

Aus der Abteilung Neuroradiologie
(Prof. Dr. med. M. Knauth)
im Zentrum Radiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Magnetresonanztomographie im Therapiemonitoring liposomaler
Glukokortikosteroide in zwei Tiermodellen der Multiplen Sklerose unter
Berücksichtigung von Läsions- und Seitenventrikelgröße sowie
Liquorsignalintensität**

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

vorgelegt von
Dominique Peter Kehrer
aus
Lima/Peru

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Knauth
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Flügel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Übersicht	1
1.2 Liposomale Glukokortikosteroide	2
1.3 Verwendete Tiermodelle der Multiplen Sklerose.....	4
1.4 Magnetresonanztomographie in Diagnostik und Forschung der Multiplen Sklerose	6
1.5 Magnetresonanztomographie im Therapiemonitoring der experimentellen Autoimmunen- zephalyomyelitis.....	6
1.6 Fragestellung.....	7
2. Material und Methoden	8
2.1 Studiendesign.....	8
2.1.1 Liposomale Glukokortikosteroide in der experimentellen Therapie zweier Tiermodelle der Multiplen Sklerose	8
2.1.2 Tiermodelle: Immunisierung und Therapiegruppen	8
2.2 Untersuchungen im Magnetresonanztomographen	9
2.3 Kriterien der Auswertung	11
2.3.1 Auswertung mit Hilfe der Software DicomWorks®.....	11
2.3.2 Auswertungsbeispiele	13
2.3.3 Analyse der Auswertung.....	14
2.3.4 Klinischer Score.....	15
2.3.5 Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung	15
2.4 Statistische Analyse	16
2.4.1 Deskriptive Statistik.....	16
2.4.2 Induktive Statistik	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Anzahl durchgeführter magnetresonanztomographischer Untersuchungen	18
3.2 Ergebnisse zum Tiermodell Dark Agouti.....	18
3.2.1 Anteil Tiere in den Therapiegruppen mit Läsionen in den magnetresonanztomographischen Untersuchungen	18
3.2.2 Anzahl und Größe der Läsionen	19
3.2.3 Verteilung der Läsionen und Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung.....	19
3.2.4 Vergleich der Therapiegruppen deskriptiv.....	20
3.2.5 Korrelation klinischer Score mit Läsionsflächensumme.....	24
3.2.6 Vergleich der Seitenventrikelflächen.....	24
3.2.7 Induktive Statistik zum Vergleich der Therapiegruppen und der Seitenventrikelflächen	25
3.2.8 Liquorgrauwertanalysen: Deskriptiver Vergleich der Liquorgrauwerte und Korrelationen	26
3.2.9 Induktive Statistik zu den Liquorgrauwertanalysen.....	30

3.3 Ergebnisse zum Tiermodell Lewis	31
3.3.1 Anteil Tiere in den Therapiegruppen mit Läsionen in den magnetresonanztomographischen Untersuchungen	31
3.3.2 Anzahl und Größe der Läsionen	32
3.3.3 Verteilung der Läsionen und Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung.....	32
3.3.4 Deskriptiver Vergleich der Therapiegruppen.....	33
3.3.5 Korrelation klinischer Score mit Läsionsflächensumme.....	37
3.3.6 Vergleich der Seitenventrikelflächen.....	37
3.3.7 Induktive Statistik zum Vergleich der Therapiegruppen und der Seitenventrikelflächen	39
3.3.8 Liquorgrauwertanalysen.....	40
4. Diskussion	41
5. Zusammenfassung	54
6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	56
7. Abkürzungsverzeichnis.....	57
8. Literaturverzeichnis.....	58

1. Einleitung

1.1 Übersicht

Hochdosierte Glukokortikosteroide bilden nach wie vor das Standardregime in der Behandlung akuter Schübe der Multiplen Sklerose (MS). Eine neue Therapieoption könnten liposomale Glukokortikosteroide darstellen. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass diese sich gezielt in entzündeten Geweben anreichern und über die so erreichten hohen Zieldosen mittels zusätzlicher nongenomischer Wirkmechanismen eine noch effektivere Unterdrückung inflammatorischer Prozesse hervorrufen.

Zur Erforschung der Wirksamkeit neuer Therapieansätze der MS wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt. Die experimentelle Autoimmunenkephalomyelitis (EAE) in verschiedenen Säugetieren bildet dabei ein etabliertes Tiermodell der MS. Sie führt nach Immunisierung mit Myelinantigenen oder autoreaktiven T-Lymphozyten zu einer akut oder chronisch-rezidivierend verlaufenden, entzündlichen und teils auch demyelinisierenden Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie reflektiert je nach Tier verschiedene Facetten der MS.

Krankheitsaktivität und Therapieerfolg können in diesen Modellen anhand klinischer Scores, wiederholter Körpergewichtsmessungen, histopathologischer Analysen und einer Bildgebung wie der Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht werden. Das pathophysiologische Korrelat der Multiplen Sklerose ebenso wie der EAE-Tiermodelle in der MRT bilden u.a. Läsionen der weißen Substanz. Die qualitative und quantitative Auswertung derselben kann Rückschlüsse auf Krankheitsaktivität und Therapieerfolg erlauben.

In der folgenden Arbeit wurde im Rahmen einer Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit liposomaler Glukokortikosteroide eine quantitative Auswertung von Läsionen in der MRT in zwei EAE-Tiermodellen der MS durchgeführt. Das Untersuchungskollektiv hierfür bildeten 45 Lewisratten und 49 Dark-Agouti (DA)-Ratten, die entweder mit Placebo (reine Liposomen ohne therapeutisches Agens), herkömmlichem Methylprednisolon oder liposomalen Glukokortikosteroiden behandelt wurden. Weiterhin wurden eine Vermessung der Seitenventrikel und ein quantitativer Vergleich der Liquorsignalintensität aller Versuchstiere durchgeführt, da sich aus der Literatur Hinweise für einen Einfluss der Krankheitsaktivität auf diese Parameter ergeben. Die Grundlage der Auswertung bildeten T2-gewichtete MRT-Aufnahmen.

1.2 Liposomale Glukokortikosteroide

Liposomen als Träger für verschiedenste Substanzen wie Chemotherapeutika, Kontrastmittel, Antigene, Immunmodulatoren und Chelatbildner sind seit vielen Jahren bekannt. Aktuelle Therapieansätze werden beispielsweise in der Onkologie verfolgt, in der man sich die Fähigkeit der Liposomen, sich gezielt in Tumoren anzureichern, zu Nutze macht (Soloman und Gabizon 2008).

Die am besten untersuchten Liposomen sind die so genannten lang zirkulierenden Polyethylenglykol (PEG)-Liposomen. Ihre lange Halbwertszeit von bis zu 50 Stunden im menschlichen Organismus (Gabizon et al. 1994) und ihre Fähigkeit, sich gezielt in entzündeten Geweben anzureichern (Laverman et al. 1999, Dams et al. 2000), machen sie zu interessanten Alternativen in der Behandlung entzündlicher Erkrankungen. Somit bieten sie sich beispielsweise als Träger für Glukokortikosteroide in Erkrankungen wie der MS an.

Langzirkulierende PEG-Liposomen mit Glukokortikosteroiden sind wie folgt aufgebaut: In einer Hülle, bestehend aus einer Phospholipiddoppelschicht und Polyethylenglykol, wird Prednisolon bzw. Methylprednisolon eingeschlossen (Abbildung 1). In der vorliegenden Arbeit wurden dafür PEG-Liposomen mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm verwendet, da die Größe der Liposomen Einfluss auf ihre pharmakokinetischen Eigenschaften hat (Senior und Gregoriadis 1982, Senior 1987).

1. Einleitung

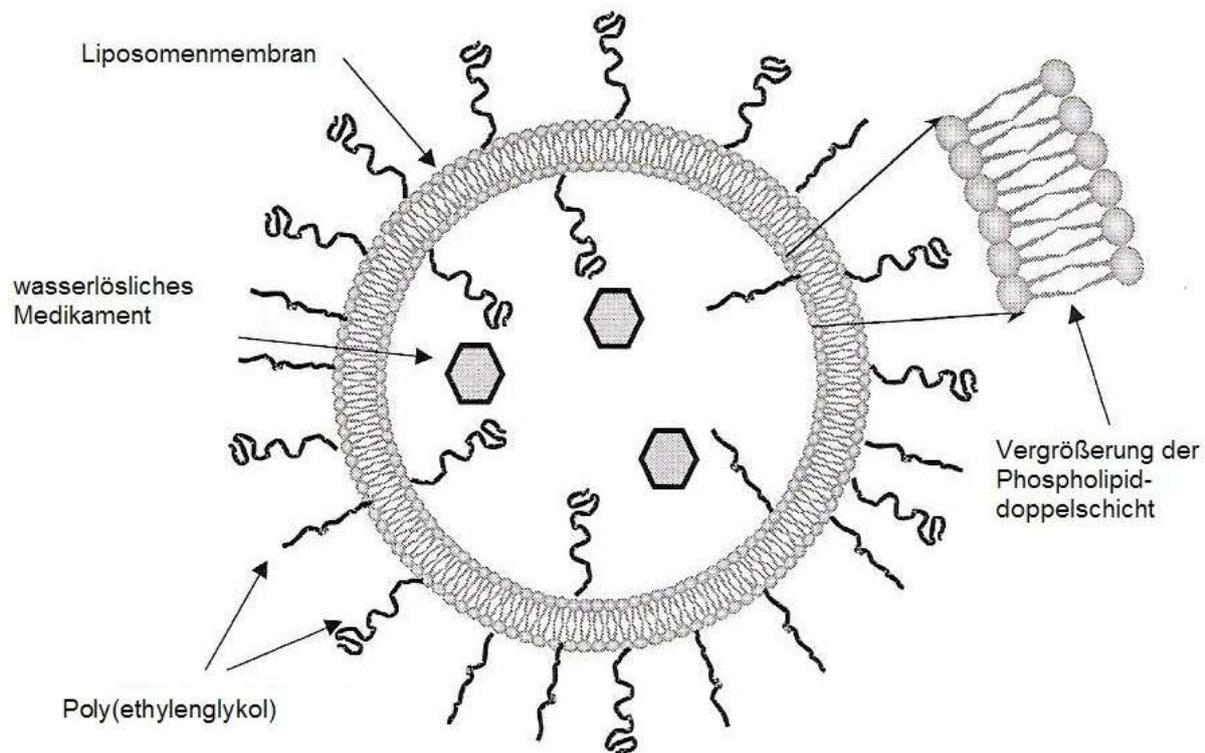


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Medikamenten enthaltenden, lang zirkulierenden PEG-Liposoms

Glukokortikosteroide in lang zirkulierenden PEG-Liposomen zeigten in vorangegangenen Arbeiten gegenüber herkömmlichen Glukokortikosteroiden pharmakokinetische Vorteile, indem sie eine längere Halbwertszeit im Blut aufwiesen und sich besonders in entzündeten Geweben anreicherten (Schmidt et al. 2003 b, Metselaar et al. 2004, Schiffelers et al. 2006). Hier wurde somit eine hohe lokale Wirkkonzentration erreicht, ohne dass sich die Rate unerwünschter Nebenwirkungen erhöhte (Schmidt et al. 2003 b). Metselaar et al. (2003) demonstrierten, dass nach einer einmaligen Injektion von Prednisolonliposomen in einer experimentell ausgelösten Arthritis einer Ratte eine komplette Unterdrückung der Entzündung für fast eine Woche erreicht werden konnte.

Es wurde postuliert, dass hohe Zielkonzentrationen von Glukokortikosteroiden zu zusätzlichen Wirkmechanismen führen. So binden niedrig- bis mittelstark dosierte Glukokortikosteroide an einen zytosolischen Steroidrezeptor von Immunzellen, um so ihre immunsuppressive Wirkung nach einer Latenz von etwa 30 Minuten zu entfalten. Diese genomische Wirkweise von Glukokortikosteroiden (Boumpas et al. 1993, Barnes und Adcock 1993, Barnes und Karin 1997) steht im Gegensatz zur nongenomischen Wirkweise, die sich zusätzlich bei hoher und ultrahoher Dosierung entfaltet: ein membrangebundener Steroidrezeptor könnte die immunsuppressive Wirkung, die innerhalb von Minuten eintritt,

1. Einleitung

erklären (so genannte spezifische nongenomische Wirkweise, Wehling 1997). Zusätzlich vermutet man eine direkte Interaktion der Glukokortikosteroide mit der Zellmembran, die innerhalb von Sekunden ihre Wirkung entfaltet (so genannte unspezifische nongenomische Wirkweise, Buttgerit et al. 1998).

Hohe Wirkstoffkonzentrationen von Glukokortikosteroiden am Ort der Entzündung führten in einer Arbeit von Schmidt et al. (2000) zu einer raschen Immunsuppression, indem sie die Apoptose von Immunzellen, insbesondere der T-Lymphozyten, in einem EAE-Tiermodell vermehrt induzierten. Diese Apoptosen werden als wesentlicher Mechanismus in antiinflammatorischen Prozessen beim EAE-Tiermodell der Lewisratte angesehen (Pender et al. 1991). In weiteren Arbeiten erkannten Schmidt et al. (2003 a, 2003 b), dass EAE-Ratten, die mit liposomalen Glukokortikosteroiden behandelt wurden, signifikant weniger Tumornekrosefaktor-alpha-positive T-Lymphozyten aufwiesen. Gegenüber EAE-Ratten, die mit einer fünffach höheren Dosierung von Methylprednisolon behandelt wurden, konnte bei EAE-Ratten, die mit Prednisolonliposomen behandelt wurden, eine Überlegenheit dieser Therapie bezüglich Verringerung der Bluthirnschrankenstörung, T-Lymphozytenapoptosen und Reduktion von zellulären Infiltraten, insbesondere der Makrophagen, beobachtet werden. Eine einmalige Injektion von Prednisolonliposomen führte zu einer deutlichen klinischen Besserung der EAE. Somit ergeben sich im Tiermodell Hinweise auf zusätzliche pharmakodynamische Vorteile liposomaler Glukokortikosteroide gegenüber herkömmlichen Glukokortikosteroiden.

1.3 Verwendete Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Die experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis dient bei verschiedenen Säugetieren als Tiermodell der MS, darunter Affen, Schweine, Mäuse und Ratten.

Die Wirksamkeit von liposomalen Glukokortikosteroiden wurde in der vorliegenden Arbeit an zwei Tiermodellen untersucht. Die EAE der Lewisratte und der Dark-Agouti-Ratte spiegeln verschiedene Aspekte der pathophysiologischen Mechanismen der MS wider (Gold et al. 2000).

Man unterscheidet aktiv immunisierte Ratten, die nach Gabe von Myelinantigenen erkranken, von passiv immunisierten Ratten, die nach Gabe von in vitro erstellten autoreaktiven T-Lymphozyten eine EAE entwickeln. Abhängig von Injektionsart, Tierrasse und verabreichtem

1. Einleitung

krankheitserzeugenden Antigen kann eine akute oder chronische Form der EAE beobachtet werden.

Die in dieser Arbeit verwendete EAE der Lewisratte nimmt einen monophasischen Verlauf, d.h. nur ein Schub wird durchlaufen. Die mit Myelin-basischem Protein (MBP) aktiv induzierte EAE der Lewisratte erreicht etwa 15 Tage nach Immunisierung den Höhepunkt der Krankheitsausprägung. Pathophysiologisch findet sich eine ausgeprägte T-Lymphozyteninfiltration in das Hirngewebe, die zu einem axonalen Schaden und sekundärer, meist nur gering ausgeprägter, Demyelinisierung führt. Eine Autoantikörpersynthese gegen neuronale Strukturen findet nur in geringem Maße statt (Gold et al. 2000). Klinisch finden sich unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome, die vom Verlust des Schwanztonus bis zu Tetraplegie und Tod reichen. Zudem kommt es in den meisten Fällen zu einer Gewichtsabnahme. Versterben die Tiere nicht im akuten Schub, heilt die EAE aus.

Die EAE der Dark-Agouti (DA)-Ratte kann dagegen einen mehrphasischen Verlauf mit rezidivierenden Schüben nehmen. Nach aktiver Immunisierung mit dem Myelinoligodendrozytenglykoprotein (MOG), welches für diese Studie verwendet wurde, wird der Höhepunkt der Erkrankung nach etwa 15 Tagen erreicht. Nach einer Remission können 2-3 weitere Schübe durchlaufen werden, die an Schwere zunehmen. Neben diesem rezidivierenden Verlauf weist auch die Histopathologie Ähnlichkeiten zur menschlichen MS auf. So kann der N.opticus betroffen sein und der axonale Schaden ist mit dem der MS vergleichbar (Gold et al. 2000, Gold et al. 2006).

Kritisiert wurde an der EAE, dass sie keine spontane Erkrankung darstellt, eine Demyelinisierung nicht in allen Tieren zu beobachten ist und der zeitliche Verlauf sowie die Heterogenität der MS nicht wiedergespiegelt wird. Positive therapeutische Effekte scheinen bei der EAE leichter erreichbar zu sein und werden nur inkonstant in klinischen Studien zur MS reproduziert (Friese et al. 2006).

1.4 Magnetresonanztomographie in Diagnostik und Forschung der Multiplen Sklerose

Die konventionelle MRT (T1-, T2-, FLAIR- und postkontrast-T1-gewichtete Sequenzen) gilt nicht nur als wichtigste paraklinisch eingesetzte Untersuchung in der MS-Diagnostik (McDonald et al. 2001), sondern hat auch einen sehr wichtigen Stellenwert in der MS-Forschung (Bermel et al. 2008). So konnten durch MRT-Studien Unterschiede klinischer MS-Verläufe (primär schubförmig, primär und sekundär chronisch progredient) herausgearbeitet werden (Lycklama à Nijeholt und Barkhof 2003). Die MRT hat sich als „wesentlicher Parameter erwiesen, um zusätzliche Aussagen über klinisch inapparente Wirkmechanismen der Therapie zu erhalten“ (Gold und Rieckmann 2004, S.72).

Über die Größe und Anzahl kernspintomographisch nachgewiesener Läsionen kann die Effizienz medikamentöser Therapien unabhängig von klinisch fassbaren Symptomen überprüft werden (Kappos et al. 1988, Paty et al. 1992). So konnte für schubprophylaktische Medikamente wie Beta-Interferone eine Reduktion der kernspintomographisch nachgewiesenen Krankheitsaktivität zwischen 50 und 80% beobachtet werden (Gold und Rieckmann 2004). Demgegenüber steht jedoch eine nur schwache Korrelation des Ausmaßes der kernspintomographisch nachgewiesenen Läsionslast und der klinischen Manifestation der MS (Kappos et al. 1999, Filippi et al. 2002 a). Dies erklärt man sich zum Teil mit der nur eingeschränkten Fähigkeit der MRT, Informationen zu zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozessen zu liefern (Filippi et al. 2002 b). Beispielsweise steht der Erkenntnis, dass der Demyelinisierung heterogene Mechanismen zu Grunde liegen und sich dadurch neue Implikationen für Diagnostik und Therapie ergeben könnten (Lucchinetti et al. 2000), eine noch mangelnde Spezifität der MRT gegenüber (Inglese et al. 2005). Modernere MRT-Techniken wie „Magnetization transfer imaging“ (MTI), diffusionsgewichtete Sequenzen sowie funktionelle MRT (fMRT) können einen Beitrag zu spezifischeren Erkenntnissen leisten (Yousry et al. 1998, Filippi et al. 1999, Inglese und Bester 2010).

1.5 Magnetresonanztomographie im Therapiemonitoring der experimentellen

Autoimmunenenzephalomyelitis

Die MRT wird auf verschiedene Weise in der Beobachtung von Krankheitsaktivität und Therapieerfolg in EAE-Modellen eingesetzt. So wurden beispielsweise Bluthirnschrankenstörungen mittels Gadoliniumanreicherung in T1-gewichteten Aufnahmen untersucht (Hawkins et al. 1991, Namer et al. 1993). Makrophageninfiltration konnte mittels ultrakleiner Eisenoxidpartikel dargestellt werden (Dousset et al. 1999, Rausch et al. 2003,

1. Einleitung

Floris et al. 2004). Weitere diagnostische Möglichkeiten ergaben sich durch den Einsatz von „Magnetization transfer ratio/imaging“ (MTR/MTI), beispielsweise in Arbeiten von Dousset et al. (1992) und Deloire-Grassin et al. (2000), und diffusionsgewichteter Aufnahmen (Verhoye et al. 1996). Aber auch konventionelle T1- und T2-gewichtete Aufnahmen dienten in zahlreichen Arbeiten der Untersuchung von Läsionen (u.a. Stewart et al. 1985, Karlik et al. 1989, Nessler et al. 2007).

Im Monitoring der Krankheitsaktivität in EAE-Tiermodellen haben sich T2-gewichtete MRT-Aufnahmen in vorangegangenen Arbeiten als sensitiv erwiesen: Jordan et al. (1999) und Hart et al. (1998) zeigten für eine EAE bei Affen, dass die mit der MRT gemessene Läsionslast eine gute Korrelation mit der histopathologischen Läsionslast aufweist. Die MRT bietet die Möglichkeit, sogenannte stille Läsionen abzubilden. Dies erhöht die Sensitivität, auch im Tiermodell positive therapeutische Effekte nachzuweisen (Jordan et al. 1999).

Namer et al. (1993) und Morrissey et al. (1996) setzten die MRT bei EAE-Lewisratten in Kombination mit histopathologischen Untersuchungen in der Darstellung pathophysiologischer Mechanismen ein. Karlik et al. (1999) und Duckers et al. (1997) wendeten die MRT in kleineren Kollektiven von EAE-Lewisratten erfolgreich im Therapiemonitoring an. Heckl et al. (2004) und Brochet et al. (2006) untersuchten die Darstellung von Läsionen in der MRT beim EAE-Tiermodell DA. Duckers et al. (1997) beschrieben signalveränderte Ventrikel in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen in einer chronischen Form der EAE der Lewisratte im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe. Histologisch zeigten sich in dieser Arbeit bei den erkrankten Tieren vergrößerte Ventrikel. Karlik et al. (1999) beobachteten in einer akuten Form der EAE der Lewisratte vergrößerte Ventrikel der nicht therapierten Tiere in postkontrast-T1-gewichteten Aufnahmen.

