

**Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin**

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Immunadsorption bei Patienten mit einer akuten Optikusneuritis
im Rahmen der Multiplen Sklerose**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen
vorgelegt von

Désirée Wagner (geb.) Tampe

aus

Neunkirchen (Saar)

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. med. M. Koziolk

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Stadelmann- Nessler

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Multiple Sklerose	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Ätiologie	1
1.1.3. Pathologie	2
1.1.4. Klinik	5
1.1.4.1. Verlaufsformen	5
1.1.4.2. Symptome	6
1.1.4.3. Diagnostik	7
1.1.4.4. Therapie	9
1.2. Fragestellung der Studie	10
1.2.1. klinische Verbesserung der Symptomatik unter der Therapie	10
1.2.2. Proteinanalysen der Eluate	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Patientenauswahl	11
2.1.1. Ethikvotum, Probandenversicherung und Meldung an die Regierungsbehörde	11
2.1.2. Einschlusskriterien	11
2.1.3. Ausschlusskriterien	12
2.1.4. Laborparameter	12
2.1.5. Behandlungsablauf	13
2.1.6. Neurologisches Monitoring	14
2.1.7. Untersuchungstermine	14
2.1.8. Statistik	18
2.2. Experimenteller Teil: Proteinanalysen	19
2.2.1. Material	19
2.2.1.1. Geräte	19

2.2.1.2. Software	19
2.2.1.3. Gebrauchsmaterial	19
2.2.1.4. Chemikalien	20
2.2.2.Hintergrund	21
2.2.2.1. Elution der Adsorbersäulen	21
2.2.2.2. 2D- Gelelektrophorese	22
2.2.2.3. Proteinverdau und MALDI- TOF- Proteinidentifikation	22
3. Ergebnisse	24
3.1. Allgemeines	24
3.2. Klinik	25
3.2.1.Expanded Disability Status Scale (EDSS)	25
3.2.2.Incapacity Status Scale (ISS)	26
3.2.3.Visus	27
3.2.4.Visuell evozierte Potentiale (VEP)	27
3.3. Befunde, Behandlung und klinischer Verlauf in einer Übersicht	30
3.4. Laborparameter	31
3.4.1.Immunglobuline und Komplementfaktoren	34
3.5. Responder versus Non- Responder	37
3.6. Nebenwirkungen und Therapie- assoziierte Komplikationen	42
3.7. Experimentelle Ergebnisse	43
3.7.1.2D- SDS Gelelektrophorese	43
3.7.2.Ergebnisse der MALDI- TOF- Analyse	45
4. Diskussion	47
4.1. Plasmaaustausch (PE)	47
4.2. Immunadsorption (IA)	51
4.3. Nebenwirkungen	54
4.4. Responder und Non- Responder	55

4.5. Hypothese zum Wirkmechanismus der IA	56
4.6. Ziele weiterführender Studien	59
5. Zusammenfassung	60
5.1. Grundlagen	60
5.2. Methoden und Ergebnisse	60
5.3. Schlussfolgerung	61
6. Anhang	62
6.1. Abkürzungsverzeichnis	62
6.2. Abbildungsverzeichnis	64
6.3. Tabellenverzeichnis	65
7. Literaturverzeichnis	66

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose (MS) ist in Mitteleuropa die häufigste chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie ist neben der Epilepsie die häufigste neurologische Erkrankung des jungen Erwachsenen und betrifft ca. 8% der behandelten Patienten in neurologischen Kliniken unserer Breitengrade. Die Prävalenz in Deutschland beträgt 149,1/100.000 Einwohner, was ungefähr 122.000 MS-Patienten entspricht (Hein und Hopfenmüller 2000). Weltweit sind etwa 2,5 Millionen Menschen an MS erkrankt, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 15. und 50. Lebensjahr. Jedoch manifestiert sich die MS nicht nur im Erwachsenenalter; pädiatrische MS-Fälle sind zunehmend in das Interessenfeld der Forschung gerückt (Pohl et al. 2007).

Die Lebenserwartung von Patienten die an MS erkrankt sind, ist im Vergleich zu Nicht-Erkrankten gleichen Alters um sechs bis zehn Jahre reduziert (Sadovnick et al. 1992), jedoch konnte in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Rückgang der Mortalität erreicht werden (Brønnum-Hansen et al. 2004).

Bei der Betrachtung der geographischen Verteilung der Multiplen Sklerose zeigt sich ein deutliches Nord-Süd-Gefälle mit jeweils, von den mittleren Breitengraden ausgehend, polwärts zunehmender Häufigkeit und nahezu fehlender Prävalenz in Äquatornähe (Kurtzke et al. 1985; Callegaro et al. 1992; Radhakrishnan et al. 1985; Kuroiwa 1982). In Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass Erwachsene ihr Erkrankungsrisiko auch bei Auswanderung in weit entfernte Gegenden beibehalten. Dies gilt ab einem Alter von über 15 Jahren, was auf eine Determinationsphase in der Kindheit vor dem 15. Lebensjahr schließen lässt (Dean 1967).

1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist noch unbekannt, jedoch existieren hinsichtlich der Pathogenese zahlreiche Theorien. Vor allem die Einflüsse von Umweltfaktoren und genetische Determinanten gelten als Auslöser für die autoimmune Schädigung der Axone.

Für den Einfluss von Umweltfaktoren sprechen die Ergebnisse der Migrationsstudien, in denen eine Migrationskonkordanz gezeigt werden konnte. In diesem Zusammenhang wurde vor allem eine infektiöse Genese mit Beteiligung verschiedenster Erreger wie Chlamydia pneumoniae (Stratton und Sriram 2003), humanes Herpesvirus 6 (Clark 2004) sowie Epstein-Barr-Virus (Cepok et al. 2005; Haahr et al. 2004) diskutiert. So konnte bei Kindern mit MS häufiger eine Immunreaktion gegen das

Epstein-Barr-Virus nachgewiesen werden als bei nicht-erkrankten Kindern (Banwell et al. 2007; Alotaibi et al. 2004). Auch die Zunahme der Erkrankungsrate auf den Färöer-Inseln nach der Stationierung Britischer Soldaten 1943 gilt als Bestätigung der Annahme einer infektiösen Genese (Kurtzke et al. 1993; Kurtzke und Hyllested 1979). Jedoch konnte eine direkte Übertragung von MS in Studien an Adoptiv- und Stiefkindern von MS-Patienten nicht gezeigt werden (Dyment et al. 2006). Eine alternative Hypothese vermutet eine verringerte Anfälligkeit, an MS zu erkranken, wenn das Immunsystem sich in der Kindheit mit verschiedenen Infektionserkrankungen auseinandersetzen muss. So wird durch das Zusammenleben mit Geschwistern vor dem sechsten Lebensjahr das Risiko an MS zu erkranken signifikant gesenkt. Dieser Zusammenhang wird durch die vermehrte, wechselnde Ansteckung mit Infektionskrankheiten von Geschwisterkindern erklärt (Ponsonby et al. 2005).

Auffällig in der Verteilung der Erkrankungshäufigkeit ist die fast fehlende Prävalenz in der äquatorialen Ebene. Hierzu entstand die Vitamin-D-Stoffwechselfhypothese, die einen Zusammenhang zwischen dem Vitamin-D-Serumspiegel und dem Erkrankungsrisiko sieht. Vitamin-D wird hauptsächlich in der Haut durch Sonneneinstrahlung gebildet. Somit führt eine vermehrte Sonnenexposition in der Kindheit zu einem höheren Vitamin-D-Spiegel und der Hypothese zu Folge zu einem niedrigeren Risiko, an MS zu erkranken (van der Mei et al. 2003; Munger et al. 2006). Mit Hilfe dieser Hypothese lässt sich auch die niedrige Inzidenz bei traditionell lebenden Inuit erklären, die sich durch ihren Fischfang Vitamin-D-reich ernähren (Kromann und Green 1980; Deutch et al. 2007).

Die Multiple Sklerose ist keine klassische vererbte Erkrankung, dennoch gibt es Hinweise auf eine genetische Prädisposition. Geschwister von MS-Patienten erkranken deutlich häufiger als der Bevölkerungsdurchschnitt und das Erkrankungsrisiko von Kindern MS-erkrankter Eltern ist deutlich erhöht (Ebers et al. 2000; Robertson et al. 1996). Des Weiteren spricht für eine deutliche genetische Beteiligung die Konkordanz bei monozygoten Zwillingen von 25% und bei dizygoten von 3% (Ebers et al. 1986; Mumford et al. 1994; Willer et al. 2003). Wesentlich für die genetische Disposition sind unter anderem spezifische HLA-Loci, die bei der MS häufiger nachgewiesen werden können. So gilt die Assoziation von HLA-DR2 und Multipler Sklerose bei Kaukasiern als gesichert (Hillert et al. 1994; Olerup und Hillert 1991). In neueren Studien konnten zahlreiche genetische Polymorphismen identifiziert werden die bei MS-Erkrankten häufiger nachgewiesen werden konnten als in der Gesamtbevölkerung und somit eine genetische Prädisposition bedeuten. Von wissenschaftlichem Interesse sind Gen-Polymorphismen, die an Interleukin-Signalkaskaden beteiligt sind (Gregory et al. 2007; Lundmark et al. 2007; Marrosu 2007).

1.1.3 Pathologie

Bei der Multiplen Sklerose ist vorwiegend die weiße Substanz des Zentralen Nervensystems (ZNS) betroffen, wobei es zu einer herdförmigen Schädigung und Auflösung der von Oligodendrozyten gebildeten Markscheiden kommt. Diese Entmarkungsherde sind großflächig disseminiert verteilt, oft

perivenös angeordnet und zeigen eine unregelmäßige Begrenzung mit einem Durchmesser von 2- 10 mm. Größere Herde entstehen durch Konfluieren mehrerer kleinerer Herde, die auch als Plaques bezeichnet werden. Sie erscheinen makroskopisch bei der chronischen, nicht floriden MS als grau-weißliche, gut abgrenzbare Herde, die sich derb anfühlen. Frische oder aktive Herde sind weniger scharf begrenzt, gelblich bis lachsfarben mit einer deutlich geringeren Konsistenz. Bei großflächiger Markscheidenfärbung sind die Plaques ausgespart und erscheinen als weißliche Flecken.

Als Prädilektionsstellen gelte die Hirnnerven (Nervi optici), der Hirnstamm, vor allem die Brücke mit Augenmuskelkernen, das Kleinhirn, die weiße Substanz in Ventrikelnähe und die Hinterstränge des Rückenmarks. Zwar gilt die MS als Erkrankung der weißen Substanz, jedoch konnten auch Läsionen in der grauen Substanz, insbesondere im zerebralen Cortex nachgewiesen werden (Inglese et al. 2004; Kidd et al. 1999; Peterson et al. 2001). Mikroskopisch lassen sich die Herde in aktiv-chronische, inaktiv-chronische Läsionen und Schattenplaques einteilen (Lucchinetti et al. 2000; Lassmann et al. 1997). Die aktiv-chronischen Läsionen zeigen eine gestörte Funktion der Blut- Hirn- Schranke mit konsekutivem Ödem, welches mit perivaskulären Lymphozytenmanschetten einhergeht. Die Myelinscheiden lösen sich auf und eindringende Makrophagen phagozytieren das Myelin. Nachfolgend werden Astrozyten aktiviert, die gliöses Narbengewebe um die Axone bilden. In den inaktiv- chronischen Läsionen weisen die Plaques einen massiven Verlust an Oligodendrozyten auf, wobei Entzündungszellen fehlen. Das Zentrum der Läsion besteht hauptsächlich aus verzweigten Astrozytenfortsätzen und größtenteils zerstörten Axonen. Die Schattenplaques entstehen durch Remyelinisierung. Diese zeichnet sich durch die Bildung von neuen, dünnen Myelinscheiden aus, die allerdings im Vergleich zu gesunder weißer Substanz unregelmäßiger erscheint (Brück und Stadelmann 2003). Diese Remyelinisierungsbereiche besitzen jedoch eine geringere Nervenleitgeschwindigkeit, was elektrophysiologisch nachweisbar ist.

Immunpathologisch lassen sich vier verschiedene Muster der Myelindestruktion unterscheiden. Allen vier gemeinsam ist das von Makrophagen und T-Zellen dominierte, entzündliche Infiltrat. Bei Mustern von Typ I und II umgeben Makrophagen und T-Lymphozyten kleine Venen und Venolen in gut abgrenzbaren Herden. Zusätzlich finden sich im Typ II Ablagerungen von Komplement und Immunglobulinen, vor allem IgG, in den aktiven Bereichen des Myelinabbaus. Diese Ablagerungen führen zu der Vermutung, dass diese, gegen das Myelin gerichteten Antikörper, zu einer komplementvermittelten Lyse des Myelins führen (Storch et al. 1998; Genain et al. 1999). Des Weiteren ist in diesem aktiven Bereich die Anzahl der Oligodendrozyten deutlich verringert, während sie im Zentrum der Plaque wieder häufiger vorhanden sind und die Remyelinisierung vorantreiben.

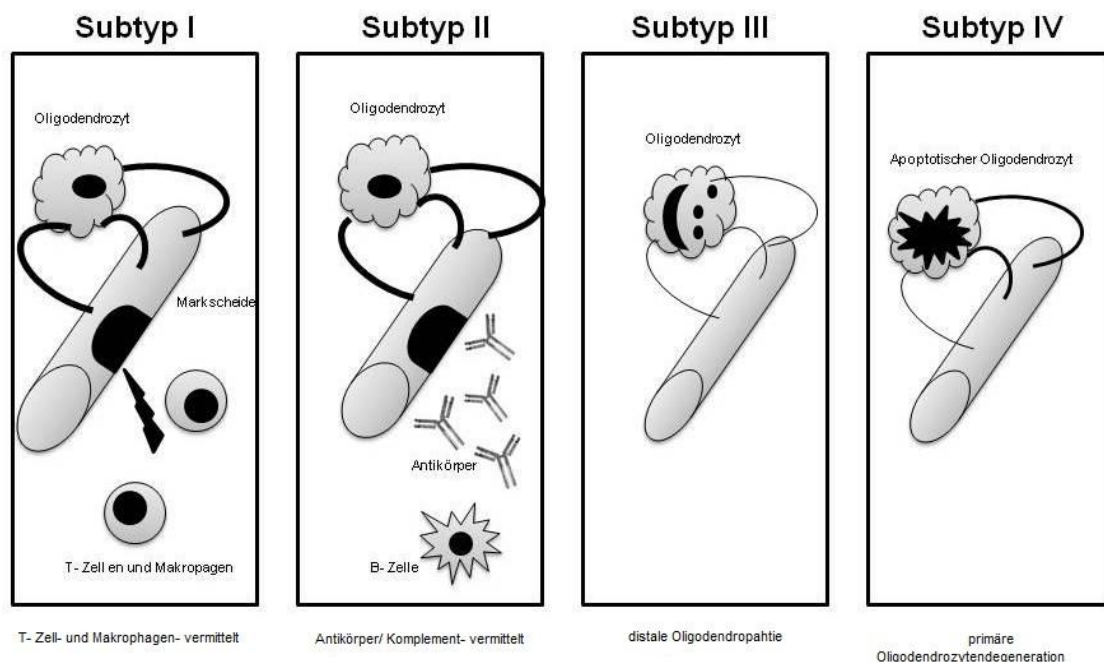
Die Läsionen des Typ III zeichnen sich durch eine diffus- unscharfe Begrenzung mit einem Fehlen der perivenösen Anordnung der Makrophagen aus. Im Gegensatz zu den anderen Typen, bei denen es zu einem gleichmäßigen Verlust aller Myelinproteine kommt, ist für diese Läsionen ein Verlust des weit distal in den Oligodendrozytenfortsätzen konzentrierten Myelin- assoziierten Gylkoproteins (MAG) charakteristisch (Itoyama et al. 1980). Die Kerne der Oligodendrozyten weisen mit Kondensation und Fragmentation die typischen Merkmale der Apoptose auf und es kommt zu einem deutlichen Verlust an Oligodendrozyten. Dieser starke Zellverlust findet hauptsächlich an der Grenzregion zwischen

aktiver Läsion und umgebender weißer Substanz statt. Eine spätere Remyelinisierung erfolgt nur in geringem Ausmaß. Es besteht eine pathologische Ähnlichkeit zur ischämischen Schädigung der weißen Substanz und es ist nicht klar, ob es sich um eine Störung der Mikrozirkulation bei einer Vaskulitis handelt oder es eine Folge der Störung der Mitochondrien mit Energiemangel ist (Aboul-Enein et al. 2003; Lassmann 2003). Zu einem Untergang von Oligodendrozyten in der die Läsion umgebenden weißen Substanz mit Folge der Demyelinisierung kommt es in den Herden des Typ IV. Die Oligodendrozyten weisen jedoch keine typischen mikroskopischen Merkmale einer Apoptose auf. Aufgrund der nahezu vollständigen Schädigung der Oligodendrozyten in den sowohl aktiven als auch inaktiven Bereichen der Läsion kommt es zu praktisch keiner Remyelinisierung. Eine Schädigung durch Makrophagentoxine wird angenommen, welche eine metabolische Störung der Oligodendrozyten voraussetzt. Man spricht hier von einer Oligodendrozytendystrophie. Dieses Muster findet sich vor allem bei der kleinen Gruppe von Patienten mit einer primär- chronisch progredienten Multiplen Sklerose.

Die Remyelinisierung spielt vor allem im Frühstadium eine bedeutende Rolle und kann sogar Entmarkungsherde komplett restituieren. Sie führt zu einer dünneren Myelinschicht, mit kürzeren Internodien und einer geringeren Nervenleitgeschwindigkeit. Nach einer Myelinschädigung leiten Nervenfasern erheblich langsamer, unabhängig davon ob es zu einer Remyelinisierung gekommen ist oder nicht. Im Spätstadium der MS kommt es jedoch zu einer zunehmenden Schädigung der Oligodendrozyten, wodurch eine Remyelinisierung ausbleibt.

Die Ursache persistierender Symptome ist eine ausgeprägte axonale Degeneration in aktiven Entzündungsherden.

Abbildung 1: Pathophysiologische Subtypen, modifiziert nach Lassmann et al. (2001), S. 116



1.1.4 Klinik

1.1.4.1 Verlaufsformen

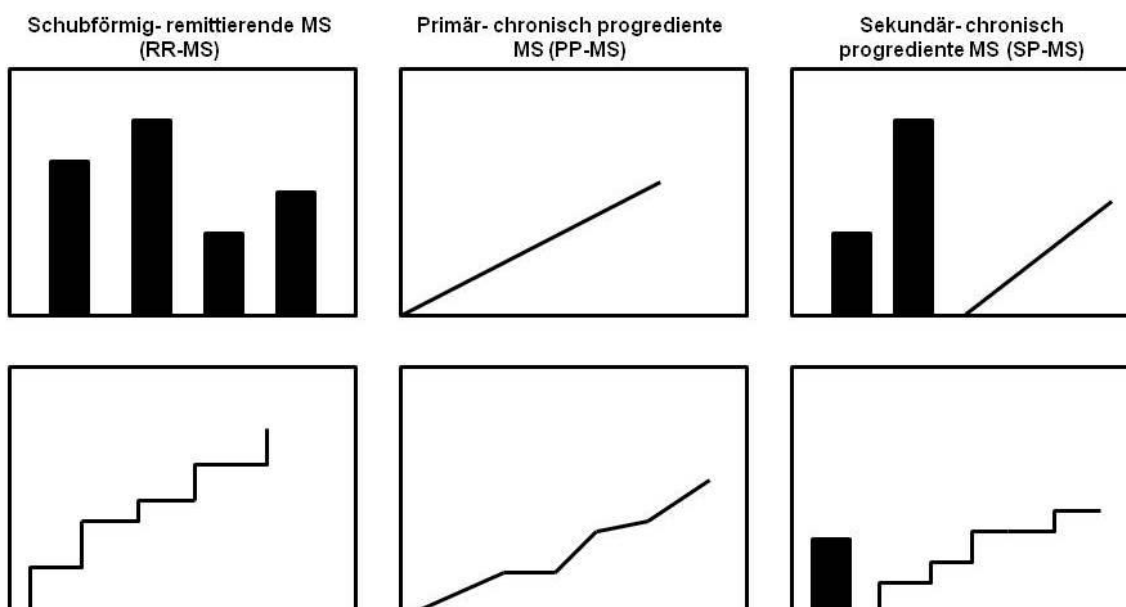
Ein akuter Schub wird definiert als das Auftreten neurologischer Symptome bei einem gesunden bzw. in der Funktion bisher nicht eingeschränkten Patienten. Auch das Wiederauftreten oder Verschlechtern schon früher aufgetretener Symptome wird als akuter Schub bezeichnet. Die Symptome müssen länger als 24h anhalten, wobei ihnen eine entzündliche Schädigung des Zentralnervensystems zugrunde liegt. Zwischen zwei Schüben soll definitionsgemäß ein Zeitraum von einem Monat liegen (Lublin und Reingold 1996). Abzugrenzen von einem akuten Schub sind die sogenannten Pseudoschübe, die durch psychische Belastung oder Depression zu einer Symptomverstärkung führen können. Auch eine Erhöhung der Körpertemperatur kann zu einer Verschlechterung führen und wird als Uhthoff- Phänomen bezeichnet (Uhthoff 1890).

Die Dauer eines Schubes präzise zu bestimmen ist kaum möglich, da im Verlauf eines Schubes einzelne Symptome an Intensität zunehmen während andere Symptome geringer werden. Therapeutisches Ziel ist es eine vollständige Remission zu erreichen, und dies bedeutet, dass alle im Schub beobachteten Krankheitssymptome sich vollständig zurückbilden müssen. Leider erreicht man eine vollständige Remission nur in der Hälfte der Fälle, eine partielle in einem Viertel und ohne Rückbildung verbleibt ein weiteres Viertel der Patienten. Die Multiple Sklerose wird nach der zeitlichen Abfolge sowie Art und Weise, wie die Symptome auftreten, in verschiedene Verlaufsformen eingeteilt.

Man unterscheidet

- I. **relapsing- remitting MS (RR-MS)**: bei der schubförmigen- remittierenden MS lassen sich einzelne Schübe voneinander abgrenzen, wobei es zu einer vollständigen oder unvollständigen Remission kommen kann
- II. **primary- progressive MS (PP-MS)**: hierbei handelt es sich um einen primär chronisch- progredienten Verlauf, wobei keine einzelnen Schübe abgrenzbar sind. Es handelt sich um eine schleichende Progression ohne Rückbildung
- III. **secondary- progressive MS (SP-MS)**: der sekundär chronisch- progrediente Verlauf, der auf einen initial schubförmigen Verlauf folgt
- IV. **progressive- relapsing MS (PR-MS)**: von Beginn an ein chronisches Fortschreiten der Erkrankung mit Schüben. Nur partielle Remission

Abbildung 2: Krankheitsverlauf der MS, modifiziert nach Lublin und Reingold (1996), S. 908
(Säulen: akuter Schub ohne Residuum; Strich: progredienter Verlauf mit Residuen)



Der primär schubförmige Verlauf findet sich zu Beginn bei 85% der Patienten. Bei 15% wird ein primär chronisch- progredienter Verlauf diagnostiziert (Thompson et al. 1997). Auch hinsichtlich des Manifestationsalters unterscheiden sich die Verlaufsformen der MS. Die RR-MS betrifft häufiger junge Patienten, wohingegen die PP-MS häufiger bei älteren Patienten beobachtet wird.

Des Weiteren zählt man zu dem Formenkreis der Multiplen Sklerose einen besonders schweren und akuten Verlauf der relativ schnell zum Tod führt. Diese besonders schwere Form der Multiplen Sklerose wird nach ihrem Erstbeschreiber als „Marburger Typ“ bezeichnet (Marburg 1906).

1.1.4.2 Symptome

Die Ausprägung der klinischen Symptome bei Multipler Sklerose unterliegen einer großen interindividuellen Variabilität. Typisch ist nur der Verlauf der neurologischen Symptome, die zeitlich unabhängig voneinander auftreten und Ausdruck der zeitlichen sowie räumlichen Dissemination sind. Da die Erkrankung das gesamte ZNS betreffen kann, sind nahezu alle zerebralen und spinalen Symptome denkbar. Häufige Initialsymptome sind motorische und sensible Störungen, retrobulbäre Optikusneuritis, Augenmotilitätsstörungen, zerebelläre Symptome, Störungen in der vegetativen Regulation sowie psychische Auffälligkeiten und es besteht eine Assoziation zwischen Initialsymptom und Manifestationsalter. So findet sich die Optikusneuritis als Erstmanifestation vor allem bei Patienten, die vor dem 30. Lebensjahr erkranken, wohingegen Lähmungen vor allem der unteren Extremität häufig bei Patienten beobachtet wird, die nach dem 30. Lebensjahr erkranken.

