Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die axonale Schädigung bei der Multiplen Sklerose: Korrelation von Neurofilament Leichtketten im Serum mit histologischen Markern der Axonschädigung und der Klinik

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Anne-Sophie Lydia Dietmann, geb. Beutler

aus

Friedrichroda

Göttingen, den 22.02.2022

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. med I. Metz

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med P. Huppke

Prüfungskommission

Referent/in Prof. Dr. med I. Metz

Ko-Referent/in: …….

Drittreferent/in: …….

Datum der mündlichen Prüfung: …….

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die axonale Schädigung bei der Multiplen Sklerose: Korrelation von Neurofilament Leichtketten im Serum mit histologischen Markern der Axonschädigung und der Klinik" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 22.02.2022 ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... **V**

TABELLENVERZEICHNIS ..... **VI**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... **VII**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 ALLGEMEINES ZUR MULTIPLEN SKLEROSE 1
1.2 EPIDEMIOLOGIE 1
1.3 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE 1
1.4 DIAGNOSEKRITERIEN 2
1.5 KLINISCHE SYMPTOMATIK UND VERLAUFSFORMEN 2
1.6 DIE EXPANDED DISABILITY STATUS SCALE 4
1.7 THERAPIE 4
1.8 PATHOLOGIE DER MULTIPLEN SKLEROSE 5
1.8.1 Demyelinisierende Läsionsaktivitäten und *Normal Appearing White Matter* 5
1.8.2 Immunsubtypen 6
1.8.3 Der axonale Schaden 7
1.8.3.1 Die akute axonale Schädigung 8
1.8.3.2 Die Reduktion der axonalen Dichte 8
1.8.4 Neurofilamente 9
1.9 NACHWEISMETHODEN DER AXONALEN SCHÄDIGUNG 11
1.9.1 Akute axonale Schädigung (Färbung mit anti-Amyloid Precursor Protein-Ak) 11
1.9.2 Reduktion der axonalen Dichte (Versilberung nach Bielschowsky) 12
1.9.3 Reduktion der axonalen Dichte (Neurofilament Leichtketten-Färbung) 12
1.10 DIE SIMOA-TECHNOLOGIE 12
1.11 ZIEL UND METHODIK DER DOKTORARBEIT 13

2 MATERIAL UND METHODEN **15**

2.1 STUDIENKOHORTE UND EINSCHLUSSKRITERIEN 15
2.2 HISTOLOGISCHE NACHWEISMETHODEN 15
2.2.1 Staging 16
2.2.2 Mapping 16
2.2.3 Vorbereitung des Gewebes und Entparaffinierung 17
2.2.4 Bielschowsky-Silberimprägnation 17
2.2.5 Immunhistochemische Färbung des Amyloid Precursor Proteins (APP) 17
2.2.6 Immunhistochemische Färbung der Neurofilament Leichtketten 18
2.2.7 Auswertungen 19
2.2.7.1 Akute axonale Schädigung (APP) 19
2.2.7.2 Axonale Dichte (Bielschowsky Versilberung, NEFL) 19
2.3 MESSUNG DER NEUROFILAMENT LEICHTKETTEN MITTELS SIMOA 20
2.4 KLINISCHE PARAMETER 22
2.5 STATISTISCHE ANALYSE 22