1.6 Fragestellung

In dieser Arbeit wird einerseits untersucht, ob die Wirksamkeit von liposomalen Glukokortikosteroiden, gegenüber einer Standardtherapie- und Placebotiergruppe, anhand einer Auswertung magnetresonanztomographischer Aufnahmen des kraniellen zentralen Nervensystems zweier Tiermodelle der MS, gezeigt werden kann. Andererseits wird der Frage nachgegangen, inwieweit die Krankheitsaktivität der EAE Einfluss auf die Größe der Seitenventrikel und die Liquorsignalintensität in der MRT hat, und ob diese ggf. somit als zusätzliche Parameter im Therapiemonitoring eingesetzt werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

2.1.1 Liposomale Glukokortikosteroide in der experimentellen Therapie zweier

Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Die Studie „Die zielgerichtete Wirkweise von lang zirkulierenden liposomalen Glukokortikosteroiden und ihre therapeutische Effizienz in Tiermodellen der Multiplen Sklerose“ wurde durch das Multiple-Sklerose (MS)-Forschungsinstitut der Universität Göttingen und der gemeinnützigen Hertie-Stiftung unter Führung von Prof. Dr. R. Gold durchgeführt. Ziel war es, die aus einer vorangegangenen Arbeit (Schmidt et al. 2003 b) ermittelte therapeutische Effizienz liposomaler Glukokortikosteroide am Ort der Entzündung zu maximieren und systemische Nebenwirkungen in einem akuten und chronischen EAE-Tiermodell zu minimieren. Dazu wurden Prednisolon und Methylprednisolon in PEG-Liposomen in jeweils zwei verschiedenen Dosierungen untersucht.

Prof. Dr. R. Gold und Assistenten führten die Immunisierung der EAE-Ratten, die Beobachtung des Krankheitsverlaufes anhand eines klinischen Scores, Gewichtsmessungen, die experimentellen Therapien und die histopathologischen Auswertungen durch. Die MRT-Untersuchungen wurden an einem 1,5-Tesla-Gerät (Gyrosan NT, Philips, Niederlande) der Abteilung Neuroradiologie des Universitätsklinikums Göttingen unter Leitung von Prof. Dr. M. Knauth und Dr. A. Mohr durchgeführt.

2.1.2 Tiermodelle: Immunisierung und Therapiegruppen

Sowohl für das Lewis- als auch für das DA-Tiermodell wurden 10-12 Wochen alte, weibliche Ratten am Ausgangstag immunisiert (Tag 1). Die Versuchstiere entstammten dem Harlan-Labor, Borchon, Deutschland.

Die EAE der Lewis-Ratte wurde am Ausgangstag durch eine subkutane (s.c.) Gabe von 75 µg Myelin-basischem Protein (MBP) aus Meerschweinchen und 75 µg vollständiger Freund'scher Adjuvans (Complete Freund's adjuvans, CFA) ausgelöst. Die Tiere wurden täglich gewogen und das Krankheitsausmaß anhand eines klinischen Scores bewertet. Zu Beginn des Krankheitsgipfels (um Tag 11) wurde die Therapie durchgeführt. Die Placebogruppe erhielt PEG-Liposomen, die lediglich phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) enthielten. Die Standardtherapiegruppe erhielt Methylprednisolon (Urbason soluble®),

2. Material und Methoden

Aventis, Frankfurt, Deutschland) in fraktionierter Dosierung, d.h. an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils einmal 50 mg/kg Körpergewicht (KG, MP50). Der Verumtherapiegruppe wurden einmalig entweder Prednisolonliposomen (PL) oder Methylprednisolonliposomen (MPL) in den Dosierungen 4 oder 10 mg/kg KG in PEG-Liposomen verabreicht (Tabelle 1). Am Krankheitsgipfel (um Tag 15) wurden die Tiere einmalig im MRT untersucht. Mit einer Latenz von einem Tag wurden die Tiere für die histopathologischen Untersuchungen getötet.

Die DA-Ratten wurden am Tag 1 mit 30-50 µg rekombinantem Myelinoligodendrozytenglykoprotein (MOG)-Antigen und 50 µg CFA immunisiert. Die Tiere wurden ebenfalls täglich gewogen und anhand desselben klinischen Scores beurteilt. Am Tag 10 bzw. 11 wurden die Tiere therapiert und um Tag 16 im MRT untersucht. Die Therapie der Verumtherapiegruppe bestand aus PEG-Prednisolonliposomen in der Dosierung 10 mg/kg KG (PL10). Die Standardtherapiegruppe erhielt an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils 10 mg/kg KG Methylprednisolon (MP10). Die Placebogruppe erhielt PEG-Liposomen, die wiederum PBS enthielten (Tabelle1).

Therapie	Abkürzung	Gruppe	Applikationsform
Phosphatgepufferte Salzlösung in PEG-Liposomen	PBS	Placebo	einmalig s.c.
Methylprednisolon 100 mg	MP50	Standard	an 2 Tagen jeweils 50 mg/kg KG s.c.
Methylprednisolon 30 mg	MP10	Standard	an 3 Tagen jeweils 10 mg/kg KG s.c.
Methylprednisolon PEG-Liposomen 4 mg/kg KG	MPL4	Verum	einmalig 4 mg/kg KG s.c.
Methylprednisolon PEG-Liposomen 10 mg/kg KG	MPL10	Verum	einmalig 10 mg/kg KG s.c.
Prednisolon PEG-Liposomen 4 mg/kg KG	PL4	Verum	einmalig 4 mg/kg KG s.c.
Prednisolon PEG-Liposomen 10 mg/kg KG	PL10	Verum	einmalig 10 mg/kg KG s.c.

Tabelle 1: Dosierung und Applikationsform der Therapie

2.2 Untersuchungen im Magnetresonanztomographen

Insgesamt wurden 45 Lewis- und 49 DA-Ratten im MRT untersucht. Die größte Therapiegruppe bildeten die Verumtherapietiere in der PL10-Dosierung (Lewis: 12 Tiere, DA: 18). Es wurde ein dosisabhängiger Effekt der liposomalen Glukokortikosteroide vermutet. Zusätzlich wies liposomales Prednisolon herstellungstechnisch Vorteile gegenüber liposomalem Methylprednisolon auf, so dass diese Dosierung am häufigsten verwendet

2. Material und Methoden

wurde. Weiterhin wurden 3 Lewisratten mit der MPL10-Dosierung und jeweils 8 Lewisratten mit der MPL4- bzw. PL4-Dosierung therapiert.

Mit der Standardtherapie wurden 8 Lewis- und 15 DA-Ratten behandelt.

Die Placebogruppen bildeten 6 Lewis- und 16 DA-Ratten (Abb. 2 und 3).

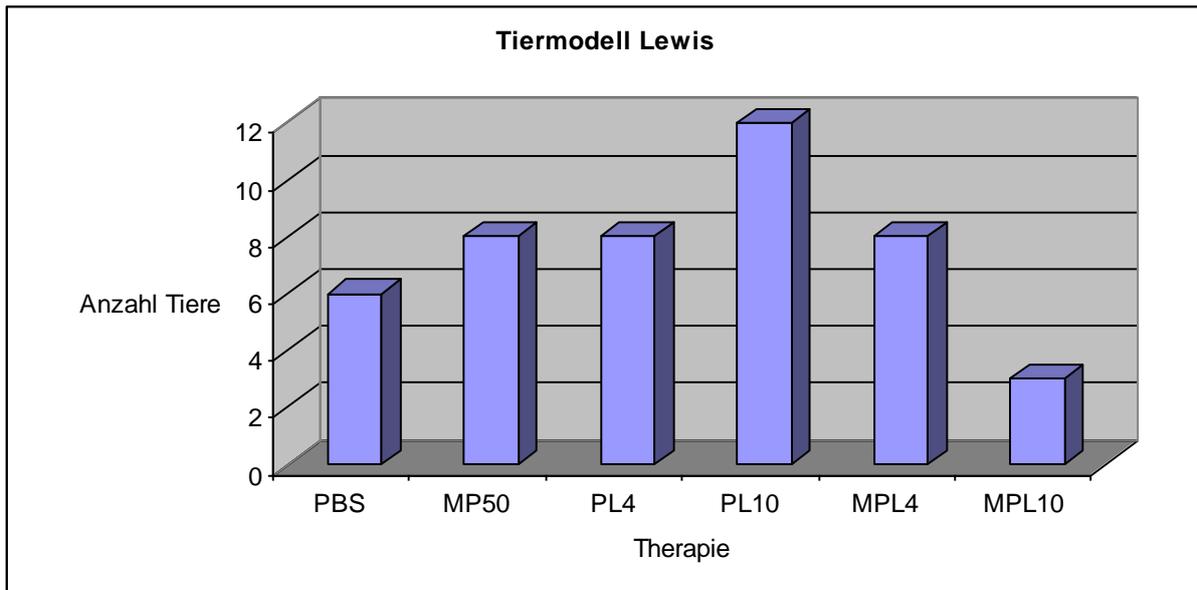


Abbildung 2: Anzahl Tiere in jeder Therapiegruppe im MRT beim Tiermodell Lewis (n=45)

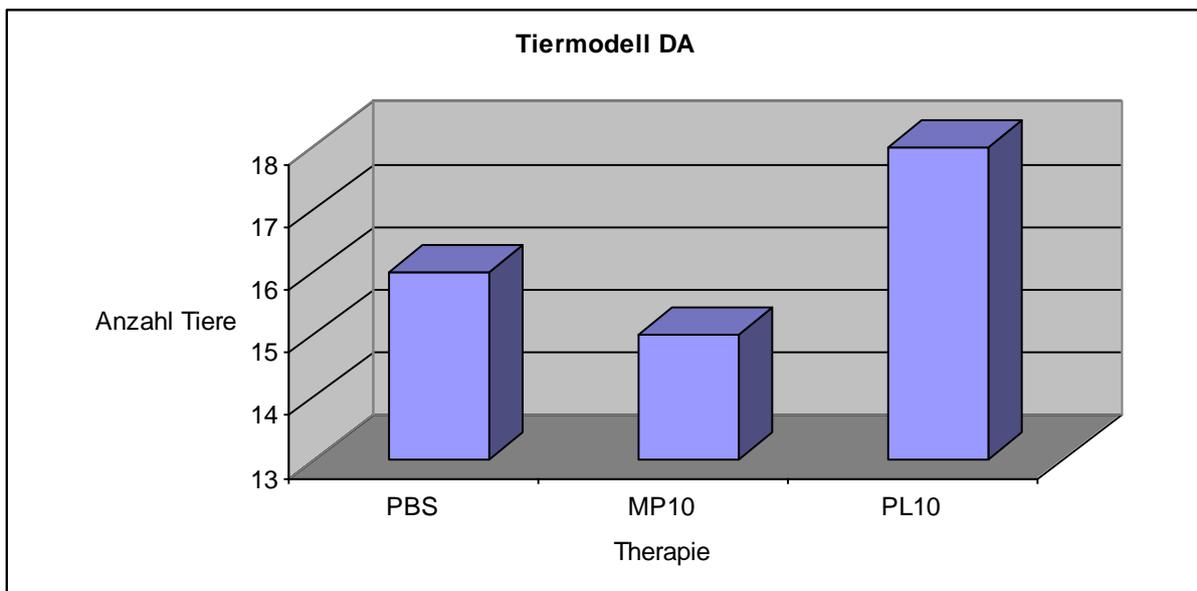


Abbildung 3: Anzahl Tiere in jeder Therapiegruppe im MRT beim Tiermodell DA (n=49)

Nach einer intraperitonealen Ketamin- (100 mg/kg KG Ketanest®, WTD, Garbsen, Deutschland) und Xylazininjektion (10 mg/kg KG Rompun®, Bayer, Leverkusen,

Deutschland) wurde jeweils eine Ratte im MRT untersucht. Dazu wurde sie rücklings in einer 23-mm-Oberflächenspule (Microscopy surface coil, Philips, Niederlande) auf dem Untersuchungstisch fixiert. Standardmäßig wurde eine T2-gewichtete Sequenz (Time to repeat (TR): 2051-2548 millisekunden (ms), Time to echo (TE): 100-120 ms, Field of view (FOV): 60 mm, Matrix: 176 x 176) mit einer Schichtdicke von 1,5 mm verwendet. Standardmäßig wurden koronare, in Einzelfällen auch sagittale, Aufnahmen mit 20 Schnittbildern angefertigt. Dargestellt wurden Cerebrum, Cerebellum und Hirnstamm. Eine vergleichbare Erfassung von Rückenmarkanteilen konnte jedoch nicht erreicht werden.

Wurden in der ersten Aufnahme Bewegungsartefakte festgestellt, erhielt die Ratte eine Ketaminnachinjektion, um dann die Aufnahmen erneut durchzuführen. Zeigten sich bei der ersten Begutachtung der Bilder deutliche Läsionen, wurde bei einigen Tieren zusätzlich eine T1-gewichtete Sequenz (Schichtdicke: 1,5 mm, TR: 550-663 ms, TE: 15-16 ms, FOV: 100 mm, Matrix: 256 x 128) angefertigt. In Einzelfällen wurden zusätzlich auch Aufnahmen mit Kontrastmittel (0,2 mmol/kg KG Magnevist®, Schering, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

2.3 Kriterien der Auswertung

2.3.1 Auswertung mit Hilfe der Software DicomWorks®

Die Auswertung der MRT-Aufnahmen erfolgte mit dem Programm DicomWorks®, Version 1.3.5. Der Auswerter war bezüglich der Therapie verblindet. Bei Mehrfachaufnahmen wurde zunächst die T2-gewichtete Sequenz mit der besten Qualität identifiziert. In den T2-gewichteten Schnittbildern wurde die Erkennung von Läsionen durch folgende Merkmale ermöglicht:

- Asymmetrien im Vergleich des Hirnparenchyms beider Hemisphären
- signalintensive Bereiche
- in typischen, immer wieder auftretenden Lokalisationen.

Die Fläche der so erkannten Läsionen wurde mit Hilfe der DicomWorks®-Funktion „Oberfläche“ ausgemessen, in mm² ausgedrückt und zusammen mit der anatomischen Lage notiert. Wurden zusätzlich T1-gewichtete Aufnahmen mit oder ohne Kontrastmittel erstellt, wurde überprüft, ob Läsionen dort ebenfalls sichtbar waren. Eine erneute Vermessung wurde dagegen nicht durchgeführt.

Läsionen in der MRT gingen oft mit vergrößerten und signalintensiven Seitenventrikeln einher. Um diesen in der Literatur erwähnten Zusammenhang weiter zu untersuchen, wurden zunächst vergleichbare Schichten in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen, in denen sich die Seitenventrikel am größten und deutlichsten darstellten, identifiziert. Die Flächen beider Seitenventrikel wurden dann bei allen Tieren ebenfalls mit der Funktion „Oberfläche“ ausgemessen. Methodenbedingt ist eine unwissentliche Mitvermessung von periventrikulären Läsionen denkbar. In diesen Fällen könnten die Läsionen, aufgrund ihrer mutmaßlich ähnlichen Signalcharakteristik, nicht sicher abgrenzbar und somit unerkannt geblieben sein. In Bezug auf das ermittelte Messergebnis ist die tatsächliche Größe des Seitenventrikels bei der beschriebenen Konstellation als geringer anzunehmen.

Um die Liquorsignalintensität von Tieren mit Läsionen gegenüber Tieren ohne Läsionen zu vergleichen, wurde bei allen Ratten an fünf definierten Punkten in T2-gewichteten Aufnahmen, mithilfe der Funktion „Punkt“, die Signalintensität innerhalb eines dem Liquor zuzuordnenden Volumenelements (Voxel) gemessen:

- im 3. Ventrikel
- jeweils an einem Punkt in den Seitenventrikeln frontal
- jeweils an einem Punkt in den Seitenventrikeln dorsal.

Um die so ermittelten Messwerte der Liquorgrauwerte interindividuell vergleichen zu können und von methodenbedingten Abweichungen unbeeinflusst zu lassen, erfolgte die Bildung eines Quotienten (so genannter Liquorquotient). Dieser errechnete sich aus dem Mittelwert der Liquorgrauwerte an den verschiedenen Messpunkten und dem Mittelwert von Grauwerten an zwei definierten, läsionsfreien Regionen. Diese waren jeweils lokalisiert an anatomisch gleicher Position in einer Hemisphäre lateral der Seitenventrikel.

Wie schon bei der Größenberechnung der Seitenventrikel ist folgende Einschränkung der angewandten Methode denkbar: Es ist nicht auszuschließen, dass eine Signalmessung innerhalb eines vermeintlich dem Liquor zuzuordnenden Volumenelements tatsächlich im Bereich einer unerkannten periventrikulären Läsion erfolgte.

2.3.2 Auswertungsbeispiele

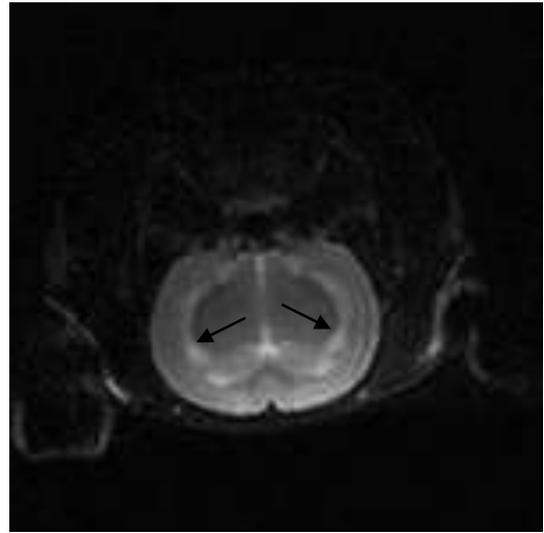
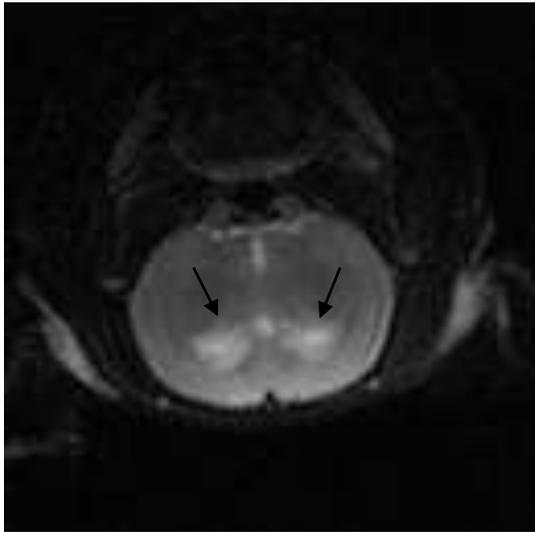


Abbildung 4: Läsionen beidseits in T2-gewichteten Aufnahmen, EAE-Tiermodell Lewis

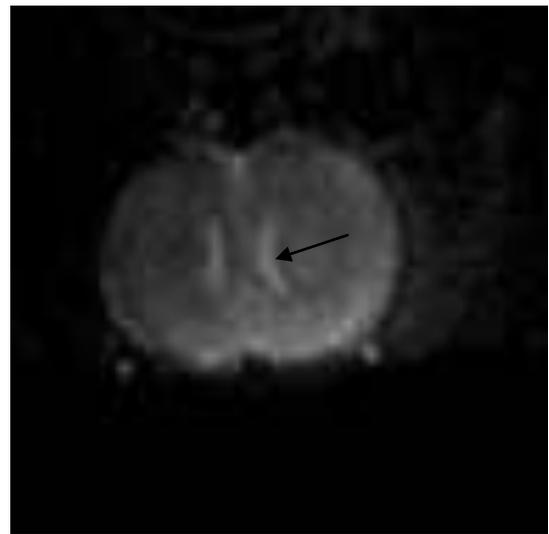
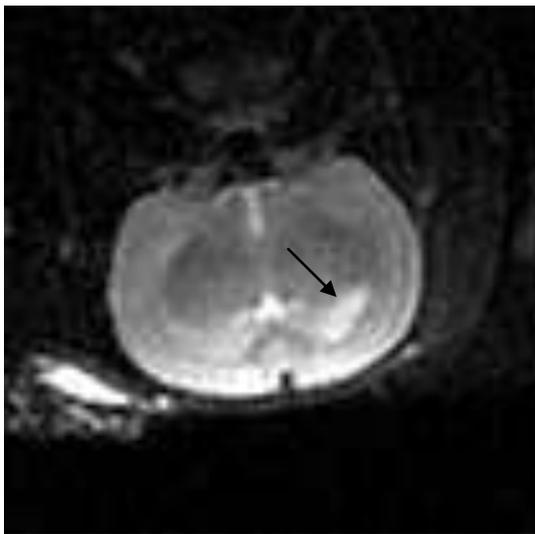


Abbildung 5: Linkes Bild: Läsion linkshemisphärisch. Rechtes Bild: prominenter linker Seitenventrikel. T2-gewichtete Aufnahmen, EAE-Tiermodell DA

2. Material und Methoden

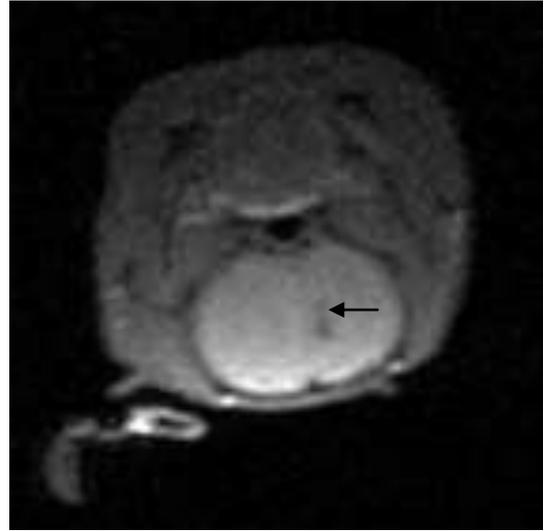
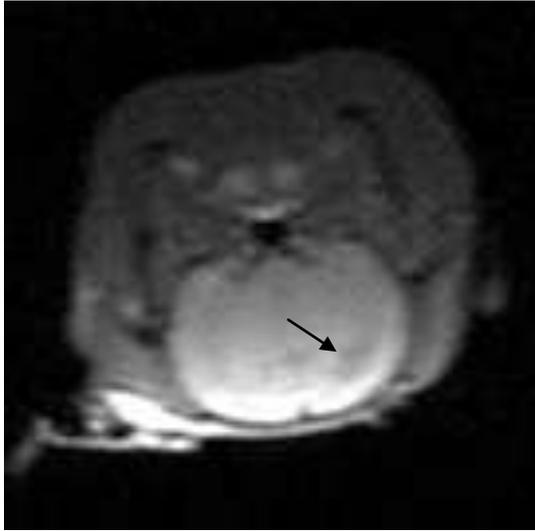


Abbildung 6: Linkes Bild: Läsion linkshemisphärisch. Rechtes Bild: prominenter linker Seitenventrikel. T1-gewichtete Aufnahmen, EAE-DA-Ratte

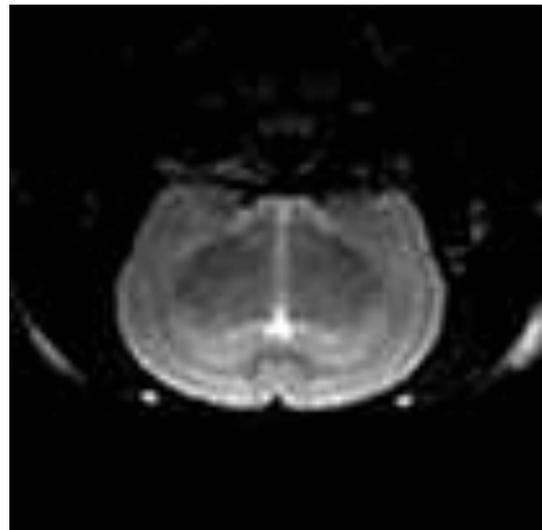
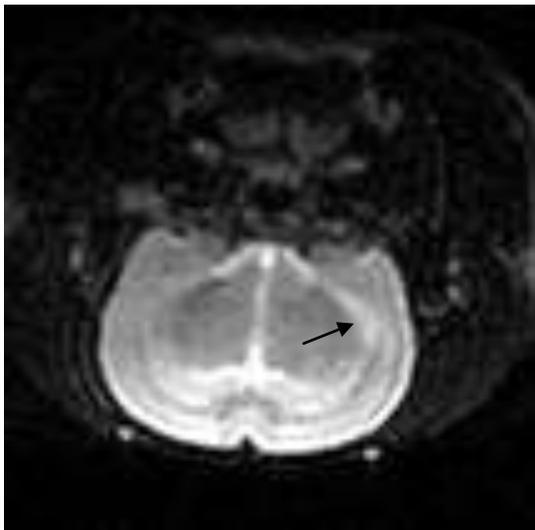


Abbildung 7: Linkes Bild: kleine Läsion linkshemisphärisch. Rechtes Bild: Tier ohne pathologischen Befund. T2-gewichtete Aufnahmen, EAE-Tiermodell DA

2.3.3 Analyse der Auswertung

Zunächst wurden Lage und Fläche der Läsionen deskriptiv tabellarisch zusammengefasst. Dann wurden die Läsionsflächen für die einzelnen Tiere in einer Gesamtsumme (Läsionsflächensumme) ausgedrückt, um ausgehend vom radiologischen Befund ein Maß für die Ausprägung der Erkrankung zu erhalten.