Zeichen einer Optikusneuritis sind Schleiersehen, verschwommen sehen bis hin zu einem kompletten Visusverlust. Die Patienten berichten über eine Blendeempfindlichkeit und Lichtscheu. Bei der Untersuchung zeigt sich in der Gesichtsfeldprüfung häufig ein zentraler Gesichtsfeldausfall. Sensible Ausfälle sind neben der Optikusneuritis das häufigste Erstsymptom und werden meist als Parästhesien mit Kribbel- und Kältegefühl empfunden. Bestehen Läsionen im Bereich des Hinterstrangs, so ist die Tiefensensibilität gestört mit der Folge der Stand- und Gangataxien bis hin zur Stehunsfähigkeit. Im Spätstadium gehören Paresen zum Bild der MS. Kommt es zu einer Schädigung der Pyramidenbahn so zeigt sich dies in spastischen Paresen mit einem erhöhten Muskeltonus, gesteigerten Muskeleigenreflexen und positivem Babinski-Zeichen. Etwa 10% der Patienten leiden im Spätstadium an atrophischen Paresen entstanden durch Entmarkungsherde im Bereich der Wurzelaustrittszone. Kombiniert mit motorischen Ausfällen kommt es häufig zu Kleinhirnsymptomen wie einem Intentionstremor, der sich bis hin zu einem Intentionismyoklonus steigern kann. Jedoch gilt als typisches Kleinhirnsymptom die skandierende Sprache. Häufig ist bei der MS der Hirnstamm betroffen. Dies äußert sich in einem Nystagmus und Motilitätsstörungen der Augen, was zu Doppelbildern führt. Auch Schwindelerscheinungen sind in Zusammenhang mit einer vestibulären Schädigung nicht selten. Ein Hauptproblem für Patienten mit Multipler Sklerose stellt die vegetative Funktionsstörung der Blase dar, da sie erhebliche Konsequenzen im alltäglichen Leben nach sich ziehen und Hauptursache für Sekundärerkrankungen ist. Im Verlauf ihrer Erkrankung klagen 50% - 80% der Patienten über Blasenfunktionsstörungen, die aufgrund einer fehlerhaften Koordination zwischen Detrusor und Sphinkter entstehen und mit einer bedeutenden Einschränkung der Lebensqualität verbunden sind. Die vorzeitige kognitive und körperliche Ermüdbarkeit wird von Patienten häufig als Symptom genannt. Dieses Fatigue- Syndrom ist besonders in den Frühstadien sehr belastend, was dazu führt, dass bei 20% der Patienten mit einem schweren Fatigue-Syndrom zusätzlich eine Depression entsteht.

Um den Schweregrad der Behinderung des Patienten zu dokumentieren und den Verlauf zu beobachten eignet sich die Kurtzke-Skala "expanded disability status scale, EDSS" (Kurtzke 1983). Es werden acht Funktionelle Systeme von der Skala erfasst: Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorik, Blasen- und Darmfunktion, visuelle und zerebrale Funktion. Des Weiteren eignet sich zur Verlaufskontrolle eingeschränkter Funktionen bei MS-Patienten die "Incapacity Status Scale nach Kurtzke" (Kurtzke 1981). Der Score errechnet sich aus der Summe der Punkte, die jedes Funktionssystem erhält.

1.1.4.3 Diagnostik

Die Diagnose der Multiplen Sklerose wurde, vor den Einzug der bildgebenden Diagnostik, vor allem durch Einschätzung der Symptome und mit Hilfe der Anamnese gestellt. Heute stützt sich die Diagnose auf das klinische Bild, den Verlauf, die bildgebende Diagnostik (Milanese et al.1988; Yetkin et al. 1991; Mushlin et al. 1993; Clanet und Berry 1998), Liquoruntersuchung (Mehta 1991; Cepok et

al. 2001) und die Aufzeichnung evozierter Potentiale (Friedli und Fuhr 1990; Ravnborg et al. 1992). Zur Diagnosestellung werden die im Jahr 2005 überarbeiteten McDonald-Kriterien herangezogen (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2005), für die eine hohe Spezifität sowie Sensitivität gezeigt werden konnte (Dalton et al. 2002; Tintoré et al. 2003).

Folgende Bedingungen sind an die McDonald-Kriterien (McDonald et al. 2001) geknüpft:

- ein Schub ist definiert, als eine neurologische Funktionsstörung, die länger als 24 Stunden besteht und frühestens 30 Tage nach einem vorausgegangenem Schub auftritt
- für die klinische, räumliche Dissemination nach Barkhof et al. (1997) und Tintoré et al. (2000) müssen mindestens 2 Funktionssysteme betroffen sein
- für die räumliche Dissemination in der Bildgebung gelten die Kriterien nach Barkhof et al. (1997) und Tintoré et al. (2000), nach denen 3 der folgenden 4 Kriterien erfüllt sein müssen: 1. eine gadoliniumanreichernde Läsion oder 9 hyperintense Läsionen im T2-gewichteten Bild, 2. mindestens eine infratentorielle Läsion, 3. mindestens eine kortexnahe Läsion und 4. mindestens 4 periventrikuläre Läsionen
- für die klinische, zeitliche Dissemination gelten ≥ 2 akute Schübe oder eine Progression über ≥ 6 Monate
- für die zeitliche Dissemination in der Bildgebung muss in der kranialen Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ≥ 3 Monate nach einem klinischen Schub eine Läsion Kontrastmittel aufnehmen, und es muss sich um eine andere Lokalisation handeln als in dem vorherigen Schub oder, falls nach ≥ 3 Monaten keine Kontrastmittel-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden kann, muss nach weiteren ≥ 3 Monaten eine neue Kontrastmittel-aufnehmende Läsion oder T2- Läsion nachgewiesen werden
- als positiver Liquor- Befund gilt der Nachweis oligoklonaler Banden bzw. eine intrathekale IgG-Produktion
- visuell evozierte Potentiale gelten als pathognomonisch, wenn sie bei gut erhaltener Konfiguration verzögert sind.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen haben besonders in der Verlaufkontrolle ihren Stellenwert. Visuell evozierte Potentiale (VEP) ermöglichen ein Erkennen von Entmarkung im afferenten visuellen System und es können sogar stumme Demyelinisierungen dargestellt werden. Im akuten Stadium der Retrobulbärneuritis ist die Amplitude erniedrigt, sowie die Latenz P100 verzögert. Diese Latenzverzögerung kann als Folge der Demyelinisierung lebenslang bestehen bleiben, wohingegen die Amplitude sich im Verlauf wieder normalisiert.

Somatosensibel evozierte Potentiale (SEP) sowie motorisch evozierte Potentiale (MEP) sind besonders bedeutsam bei chronisch- progredienten Verlaufsformen einer spinalen MS.

1.1.4.4 Therapie

Bis heute gibt es keine kausale Behandlungsmöglichkeit der Multiplen Sklerose. Man muss unterscheiden zwischen der Therapie des akuten Schubs und der Schubprophylaxe, welche eine Reduktion der Schubfrequenz und die Verzögerung der Progredienz zum Ziel hat. Des Weiteren orientiert sich die Wahl der Therapie an dem klinischen Verlauf.

Zur Schubprophylaxe werden immunmodulatorische und immunsupprimierende Substanzen eingesetzt, mit dem Ziel, neue neurologische Defizite zu verhindern und die Verschlechterung bestehender zu verzögern. Als immunmodulatorisch wirksame Substanzen kommen β -Interferone (Bayas und Gold 2003), Glatirameracetat (Wolinsky 2006), intravenöse Immunglobuline (IVIG) (Stangel und Gold 2005) und Natalizumab zum Einsatz. Die Wirkungsweise dieser Immunmodulatoren ist noch nicht vollständig geklärt mit Ausnahme von Natalizumab, welches das Einwandern von Leukozyten ins ZNS verhindern soll. Azathioprin, Methotrexat (Fernández et al. 2004), Mitoxantron (Edan et al. 2004) und Cyclophosphamid wirken immunsuppressiv. Eine schubförmig- verlaufende MS wird zunächst mit β -Interferon oder Glatirameracetat behandelt. Zeigt diese Behandlung keine ausreichende Wirkung, erfolgt eine Therapieeskalation mit Mitoxantron (Rieckmann et al. 2004). Bei der primär chronisch-progredienten MS gibt es zurzeit noch keine effektive Therapie (Leary und Thompson 2005).

Goldstandard im akuten Schub der MS ist die intravenöse Gabe von Glukokortikoiden, welche als Puls- Therapie mit 1000mg für drei Tage gegeben werden. Sie wirken antiinflammatorisch und stabilisieren die Blut-Hirn-Schranke, so dass weniger Entzündungszellen aus dem Blut in das ZNS einwandern können. (Joyce et al. 1997; Gaillard et al. 2001). Nebenwirkungen der Stoßtherapie sind vor allem Schlafstörungen und Stimmungsschwankungen. Nach Empfehlungen der aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sollte bei Versagen der Schub- Therapie mit Methylprednisolon die Möglichkeit des Plasmaaustauschs erwogen werden (Diener und Putzki 2008; Weinshenker et al. 1999). Hierbei handelt es sich um Behandlungsverfahren, welches die pathogenen Proteine, die sich im Patientenplasma befinden, eliminiert. Beim Plasmaaustausch (PE) wird das Plasma des Patienten abgefiltert und durch eine Substitutionslösung, wie Frischplasma, Humanalbumin oder Kristalloide, ersetzt. So werden potentiell pathogene Proteine des Patientenplasmas entfernt und andere wichtige Proteine durch Fremdeiweiß ersetzt. Des Weiteren erfolgt durch die Entfernung löslicher Botenstoffe des Immunsystems eine Immunmodulation. So reduziert der PE den Th1/Th2-Zytokin- Quotient (Goto et al. 2001), entfernt autoreaktive Antikörper gegen Myelin- basisches Protein bzw. Myelin- Oligodendrozyten- Glykoprotein (MOG) (Lehmann et al. 2006) und reguliert veränderte Zellpopulationen; es kommt beispielsweise zu einem Anstieg von CD3⁺, CD4⁺ und einem Abfall von CD19⁺- Zellen (Yoshii und Shinohara 2000). Studien konnten bei 71% der Patienten ein gutes bis sehr gutes Ansprechen auf den Plasmaaustausch, durchschnittlich nach der dritten Behandlung, zeigen. Des Weiteren ist aus dieser Studie ersichtlich, dass ein früher Beginn der Behandlung häufiger zu einem guten Ergebnis führt (Schilling et al. 2006). Es besteht jedoch eine Abhängigkeit zwischen Erfolg dieser Behandlung und dem neuropathologischen Muster.

So sprechen Patienten mit dem Subtyp II besonders gut auf den Plasmaaustausch an, wohingegen Patienten mit Sutypen I und III ein mangelndes Ansprechen zeigen (Keegan et al. 2005).

Komplikationen der Therapie können auf verschiedenen Ebenen entstehen. Somit stellt der Gefäßzugang einen Bereich dar, in dem es zu diversen Problemen kommen kann. Zum einen gibt es den peripher veno-venösen Zugang, bei dem es zu Fehlpunktion, Hämatomen und Nervenverletzung kommen kann. Der zentralvenöse Zugang, der meist aufgrund der schlechten Venenverhältnisse gewählt werden muss, birgt die Gefahr der Gefäßperforation, der kardialen Arrhythmien, Infektionen, Thrombose, Blutung und Stenosenbildung. Die Substitutionslösung kann zu einer Gerinnungsstörung, allergischen Reaktion, Virusinfektion und Vasodilatation führen. Therapie-assoziierte Nebenwirkungen werden mit einer Inzidenz von 7,3 bis 17,5% angegeben, lebensbedrohliche Komplikationen mit 0,3% (Shemin et al. 2007). Eine Studie über Nebenwirkungen des PE zeigte jedoch, dass Patienten mit einer neurologischen Grunderkrankung ein signifikant höheres Risiko haben, eine Nebenwirkung des PE zu erleiden, als Patienten mit einer internistischen Grunderkrankung (Bramlage et al. 2009).

Als Alternative zum Plasmaaustausch kommt die Immunadsorption (IA) in Frage. Hierbei wird das Patientenplasma nach Primärtrennung von spezifischen Antikörpern befreit und dem Patienten gereinigt wieder re-infundiert. Es erfolgt eine Reduktion von Immunkomplexen und Immunglobulinen, sowie der Anstieg von anti- idiotypischen Antikörpern und aktivierten T-Zellen (Goto et al. 2001). Des Weiteren wird das Komplementsystem aktiviert und TNF- α , IL6, IL8, und IL10 werden adsorbiert (Sasso et al. 2001; Oda et al. 2004). Darüber hinaus kommt es zu einer Reduktion des CD4/CD8-Quotienten, sowie der T-Suppressor-Inducer-Zellen (Schneidewind- Müller et al. 2002; Brunner et al. 2005).

1.2 Fragestellung der Studie

1.2.1 Klinische Verbesserung der Symptomatik unter der Therapie

Ziel dieser Studie war es, die Verträglichkeit und Verbesserung der klinisch-neurologischen Symptomatik bei MS-Patienten unter Behandlung mit IA zu erfassen und dies mit einem historischen Patientenkollektiv, welches mit PE behandelt wurde, zu vergleichen.

1.2.2 Proteinanalysen der Eluate

Ein anderer Aspekt dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Proteinanalysen der Eluate der IA-Säulen und Serum-Proben Unterschiede in den einzelnen Patienten zu identifizieren, um vielleicht in Zukunft eine Aussage über das Ansprechen auf die IA vor Therapiebeginn machen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenauswahl

Die Patienten erfüllten aufgrund eines Steroid- refraktären Schubs der MS die Indikation zu einer Plasmapherese-Therapie. Die Rekrutierung erfolgte durch die verantwortlichen Studienleiter und Prüfarzte, wenn alle Einschlusskriterien erfüllt waren.

Das medizinische Auswahlverfahren erfolgte mittels Anamnese mit Patientenbefragung bzw. Aktenstudium und anschließenden körperlichen Untersuchungen und Blutentnahmen zum Ausschluss schwerwiegender Begleiterkrankungen. Die neurologische Untersuchung erfolgte in standardisierter Weise, der Visus wurde dabei in den Verlaufskontrollen mit identischen Sehtafeln bestimmt.

2.1.1 Ethikvotum, Probandenversicherung und Meldung an die Regierungsbehörde

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethik- Kommission genehmigt (Nr. 2/4/07) und es erfolgte die Meldung bei der Regierung (Nr. DE/CA25/0000708000). Jeder Patient wurde vor Einschluss in die Studie aufgeklärt und die Einwilligung mittels Unterschrift dokumentiert. Alle Patienten waren über eine Probandenversicherung bei der Zürich-Versicherungs-AG (Nr. 802.090.118.336) versichert.

2.1.2 Einschlusskriterien

Um in die Studien eingeschlossen werden zu können mussten die Patienten folgende Kriterien erfüllen:

- Volljährigkeit oder Einwilligung des gesetzlichen Betreuers
- funktionell beeinträchtigende Residuen nach Schub der multiplen Sklerose
- therapie-refraktäre Symptome nach zweimaliger Glukokortikoid-Therapie
- Keine Infektion in den letzten 4 Wochen vor Studienbeginn
- Keine Hb-Schwankungen um mehr als 3g/dl, keine Hb-Werte unter 11g/dl in den letzten 3 Wochen vor Studienbeginn (soweit bekannt)
- Keine Infektkonstellation im Labor (Leukozyten > 12 Tsd/ μ l), keine CRP-Werte > 20mg/dl in einer Blutentnahme in den letzten 4 Wochen
- Aufklärung und Einverständnis des Patienten.

2.1.3 Ausschlusskriterien

- Patient nicht einwilligungsfähig
- Infektkonstellation im Labor oder offensichtlicher Infekt in den letzten 4 Wochen vor Studienbeginn
- Neoplastische Grunderkrankung
- akute Erkrankungen der Lungen, der Leber und des Herzens (z. B. akuter Myokardinfarkt)
- Akute Infektionserkrankungen
- psychiatrische Erkrankungen
- niedriger Hb-Wert (<10 g/dl)
- Hepatitis B-E, sofern bekannt
- HIV-Infektion, sofern bekannt
- Arzneimittel- und Drogen und Alkoholmissbrauch.
- Die gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie gemäß §40 AMG
- Eine bestehende Schwangerschaft sowie eine nicht beendete Stillperiode
- Personen mit Untergewicht (body mass index < 20)
- Personen mit Hypotension (RR systol. < 110 mmHg oder RR diast. < 60 mmHg)
- Hypoproteinämie (Gesamteiweiß < 3,5 g/dl)
- Hypofibrinogenämie (Fibrinogen < 150 mg/dl)
- Antikörpermangelsyndrom
- Schwere Herzinsuffizienz (NYHA III oder IV)
- Bekannte Unverträglichkeit gegen einen Bestandteil der IA
- Einnahme eines ACE-Hemmers bis 10 Tage vor Therapiebeginn
- Bekannte Heparin induzierte Thrombozytopenie
- Andere Umstände, die die Verlaufsbeurteilung beeinflussen können.

2.1.4 Laborparameter

Bei Einschluss in die Studie und zur Therapieüberwachung wurden Laborparameter wie Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt), Thrombozyten, Leukozyten, Quick, partielle Thromboplastinzeit (pTT), Gesamteiweiß, Kreatinin, Harnstoff, Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), γ -Glutamyltransferase (γ GT), Alkalische Phosphatase (AP), C-reaktives-Protein (CRP), Natrium (Na), Kalium (K), Kalzium (Ca), und Kreatinin-Kinase (CK) bestimmt. Die Bestimmung dieser Laborparameter erfolgte in dem zertifizierten Labor der Klinischen Chemie der Universitätsmedizin Göttingen.

Des Weiteren wurde im zertifizierten nephrologischen Routinelabor eine quantitative Bestimmung der Immunglobuline A (IgA), G (IgG), und M (IgM) sowie der Komplementfaktoren C3c, C4 mit Hilfe eines Nephelometers vorgenommen. Auch die Konzentration des löslichen Interleukin-2- Rezeptors (sIL-2R) wurde in diesem Labor durch das Immulight-System (Siemens; Germany), welches mit Chemolumineszenz arbeitet, bestimmt (Koziolok und Müller 2009).

Die Laboranalysen erfolgten wie im Prüfplan aufgeführt (siehe Tabelle 1).

2.1.5 Behandlungsablauf

Die Immunadsorption (IA) wurde mit dem Octo Nova® (Diamed, Köln, Germany) Gerätesystem durchgeführt. Nach Aufklärung und Einverständnis der Patienten erfolgte die Behandlung der Patienten mit 5 IA-Therapien im Abstand von 2 Tagen und Beobachtung gemäß dem Prüfplan der Studie (siehe Tabelle 1). Bei Besonderheiten wurde zur Sicherheit des Patienten der Abstand zwischen zwei Therapien individuell verlängert.

Die IA erfolgte unter intensivierter Überwachung auf der Intensivstation 1022 der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie. Die Entnahme des venösen Blutes erfolgte über einen zentral-venösen Zugang, sofern ein Zugang über die Kubitalvene nicht möglich war. Unter Verwendung der Schlauchsysteme AV-210 bzw. CAV-210 wurde mit einem Blutfluss von bis zu 150ml/min im ersten Schritt das Blutplasma mit einem Plasmaseparator (Plasmaflo OP Asahi Medical) von den korpuskulären Anteilen getrennt. Die effektive Oberfläche des Plasmaseparators konnte zwischen 0,5 und 0,8 m² gewählt werden und bestand aus dem Membranmaterial Polyethylen, welches mit Ethylenvinylalkohol Copolymer beschichtet war.

Im zweiten Kreislauf wurde das Plasma innerhalb des Plasma- Perfusionssystems (PP-System) mit Hilfe des Schlauchsystems PA-220 durch den Adsorber IMMUSORBA TR-350 (Asahi Medical, Tokio) geleitet. Das PP-System erlaubt Plasmaflüsse von 5- 50ml/min, jedoch sollte bei diesem Adsorber ein maximaler Plasmafluss von 20ml/min nicht überschritten werden. Um spezifische Substanzen aus dem Plasma zu entfernen, diente als Adsorbent die Aminosäure Tryptophan, welche an Polyvinylalkohol gekoppelt war. Durch den Adsorber IMMUSORBA TR-350 war das behandelbare Plasmavolumen auf maximal 3000ml begrenzt. Um die Bindungskapazität des Adsorbers zu erhöhen, wurde das Patientenplasma mit Hilfe der Heizung Octo Therm® erwärmt. Das gereinigte Plasma konnte dann den korpuskulären Anteilen zugeführt und dem Patienten reinfundiert werden. Während der Therapie erfolgte zur Verhinderung der Bildung von Blutkoagel die Hemmung der Blutgerinnung mittels eines Gemisches aus Zitrat (ACD-A) und Heparin.

Am Folgetag jeder IA wurde bei jedem Patienten eine körperliche Untersuchung, Blutentnahme und Dokumentation von Nebenwirkungen durchgeführt.

2.1.6 Neurologisches Monitoring

Der neurologische Status wurde mittels etablierten klinischen Scores wie dem EDSS (Kurtzke 1983) (siehe Tabelle 2) und ISS (Kurtzke 1981) (siehe Tabelle 3) erhoben. Dabei wird jedem Funktions-System ein Punktwert zugeordnet und am Ende die Punktzahl addiert. Je höher der Punktwert, desto größer der Grad der Behinderung des Patienten. Dies ermöglichte einen Vergleich der Patienten untereinander, sowie eine Dokumentation einer möglichen Verbesserung von Symptomen. Durch die Kollegen aus der Neurologie wurde im Rahmen der Erhebung des EDSS-Scores der Visus mittels einer Snellen-Sehtafel (Hedin und Olsson 1984) überprüft.

Zur Objektivierung wurden bei jedem Patienten vor, nach und in der Nachbeobachtungszeit visuell evozierte Potentiale (VEP's) gemessen. Dabei mussten die Patienten auf ein Schachbrettmuster schauen, bei dem sich die Farben der Quadrate im Wechsel veränderten.

Diese visuelle Reizung führte zu einer Ausbildung von elektrischen Potentialen, die am okzipitalen Kortex abgeleitet werden konnten und Auskunft über die Funktion des Sehnerven sowie der Sehbahn gaben (NIHON KOHDEN, Neuropack M1).

2.1.7. Untersuchungstermine

Visiten mit körperlicher Untersuchung, Blutentnahmen und neurologischer Untersuchung fanden vor Einschluss in die Studie (Untersuchungstermin 0), an den Folgetagen der IA- Behandlung (Untersuchungstermin 1-5) sowie in der Nachbeobachtungsphase (Untersuchungstermin 6-8) statt (siehe Prüfplan Tabelle 1).