3 ERGEBNISSE **23**

3.1 EPIDEMIOLOGISCHE UND KLINISCHE DATEN 23
3.2 HISTOLOGIE 25
3.2.1 Akute axonale Schädigung in der anti-APP-Färbung 25
3.2.2 Axonale Dichte in der Bielschowsky-Versilberung 26
3.2.3 Axonale Dichte in der NEFL-Färbung 27
3.2.4 Die axonale Schädigung in Bezug auf das Geschlecht 28
3.2.5 Axonale Schädigung in Bezug auf das Alter 28
3.3 NEUROFILAMENT LEICHTKETTEN IM SERUM 28
3.3.1 Neurofilament Leichtketten im Serum hirnbiopsierter Patienten 28
3.3.2 Vergleich sNfL-Werte in Bezug auf das Alter 30
3.3.3 Vergleich der sNfL-Werte in Bezug auf den zeitlichen Abstand zur Biopsie 30
3.3.4 Vergleich der sNfL-Werte zwischen den Geschlechtern 31
3.3.5 Vergleich der sNfL-Werte bei Schubereignis vor der Blutentnahme 31
3.3.6 Vergleich der sNfL-Werte bei Medikamentengabe vor der Blutentnahme 32
3.3.7 Vergleich der sNfL-Werte bei offener oder stereotaktischer Biopsie 33
3.4 KORRELATIONEN ZWISCHEN DER AXONALEN SCHÄDIGUNG UND DEN NEUROFILAMENT LEICHTKETTEN IM SERUM 33
3.4.1 Korrelationen der akuten axonalen Schädigung (APP-positive Sphäroide) mit den sNfL .. 33
3.4.2 Korrelationen der axonalen Dichte (Bielschowsky-Versilberung) mit den sNfL 33
3.4.3 Korrelationen der NEFL-Färbung mit sNfL 34
3.4.4 Annäherung eines Modells zur Erklärung der sNfL-Werte 34
3.5 KORRELATIONEN ZWISCHEN DEN NEUROFILAMENT LEICHTKETTEN IM SERUM UND DER KLINISCHEN BEHINDERUNG 38

4 DISKUSSION 41

4.1 NEUROFILAMENT IM SERUM 41
4.2 DIE AKUTE AXONALE SCHÄDIGUNG 45
4.3 DIE AXONALE DICHTE 46
4.4 DIE NEUROFILAMENT LEICHTKETTEN-FÄRBUNG 49
4.5 KORRELATIONEN MIT DEM EDSS-SCORE 49
4.6 WEITERE ÜBERLEGUNGEN 50

5 ZUSAMMENFASSUNG 51

6 ANHANG 53

6.1 HISTOLOGISCHE PARAMETER 53
6.2 SERUMPARAMETER 55

7 LITERATURVERZEICHNIS 56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die klassischen Verlaufsformen der MS 4
Abbildung 2 Schematische Darstellung einer Läsion 5
Abbildung 3 Einteilung der Immunsubtypen 7
Abbildung 4 Die akute axonale Schädigung 11
Abbildung 5 Die axonale Dichte 12
Abbildung 6 Funktionsprinzip eines SiMoA 21
Abbildung 7: Die Anzahl APP-positiver Sphäroide in verschiedenen Läsionsaktivitäten sowie der NAWM. 26
Abbildung 8: Die axonale Dichte in den verschiedenen Läsionsaktivitäten sowie der NAWM in der Bielschowsky-Versilberung. 27
Abbildung 9: Die axonale Dichte in verschiedenen Läsionsaktivitäten sowie der NAWM in der NEFL-Färbung. 28
Abbildung 10: sNfL-Werte biopsierter MS-Patienten zum Zeitpunkt der ersten (Baseline), zweiten (Follow-up) BE und gesunde Kontrollen 30
Abbildung 11: Korrelation zwischen den sNfL-Werten und dem zeitlichen Abstand der ersten und zweiten BE zur Bx 31
Abbildung 12: sNfL-Werte in Abhängigkeit eines Schubereignisses sechs Monate vor erster Blutentnahme 32
Abbildung 13 Korrelation zwischen den sNfL-Werten der zweiten BE und der axonalen Dichte in der NAWM in der Bielschowsky-Versilberung. 34
Abbildung 14: Partielle Regressionsplots des Modells mit sNfL 38
Abbildung 15: Korrelation zwischen sNfL-Werten der ersten BE und dem EDSS zum Zeitpunkt der Biopsie. 39
Abbildung 16: sNfL-Werte korrelieren mit dem EDSS-Score nach einem Jahr und beim letzten Follow-up. 40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Deskriptive Statistik der demographischen und klinischen Variablen der Patienten zum Zeitpunkt der Bx, der ersten und zweiten Blutentnahme 24
Tabelle 2 Krankheitsverlauf der Patienten zum Zeitpunkt der Bx/ nach Indexattacke, die zur Biopsie führte und beim letzten Follow-up 25
Tabelle 3 Modell zur Erklärung von sNfL-Werten 36

