	0.67	p=0.1766
	Maximum		31.33	42.33	
	Median		12.28	15.87	
	Mittelwert		14.18	18.88	
	Standardabw.		8.24	11.19	
TNF-RII [pg/mL]	Minimum		0.19	2.86	p=0.4385
	Maximum		40.98	27.44	
	Median		12.94	14.68	
	Mittelwert		14.66	14.63	
	Standardabw.		8.56	5.83	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		2.45	9.83	p=0.5468
	Maximum		92.61	58.47	
	Median		16.16	22.16	
	Mittelwert		28.72	27.99	
	Standardabw.		25.91	16.92	
nicht bestimmbar = fehlende Angabe					
fehlende Angaben			3	1	
TNF-β [pg/mL]	Minimum		2.45	9.83	p=0.6058
	Maximum		236.94	159.25	
	Median		16.67	22.16	
	Mittelwert		45.15	39.01	
	Standardabw.		60.84	43.19	
nicht bestimmbar = 0					
fehlende Angaben			2	1	
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum		0.55	7.95	p=0.6524
	Maximum		34.45	23.63	
	Median		15.80	15.88	
	Mittelwert		14.92	16.16	
	Standardabw.		8.18	4.70	
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum		2.38	6.65	p=0.0869
	Maximum		39.81	18.31	
	Median		9.51	12.80	
	Mittelwert		12.23	12.79	
	Standardabw.		8.75	2.97	
sIL-4R [pg/mL]	Minimum		1.22	3.05	p=0.3971
	Maximum		43.40	22.51	
	Median		6.66	8.34	
	Mittelwert		11.34	10.42	
	Standardabw.		11.14	6.09	

Tabelle 15:**Verläufe der Parameter vor ↔ während ↔ nach dem Schub [N=9; *: N=7]**

Parameter	Kennzahl	Zeitintervall in Relation zum Schub		
		bis 4 Wochen vor	während	bis 4 Wochen nach
TNF-RI [pg/mL]	Minimum	730.32	745.02	662.44
	Maximum	1651.64	1694.30	1322.56
	Median	928.92	928.52	938.40
	Mittelwert	1094.06	1027.03	941.32
	Standardabw.	317.83	294.49	183.73
TNF-RII [pg/mL]	Minimum	2473.52	2374.72	2513.56
	Maximum	5999.92	4862.54	5033.24
	Median	3536.16	3643.08	3543.40
	Mittelwert	3784.36	3551.72	3592.61
	Standardabw.	1077.14	853.27	862.59
TNF-β* [pg/mL]	Minimum	45.88	50.42	44.74
	Maximum	548.57	388.38	294.97
	Median	176.90	138.64	122.30
	Mittelwert	222.78	175.69	133.36
	Standardabw.	184.63	115.52	93.15
s-ICAM1 [ng/mL]	Minimum	480.00	556.00	490.00
	Maximum	892.00	914.00	878.00
	Median	778.00	686.00	604.00
	Mittelwert	704.44	722.48	657.78
	Standardabw.	169.06	105.40	139.43
s-VCAM1 [ng/mL]	Minimum	814.50	850.88	877.75
	Maximum	1835.00	1426.63	1595.25
	Median	1039.75	1083.88	1122.50
	Mittelwert	1100.75	1082.31	1138.81
	Standardabw.	302.49	174.77	205.86
sIL-4R [pg/mL]	Minimum	457.48	615.66	590.64
	Maximum	927.80	967.29	908.88
	Median	816.84	702.00	780.84
	Mittelwert	786.88	753.66	761.40
	Standardabw.	141.51	124.55	95.84

Tabelle 16: MRT-Daten im Verlauf der Behandlung mit AVONEX®

Anzahl der Läsionen					
Statistische Kennzahl	k0	k1	k2	post	Differenz
N	26	24	22	26	26
Minimum	5	6	6	6	-16
Maximum	62	81	61	61	8
Median	23.5	26.5	21.5	21.5	0.0
Mittelwert	28.0	30.6	25.7	26.5	-1.5
Standardabweichung	18.2	20.2	16.5	16.6	5.5

Fläche der Läsionen [mm ²]					
Statistische Kennzahl	k0	k1	k2	post	Differenz
N	26	24	22	26	26
Minimum	41.10	51.52	36.61	36.61	-392.75
Maximum	1506.89	1461.13	1564.13	1564.13	142.29
Median	323.18	351.02	313.60	313.60	-0.88
Mittelwert	446.82	458.42	438.48	411.76	-35.06
Standardabweichung	380.65	368.18	407.59	381.86	127.89