2.3.4 Klinischer Score

Neben den MRT-Untersuchungen wurden die Schwere der Erkrankung bzw. der Therapieerfolg anhand eines klinischen Scores untersucht. Die klinische Abstufung erfolgte wie nachstehend aufgeführt (nach Linker et al. 2002):

- 0: gesund
- 1: reduzierter Schwanztonus
- 2: Schwanz nachziehend
- 3: abwesender berichtigender Reflex
- 4: Gangataxie
- 5: leichte Paraparese
- 6: moderate Paraparese
- 7: schwere Paraparese/Paraplegie
- 8: Tetraparese
- 9: Moribund
- 10: Tod.

2.3.5 Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung

Um bei der Ausprägung der Erkrankung sowohl radiologische (Läsionsflächensumme) als auch klinische Befunde (Score) zu berücksichtigen, wurden die Ratten beider Tiermodelle jeweils in drei Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1 (gesunde bzw. leicht beeinträchtigte Tiere): Läsionsflächensumme $< 2 \text{ mm}^2$ und Score kleiner/gleich 1

Gruppe 2 (mittelschwer erkrankte Tiere): Läsionsflächensumme = $2\text{-}5 \text{ mm}^2$ und Score = 1-4

Gruppe 3 (schwer erkrankte Tiere): Läsionsflächensumme $> 5 \text{ mm}^2$ und Score > 4 .

Hiermit wurde das Ziel verfolgt, in den gesonderten statistischen Analysen nicht auf Tiere mit konträren Befunden beider Parameter zurückzugreifen. So konnte bei einigen Tieren, die radiologisch eine deutliche Krankheitsaktivität aufwiesen, nur eine gering ausgeprägte klinische Symptomatik beobachtet werden. Die Läsionsflächensumme beruhte auf einer zerebralen Bildgebung, wohingegen der klinische Score eher Symptome abbildete, die aus pathologischen Veränderungen im Myelon resultierten.

2.4 Statistische Analyse

2.4.1 Deskriptive Statistik

Die Läsionsflächensumme als ein Maß für die Ausprägung der Erkrankung wurde herangezogen, um die verschiedenen Therapiegruppen miteinander zu vergleichen. Dafür wurden der Mittelwert der Läsionsflächensummen und der Standardfehler in der jeweiligen Therapiegruppe ermittelt.

Betrachtet wurden bei den Lewistieren zum einen alle Therapiegruppen und alle Liposomendosierungen. In weiteren Vergleichen wurden nur Tiere, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren, berücksichtigt bzw. nur Tiere mit Läsionen in den MRT-Aufnahmen.

Bei den DA-Tieren wurde ebenso verfahren, nur dass es hier von vorneherein nur drei Therapiegruppen gab.

Bei beiden Tiermodellen wurden die Therapiegruppen auch anhand des klinischen Scores verglichen. Dazu wurden die Mittelwerte und Standardfehler ermittelt.

Zur Überprüfung der Korrelation zwischen der Läsionsflächensumme und dem klinischen Score wurde bei beiden Tiermodellen der Spearmansche Korrelationskoeffizient ermittelt, wobei nur Tiere betrachtet wurden, die Läsionen in der MRT aufwiesen. Damit wurde untersucht, ob die kraniell gemessene Läsionslast Rückschlüsse auf die spinale entzündliche Aktivität der EAE, die mit dem klinischen Score eher abgebildet wird, zulässt. Dazu wurde der Punktwert des Scores am Tage der MRT-Untersuchung herangezogen.

Um zu untersuchen, ob die radiologisch festgestellte Krankheitsaktivität Einfluss auf die Größe der Seitenventrikel hat, wurden diese bei Tieren mit Läsionen in der MRT mit denjenigen von Tieren ohne Läsionen verglichen. Weiterhin wurde bei Tieren nur mit unilateralen Läsionen ermittelt, ob diese Einfluss auf die Größe der gleichseitigen Seitenventrikel haben. Dazu wurden bei diesen Tieren beide Seitenventrikel miteinander verglichen. Für beide Betrachtungen wurden jeweils die Mittelwerte und Standardfehler der Seitenventrikelflächen herangezogen.

Für beide Tiermodelle wurden die Mittelwerte der Liquorsignalintensitäten an den oben beschriebenen definierten Punkten bei Tieren mit und ohne Läsionen mit den jeweiligen Standardabweichungen gegenübergestellt. Es wurde untersucht, ob die Erkrankungsaktivität, einerseits gemessen über die radiologisch ermittelte Läsionslast (Läsionsflächensumme) und andererseits gemessen über den klinischen Score, Auswirkungen auf den o.g. Liquorquotienten hat. Der jeweilige Liquorquotient wurde für Ratten beider Tiermodelle mit Läsionen gegenüber solchen ohne Läsionen in T2-gewichteten Aufnahmen verglichen. Dafür wurden wiederum die Mittelwerte und Standardfehler herangezogen. Weiterhin wurde der Spearman'sche Korrelationskoeffizient zwischen dem klinischen Score und dem Liquorquotienten sowie der Pearson'sche Korrelationskoeffizient zwischen der Läsionslast (ausgedrückt durch die Läsionsflächensumme) und dem Liquorquotienten ermittelt.

Die Diagramme und Berechnungen wurden mit dem Programm StatSoft Statistica® 7.0 erstellt.

2.4.2 Induktive Statistik

Um statistische Unterschiede der Krankheitsausprägung zwischen den verschiedenen Therapiegruppen herauszuarbeiten, wurden die Läsionsflächensummen gegeneinander mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests (nicht normalverteilte Daten) verglichen. In diesen Vergleichen wurden die Verumtherapiegruppen MPL 4 und 10 bei den Lewisratten, aufgrund der niedrigen Anzahl der Tiere der letztgenannten Gruppe (Abb. 2), zusammen betrachtet. Auf deskriptiver Ebene zeigten diese beiden Therapiegruppen tendenziell vergleichbare Krankheitsausprägungen. Bei diesen statistischen Tests wurden nur Tiere, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren, berücksichtigt.

Die statistischen Unterschiede bei den Seitenventrikelflächen, für Tiere mit gegenüber Tieren ohne Läsionen, bzw. den Seitenventrikelflächen für Tiere nur mit einseitigen Läsionen, wurden ebenfalls mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Zum Vergleich der Liquorquotienten bei Tieren mit bzw. ohne Läsionen wurde der t-Test für unverbundene Stichproben herangezogen.

Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die statistischen Tests wurden mithilfe der Programms StatSoft Statistica® 7.0 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Anzahl durchgeführter magnetresonanztomographischer Untersuchungen

Insgesamt wurden MRT-Aufnahmen von 94 Versuchstieren ausgewertet. Dabei handelte es sich um 45 Lewis- und 49 DA-Ratten. Es wurden 134 T2-gewichtete Aufnahmeserien mit jeweils 15-20 Bildern angefertigt (Lewis: 63, DA: 71). Hiervon wurden die qualitativ besten 94 Aufnahmeserien ausgewertet (Lewis: 45, DA: 49). Weiterhin wurden 16 T1-gewichtete native Aufnahmeserien mit jeweils 10-20 Bildern (Lewis: 8, DA: 8) und 9 T1-gewichtete Aufnahmeserien unter Kontrastmittelapplikation mit jeweils 20 Bildern angefertigt und ausgewertet (Lewis: 1, DA: 8).

3.2 Ergebnisse zum Tiermodell Dark Agouti

3.2.1 Anteil Tiere in den Therapiegruppen mit Läsionen in den magnetresonanztomographischen Untersuchungen

Bei den DA-Ratten wurden bei 15 von 49 Tieren (31%) aller Therapiegruppen radiologisch fassbare Läsionen in T2-gewichteten Aufnahmen identifiziert. In der Placebogruppe wurden bei 8 von 16 Tieren (50%), in der Standardtherapiegruppe bei 4 von 15 Tieren (27%) und in der Verumtherapiegruppe bei 3 von 18 Tieren (17%) Läsionen erkannt (Abb. 8).

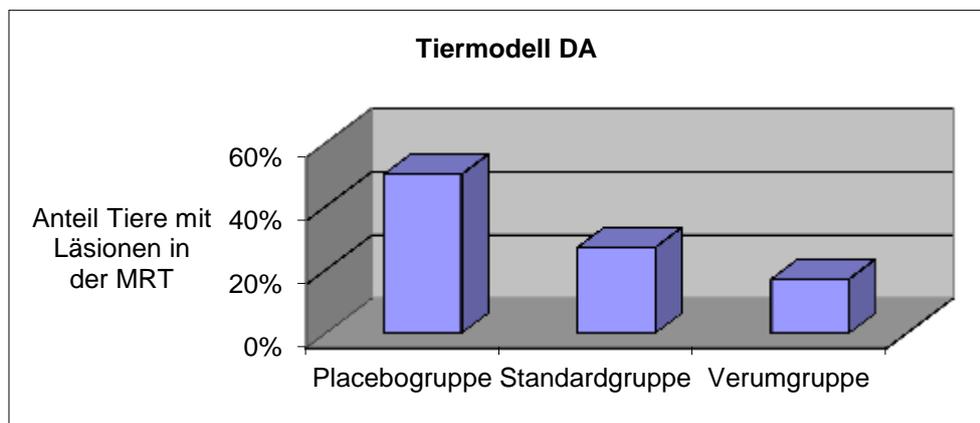


Abbildung 8: Anteil der Ratten mit Läsionen in den verschiedenen Therapiegruppen des Tiermodells DA

3.2.2 Anzahl und Größe der Läsionen

Der Median der Läsionsanzahl lag bei den Tieren mit pathologischen MRT-Befunden für die DA-Ratten bei 2. Eine Auswertung nach Anzahl der Läsionen war demnach nicht sinnvoll, zumal die Größe der Läsionen teilweise erheblich variierte.

Die mittlere Fläche einer Läsion betrug für alle DA-Tiere zusammengenommen 4,2 mm² (Standardabweichung (SA): 1,8 mm²). Für die einzelnen Therapiegruppen lag dieser Mittelwert für die Tiere mit liposomalen Glukokortikosteroiden bei 4,6 mm² (SA: 1,9 mm²), für die Methylprednisolontiere bei 2,9 mm² (SA: 1,3 mm²) und für die Placebotiere bei 4,4 mm² (SA: 1,7 mm²).

3.2.3 Verteilung der Läsionen und Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung

Bei 6 von 15 Tieren mit pathologischen MRT-Befunden fanden sich Läsionen nur linkshemisphärisch, bei 6 Tieren nur rechtshemisphärisch und bei den übrigen 3 Tieren bilateral.

Um für weitergehende Analysen Tiere mit gegensätzlichen Ergebnissen ihrer klinisch (Score) und radiologisch (Läsionsflächensumme) erkannten Krankheitsschwere unberücksichtigt zu lassen, erfolgte eine Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung: Insgesamt ließen sich 17 von 49 (35%) DA-Ratten in der Übereinstimmung ihrer klinisch und radiologisch erkannten Krankheitsschwere einteilen. 12 Ratten konnten der Gruppe der leicht erkrankten und 4 Ratten der Gruppe der mittelschwer erkrankten Tiere zugeordnet werden. Eine Ratte wurde als schwer erkranktes Tier klassifiziert (Abb. 9). Bei den Tieren, die nicht eingeteilt werden konnten, stand bei 22 Ratten einem hohen klinischen Scorewert keine oder eine niedrige Läsionslast gegenüber. 10 Ratten zeigten bei deutlicher Läsionslast klinisch kaum Beeinträchtigungen.

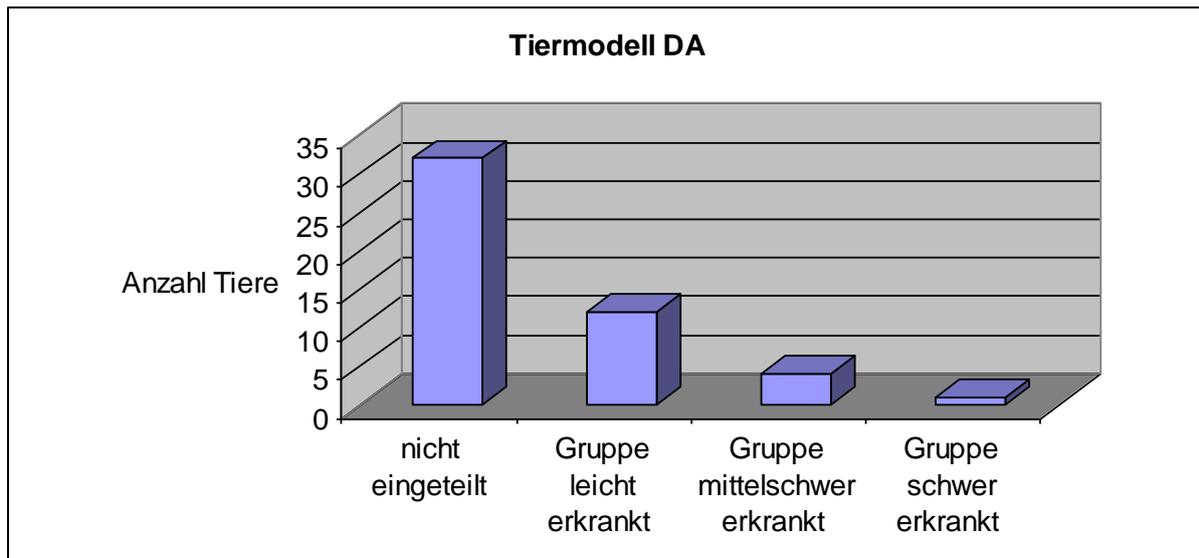


Abbildung 9: Einteilung der DA-Ratten entsprechend ihrer Übereinstimmung zwischen klinischem und radiologischem Bild (n=49)

3.2.4 Vergleich der Therapiegruppen deskriptiv

Mit dem klinischen Score stand ein zweites und MRT-unabhängiges Instrument zur Beurteilung der Krankheitsausprägung zur Verfügung. Gemessen an diesem Score zeigten die mit liposomalen Glukokortikosteroiden behandelten Tiere, mit einem mittleren Scorewert von 1,92, eine gegenüber der Standardtherapiegruppe (mittlerer Scorewert: 2,8) mildere Krankheitsausprägung. Die Placebogruppe war mit einem mittleren Scorewert von 3,34 klinisch am schwersten von der EAE betroffen (Abb. 10).

3. Ergebnisse

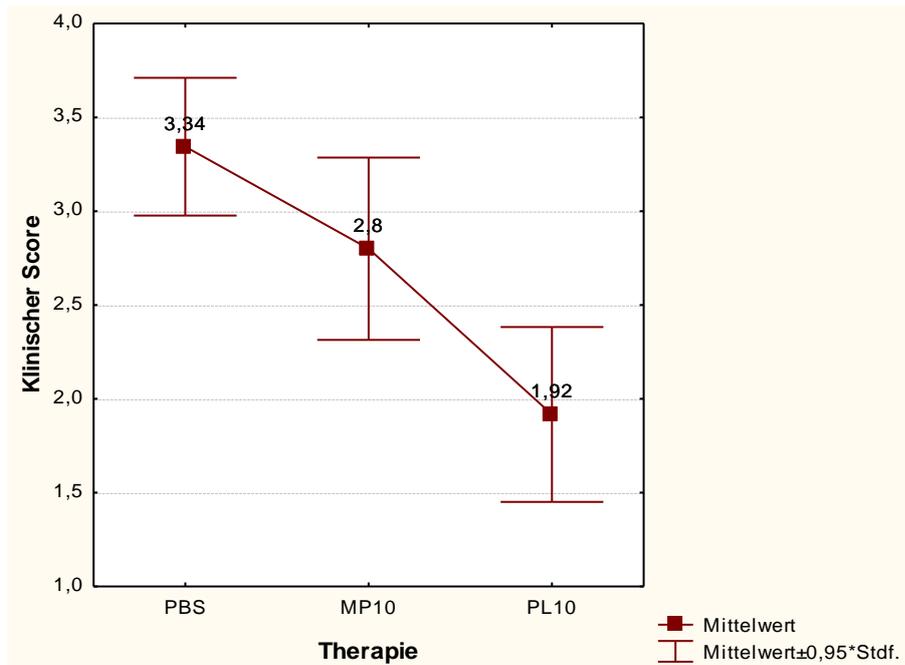


Abbildung 10: Vergleich der DA-Therapiegruppen anhand des klinischen Scores (n=49)

In einem ersten Vergleich der MRT-Befunde wurden alle DA-Ratten berücksichtigt. Ausgehend von den Mittelwerten der Läsionsflächensummen ließen sich Unterschiede in der radiologisch beurteilten Krankheitsausprägung der drei DA-Therapiegruppen feststellen: Die mit liposomalen Glukokortikosteroiden (PL10) behandelten Tiere wiesen mit einer durchschnittlichen Läsionsflächensumme von 1,28 mm² die niedrigste Läsionslast in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen auf. Die Tiere der Standardtherapie- (MP10, 2,13 mm²) und Placebogruppe (PBS, 4,38 mm²) zeigten dagegen eine deutlichere Krankheitsausprägung (Abb. 11).

3. Ergebnisse

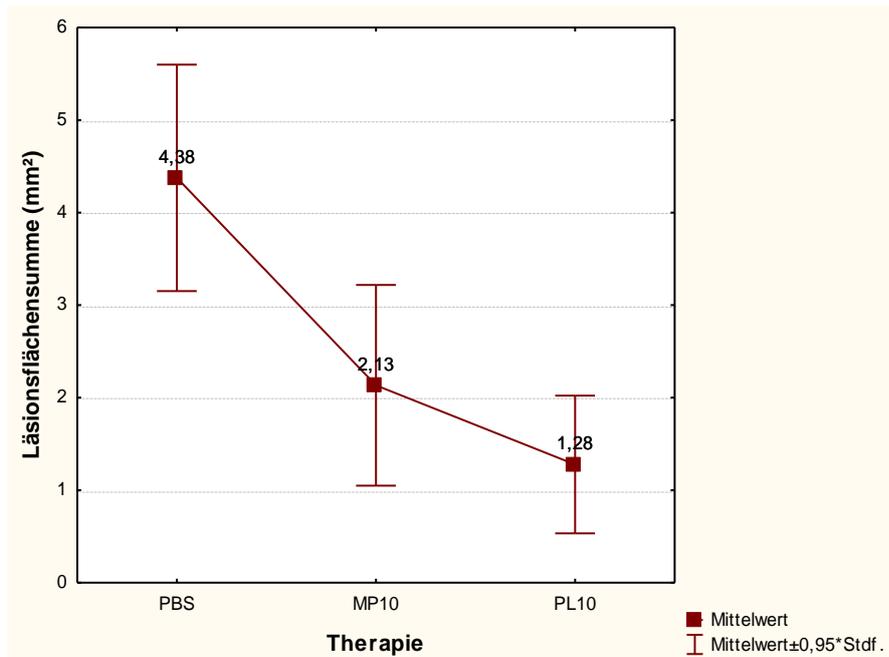


Abbildung 11: Vergleich der mittleren Läsionsflächensummen aller Tiere in den DA-Therapiegruppen (n=49)

In einer zweiten Betrachtung wurden nur Tiere berücksichtigt, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren. Die zuvor beobachtete Abstufung der radiologisch beurteilten Krankheitsausprägung der drei Therapiegruppen stellte sich erneut ein. Bei den PL10-Tieren konnten keine Läsionen nachgewiesen werden. Bei den MP10-Tieren zeigte sich ein Läsionsflächensummenmittelwert von 1,4 mm² und bei den PBS-Tieren von 5 mm² (Abb. 12).