Abkürzungsverzeichnis

APP	*Amyloid-Precursor Protein*
BE	Blutentnahme
Bx	Biopsie
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom *(Clinically Isolated Syndrome)*
CNP	2‘,3‘-Cyclic Nucleotide 3’Phosphodiesterase
CSF	Liquor *(Cerebrospinal Fluid)*
DM	Demyelinisierung
EA	frühaktiv *(Early Active)*
ECL	Elektrochemiluminiszenz-basierender Enzyme-linked immunosorbent assay
EDSS	*Expanded Disability Status Scale*
ELISA	Konventioneller Enzyme-linked immunosorbent assay
HE	Hämatoxilin-Eosin
HDCS	hochdosierte Kortikosteroidtherapie
IA	inaktiv *(Inactive)*
LA	spätaktiv *(Late Active)*
LFB-PAS	Luxol Fast Blue / Periodic-Acid-Schiff-Stain
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
mAK	monoklonaler Antikörper
MBP	Myelin-Basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NAWM	normal erscheinende weiße Substanz *(Normal Appearing White Matter)*
NEFL	Neurofilament Leichtketten in der immunhistochemischen Färbung
pAK	polyklonaler Antikörper
PLP	Proteolipid-Protein
PPMS	*Primary Progressive Multiple Sclerosis* (primär progrediente MS)

PPWM	periläsionale weiße Substanz (P*eriplaque White Matter)*
RRMS	schubförmige MS ‘(*Relapsing Remitting Multiple Sclerosis)*
SiMoA	*Single Molecule Array*
sNfL	Neurofilament Leichtketten im Serum *(Serum Neurofilament Light chains)*
SPMS	*Sekundär progrediente MS (Secondary Progressive Multiple Sclerosis)*
TMB	Tetramethylbenzene

1 Einleitung

1.1 Allgemeines zur Multiplen Sklerose

Bei der Multiple Sklerose (Encephalomyelitis disseminata, kurz MS) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche entmarkende Erkrankung des zentralen Nervensystems (Charcot 1868).

1.2 Epidemiologie

Die MS stellt den häufigsten Grund einer nicht-traumatischen Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar (Kuhle et al. 2016b).

Diese Erkrankung betrifft weltweit 2,5 Millionen Menschen, etwa 700 000 davon in Europa (Montalban et al. 2018). Der Erkrankungsbeginn liegt zumeist im jungen Erwachsenenalter, mit einem Häufigkeitsgipfel um das 30. Lebensjahr, wobei auch Kinder an MS erkranken können (Polman et al. 2011). Es sind etwa doppelt bis dreimal so viele Frauen wie Männer betroffen (Bhan et al. 2018; Montalban et al. 2018). Es erkranken vor allem Menschen in den nördlichen und südlichen gemäßigten Breiten (Martyn et al. 1997).

1.3 Ätiologie und Pathogenese

Bisher gibt es keine bekannte Ursache für die MS, wenngleich das Verständnis der Pathogenese wächst. Die MS ist vermutlich eine autoimmun bedingte Erkrankung, die neben einer Entmarkung chronische Entzündungsprozesse aufweist, die permanent die neuroaxonale Homöostase stören und zu einer neuroaxonalen Degeneration führen (Friese et al. 2014). Nach derzeitigem Verständnis spielen hierbei aktivierte Mikroglia, oxidativer Stress und geschädigte Mitochondrien eine Schlüsselrolle für die neuroaxonale Schädigung (Haider et al. 2016).