Durchschnittliche Fläche der Läsionen [mm ²]					
Statistische Kennzahl	k0	k1	k2	post	Differenz
N	26	24	22	26	26
Minimum	4.83	3.91	3.66	3.66	-9.35
Maximum	34.90	45.25	42.67	42.67	21.79
Median	15.28	14.57	16.58	14.22	-0.36
Mittelwert	16.15	16.63	17.26	16.40	0.25
Standardabweichung	7.73	10.45	11.02	10.93	5.70

Anzahl der kontrastmittelanreichernden Läsionen					
Statistische Kennzahl	k0	k1	k2	post	Differenz
N	25	23	21	25	25
Minimum	0	0	0	0	-6
Maximum	8	10	5	5	3
Median	2.0	1.0	1.0	1.0	-1.0
Mittelwert	2.5	1.8	1.1	1.2	-1.3
Standardabweichung	2.5	2.3	1.5	1.5	2.1

Tabelle 17: MRT-Daten unter Berücksichtigung des Therapieerfolges

Parameter		Responder	Nonresponder	Wilcoxon
Anzahl der Patienten		21	5	
Anzahl der Läsionen (raw data)				
• Anzahl an k0	Minimum	5	10	p=0.3620
	Maximum	62	60	
	Median	21.0	37.0	
	Mittelwert	26.6	34.0	
	Standardabw.	18.1	19.3	
• Differenz post – k0	Minimum	–12	–16	p=0.6708
	Maximum	8	3	
	Median	0.0	0.0	
	Mittelwert	–1.0	–3.4	
	Standardabw.	5.1	7.5	
Gesamtzahl der Läsionen vor und/oder nach Behandlung mit AVONEX® (adjustiert)				
	Minimum	7	15	p=0.2547
	Maximum	94	117	
	Median	25.0	40.0	
	Mittelwert	34.5	51.8	
	Standardabw.	24.7	39.4	
Änderungsprofil der Läsionen im Postbefund (adjustiert)				
• Abnahmen	Minimum	0.0	4.0	p=0.2546
	Maximum	36.8	38.0	
	Median	8.1	13.7	
	Mittelwert	11.1	16.4	
	Standardabw.	10.3	12.8	
• Zunahmen	Minimum	1.0	5.0	p=0.1816
	Maximum	28.3	38.9	
	Median	6.4	14.0	
	Mittelwert	9.2	15.9	
	Standardabw.	7.7	13.6	

Tabelle 19: MRT-Daten unter Berücksichtigung der Schubrate unter Therapie mit AVONEX®

Parameter		Schubrate = 0	Schubrate > 0	Wilcoxon
Anzahl der Patienten		17	9	
Anzahl der Läsionen (raw data)				
• Anzahl an k0	Minimum	5	9	p=0.5529
	Maximum	62	60	
	Median	21.0	36.0	
	Mittelwert	26.1	31.6	
	Standardabw.	17.5	19.9	
• Differenz post – k0	Minimum	–7	–16	p=0.8074
	Maximum	8	3	
	Median	–2.0	0.0	
	Mittelwert	–0.8	–2.8	
	Standardabw.	4.9	6.8	
Gesamtzahl der Läsionen vor und/oder nach Behandlung mit AVONEX® (adjustiert)				
	Minimum	7	10	p=0.4187
	Maximum	83	117	
	Median	25.0	40.0	
	Mittelwert	32.7	47.6	
	Standardabw.	21.3	37.2	
Änderungsprofil der Läsionen im Postbefund (adjustiert)				
• Abnahmen	Minimum	0.0	1.0	p=0.3883
	Maximum	30.0	38.0	
	Median	8.1	13.7	
	Mittelwert	10.0	16.1	
	Standardabw.	8.3	14.0	
• Zunahmen	Minimum	1.0	2.0	p=0.1687
	Maximum	26.0	38.9	
	Median	6.4	14.0	
	Mittelwert	8.3	14.7	
	Standardabw.	6.4	12.2	

Tabelle 20: MRT-Daten unter Berücksichtigung der Schubrate unter Therapie mit AVONEX®