Tabelle 1: Prüfplan der IA- Studie

Prä- Therapiephase			Therapiephase						Post- Therapiephase		
Untersuchungstermin	-1	Aufnahme	1.IA	2.IA	3.IA	4.IA	5.IA	0	+1	+2	+3
Tage	-28 bis -1	0	1	4	8	11	14		30±5	60±10	180±10
Aufklärung	X										
Einwilligung		X									
Ein-/ Ausschlusskriterien	X	X	X	X	X	X	X				
Eigenanamnese	X										
Labor Baseline		X									
Labor Safety			X	X	X	X	X		X	X	X
Schwangerschaftstest		X									
Zwischenanamnese			X	X	X	X	X		X	X	X
Vitalzeichen		X	X	X	X	X	X		X	X	X
körperliche Untersuchung		X	X	X	X	X	X		X	X	X
Größe/ Gewicht		X	X	X	X	X	X				
Medikation	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
EKG	X										
Nebenwirkungen			X	X	X	X	X		X	X	X
Neurostatus/Visus		X						X		X	
EDSS		X			X			X		X	
incapacity status scale		X			X			X	X	X	X
VEP		X						X		X	
Biomarker			XX		X			X	X	X	X

Tabelle 2: Expanded Disability Status Scale nach McDonald und Compton (2005)

Wert	Beschreibung
0,0	Unauffällige neurologische Untersuchung
1,0	Keine Einschränkung, minimale Symptome in einem FS
1,5	Keine Einschränkung, minimale Symptome in mehr als einem FS
2,0	Minimale Einschränkung in einem FS
2,5	Milde Einschränkung in einem FS oder minimale Einschränkung in zwei FS
3,0	Moderate Einschränkung in einem FS oder milde Einschränkung in drei bis vier FS; voll gehfähig
3,5	Voll gehfähig, aber moderate Einschränkung in einem FS und mehr als minimale Einschränkung in mehreren anderen FS
4,0	Voll gehfähig ohne Hilfe, selbständig, trotz relative schwerer Einschränkungen um 12 Stunden am Tag auf; kann ohne Hilfe und Pause 500m gehen
4,5	Voll gehfähig ohne Hilfe, die meiste Zeit des Tages auf, in der Lage, den ganzen Tag zu arbeiten, aber andererseits Einschränkung der vollen Aktivität oder minimale Hilfe nötig; kann ohne Hilfe und Pause 300m gehen
5,0	Gehfähig ohne Hilfe und Pause über 200m; Einschränkungen beeinträchtigen alltägliche Tätigkeiten
5,5	Gehfähig ohne Hilfe und Pause über 100m; Einschränkungen schließen manche alltägliche Tätigkeiten aus
6,0	Intermittierend oder einseitig dauerhafte Gehhilfe nötig; um mit oder ohne Pause 100m gehen zu können
6,5	Dauerhafte beidseitige Gehhilfe nötig, um ohne Pause 20m gehen zu können
7,0	Auch mit Hilfe nur bis zu 5m gehfähig; auf den Rollstuhl angewiesen; im Rollstuhl alleine mobil und etwa 12 Stunden auf
7,5	Nur wenige Schritte möglich; auf den Rollstuhl angewiesen und zum Teil auch hier auf Hilfe angewiesen; nicht den gesamten Tag auf; evtl. motorbetriebener Rollstuhl notwendig
8,0	Hauptsächlich im Bett liegend oder im Rollstuhl sitzend; selbständige Körperpflege möglich; Arme im allgemeinen noch funktionsfähig
8,5	Hauptsächlich im Bett liegend; Funktion der Arme eingeschränkt; selbständige Körperpflege eingeschränkt
9,0	Bettlägerig; sprechen und essen möglich
9,5	Bettlägerig; völlig hilflos; unfähig effektiv zu kommunizieren oder zu essen/ zu schlucken
10,0	Tod infolge der Multiplen Sklerose

Tabelle 3: Incapacity Status Scale (ISS) nach Kurtzke (1981)

Funktionssystem	Leistung	Punkte
1. Treppen steigen	Normal	0
2. Laufen	Leichte Einschränkung, es wird aber keine Hilfe benötigt	1
3. Transfer (z.B. Rollstuhl→ Sessel oder Bett)	Moderate Einschränkung, es werden Hilfsmittel benötigt	2
4. Toilettengang	Ausgeprägte Einschränkung, bei der menschliche Hilfe nötig ist	3
5. Darmfunktion	Sehr starke Einschränkung, der Patient ist völlig hilflos	4
6. Blasenfunktion		
7. Baden		
8. Ankleiden		
9. Haarpflege		
10. Essen		
11. Sehvermögen		
12. Sprechen und Verstehen		
13. Andere körperliche Fähigkeiten		
14. Soziale Funktion (z.B. Kino)		
15. Ermüdbarkeit		
16. Psychische Funktionen		

2.1.8 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung für medizinische Statistik, Universität Göttingen mit Hilfe des SAS-Programms (Version 9.1, SAS Institut). P-Werte <5% zeigen einen signifikanten Effekt. So denn ein signifikanter Effekt in der globalen Analyse nachweisbar war, erfolgte die paarweise Analyse zwischen Tag 0 und den einzelnen Untersuchungsterminen, um den Zeitpunkt herauszufiltern an dem ein signifikanter Effekt eintrat. Diese Vergleiche erfolgten mittels der Bonferroni-Methode mit Hilfe des kostenlosen Programms R (Version 2.8, www.r-project.org).

Die Darstellung der Daten erfolgt deskriptiv und wird mit den Ergebnissen vorheriger Studien verglichen.

2.2 Experimenteller Teil: Proteinanalysen

2.2.1 Material

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien und Angabe von Hersteller mit Stadt und Land des Firmensitzes.

2.2.1.1 Geräte

Analysewaage, 1213 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav	Biomedis, Gießen, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Kühlzentrifuge, GS-6R	Beckmann, München, Deutschland
Magnetrührer (beheizbar), IKAMAG RCT	IKA, Labortechnik, Staufen, Deutschland
Nanopore Wasser-Anlage, Ultrafree 20	Millipore, Eschborn, Deutschland
Netzgerät PowerPac 1000 für Blot	BioRad, München, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipettierhilfe pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Scanner CanonScan 4400F	Canon, Tokyo, Japan
Spannungsgerät Power Pac 1000	BioRad, München, Deutschland
Elektrophoresekammer Mini-Protean	BioRad, München, Deutschland
Waage Sartorius excellence	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wippe Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland

2.2.1.2 Software

SAS software, Version 9.1	SAS Institut, Cary, NC, USA
Prism	GraphPad Software, La Jolla, USA
Peptide Mass Fingerprint	Matrix science, Boston, MA, USA

2.2.1.3 Gebrauchsmaterial

0,5ml-Reagenzgefäß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon 15-ml-Röhrchen, steril	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon 50-ml-Röhrchen, steril	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Filterpapier 2mm	BioRad, München, Deutschland
Glaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
Mehrkanalpipette, Dispenser Multipipette 4780	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroliter Pipetten 2,5, 10, 100, 200, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Parafilm „M“	Pechiney, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Gießen, Deutschland
Pasteurkapillarpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Pipetten 2, 5, 10, 25ml	Greiner, Solingen, Deutschland
Pipettenspitzen 2,5, 10, 20, 100, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 2, 5, 10ml	Braun, Melsungen, Deutschland

2.2.1.4 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	Sigma- Aldrich, München, Deutschland
Acrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ampholyte Bio- Lyte 7/9	BioRad München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Paesel & Lorei, Hanau, Deutschland
Bradford-Reagenz	BioRad, München, Deutschland
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco´s PBS	PAA, Pasching, Österreich
Eisessig	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Elektrodenpuffer XT MOPS, Running Buffer	BioRad München, Deutschland
Elektrophoresis Purify Reagent CHAPS	BioRad München, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HCl, rauchend 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Iodoacetamide	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
IPG- Strips pH3-10, 7cm	BioRad München, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumthiosulfat- Pentahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rainbow Marker (12000- 225000 Da)	Amersham, Freiburg, Deutschland
Roti-Blue 5x-Konzentrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris- Puffer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Promega, Madison, USA
Urea	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Alle Chemikalien besaßen, sofern nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad „pro analysis“.

2.2.2 Hintergrund

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) ist eine analytische Methode, welche mit Hilfe der Kombination aus isoelektrischer Fokussierung (IEF) und der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE) die Trennung komplexer Proteingemische in Einzelproteine ermöglicht. Jeder Spot im Proteinmuster entspricht einem bestimmten Proteinmolekül. Da sich Proteinmuster in biologischen Systemen umwelt- und auch zustandsabhängig verändern, können sie z.B. Aufschluss über Wirkungsmechanismen von medizinischen Interventionen auf molekularer Ebene geben.

Nach Auftrennung der Proteine werden diese mit Hilfe der Matrix- unterstützten Laser- Desorption/ Ionisation und der Flugzeit (MALDI-TOF) des Moleküls sowie anschließender Auswertung durch ein Computerprogramm analysiert. Auch bei der Identifikation möglicher biologischer Marker sind die Proteinanalysen der 2D-Gelelektrophorese eine anerkannte Methode (Dihazi et al. 2007; Flat et al. 2006).

Der Hersteller der Adsorbersäule IMMUSORBA TR-350 (Asahi Medical, Tokyo/ Diamed, Köln) gibt als Zielmoleküle Albumin, Fibrinogen und Antikörper an, welche mit Hilfe ionischer und hydrophober Wechselwirkungen aus dem Patientenplasma entfernt werden.

Um dies genauer zu untersuchen, haben wir die Adsorbersäulen von 5 Patienten nach der Therapie eluiert, die Proteinlösung auf 2D-Gelen aufgetrennt und mit Hilfe der Flugzeit- Massenspektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation= MALDI-TOF) analysiert.

2.2.2.1 Elution der Adsorbersäulen

Nach Beendigung der IA wurde die Säule zweimalig mit 700ml PBS gespült, um das verbliebene Plasma zu entfernen.

Aufgrund der ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Tryptophan und den Zielstrukturen erfolgte die Elution gebundener Proteine mit drei verschiedenen Salzlösungen mit

jeweils zweifachem Säulenvolumen (insgesamt 700ml). Zuerst wurde die Säule mit Solution A gewaschen (100mM Natrium-Acetat, 1M NaCl, pH=5), gefolgt von Solution B (20mM Tris/ HCl, 1M NaCl, pH= 8,5), und zuletzt mit Solution C (20% Acetonitril in ddH₂O) gewaschen.

2.2.2.2 2D-Gelelektrophorese

Das Eluat der verschiedenen Lösungen wurde im Verhältnis 1:1 mit Aceton verdünnt und 20min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung für 10min bei 3000/rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Protein- Pellet in 2D-Gel Puffer (8M Urea, CHAPS 1%, DTT 15mM, Ampholyt 2µl/ml) aufgelöst. Daraufhin erfolgte die Proteinkonzentrations- Bestimmung nach der „Bradford- Methode“ (Bradford 1976).

Für ein Coomassie- Gel von der Größe 7x10x1cm wurden 200µg Protein eingesetzt und mit 2D-Gel-Puffer (8M Urea, CHAPS 1%, DTT 15mM, Ampholyt 2µl/ml), sowie einer Spur Bromphenolblau auf ein Endvolumen von 150µl verdünnt. Diese 150µl der Proteinelösung wurde in einer Fokussierungskammer verteilt, mit einem IPG- Strip (pH 3-10, 7cm) versehen und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine passive Hydrierungsphase in dem Fokussierungsgerät von 12h, gefolgt von mehreren Fokussierungs- Schritten: 200V für 2 Stunden, 500V für 1 Stunde, 1000V für eine Stunde, 8000V für 1,5 Stunden und anschließender Erhaltungsspannung mit 500V.

Nach Abschluss der ersten isoelektrischen Dimension wurden die IPG- Strips aus der Kammer entfernt und zuerst in Äquilibrierungspuffer1 (Äquilibrierungspuffer, DTT 0,01g/ml, 350µl Bromphenolblau) für 20 min auf der Wippe inkubiert. Danach folgte die Überführung in den Äquilibrierungspuffer2 (Äquilibrierungspuffer, 0,04g/ml Iodoacetamid, 350µl Bromphenolblau) mit 20min auf der Wippe. Bei dem Gel handelt es sich um ein 12%iges Natriumlaurylsulfat-Gel (SDS-Gel= sodium dodecyl sulfate) mit 7x10x1cm Größe. Die Strips wurden auf das Gel gegeben und eine Spannung von 120V über ca. 2 Stunden angelegt. Hatten sich die Proteine bis zum untersten Punkt des Gels aufgetrennt, wurde es für 60min in eine Fixierungslösung (10%ige Essigsäure) gegeben, gefolgt von 24h in der Coomassie-Einfärbe-Lösung. Am folgenden Tag wurde das Gel mit 5%iger Ethanol-Lösung entfärbt.

2.2.2.3 Proteinverdau und MALDI-TOF-Proteinidentifikation

Die Proteinspots wurden manuell isoliert und in Eppendorf-Cups überführt, gefolgt von einem Wasch-Schritt mit ddH₂O für 15min. Danach folgten verschiedene Inkubations- Schritte: 15 min mit 50%iger Acetonitril (ACN), Lösung verworfen; 60 min 100% ACN, Lösung verworfen; 5 min 100mM Ammoniumbicarbonat, Lösung nicht verworfen; 1:1 100%ige ACN dazu, 15 min inkubieren und Lösung verworfen. Es folgte die Trocknung der Spots im Speed- Vakuum für 15 min. Um den Verdau zu beginnen, haben wir die Spots für 45min auf Eis mit einer Trypsin- Digestions- Lösung (pro 100µl

Digestionslösung (5µl 1M CaCl₂ + 25µl 1M Ambic + 970µl ddH₂O) 12µl 10%iges Trypsin) inkubiert, gefolgt von 12h in der Digestions- Lösung bei 37°C.

Der 2. Tag des Proteinverdaus sollte die Proteine aus den Gelresten lösen. Dazu waren verschiedene Schritte nötig. Der Überstand aus den E-Cups mit der Digestions-Lösung wurde in ein neues E-Cup überführt und im Speed- Vakuum für 30min getrocknet. Währenddessen wurden die Gelreste mit einer 0,1%igen Trifluoressigsäure (TFA) im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wiederum in die getrockneten E-Cups überführt und erneut getrocknet. In gleicher Weise wurde mit 30% ACN/ 70% 0,1%ige TFA und 60% ACN/ 40% 0,1%ige TFA verfahren. Zum Schluss wurde der letzte Überstand im E- Cup getrocknet.

Zur MALDI-TOF-Analyse wurden 1µl Analyt zusammen mit 1µl Matrix (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) auf einem metallischen Träger kokristallisiert. Durch Laserbeschuss verdampfte die Matrix explosionsartig und das zu untersuchende Molekül wurde mitgerissen. Dabei erfolgte eine Ionisierung des Analyten mit Auftreten von Pseudomolekülonen wie (M+H)₂, (M+Na)₂ oder (M+K)₂. Bei uns wurden die Proben 50x mit dem Laser beschossen und es wurde eine Beschleunigungsspannung von 20kV benutzt. Zur Auswertung erfolgt der Datenbankabgleich unter Verwendung der Mascot Peptide Mass Fingerprint Software welche von Matrix Science zur Verfügung gestellt wurde (Perkins et al. 1999). Ein Proteinscore von >56 galt nach dieser Datenbank als signifikante (p<0.05) Übereinstimmung mit dem verglichenen Protein. In unseren Ergebnissen sind nur die Proteine erwähnt, die den Cut- off von 56 überschritten haben.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Es konnten 11 Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Bei keinem der Patienten musste die Behandlung vorzeitig abgebrochen werden. Bei 8 der 11 Patienten kam es schon nach der 3. IA-Behandlung zu einer deutlichen Verbesserung der neurologischen Symptomatik, sodass die Patienten in Responder und Non-Responder unterschieden werden konnten. Als Responder wurden Patienten definiert, die eine Verbesserung des Visus von mindestens 50% während der Therapiephase erreicht haben. Zwei der Patienten zeigten kein Ansprechen auf die Therapie und eine Patientin erlitt eine akute Jugularvenen-Thrombophlebitis mit erneuter Visusverschlechterung.

Das durchschnittliche Patientenalter lag bei $33,6 \pm 10,5$ Jahren mit einer Erkrankungsdauer von $3,5 \pm 4,9$ Jahren.

Tabelle 4: Übersicht über die Patientendaten (Mittelwert \pm Standardabweichung; in Klammern die Streuung)

Parameter	Auswertung
weiblich männlich	7 (64%) 4 (36%)
Alter	$33,6 \pm 10,5$ (19,0 – 55,0)
Tage nach Symptombeginn	$26,6 \pm 14,6$ (10,0 – 60,0)
Tage nach Steroidstoß	$10,8 \pm 6,9$ (1,0 – 20,0)
Kumulative Methylprednisolonosis (g)	$9,5 \pm 3,7$ (4,0 – 15,0)
Erkrankungsdauer (Jahre)	$3,5 \pm 4,9$ (0,0 – 16,0)
BMI	$25,5 \pm 3,0$ (20,1 – 30,7)

Die Grundlage für den Einschluss in die Studie stellte eine kortikoid- refraktäre Symptomatik im Rahmen eines akuten Schubes der MS dar. Somit waren alle Patienten mit einem Steroid vorbehandelt. Die durchschnittliche Dosis bei Einschluss in die Studie lag bei $9,5 \pm 3,7$ g. Zwischen Beginn der Steroid-Therapie und Beginn der IA-Therapie vergingen $10,8 \pm 6,9$ Tage.

Während des stationären Aufenthalts erhielten alle Patienten an den immunadsorptionsfreien Tagen ein niedermolekulares Heparin (s.c.) als Thromboseprophylaxe.

Die Begleitmedikation bezüglich der Grunderkrankung war bei den Patienten sehr unterschiedlich. Sieben der Patienten hatten bei Studienbeginn keine Vormedikation. Zur Schubprophylaxe erhielten zwei Patienten ein Beta- Interferon Präparat und einer der Studienpatienten war mit dem Immunmodulator Glatirameracetat. Bei Abschluss der Studie erhielten 8 Patienten eine Schubprophylaxe mit Beta-Interferon, zwei Glatirameracetat und bei einem Patienten konnte die weitere Medikation nicht erhoben werden, da dieser zu den Terminen der Nachbeobachtung nicht erschienen ist.

Tabelle 5: Basistherapie der Patienten

Basistherapie vor IA	Patientenanzahl
keine	8
Interferon beta	2
Glatirameracetat	1

Basismedikation nach IA	Patientenanzahl
keine	0
Interferon beta	8
Glatirameracetat	2

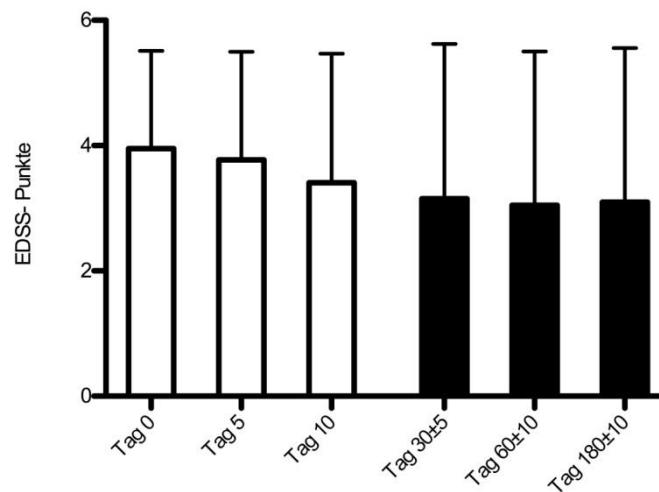
Zwischen Beginn der Symptome und Einschluss in die Studie lagen durchschnittlich $26,6 \pm 14,6$ Tage, zwei Patienten hatten in der Nachbeobachtungszeit einen akuten Schub der MS.

3.2 Klinik

3.2.1 Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Der EDSS lag bei den Patienten bei Studieneinschluss bei $3,95 \pm 1,56$ Punkten. Bereits während der Therapiephase konnte er auf $3,77 \pm 1,72$ Punkte an Tag 5 und $3,41 \pm 2,06$ Punkte bei der Abschlussuntersuchung Tag 10 gesenkt werden. In der Nachbeobachtungszeit konnten wir eine weitere Reduktion auf $3,15 \pm 2,47$ Punkte an Tag 30 und $3,05 \pm 2,45$ Punkten an Tag 60 verzeichnen. Bei dem letzten Nachbeobachtungstermin kam es zu einem diskreten Anstieg auf $3,10 \pm 2,46$ ($p=0,89$) Punkte.

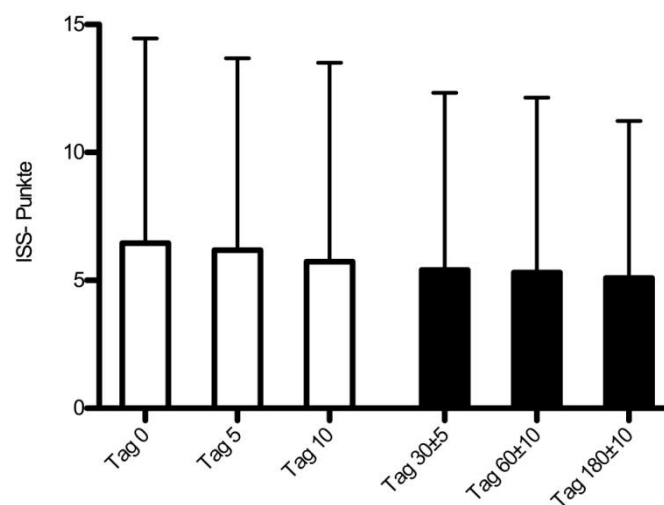
Abbildung 3: EDSS (Mittelwert und Standardabweichung)



3.2.2 Incapacity Status Scale (ISS)

Auch bei dem ISS konnten wir eine Reduktion des Punktwertes registrieren und bei alleiniger Betrachtung der Responder zu einer signifikanten Besserung ($p < 0,05$). Dieser lag bei Einschluss in die Studie bei $6,45 \pm 8,00$ Punkten. Analog zum EDSS konnte schon während der Therapiephase eine Reduktion auf $6,18 \pm 7,49$ Punkte an Tag 5 und $5,73 \pm 7,77$ Punkte an Tag 10 bei der Abschlussuntersuchung erreicht werden. Auch in der Nachbeobachtungszeit fiel der Punktwert weiter auf $5,40 \pm 6,93$ Punkte an Tag 30, $5,30 \pm 6,85$ Punkte an Tag 60 und blieb bei der letzten Untersuchung an Tag 180 auf diesem Niveau bei $5,10 \pm 6,14$ ($p = 1,00$) Punkten stabil.

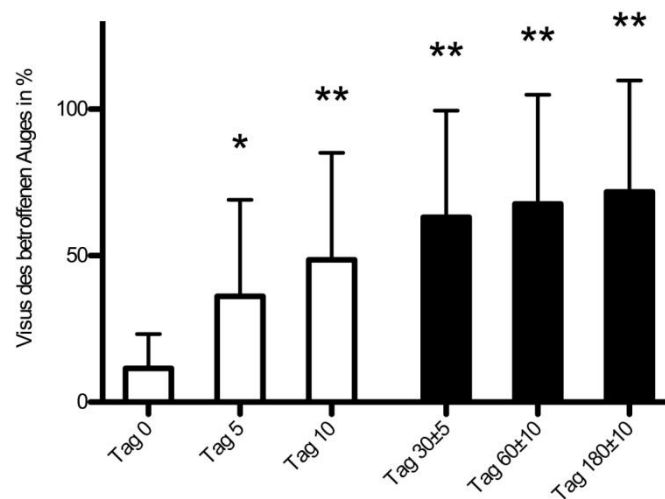
Abbildung 4: ISS (Mittelwert mit Standardabweichung)



3.2.3 Visus

Bei der Einschlussuntersuchung der Studie hatten die Patienten einen Visus von $0,12 \pm 0,12$ des betroffenen Auges. Für den Visus fand sich folgender Verlauf: bereits nach der 3.IA zeigte sich ein signifikanter Anstieg auf $0,36 \pm 0,33$ ($p=0,02$) an Tag 5 und $0,49 \pm 0,36$ ($p=0,005$) an Tag 10. Bei den Nachuntersuchungen konnte eine weitere relevante Verbesserung der Sehkraft verzeichnet werden. An Tag 30 hatten die Patienten einen durchschnittlichen Visus von $0,63 \pm 0,36$ ($p=0,01$), an Tag 60 von $0,68 \pm 0,37$ ($p \leq 0,01$). In der Nachbeobachtungszeit hielt der positive Effekt der IA bis zu 6 Monate nach Therapiebeginn hin an. Die signifikante Verbesserung erreichte an Tag 180 das beste Visus-Ergebnis mit $0,72 \pm 0,38$ ($p \leq 0,01$).