Bis dato wurden diverse genetische und Umweltfaktoren identifiziert, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MS bedingen. Ein wesentlicher Risikofaktor sind bestimmte Varianten des *Human Leukocyte Antigen-Komplexes* (HLA), die derzeit Gegenstand weiterer Forschung sind (IMSGC 2013). Darüber hinaus gibt es starke Evidenzen dafür, dass

Umweltfaktoren in der Pathogenese beteiligt sind. Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus, Fettleibigkeit und Nikotinabusus gelten als weitere Risikofaktoren (Harroud und Richards 2018; Waubant et al. 2019). In Fall-Kontroll-Studien konnte gezeigt werden, dass reduzierte Vitamin-D Spiegel mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einer MS einhergehen, respektive gezeigt werden konnte, dass hohe Vitamin-D Spiegel mit einem reduzierten Erkrankungsrisiko einhergehen (Harroud und Richards 2018).

1.4 Diagnosekriterien

Zur Diagnose einer MS ist der Nachweis von zeitlich und örtlich disseminiert auftretenden ZNS-Läsionen die Grundvoraussetzung. Die klinische Symptomatik kann zur Beurteilung ausreichen, wenn Differentialdiagnosen entsprechend verworfen werden können. Das Auftreten einer zweiten Exazerbation (Schub) mit neuen Symptomen führt zur Diagnose einer klinisch definierten MS (Lublin et al. 2014). Darüber hinaus kann eine MS auch bei einem neurologisch nachgewiesenen neuen Herd diagnostiziert werden, wenn es in der Vergangenheit Symptome gab, die einer Schubsymptomatik entsprachen (Polman et al. 2011).

Ab 1982 galten die Poser-Kriterien zur Diagnostik einer MS. Die McDonald Kriterien integrierten ab dem Jahr 2000 MRT- und klinische Befunde für die Diagnose einer MS, um eine MS auch unabhängig von einem zweiten Schub diagnostizieren zu können. In der MRT werden zeitlich und örtlich disseminierte Läsionsherde nachgewiesen. Zudem können Läsionen in ihrer Größe, ihrer Häufigkeit und ihrer Lokalisation über die Zeit dokumentiert werden.

Im Jahr 2017 wurden die McDonald Kriterien zur Diagnose einer MS letztmalig überarbeitet (Poser et al. 1983; McDonald et al. 2001; Fangerau et al. 2004; Polman et al. 2011; Thompson et al. 2018).

1.5 Klinische Symptomatik und Verlaufsformen

Die MS kann sehr variable Krankheitsverläufe aufweisen (vgl. Abbildung 1). Hierzu zählen die häufigste Verlaufsform der schubförmigen MS (RRMS), die primär (PPMS) und sekundär progrediente MS (SPMS), die schubförmig progrediente MS (PRMS), sowie die Sonderformen des klinisch isolierten Syndroms (CIS) und des radiologisch isolierten

Syndroms (RIS) (Lublin et al. 2014). Eine MS äußert sich durch unterschiedliche neurologische Defizite (Oh et al. 2018).

Die RRMS ist die häufigste Form einer MS und betrifft ungefähr 85 – 90 % aller Patienten. Diese Verlaufsform geht mit Schüben einher. Zeichen eines Schubes können Sensibilitäts- und Gangstörungen oder Optikusneuritiden sein. Weiterhin typisch können Hirnstammzeichen auftreten. Ein Schub besteht per Definition über mehr als 24 Stunden, ohne gleichzeitiges Vorhandensein einer Infektion oder Fiebers, und mit partieller oder kompletter Rückbildung der neurologischen Symptome (Harroud und Richards 2018; Waubant et al. 2019). Zwischen den Schüben besteht keine Zunahme der Behinderung (Katz Sand 2015; Harris et al. 2017).

Das CIS beschreibt das einmalige Auftreten neurologischer Defizite, welche typisch für eine Demyelinisierung sind. Bei diesen Patienten besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit des Übergangs in eine RRMS, wenngleich zu diesem Zeitpunkt die Diagnosekriterien nicht erfüllt sind (Katz Sand 2015; Zetterberg und Svenningsson 2019).