Parameter		Schubrate = 0	Schubrate > 0	Wilcoxon
Fläche der Läsionen [mm²]				
• Fläche an k0	Minimum	41.10	68.43	p=0.9142
	Maximum	1333.05	1506.89	
	Median	347.70	290.06	
	Mittelwert	439.84	459.99	
	Standardabw.	354.40	448.68	
• Differenz post – k0	Minimum	–193.56	–392.75	p=0.1958
	Maximum	142.29	96.07	
	Median	19.29	–31.81	
	Mittelwert	–7.49	–87.13	
	Standardabw.	100.26	162.31	
Mittlere Läsionsfläche [mm²]				
• Fläche an k0	Minimum	6.39	4.83	p=0.4505
	Maximum	34.90	25.98	
	Median	15.53	13.26	
	Mittelwert	17.25	14.07	
	Standardabw.	7.63	7.92	
• Differenz post – k0	Minimum	–5.06	–9.35	p=0.3058
	Maximum	21.79	5.11	
	Median	0.57	–0.37	
	Mittelwert	1.18	–1.49	
	Standardabw.	6.32	4.08	
Kontrastmittelanreichernde Herde				
• Anzahl an k0	Minimum	0	0	p=0.3860
	Maximum	8	6	
	Median	3.0	1.0	
	Mittelwert	2.9	1.8	
	Standardabw.	2.6	2.2	
	fehlende Angaben	1	–	
• Differenz post – k0	Minimum	–6	–6	p=0.8170
	Maximum	1	3	
	Median	–1.0	–1.0	
	Mittelwert	–1.4	–1.1	
	Standardabw.	2.0	2.5	
	fehlende Angaben	1	–	

Tabelle 21: MRT-Daten unter Berücksichtigung von Nebenwirkungen unter der Therapie mit AVONEX®

Parameter		NW keine / leicht	NW mittel / schwer	Wilcoxon
Anzahl der Patienten		18	8	
Anzahl der Läsionen (raw data)				
• Anzahl an k0	Minimum	5	9	p=0.7810
	Maximum	62	60	
	Median	26.5	18.5	
	Mittelwert	29.3	25.1	
	Standardabw.	18.5	18.1	
• Differenz post – k0	Minimum	–16	–7	p=0.7167
	Maximum	8	3	
	Median	–2.5	0.0	
	Mittelwert	–1.8	–0.6	
	Standardabw.	6.3	3.3	
Gesamtzahl der Läsionen vor und/oder nach Behandlung mit AVONEX® (adjustiert)				
	Minimum	7	10	p=0.5784
	Maximum	94	117	
	Median	32.5	22.5	
	Mittelwert	38.3	36.9	
	Standardabw.	25.1	35.6	
Änderungsprofil der Läsionen im Postbefund (adjustiert)				
• Abnahmen	Minimum	0.0	1.0	p=0.5048
	Maximum	36.8	38.0	
	Median	9.7	6.5	
	Mittelwert	12.7	10.6	
	Standardabw.	10.3	12.3	
• Zunahmen	Minimum	1.0	2.0	p=0.3033
	Maximum	28.3	38.9	
	Median	8.2	4.6	
	Mittelwert	10.7	10.1	
	Standardabw.	7.8	12.2	

Tabelle 22: MRT-Daten unter Berücksichtigung von Nebenwirkungen der Therapie mit AVONEX®

Parameter		NW keine / leicht	NW mittel / schwer	Wilcoxon
Fläche der Läsionen [mm²]				
• Fläche an k0	Minimum	41.10	68.43	p=0.0710
	Maximum	1506.89	557.10	
	Median	422.10	264.67	
	Mittelwert	532.65	253.70	
	Standardabw.	421.28	157.82	
• Differenz post – k0	Minimum	–281.63	–392.75	p=0.9778
	Maximum	96.07	142.29	
	Median	11.51	–31.23	
	Mittelwert	–35.37	–34.36	
	Standardabw.	114.40	163.20	
Mittlere Läsionsfläche [mm²]				
• Fläche an k0	Minimum	6.40	4.83	p=0.0486
	Maximum	34.90	25.54	
	Median	18.54	10.28	
	Mittelwert	18.12	11.71	
	Standardabw.	7.51	6.62	
• Differenz post – k0	Minimum	–5.06	–9.35	p=0.5977
	Maximum	21.79	4.59	
	Median	0.09	–1.32	
	Mittelwert	0.96	–1.32	
	Standardabw.	6.21	4.30	
Kontrastmittelanreichernde Herde				
• Anzahl an k0	Minimum	0	0	p=0.3567
	Maximum	8	4	
	Median	2.0	1.5	
	Mittelwert	2.9	1.8	
	Standardabw.	2.8	1.8	
..... fehlende Angaben		1	–	
• Differenz post – k0	Minimum	–6	–4	p=0.2975
	Maximum	3	1	
	Median	–1.0	0.0	
	Mittelwert	–1.6	–0.8	
	Standardabw.	2.3	1.6	
..... fehlende Angaben		1	–	