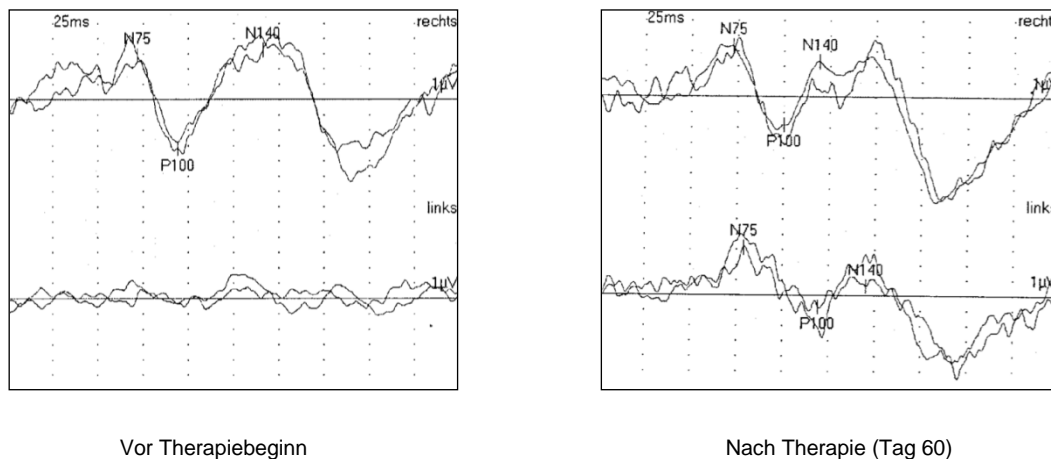
Abbildung 5: Visus des betroffenen Auges (Mittelwert mit Standardabweichung, Signifikanzniveau: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$)



3.2.4 Visuell evozierte Potentiale (VEP)

Als objektiven Parameter der Verbesserung der Sehkraft wurden bei jedem Patienten visuell-evozierte Potentiale beider Augen gemessen. Bei einer Schädigung des Nervus opticus kommt es zu einer Verlängerung der Latenz und Abflachung der Amplitude.

Abbildung 6: Beispiel VEP eines Patienten vor und nach der IA- Behandlung



Die Latenzen der VEP's des betroffenen und nicht- betroffenen Auges sind in folgenden Tabellen zusammengefasst (Tabelle 6 und 7). Das Ansprechen auf die Therapie zeigt sich in der Responder-Gruppe als Verbesserung der Latenz im Sinne einer schnelleren Antwort auf den Reiz. Bei 50% der Responder waren zu Beginn der Therapie die Latenz nicht messbar und im Verlauf kam es, als objektiv messbaren Parameter, wieder zu einem Potential. In der Non-Responder-Gruppe wird das nicht Ansprechen auf die Therapie in einer mangelnden Verbesserung – teilweise auch in einer weiterbestehenden fehlenden Messbarkeit – der Latenz deutlich.

Tabelle 6: Latenz des betroffenen Auges (msec)

Latenz des betroffenen Auges [msec]			
Responder-Patienten Nr.	Tag 0	Tag 5	Tag 60±10
1	96,3	155,7	135,9
2	nicht messbar	nicht messbar	159,6
4	nicht messbar	119,0	109,5
5	142,5	128,4	122,1
6	113,7	114,3	108,3
8	98,1	108,0	103,5
9	nicht messbar	88,5	145,8
10	nicht messbar	nicht messbar	179,7
Non-Responder- Patienten Nr.	Tag 0	Tag 5	Tag 60±10
3	nicht messbar	nicht messbar	nicht messbar
7	nicht messbar	nicht messbar	nicht erhoben
11	87,3	84,3	91,8

Tabelle 7: Latenz des nicht-betroffenen Auges (msec)

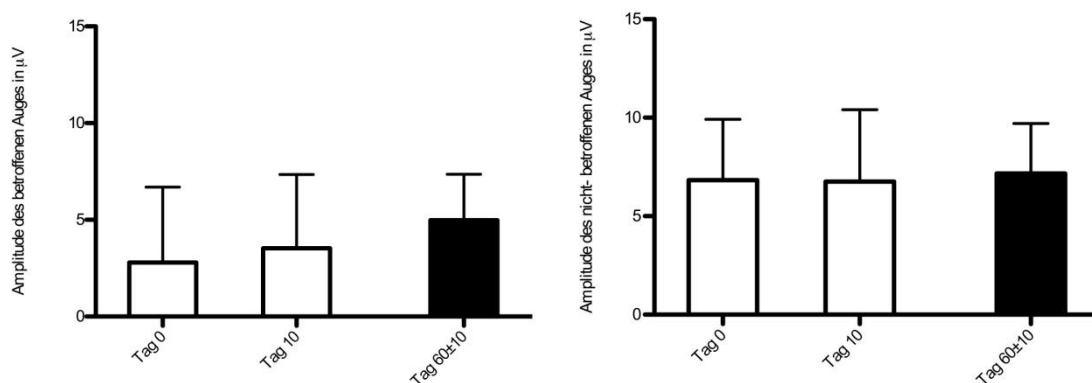
Latenz des nicht- betroffenen Auges [msec]			
Responder-Patienten Nr.	Tag 0	Tag 5	Tag 60±10
1	85,2	95,1	86,7
2	99,9	159,6	161,5
4	94	100	105,6
5	95,7	94,8	102,6
6	104,1	102,9	114,3
8	94,5	102	96,6
9	104,4	100,8	88,8
10	90,9	88,5	86,7

Non- Responder-Patienten Nr.	Tag 0	Tag 5	Tag 60±10
3	119,7	119,7	120,6
7	101,1	99	nicht erhoben
11	87,3	110,7	111,9

Die Auswertung der Amplituden des erkrankten Auges ergab folgenden Verlauf: am Tag der Aufnahme lag diese bei $2,79\pm 3,90\mu\text{V}$, mit einem Anstieg auf $3,53\pm 3,82\mu\text{V}$ nach der 5.IA und $4,98\pm 2,38\mu\text{V}$ ($p=0,37$) in der Nachbeobachtungsphase an Tag 60.

Auch an dem nicht-betroffenen Auge führte die Therapie zu Veränderungen im VEP. Es kam zu einer diskreten Verlängerung der Latenz von $97,89\pm 9,61\text{msec}$. an Tag 0, auf $106,65\pm 19,41\text{msec}$ nach Abschluss der Therapiephase und $107,53\pm 22,40\text{msec}$ ($p=0,40$) an Tag 60. Auch die Amplitude zeigte dahingegen eine leichte Verbesserung von $6,83\pm 3,09\mu\text{V}$ am Aufnahmetag und $6,76\pm 3,64\mu\text{V}$ an Tag 10 auf $7,17\pm 2,53\mu\text{V}$ ($p=0,94$) an Tag 60.

Abbildung 7: Amplitude betroffenes und nicht-betroffenes Auge im Vergleich (Mittelwert mit Standardabweichung)



3.3 Befunde, Behandlung und klinischer Verlauf in einer Übersicht

Tabelle 8: Patientendaten im Verlauf

Patientennr./ Geschlecht/ Alter	Ansprechen	Langzeittherapie vor IA	Krankheitsdauer (Jahre)	Kumulative Prednisolondosis (g)	Symptombeginn bis Therapiebeginn (Tage)	Visus des betroffenen Auges vor IA	Visus des betroffenen Auges nach IA an Tag 180
1/w/26	+++	keine	0	15	38	0,2	1
2/w/28	+++	Beta- Interferon	1,5	5	30	0,02	0,8
3/w/39	-	Glatirameracetat	16	10	10	0	0,05
4/m/28	+++	Keine	0	4	10	0,1	1
5/m/19	+++	Beta- Interferon	6	10	28	0,05	1
6/w/47	+++	L- Dopa*	5	10	21	0,1	0,9
7/m/39	-	keine	0	15	18	0	0,025
8/w/27	++	Keine	2	10	60	0,2	0,6
9/w/33	+++	Keine	7	10	33	0,4	0,8
10/m/29	+++	keine	0	5	14	0,1	1
11/w/55	-	Keine	1	11	30	0,1	0,025

* bei Restless- Legs- Syndrom

3.4 Laborparameter

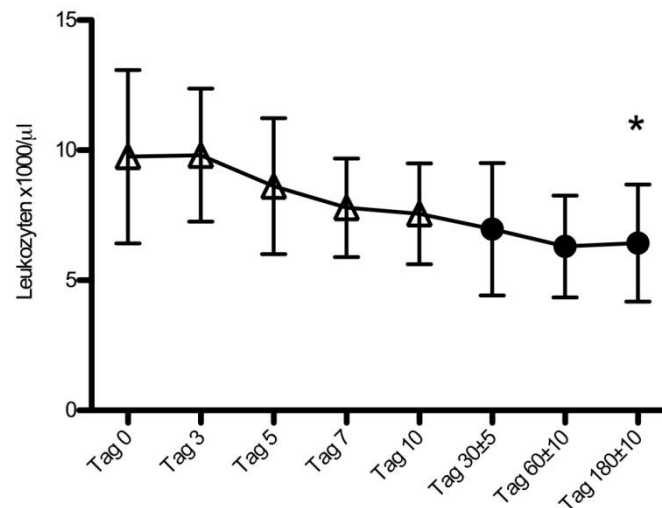
Während der Therapie erfolgte ein laborchemisches Monitoring von Hämoglobin, Hämatokrit, Quick, pTT, Fibrinogen, Thrombozyten, Leukozyten, CRP, Elektrolyten, AST, ALT, AP, yGT, Kreatinin, Harnstoff und Gesamteiweiß (Protein). Während der Therapie kam es zu einer signifikanten Reduktion des Quick und Verlängerung der pTT. Die Verlängerung der pTT lässt sich durch die Heparin-Gabe während der Therapie erklären. Bei den anderen Laborparametern kam es zu keiner relevanten Veränderung.

Tabelle 9: Laborparameter im Verlauf (* signifikant mit $p < 0,05$)

Tag	Referenzbereich	0	2	5	7	10	30±5	60±10	180±10
Quick [%]	70- 130 %	76,1±6,0	69,4±10,4	76,1±9,3	73,8±7,4	72,7±7,7	75,6±5,6	84,0±9,6	82,5±10,6
pTT [sec]	26-37 sec	25,1±2,3	34,8±23,8	27,9±3,3	29,9±3,3	30,4±3,1	29,1±4,6	28,6±2,1	27,9±2,4
Hb [g/dl]	♂ 13,5- 17,5 g/dl ♀ 11,5- 15,0 g/dl	13,5±1,6	13,2±1,5	13,2±1,0	12,8±1,0	13,1±1,2	13,0±1,6	13,2±1,6	13,7±1,4
Hkt [%]	♂ 39- 51 % ♀ 35- 46 %	40,2±5,0	39,2±4,0	39,0±3,3	38,2±2,6	39,0±3,3	38,9±4,4	39,9±4,5	41,6±3,8
Thrombozyten [10 ⁹ /μl]	150- 350 x 10 ⁹ /μl	250,5±48,7	210,3±38,0	217,1±47,1	208,3±56,2	238,9±88,0	308,0±150,2	257,2±47,1	289,0±53,6
Leukozyten [x10 ⁹ /μl]	4,0- 11,0 x10 ⁹ /μl	9,8±3,3	9,8±2,6	8,6±2,6	7,8±1,9	7,6±1,9	7,0±2,5	6,3±2,0	6,4±2,3*
Natrium [mmol/l]	136- 145 mmol/l	138,6±2,3	140,5±1,9	141,0±1,8	141,8±1,0	140,6±0,9	141,6±1,5	140,0±2,2	140,0±1,6
Kalzium gesamt [mmol/l]	2,2- 2,65 mmol/l	2,23±0,11	2,16±0,16	2,19±0,10	2,20±0,08	2,14±0,07	2,30±0,03	2,34±0,11	2,36±0,12
Kreatinin [mg/dl]	♂ 0,6- 1,1 mg/dl ♀ 0,5- 0,9 mg/dl	0,76±0,21	0,83±0,23	0,75±0,17	0,76±0,15	0,84±0,18	0,78±0,10	0,76±0,15	0,70±0,16
Protein [g/dl]	6,4- 8,1 g/dl	6,69±0,82	6,53±0,70	6,44±0,36	6,09±0,42	6,30±0,46	7,15±0,57	7,52±0,44	7,70±0,54
AST [U/l]	♂ < 35 U/l ♀ < 31 U/l	25,05±4,87	21,03±3,80	21,71±4,61	20,83±5,62	23,89±8,80	30,80±15,02	25,72±4,71	28,90±5,36
ALT [U/l]	♂ < 45 U/l ♀ < 34 U/l	32,7±16,1	60,6±80,0	36,7±24,4	38,4±26,3	30,4±18,9	44,1±29,9	39,7±42,0	25,6±19,8
γGT [U/l]	♂ < 55 U/l ♀ < 38 U/l	29,2±23,7	45,7±71,7	38,8±58,4	37,7±58,4	33,9±40,0	33,3±33,1	41,2±52,6	27,1±29,6
AP [U/l]	♂ 40- 129 U/l ♀ 35- 104 U/l	62,1±23,7	57,6±19,4	66,9±29,7	64,2±29,6	65,9±21,5	61,7±17,1	62,5±19,9	60,5±14,2
CRP	< 8 mg/l	5,5±11,1	12,4±0,5	20,8±15,7	19,1±19,1	12,4±11,1	6,2±7,3	2,9±NA	2,0±0,0

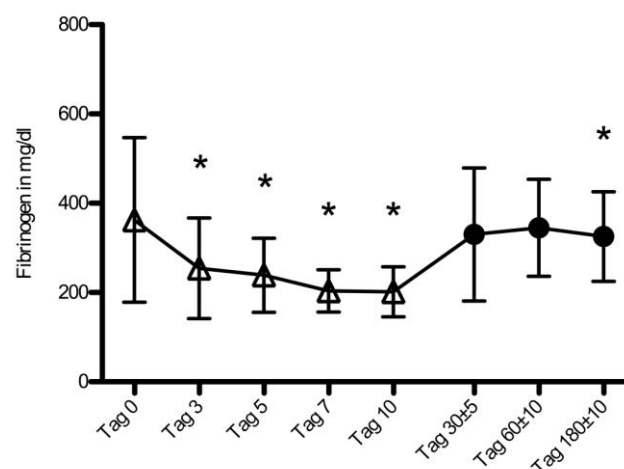
Bei den Leukozyten kam es während der IA- Behandlung und in der Nachbeobachtungszeit zu einem signifikanten Abfall ($9,8 \times 10^3/\mu\text{l}$ vs $6,4 \times 10^3/\mu\text{l}$; $p \leq 0,05$).

Abbildung 8: Leukozyten im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$)



Wie erwartet bewirkte die Immunadsorption eine signifikante Reduktion des Plasma-Fibrinogens. Dieses lag bei Aufnahme bei $362,6 \pm 184,6 \text{ mg/dl}$, sank signifikant nach der ersten IA auf $254,1 \pm 110,46 \text{ mg/dl}$ ($p=0,03$), nach der zweiten auf $238,9 \pm 83,0 \text{ mg/dl}$ ($p=0,02$), nach der dritten Behandlung auf $203,4 \pm 47,3 \text{ mg/dl}$ ($p=0,01$) und nach der vierten IA auf $201,8 \pm 56,0 \text{ mg/dl}$ ($p=0,02$). In der Nachbeobachtungszeit normalisierte sich das Plasma-Fibrinogen auf nahezu das Ausgangsniveau mit $330,0 \pm 148,9 \text{ mg/dl}$ ($p=0,92$) an Tag 30, $345,0 \pm 108,6 \text{ mg/dl}$ ($p=0,56$) an Tag 60 und $325,4 \pm 100,6 \text{ mg/dl}$ ($p=0,64$) bei der Abschlussuntersuchung am Tag 180.

Abbildung 9: Fibrinogen im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$)

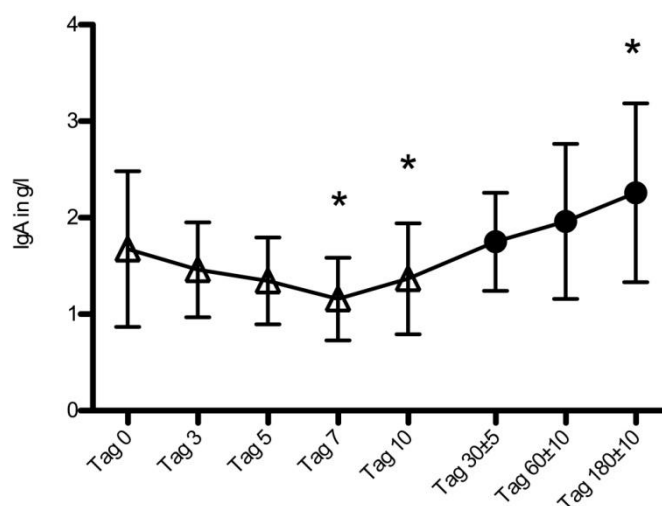


3.4.1 Immunglobuline und Komplementfaktoren

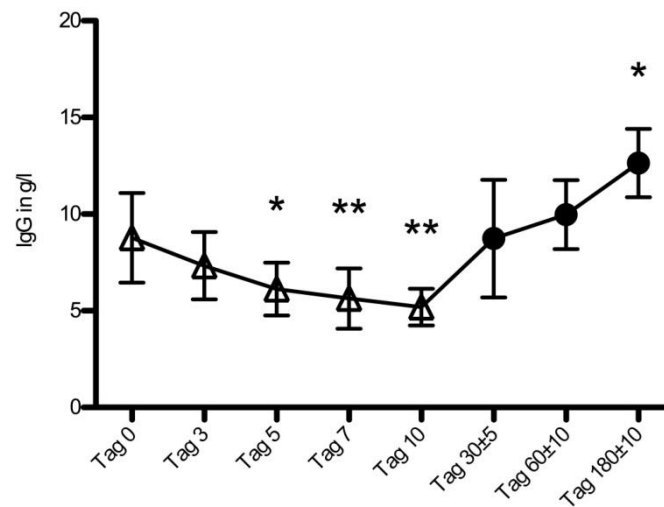
Auch Immunglobuline und Komplementfaktoren wurden durch die IA signifikant gesenkt. Bei allen Fraktionen kommt es in der Nachbeobachtungszeit zu einem reaktiven Anstieg mit überschreiten der Ausgangswerte.

Die Immunglobulin-A Konzentration am Aufnahmetag lag bei $1,68 \pm 0,81 \text{ g/l}$. Während der IA-Therapie kam es zu einem stetigen Abfall der Konzentration auf $1,46 \pm 0,49 \text{ g/l}$ ($p=0,32$) an Tag 2, $1,34 \pm 0,45 \text{ g/l}$ ($p=0,16$) an Tag 5, $1,21 \pm 0,43 \text{ g/l}$ ($p=0,01$) an Tag 7 und $1,37 \pm 0,58 \text{ g/l}$ ($p=0,05$) an Tag 10. Nach diesem signifikanten Abfall kam es in der Nachbeobachtungszeit wieder zu einer Normalisierung und reaktivem Überschreiten des Ausgangswertes auf $2,00 \pm 0,74 \text{ g/l}$ ($p=0,97$) an Tag 30, $1,80 \pm 0,71 \text{ g/l}$ ($p=0,69$) und $2,26 \pm 0,93 \text{ g/l}$ ($p=0,01$).

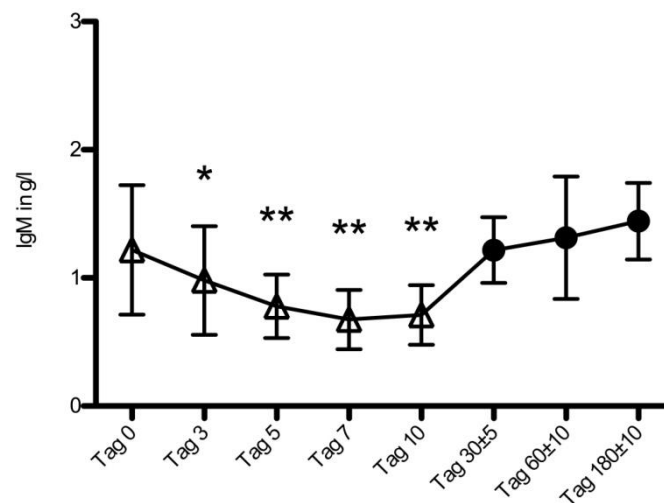
Abbildung 10: IgA im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$)



Ähnliches beobachteten wir bei der Immunglobulin-G Fraktion. Hier lag der Wert bei Aufnahme bei $8,8 \pm 2,3 \text{ g/l}$, an Tag 2 bei $7,3 \pm 1,7 \text{ g/l}$ ($p=0,06$), an Tag 5 bei $6,1 \pm 1,4 \text{ g/l}$ ($p=0,02$), an Tag 7 bei $5,6 \pm 1,6 \text{ g/l}$ ($p \leq 0,01$) und schließlich mit dem niedrigsten Wert an Tag 10 bei $5,2 \pm 0,9 \text{ g/l}$ ($p \leq 0,01$). Auch hier kam es in der Nachbeobachtungszeit zu einem Wiederanstieg und Überschreiten des Ausgangswertes von $8,7 \pm 3,0 \text{ g/l}$ ($p=0,69$) an Tag 30, $10,0 \pm 1,8 \text{ g/l}$ ($p=0,52$) an Tag 60 und schließlich $12,6 \pm 1,8 \text{ g/l}$ ($p \leq 0,01$) an Tag 180.

Abbildung 11: IgG im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$)

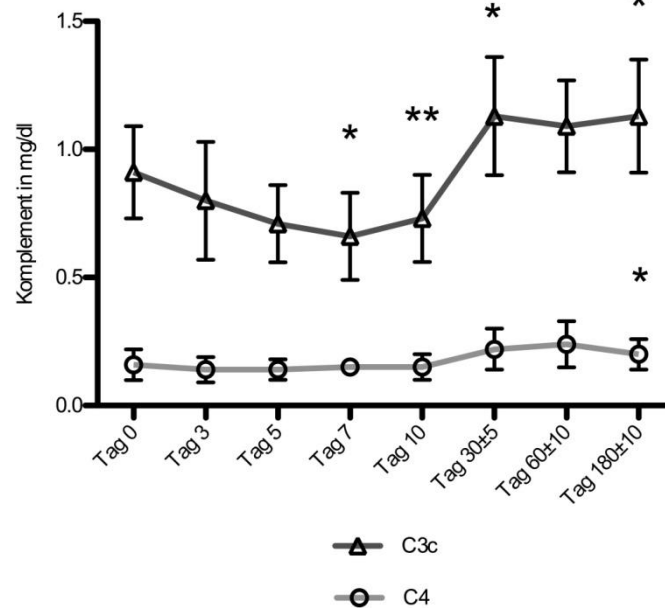
Auch die Immunglobulin-M Fraktion konnte signifikant gesenkt werden: von $1,22 \pm 0,50$ g/l an Tag 0, auf $0,98 \pm 0,23$ g/l ($p=0,01$) an Tag 2, $0,78 \pm 0,25$ g/l ($p \leq 0,01$) an Tag 5, $0,68 \pm 0,23$ g/l ($p \leq 0,01$) an Tag 7 und $0,71 \pm 0,23$ g/l nach der letzten Immunadsorption ($p \leq 0,01$). Auch hier kam es zu einem Anstieg und reaktiven Überschreiten des Ausgangswertes in der Nachbeobachtungszeit auf $1,22 \pm 0,26$ g/l ($p=0,56$) an Tag 30, $1,31 \pm 0,48$ g/l ($p=0,87$) an Tag 60 und $1,44 \pm 0,30$ g/l ($p=0,41$) bei der Abschlussuntersuchung.

Abbildung 12: IgM im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$)

Die Komplementfaktoren C3c und C4 zeigen einen ähnlichen Verlauf. C3c lag bei Aufnahme bei $0,91 \pm 0,18$ mg/dl und sank während der Behandlung auf $0,80 \pm 0,23$ mg/dl ($p=0,12$) an Tag 2, $0,71 \pm 0,15$ mg/dl ($p=0,09$) an Tag 5, $0,66 \pm 0,17$ mg/dl ($p=0,04$) an Tag 7 und $0,73 \pm 0,17$ mg/dl ($p \leq 0,01$) an Tag 10. Analog zu den anderen immunologischen Parametern kam es hier in der Nachbeobachtungszeit auch zu einem Wiederanstieg auf $1,13 \pm 0,23$ mg/dl ($p=0,03$) an Tag 30, $1,09 \pm 0,18$ ($p=0,15$) an Tag 60 und $1,13 \pm 0,22$ ($p=0,01$) an Tag 180.