3. Ergebnisse

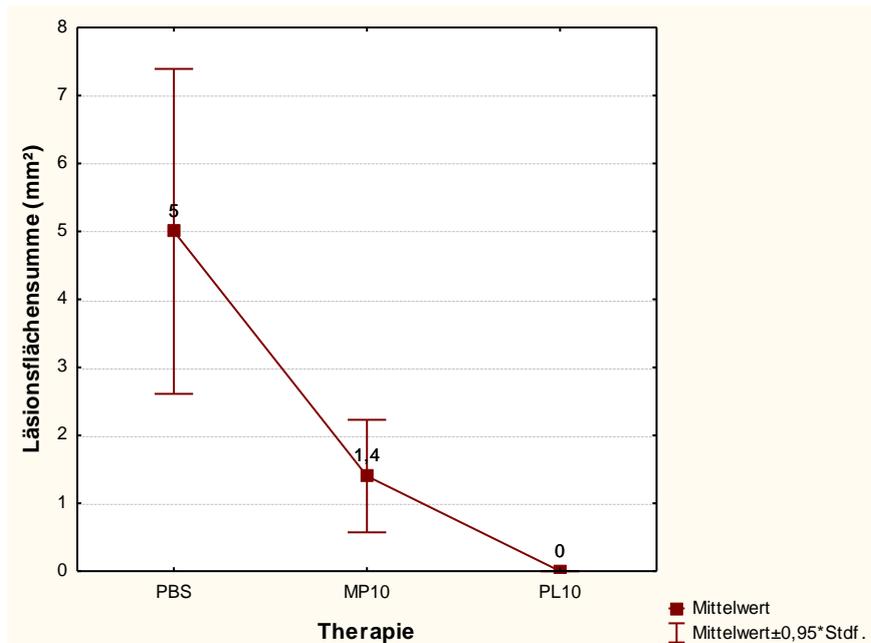


Abbildung 12: Vergleich der mittleren Läsionsflächensummen in den DA-Therapiegruppen, wobei nur Tiere berücksichtigt wurden, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren (n=17)

Bei einem Vergleich der Mittelwerte der Läsionsflächensummen nur bei Tieren, bei denen Läsionen in der MRT festgestellt worden waren, ergab sich folgendes Bild: Die Verumtherapietiere wiesen die niedrigste Läsionslast auf (mittlere Läsionsflächensumme: 7,67 mm²). Die Tiere der Standardtherapie- (8 mm²) und Placebogruppe (8,75 mm²) zeigten eine vermehrte Läsionslast. Verglichen mit den vorangegangenen Diagrammen war die Abstufung jedoch nur schwach ausgeprägt und der Überlappungsbereich der Standardabweichungen erheblich (Abb. 13).

3. Ergebnisse

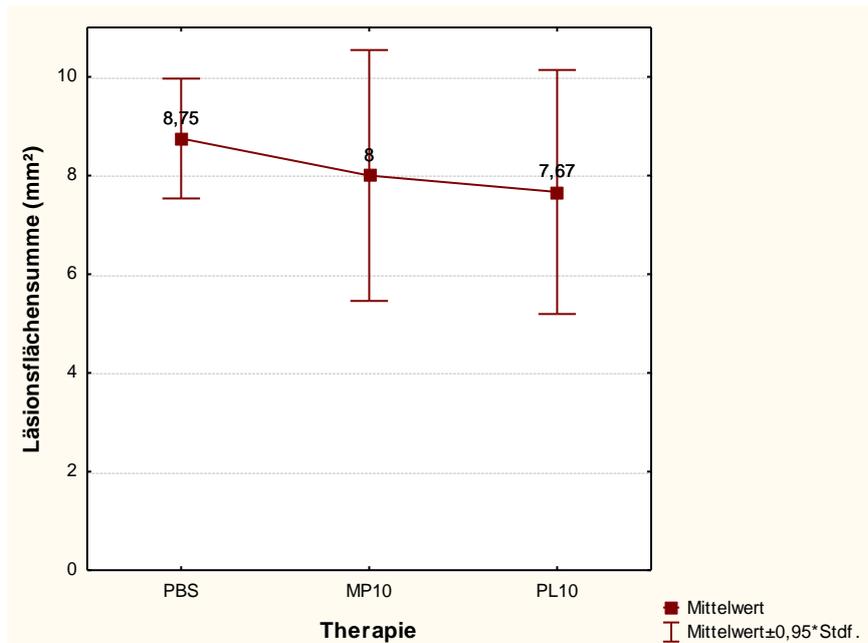


Abbildung 13: Vergleich der mittleren Läsionsflächensummen der DA-Therapiegruppen, wobei nur Tiere mit Läsionen in der MRT berücksichtigt wurden (n=15)

3.2.5 Korrelation klinischer Score mit Läsionsflächensumme

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der zerebral gemessenen Läsionslast und der entzündlichen Aktivität, die mit dem klinischen Score abgebildet wird, bestand. Hierfür wurde der klinische Score gegen die Läsionsflächensumme aufgetragen. Es konnte ein Korrelationskoeffizient nach Spearman von 0,33 ($p = 0,225$) ermittelt werden, wobei nur DA-Ratten mit radiologisch nachgewiesenen Läsionen berücksichtigt wurden.

3.2.6 Vergleich der Seitenventrikelflächen

Für den Vergleich der Seitenventrikelflächen wurde die Schicht in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen herangezogen, in der sich die Seitenventrikel am größten und deutlichsten darstellten. Hierbei wurde untersucht, ob die radiologisch gemessene Läsionslast Einfluss auf die Größe der Seitenventrikel hatte.

Bei Tieren ohne Läsionen in der MRT betrug die mittlere Querschnittsfläche des linken Seitenventrikels $2,52 \text{ mm}^2$ und der des rechten Ventrikels $2,7 \text{ mm}^2$. Bei Tieren mit Läsionen konnten dagegen nur linkshemisphärisch vergrößerte Seitenventrikel festgestellt werden (Mittelwert links: 3 mm^2). Rechtshemisphärisch verblieb der Mittelwert mit $2,73 \text{ mm}^2$ annähernd gleich.

3. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob ipsilaterale Läsionen Einfluss auf die Größe des Seitenventrikels hatten, erfolgte eine gesonderte Betrachtung: Bei Tieren nur mit linkshemisphärischen Läsionen wurde eine mittlere Fläche des linken Seitenventrikels von 3,17 mm² und des rechten Seitenventrikels von 2,17 mm² ermittelt. Bei Tieren nur mit rechtshemisphärischen Läsionen betrug dieser Mittelwert rechts 3,5 mm² und links 3 mm² (Abb. 14).

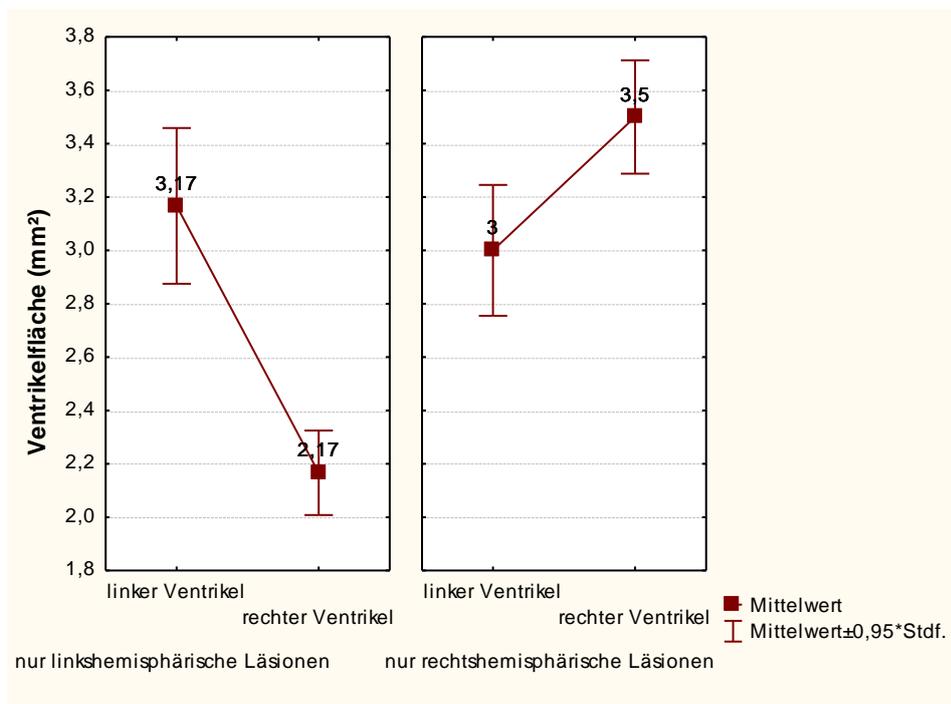


Abbildung 14: Vergleich der Mittelwerte der Seitenventrikelflächen nur bei Tieren mit Läsionen in einer Hemisphäre (jeweils n=6)

3.2.7 Induktive Statistik zum Vergleich der Therapiegruppen und der Seitenventrikelflächen

Der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Läsionsflächensummen der Tiere der Placebogruppe, gegenüber den Läsionsflächensummen der Tiere der Verumtherapiegruppe, zeigte eine signifikant erhöhte Läsionslast der erstgenannten Gruppe ($p = 0,048$).

Ein signifikanter Unterschied der Läsionslast zwischen der Verum- und der Standardtherapiegruppe wurde dagegen nicht erreicht ($p = 0,284$).

Zwischen der Standardtherapie- und Placebogruppe konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p = 0,191$).

3. Ergebnisse

Mittels Mann-Whitney-U-Test konnten signifikant vergrößerte linke Seitenventrikel bei Tieren mit Läsionen nachgewiesen werden ($p = 0,032$). Ebenso fiel dieser Test zum Vergleich der linken Seitenventrikelflächen mit den rechten Seitenventrikelflächen bei Tieren nur mit linkshemisphärischen Läsionen signifikant aus ($p = 0,041$).

Dagegen konnte kein signifikanter Größenunterschied des rechten Seitenventrikels bei Tieren mit Läsionen gegenüber Tieren ohne Läsionen gezeigt werden ($p = 1$). Auch konnte kein signifikanter Größenunterschied der Seitenventrikel bei Tieren nur mit rechtshemisphärischen Läsionen ermittelt werden ($p = 0,24$).

3.2.8 Liquorgrauwertanalysen: Deskriptiver Vergleich der Liquorgrauwerte und Korrelationen

Um Liquorsignalunterschiede in den inneren Liquorräumen zwischen Tieren mit und ohne Läsionen herauszuarbeiten, erfolgte folgende Untersuchung: An fünf vordefinierten Punkten in liquorgefüllten Räumen wurden die Grauwerte in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen bestimmt. An allen Punkten wurden bei Tieren ohne Läsionen, gegenüber Tieren mit Läsionen, niedrigere mittlere Grauwerte ermittelt. Jedoch zeigte sich eine große Streuung (Tabelle 2).

	Mittelwert / SA bei Tieren ohne Läsionen (n=34)	Mittelwert / SA bei Tieren mit Läsionen (n=15)
Linker dorsaler Seitenventrikel:	1084 / 148	1157 / 114
Rechter dorsaler Seitenventrikel:	1062 / 126	1148 / 127
Linker frontaler Seitenventrikel:	953 / 143	1037 / 190
Rechter frontaler Seitenventrikel:	961 / 156	1014 / 187
Dritter Ventrikel:	1379 / 212	1386 / 126

Tabelle 2: Vergleich der Liquorgrauwerte bei DA-Ratten mit und ohne Läsionen in der MRT

Um die ermittelten Messwerte in den Liquorgrauwertanalysen interindividuell vergleichen zu können und untersuchungsabhängige Abweichungen der Messwerte nicht in die Ergebnisse einfließen zu lassen, erfolgte die Bildung eines Liquorquotienten. Dieser errechnete sich aus dem Mittelwert der Liquorgrauwerte an den verschiedenen Messpunkten und dem Mittelwert von Grauwerten zweier definierter, läsionsfreier Regionen. Diese waren jeweils an anatomisch gleicher Position in einer Hemisphäre lokalisiert.

3. Ergebnisse

Es wurde untersucht, ob die Erkrankungsaktivität, einerseits gemessen über die radiologisch ermittelte Läsionslast und andererseits gemessen über den klinischen Score, Auswirkungen auf den o.g. Quotienten hat. Dieser wurde bei DA-Ratten mit Läsionen gegenüber solchen ohne Läsionen verglichen. Weiterhin wurden Korrelationen zwischen dem klinischen Score bzw. der Läsionslast (ausgedrückt durch die Läsionsflächensumme) und dem Liquorquotienten ermittelt.

Im Folgenden wurde der ermittelte Liquorquotient mit dem klinischen Score nur bei Tieren mit radiologisch nachgewiesenen Läsionen verglichen. Es wurde ein Spearmanscher Korrelationskoeffizient von 0,61 ($p = 0,017$) ermittelt (Abb. 15).

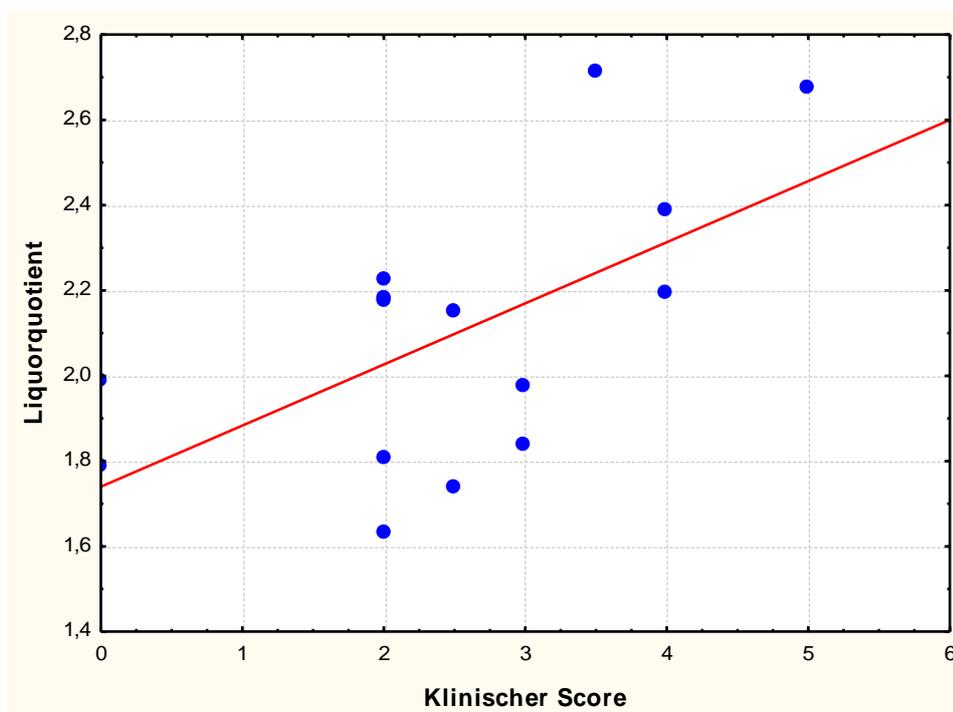


Abbildung 15: Korrelation zwischen dem klinischen Score und dem Liquorquotienten, wobei nur Tiere mit nachgewiesenen zerebralen Läsionen berücksichtigt wurden ($n=15$)

Um zu ermitteln, ob der Liquorquotient auch als Parameter der Erkrankung verwendet werden kann, wurden in einem weiteren Vergleich alle im MRT untersuchten DA-Ratten in die Auswertung eingeschlossen, also auch solche ohne MR-tomographisch nachgewiesene zerebrale Läsionen. Es wurde wiederum der klinischen Score gegen den Liquorquotienten aufgetragen. Dabei konnte keine Korrelation ermittelt werden (Spearmanscher Korrelationskoeffizient 0,22, $p = 0,128$, Abb. 16). Wurden jedoch fünf Tiere aus der Analyse

3. Ergebnisse

entfernt, die klinisch sehr schwer betroffen waren, ohne jedoch Läsionen in der MRT aufzuweisen, ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,48 ($p = 0,001$, Abb. 17).

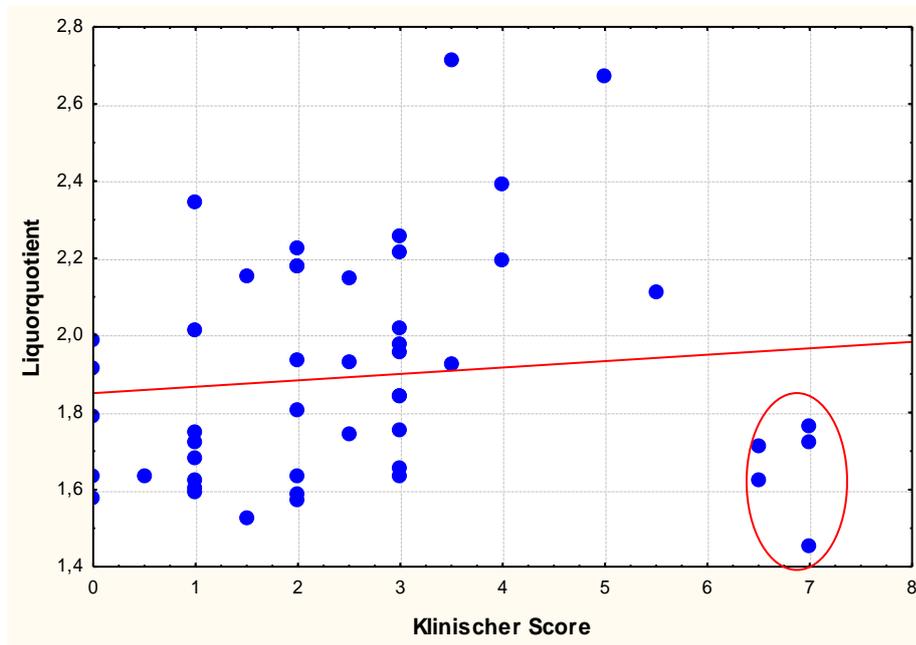


Abbildung 16: Korrelation klinischer Score mit dem Liquorquotienten, wobei alle DA-Ratten berücksichtigt wurden. Man beachte die fünf Ratten, die klinisch schwer betroffen waren, ohne jedoch erhöhte Liquorintensitäten aufzuweisen (in der Abbildung eingekreist, $n=49$)

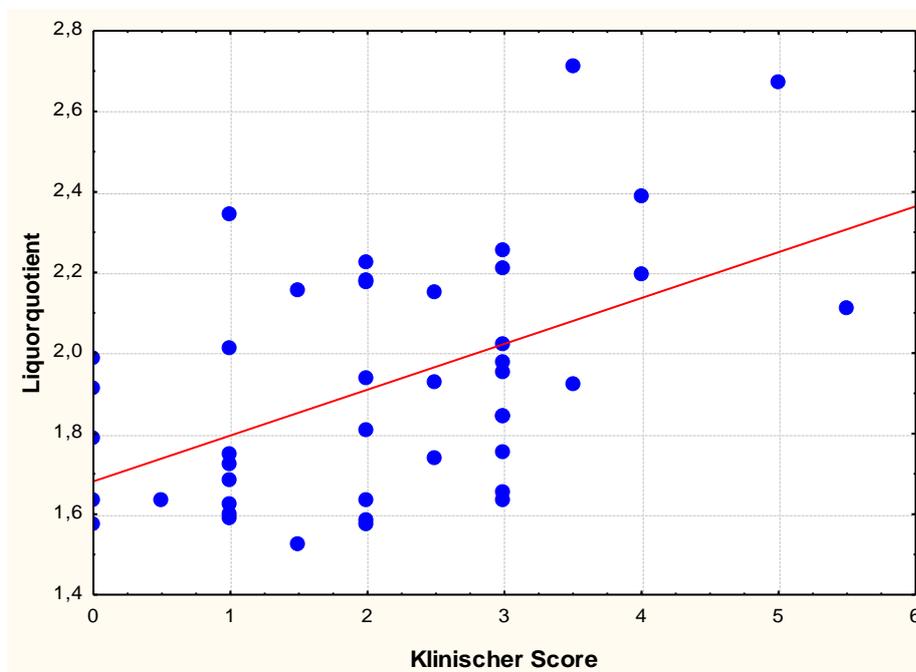


Abbildung 17: Korrelation zwischen dem klinischen Score und dem Liquorquotienten wie in Abb. 16, ohne dass jedoch die fünf markierten Ratten berücksichtigt wurden ($n=44$)

3. Ergebnisse

In einem letzten Vergleich des klinischen Scores mit dem Liquorquotienten wurden nur Tiere berücksichtigt, die nach klinischem Score und Läsionsflächensumme in die kombinierte Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren. Hier wurde ein Spearmanscher Korrelationskoeffizient von 0,71 ($p = 0,002$) ermittelt (Abb. 18).

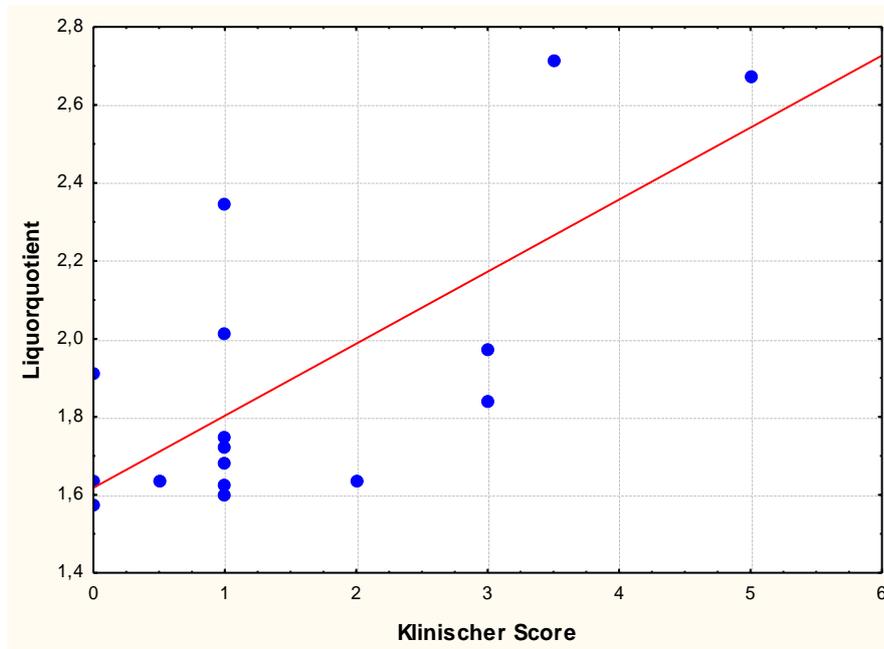


Abbildung 18: Korrelation zwischen klinischem Score und Liquorquotienten bei Tieren, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren ($n=17$)

Im Folgenden wurde die Korrelation zwischen der Läsionsflächensumme in der MRT und dem Liquorquotienten untersucht. Der Pearsonsche Korrelationskoeffizient betrug 0,48 ($p = 0,071$), wobei nur Tiere mit Läsionen in der MRT berücksichtigt wurden (Abb. 19).