Protokolle zur Durchführung der Messungen mittels ELISA

Herstellung der Testlösungen:

- Lösung 0 (Coating Buffer):
8,0g NaCl
1,42g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
0,2g KH_2PO_4
0,2g KCl
in 1000ml Aqua dest.
- Lösung 1 (Blocking Solution):
0,5g BSA [bovines serum albumin (fraction 5)]
in 100ml Lösung 0
- Lösung 2 (Assay Buffer A):
0,5g BSA [bovines serum albumin (fraction 5)]
0,1ml Tween 20
in 100ml Lösung 0
- Lösung 3 (Assay Buffer A):
1g BSA [bovines serum albumin (fraction 5)]
0,1ml Tween 20
in 100ml Lösung 0
- Wasch Buffer:
1ml Tween 20
in 1000ml Lösung 0
- Stop Solution 1:
5,6ml H_2SO_4 95-98%
in 100ml Aqua dest.
- Stop Solution 2:
10ml H_2SO_4 95-98%
in 80ml Aqua dest.

Protokoll zur Durchführung des sTNF-R1 und sTNF-R2

Verdünnung des Coating Antibody (AB) auf eine Konzentration von 1,0µg/ml mit Lösung 0.

Zum Beschichten der Mikrotiterplatte werden jeweils 100µl dieser hergestellten Lösung in alle Wells (Vertiefungen) der Mikrotiterplatte pipettiert. Die abgedeckte Platte bei 2-8°C über ein Zeitintervall von 12-18 Stunden inkubieren lassen.

Nach der Inkubationszeit restliche Lösung aus den Platten entfernen. Im Anschluss automatisiertes Waschen der Platte mit 300µl Wasch Buffer und viermaliges Wiederholen des Waschvorganges. Nach dem Waschvorgang vorsichtiges Abklopfen der noch verbliebenen Flüssigkeit.

Pipettieren von 300µl Lösung 1 in jedes Well der Mikrotiterplatte. Im Anschluss zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

Lyophilisierten Standard in Lösung 3 zu einer Konzentration von 10000pg/ml aufnehmen. Die weitere Verdünnung für die Standard-Verdünnungsreihe in fetalem Kälberserum (FKS) zu Konzentrationen von 1600pg/ml, 800pg/ml, 320pg/ml, 128 pg/ml, 51,2 pg/ml, 20,5pg/ml und 8,2 pg/ml. Als Nullwert (Blank) dient FKS.

Kontrolle, laut vial-Beschriftung, in Aqua dest. aufnehmen.

Verdünnung der Kontrollen von sTNF-R1 ($c = 2,2 \pm 0,4 \text{ ng/ml}$) 1:4 und von sTNF-R2 ($c = 4,5 \pm 0,9 \text{ ng/ml}$ und $c = 5,1 \pm 1,02 \text{ ng/ml}$) 1:10 mit Lösung 2.

Verdünnung des Pools für sTNF-R1 im Verhältnis 1:4, für sTNF-R2 im Verhältnis 1:15 und die Serumproben beider Rezeptoren im Verhältnis 1:4 jeweils mit Lösung 2.

Nach Ende der Inkubationszeit von zwei Stunden Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorganges der Mikrotiterplatten.

Im Anschluss werden in jedes Well 100µg der Standards, des Blank, der Kontrollen, des Pools und der Serumproben in Doppelbestimmung pipettiert.

Biotinylated detection AB ($c = 500 \mu\text{g/ml}$) im Verhältnis 1:1250 mit Lösung 2 verdünnen und je 50µl zusätzlich in jedes Well pipettieren.

Erneute Inkubation der Mikrotiterplatten über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotator bei 400 rpm.

Danach erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Streptavidin-HRP ($c = 1 \text{ mg/ml}$) im Verhältnis 1:2500 mit Lösung 2 verdünnen und je 100µl in jedes Well pipettieren.

Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatten über ein Zeitintervall von 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotator bei 400 rpm.

Erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Tetramethylbenzidine (TMB)-Substrat I und II zu gleichen Teilen mischen und jeweils 100µl in jedes Well pipettieren.

Die abgedunkelten Mikrotiterplatten erneut bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten inkubieren lassen, so dass die Blauextinktion des größten Standards (1600pg/ml), mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 620nm und als Referenzfilter 450nm gemessen, 0,7 beträgt.