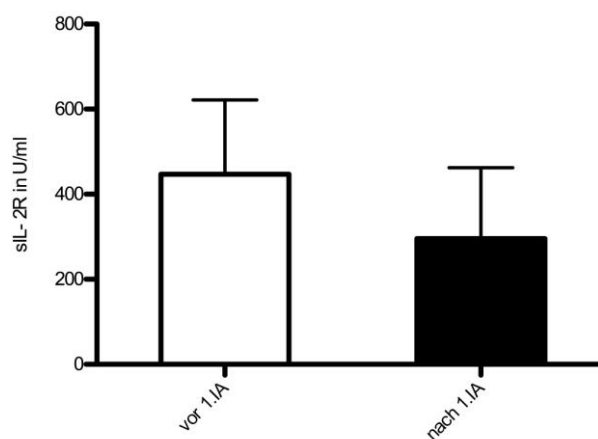
Bei C4 zeigt sich eine weniger ausgeprägte Reduktion. Bei Beginn lag C4 bei $0,16 \pm 0,06 \text{ mg/dl}$, (Tag 2: $0,14 \pm 0,05 \text{ mg/dl}$ ($p=0,32$), Tag 5: $0,14 \pm 0,04 \text{ mg/dl}$ ($p=0,68$), Tag 7: $0,15 \pm 0,02 \text{ mg/dl}$ ($p=1,00$); Tag 10: $0,15 \pm 0,05 \text{ mg/dl}$ ($p=0,86$) und in der Nachbeobachtungszeit zu einem signifikanten Anstieg der Werte auf $0,22 \pm 0,08 \text{ mg/dl}$ ($p=0,05$) an Tag 30, $0,24 \pm 0,09 \text{ mg/dl}$ ($p=0,09$) an Tag 60 und $0,20 \pm 0,06 \text{ mg/dl}$ ($p=0,04$) bei der Abschlussuntersuchung.

Abbildung 13: Komplementfaktoren C3c und C4 im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$)



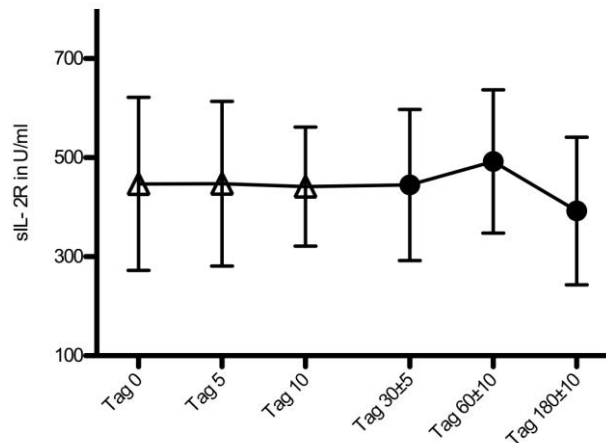
Wir haben vor und nach der ersten Immunadsorption die sIL2- Rezeptor-Konzentration bestimmt und festgestellt, dass es unmittelbar nach der Therapie zu einem signifikanten Absinken der Konzentration von $447,0 \pm 174,75 \text{ U/ml}$ auf $295,75 \pm 166,39$ ($p < 0,01$) kommt.

Abbildung 14: sIL- 2R Serum Spiegel vor und nach der 1. IA (Mittelwert mit Standardabweichung)



Im Verlauf der Therapie zeigte sich jedoch eine nicht-signifikante Reduktion (658,00±2,83U/ml an Tag 0 vs 447,38±166,09U/ml an Tag 5), mit einem stabilen Niveau (Tag 10: 441,67±120,21 vs Tag 30: 444,80±120,21U/ml vs Tag 60: 492,33±144,67) und einem erneuten Absinken auf 392,40±149,08U/ml an Tag 180.

Abbildung 15: sIL- 2R- Serum Spiegel im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)



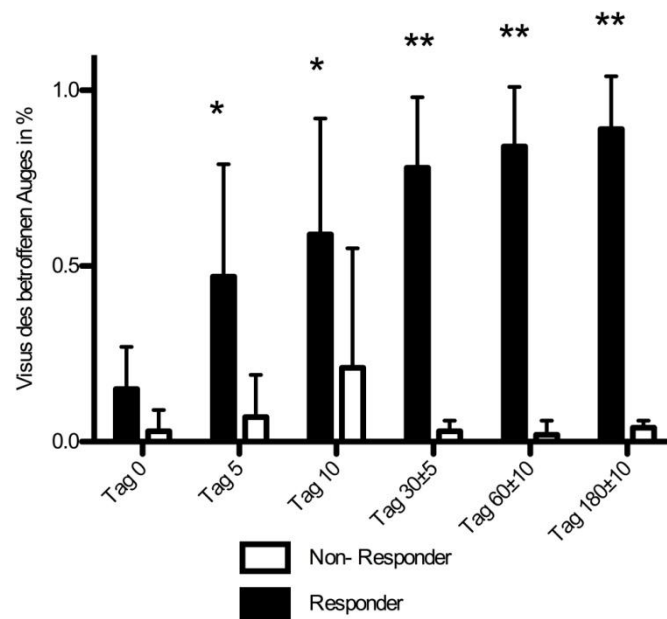
3.5 Responder vs. Non-Responder

Wie zuvor erwähnt konnte bei 8 der 11 Patienten eine rasche Verbesserung der neurologischen Symptomatik bereits nach der 3. IA verzeichnet werden.

Mit Hilfe der Abteilung für medizinische Statistik erfolgte die getrennte Auswertung bezogen auf das Ansprechen auf die Therapie, definiert als Verbesserung der neurologischen Symptomatik. Bei Erreichen einer Signifikanz wurden die einzelnen Visits mit dem Ausgangswert verglichen, um herauszufiltern ab wann der signifikante Effekt eingetreten ist. Das Signifikanz-Niveau wurde mit Hilfe der Bonferroni-Formel angepasst.

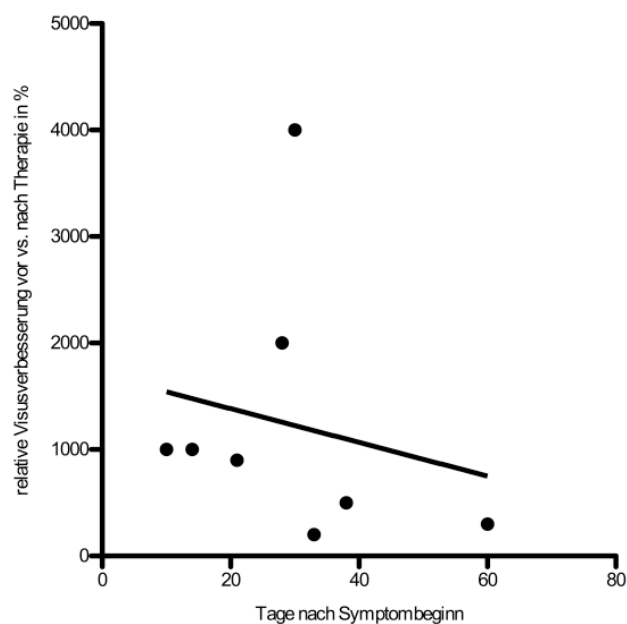
Die Verbesserung des Visus ist bei alleiniger Betrachtung der Responder signifikant mit 0,15±0,12 auf 0,89±0,15 ($p < 0,01$). Dahingegen zeigten die Non-Responder, wie die Definition vorausgesetzt, keine Verbesserung des Visus (0,03±0,06 vs 0,04±0,02).

Abbildung 16: Visus-Verlauf Responder vs. Non-Responder ((Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$)



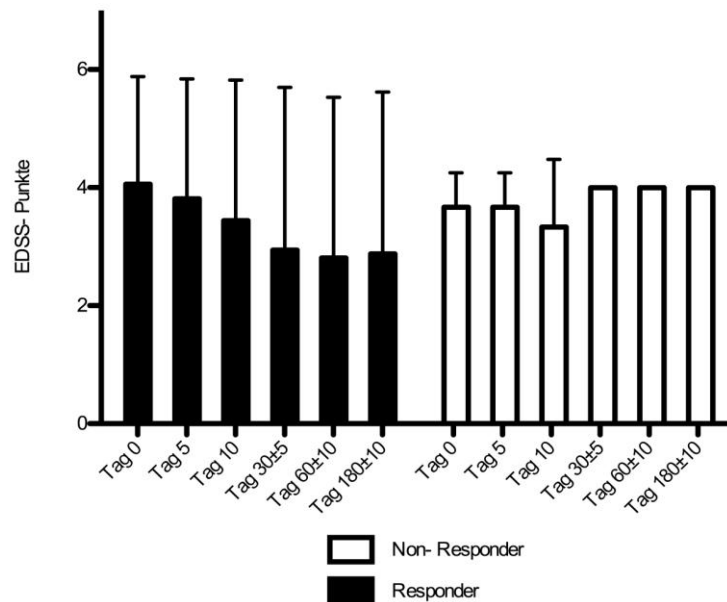
Führt man eine nicht-parametrische Korrelation mit der Anzahl der Tage zwischen Symptom- und Therapiebeginn und relativer Visusverbesserung bei den Responder-Patienten durch, zeigt sich eine negative Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $-0,539$ ($p=0,08$)

Abbildung 17: Korrelation zwischen Anzahl der Tage zwischen Symptom- und Therapiebeginn und relativer Visusverbesserung



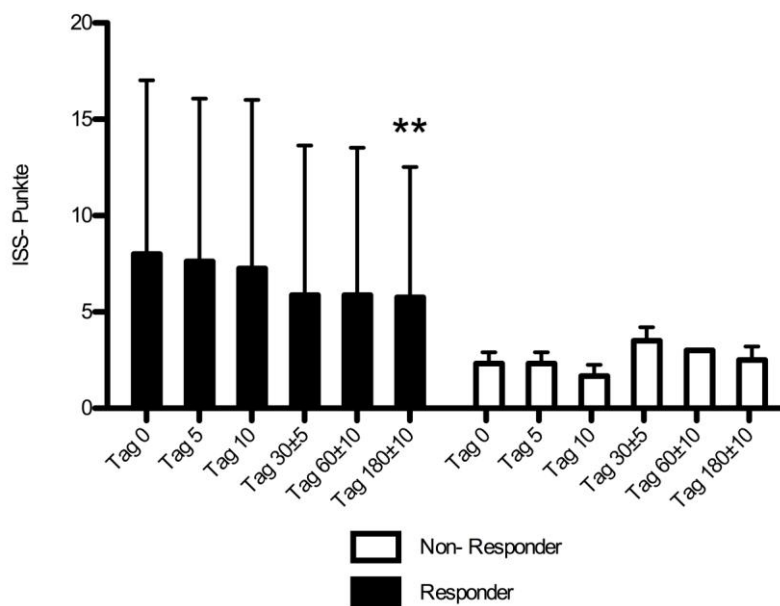
Auch der EDSS der Responder zeigt, im Gegensatz zu den Non-Respondern, eine deutliche Reduktion der Punktwerte ($4,06 \pm 1,82$ auf $2,88 \pm 2,74$ vs $3,67 \pm 0,58$ auf $4,00 \pm 0,00$; Responder: $p=0,58$).

Abbildung 18: EDSS Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung)



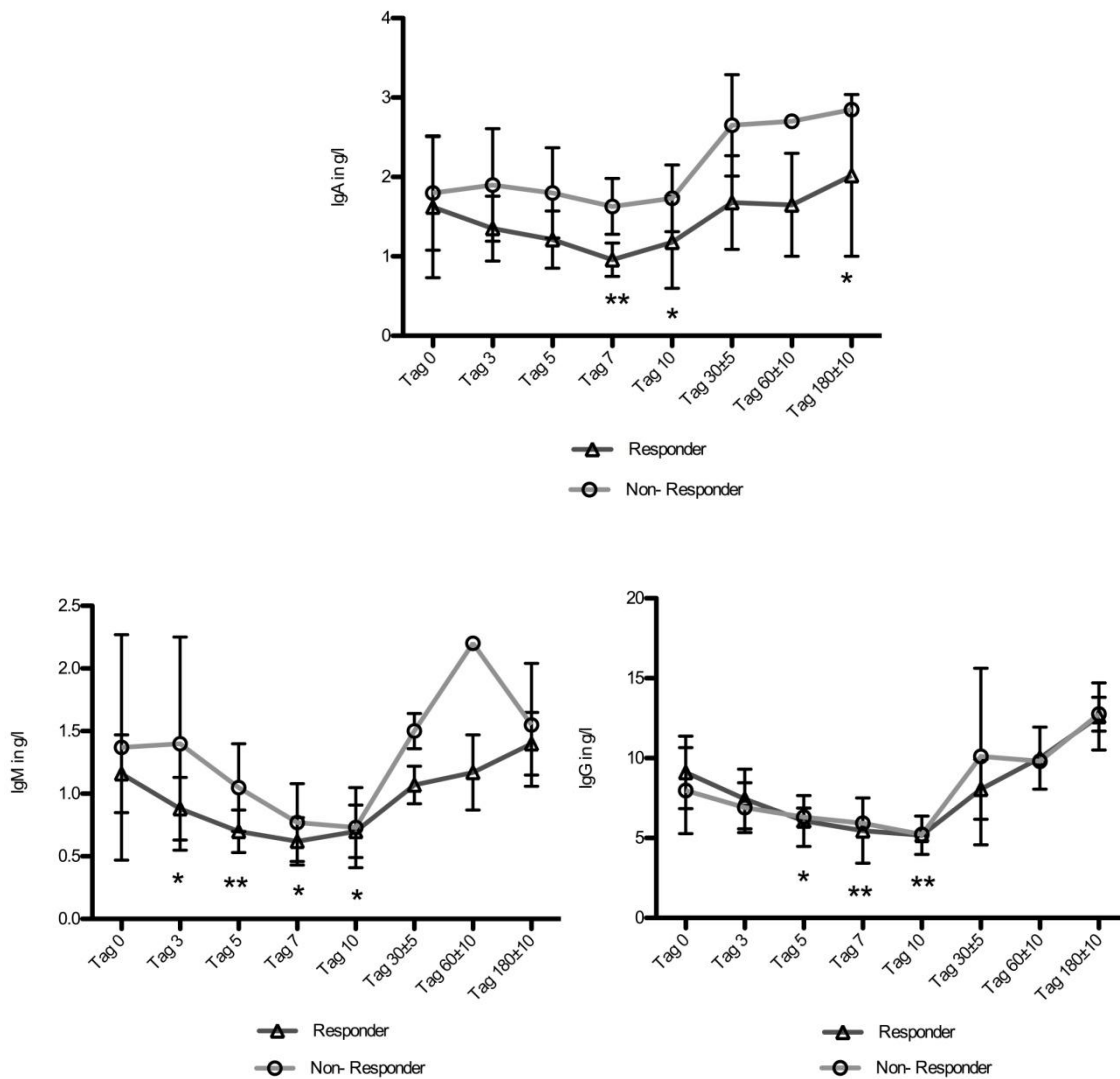
Beim ISS ist nach Trennung der Patienten in Responder und Non-Responder eine signifikante Reduktion der Punkte erzielt worden, wohingegen bei den Patienten die nicht auf die Therapie angesprochen haben der Punktwert des ISS diskret gestiegen ist ($8,00 \pm 9,02$ auf $5,75 \pm 6,78$ vs $2,33 \pm 0,58$ auf $2,50 \pm 0,71$; Responder: $p=0,04$)

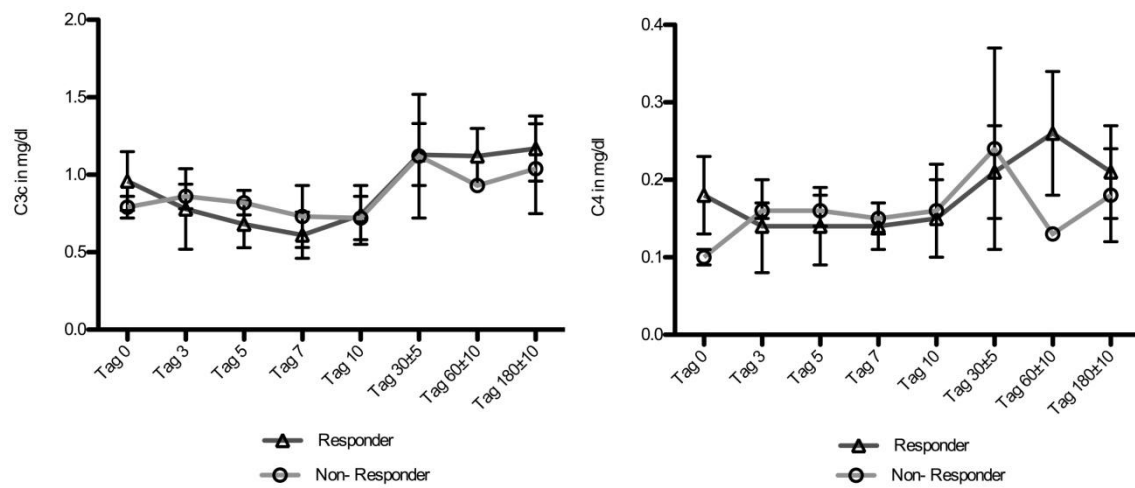
Abbildung 19: ISS Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: $**=p \leq 0,01$)



Laborchemisch zeigt sich bei den Immunglobulinen und Komplementfaktoren kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Zu Beginn der Therapie zeigt sich bei den Respondern ein deutlich erhöhter C4-Spiegel bei den Respondern von 0,18g/l im Vergleich zu den Non-Respondern mit 0,10g/l.

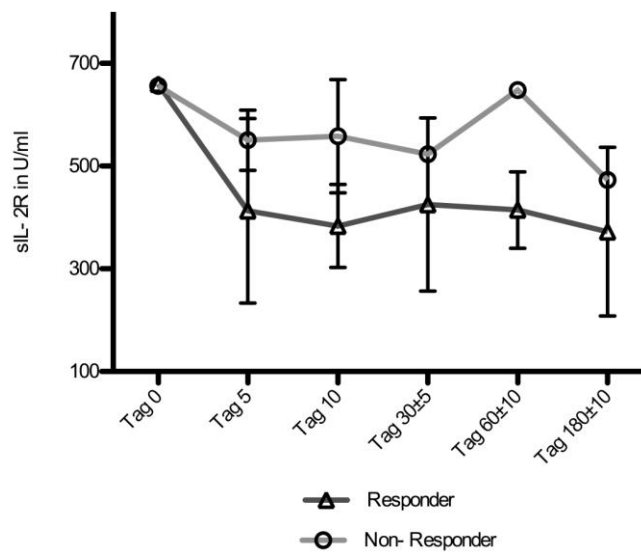
Abbildung 20: IgA, IgM, IgG und Komplement Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= $p \leq 0,05$; **= $p \leq 0,01$)





Einzig bei der Bestimmung des sIL-2R konnte, im Gegensatz zur Gesamtauswertung, ein signifikanter Unterschied in der Responder-Gruppe detektiert werden ($660,00 \pm 2,82$ auf $372,25 \pm 164,09$; $p=0,03$)

Abbildung 21: sIL-2R Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung)



3.6 Nebenwirkungen und Therapie- assoziierte Komplikationen

An moderaten, nicht-lebensbedrohlichen Nebenwirkungen traten Komplikationen auf, die mit der Anlage des großlumigen zentral-venösen Zugangs in Zusammenhang standen. Im Verlauf der Behandlung erlitt ein Patient eine Katheterinfektion, welche aber nach rascher Antibiotika-Gabe und Entfernung des Katheters sistierte. Ein weiterer Patient entwickelte nach Abschluss der Therapie eine einseitige Jugularvenen-Thrombophlebitis. Diese führte zu einer erneuten Verschlechterung des Visus.

Alle Patienten wurden nach jeder IA-Behandlung mit einem Fragebogen nach Nebenwirkungen der Therapie befragt. Allgemein traten während und nach der Therapie lediglich milde Nebenwirkungen auf. Die Patienten gaben am häufigsten Schwindel, Kopfschmerzen und Blutdrucksenkung, gefolgt von Übelkeit und Erbrechen an. Kältegefühl war ein häufig genanntes Ereignis. Weiterhin kam es zu Parästhesien und Muskelkrämpfen sowie Bluthochdruck, Brustschmerz und Herzklopfen. Ein Patient klagte nach der Therapie über eine verstopfte Nase und anormale Stimulation der Tränendrüse. Zu übermäßigem Schwitzen kam es bei fünf der Patienten. Des Weiteren gaben die Patienten starken Husten, Fieber, Juckreiz und Urtikaria an.

Tabelle 10: leichte Nebenwirkungen der Therapie

Leichte Nebenwirkung	Anzahl der Patienten (n=11)	Anzahl der Therapien(n=55)
Kopfschmerzen	3	5
Übelkeit	5	7
Erbrechen	1	1
Unwohlsein	7	12
Schwindelgefühl	7	11
Hypotonie	4	5
Hypertonie	1	1
Brustschmerzen	1	1
Palpitationen	3	4
Atembeschwerden	1	1
Starker Husten	2	2
Verstopfte Nase	1	3
Anormale Stimulation der Tränendrüse	3	3
Urtikaria	1	1
Juckreiz	1	1
Fieber	2	2
Kältegefühl	8	23
Übermäßiges Schwitzen	5	6
Parästhesien	4	7
Muskelkrämpfe	1	1
Tinnitus	1	1
Infekt	2	2

Tabelle 11: moderate Nebenwirkungen der Therapie

moderate Nebenwirkung	Anzahl der Patienten (n=11)	Anzahl der Therapien (n=55)
Shaldon- Katheterinfektion	1	1
Jugularvenen- Thrombophlebitis	1	1

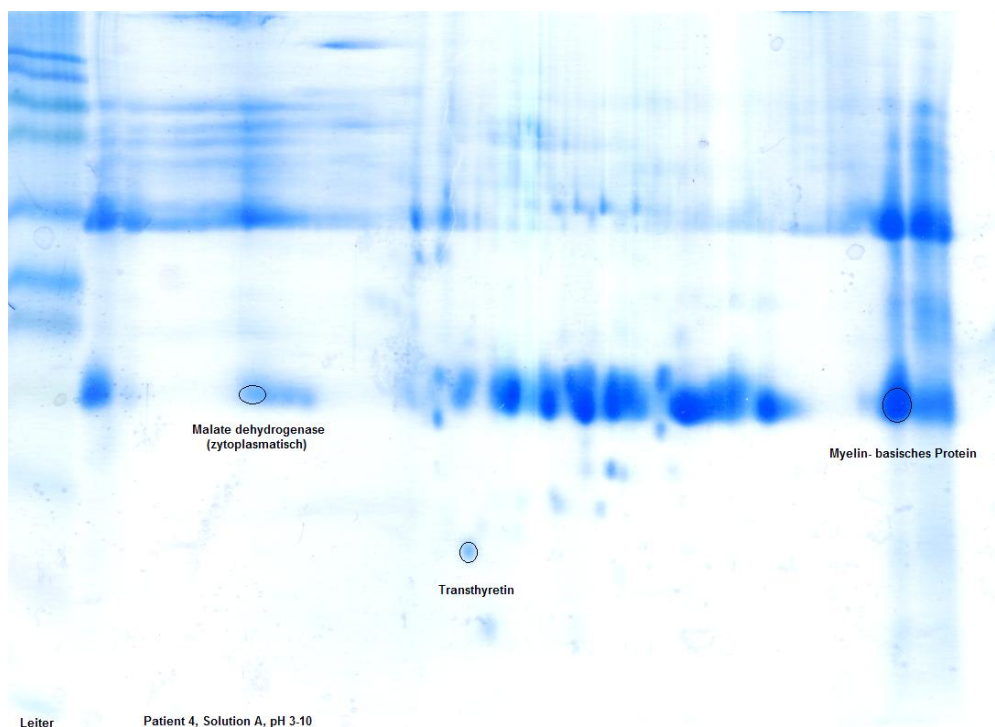
3.7 Experimentelle Ergebnisse

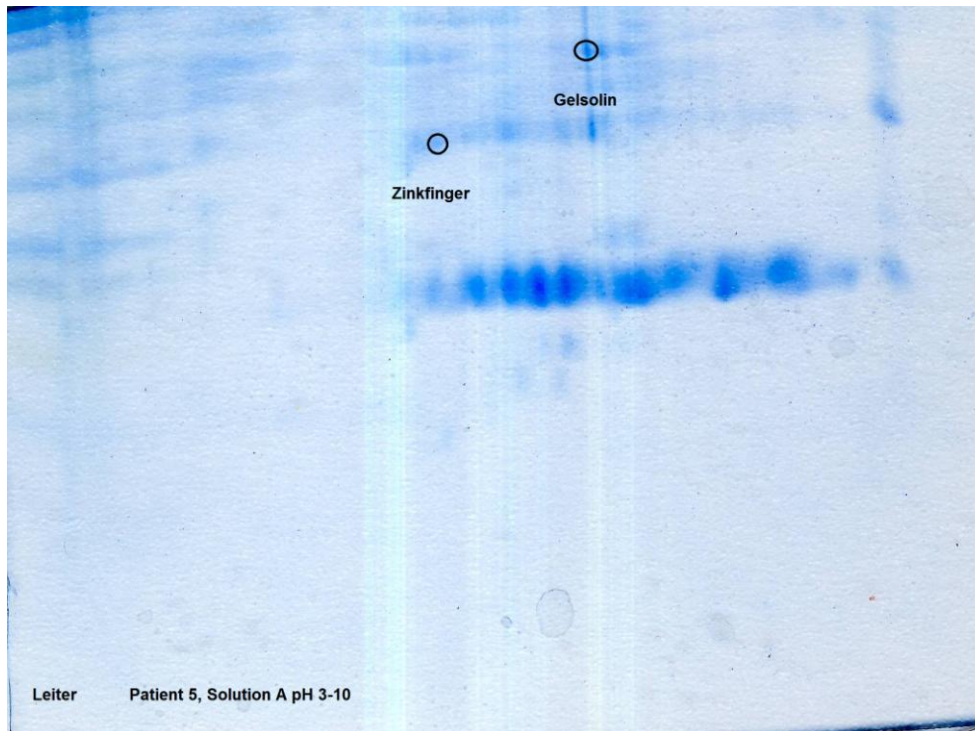
3.7.1 2D- SDS Gelelektrophorese

Wir analysierten das Eluat, welches wir aus der Immunadsorptions-Säule eines jeden Patienten gewonnen hatten. Bei dieser Analyse des fanden wir neben den erwarteten Proteinen wie Fibrinogen, Immunglobuline und Komplementfaktoren sowie einige Eiweiße, die in der Pathogenese der Multiplen Sklerose eine Rolle spielen könnten. Von besonderem Interesse sind für uns das basische Myelin-Protein und das CD5-Antigen.