3. Ergebnisse

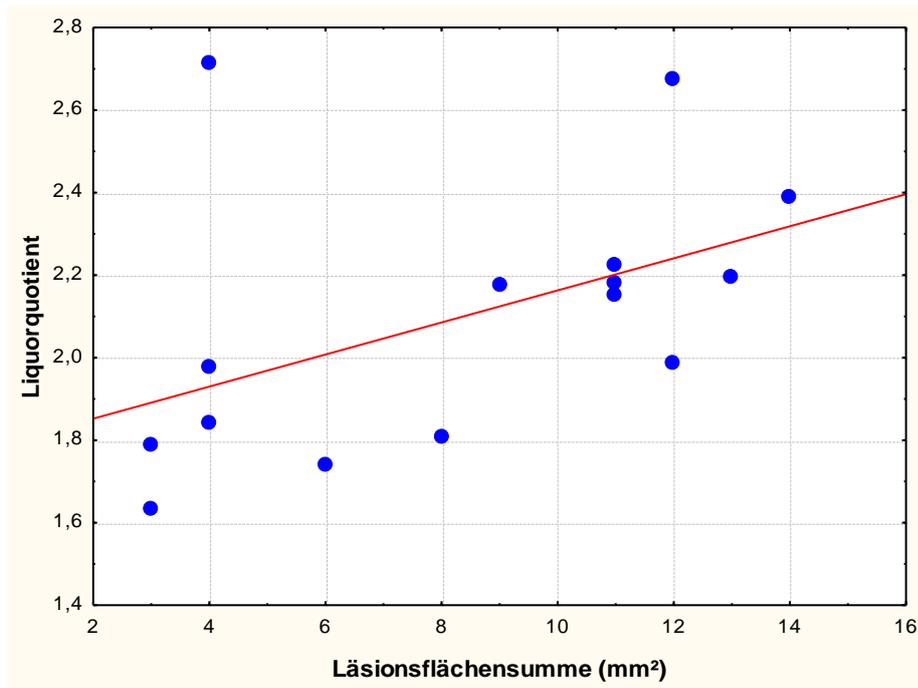


Abbildung 19: Korrelation zwischen der Läsionsflächensumme und dem Liquorquotienten, wobei nur Tiere mit Läsionen in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen berücksichtigt wurden (n=15)

3.2.9 Induktive Statistik zu den Liquorgrauwertanalysen

Um Signalunterschiede des Liquors zwischen Tieren mit und ohne radiologische Erkrankungszeichen zu untersuchen, wurden beide Gruppen mittels eines t-Tests verglichen. Bei Tieren mit Läsionen in der MRT konnte eine hochsignifikant erhöhte Liquorsignalintensität, ausgedrückt durch den Liquorquotienten, gegenüber Tieren ohne Läsionen beobachtet werden ($p < 0,001$).

3.3 Ergebnisse zum Tiermodell Lewis

3.3.1 Anteil Tiere in den Therapiegruppen mit Läsionen in den magnetresonanztomographischen Untersuchungen

Bei 18 von 45 untersuchten Lewisratten (40%) konnten in den MRT-Untersuchungen Läsionen erkannt werden. In der Placebogruppe konnten bei 4 von 6 Tieren Läsionen nachgewiesen werden (66%). In der Standardtherapiegruppe zeigten sich bei 4 von 8 Tieren (50%) und in der Verumtherapiegruppe bei 10 von 31 Tieren (32%) Läsionen (Abb. 20).

Innerhalb der Lewis-Verumtherapiegruppe konnten bei 5 von 8 Tieren (63%), die mit Prednisolonliposomen in der 4-mg/kg-Körpergewicht (KG)-Dosierung (PL4) behandelt wurden, Läsionen beobachtet werden. Bei den Prednisolonliposomen in der 10-mg/kg-KG-Dosierung (PL10) konnten bei 3 von 12 Tieren (25%) Läsionen gesehen werden. Bei 2 von 8 Tieren (25%) mit der Methylprednisolonliposomen-Dosierung 4 mg/kg KG (MPL4) konnten Läsionen nachgewiesen werden. Keine Läsionen traten bei den 3 Tieren mit der 10-mg/kg-KG-Dosierung auf (MPL10, Abb. 21).

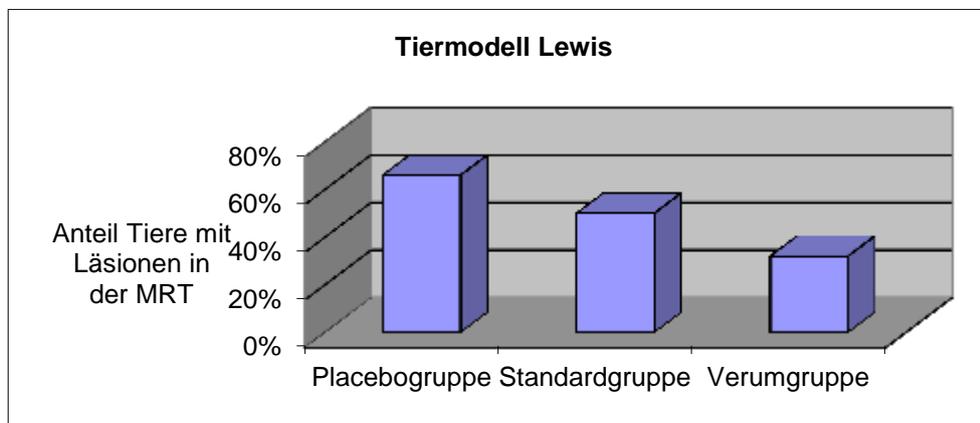


Abbildung 20: Anteil der Versuchstiere mit Läsionen in der MRT in den verschiedenen Lewis-Therapiegruppen

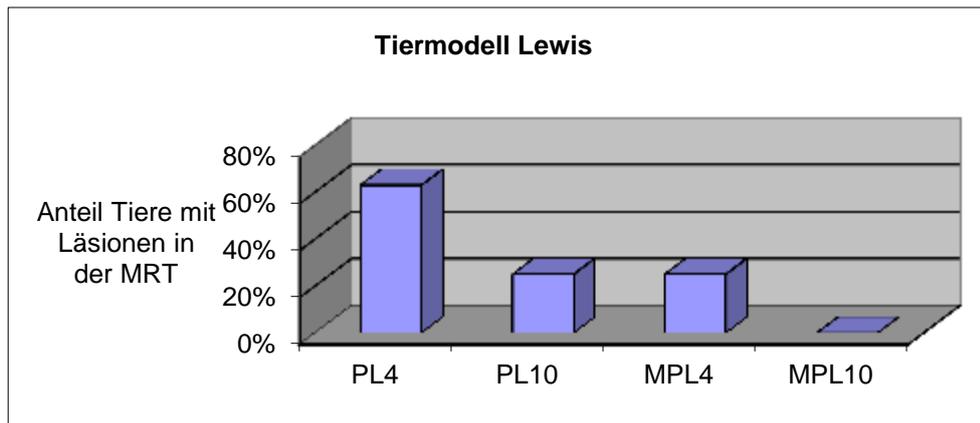


Abbildung 21: Anteil der Versuchstiere mit Läsionen in der MRT in den verschiedenen Verumtherapieuntergruppen

3.3.2 Anzahl und Größe der Läsionen

Der Median der Läsionsanzahl lag bei den Tieren mit pathologischen MRT-Befunden für die Lewisratten bei 2. Eine Auswertung nach Anzahl der Läsionen war demnach, ebenso wie bei den DA-Ratten, nicht sinnvoll. Zudem variierte die Größe der Läsionen ebenfalls teilweise erheblich.

Die mittlere Fläche einer Läsion betrug bei den Lewisratten $5,3 \text{ mm}^2$ (SA: 2 mm^2). Bei separater Betrachtung der einzelnen Therapiegruppen lag dieser Mittelwert für die Verumtherapietiere bei 5 mm^2 (SA: $1,3 \text{ mm}^2$). Bei den Standardtherapietieren betrug die mittlere Läsionsfläche $5,1 \text{ mm}^2$ (SA: $2,1 \text{ mm}^2$) und die der Placebotiere $5,9 \text{ mm}^2$ (SA: $1,9 \text{ mm}^2$).

3.3.3 Verteilung der Läsionen und Einteilung nach der kombinierten Krankheitsausprägung

Bei 7 von 18 Lewistieren mit pathologischen MRT-Befunden fanden sich Läsionen nur linkshemisphärisch, bei 5 nur rechtshemisphärisch und bei den übrigen 6 bilateral.

Analog zu den DA-Ratten erfolgte die Einteilung in die kombinierte Krankheitsausprägung. Zugrunde gelegt wurde wiederum die Kombination der radiologisch (Läsionsflächensumme) und klinisch (Score) gemessenen Schwere der Erkrankung. Insgesamt ließen sich 29 aller 45 Lewistiere (64%) einteilen: 14 Tiere in die Gruppe der leicht erkrankten bzw. gesunden, 6 Tiere in die der mittelschwer und 9 Tiere in die der schwer erkrankten Tiere (Abb. 22). Bei den Tieren, die nicht eingeteilt werden konnten, stand bei 13 Tieren einer deutlichen

3. Ergebnisse

klinischen Krankheitsausprägung mit erhöhten Scorewerten kein oder nur ein geringfügiger Läsionsnachweis in der MRT gegenüber. Bei 3 Tieren zeigten sich bei deutlichem Läsionsnachweis klinisch kaum Beeinträchtigungen.

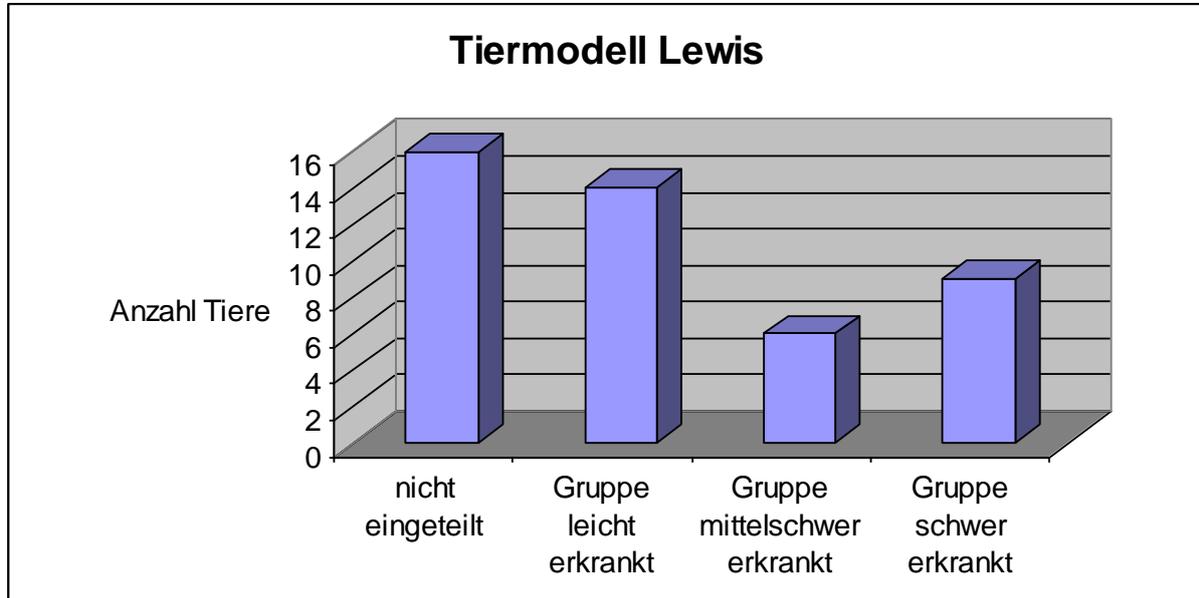


Abbildung 22: Einteilung der Lewisratten entsprechend ihrer Übereinstimmung zwischen klinischem und radiologischem Bild (n=45)

3.3.4 Deskriptiver Vergleich der Therapiegruppen

Anhand der Mittelwerte im klinischen Score zeigte sich eine verminderte Krankheitsausprägung in der Standard- und Verumtherapiegruppe gegenüber der Placebogruppe. Dabei wurden bei den Tieren, die mit liposomalen Glukokortikosteroiden behandelt worden waren, die niedrigsten Punktwerte gemessen. Diese waren damit klinisch am wenigsten betroffen (Abb. 23).

3. Ergebnisse

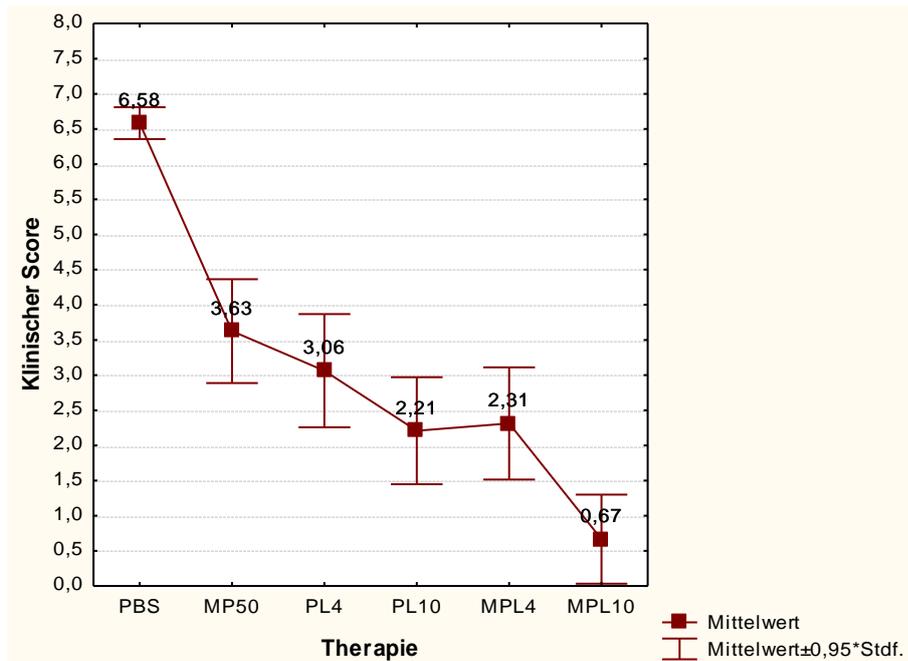


Abbildung 23: Vergleich der Lewistherapiegruppen anhand des klinischen Scores (n=45)

Um den Therapieerfolg in den verschiedenen Therapiegruppen zu überprüfen, wurden diese anhand der Mittelwerte der Läsionsflächensummen verglichen. Zunächst wurden alle Lewisratten betrachtet.

Wurden in der Verumtherapiegruppe die verschiedenen Dosierungen und die Methylprednisolon- (MPL) und Prednisolonliposomentherapie (PL) anhand der Mittelwerte der Läsionsflächensummen verglichen, zeigten sich bei den Ratten mit MPL in der 10-mg/kg-KG-Dosierung (MPL10) keine Läsionen. Bei Tieren mit MPL in der 4-mg/kg-KG (MPL4)-Dosierung wurde mit einer mittleren Läsionsflächensumme von 1,63 mm² gegenüber PL in der 10-mg/kg-KG (PL10)-Dosierung (mittlere Läsionsflächensumme: 2,83 mm²) eine niedrigere radiologisch gemessene Krankheitsaktivität beobachtet.

Bei Tieren, die mit herkömmlichem Methylprednisolon (MP50) behandelt worden waren, und bei Liposomentieren mit PL in der 4-mg/kg-KG (PL4)-Dosierung zeigte sich eine vergleichbare Läsionslast (mittlere Läsionsflächensumme: 6,5 bzw. 6,88 mm²). Die ausgeprägteste mittlere Läsionsflächensumme wurde erwartungsgemäß mit 10,67 mm² bei den Placebotieren beobachtet (PBS, Abb. 24).

3. Ergebnisse

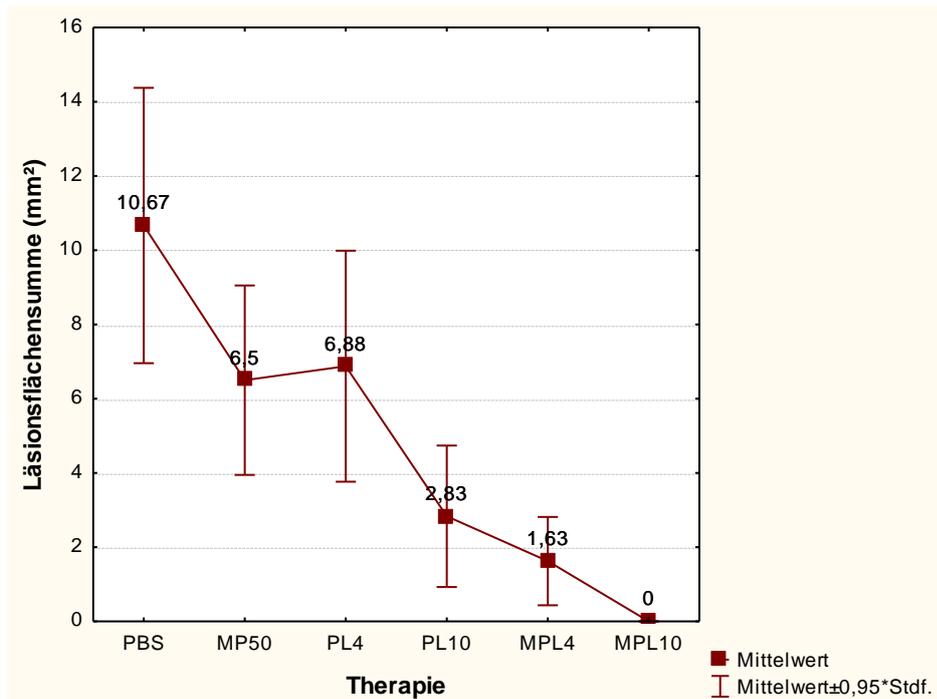


Abbildung 24: Vergleich aller Lewistherapiegruppen (n=45)

Ähnlich stellte sich das Bild dar, wenn die Mittelwerte der Läsionsflächensummen nur bei Tieren betrachtet wurden, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren.

Der Vergleich der Verumtherapieuntergruppen spiegelte die vorangegangene Beobachtung wider, dass die Läsionslast unter Methylprednisolonliposomen gegenüber Prednisolonliposomen weniger ausgeprägt war. Sowohl die 10-mg/kg-KG- als auch die 4-mg/kg-KG-Dosierung beider liposomaler Glukortikosteroide waren bezüglich der Läsionsausprägung herkömmlichem Methylprednisolon überlegen (Abb. 25).

3. Ergebnisse

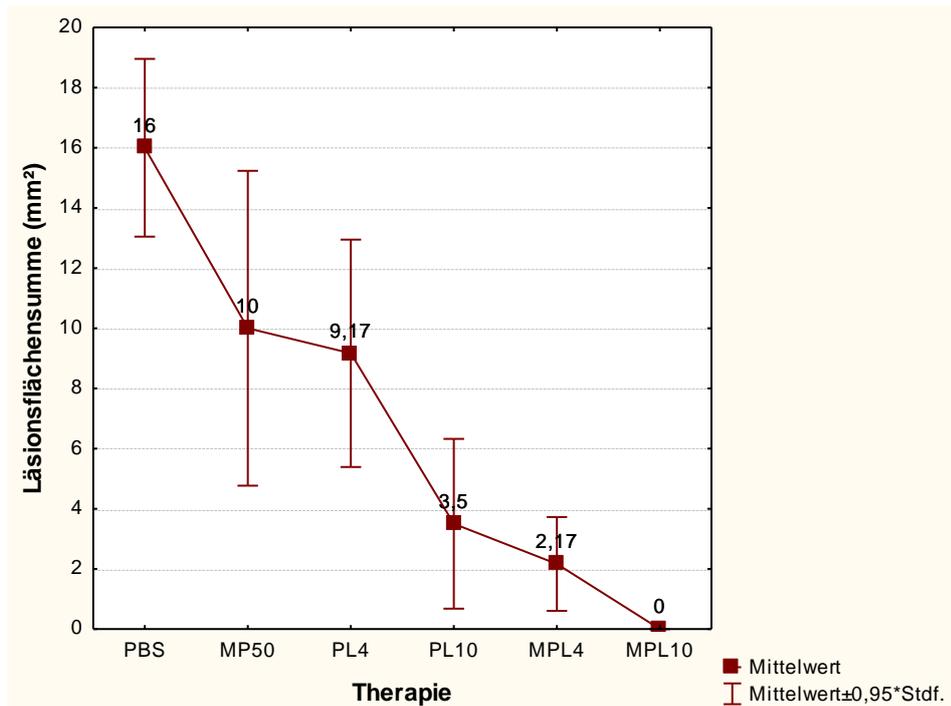


Abbildung 25: Vergleich aller Lewistherapiegruppen, wobei nur Tiere berücksichtigt wurden, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren (n=29)

In einer weiteren Betrachtung wurden die mittleren Läsionsflächensummen nur bei Tieren mit Läsionen in der MRT verglichen.

Unter Therapie mit liposomalen Glukokortikosteroiden zeigte sich gegenüber der Standardtherapie- und Placebogruppe eine niedrigere mittlere Läsionsflächensumme.

Innerhalb der Verumtherapiegruppe wiesen Tiere mit der MPL4-Dosierung die kleinste mittlere Läsionsflächensumme auf (6,5 mm²), wobei die Tiere der MPL10-Gruppe gar keine Läsionen entwickelten. Die mit Prednisolonliposomen behandelten Tiere zeigten sowohl in der 10-mg/kg-KG- (11,3 mm²) als auch in der 4-mg/kg-KG-Dosierung (11 mm²) eine vergleichbare mittlere Läsionsflächensumme.

Eine deutlichere radiologisch gemessene Krankheitsaktivität wurde bei den Placebo- (16 mm²), gefolgt von den Standardtherapietieren (13 mm²), beobachtet (Abb. 26).