Im Anschluss 100µl Stop Solution zum Beenden der Reaktion in jedes Well pipettieren.

Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450nm und als Referenzfilter 620nm.

Protokoll zur Durchführung des TNF-beta

Verdünnung des Coating AB (600µl c = 100µl/ml) mit 9,4ml Lösung 0.

Zum Beschichten der Mikrotiterplatte werden jeweils 100µl dieser hergestellten Lösung in alle Wells (Vertiefungen) der Mikrotiterplatte pipettiert. Die abgedeckte Platte bei 2-8°C über ein Zeitintervall von 12-18 Stunden inkubieren lassen.

Nach der Inkubationszeit restliche Lösung aus den Platten entfernen. Im Anschluss automatisiertes Waschen der Platte mit 300µl Wasch Buffer und viermaliges Wiederholen des Waschvorganges. Nach dem Waschvorgang vorsichtiges Abklopfen der noch verbliebenen Flüssigkeit.

Pipettieren von 250µl Lösung 2 in jedes Well der Mikrotiterplatte. Im Anschluss zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

5µl des Standardproteins mit 495µl Lösung 2 zu einer Konzentration von 1000pg/ml verdünnen. Die weitere Verdünnung für die Standardverdünnungsreihe in fetalem Kälberserum (FKS) zu Konzentrationen von 500pg/ml, 250pg/ml, 63pg/ml, 31pg/ml, 16pg/ml, 8 pg/ml. Als Nullwert (Blank) dient FKS.

Erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Im Anschluss werden in jedes Well 100µg der Standards, des Blank, des Pools und der Serumproben in Doppelbestimmung pipettiert.

HRP-conjugate im Verhältnis 1:1000 mit Lösung 2 verdünnen und jeweils 50µl in jedes Well pipettieren.

Erneute Inkubation der Mikrotiterplatten über vier Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotator bei 400 rpm.

Danach erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Tetramethylbenzidine (TMB)-Substrat I und II zu gleichen Teilen mischen und jeweils 100µl in jedes Well pipettieren.

Die abgedunkelten Mikrotiterplatten erneut bei Raumtemperatur für ca. 45 Minuten inkubieren lassen, so dass die Blauextinktion des größten Standards (500pg/ml), mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 620nm und als Referenzfilter 450nm gemessen, 0,5 beträgt.

Im Anschluss 100µl Stop Solution 2 zum Beenden der Reaktion in jedes Well pipettieren.

Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450nm und als Referenzfilter 620nm.

Protokoll zur Durchführung des siCAM-1

Verdünnung des Coating Antibody auf eine Konzentration von 10µg/ml mit Lösung 0.

Zum Beschichten der Mikrotiterplatte werden jeweils 100µl dieser hergestellten Lösung in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Die abgedeckte Platte bei 2-8°C über ein Zeitintervall von 12-18 Stunden inkubieren lassen.

Nach der Inkubationszeit restliche Lösung aus den Platten entfernen. Im Anschluss automatisiertes Waschen der Platte mit 300µl Wasch Buffer und viermaliges Wiederholen des Waschvorganges. Nach dem Waschvorgang vorsichtiges Abklopfen der noch verbliebenen Flüssigkeit.

Pipettieren von 250µl Lösung 2 in jedes Well der Mikrotiterplatte. Im Anschluss zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

5µl des Standardproteins mit 495µl Lösung 2 zu einer Konzentration von 10ng/ml verdünnen. Die weitere Verdünnung für die Standardverdünnungsreihe in Sample Diluent zu Konzentrationen von 5ng/ml, 2,5ng/ml, 1,25ng/ml und 0,63ng/ml. Als Nullwert (Blank) dient Sample Diluent.

Verdünnung der Serumproben und des Pools im Verhältnis 1:200 mit Sample Diluent.

Erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Im Anschluss werden in jedes Well 100µg der Standards, des Blank, des Pools und der Serumproben in Doppelbestimmung pipettiert.

HRP-conjugate im Verhältnis 1:6000 mit Lösung 2 verdünnen und jeweils 50µl in jedes Well pipettieren.

Erneute Inkubation der Mikrotiterplatten über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotator bei 400 rpm.

Danach erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Tetramethylbenzidine (TMB)-Substrat I und II zu gleichen Teilen mischen und jeweils 100µl in jedes Well pipettieren.

Die abgedunkelten Mikrotiterplatten erneut bei Raumtemperatur für ca. 15 Minuten inkubieren lassen, so dass die Blauextinktion des größten Standards (5ng/ml), mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 620nm und als Referenzfilter 450nm gemessen, 0,8 beträgt.