Nach der Anfertigung von 2D-SDS Gelen erfolgte die Auswertung der Proteine mittels MALDI-TOF-Proteinidentifikation. In der folgenden Tabelle werde die Proteine aufgeführt einen Peptide-Mass-Fingerprint-Score von >56 erreicht haben und somit signifikant sind ($p < 0,05$). Auch die Proteinmasse in Dalton und das entsprechende Gen sind hier aufgeführt. Swiss Prot gibt die Datenbank an, mit der die Proben verglichen wurden.

Abbildung 22: Beispiel SDS- PAGE Gel (Coomassie- Blau)





3.7.2 Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse

Tabelle 12: Proteinanalyse mittels MALDI- TOF

Proteinname	Gene Name	Accession	Swiss Prot	Nominal Mass	PMF- Score
Apolipoprotein A-I	APOA1	APOA1 HUMAN	56.6	30759	119
Apolipoprotein A-IV	APOA4	APOA4 HUMAN	56.6	45371	67
Clusterin	CLU	CLUS HUMAN	56.8	53031	88
Complement factor I	CF1	CFA1 HUMAN	56.8	68072	86
Complement factor H	CFH	CFAH	57.1	143680	61
Fibrinogen alpha chain	FGA	FIBA HUMAN	57.1	95656	103
Fibrin alpha C term fragment	Keine Angabe	gi 223057	NCBI nr	14443	85
Fibrinogen beta chain	FGB	FIBB HUMAN	57.1	56577	78
Fibrinogen gamma chain	FGG	FIBG HUMAN	57.2	52106	71
Histidin- rich glycoprotein	HRG	HRG HUMAN	57.0	60510	152
Kininogen 1	KNG1	KNG1 HUMAN	56.8	72996	70
Plasminogen	PLG	PLMN HUMAN	56.6	93247	55
Serum Amyloid-P Komponente	APCS	SAMP HUMAN	56.8	25485	62
Transthyretin	TTR	TTHY HUMAN	56.6	15991	70
anti- human Cytomegalovirus Antibody, Chain A, crystal structure	keine Angabe	gi 218681891		23961	55
anti-human Cytomegalovirus antibody 8f9 plus gb Peptide Chain A, crystal structure	Keine Angabe	gi 218681891	NCBI nr	23961	65
Chain L, crystal structure of the broadly neutralizing Anti Hiv	Keine Angabe	gi 75765276	NCBI nr	23800	80
Chain L, crystal structure of a glycosylated Fab from an IgM	Keine Angabe	gi 99031801	NCBI nr	23616	79

Cryoglobulin					
Chain A, Structural characterization of a mutated, Adcc-Enhanced Human Fc Fr	Keine Angabe	gi 171848866	NCBI nr	25749	66
CD5 antigen- like	CD5L	CD5L HUMAN	56.8	39603	62
Immunglobulin kappa chain, C region	IGCK	IGCK HUMAN	57.2	11773	73
Immunglobulin kappa light chain variable region	keine Angabe	gi 48475436	NCBI nr	21251	80
Immunglobulin kappa light chain VLJ region	keine Angabe	gi 21669479	NCBI nr	29086	76
IGKC protein	keine Angabe	gi 49258112		25915	78
Monoclonal IgM antibody light chain	keine Angabe	gi 41388186	NCBI nr	26008	65
Cleavage stimulation factor, subunit, tau variant	CSTF2T	CSTFT HUMAN	57.2	64624	57
Gelsolin	GSN	GELS HUMAN	57.2	86043	95
Microtubule-actin crosslinking faktor 1	MACF	MACF1	57.0	623626	57
Mps one binder kinase activator-like2A	MOBK2A	MOL2A	57.0	25676	55
<u>Myelin basic protein</u>	MBP	MBP HUMAN	56.6	33097	53
Malate Dehydrogenase zytoplasmatic	MDH1	MDHC HUMAN	56.6	36631	57
Small ubiquitin-related modifier	SUMO1	SUMO1 HUMAN	57.2	11607	59
Transmembrane and TPR repeat-containing protein 1	TMTC1	TMTC1 HUMAN	57.2	88209	62
Zinc finger protein basonuclein-2	BNC2	BNC2 HUMAN	57.2	1236677	62
39S ribosomal protein L13 mitochondrial	MRPL13	RM13 HUMAN	57.0	20736	58

4. Diskussion

4.1 Plasmaaustausch (PE)

Bei der Therapie der schweren Optikusneuritis im Rahmen einer MS stellt die hochdosierte Gabe von Kortikosteroiden den derzeitigen Goldstandard dar (Beck et al. 1993). Jedoch zeigen manche Patienten kein Ansprechen auf diese Stoßtherapie und erfüllen damit die Indikation zu einem PE, welcher nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie aus dem Jahre 2008 die einzige etablierte Eskalationstherapie des Steroid- refraktären Schubes bei der MS darstellt (Diener und Putzki 2008). Grundlage hierfür ist eine Placebo- kontrollierte Studie an Patienten mit neurologischen Defiziten im Rahmen einer MS, aber auch anderen demyelinisierenden Erkrankungen, welche ein Ansprechen auf den PE mit Besserung der Symptomatik in 42% zeigten (Weinshenker et al. 1999). Daneben gibt es derzeit nur wenige Daten über die therapeutische Wirksamkeit des PE bei der MS und aktuell vorliegende Studien weisen nur geringe Fallzahlen auf. Eine Übersicht ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Zusammenfassung der Studien zum PE bei MS

Autoren	Patientenzahl	Studientyp	MS-Typ	PE-Anzahl/ Patient	behandeltes Plasmavolumen (ml)	Steroid- refraktär	Zeitraum	Outcome
Khatri et al. 1985	54	doppel-blind kontrolliert	chronisch- progredient	20	k.A.	nein	1x/Woche	EDSS-Verbesserung
Weinshenker et al. 1999	36	doppel-blind	verschiedene akute	7	3000	ja	k.A.	signifikante Verbesserung neurologischer Defizite bei 42%
Weiner et al. 1990	116	doppel-blind multizentrisch randomisiert	chronisch- progredient	11	k.A.	ja	8 Wochen	signifikante Verbesserung des klinischen Scores nach 4 Wochen
Ruprecht et al. 2004	10	retrospektiv	akute Optikusneuritis	k.A.	k.A.	ja	k.A.	Verbesserung der Sehkraft bei 7 von 10 Patienten
Schilling et al. 2006	16 (3 pädiatrische)	retrospektiv	RRMS	5	3000	ja	26 Tage	71% mit gutem bzw. sehr gutem Ansprechen auf den PE
Trebst et al. 2009	20	retrospektiv	RRMS	3-7	1,5- fache des Patientenplasmavolumens	ja	k.A.	Verbesserung des Visus im Rahmen der Optikusneuritis bei 76%, Verbesserung mit anderer Schubsymptomatik bei 87,5%
Habek et al. 2010	4	retrospektiv	RRMS	5	2750	ja	5 Tage	1 Patient mit ausgeprägter, 2 mit leichter, 1 mit keiner Verbesserung

Schon im Jahre 1985 konnten Khatri et al. in einer verblindeten Placebo-kontrollierten Studie an 54 Patienten mit MS zeigen, dass durch einen wöchentlichen PE über insgesamt 20 Wochen eine signifikante Besserung der Beschwerdesymptomatik bei 14 von 26 Patienten erreicht werden konnte, in der Placebogruppe besserten sich dagegen nur 8 von 28 Patienten (Khatri et al. 1985).

Die Wirksamkeit des PE wird durch eine multizentrisch randomisierte und verblindete Studie an 116 Patienten mit chronisch-progredienter Verlaufsform der MS von Weiner et al. bestätigt, welche eine signifikant raschere Besserung der Symptomatik gegenüber der Placebogruppe durch insgesamt 11 PE-Behandlungen innerhalb von 8 Wochen und begleitender immunsuppressiven Therapie mit dem adrenokortikotropen Hormon (ACTH) und Cyclophosphamid erreichen konnten. Langzeiteffekte waren auch nach der letzten Behandlung weitere 12 Wochen nachweisbar (Weiner et al. 1990).

Hinsichtlich einer Optikusneuritis im Rahmen der MS konnten Ruprecht et al. eine signifikante Verbesserung des Visus bei 7 von 10 Patienten durch den PE erreichen (Ruprecht et al. 2004).

In einer weiteren retrospektiven Studie der Abteilungen Neurologie und Nephrologie & Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen wurde der klinische Verlauf bei 13 Erwachsenen sowie 3 pädiatrischen Patienten mit MS beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass 71% der Patienten ein gutes bis sehr gutes Ansprechen bereits nach der dritten PE-Behandlung aufweisen. In dieser Studie betrug die Dauer zwischen Schubbeginn und Therapiestart im Mittel 28 Tagen, wobei ein früher Therapiestart mit einem günstigerem klinischen Verlauf korrelierte (Schilling et al. 2006).

Eine etwas größere Studie an 21 Patienten mit Steroid-refraktärer MS konnte eine klinische Verbesserung der mono- oder bilaterale Optikusneuritis bei 76% bzw. Verbesserung anderer Schubsymptomatiken bei 87,5% der Patienten erreichen (Trebst et al. 2009).

Im Jahre 2010 wurde eine weitere Studie zum PE bei MS von Habek et al. an 4 Patienten mit schwerer Verlaufsform publiziert. Hier konnte beobachtet werden, dass ein fünfmaliger PE bei einem Patienten ein sehr gutes Ansprechen zeigte, bei zwei Patienten konnte eine leichte Verbesserung der Symptomatik erreicht werden, ein Patient war Non-Responder ohne Besserung der Beschwerdesymptomatik (Habek et al. 2010).

In unserer Studie wurden 11 Patienten mit steroid-refraktärer Optikusneuritis im Rahmen eines MS-Schubs mittels IA als Eskalationstherapie behandelt. Die Fallzahl ist gering, für eine monozentrische Studie jedoch vergleichbar mit anderen Publikationen. Eine Placebo-behandelte Kontrollgruppe gab es in unserer Studie nicht, da dies ethisch nicht vertretbar gewesen wäre. Möglich und interessant jedoch wäre eine kontrollierte Studie, welche die Wirksamkeit von PE versus IA vergleicht. Vergleichbar mit den Responderraten der PE-Studien zeigten in dieser Studie 8 der 11 Patienten ein gutes Ansprechen auf die IA.

Ähnlich zum PE konnte schon in der frühen Therapiephase eine Besserung der klinischen Symptomatik in dieser Studie dokumentiert werden. Verglichen mit dem Ausgangswert vor Therapiebeginn konnte bei den Respondern bereits nach der dritten Behandlung eine Verbesserung des Visus auf 300% des Ausgangswertes bzw. nach der fünften Behandlung auf 525% des Ausgangswertes erreicht werden. Auch in der Posttherapiephase nach der letzten Behandlung konnte ein günstiger Einfluss der IA auf den Visus mit Anstieg auf 567% des Ausgangswertes nach 30 Tagen

bzw. auf maximal 600% des Ausgangswertes nach sechs Monaten beobachtet werden, was für eine positive Nachwirkphase der Therapie sprechen könnte. Aufgrund einer fehlenden Placebo-behandelten Kontrollgruppe ist nicht auszuschließen, dass ein verzögerter Wirkeintritt der Stoßtherapie mit Kortikosteroiden oder eine spontane Remission der Erkrankung bei einigen Patienten zu dieser Besserung der Symptomatik führt, welche sich nicht ausschließlich auf die IA zurückführen lässt. Doch beweist das vermehrte Ansprechen und der verbesserte Therapieerfolg bei früherem Therapiebeginn, dass die IA-Behandlung prognostisch günstige Effekte aufweist. Diese Verbesserung des Visus wurde durch Verkürzung der Latenz sowie Anstieg der Amplitude in den gemessenen VEP's während und nach der Behandlungsphase objektiviert. So könnte auch die relevante Reduktion der Punktezahl des EDSS und ISS erst nach Therapieende durch einen über die Behandlung hinaus andauernden Effekt der IA auf die Krankheitsaktivität erklärt werden.

Insgesamt zeigt sich bei Betrachtung der Studienlage ein sehr heterogenes Bild des Aufbaus der verschiedenen Studien. Die Patientenzahlen bewegen sich zwischen 4 und 116, die Mehrzahl der Studien sind retrospektiv. Bisher gibt es nur drei kontrolliert-prospektive Studien, welche die Wirkungsweise des PE bei der MS untersucht haben, wobei in keiner der vorliegenden Arbeiten zwischen akuter und chronischer Verlaufsform unterschieden wurde. Unsere Studien zeichnet sich durch ein sehr homogenes Patientenkollektiv aus, da sich der akute Schub der MS bei allen Patienten in Form einer akuten monolateralen Optikusneuritis auswirkte. Wie in den Leitlinien gefordert und auch in dieser Studie als Einschlusskriterium gefordert, wurden bei nahezu allen Studien Patienten behandelt, die an einem steroid-refraktären Schub der MS litten.

Auch die Anzahl und Frequenz der PE-Behandlungen ist sehr unterschiedlich. So führten Trebst et al. drei bis fünf Behandlungen pro Patient über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen durch, dagegen wurde die Patienten von Khatri et al. mit 20 PE-Behandlungen über 20 Wochen therapiert (Khatri et al. 1985, Trebst et al. 2009). In der dargestellten Studie wurde die IA mit 5. Zyklen in einem Zeitraum von ca. 10 Tagen durchgeführt.

Aufgrund der variablen Studienprotokolle ist nach aktueller Studienlage nicht ersichtlich, wann mit der PE-Behandlung begonnen und in welcher Dosis, Anzahl und Frequenz diese durchgeführt werden sollte. Dies unterstreicht die Relevanz zukünftiger prospektiver Studien über die Behandlung der MS unter Berücksichtigung der verschiedenen Subtypen und Verlaufsformen.

4.2 Immunadsorption (IA)

Eine alternative Behandlung des Steroid-refraktären Schubes der MS stellt die IA dar. Sie ist bislang weder in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie aus dem Jahre 2008 noch im Apheresestandard der Arbeitsgemeinschaft für klinische Nephrologie aus dem Jahre 2003 festgehalten. Die Wirksamkeit der IA bei der MS wurde bislang nur an drei klinischen Arbeiten untersucht, wobei nur Moldenhauer et al. eine prospektive Studie durchgeführt haben, allerdings an einem sehr inhomogenen Patientenkollektiv mit akuter und chronischer Verlaufsform einer MS (de Andrés et al. 2000, Hosokawa et al. 1989, Moldenhauer et al. 2005). Die vorliegende Arbeit stellt daher die zweite prospektive Arbeit zur IA bei MS überhaupt dar, wobei in dieser Studie erstmalig ein homogenes Patientenkollektiv mit Steroid-refraktärer Optikusneuritis und akuter Verlaufsform berücksichtigt wurde. Tabelle 14 fasst die bisherigen Studien zur IA-Behandlung bei MS zusammen.

Tabelle 14: Zusammenfassung der Studien zur IA bei MS

Autoren	Patientenzahl	Studientyp	MS-Typ	IA-Anzahl/ Patient	behandeltes Plasmavolumen	Adsorbermatrix/Ligand	Steroid- refraktär	Zeitraum	Outcome
Hosokawa et al. 1989	16	retrospektiv	chronisch progredient	>10	3000ml	Polyvinylalkohol/Tryptophan	nein	6 Monate	EDSS- Verbesserung
de Andrés et al. 2000	3	retrospektiv	RRMS	5-6	k.A.	k.A.	ja	7-10 Tage	signifikante Verbesserung neurologischer Defizite bei 42%
Moldenhauer et al. 2005	12	prospektiv	RRMS SPMS	14	1,5-faches Plasmavolumen	Sepharose-konjugierte Schafantikörper gegen humanes Ig	nein	90 Tage	signifikante Verbesserung des klinischen Scores nach 4 Wochen

In einer von Hosokawa et al. im Jahre 1989 durchgeführten Studie an 16 Patienten mit neurologischer Symptomatik einer MS erfolgte eine IA mit initial zwei Behandlungen pro Woche über zwei Wochen, anschließend einer Behandlung pro Woche über acht Wochen und zuletzt alle zwei Wochen (Hosokawa et al. 1989). Hierbei erfolgte die Behandlung von insgesamt 3000ml Plasmavolumen mittels IA bei jeder Therapie, wodurch es zu einer Verbesserung der Gehfähigkeit bei vier, der Stehfähigkeit bei sechs und der Sitzfähigkeit bei sieben Patienten kam. Auch Sensibilitätsstörungen, Visusminderung und Inkontinenz waren durch die IA-Behandlung rückläufig. 16 Patienten mit langer Therapiedauer und chronisch-progredienten MS wurden eingeschlossen, es wurde keine Behandlung bei der schubförmigen Verlaufsform durchgeführt.

Eine weitere Studie von de Andrés et al. untersuchte die Wirksamkeit der IA bei der malignen MS, einer prolongierten Verlaufsform mit schweren Rezidivereignissen, welche ein sehr schlechtes Ansprechen auf die hochdosierte Steroidtherapie aufweist (de Andrés et al. 2000). Bei insgesamt drei Patienten erfolgte hier eine Therapie mittels fünf bis sechs IA-Behandlungen und anschließender immunsuppressiver Erhaltungstherapie mit ACTH in Kombination mit Cyclophosphamid oder Mitoxantron. Alle Patienten zeigten eine Verbesserung der Verlaufsform über einen Nachbeobachtungszeitraum von im Mittel 7,6 Jahren, wobei ein Patient ein mildes Rezidiv erlitt.

Die erste prospektive Studie in diesem Bereich wurde von Moldenhauer et al. im Jahre 2005 durchgeführt (Moldenhauer et al. 2005). Die IA zeigte bei 12 Patienten mit akuter oder chronischer Verlaufsform einer sekundär-progredienter MS eine Stabilisierung der zerebralen Läsionen in der Magnetresonanztomografie durch 14 Behandlungen über einen Zeitraum von zehn Wochen. Auch über die Therapiephase hinaus konnte nach drei Monaten ein signifikant niedriger EDSS nachgewiesen werden.

Wie auch bei den PE-basierenden Studien zeigt sich bei den IA-Untersuchungen ein sehr heterogenes Studiendesign hinsichtlich Einschlusskriterien, Therapiemodus und Effektivitätsbeurteilung. Die Fallzahl in den publizierten IA-Studien bewegt sich zwischen 3 und 16, unsere Studie ist mit einer Anzahl von 11 Patienten somit vergleichbar. Keine der Studien hat die Wirkung der IA gegen eine Kontrollgruppe verglichen.

Einzig die Arbeitsgruppe um de Andrés et al. hat als Einschlusskriterium eine vorherige Steroid-Behandlung vorausgesetzt. Auch wurde in den bisherigen Studien nicht zwischen der chronischen und schubförmigen Verlaufsform der MS unterschieden, sodass die Wirkung der IA bei akutem Steroid-refraktärem Schub der MS bisher in keiner Studie untersucht wurde.

Allerdings ist über das Ansprechen gerade der schubförmigen Verlaufsform der MS auf die IA bislang wenig bekannt, da die Patientenkollektive vorheriger Arbeiten aus chronischen oder gemischt schubförmigen sowie chronisch-progredienten Verläufen bestanden.

Somit ist die vorliegende Arbeit mit Einschluss von 11 Patienten die erste umfangreichere prospektive Studie über die Behandlung der ausschließlich akuten Verlaufsform der Steroid-refraktären MS mittels IA, welche die Langzeiteffekte dieser Therapie auch über eine ausreichende Nachbeobachtungszeit untersucht. Ein Vorteil liegt in dem sehr homogenen Patientenkollektiv, da alle Patienten an einer

akuten monolateralen Optikusneuritis litten. Diese Arbeit bestätigt frühere Beobachtungen über einen günstigen Effekt der IA auf den Verlauf dieser Erkrankung.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein unzureichendes Ansprechen auf die IA mit ausbleibender Besserung des Visus nach der dritten Behandlung mit einer schlechten Prognose des weiteren Krankheitsverlaufes verbunden ist. So zeigten diese Non-Responder auch im weiteren Verlauf kein Ansprechen auf die IA, so dass bei diesen Patienten nach der dritten Behandlung ein Beendigung der Behandlung bzw. ein Therapiewechsel erwogen werden sollte.

Vergleiche mit Daten anderer Arbeitsgruppen sind schwierig, da diese meist retrospektiv erhoben wurden und die einzig prospektive Studie von Moldenhauer et al. nicht zwischen schubförmiger und chronisch- progredienter Verlaufsform unterschieden hat. Bisher war in nur einer Studie eine Steroid-Vorbehandlung Voraussetzung zum Einschluss in die Studie. Sieht man die IA als Eskalationstherapie, sollte eine Vorbehandlung mit Steroiden die Voraussetzung für den Beginn einer IA-Therapie sein. Auch dies wiederum würde ausschließlich bei der akuten Verlaufsform der MS einen Sinn ergeben. Weitere Aspekte der erschwerten Vergleichbarkeit sind die Verwendung unterschiedlicher Liganden in den Adsorbersäulen und das behandelte Plasmavolumen, welches zwischen dem 1,5-fachen des errechneten Gesamtplasmavolumens und 3000ml variiert. Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Effektivität der einzelnen Liganden. Somit müssen zukünftige Studien klären, von welchen Adsorbersäulen und behandelten Plasmavolumina die Patienten maximal profitieren und ein noch früherer Therapiebeginn und die Erhöhung der Anzahl der Behandlungen zu einem noch besseren Langzeitergebnis führen. Des Weiteren sollte Gegenstand dieser Studien sein, die Wirksamkeit auch bei anderen Formen der MS zu untersuchen und die IA-Behandlung mit den Erfolgen der PE-Behandlung zu vergleichen.

4.3 Nebenwirkungen

Ein wichtiger Aspekt bei der Behandlung neurologischer Patienten mittels PE ist deren, verglichen mit der Behandlung internistischer Patienten, signifikant erhöhtes Risiko für Komplikationen (Bramlage et al. 2009). Insgesamt wurde ein Risiko für Nebenwirkungen jeglicher Art zwischen 4,2% und 25,6% beschrieben (Bramlage et al. 2009, Samtleben et al. 1980, Sprenger et al. 1984). In der Genese der Nebenwirkungen sollte zwischen Therapie-, Antikoagulation- und Zugangs- assoziiert unterschieden werden. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Zugangs- assoziiert und wurden in dieser Arbeit mit 10,3% angegeben. Da bei der IA kein Substitut verwendet wird wären Therapie- assoziierten Nebenwirkungen, wie beispielsweise allergische Reaktionen die durch die Übertragung von Fremdblutbestandteilen beim PE entstehen und mit 4,6% angegeben werden, vermeidbar.