3. Ergebnisse

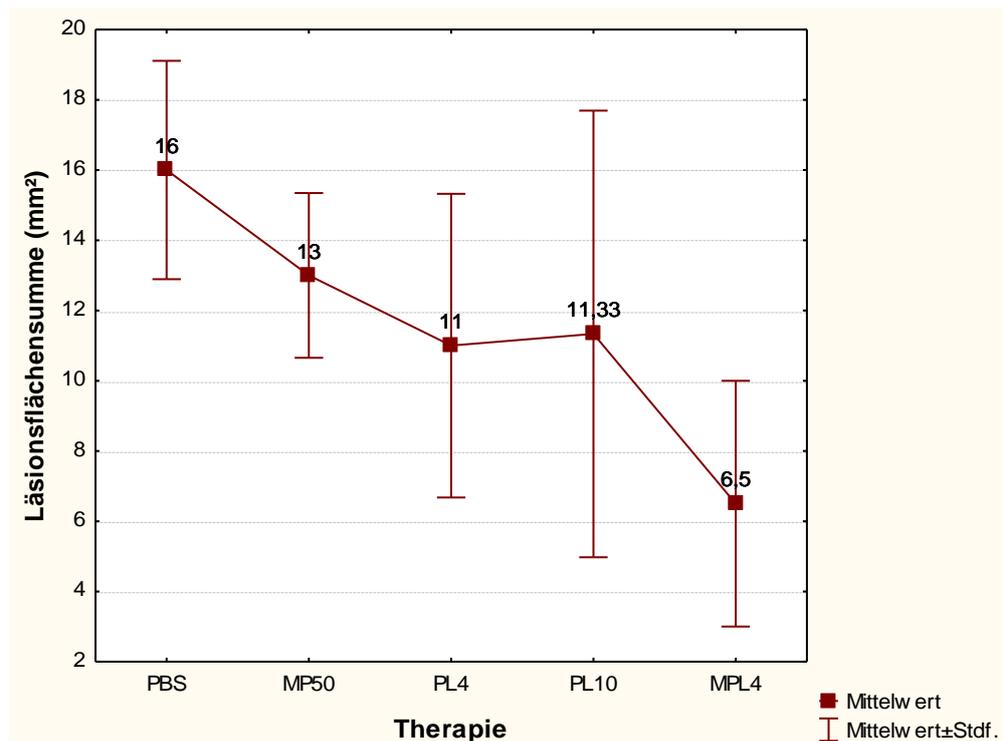


Abbildung 26: Vergleich der Lewistherapiegruppen, wobei nur Tiere mit Läsionen in der MRT betrachtet wurden (n=18)

3.3.5 Korrelation klinischer Score mit Läsionsflächensumme

Analog zum Tiermodell-DA wurde untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der zerebral gemessenen Läsionslast und der klinisch gemessenen entzündlichen Aktivität, bestand. Hierfür wurde wiederum der klinische Score gegen die Läsionsflächensumme aufgetragen. Es wurde ein Korrelationskoeffizient nach Spearman von 0,54 ($p = 0,02$) ermittelt, wobei nur Tiere mit radiologisch nachgewiesenen Läsionen berücksichtigt wurden.

3.3.6 Vergleich der Seitenventrikelflächen

Im Folgenden wurde untersucht, ob die entzündliche Aktivität, dargestellt über die Läsionen in der MRT, Einfluss auf die Größe der Seitenventrikel hatte.

Bei Tieren ohne Läsionen in der MRT betrug die mittlere Fläche des linken Seitenventrikels 2,65 mm² und die des rechten Seitenventrikels 2,62 mm². Im Vergleich dazu waren die Seitenventrikel bei Tieren mit Läsionen vergrößert (Mittelwert links: 3,33 mm², rechts: 3,67 mm², Abb. 27).

Wurden nur bei Tieren mit unilateralen Läsionen die Seitenventrikel betrachtet, ergab sich folgendes Bild: Bei Tieren nur mit linkshemisphärischen Läsionen wurde eine mittlere Fläche

3. Ergebnisse

des linken Seitenventrikels von 3,57 mm² und des rechten Seitenventrikels von 3,57 mm² gemessen. Bei Tieren nur mit rechtshemisphärischen Läsionen betrug dieser Mittelwert rechts 4,4 mm² und links 3 mm² (Abb. 28).

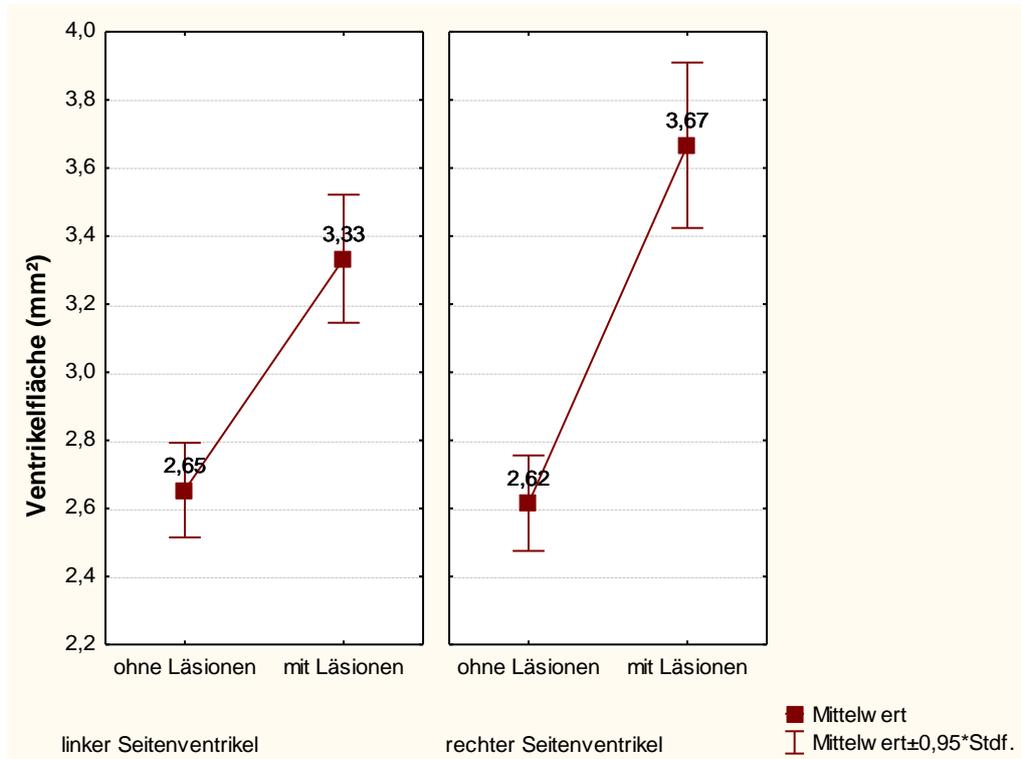


Abbildung 27: Vergleich der Mittelwerte der Seitenventrikelflächen zwischen Lewistieren mit und ohne Läsionen in der MRT (n=45)

3. Ergebnisse

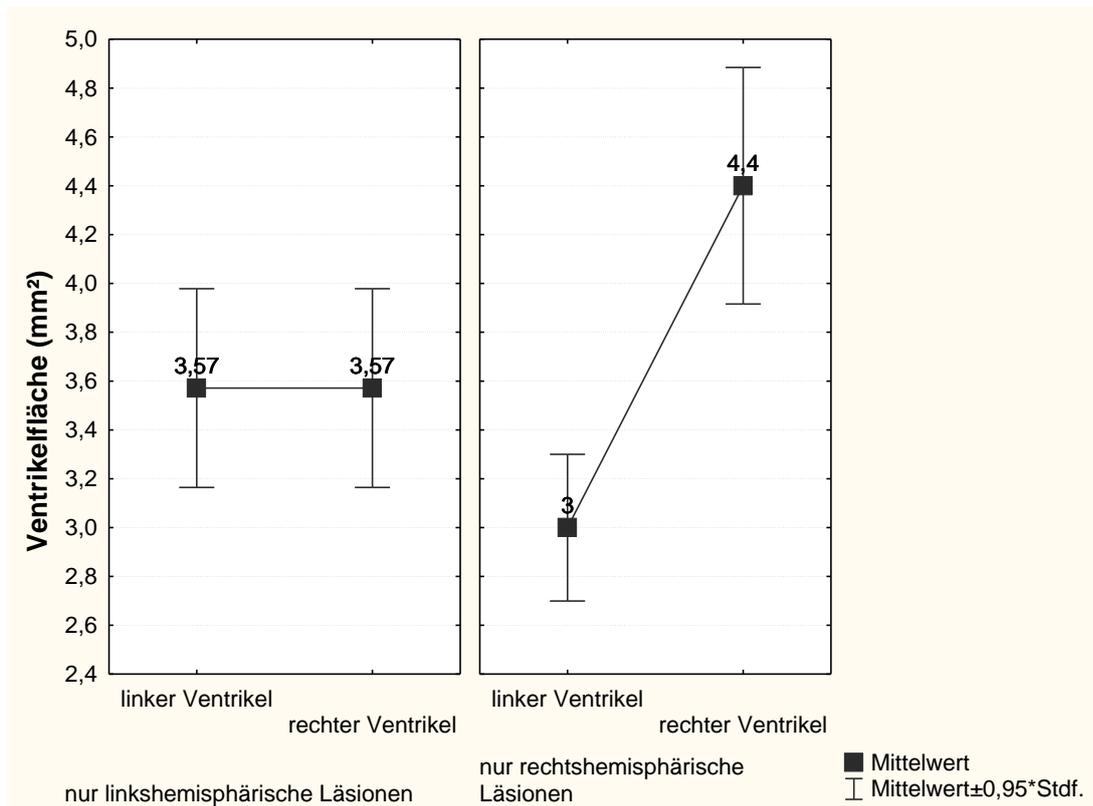


Abbildung 28: Vergleich der Mittelwerte der Seitenventrikelflächen nur bei Tieren mit Läsionen in einer Hemisphäre (n=7 bzw. n=5)

3.3.7 Induktive Statistik zum Vergleich der Therapiegruppen und der Seitenventrikelflächen

Die durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Läsionsflächensummen der Tiere der verschiedenen Therapiegruppen, die nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt worden waren, ergaben folgende Ergebnisse: Es konnte eine signifikant erhöhte Läsionslast der Placebo- gegenüber der Verumtherapiegruppe mit der zusammengefassten Dosierung MPL4/10 nachgewiesen werden ($p = 0,008$). Für die Dosierung PL10 konnte gegenüber der Placebogruppe ebenfalls eine Signifikanz gezeigt werden ($p = 0,049$).

Dagegen konnte kein signifikanter Unterschied in der Läsionsausprägung zwischen der Standardtherapie- und der Verumtherapiegruppe MPL4/10 ermittelt werden ($p = 0,194$). Ebenso zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Standardtherapiegruppe und den Prednisolonliposomentieren in beiden Dosierungen (PL10: $p = 0,376$, PL4: $p = 0,352$). Zwischen der Placebo- und Standardtherapiegruppe ergab sich ebenfalls keine Signifikanz ($p = 0,4$).

3. Ergebnisse

Die Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Seitenventrikelflächen zwischen Lewisratten mit und ohne Läsionen zeigten sowohl linksseitig ($p = 0,01$) als auch rechtsseitig ($p < 0,001$) signifikant vergrößerte Seitenventrikel der radiologisch als krank klassifizierten Tiere.

Beim intraindividuellen Vergleich der Seitenventrikelflächen ausschließlich bei Tieren mit unilateralen Läsionen konnte dagegen kein signifikanter Größenunterschied ermittelt werden.

3.3.8 Liquorgrauwertanalysen

Ebenso wie bei dem Tiermodell DA wurde untersucht, inwieweit die radiologisch gemessene Entzündungsaktivität Einfluss auf die Liquorsignalintensität der inneren Liquorräume hatte.

An fünf vordefinierten Punkten in liquorgefüllten Räumen wurden dafür die Grauwerte in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen bestimmt. An allen Punkten wurden bei Tieren ohne Läsionen, gegenüber Tieren mit Läsionen, niedrigere Mittelwerte ermittelt. Jedoch zeigte sich eine größere Streuung bei Tieren mit Läsionen (Tabelle 3).

	Mittelwert/SA bei Tieren ohne Läsionen (n=27)	Mittelwert/SA bei Tieren mit Läsionen (n=18)
Linker dorsaler Seitenventrikel:	1196 (SA: 595)	1453 (SA: 817)
Rechter dorsaler Seitenventrikel:	1141 (SA: 423)	1414 (SA: 609)
Linker frontaler Seitenventrikel:	1093 (SA: 462)	1546 (SA: 789)
Rechter frontaler Seitenventrikel:	1104 (SA: 384)	1701 (SA: 750)
Dritter Ventrikel:	1660 (SA: 544)	2028 (SA: 852)

Tabelle 3: Vergleich der Liquorgrauwerte bei Lewisratten mit und ohne Läsionen in der MRT

Ebenso wie beim Tiermodell DA erfolgte die Bildung eines Quotienten aus dem Mittelwert der Liquorgrauwerte an den verschiedenen Messpunkten und dem Mittelwert von Grauwertanalysen in beiden Hemisphären, in denen keine Läsionen nachzuweisen waren.

Dieser Liquorquotient wies im Gegensatz zu dem Tiermodell DA keine Korrelation zu dem klinischen Score auf. Auch konnte zwischen Lewisratten mit und ohne Läsionen in der MRT in einem t-Test für unverbundene Stichproben kein signifikanter Unterschied der Liquorintensität ermittelt werden ($p = 0,189$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit bildeten signalintensive Läsionen in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen die Grundlage der Auswertung. Zunächst ist zu diskutieren, ob all jene läsionsverdächtigen Areale, die in dieser Arbeit als Läsionen in die Auswertung eingingen, tatsächlich Krankheitsäquivalente darstellen. Eine definitive Überprüfung könnte eine histopathologische Analyse derselben liefern. Der Vergleich zwischen korrespondierenden Läsionen in der MRT und in histopathologischen Untersuchungen erfolgte in dieser Studie, aufgrund der erheblichen Schichtdickenunterschiede beider Methoden, nicht. So bleibt der Vergleich mit vorangegangenen Arbeiten, die zusätzlich histopathologische Untersuchungen in EAE-Ratten durchgeführt haben (u.a. Zamaroczy et al. 1991, Duckers et al. 1997, Karlik et al. 1999, Steinbrecher et al. 2005).

Duckers et al. (1997) wiesen in korrespondierenden histologischen Schnitten zu signalintensiven Arealen in T2-gewichteten Aufnahmen in einer chronischen Form der EAE bei Lewisratten Demyelinisierung, entzündliche Infiltrate, Ödeme und vergrößerte Ventrikel nach. In einer akuten Form der EAE bei Lewisratten konnte jedoch nur eine gering ausgeprägte Demyelinisierung beobachtet werden (Meeson et al. 1994, Gold et al. 2006).

Steinbrecher et al. (2005) ermittelten für EAE-DA-Ratten in korrespondierenden Schnitten entzündliche Infiltrate, die hauptsächlich Makrophagen und Lymphozyten enthielten, sowie Demyelinisierung. Heckl et al. (2004) zeigten für EAE-DA-Ratten, dass sich Läsionen, bei denen histologisch eine zugrundeliegende Demyelinisierung nachgewiesen werden konnte, in T2-gewichteten Aufnahmen signalintensiv darstellen.

Grossman et al. (1987) ermittelten bei EAE-Meerschweinchen für Läsionen, die in T2-gewichteten Aufnahmen identifiziert wurden, eine Sensitivität von 42% verglichen mit allen histologisch dargestellten Läsionen. Hart et al. (1998) zeigten für EAE-Affen, dass man mit der in T2-gewichteten Aufnahmen ermittelten Läsionsanzahl, die histologisch nachgewiesenen Läsionen gut abschätzen kann. Jordan et al. (1999) wiesen nach, dass eine Korrelation zwischen Läsionen in der MRT und in histopathologischen Analysen im Wesentlichen von drei Faktoren abhängt: der MR-tomographischen Schichtdicke, dem Läsionsdurchmesser und der Kontrastmittelanreicherung. Wurde die schmalere Schichtdicke gewählt, zeigte sich eine bessere Korrelation, da auch kleinere Läsionen zuverlässig detektiert werden konnten, insbesondere dann, wenn sie Kontrastmittel anreicherten. Steinbrecher et al.

4. Diskussion

(2005) konnten für EAE-DA-Ratten auch auf Rückenmarksebene eine gute Sensitivität der MR-tomographischen Detektion von histologisch validierten Läsionen zeigen. Allerdings wurden in dieser Arbeit postmortale Rückenmarksschnitte in einem hochauflösenden Gerät (17,6 Tesla) untersucht.

Insgesamt gesehen ist eine Abschätzung der Läsionslast mit Hilfe T2-gewichteter Aufnahmen in EAE-Tiermodellen möglich. Eine diagnostische Unsicherheit wird dennoch verbleiben. Da in der vorliegenden Arbeit für alle Tiere dieselben Kriterien der Läsionsidentifizierung angewendet wurden, sollte dies jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die statistischen Auswertungen haben. Im Folgenden wird aus Gründen der einfacheren Sprachführung nicht von läsionsverdächtigen Arealen, sondern von Läsionen gesprochen. Für diese gelten jedoch immer die genannten Einschränkungen.

Bei den Lewisratten konnten in dieser Arbeit bei 18 von 45 Tieren (40%) signalintensive Läsionen in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen identifiziert werden, bei den DA-Ratten bei 15 von 49 Tieren (31%). In den Placebogruppen konnten bei 4 von 6 Lewisratten (66%) und bei 8 von 16 DA-Ratten (50%) Läsionen festgestellt werden. Zamaroczy et al. (1991) konnten in der akuten Krankheitsphase bei 44% vergleichbarer und unbehandelter EAE-Lewisratten signalintensive Läsionen mit Schwerpunkt im Rückenmark und Hirnstamm zeigen. Heckl et al. (2004) konnten in einer Versuchsserie bei allen unbehandelten EAE-DA-Ratten in T2-gewichteten Aufnahmen histologisch validierte Läsionen nachweisen, die hauptsächlich zerebral lokalisiert waren. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Läsionsraten für Placebotiere liegen im Vergleich dazwischen: Zu berücksichtigen ist, dass Läsionen im Rückenmark in der vorliegenden Arbeit nicht quantifizierbar waren, da Rückenmarksanteile aus aufnahmetechnischen Gründen nicht erfasst werden konnten. Demnach wird der Anteil der Tiere mit entzündlichen Läsionen in dieser Arbeit unterschätzt.

Bei den mit liposomalen Glukokortikosteroiden behandelten Tieren liegt der Anteil der Tiere mit Läsionen, verglichen mit den Tieren der Placebo- und Methylprednisolontherapiegruppen, niedriger. Bei den mit diesem neuartigen Therapieansatz behandelten Lewisratten wurden bei 10 von 31 Tieren (32%) und bei den DA-Ratten bei 3 von 18 Tieren (17%) Läsionen identifiziert. Diesbezügliche EAE-MRT-Studien liegen nicht vor. Eine vergleichende Einordnung des höheren Anteils an radiologisch als krankheitsfrei klassifizierten Tieren, die mit liposomalen Glukokortikosteroiden behandelt wurden, ist somit noch nicht möglich.

Für das Lewis-Tiermodell konnte ein Median der Läsionsanzahl von 2 für Tiere mit Läsionen in der MRT ermittelt werden. Die durchschnittliche Größe dieser Läsionen differierte in den verschiedenen Therapiegruppen: von 5 mm² (+/- 1,3 mm² Standardabweichung (SA)) in der Verumtherapiegruppe bis 5,9 mm² (+/- 1,9 mm² SA) bei den Placebotieren. Duckers et al. (1997) beschrieben therapieabhängige Läsionsgrößen: Lewisratten mit einer chronischen EAE, die lediglich mit einer Salzlösung behandelt wurden, wiesen ein durchschnittliches Läsionsvolumen zum Krankheitshöhepunkt von 54 µl (+/- 9 µl SA) auf. Die Tiere mit Therapie (neurotrophes Adrenokortikotropes Hormonanalogue) wiesen zum gleichen Zeitpunkt ein Läsionsvolumen von 13 µl (+/- 3 µl SA) auf.

Heckl et al. (2004) konnten bei unbehandelten EAE-DA-Ratten ein Median von zwei Läsionen mit einem jeweiligen Durchmesser von 2-9 mm ermitteln. In der vorliegenden Arbeit liegt der Median für DA-Tiere mit pathologischen MRT-Befunden ebenfalls bei zwei Läsionen. Der hier ermittelte Mittelwert einer Läsionsfläche von 4,4 mm² (+/-1,7 mm² SA) für die Placebotiere liegt im Bereich von Heckl et al., wenn man vom o.g. Durchmesser auf eine Kreisfläche schließt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die gemessene Fläche der Läsionen in der MRT als Grundlage der radiologisch beurteilten Krankheitsaktivität angenommen. Vorangegangene Arbeiten quantifizierten Läsionen in EAE-Tiermodellen auf andere Weise: Namer et al. (1993, 1994) und Duckers et al. (1997) verwendeten Läsionsvolumina, weitere Arbeiten untersuchten Läsionen über Relaxationszeiten (Morrissey et al. 1996) oder Pixel-Histogramme (Karlik et al. 1999). In den allermeisten Fällen wurden Läsionen in der vorliegenden Arbeit in ein bis zwei Schnittbildern sichtbar. Dass sie aber in zwei übereinander liegenden Bildern annähernd gleich lokalisiert waren, so dass man die Vermutung haben könnte, es handelt sich um dieselbe Läsion, war die Ausnahme. In diesen Fällen wäre eine Volumenberechnung möglich gewesen. Läsionen, die nur in einem Schnittbild sichtbar waren, hätte man dagegen nicht berücksichtigen können. Bei einer Schichtdicke von 1,5 mm und einer durchschnittlichen Läsionsfläche von ca. 5 mm² ist zudem der Einfluss von Partialvolumenartefakten auf das Messergebnis nur schlecht abzuschätzen.

Die weitere Auswertung der Läsionen führte zu einem quantitativen radiologischen Maß der Krankheitsausprägung, der Läsionsflächensumme. Die Annahme, die zu dem Instrument

Läsionsflächensumme führte, war, dass damit eine Differenzierung im Hinblick auf die verschiedenen Therapiegruppen möglich sein könnte. Methodisch bedingt wäre aus o.g. Gründen eine Volumenberechnung der Läsionen mit zu großen Ungenauigkeiten behaftet gewesen. Vorausgesetzt eine genaue Messung der Volumina ist möglich, würde die Auswertung, ausgehend von Läsionsvolumina oder Läsionsflächen, prinzipiell zu vergleichbaren Ergebnissen führen, d.h. Krankheitsausprägung und Therapieerfolg könnten mit beiden Methoden differenziert werden. Das Instrument Läsionsflächensumme wurde einerseits der klinischen Symptomatik gegenübergestellt. Dieser Zusammenhang wurde mithilfe der Korrelation mit dem klinischen Score untersucht. Andererseits ließ der retrospektive Vergleich der Therapiegruppen anhand der Läsionsflächensumme gewisse Rückschlüsse auf die Aussagekraft dieses Instruments zu: Vorangegangene Arbeiten ohne MR-tomographische Untersuchungstechniken ließen tierexperimentell eine Überlegenheit der liposomalen Glukokortikosteroide gegenüber der Standardtherapie vermuten (Schmidt et al. 2003 b, Metselaar et al. 2003).

Mit dem klinischen Score steht ein vergleichsweise einfach durchzuführendes Instrument zur Beurteilung der Krankheitsausprägung und der Wirkung von neuen Therapieansätzen in EAE-Modellen zur Verfügung (Linker et al. 2002). Der Spearmansche Korrelationskoeffizient zwischen dem klinischen Score und der Läsionsflächensumme beträgt in dieser Arbeit für Lewisratten mit radiologisch nachgewiesenen Läsionen 0,54 ($p = 0,02$). Für das Tiermodell DA liegt dieser Korrelationskoeffizient bei 0,33 ($p = 0,225$). In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass die DA-Ratten insgesamt, gemessen am klinischen Score, weniger schwer erkrankten als die Lewisratten. Zudem wurden weniger DA-Ratten mit Läsionen in der MRT identifiziert, welches diesen Vergleich anfälliger für statistische Ausreißer machte.