Im Anschluss 100µl Stop Solution 2 zum Beenden der Reaktion in jedes Well pipettieren.

Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450nm und als Referenzfilter 620nm.

Protokoll zur Durchführung des sVCAM-1

Verdünnung des Coating Antibody auf eine Konzentration von 5µg/ml mit Lösung 0.

Zum Beschichten der Mikrotiterplatte werden jeweils 100µl dieser hergestellten Lösung in alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Die abgedeckte Platte bei 2-8 °C über ein Zeitintervall von 12-18 Stunden inkubieren lassen.

Nach der Inkubationszeit restliche Lösung aus den Platten entfernen. Im Anschluss automatisiertes Waschen der Platte mit 300µl Wasch Buffer und viermaliges Wiederholen des Waschvorganges. Nach dem Waschvorgang vorsichtiges Abklopfen der noch verbliebenen Flüssigkeit.

Pipettieren von 250µl Lösung 2 in jedes Well der Mikrotiterplatte. Im Anschluss zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

25µl des Standardproteins mit 225µl Lösung 2 zu einer Konzentration von 200ng/ml verdünnen. Die weitere Verdünnung für die Standardverdünnungsreihe in Lösung 2 zu Konzentrationen von 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12,5ng/ml und 6,3ng/ml. Als Nullwert (Blank) dient Lösung 2.

Verdünnung des Pools im Verhältnis 1:50 und der Serumproben im Verhältnis 1:25 mit Lösung 2.

Erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Im Anschluss werden in jedes Well 100µg der Standards, des Blank, des Pools und der Serumproben in Doppelbestimmung pipettiert.

Auflösen des Biotin-Conjugate im Verhältnis 1:10 mit Lösung 2. Im Anschluss weitere Verdünnung des Biotin-Conjugate pro Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:750 mit Lösung 2 und Streptavidin-HRP im Verhältnis 1:1250 mit Lösung 2.

Die beiden oben genannten Lösungen zu gleichen Teilen mischen und jeweils 50µl hiervon in jedes Well pipettieren.

Erneute Inkubation der Mikrotiterplatten über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rotator bei 400 rpm.

Danach erneutes Wiederholen des oben beschriebenen Waschvorganges.

Tetramethylbenzidine (TMB)-Substrat I und II zu gleichen Teilen mischen und jeweils 100µl in jedes Well pipettieren.

Die abgedunkelten Mikrotiterplatten erneut bei Raumtemperatur für ca. 15 Minuten inkubieren lassen, so dass die Blauextinktion des größten Standards (100ng/ml), mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 620nm und als Referenzfilter 450nm gemessen, 0,6 beträgt.

Im Anschluss 100µl Stop Solution 2 zum Beenden der Reaktion in jedes Well pipettieren.

Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450nm und als Referenzfilter 620nm.

Protokoll zur Durchführung des sIL-4R

Verdünnung des Standard buffer diluent 10fach mit Aqua dest.

Vollständiges Aufnehmen der Standards mit der auf dem Vial beschriebenen Menge an Standard Buffer Diluent zu einer Konzentration von 1000pg/ml.

Verdünnung des Washing Buffer 200fach mit Aqua dest.

Weitere Verdünnungen des gleichmäßig aufgelösten Standards in Standard buffer diluent zu Konzentrationen von 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62,5pg/ml und 31,25 pg/ml. Als Nullwert (Blank) dient Standard buffer diluent.

Im Anschluss werden in jedes Well 100µg der Standards, des Blank, des Pools und der Serumproben in Doppelbestimmung pipettiert.

Verdünnung des Biotinylated Antibody (AB) mit Biotinylated Antibody Diluent im Verhältnis 1:27,5. Danach 50µl des verdünnten Biotinylated Antibody in jedes Well pipettieren.

Die abgedeckte Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubieren lassen.

Restliche Lösung aus den Platten entfernen. Im Anschluss automatisiertes Waschen der Platte mit 300µl Wasch Buffer und dreimaliges Wiederholen des Waschvorganges. Nach dem Waschvorgang vorsichtiges Abklopfen der noch verbliebenen Flüssigkeit.

Streptavidin-HRP (5µl vial) in 500µl HRP Diluent aufnehmen. Weitere Verdünnungen im Verhältnis 1:67,7 durchführen.

100µl des komplett verdünnten Streptavidin-HRP in jedes Well pipettieren.