Dagegen ist über die Risiken oder Nebenwirkungen der IA-Behandlung nur wenig bekannt. Bislang gibt es keine Studie, welche diese beschreibt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass leichte Nebenwirkungen wie Kältegefühl, Unwohlsein oder Kopfschmerzen bei nahezu allen Patienten während der Therapiephase auftraten und als Therapie- assoziierte Nebenwirkungen gesehen werden

können. Die moderaten Nebenwirkungen sind Zugangs- assoziierte Nebenwirkungen die auf die notwendige Anlage eines großlumigen zentralen Venenkatheters, eines sogenannten Shaldon-Katheters, zurückzuführen waren. Ein Patient erlitt während der Therapiephase eine Infektion des Katheters, der andere nach Abschluss der Therapie eine Thrombose im Bereich der Jugularvene, sodass sich eine Inzidenz für moderate Nebenwirkungen von 18,2% angeben lässt. Diese waren durch die Anlage eines Gefäßzuganges verursacht und sind daher nur indirekt assoziiert mit der IA-Behandlung. Die hohe Inzidenz ist jedoch ein Argument die alternative veno-venöse Behandlung mit Punktion der Kubitalvenen zu bevorzugen. Einen direkten Zusammenhang ergab sich bei leichten Nebenwirkungen, welche sich bei gutem bis sehr gutem Therapieansprechen auf die IA vertreten lassen. Bei 11 Patienten ist die Aussagekraft über mögliche Nebenwirkungen im Vergleich zu Analysen von über 1000 PE- Behandlungen deutlich eingeschränkt. Hier müssen zukünftige Studien an größeren Patientenkollektiven direkte und indirekte Nebenwirkungen der IA aufzeigen, um diese mit dem PE vergleichen zu können.

4.4 Responder und Non-Responder

Die Anzahl der Responder lag in der vorliegenden Arbeit bei acht Patienten, drei zeigten als Non-Responder keine Besserung des Visus im Verlauf der Therapiephase. Das Ansprechen aller Responder schon nach der dritten IA-Behandlung lässt eine frühzeitige Unterscheidung der beiden Gruppen zu, die Gruppe der Non-Responder zeigte auch im weiteren Therapieverlauf keine Besserung des eingeschränkten Visus.

Unterschiede zwischen der Gruppe der Responder und der Non-Responder zeigten sich in dieser Arbeit auch laborchemisch. So ist bei den Respondern nach der fünften IA-Behandlung ein deutlicher Effekt mit Absinken des sIL-2R-Spiegels im Blut nachweisbar, welcher auch in der Nachbeobachtungsphase nach der Therapie anhält. Dies war in der Gruppe der Non-Responder während und nach der Therapiephase nicht zu beobachten.

Die Unterscheidung und Diagnose der einzelnen Subtypen der MS lässt sich nur mittels zerebraler Biopsie sichern, welche nicht routinemäßig durchgeführt werden. Einmalig konnten Keegan et al. mittels Hirnbiopsien nachweisen, dass ein Ansprechen auf den PE mit dem Antikörper-vermittelten Subtyp 2 der MS korreliert (Keegan et al. 2005). Auch wenn der Vergleich von 8 Respondern vs 3 Non-Respondern sehr kritisch zu sehen ist, zeigen die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit, dass gerade die Gruppe der Responder erhöhte Plasmaspiegel humoraler Faktoren aufweisen. Diese erhöhten Plasmaspiegel werden durch die IA effektiv gesenkt und dies wiederum könnte – im Kontext mit den verschiedenen Subtypen der MS – bedeuten, dass die Gruppe der Responder an dem Antikörper-vermittelten Subtyp 2 der MS leiden. Bei den drei Patienten, welche auf die IA nicht angesprochen haben, könnte ein Subtyp der MS vorliegen, welcher nicht durch Antikörper vermittelt wird und somit humorale Bestandteile des Immunsystems in dieser Gruppe nicht erhöht gemessen werden konnten.

Ziel einer bereits geplanten Studie ist es, immunologische Unterschiede sowohl im Plasma wie auch im Eluat der Adsorbersäulen der Responder und Non- Responder mittels 2D-DIGE-TOF-MS-Analyse näher zu untersuchen. Hierzu werden maximal drei verschiedene Proteinextrakte mit je einem Farbstoff markiert, gemischt und gemeinsam auf demselben Gel getrennt. Da die Farbstoffe separat voneinander detektiert werden können, ermöglicht dies die Identifizierung unterschiedlicher Proteinmuster um eine Klassifizierung und Abschätzung des Therapieansprechens zu ermöglichen. Ein weiterer Aspekt dieser Folgestudie ist die Identifikation von Serum-Proteinen sein, welche sich durch die Immunadsorptionsbehandlung verändern und im Rahmen der Immunmodulation eine Rolle spielen könnten.

4.5 Hypothese zum Wirkmechanismus der IA

Der theoretische Hintergrund für die Behandlung des Steroid-refraktären Schubes der MS mittels PE oder IA stellt die Elimination humoraler Bestandteile des Immunsystems dar, welche pathophysiologisch an der Vermittlung der Erkrankung beteiligt sind. So erklären sich Beobachtungen von Keegan et al., welche nach PE ein Ansprechen von 100% bei Patienten mit vor der Therapiephase bioptisch gesichertem Antikörper-vermitteltem Subtyps 2 der MS nachweisen konnten (Keegan et al. 2005). Dagegen war die Therapie bei Patienten mit den Subtypen 1 und 3 erfolglos, es zeigte sich keine Besserung der Beschwerdesymptomatik. Die Behandlung mittels IA stützt sich auf diesen pathophysiologischen Hintergrund mit dem Vorteil der spezifischen Elimination pathogener Plasmabestandteile ohne Austausch des gesamten Patientenplasmas, wie es bislang beim PE durchgeführt wird.

In dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurden erstmals Eluate der Adsorbersäulen auf deren Zusammensetzung untersucht, um Aufschluss über eine mögliche Elimination von Mediatoren der MS durch die IA zu identifizieren. Die Identifikation einiger Proteine, welche durch die Adsorbersäulen bei der IA-Behandlung selektiv eliminiert wurden, erfolgte mittels 2D-SDS-Gelelektrophorese und anschließender MALDI-TOF-Proteinidentifikation. Der Proteinbereich dieser Methode liegt bei einer molekularen Masse zwischen 5 und 200kDa, wobei auf Grund des wässrigen Milieus der Trennsysteme insbesondere hydrophile Proteine aufgetrennt werden und eine Identifikation sehr basischer Proteine wegen des pH-Bereiches zwischen drei und zehn erschwert ist (Klose 1975; O' Farrell 1975).

Insgesamt konnten 38 Proteine in den Eluaten identifiziert werden. Neben häufigen Plasmaproteinen wie Fibrinogen, Albumin und Plasminogen wurden auch regulatorische Faktoren des Immunsystems wie Komplement I und H identifiziert. So konnten Padilla-Docal et al. im Liquor erhöhte Konzentrationen des Komplementfaktors C3c im akuten Schub einer MS nachweisen, sodass in der Aktivierung des Komplementsystems ein Pathomechanismus der Genese der MS vermutet wird (Padilla-Docal et al. 2007). Schneider konnte im Jahre 1996 bei Patienten mit MS nachweisen, dass die Behandlung mittels PE zu einer Verminderung des Komplementfaktors C3 im Plasma führt

(Schneider 1996). Der Komplementmodulator FUT-175, welcher die Produktion von C3a und C5 verhindert, stellt hierbei einen möglichen experimentellen Ansatz dar. So konnten Li et al. zeigen, dass dieser nach intraperitonealer Applikation einen therapeutisch günstigen Effekt mit verminderter Konzentration von C3a im Tiermodell der MS aufweist (Li et al. 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte ein Einfluss der IA während der Therapiephase auf das Komplementsystem mit Reduktion von C3c und C4 im Plasma nachgewiesen werden. Ob dies durch eine spezifische Adsorption einzelner Komplementkomponenten an die Adsorbermatrix oder eine extrakorporale Aktivierung des Komplementsystems mit Verbrauch der Komponenten verursacht wird, konnte die Arbeit nicht beantworten.

Des Weiteren gelang in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von Transthyretin, Serum-Amyloid, Clusterin, Gelsolin, Kininogen-1 und Immunglobulinen im Eluat der Adsorbersäulen, welche durch die IA eliminiert wurden und als mögliche pathomechanistische Faktoren der MS diskutiert werden (Rithidech et al. 2009).

Als ein weiteres Protein im Eluat der Adsorbersäulen konnte das am Aufbau der Myelinscheide des ZNS beteiligte Myelin-basische Protein (MBP) identifiziert werden, welches ein Autoantigen immunologischer Prozesse des ZNS darstellt, bei demyelinisierenden Prozessen vermehrt im Liquor nachgewiesen werden konnte und im Tiermodell eine experimentelle Enzephalomyelitis nach passiver Immunisierung verursacht (Cohen et al. 1976, Gold et al. 2006, Whitaker et al. 1980). Die Elimination dieses Proteins scheint spezifisch, da bei seriellen Plasmaanalysen der behandelten Patienten ein Abfall über die Behandlung zu verzeichnen war (unveröffentlichte Analysen außerhalb dieser Dissertation). Harp et al. konnten im peripheren Blut von Patienten mit MS vermehrt MBP-spezifische Gedächtniszellen nachweisen, welche die Migration aktivierter T-Lymphozyten aus den Lymphknoten induzieren und diese zur Produktion insbesondere des inflammatorischen Zytokins Interferon-gamma stimulieren (Harp et al. 2010). In einer doppelt verblindeten Placebo-kontrollierten Studie an 32 Patienten mit MS wurde ein synthetisches Fragment des MBP alle sechs Monate intravenös appliziert und über einen Zeitraum von insgesamt 24 Monaten beobachtet (Warren et al. 2006). Grundlage hierfür war die Annahme, dass Autoantikörper gegen MBP pathophysiologisch an der MS beteiligt sind und diese durch das synthetische Fragment wenigstens teilweise abgefangen und eliminiert werden. Warren et al. konnten zeigen, dass es zu einer reduzierten Konzentration von Autoantikörpern gegen MBP im Liquor dieser Patienten kam und dies einen günstigen Einfluss auf die Progredienz der Erkrankung hatte. Jedoch konnte keine Korrelation zwischen Suppression dieser Autoantikörper und der klinischen Besserung der Beschwerdesymptomatik nachgewiesen werden.

Ein weiteres Protein, welches durch die IA eliminiert wurde und im Eluat nachgewiesen werden konnte, war das immunmodulatorische CD5-Antigen. Dies wurde im Zeitverlauf der Behandlung ebenfalls signifikant im Patientenplasma abgesenkt. Antikörper bei immunologischen Prozessen wie der MS stimulieren hierbei die Produktion von CD5 in T-Lymphozyten, wodurch es zu einer Aktivierung und Proliferation von T- und B-Lymphozyten nach vermehrtem Calciumeinstrom in die Zelle und Induktion der Expression von IL-2 kommt (Ceuppens und Baroja 1986, June et al. 1987, Spertini et al. 1991). Somit nimmt CD5 eine wesentliche Rolle bei der Regulation und Interaktion von zellulären

Bestandteilen des Immunsystems ein. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist eine Fehlregulation der zellulären Immunantwort bei immunologisch entzündlichen Prozessen des ZNS durch einen unspezifischen Verlust und verminderte Aktivität von T-Supressorzellen und natürlichen Killerzellen, eine vermehrte Anzahl aktivierter T-Lymphozyten sowie einem erhöhtem Quotienten aus Th1- und Th2-Zellen (Goto et al. 2001, Hafler und Weiner 1995, Khoury et al. 2000). Die gestörte zelluläre Immunantwort mit Th1-Dominanz und veränderter Zytokinproduktion ist an der Pathogenese der MS beteiligt (Goto et al. 2001). Goto et al. konnten nachweisen, dass sowohl der PE als auch die IA eine modulatorische Wirkung auf das zelluläre Immunsystem mit Konversion der Th1- zu einer Th2-Dominanz haben (Goto et al. 2001). Bestätigt wurde dies von Hehmke et al., welche einen Effekt auf den Quotienten aus Th1- und Th2-Helferzellen durch die IA-Behandlung bei Patienten mit MS nachweisen konnten (Hehmke et al. 2000).

Für eine effektive Elimination von pathogenen und modulatorischen Faktoren im Rahmen einer MS ist deren Verteilung in den verschiedenen Kompartimenten des intra- und extravasalen Raumes bzw. dem Liquor entscheidend. In einem kinetischen Modell von Kellogg werden das Blut- und Liquorsystem als geschlossene Systeme betrachtet, welche durch die Blut-Hirn-Schranke voneinander getrennt werden (Kellogg und Hester 1988). Ein Austausch von Molekülen ist über Diffusion möglich, welche dem Konzentrationsgradienten folgen. Durch die IA wird das Kompartiment Blut „gereinigt“ und ein Gradient zwischen dem ZNS- und Blutkompartiment geschaffen. Demzufolge sollte einem Absinken der Immunglobulinkonzentration im Blut eine Depletierung im ZNS folgen. Zu dieser Hypothese im Widerspruch steht eine Fallbeschreibung von Ryberg und Pirskanen über die Behandlung eines Patienten mit MS mittels PE, bei dem zwar ein Absinken der Konzentration von IgG im Plasma nach PE erreicht wurde, jedoch keine Reduktion von IgG im Liquor nachzuweisen war (Ryberg und Pirskanen 1985). Die Beurteilbarkeit einer Fallbeschreibung ist jedoch deutlich eingeschränkt und Ziel sollten weitere Analysen an größeren Fallzahlen sein, um diese Aspekte näher zu untersuchen. Eine weitere Einschränkung dieser Fallbeobachtung beruht auf dem großen Zeitabstand zwischen den einzelnen Behandlungen mit über einer Woche. Dies erlaubt nur eine beschränkte Aufrechterhaltung eines negativen Gradienten, welcher für die Elimination humoraler Faktoren aus dem Plasma direkt nach der Behandlung nötig ist um eine Umverteilung aus dem ZNS zu bewirken.

Eine effektive Elimination aus dem extravasalen Raum und Liquor ist nur möglich, wenn die Intervalle der einzelnen Behandlungen sehr kurz sind. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein Intervall von zwei Tagen gewählt, wodurch eine signifikante Reduktion von IgG im Plasma durch die IA erreicht werden konnte, wobei die optimale Anzahl der Behandlungen und deren Frequenz derzeit unklar ist. Unser Studiendesign erlaubte keine Rückschlüsse auf die intrazerebralen Immunglobulinkonzentrationen im Zeitverlauf. Im Serum kam es in der Nachbeobachtungsphase zu einem reaktiven Anstieg des IgG auf ein signifikant höheres Niveau im Vergleich zum Ausgangswert. Einen ähnlichen Verlauf zeigten auch IgA und IgM. Ein Marker für die Neuproduktion von Immunglobulinen stellen freie Leichtketten dar, welche bei einer alleinigen Umverteilung in den einzelnen Kompartimenten nicht nachweisbar wären. Hier konnten Goldammer et al. zeigen, dass es nach der IA zu einem Anstieg von IgG im Plasma bei fehlenden freien Leichtketten kommt

(Goldammer et al. 2002). Diese Beobachtung spricht gegen eine Neuproduktion und eher für eine Umverteilung in den einzelnen Kompartimenten und bestätigt die grundlegende Annahme der Wirkungsweise des PE oder der IA mit Aufbau eines negativen Gradienten im Plasma gegenüber dem ZNS. Jedoch wurde dies nur in der Behandlungsphase beobachtet und es fehlen Daten über die Nachwirkphase der IA. Unwahrscheinlich ist, dass der in unserer Studie beobachtete Anstieg von Immunglobulinen 6 Monate nach Abschluss der IA-Behandlung weiterhin ein Umverteilungsphänomen darstellt. Hier bedarf es jedoch weiterer Analysen des beobachteten Phänomens.

Noch ist über die relevanten Pathomechanismen zellulärer und humoraler Bestandteile des Immunsystems bei den einzelnen Formen der MS und den genauen Einfluss der Behandlung mittels IA auf diese Prozesse wenig bekannt. Gegenstand zukünftiger Studien muss daher die Erarbeitung von Therapieregimen und Empfehlungen sein, welche auch individuelle Kriterien der einzelnen Patienten wie dem Subtyp der MS oder dessen Ansprechen berücksichtigen sollten.

4.6 Ziele weiterführender Studien

Beobachtungen und Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten konnten zeigen, dass die IA eine alternative Behandlung von Patienten mit einem Steroid-refraktärem Schub der MS darstellen kann (Moldenhauer et al. 2005; Ohji und Nomura 2008). Des Weiteren konnte im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die IA immunologische Prozesse beeinflusst und sowohl pathogene Faktoren eliminiert wie auch immunmodulatorisch wirkt. Daher erscheint die IA besonders im Antikörper-vermitteltem Subtyp 2 der MS sinnvoll, da dieser wahrscheinlich durch das humorale Immunsystem verursacht wird. Limitierend ist in dieser Studie die niedrige Patientenzahl, so dass nur wenig über klinische Kriterien für ein Ansprechen oder die Prognose gesagt werden kann. Daher müssen Folgestudien mit größeren Patientenzahlen auf Grundlage der vorliegenden Arbeit Einschlusskriterien und klinische Parameter zur Einteilung in die einzelnen Subtypen der MS erarbeiten, um frühzeitig zwischen Respondern und Non-Respondern unterscheiden zu können. Des Weiteren müssen diese zeigen, welchen Stellenwert die IA gegenüber dem PE einnimmt und welche Patienten mehr von der einen oder anderen Behandlungsmethode profitieren.

Auch die weitere experimentelle Aufarbeitung der immunologischen Prozesse in der Pathogenese der MS ist von großem Interesse. Auf Grundlage dieser Studie ist bereits ein Folgeprojekt initiiert, welches einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Plasmaproteinmuster und dem klinischen Ansprechen aufzeigen soll und damit eine Vorhersage über den Behandlungserfolg der einzelnen Patienten zulassen könnte. Die Analyse könnte helfen, pathogenetische Faktoren zu identifizieren und spezifische Adsorbersäulen zu entwickeln, um noch effektiver in die immunologischen Prozesse bei der MS einzugreifen.

5. Zusammenfassung

5.1 Grundlagen

Für den kortikoid- refraktären Schub im Rahmen der MS ist die Indikation zur Eskalationstherapie mittels PE gegeben. Unter der pathophysiologischen Annahme, dass es antikörper- vermittelte Subtypen bei der MS gibt, haben wir in dieser Studie untersucht, ob auch die IA eine Verbesserung der neurologischen Symptome bewirkt.

5.2 Methoden und Ergebnisse

In dieser prospektiven Studie wurden von uns 11 Patienten mit einer Optikusneuritis im Rahmen der MS behandelt, die die Indikation zur Apheresetherapie erfüllten. Insgesamt wurden 5 IA Behandlungen mit einer Tryptophan-beschichteten Adsorbersäule in einem Zeitraum von 9 bis 14 Tagen durchgeführt. Die klinische Aktivität der multiplen Sklerose (Expanded Disability Status Score (EDSS), Incapacity Status Scale (ISS)), Laborparameter (Hämostasiologie, Hämatopoese, Elektrolyte, sIL-R2, Komplementkomponenten, Immunglobuline, Gesamteiweiß) sowie die visuell evozierten Potenziale (VEP) wurden vor, während und nach Beendigung der IA-Behandlung mit einer Nachbeobachtungszeit von 6 Monaten (30 ± 5 , 60 ± 10 und 180 ± 10 Tage nach Beginn der IA) bestimmt. Die Nachbeobachtungszeit wurde bei 10 von 11 Patienten beendet. Aufgetretene Nebenwirkungen wurden dokumentiert und aus den Eluaten der an die Säule gebundenen Eiweiße wurden Proteomanalysen mittels 2D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchgeführt. Der mittlere Visus vor Beginn der IA war $0,12\pm 0,12$. Unter der IA-Behandlung, beginnend mit der dritten IA, zeigte sich eine Zunahme des Visus und eine subjektive Verbesserung der Symptome bei 8 von 11 Patienten. Der Visus stieg signifikant auf $0,36\pm 0,33$ nach der 3. IA ($p=0,02$), $0,49\pm 0,36$ nach der 5. IA ($p<0,01$). Auch in der Nachbeobachtungszeit kam es zu einer weiteren signifikanten Verbesserung auf $0,63\pm 0,36$ an Tag 30 ($p<0,01$), $0,68\pm 0,37$ an Tag 60 ($p<0,01$) und $0,72\pm 0,38$ 6 Monate nach Therapiebeginn ($p<0,01$). Der EDSS- Wert verbesserte sich von $3,95\pm 1,56$ bei Therapiebeginn auf $3,10\pm 2,46$ an Tag 180. Auch der ISS konnte während der Therapie und in der Nachwirkphase reduziert werden ($6,45\pm 8,00$ vs $5,10\pm 6,14$; $p=1,00$). Bei 72% der Patienten konnten wir eine objektive Besserung der Amplitude und Latenz in den VEP's dokumentieren.

Bei zwei Patienten kam es zu moderaten Nebenwirkungen. Einer erlitt eine akute Infektion des Shaldon-Katheters, welche nach Entfernung und antibiotischer Therapie rasch sistierte. Ein anderer Patient erlitt nach Durchführung der 5.IA-Therapien eine Thrombophlebitis der Vena jugularis interna mit erneuter Verschlechterung des Visus. Leichte Nebenwirkungen wie Kältegefühl, Kopfschmerzen und Hypotonie wurden sehr häufig berichtet.

In der Proteomanalyse zeigte sich eine Bindung rheologisch relevanter Proteine und Immunglobuline. Zusätzlich konnten Eiweiße im Eluat nachgewiesen werden, die eine mögliche Rolle in der Pathogenese der multiplen Sklerose spielen könnten.

Es ist zu vermuten, dass die Entfernung von Autoantikörpern, Komplementfaktoren und die immunmodulatorische Wirkung der IA den wichtigsten Wirkmechanismus bei der Verbesserung der Schub-Symptomatik darstellen.