Der klinische Score bildet hauptsächlich Defizite ab, die durch Läsionen auf Rückenmarksebene verursacht werden (Gold et al. 2006). Lorentzen et al. (1995) beschrieben, dass neurologische Defizite in EAE-DA-Ratten mit demyelinisierenden inflammatorischen Läsionen im Rückenmark einhergehen. Diese Läsionen konnten in der vorliegenden Arbeit methodisch bedingt nicht in der MRT dargestellt werden. Insofern überrascht die nur mäßige Korrelation klinischer Befunde mit der kraniellen Läsionslast in der MRT nicht. Dagegen gelingt es mit der MRT in EAE-Ratten Läsionen zu identifizieren, die nicht zu motorischen oder sonstigen messbaren Defiziten führen, die so genannten stillen Läsionen (Zamaroczy et al. 1991). Diese machen beispielsweise in EAE-Affen die Mehrheit der Läsionen aus (Jordan

et al. 1999). Ihre Erfassung mit der MRT erhöht die Sensitivität, positive therapeutische Effekte nachzuweisen (Jordan et al. 1999). Auch beim Menschen beobachtet man deutlich mehr Läsionen als die, die aufgrund korrespondierender Symptome einer klinischen Untersuchung zugänglich sind (Isaac et al. 1988, Koopmans et al. 1989). Bei Patienten können MS-bedingte Symptome wie z.B. Hypästhesien, kognitive Einschränkungen und Fatigue artikuliert werden, bei Versuchstieren naturgemäß nicht. Mit der MRT deckt man somit einen Bereich im Therapiemonitoring von Tiermodellen ab, der mit dem klinischen Score alleine nicht erfassbar ist.

Ein weiterer Grund für die nur mäßige Korrelation klinischer und radiologischer Befunde könnte sein, dass Läsionen, oder allgemeiner ausgedrückt krankheitsbedingte Gewebeschäden, die zu klinisch erfassbaren Defiziten führen, nur vorübergehend mit der gleichen MRT-Modalität nachweisbar sind. So unterliegen Läsionen dynamischen Prozessen, die sich auf deren Entstehung, Verteilung und Entwicklung auswirken (Stewart et al. 1991, Jordan et al. 1999). Nessler et al. (2007) beobachteten bei EAE-Mäusen, dass die Signalintensität von Läsionen in T2-gewichteten Aufnahmen in deren Entwicklung nachlässt. In EAE-Modellen können Läsionen vor klinischen oder sogar histopathologischen Manifestationen in der MRT sichtbar sein (Stewart et al. 1985, O'Brian et al. 1987, Morrissey et al. 1996). In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere einmal im MRT untersucht und somit pathologische Befunde nur zu diesem einen Zeitpunkt erfasst.

Mit der Einteilung gemäß der kombinierten Krankheitsausprägung, mithilfe klinischer Befunde (klinischer Score) und der Läsionslast (Läsionsflächensumme), in leicht, mittel- und schwer erkrankte Tiere, wurde das Ziel verfolgt, in den gesonderten statistischen Analysen Tiere mit konträren Befunden beider Parameter nicht zu berücksichtigen. Kann eine deutliche klinische Beeinträchtigung mit hohen Werten im klinischen Score, bei jedoch niedriger zerebraler Läsionslast, mit dem Vorhandensein spinaler, und damit radiologisch nicht erfasster Läsion, erklärt werden, ist der umgekehrte Fall problematischer: Einerseits kann es sich um stumme Läsionen handeln, die nicht zu motorischen oder sonstigen mit dem klinischen Score erfassbaren Defiziten führen, andererseits sind falschpositive MRT-Befunde denkbar. Hier lohnt ein Blick auf die Verteilung: Erstgenannter Fall ist deutlich häufiger: 13 von 16 Lewisratten und 22 von 32 DA-Ratten, die nicht nach der kombinierten Krankheitsausprägung eingeteilt werden konnten, wiesen hohe Werte im klinischen Score bei

4. Diskussion

gleichzeitig nicht vorhandener oder niedriger Läsionslast auf. Bei den übrigen Tieren war der umgekehrte Fall zu beobachten.

Im Vergleich der Therapiegruppen fällt zunächst auf, dass insbesondere der Anteil der Tiere mit Läsionen differiert: Sowohl bei den Lewis- als auch bei den DA-Tieren ist dieser Anteil in der Verumtherapiegruppe am niedrigsten. Im Vergleich der Mittelwerte der Läsionsflächensummen bei den Lewistherapiegruppen, lässt sich deskriptiv ein Wirkvorteil der liposomalen Glukokortikosteroide gegenüber herkömmlichem Methylprednisolon feststellen. Eine Ausnahme bildet die Prednisolonliposomentherapie in der 4-mg/kg-Körpergewicht (KG)-Dosierung, unter der gegenüber der Methylprednisolontherapie eine höhere durchschnittliche Läsionslast zu beobachten ist.

Innerhalb der Verumtherapiegruppe deutet sich eine Überlegenheit der 10-mg/kg-KG- gegenüber der 4-mg/kg-KG-Dosierung der liposomalen Glukokortikosteroide an. Zudem zeigt sich unter der Methylprednisolonliposomen- gegenüber der Prednisolonliposomentherapie eine niedrigere Läsionslast. In beiden Fällen sollten jedoch die teilweise kleinen Fallzahlen in der Interpretation berücksichtigt werden.

Gegenüber der Placebogruppe lässt sich für die Lewisratten ein statistisch signifikanter Wirkvorteil, in Hinblick auf die radiologische Krankheitsausprägung, sowohl des liposomalen Methylprednisolons als auch des liposomalen Prednisolons in der 10-mg/kg-KG-Dosierung feststellen.

Betrachtet man nur Lewistiere mit Läsionen in der MRT, so sind die Ratten der Verumtherapiegruppe am wenigsten stark und die Placebotiere deutlicher von radiologischen Erkrankungszeichen (Läsionsflächensumme) betroffen. Quantitativ zeigt sich hier ein kleiner Vorteil der 4-mg/kg-KG- gegenüber der 10-mg/kg-KG-Prednisolonliposomendosierung, jedoch ist in letzterer Gruppe der Anteil der Tiere mit Läsionen niedriger. Festzuhalten bleibt, dass bei Tieren, die mit liposomalen Glukokortikosteroiden behandelt wurden, im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen, erstens weniger Tiere radiologische Erkrankungszeichen zeigten und zweitens, wenn sie denn auffällig waren, die Läsionslast niedriger ausfiel. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit einer Arbeit von Schmidt et al. (2003 b), die eine Überlegenheit dieses neuartigen Therapieansatzes gegenüber der Standardtherapie anhand von histopathologischen Untersuchungen im Lewis-EAE-Tiermodell demonstrierten.

Beim Tiermodell DA stellt sich das Bild ähnlich dar. Alle Vergleiche der Mittelwerte der Läsionsflächensummen weisen auf einen Wirkvorteil der liposomalen Glukokortikosteroide hin. Der Vergleich nur bei Tieren mit Läsionen zeigt zwar einen leichten Vorteil der Verumtherapiegruppe, jedoch nicht so deutlich wie bei den Lewistieren. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das radiologische Krankheitsniveau insgesamt, im Vergleich zum Tiermodell Lewis, niedriger ausfiel und die angenommene Überlegenheit der liposomalen Glukokortikosteroide nicht so deutlich zum Tragen kam. Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass liposomale Glukokortikosteroide in der Behandlung von EAE-DA-Ratten bezüglich radiologischer Erkrankungszeichen der Standardtherapie überlegen sind, auch wenn das Ergebnis nicht statistisch signifikant ausfiel.

Wie beim Tiermodell Lewis konnte auch für das Tiermodell DA eine statistisch signifikant geringere Läsionslast der Verumtherapie- gegenüber der Placebogruppe gezeigt werden, nicht jedoch bei der Standardtherapie- gegenüber der Placebogruppe.

Einige Tiere wiesen trotz Therapie deutliche Läsionen auf, sowohl bei den Lewis- als auch bei den DA-Ratten. Eine Erklärung könnte sein, dass diese Tiere von vornherein schwerer von der EAE betroffen waren. Ohne Therapie hätte die EAE dieser Tiere möglicherweise einen noch schwerwiegenderen Verlauf genommen. Auch unter den Placebotieren gab es, gemessen am klinischen Score, stark und weniger stark betroffene Tiere, bei jedoch insgesamt ausgeprägterem Krankheitsniveau. Dies könnte mit der aktiven Immunisierung zusammenhängen. Bei passiv immunisierten EAE-Tieren ist ein homogenerer Krankheitsverlauf bekannt (Gold et al. 2000).

Es konnten statistisch signifikant vergrößerte Seitenventrikel bei Lewisratten mit Läsionen gegenüber solchen ohne Läsionen in der MRT gezeigt werden. Karlik et al. (1999) ebenso wie Duckers et al. (1997) beschrieben bei EAE-Lewisratten vergrößerte Ventrikel. Einschränkend sollte betont werden, dass methodenbedingt eine Abgrenzung zu unerkannt gebliebenen periventrikulären Läsionen nicht mit letzter Sicherheit möglich war. Aus diesen Überlegungen folgt, dass die Größenberechnung der Seitenventrikel beeinflusst und die tatsächliche Größe überschätzt worden sein könnte. Diese mutmaßliche Messunsicherheit liegt bei allen Tieren zugrunde. Bei Tieren mit radiologischem Läsionsnachweis ist jedoch, aufgrund der unterstellten vermehrten Krankheitsaktivität, eine höhere Anzahl von unerkannt gebliebenen

4. Diskussion

periventrikulären Läsionen zu vermuten. Die Bedeutung der tatsächlichen Seitenventrikelgröße als potentieller Marker der Krankheitsaktivität sollte, aufgrund der geschilderten diagnostischen Unsicherheiten, daher einschränkender bewertet werden. Die mit relativ geringem Zeitaufwand verbundene MR-tomographische Größenbeurteilung der Seitenventrikel, einschließlich der vermuteten und nicht sicher differenzierbaren Ventrikel/Läsionskomplexe, könnte im Sinne einer Screeningmethode erste Hinweise auf mögliche Therapieeffekte liefern.

Um zu untersuchen, ob ipsilaterale Läsionen Einfluss auf die Größe des Seitenventrikels haben, erfolgte eine zweite Betrachtung: Nur bei Tieren mit einseitigen Läsionen wurden die Seitenventrikel verglichen. Auf deskriptiver Ebene zeigte sich zumindest für rechtsseitige Läsionen tendenziell ein Zusammenhang, eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch nicht.

Bei den DA-Ratten deuteten sich Größenunterschiede der Seitenventrikel zwischen Tieren mit und ohne radiologische Krankheitszeichen an, eine statistische Signifikanz konnte jedoch nur für die linken Seitenventrikel gezeigt werden. Ebenso wie beim Tiermodell Lewis ergeben sich jedoch methodische Einschränkungen bezüglich der sicheren Differenzierung von Seitenventrikeln und unerkannten periventrikulären Läsionen.

Deutlicher als bei den Lewisratten ergab sich jedoch ein tendenzieller Zusammenhang zwischen entzündlicher Aktivität und Größe der ipsilateralen Ventrikel. So konnten für Tiere mit Läsionen nur in der linken Hemisphäre statistisch signifikant vergrößerte linke Seitenventrikel, verglichen mit der Größe der rechten Seitenventrikel, ermittelt werden. Bei Tieren mit nur in der rechten Hemisphäre gelegenen Läsionen konnten ebenfalls vergrößerte rechte Seitenventrikel gemessen werden, eine statistische Signifikanz erreichte dieses Ergebnis jedoch nicht. Da eine quantitative Abstufung der entzündlichen Aktivität bei dieser Betrachtung nicht erfolgte, bleibt zu vermuten, dass bei Tieren mit wenigen und kleinflächigen Läsionen geringere Auswirkungen auf die Ventrikel zu erwarten sind.

Neben den Größenunterschieden der Seitenventrikel wurden bei beiden Tiermodellen erhöhte Liquorsignalintensitäten bei gleichzeitig vorhandener Entzündungsaktivität in der MRT beobachtet. Duckers et al. (1997) beschrieben bei EAE-Lewisratten signalveränderte Ventrikel und vermuteten eine entzündlich bedingte Erhöhung der Proteinkonzentration im

4. Diskussion

Liquor als Ursache. Um zu untersuchen, ob diese Liquorveränderungen als weiteres Kriterium der Auswertung und damit möglicherweise auch des Therapiemonitorings dienen könnten, erfolgte die Bildung eines so genannten Liquorquotienten. Dieser war unabhängig von der bei jeder MRT-Untersuchung durchgeführten Grauwertnormalisierung, auf der dann die späteren Absolutwerte der Signalintensität basieren. Somit wurden die Liquorsignalveränderungen interindividuell vergleichbar.

Für das Tiermodell DA konnte ein statistisch hochsignifikanter Unterschied der Liquorsignalintensität zwischen Tieren mit und ohne Läsionen in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen gezeigt werden. Darüber hinaus bestand auch ein tendenzieller Zusammenhang zwischen Liquorsignalintensität und Schwere der klinisch gemessenen Krankheitssymptomatik.

Prinzipiell gibt es in der vorliegenden Untersuchung zwei Einflussgrößen, die sich auf die Liquorzusammensetzung auswirken könnten: die entzündliche Aktivität der EAE, quantifiziert über die ausgemessenen Läsionen, sowie die verwendete experimentelle Therapie. In der Standardtherapiegruppe (Methylprednisolon) und der Verumtherapiegruppe (liposomales Prednisolon oder Methylprednisolon) zeigten weniger Tiere, im Vergleich zu den Placebotieren, Erkrankungszeichen in der MRT. Somit müsste in Betracht gezogen werden, dass das therapeutisch wirksame Agens selber, d.h. die verwendeten Glukokortikosteroide, eine Verminderung der Liquorsignalintensität hervorruft. Neben der guten Fähigkeit, die Bluthirnschranke zu überwinden (Schmidt et al. 2003 b), ist eine Passage der Glukokortikosteroide über die Blutliquorschranke möglich: Uete et al. (1970) konnten bei systemischer Applikation von Methylprednisolon jedoch nur 1/10 der Serumkonzentration im Liquor beim Menschen nachweisen. Mittels liposomaler Formulierung sind hier höhere Konzentrationen des therapeutischen Agens zu erwarten (Isaev et al. 1999). Weiterhin sind auch eine direkte Passage der Glukokortikosteroide aus entzündlich verändertem ZNS-Gewebe in die angrenzenden Ventrikel bzw. eine indirekte Wirkung auf die Liquorzusammensetzung denkbar. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Liquorveränderungen durch die Krankheitsaktivität selber verursacht werden, und die o.g. Therapeutika nur indirekt, über eine Reduktion der entzündlichen Prozesse, Einfluss nehmen.

Für das Tiermodell DA konnte bei Tieren mit nachgewiesenen Läsionen in T2-gewichteten Aufnahmen eine Korrelation zwischen der zerebralen Läsionslast, ausgedrückt durch die

4. Diskussion

Läsionsflächensumme, und der Liquorintensität, ausgedrückt durch den Liquorquotienten, von 0,48 ($p = 0,071$) ermittelt werden. Tendenziell besteht somit ein Zusammenhang zwischen der zerebralen Krankheitsaktivität und der MR-tomographisch beurteilbaren Liquorzusammensetzung. Beim Tiermodell DA könnte die in der MRT gemessene Liquorintensität daher als zusätzlicher Marker des Therapiemonitorings in Betracht gezogen werden.

Wie schon erwähnt, konnte ein Zusammenhang zwischen dem klinischen Score und der Liquorintensität beobachtet werden: So besteht eine Korrelation zwischen diesem Score und dem Liquorquotienten, bei Tieren mit nachgewiesenen Läsionen, von 0,61 ($p = 0,017$). Betrachtet man zusätzlich auch Tiere ohne nachgewiesene Läsionen, ergibt sich zunächst keine Korrelation. Hier sollten die Versuchstiere, die klinisch schwer von der EAE betroffen waren, ohne dabei jedoch zerebrale Läsionen aufzuweisen, gesondert betrachtet werden: Diese Tiere müssen spinale Läsionen aufweisen, die besonders durch den klinischen Score abgebildet werden (Gold et al. 2006). Gleichzeitig könnte bei diesen Tieren die hier postulierte entzündlich veränderte Liquorintensität, gemessen in den Seitenventrikeln und dem 3. Ventrikel, durch Fehlen von zerebralen Läsionen nicht so ausgeprägt sein. Da der Liquor hauptsächlich von den inneren in Richtung der äußeren Liquorräume bzw. des Zentralkanals zirkuliert (Trepel 1999), sollten spinale Läsionen auf dessen Zusammensetzung in den Ventrikeln nur wenig Einfluss nehmen. Nimmt man diese Tiere aus der Betrachtung (Abbildungen 16 und 17), ergibt sich eine Korrelation zwischen dem klinischen Score und dem Liquorquotienten von 0,48 ($p = 0,001$).

Im Gegensatz zum Tiermodell DA konnten für das Tiermodell Lewis keine statistisch signifikanten Unterschiede der Liquorintensität zwischen Tieren mit und ohne Läsionen in der MRT ermittelt werden. Auch konnte keine Korrelation zwischen dem klinischen Score und dem Liquorquotienten ermittelt werden.

Bei Lewistieren mit Läsionen zeigt sich gegenüber läsionsfreien Tieren im Mittel ein höheres Liquorsignal. Auffällig ist die große Streuung der Liquorsignalintensität an den einzelnen Messpunkten (Tabelle 3). Insbesondere zeigen sich bei Tieren mit Läsionen durchweg größere Abweichungen vom Mittelwert. Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, da sich Konsequenzen für den tierindividuellen Liquorquotienten ergeben könnten. Dieser Quotient wurde auf der Grundlage des Mittelwertes der Liquorsignalintensitäten an den

verschiedenen Messpunkten ermittelt. Die im Zusammenhang mit der Größenvermessung der Ventrikel diskutierte Problematik von möglicherweise nicht erkannten periventrikulären Läsionen, sollte auch bei der Liquorsignalmessung berücksichtigt werden. Die Inhomogenität des Liquorsignalverhaltens kann auf fälschliche Messungen in Läsionsarealen zurückzuführen sein. Beim Tiermodell DA lässt die geringere Streuung der Messwerte, die bei läsionsfreien als auch bei läsionsbehafteten Tieren vergleichbar ausgeprägt ist, auf eine genauere und homogenere Abbildung der Liquorsignalcharakteristik schließen (Tabelle 2). Beim Tiermodell Lewis konnte insgesamt eine höhere Krankheitsaktivität beobachtet werden: Sowohl die ermittelte Zahl der nach radiologischen Kriterien als krank einzustufenden Tiere, als auch die Läsionslast im Einzelfall, war höher. Daher kann bei den Lewistieren eine größere mutmaßliche Messungengenauigkeit angenommen werden, zumal bei den Tieren mit Läsionen die vermeintlich größeren Seitenventrikel Fehlmessungen begünstigen. Es ist zu vermuten, dass die daraus resultierenden Signalinhomogenitäten den statistischen Nachweis einer erhöhten Liquorsignalintensität bei Lewistieren mit ausgeprägter Krankheitsaktivität erschweren.

Die Auswertung und Analyse von zerebralen Läsionen, Ventrikelgrößen und Liquorsignalintensitäten in diesen zwei EAE-Modellen mit den vorliegenden Techniken stellt eine zeitaufwendige Prozedur dar. Jedoch bildet das tierexperimentelle MRT-Monitoring, welches durch unterschiedliche Techniken erreicht werden kann, eine sinnvolle Ergänzung zu klinischen Scores und histopathologischen Analysen, weil ein sonst nicht erfassbarer Bereich im Therapiemonitoring abgedeckt werden kann. Standardmäßig eingesetzte wie auch neuartige Therapieansätze, die zu einer Reduktion der Läsionslast in EAE-Modellen, aber damit nicht zwingend zu einer Verbesserung im klinischen Score führen, können mithilfe der MRT untersucht werden. Gegenüber der Histologie weist die MRT den Vorteil auf, dass sie durch mehrfache Untersuchungen dynamische Prozesse, die sich auf Entstehung, Verteilung und Entwicklung von Läsionen auswirken (Stewart et al. 1991, Jordan et al. 1999), besser abbilden kann. Demgegenüber steht eine mangelnde Fähigkeit T2-gewichteter MRT-Aufnahmen, pathophysiologische Mechanismen der EAE zu differenzieren: So kann nicht zwischen früh oder spät aktiven, inaktiven oder remyelinisierenden Läsionen in EAE-Modellen unterschieden werden (Hart et al. 1998).

Sicherlich ist eine effizientere Erfassung und Auswertung radiologischer Krankheitszeichen der EAE nach standardisierten Kriterien wünschenswert. Zudem gilt es, die Spezifität von in

4. Diskussion

der MRT identifizierten Läsionen im Hinblick auf pathophysiologische Prozesse der EAE zu erhöhen, um die grundlegenden Mechanismen, speziell auch im Hinblick auf die MS, besser zu verstehen.

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung, ob die Wirksamkeit liposomaler Glukokortikosteroide, gegenüber einer Placebo- und Standardtherapiegruppe, anhand einer quantitativen Auswertung von T2-gewichteten MRT-Aufnahmen zweier Tiermodelle, demonstriert werden kann, ist mit Einschränkungen positiv zu beantworten. Bei den beiden hier eingesetzten Tiermodellen lässt sich auf deskriptiver Ebene ein Wirkvorteil der liposomalen Glukokortikosteroide gegenüber herkömmlichem Methylprednisolon ermitteln. Erwartungsgemäß ist dieser Wirkvorteil gegenüber der Placebogruppe bei beiden Tiermodellen statistisch signifikant (Ausnahme: Prednisolonliposomendosierung 4 mg/kg KG beim Lewistiermodell).