Die abgedeckte Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubieren lassen.

Wiederholung des oben beschriebenen Waschvorganges.

100µl des gebrauchsfertigen TMB in jedes Well pipettieren und abgedunkelt für ca. 10 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren lassen.

Beenden der Reaktion mittels 100µl H₂SO₄ Stop Reagent pro Well.

Automatisierte Messung der Extinktion mit dem Spektrometer (Fa. Molecular Devices, USA) bei 450nm und als Referenzfilter 620nm.

Herstellernachweis

ELISA-Test

- Human TNF-R1 CytoSets™ und Human TNF-R2 CytoSets™
BioSource Europe S.A., Rue de l'Industrie 8, B1400 Nivelles, Belgium
- Human sICAM-1 Module Set, human sVCAM-1 Module Set und human TNF-beta Module Set
Bender MedSystems Diagnostic GmbH, Rennweg 95b, A-1030 Vienna, Austria
- sIL-4R ELISA KIT
Diacclone Research, 1, Bld Fleming, BP 1985, F25000 Besancon

Lösungen und Chemikalien

- fetales Kälberserum FKS
Biochrom AG, Leonorenstrasse 2-6, 12247 Berlin
- Sample Diluent No1
Bender MedSystems Diagnostic GmbH, Rennweg 95b, A-1030 Vienna, Austria
- Tetramethyl Benzidine TMB Peroxidase Substrate System
KPL Kirkegaard Perry Laboratories, 2 Cessna Court, Gaithersburg, Maryland, 20879-4171 USA
- Kontrollen für sTNF-R1 und sTNF-R2
BioSource Europe S.A., Rue de l'Industrie 8, B1400 Nivelles, Belgium
- Aqua dest.
Baxter Deutschland GmbH, D85716 Unterschleißheim

- NaCl
Carl Roth GmbH & Co, Schoemperlemstr. 1-5, D-76185 Karlsruhe
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
Merk K Ga A, D-64271 Darmstadt
- KH_2PO_4
Merk K Ga A, D-64271 Darmstadt
- KCl
Merk K Ga A, D-64271 Darmstadt
- H_2SO_4
Merk K Ga A, D-64271 Darmstadt
- Bovines Serumalbumin (BSA)
Merk K Ga A, D-64271 Darmstadt
- Tween 20
Merk-Schuchardt, D-85662 Hohenbrunn

Geräte

- Mikrotiterplatte
Nunc A/S, Kamstrupvej 90, DK-4000 Roskilde, Denmark
- Pipetten
Eppendorf Nethler-Hinz GmbH, Im Borkhausenweg 1, 22339 Hamburg
- Probenröhrchen Nunc Cryo Tube™ Vials
Nunc™ Brand Products, Hagenauerstrasse 21a, 65203 Wiesbaden-Bieberich

- Probenröhrchen Cellstar PR-Röhrchen
Greiner Labortechnik GmbH, Maybachstrasse 2, 72636 Frickenhausen
- Zentrifuge Hettich Rotaxia/RP
Hettich Zentrifugen, Gartenstrasse 100, 78532 Tuttlingen
- Automatischer Wascher Behring BEP II ELISA Processor II
Dade Behring Vertriebs GmbH & Co, Am Kronberger Hang 3, D-65824 Schwalbach
- Mehrkanalspektrometer Vmax kinetic microplate reader
Molecular Devices, Gutenbergstrasse 10, 85737 Ismaning
- Software ELISA-Programm
Medgenix Diagnostic, Biosource GmbH, Lise-Meitner Strasse 4a, 40878 Ratingen
- Easia Shaker
Medgenix Diagnostic, Biosource GmbH, Lise-Meitner Strasse 4a, 40878 Ratingen

Beteiligung an wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Poster

S. Mannes-Keil, R. Reuß, G. Foerster, K. Retzlaff, C.V. Burger, S. Pohle, J. Schnittker, M. Kaps, P. Oschmann. 2004. Fluctuations of immunological parameters as prognostic criterion for disease activity and side effect profile in patients treated with interferon beta-1a (AVONEX®). 20th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Wien (Österreich)

K. Retzlaff, B.S. Kühne, P. Frielinghaus, S. Mannes-Keil, J. Kraus, C.V. Burger, R. Reuß, M. Kaps, P. Oschmann. 2005. sVCAM-1 in MS patients under interferon beta treatment: a surrogate marker for therapy response? 15th Meeting of the European Neurological Society, Wien (Österreich)