5.3 Schlussfolgerung

Die Immunadsorptionsbehandlung hat bei dem akuten Schub der Multiplen Sklerose mindestens den gleichen Stellenwert wie der etablierte Plasmaaustausch. Hinzu kommt das spezifischere Eingreifen in die immunologischen Prozesse der Pathogenese und der Vorteil, dass dem Patienten die Belastung mit Fremdeiweiß erspart bleibt. Von Interesse wären Folgestudien mit größeren Patientenzahlen zur Etablierung von klinischen Einschlusskriterien und Prognosekriterien bezüglich des Ansprechens auf die Immunadsorption.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitrile
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ALT	Alanin- Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
C3c	Komplementfaktor C3c
C4	Komplementfaktor C4
Ca	Kalzium
CK	Kreatinin- Kinase
CRP	C- reaktives Protein
EDSS	Expanded disability status scale
γ GT	γ - Glutamyltransferase
Hb	Hämoglobin
Hkt	Hämatokrit
IA	Immunadsorption
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IVIG	intravenöse Immunglobuline
ISS	Incapacity status scale
K	Kalium
MAG	Myelin- assoziiertes Glykoprotein
MALDI- TOF	Matrix- unterstützte Laser- Desorption/ Ionisation und Flugzeit des Moleküls
MBP	Myelin- basisches Protein

MEP	motorisch evozierte Potentiale
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
Na	Natrium
PE	Plasmaausstausch
PP-MS	primär- chronisch progredient verlaufende Multiple Sklerose
PR-MS	chronisch- progredient mit einzelnen Schüben verlaufende Multiple Sklerose
pTT	partielle Thromboplastinzeit
RR-MS	schubförmig- remittierend verlaufende Multiple Sklerose
s.c.	subkutan
SDS- PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEP	somatosensibel evozierte Potentiale
sIL- 2R	löslicher Interleukin-2-Rezeptor
SP-MS	sekundäre chronisch progredient verlaufende Multiple Sklerose
TFA	Trifluoressigsäure
VEP	visuell evozierte Potentiale
ZNS	Zentrales Nervensystem
2D- Gelelektrophorese	2-dimensionale Gelelektrophores

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Pathophysiologische Subtypen, modifiziert nach Lassmann (2001), S. 116..	4
Abbildung 2:	Krankheitsverlauf der MS, modifiziert nach Lublin und Reingold (1996), S. 908..	6
Abbildung 3:	EDSS (Mittelwert und Standardabweichung)	26
Abbildung 4:	ISS (Mittelwert und Standardabweichung)	26
Abbildung 5:	Visus des betroffenen Auges (Mittelwert mit Standardabweichung, Signifikanzniveau: *= p≤0,05; **=p≤0,01)	27
Abbildung 6:	Beispiel VEP eines Patienten vor und nach der IA- Behandlung	28
Abbildung 7:	Amplitude betroffenes und nicht- betroffenes Auge im Vergleich (Mittelwert mit Standardabweichung)	29
Abbildung 8:	Leukozyten im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05)	33
Abbildung 9:	Fibrinogen im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05)	33
Abbildung 10:	Immunglobulin A im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05) .	34
Abbildung 11:	Ig G im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05; **=p≤0,01) ...	35
Abbildung 12:	Ig M im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05; **=p≤0,01) ...	35
Abbildung 13:	Komplementfaktoren C3c und C4 im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05; **=p≤0,01)	36
Abbildung 14:	sILR2- Serum Spiegel vor und nach der 1. IA (Mittelwert mit Standardabweichung)	36
Abbildung 15:	sILR2- Serum Spiegel im Verlauf (Mittelwert mit Standardabweichung)	37
Abbildung 16:	Visus- Verlauf Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05; **=p≤0,01)	38
Abbildung 17:	Korrelation zwischen Anzahl der Tage zwischen Symptom- und Therapiebeginn und relativer Visusverbesserung	38
Abbildung 18:	EDSS Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung).....	39
Abbildung 19:	ISS Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: **=p≤0,01)	39
Abbildung 20:	IgA, IgM, IgG und Komplement Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung; Signifikanzniveau: *= p≤0,05; **=p≤0,01)	40
Abbildung 21:	sILR2 Responder vs. Non-Responder (Mittelwert mit Standardabweichung)	41
Abbildung 22:	2D- SDS PAGE Gel (Beispiel: Coomassie)	43

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Prüfplan der IA-Studie	15
Tabelle 2:	Expanded disability status scale nach McDonald und Composton (2005)	16
Tabelle 3:	Incapacity Status Scale (ISS) nach Kurtzke (1981).....	17
Tabelle 4:	Übersicht über die Patientendaten (Mittelwert \pm Standardabweichung; in Klammern die Streuung)	24
Tabelle 5:	Basistherapie der Patienten	25
Tabelle 6:	Latenz des betroffenen Auges (msec)	28
Tabelle 7:	Latenz des nicht- betroffenen Auges (msec)	29
Tabelle 8:	Patientendaten im Verlauf	30
Tabelle 9:	Laborparameter im Verlauf (* signifikant mit $p < 0,05$)	32
Tabelle 10:	leichte Nebenwirkungen der Therapie	42
Tabelle 11:	moderate Nebenwirkungen der Therapie	43
Tabelle 12:	Proteinanalyse mittels MALDI-TOF	45
Tabelle 13:	Zusammenfassung der Studien zum PE mit MS	48
Tabelle 14:	Zusammenfassung der Literatur zur IA bei MS	52

7. Literaturverzeichnis

Aboul- Enein F, Rauschka H, Kornek B, Stadelmann C, Stefferl A, Brück W, Lucchinetti C, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2003): Preferential loss of myelin-associated glycoprotein reflects hypoxia-like white matter damage in stroke and inflammatory brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 25-33

Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, Banwell B (2004): Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA* 291, 1875-9

Banwell B, Krupp L, Kennedy J, Tellier R, Tenembaum S, Ness J, Belman A, Boiko A, Bykova O, Waubant E, Mah JK, Stoian C, Kremenchutzky M, Bardini MR, Ruggieri M, Rensel M, Hahn J, Weinstock-Guttman B, Yeh EA, Farrell K, Freedman M, Iivanainen M, Sevon M, Bhan V, Dilenge ME, Stephens D, Bar-Or A (2007): Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study. *Lancet Neurol* 6, 773-81

Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J (1997): Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 120, 2059-69

Bayas A, Gold R (2003): Lessons from 10 years of interferon beta-1b (Betaferon/Betaseron) treatment. *J Neurol* 250, 3-8

Beck RW, Cleary PA, Trobe JD, Kaufman DI, Kupersmith MJ, Paty DW, Brown CH (1993): The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med* 329, 1764-9

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 72, 248-54

Bramlage CP, Schröder K, Bramlage P, Ahrens K, Zapf A, Müller GA, Koziolok MJ (2009): Predictors of complications in therapeutic plasma exchange. *J Clin Apheresis* 24, 225-31

Brønnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E (2004): Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain* 127, 844-50

Brunner J, Kern PM, Gaipf US, Munoz LE, Voll RE, Kalden JR, Wiesenhutter CW, Herrmann M (2005): The low-throughput protein A adsorber: an immune modulatory device. Hypothesis for the mechanism of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 15, 9-18

Brück W, Stadelmann C (2003): Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 5, 265-7

Callegaro D, de Lolio CA, Radvány J, Tilbery CP, Mendonça RA, Melo AC (1992): Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, in 1990. *Neuroepidemiology* 11, 11-4

- Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Bøddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B (2001): Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis. *Brain* 124, 2169-76
- Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, Sommer N, Hemmer B (2005): Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 115, 1352-60
- Ceuppens, JL, and Baroja, ML (1986): Monoclonal antibodies to the CD5 antigen can provide the necessary second signal for activation of isolated resting T cells by solid-phase-bound OKT3. *J Immunol* 137, 1816-1821
- Clanet M und Berry I (1998): Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 11, 299-303
- Clark D (2004): Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes* 11, Suppl 2:112A-119A
- Cohen SR, Herndon RM, McKhann GM (1976): Myelin basic protein in cerebrospinal fluid as an indicator of active demyelination. *Trans Am Neurol Assoc* 101, 45-7
- Dalton CM, Brex PA, Miszkil KA, Hickman SJ, MacManus DG, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH (2002): Application of the new McDonald criteria to patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 52, 47-53
- Dean G (1967): Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* 2, 724-30
- de Andrés C, Anaya F, Giménez-Roldán S (2000): Plasma immunoadsorption treatment of malignant multiple sclerosis with severe and prolonged relapses. *Rev Neurol* 30, 601-5
- Deutch B, Dyerberg J, Pedersen HS, Aschlund E, Hansen JC (2007): Traditional and modern Greenlandic food - dietary composition, nutrients and contaminants. *Sci Total Environ* 384, 106-19
- Diener HC und Putzki N (eds.) for the German Society of Neurology (2008): Guidelines for Diagnosis and Therapie in neurology (Leitlinien für die Diagnostik und Therapie in der Neurologie). Georg Thieme Publishers, www.dgn.de
- Dihazi H, Müller GA, Lindner S, Meyer M, Asif AR, Oellerich M, Strutz F (2007): Characterization of diabetic nephropathy by urinary proteomic analysis: identification of a processed ubiquitin form as a differentially excreted protein in diabetic nephropathy patients. *Clin Chem* 53, 1636-45
- Dyment DA, Yee IM, Ebers GC, Sadovnick AD (2006): Multiple sclerosis in stepsiblings: recurrence risk and ascertainment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 258-9
- Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T (1986): A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 315, 1638-42
- Ebers GC, Yee IM, Sadovnick AD, Duquette P (2000): Conjugal multiple sclerosis: population-based prevalence and recurrence risks in offspring. *Ann Neurol* 48, 927-31

- Edan G, Morrissey S, Le Page E (2004): Rationale for the use of mitoxantrone in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 223, 35-9
- Fernández O, Fernández V, De Ramón E (2004): Azathioprine and methotrexate in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 223, 29-34
- Friedli WG, Fuhr P (1990): Electrocutaneous reflexes and multimodality evoked potentials in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53, 391-7
- Gaillard PJ, van Der Meide PH, de Boer AG, Breimer DD (2001): Glucocorticoid and type 1 interferon interactions at the blood-brain barrier: relevance for drug therapies for multiple sclerosis. *Neuroreport* 12, 2189-93
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999): Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5, 170-5
- Gold R, Linington C, Lassmann H (2006): Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971.
- Goldammer A, Derfler K, Herkner K, Bradwell AR, Hörl WH, Haas M (2002): Influence of plasma immunoglobulin level on antibody synthesis. *Blood* 100, 353-5
- Goto H, Matsuo H, Nakane S, Izumoto H, Fukudome T, Kambara C, Shibuya N (2001): Plasmapheresis affects T helper type-1/T helper type-2 balance of circulating peripheral lymphocytes. *Ther Apher* 5, 494-6
- Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL (2007): Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 39, 1083-9
- Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Höllsberg P (2004): A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 109, 270-5
- Habek M, Barun B, Purić Z, Brinar VV (2010): Treatment of steroid unresponsive relapse with plasma exchange in aggressive multiple sclerosis. *Ther Apher Dial* 14, 298-302
- Hafler DA, Weiner HL (1995): Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis. *Immunol Rev* 144, 75-107
- Harp CT, Ireland S, Davis LS, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, Stuve O, Lovett-Racke AE, Eagar TN, Greenberg BM, Racke MK, Cowell LG, Karandikar NJ, Frohman EM, Monson NL (2010): Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol* 40, 2942-56
- Hedin A, Olsson K (1984): Letter legibility and the construction of a new visual acuity chart *Ophthalmologica* 189, 147-56

- Hehmke B, Salzsieder E, Matic GB, Winkler RE, Tiess M, Ramlow W (2000): Immunoabsorption of immunoglobulins alters intracytoplasmic type 1 and type 2 T cell cytokine production in patients with refractory autoimmune diseases. *Ther Apher* 4, 296-302
- Hein T, Hopfenmüller W (2000): Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany *Nervenarzt* 71, 288-94
- Hillert J, Käll T, Vrethem M, Fredrikson S, Ohlson M, Olerup O (1994): The HLA-Dw2 haplotype segregates closely with multiple sclerosis in multiplex families. *J Neuroimmunol* 50, 95-100
- Hosokawa S, Oyamaguchi A, Yoshida O (1989): Successful immunoabsorption with membrane plasmapheresis for multiple sclerosis. *ASAIO Trans* 35, 576-7
- Inglese M, Ge Y, Filippi M, Falini A, Grossman RI, Gonen O (2004): Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimage* 21, 1825-9
- Itoyama Y, Sternberger NH, Webster HD, Quarles RH, Cohen SR, Richardson EP Jr. (1980): Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 7, 167-77
- Joyce DA, Steer JH, Abraham LJ (1997): Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF-alpha secretion. *Inflamm Res* 46, 447-51
- June CH, Rabinovitch PS, Ledbetter JA (1987): CD5 antibodies increase intracellular ionized calcium concentration in T cells. *J Immunol* 138, 2782-2792
- Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF (2005): Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 366, 579-82
- Kellogg RM, Hester JP (1988): Kinetics modeling of plasma exchange: intra- and post-plasma exchange. *J Clin Apheresis* 4, 183-7
- Kidd D, Barkhof F, McConnell R, Algra PR, Allen IV (1999): Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 122, 17-26
- Khatri BO, McQuillen MP, Harrington GJ, Schmoll D, Hoffmann RG (1985): Chronic progressive multiple sclerosis: double-blind controlled study of plasmapheresis in patients taking immunosuppressive drugs. *Neurology* 35, 312-9
- Khoury SJ, Guttmann CR, Orav EJ, Kikinis R, Jolesz FA, Weiner HL (2000): Changes in activated T cells in the blood correlate with disease activity in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 57, 1183-9
- Klose J (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243
- Koziolek MJ, Mueller GA (2009): Impact of LDL-Apheresis on inflammation and microcirculation. *Atheroscler Suppl* 10, 56-8

- Kromann N, Green A (1980): Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand* 208, 401-6
- Kuroiwa Y (1982): Clinical and epidemiological aspects of multiple sclerosis in Japan. *Jpn J Med* 21, 35-40
- Kurtzke JF (1981): Initial proposal for a uniform minimal record of disability. *Acta Neurol Scand* 64, 48-51
- Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444-52
- Kurtzke JF, Hyllested K (1979): Multiple sclerosis in the Faroe Islands: I. Clinical and epidemiological features. *Ann Neurol* 5, 6-21
- Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE Jr. (1985): Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS. *Neurology* 35, 672-8
- Kurtzke JF, Hyllested K, Heltberg A, Olsen A (1993): Multiple sclerosis in the Faroe Islands. 5. The occurrence of the fourth epidemic as validation of transmission. *Acta Neurol Scand* 88, 161-73
- Lassmann H (2003): Axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 695-7
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C, Rodriguez M (1997): Remyelination in multiple sclerosis. *Mult Scler* 3, 133-6
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C (2001): Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 7, 115-21
- Leary SM und Thompson AJ (2005): Primary progressive multiple sclerosis: current and future treatment options. *CNS Drugs* 19, 369-76
- Lehmann HC, Hartung HP, Hetzel GR, Stüve O, Kieseier BC (2006): Plasma exchange in neuroimmunological disorders: Part 1: Rationale and treatment of inflammatory central nervous system disorders. *Arch Neurol* 63, 930-5
- Li Q, Nacion K, Bu H, Lin F (2009): The complement inhibitor FUT-175 suppresses T cell autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 175, 661-7
- Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 4, 907-11
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-17
- Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallström E, Khademi M, Oturai A, Ryder LP, Saarela J, Harbo HF, Celius EG, Salter H, Olsson T, Hillert J (2007): Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet* 39, 1108-13

- Marburg O (1906): Die sogenannte „akute multiple Sklerose“ (Encephalomyelitis periaxialis scleroticans). *Jahrb Psychiatr Neurol* 27, 211–312
- Marrosu MG (2007): Susceptibility to multiple sclerosis: the role of interleukin genes. *Lancet Neurol* 6, 846-7
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-7
- Mehta PD (1991): Diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 28, 233-51
- Milanese C, Savoiardo M, La Mantia L, Campi A, Visciani A, Salmaggi A, Tajoli Malesani L (1988): Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: diagnostic value and clinical correlations. *Ital J Neurol Sci* 9, 127-34
- Moldenhauer A, Haas J, Wäscher C, Derfuss T, Hoffmann KT, Kiesewetter H, Salama A (2005): Immunoabsorption patients with multiple sclerosis: an open-label pilot study. *Eur J Clin Invest* 35, 523-30
- Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA (1994): The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* 44, 11-5
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006): Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296, 2832-8
- Mushlin AI, Detsky AS, Phelps CE, O'Connor PW, Kido DK, Kucharczyk W, Giang DW, Mooney C, Tansey CM, Hall WJ (1993): The accuracy of magnetic resonance imaging in patients with suspected multiple sclerosis. The Rochester-Toronto Magnetic Resonance Imaging Study Group. *JAMA* 269, 3146-51
- Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M, Ikeda H, Sakai M (2004): Cytokine adsorptive property of various adsorbents in immunoabsorption columns and a newly developed adsorbent: an in vitro study. *Blood Purif* 22, 530-6
- O' Farrell PH (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021
- Ohji S, Nomura K (2008): The indication of steroid pulse therapy and apheresis therapy for multiple sclerosis. *Nippon Rinsho* 66, 1127-32
- Olerup O, Hillert J (1991): HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1-15
- Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Fundora-Hernández H, Noris-García E, Bu-Coifui-Fanego R, González-Hernández M, Rodríguez-Rey A (2007): C3c intrathecal synthesis evaluation in patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 65, 800-2

- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-67
- Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001): Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389-400
- Pohl D, Waubant E, Banwell B, Chabas D, Chitnis T, Weinstock-Guttman B, Tenenbaum S; International Pediatric MS Study Group (2007): Treatment of pediatric multiple sclerosis and variants. *Neurology* 68, 54-65
- Polman CH, Wolinsky JS, Reingold SC (2005): Multiple sclerosis diagnostic criteria: three years later. *Mult Scler* 11, 5-12
- Ponsonby AL, van der Mei I, Dwyer T, Blizzard L, Taylor B, Kemp A (2005): Birth order, infection in early life, and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 4, 793-4
- Radhakrishnan K, Ashok PP, Sridharan R, Mousa ME (1985): Prevalence and pattern of multiple sclerosis in Benghazi, north-eastern Libya. *J Neurol Sci* 70, 39-46
- Ravnborg M, Liguori R, Christiansen P, Larsson H, Sørensen PS (1992): The diagnostic reliability of magnetically evoked motor potentials in multiple sclerosis. *Neurology* 42, 1296-301
- Rieckmann P, Toyka KV, Bassetti C, Beer K, Beer S, Buettner U, Chofflon M, Götschi-Fuchs M, Hess K, Kappos L, Kesselring J, Goebels N, Ludin HP, Mattle H, Schlupe M, Vaney C, Baumhackl U, Berger T, Deisenhammer F, Fazekas F, Freimüller M, Kollegger H, Kristoferitsch W, Lassmann H, Markut H, Strasser-Fuchs S, Vass K, Altenkirch H, Bamborschke S, Baum K, Benecke R, Brück W, Dommasch D, Elias WG, Gass A, Gehlen W, Haas J, Haferkamp G, Hanefeld F, Hartung HP, Heesen C, Heidenreich F, Heitmann R, Hemmer B, Hense T, Hohlfeld R, Janzen RW, Japp G, Jung S, Jügel E, Koehler J, Kölmel W, König N, Lowitzsch K, Manegold U, Melms A, Mertin J, Oschmann P, Petereit HF, Pette M, Pöhlau D, Pohl D, Poser S, Sailer M, Schmidt S, Schock G, Schulz M, Schwarz S, Seidel D, Sommer N, Stangel M, Stark E, Steinbrecher A, Tumani H, Voltz R, Weber F, Weinrich W, Weissert R, Wiendl H, Wiethölter H, Wildemann U, Zettl UK, Zipp F, Zschenderlein R, Izquierdo G, Kirjazovas A, Packauskas L, Miller D, Koncan Vracko B, Millers A, Orologas A, Panellus M, Sindic CJ, Bratic M, Svraka A, Vella NR, Stelmasiak Z, Selmaj K, Bartosik-Psujik H, Mitosek-Szewczyk K, Belniak E, Mochecka A, Bayas A, Chan A, Flachenecker P, Gold R, Kallmann B, Leussink V, Mäurer M, Ruprecht K, Stoll G, Weilbach FX; Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (2004): Escalating immunotherapy of multiple sclerosis--new aspects and practical application. *J Neurol* 251, 1329-39
- Rithidech KN, Honikel L, Milazzo M, Madigan D, Troxell R, Krupp LB (2009): Protein expression profiles in pediatric multiple sclerosis: potential biomarkers. *Mult Scler* 15, 455-64
- Robertson NP, Clayton D, Fraser M, Deans J, Compston DA (1996): Clinical concordance in sibling pairs with multiple sclerosis. *Neurology* 47, 347-52
- Ruprecht K, Klinker E, Dintelmann T, Rieckmann P, Gold R (2004): Plasma exchange for severe optic neuritis: treatment of 10 patients. *Neurology* 63, 1081-3
- Ryberg B, Pirskanen R (1985): Persistence of antibrain antibodies in cerebrospinal fluid during plasmapheresis for multiple sclerosis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291, 850-1

- Sadovnick AD, Ebers GC, Wilson RW, Paty DW (1992): Life expectancy in patients attending multiple sclerosis clinics. *Neurology* 42, 991-4
- Samtleben W, Blumenstein M, Liebl L, Gurland HJ (1980): Membrane plasma separation for treatment of immunologically mediated diseases. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 26, 12-6
- Sasso EH, Merrill C, Furst TE (2001): Immunoglobulin binding properties of the ProSORBA immunoadsorption column in treatment of rheumatoid arthritis. *Ther Apher* 5, 84-91
- Schilling S, Linker RA, König FB, Koziol M, Bähr M, Müller GA, Paulus W, Gärtner J, Brück W, Chan A, Gold R (2006): Plasma exchange therapy for steroid-unresponsive multiple sclerosis relapses: clinical experience with 16 patients. *Nervenarzt* 77, 430-8
- Schneider M (1996): Plasma- and lymphapheresis in autoimmune diseases. *Z Rheumatol* 55, 90-104
- Schneidewind-Müller JM, Winkler RE, Tiess M, Müller W, Ramlow W (2002): Changes in lymphocytic cluster distribution during extracorporeal immunoabsorption. *Artif Organs* 26, 140-4
- Shemin D, Briggs D, Greenan M (2007): Complications of therapeutic plasma exchange: a prospective study of 1,727 procedures. *J Clin Apher* 22, 270-6
- Spertini F, Stohl W, Ramesh N, Moody C, Geha RS (1991): Induction of human T cell proliferation by a monoclonal antibody to CD5. *J Immunol* 146, 47-52
- Sprenger KB, Rasche H, Franz HE (1984): Membrane plasma separation: complications and monitoring. *Artif Organs* 8, 360-3
- Stangel M, Gold R (2005): Intravenous Immunoglobulins in MS. *Int MS J* 2 12, 5-10
- Storch MK, Piddlesden S, Haltia M, Iivanainen M, Morgan P, Lassmann H (1998): Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Ann Neurol* 43, 465-71
- Stratton CW, Sriram S (2003): Association of Chlamydia pneumoniae with central nervous system disease. *Microbes Infect* 5, 1249-53
- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, Montalban X, De Sá J (1997): Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120, 1085-96
- Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Río J, Díaz-Villoslada P, Brieva L, Borrás C, Grivé E, Capellades J, Montalban X (2000): Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 21, 702-6
- Tintoré M, Rovira A, Río J, Nos C, Grivé E, Sastre-Garriga J, Pericot I, Sánchez E, Comabella M, Montalban X (2003): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: application in first demyelinating episode. *Neurology* 60, 27-30
- Trebst C, Reising A, Kielstein JT, Hafer C, Stangel M (2009): Plasma exchange therapy in steroid-unresponsive relapses in patients with multiple sclerosis. *Blood Purif* 28, 108-15

Uhthoff W (1890): Untersuchungen über die bei der multiplen Herdsklerose vorkommenden Augenstörungen. Arch Psychiatr Nervenkrankh 21, 305–410

van der Mei IA, Ponsonby AL, Dwyer T, Blizzard L, Simmons R, Taylor BV, Butzkueven H, Kilpatrick T (2003): Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study. BMJ 327, 316

Warren KG, Catz I, Ferenczi LZ, Krantz MJ (2006): Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. Eur J Neurol 13, 887-95

Weiner HL, Dau PC, Khatri BO, Petajan J, Birnbaum G, McQuillen MP, Fosburg MT, Feldstein M, Orav J (1990): Double-blind study of true vs. sham plasmapheresis in patients being treated with immunosuppression for acute attacks of multiple sclerosis. Prog Clin Biol 337, 283

Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, Noseworthy JH, Lucchinetti CF, Dodick DW, Pineda AA, Stevens LN, Rodriguez M (1999): A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. Ann Neurol 46, 878-86

Whitaker JN, Lisak RP, Bashir RM, Fitch OH, Seyer JM, Krance R, Lawrence JA, Ch'ien LT, O'Sullivan P (1980): Immunoreactive myelin basic protein in the cerebrospinal fluid in neurological disorders. Ann Neurol 1, 58-64.

Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group (2003): Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12877-82

Wolinsky JS (2006): The use of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. Adv Neurol 98, 273-92

Yetkin FZ, Haughton VM, Papke RA, Fischer ME, Rao SM (1991): Multiple sclerosis: specificity of MR for diagnosis. Radiology 178, 447-51

Yoshii F, Shinohara Y (2000): Lymphocyte subset proportions in Guillain-Barré syndrome patients treated with plasmapheresis. Eur Neurol 44, 162-7

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. M. Koziolk für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas. Seine motivierende und umfassende Betreuung hat maßgeblich zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen. Herr Koziolk war während der gesamten Zeit stets ansprechbar und hilfsbereit. Sein unglaublich schnelles Korrekturlesen spornte mich an, das Ziel beim Schreiben nicht aus den Augen zu verlieren und die Arbeit schnellstmöglich fertigzustellen.

Herrn PD Dr. Kitze möchte ich für die neurologische Unterstützung bei der Erhebung der Patientendaten danken, die einen unentbehrlichen Bestandteil dieser Arbeit darstellen.

Herrn Prof. Dr. Müller danke ich für die Möglichkeit, in der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie zu promovieren. Prof. Dr. Bähr und der gesamten Abteilung Neurologie möchte ich für die Unterstützung und gelungene Kooperation beider Abteilungen danken.

PD Dr. Dihazi, Fatma Agdas und Elke Brunst- Knoblich danke ich für die zuvorkommende Betreuung und hilfreichen Anregungen zur praktischen Durchführung der Labortätigkeiten.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Stationen 1022, 3013 und 3014, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dr. Jung war eine große Hilfe in der statistischen Auswertung der Patientendaten.

Und zuletzt gilt mein Dank meinem zukünftigen Ehemann Björn Tampe für seine Anregungen, die beim Entstehungs- und Vollendungsprozess dieser Arbeit einen wichtigen Teil beigetragen haben. Ohne seine aufopferungsvollen Korrekturen wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit so zügig zum Abschluss zu bringen.