Neben der Auswertung eines konventionellen MR-Parameters (Läsionsgrößen in T2-gewichteten Aufnahmen) wurden die Seitenventrikelgröße und Liquorsignalintensität mittels quantitativer Vergleiche als weitere potentielle Marker der Erkrankungsaktivität der EAE herangezogen. Bei Tieren mit radiologischen Erkrankungszeichen konnten prominentere Seitenventrikel beobachtet werden, wobei sich das Bild bei den Lewis- deutlicher als bei den DA-Ratten darstellt. Insbesondere bei der erstgenannten Gruppe ist jedoch methodenbedingt eine durchgehend sichere Differenzierung der Ventrikel von okkulten periventrikulären Läsionen nicht anzunehmen. Man sollte daher einschränkender von Ventrikel/Läsionskomplexen sprechen, deren Ausmaße Hinweise auf die Erkrankungsaktivität liefern können. Weiterhin konnte beim Tiermodell DA ein Zusammenhang zwischen der in T2-gewichteten Aufnahmen gemessenen Läsionslast und der Liquorsignalintensität festgestellt, und damit ein weiterer potentieller Parameter im Therapiemonitoring vorgestellt werden. Auch konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der klinischen Ausprägung der Erkrankung und der Liquorsignalintensität beobachtet werden, jedoch nur bei Tieren mit zerebralen Läsionen.

Somit bietet sich für das Tiermodell Lewis das Ausmaß der Ventrikel/Läsionskomplexe als möglicher Marker der Erkrankungsaktivität der EAE und damit indirekt des Therapieerfolgs an, wohingegen beim Tiermodell DA die erhöhte Liquorsignalintensität diesbezügliche Hinweise liefern kann.

Schwächen dieser Arbeit sind zum einen, dass spinale Läsionen nicht erfasst wurden. Zum anderen waren die Untersuchungsgruppen teilweise sehr klein, wodurch die Möglichkeiten einer aussagekräftigen statistischen Auswertung eingeschränkt wurden.

Tierexperimentell ergeben sich durch die MRT-Auswertungen dieser Arbeit weitere Hinweise, dass liposomale Glukokortikosteroide in EAE-Modellen herkömmlichen Glukokortikosteroiden überlegen sein könnten. Die Ergebnisse reihen sich in bisherige Arbeiten ein (u.a. Schmidt et al. 2003 a, Schmidt et al. 2003 b), die zu dem Schluss kommen, dass dieser Therapieansatz eine effektive Alternative zur herkömmlichen Standardtherapie akuter Schübe der Multiplen Sklerose darstellen könnte. Bevor dieser jedoch als Ergänzung des Therapierepertoires Eingang findet, sind noch weitere Forschungsbemühungen, insbesondere im Hinblick auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Tiermodell zum Menschen, nötig.

Es ist darüber hinaus aber auch anzumerken, dass die Arbeit Nachteile und Einschränkungen des MR-tomographischen Nachweises der Krankheitsaktivität und damit des Therapiemonitorings in EAE-Tiermodellen aufgezeigt hat, die nicht alleine auf das spezifische Studiendesign zurückzuführen sind. Auch die Etablierung weiterer klinischer Marker, die weniger von spinalen Symptomen geprägt sind, und somit in einer höheren Fallzahl mit dem MR-tomographisch gut fassbaren zerebralen Befund in Übereinstimmung stehen, ist wünschenswert. Damit könnte ein weiterer Beitrag im Hinblick auf eine zuverlässige Reproduzierbarkeit tierexperimenteller Ergebnisse auf den an Multipler Sklerose erkrankten Menschen geliefert werden.

5. Zusammenfassung

Glukokortikosteroide, die mittels lang zirkulierender Polyethylenglykol (PEG)-Liposomen verabreicht werden, könnten eine effektive Therapieoption in der Behandlung akuter Schübe der Multiplen Sklerose darstellen. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass diese durch ihre günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften eine hohe Wirkstoffkonzentration am Ort der Entzündung erreichen. Dies führt über zusätzliche nongenomische Wirkmechanismen zu einer noch effektiveren Unterdrückung entzündlicher Prozesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde, im Rahmen einer Studie zur Maximierung der therapeutischen Effizienz liposomaler Glukokortikosteroide in zwei Tiermodellen der Multiplen Sklerose, eine quantitative Auswertung T2-gewichteter magnetresonanztomographischer Aufnahmen durchgeführt. 49 Dark-Agouti (DA)- und 45 Lewisratten bildeten hierfür das Untersuchungskollektiv. Eine induzierte experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) bildete bei den Tieren pathophysiologische Mechanismen der Multiplen Sklerose ab. Mit Hilfe eines etablierten Scores wurden Krankheitssymptome quantifiziert und mit den radiologischen Befunden in Beziehung gebracht.

Verglichen wurden bei jedem Tiermodell mehrere Therapiegruppen: Placebotiere, die lediglich Liposomen ohne therapeutisches Agens erhielten, Standardtherapietiere, die mit herkömmlichem Methylprednisolon behandelt wurden, und Verumtherapietiere, denen liposomales Prednisolon in einer Dosierung (Tiermodell DA) bzw. liposomales Prednisolon oder Methylprednisolon in jeweils zwei verschiedenen Dosierungen (Tiermodell Lewis) verabreicht wurden.

Die Quantifizierung radiologisch festgestellter Erkrankungszeichen erfolgte mithilfe der ausgemessenen Fläche zerebraler Läsionen. Die Summe der Läsionsflächen (Läsionsflächensumme) bildete für jedes Tier das Maß der Krankheitsausprägung, mit dessen Hilfe die Therapiegruppen verglichen wurden. Aus der Literatur sind Auswirkungen der Erkrankungsaktivität auf Größe der Ventrikel und Liquorsignalintensität bekannt. Mittels quantitativer Betrachtungen wurden daher die Seitenventrikel und das Liquorsignalverhalten ebenso im Hinblick auf ihr Potential im Therapiemonitoring untersucht.

Erwartungsgemäß konnte sowohl für das DA- als auch für das Lewis-Tiermodell, im Vergleich der Läsionsflächensummen, ein statistisch signifikanter und dosisabhängiger Wirkvorteil liposomaler Glukokortikosteroide, gegenüber Placebothherapie, ermittelt werden. Eine Ausnahme hiervon bildete eine niedrig dosierte Therapie mit liposomalem Prednisolon, für die keine statistisch signifikante Reduktion der Läsionslast gegenüber Placebothherapie gezeigt werden konnte. Gegenüber den mit herkömmlichem Methylprednisolon behandelten Tieren ergaben sich auf deskriptiver Ebene in beiden Tiermodellen Hinweise für einen Wirkvorteil liposomaler Glukokortikosteroide.

Zwischen radiologischem Befund und klinischem Score wurde nur eine mäßige Korrelation ermittelt. Statistisch signifikant vergrößerte Seitenventrikel wurden bei Lewisratten mit Läsionen in der MRT, gegenüber solchen ohne Läsionen, beobachtet. Methodenbedingt wurde die tatsächliche Größe der Seitenventrikel eher überschätzt, da eine durchgehend sichere Differenzierung zu okkulten periventrikulären Läsionen nicht anzunehmen ist.

Beim Tiermodell DA konnte bei Ratten mit radiologisch nachgewiesenen Läsionen, gegenüber Ratten ohne Läsionen, eine statistisch signifikant erhöhte Liquorsignalintensität gemessen werden. Weiterhin konnten in diesem Tiermodell Korrelationen zwischen der Liquorsignalintensität und der zerebralen Läsionslast bzw. der Liquorsignalintensität und dem klinischen Score herausgearbeitet werden, letztere jedoch nur bei Tieren mit radiologisch nachgewiesenen Läsionen.

Methodische Schwächen der vorliegenden Arbeit sind, dass spinale Läsionen nicht erfasst wurden und die Anzahl der Versuchstiere in den Untergruppen differierte, so dass eine optimale Vergleichbarkeit nicht gegeben war.

Mit dieser Arbeit ergeben sich anhand einer quantitativen magnetresonanztomographischen Auswertung weitere Hinweise, dass liposomale Glukokortikosteroide in EAE-Tiermodellen der Multiplen Sklerose der Standardtherapie überlegen sind. Mit der Größe der Seitenventrikel beim Tiermodell Lewis und der Liquorsignalintensität beim Tiermodell DA werden weitere potentielle Parameter im MRT-Monitoring der Erkrankungsaktivität vorgestellt.

6. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Seite 9
Tabelle 2	Seite 26
Tabelle 3	Seite 40

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Seite 3
Abbildung 2	Seite 10
Abbildung 3	Seite 10
Abbildung 4	Seite 13
Abbildung 5	Seite 13
Abbildung 6	Seite 14
Abbildung 7	Seite 14
Abbildung 8	Seite 18
Abbildung 9	Seite 20
Abbildung 10	Seite 21
Abbildung 11	Seite 22
Abbildung 12	Seite 23
Abbildung 13	Seite 24
Abbildung 14	Seite 25
Abbildung 15	Seite 27
Abbildung 16	Seite 28
Abbildung 17	Seite 28
Abbildung 18	Seite 29
Abbildung 19	Seite 30
Abbildung 20	Seite 31
Abbildung 21	Seite 32
Abbildung 22	Seite 33
Abbildung 23	Seite 34
Abbildung 24	Seite 35
Abbildung 25	Seite 36
Abbildung 26	Seite 37
Abbildung 27	Seite 38
Abbildung 28	Seite 39

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
CFA	Complete Freund´s adjuvans
DA	Dark Agouti
EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
FOV	Field of view
KG	Körpergewicht
MBP	Myelin-basisches Protein
MOG	Myelinoligodendrozytenglykoprotein
MP	Methylprednisolon
MPL	Methylprednisolonliposomen
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
ms	Millisekunde
MTI	Magnetization transfer imaging
MTR	Magnetization transfer ratio
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglykol
PL	Prednisolonliposomen
SA	Standardabweichung
s.c.	subkutan
Stdf.	Standardfehler
TE	Time to echo
TR	Time to repeat
ZNS	Zentralnervensystem

8. Literaturverzeichnis

Barnes PJ, Adcock I (1993): Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 14, 436-441

Barnes PJ, Karin M (1997): Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336, 1066-1071

Bermel A, Fisher E and Cohen JA (2008): The use of MR imaging as an outcome measure in multiple sclerosis clinical trials. *Neuroimaging Clin N Am* 18, 687-701

Boumpas T, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE (1993): Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119, 1198-1208

Brochet B, Deloire MS, Touil T, Anne O, Caille JM, Dousset V, Petry KG (2006): Early macrophage MRI of inflammatory lesions predicts lesion severity and disease development in relapsing EAE. *Neuroimage* 32, 266-274

Buttgereit F, Wehling M, Burmester GR (1998): A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis Rheum* 41, 761-767

Dams ET, Oyen WJ, Boerman OC, Storm G, Laverman P, Kok PJ, Buijs WC, Bakker H, van der Meer JW, Corstens FH (2000): ^{99m}Tc-PEG liposomes for the scintigraphic detection of infection and inflammation: clinical evaluation. *J Nucl Med* 41, 622-630

Deloire-Grassin MS, Brochet B, Quesson B, Delalande C, Dousset V, Canioni P, Petry KG (2000): In vivo evaluation of remyelination in rat brain by magnetization transfer imaging. *Imaging J Neurol Sci* 178, 10-16

Dousset V, Grossman RI, Ramer KN, Schnall MD, Young LH, Gonzalez-Scarano F, Lavi E, Cohen JA (1992): Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: lesion characterization with magnetization transfer imaging. *Radiology* 182, 483-491

Dousset V, Ballarino L, Delalande C, Coussemaq M, Canioni P, Petry KG, Caille JM (1999): Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted,

8. Literaturverzeichnis

conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Neuroradiol* 20, 223-227

Duckers HJ, Muller HJ, Verhaagen J, Nicolay K, Gispen WH (1997): Longitudinal in vivo magnetic resonance imaging studies in experimental allergic encephalomyelitis: effect of a neurotrophic treatment on cortical lesion development. *Neuroscience* 77, 1163-1173

Filippi M, Rocca MA, Minicucci L, Martinelli V, Ghezzi A, Bergamaschi R, Comi G (1999): Magnetization transfer imaging of patients with definite MS and negative conventional MRI. *Neurology* 52, 845-848

Filippi M, Dousset V, McFarland HF, Miller DH, Grossman RI (2002 a): Role of magnetic resonance imaging in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: consensus report of the White Matter Study Group. *J Magn Reson Imaging* 15, 499-504

Filippi M, Tortorella C, Rovaris M (2002 b): Magnetic resonance imaging of multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 12, 289-301

Floris S, Blezer EL, Schreiber G, Dopp E, van der Pol SM, Schadee-Eestermans IL, Nicolay K, Dijkstra CD, de Vries HE (2004): Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* 127, 616-627

Friese MA, Montalban X, Willcox N, Bell JI, Martin R, Fugger L (2006): The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain* 129, 1940-1952

Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y (1994): Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res* 54, 987-992

Gold R, Rieckmann P: Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose, 3. Auflage; UNI-MED Verlag AG, Bremen 2004

8. Literaturverzeichnis

Gold R, Hartung HP, Toyka KV (2000): Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today* 6, 88-91

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

Grossman RI, Lisak RP, Macchi PJ, Joseph PM (1987): MR of acute experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Neuroradiol* 8, 1045-1048

Hart BA, Bauer J, Muller HJ, Melchers B, Nicolay K, Brok H, Bontrop RE, Lassmann H, Massacesi L (1998): Histopathological characterization of magnetic resonance imaging-detectable brain white matter lesions in a primate model of multiple sclerosis: a correlative study in the experimental autoimmune encephalomyelitis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *Am J Pathol* 153, 649-663

Hawkins CP, Mackenzie F, Tofts P, du Boulay EP, McDonald WI (1991): Patterns of blood-brain barrier breakdown in inflammatory demyelination. *Brain* 114, 801-810

Heckl S, Nagele T, Herrmann M, Gartner S, Klose U, Schick F, Weissert R, Kuker W (2004): Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): lesion visualization on a 3 Tesla clinical whole-body system after intraperitoneal contrast injection. *Rofo* 176, 1549-1554

Inglese M, Bester M (2010): Diffusion imaging in multiple sclerosis: research and clinical implications. *NMR Biomed* 23, 865-872

Inglese M, Grossman RI, Filippi M (2005): Magnetic resonance imaging monitoring of multiple sclerosis lesion evolution. *J Neuroimaging* 15, 22S-29S

Isaac C, Li DK, Genton M, Jardine C, Grochowski E, Palmer M, Kastrukoff LF, Oger J, Paty DW (1988): Multiple sclerosis: a serial study using MRI in relapsing patients. *Neurology* 38, 1511-1515

8. Literaturverzeichnis

Isaev VG, Garmaeva TTs, Skorokhod AA, Parovichnikova EN, Tiurina NG, Kucher RA, Vitvitskiĭ VM, Ataulakhanov FI, Savchenko VG (1999): Immobilized forms of daunorubicin in patients with acute leukemia. *Ter Arkh* 71, 32-37

Jordan EK, McFarland HI, Lewis BK, Tresser N, Gates MA, Johnson M, Lenardo M, Matis LA, McFarland HF, Frank JA (1999): Serial MR imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by human white matter or by chimeric myelin-basic and proteolipid protein in the common marmoset. *Am J Neuroradiol* 20, 965-976

Kappos L, Stadt D, Ratzka M, Keil W, Schneiderbanger-Grygier S, Heitzer T, Poser S, Nadjmi M (1988): Magnetic resonance imaging in the evaluation of treatment in multiple sclerosis. *Neuroradiology* 30, 299-302

Kappos L, Moeri D, Radue EW, Schoetzau A, Schweikert K, Barkhof F, Miller D, Guttman CR, Weiner HL, Gasperini C, Filippi M (1999): Predictive value of gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging for relapse rate and changes in disability or impairment in multiple sclerosis: a meta-analysis. Gadolinium MRI Meta-analysis Group. *Lancet* 353, 964-969

Karlik SJ, Wong C, Gilbert JJ, Noseworthy JH (1989): NMR studies in the relapsing experimental allergic encephalomyelitis (EAE) model of multiple sclerosis in the strain 13 guinea pig. *Magn Reson Imaging* 7, 463-473

Karlik SJ, Munoz D, St Louis J, Strejan G (1999): Correlation between MRI and clinicopathological manifestations in Lewis rats protected from experimental allergic encephalomyelitis by acylated synthetic peptide of myelin basic protein. *Magn Reson Imaging* 17, 731-737

Koopmans RA, Li DK, Oger JJ, Mayo J, Paty DW (1989): The lesion of multiple sclerosis: imaging of acute and chronic stages. *Neurology* 39, 959-963

Laverman P, Boerman OC, Oyen WJ, Dams ET, Storm G, Corstens FH (1999): Liposomes for scintigraphic detection of infection and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev* 37, 225-235

8. Literaturverzeichnis

Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R (2002): CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8, 620-624

Lorentzen JC, Issazadeh S, Storch M, Mustafa MI, Lassman H, Linington C, Klareskog L, Olsson T (1995): Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. *J Neuroimmunol* 63, 193-205

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717

Lycklama a Nijeholt G, Barkhof F (2003): Differences between subgroups of MS: MRI findings and correlation with histopathology. *J Neurol Sci* 206, 173-174

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, 121-127

Meeson AP, Piddlesden S, Morgan BP, Reynolds R (1994): The distribution of inflammatory demyelinated lesions in the central nervous system of rats with antibody-augmented demyelinating experimental allergic encephalomyelitis. *Exp Neurol* 129, 299-310

Metselaar JM, Wauben MH, Wagenaar-Hilbers JP, Boerman OC, Storm G (2003): Complete remission of experimental arthritis by joint targeting of glucocorticoids with long-circulating liposomes. *Arthritis Rheum* 48, 2059-2066

Metselaar JM, van den Berg WB, Holthuysen AE, Wauben MH, Storm G, van Lent PL (2004): Liposomal targeting of glucocorticoids to synovial lining cells strongly increases therapeutic benefit in collagen type II arthritis. *Ann Rheum Dis* 63, 348-353

Morrissey SP, Stodal H, Zettl U, Simonis C, Jung S, Kiefer R, Lassmann H, Hartung HP, Haase A, Toyka KV (1996): In vivo MRI and its histological correlates in acute adoptive transfer experimental allergic encephalomyelitis. Quantification of inflammation and oedema. *Brain* 119, 239-248

Namer IJ, Steibel J, Poulet P, Armspach JP, Mohr M, Mauss Y, Chambron J (1993): Blood-brain barrier breakdown in MBP-specific T cell induced experimental allergic encephalomyelitis. A quantitative in vivo MRI study. *Brain* 116, 147-159

Namer I J, Steibel J, Poulet P, Mauss Y, Armspach JP, Eclancher B, Chambron J (1994): Hyperbaric oxygen treatment in acute experimental allergic encephalomyelitis. Contribution of magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 1, 308-312

Nessler S, Boretius S, Stadelmann C, Bittner A, Merkler D, Hartung HP, Michaelis T, Bruck W, Frahm J, Sommer N, Hemmer B (2007): Early MRI changes in a mouse model of multiple sclerosis are predictive of severe inflammatory tissue damage. *Brain* 130, 2186-2198

O'Brien JT, Noseworthy JH, Gilbert JJ, Karlik SJ (1987): NMR changes in experimental allergic encephalomyelitis: NMR changes precede clinical and pathological events. *Magn Reson Med* 5, 109-117

Paty DW, Li DK, Koopmans R (1992): MRI in monitoring the treatment of multiple sclerosis: concerted action guidelines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, 978

Pender MP, Nguyen KB, McCombe PA, Kerr JF (1991): Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 104, 81-87

Rausch M, Hiestand P, Baumann D, Cannet C, Rudin M (2003): MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn Reson Med* 50, 309-314

Schiffelers RM, Banciu M, Metselaar JM, Storm G (2006): Therapeutic application of long-circulating liposomal glucocorticoids in auto-immune diseases and cancer. *J Liposome Res*

16, 185-194

Schmidt J, Gold R, Schonrock L, Zettl UK, Hartung HP, Toyka KV (2000): T-cell apoptosis in situ in experimental autoimmune encephalomyelitis following methylprednisolone pulse therapy. *Brain* 123, 1431-1441

Schmidt J, Metselaar JM, Gold R (2003 a): Intravenous liposomal prednisolone downregulates in situ TNF-alpha production by T-cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Histochem Cytochem* 51, 1241-1244

Schmidt J, Metselaar JM, Wauben MH, Toyka KV, Storm G, Gold R (2003 b): Drug targeting by long-circulating liposomal glucocorticosteroids increases therapeutic efficacy in a model of multiple sclerosis. *Brain* 126, 1895-1904

Senior J, Gregoriadis G (1982): Is half-life of circulating liposomes determined by changes in their permeability? *FEBS Lett* 145, 109-114

Senior J (1987): Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 3, 123-193

Soloman R, Gabizon AA (2008): Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma* 8, 21-32

Steinbrecher A, Weber T, Neuberger T, Mueller AM, Pedre X, Giegerich G, Bogdahn U, Jakob P, Haase A, Faber C (2005): Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat spinal cord: lesion detection with high-resolution MR microscopy at 17.6 T. *Am J Neuroradiol* 26, 19-25

Stewart WA, Alvord EC, Hrubby S, Hall LD, Paty DW (1985): Early detection of experimental allergic encephalomyelitis by magnetic resonance imaging. *Lancet* 1985, 2, 898

Stewart WA, Alvord EC Jr, Hrubby S, Hall LD, Paty DW (1991): Magnetic resonance imaging of experimental allergic encephalomyelitis in primates. *Brain* 114, 1069-1096

8. Literaturverzeichnis

Trepel M: Neuroanatomie: Struktur und Funktion, 2. Auflage; Urban & Fischer Verlag, München 1999

Uete T, Nishimura S, Oya H, Shimomura T, Tatebayashi Y (1970): Corticosteroid levels in blood and cerebrospinal fluid in various diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 30, 208-214

Verhoye MR, Gravenmade EJ, Raman ER, Van Reempts J, Van der Linden A (1996): In vivo noninvasive determination of abnormal water diffusion in the rat brain studied in an animal model for multiple sclerosis by diffusion-weighted NMR imaging. *Magn Reson Imaging* 14, 521-532

Wehling M (1997): Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59, 365-393

Yousry TA, Berry I, Filippi M (1998): Functional magnetic resonance imaging in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64, 85-87

Zamaroczy D, Schluesener HJ, Jolesz FA, Sobel RA, Colucci VM, Weiner HL, Sandor T (1991): Differentiation of experimental white matter lesions using multiparametric magnetic resonance measurements. *Invest Radiol* 26, 317-324

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Michael Knauth für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation, die konstruktive Kritik an meiner Arbeit und Korrektur des Textes.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexander Mohr für die gute Betreuung und Unterstützung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ralf Gold sowie Herrn Dr. Ralf Linker danke ich für fachlichen Rat sowie für die Möglichkeit, die Daten im Rahmen der Studie erheben und auswerten zu dürfen.

Herrn Dr. Ingo Bulla sowie den Assistenten der Abteilung Medizinische Statistik danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der neuroradiologischen Abteilung Göttingen für die Unterstützung in der Durchführung der MRT-Untersuchungen.