J. Kraus, A. Kreiling, S. Mannes-Keil, K. Retzlaff, P. Oschmann. 2005. Circadian rhythmicity of cytokines and cytokine receptors in the serum of MS sclerosis patients. 15th Meeting of the European Neurological Society, Wien (Österreich)

J. Kraus, A. Kreiling, S. Mannes-Keil, K. Retzlaff, P. Oschmann. 2006. Circadian rhythmicity of cytokines and cytokine receptors in the serum of MS sclerosis patients. 22nd Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS), Madrid (Spanien)

Abstracts

I. Krasenbrink, S. Mannes-Keil, S. Kühne, K. Dimde, J. Kraus, M. Kaps, P. Oschmann. 2001. Effekte einer einmal wöchentlichen Gabe von Interferon beta-1a (AVONEX®) auf klinische Parameter sowie Zytokine und Adhäsionsmoleküle gemessen durch ELISA. 74. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, Aachen

Publikationen

Retzlaff K, Kühne BS, Mannes-Keil S, Frielinghaus P, Kraus J, Foerster G, Kaps M, Oschmann P. 2003. Einfluss einer Interferon-Therapie auf die Interferon-beta- und Interleukin 4-Rezeptor-mRNA-Expression, Aktuelle Neurologie 2003, Thieme Verlag

G. Foerster, K. Retzlaff, S. Mannes-Keil, H. Buch, J. Kraus, M. Kaps, P. Oschmann. 2004.

Th2-Zytokinexpression bei MS-Patienten: IL-4 und IL-10-Expression korreliert mit Progression der Erkrankung. 2004. Akt Neurol 2004; 31

K. Retzlaff, B.S. Kühne, S. Mannes-Keil, P. Frielinghaus, J. Kraus, G. Foerster, C.V. Burger, M. Kaps, P. Oschmann. 2004. Bedeutung des solublen Interleukin 4-Rezeptors als prognostischen Marker für den klinischen Verlauf bei MS-Patienten. Akt Neurol 2004; 31.

A. Kreiling, P. Oschmann, S. Mannes-Keil, K. Retzlaff, J. Kraus. 2005. Zirkadiane Rhythmik von Zytokinen und Zytokinrezeptoren im Serum von MS-Patienten. Akt Neurol 2005; 32

R. Reuß, S. Pohle, K. Retzlaff, S. Mannes-Keil, C. Burger, S. Vogel, M. Kaps, P. Oschmann. 2005. Interferon beta-1a increases leukocyte TNF-R1 and decreases TNF-R2 gene expression in human MS therapy responders, thus TNF- α signaling via TNF-R1 might be beneficial, via TNF-R2 detrimental. Akt Neurol 2005; 32.

S. Vogel, K. Retzlaff, R. Dudeck, R. Reuß, C. Burger, S. Mannes-Keil, M. Kaps, P. Oschmann. 2005. Risikoprofil von Drop-out-Patienten mit einer Mitoxantron-Therapie bei Multipler Sklerose. 2005. Akt Neurol; 32.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Lich, im Juni 2008

Sabine Rosalia Emma Mannes-Keil, geb. Mannes

Danksagung

Ich danke

Herrn Professor. Dr. P. Oschmann für die Anregung zur Anfertigung dieser Arbeit, für seine ständige Gesprächsbereitschaft sowie die kompetente Betreuung während dieser Zeit

ganz herzlich allen Patienten, die sich zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärten und ohne deren Kooperation diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre

Marita Hölz, Edith Löffler, Cornelia Roth-Langer und Helga Weiser-Fichtner des Neurochemischen Labors der Neurologischen Klinik Gießen für die freundliche Aufnahme, stetige Hilfsbereitschaft und das angenehme, familiäre Arbeitsklima

Gesine Foerster für ihre Freundschaft, die seelische und moralische Unterstützung und geduldige Korrektur der unzähligen falsch gesetzten Kommas auch über die Landesgrenzen Hessens hinaus

Kerstin Retzlaff, Marlene Tschernatsch, Christina Burger, Sabina Kühne und Heike Buch für unvergessliche Momente im Labor und im Stationsbetrieb

Susanne Pohle und Reinhard Reuß für die kompetente Auswertung der MRT-Daten

dem Institut für angewandte Statistik Dr. Jörg Schnitker GmbH für die statistische Auswertung der Ergebnisse sowie Herrn Dr. H.C. Salmen von biogen idec für die wertvollen Anregungen

meinem Mann Sven Keil, meinen Eltern und meiner Familie für so Vieles.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5448-2