Die SPMS entwickelt sich im Verlauf einer RRMS und ist gekennzeichnet durch eine langsam fortschreitende Verschlechterung des Gesundheitszustands über mindestens sechs Monate, die durch vorangegangene Schübe nicht erklärt werden kann. Es können jedoch aufgelagerte Schübe in der progredienten Phase auftreten. Die Diagnose dieser Verlaufsform wird meist retrospektiv gestellt, da es derzeit keine klaren klinischen, bildgebenden, immunologischen oder pathologischen Kriterien gibt, die den Übergang von einer RRMS zu einer SPMS anzeigen (Lublin et al. 2014).

Im Gegensatz zur SPMS besteht bei der PPMS seit Krankheitsbeginn eine stetige Zunahme der Behinderung über mindestens 12 Monate, ohne dass jemals ein schubförmiger Verlauf bestand. Von allen MS-Erkrankten haben 10 – 15 % eine PPMS (Montalban et al. 2018).

Aus den zuvor beschriebenen Verläufen lässt sich die Mischform schubförmig-progrediente MS ableiten, die eine fortschreitende Verschlechterung der Behinderung bei gleichzeitig schubförmigen Verlauf zeigt (Lublin et al. 2014).

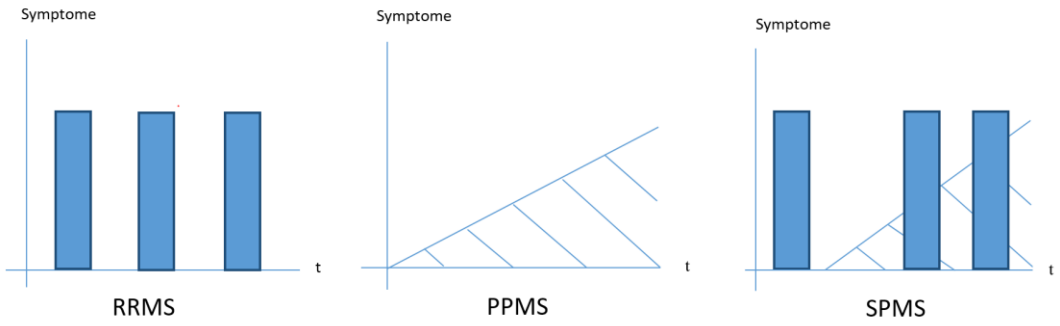


Abbildung 1 Die klassischen Verlaufsformen der MS

Das RIS beschreibt eine Sonderform der MS. Hierbei handelt es sich um Patienten, die keine typische klinische Symptomatik aufweisen, jedoch die Barkhoff-Kriterien für eine MS erfüllen (Katz Sand 2015). Dabei handelt es sich um radiologische Kriterien, die aufgrund des läsionalen Verteilungsmusters in der T2-Wichtung für eine MS sprechen (Sastre-Garriga et al. 2004).

1.6 Die Expanded Disability Status Scale

Mit der Expanded Disability Status Scale (EDSS) wird die klinische Behinderung der Patienten standardisiert bewertet. Dies dient zur Beurteilung der Behinderung im MS-Verlauf, aber beispielhaft auch bei klinischen Studien zur Beurteilung der Wirksamkeit von Medikamenten. Nach einer standardisierten neurologischen Untersuchung wird der Grad der Behinderung auf einer Skala von 0 (keine Behinderung) bis 10 (Tod durch MS) eingeordnet (Kurtzke 2015).

1.7 Therapie

Es gibt derzeit keine kurative Therapie für die MS. Eine Behandlung kann lediglich das Schubrisiko senken sowie die Progredienz der Behinderung verhindern bzw. verlangsamen (Montalban et al. 2018). Aufgrund unzureichender Biomarker, die das klinische Langzeitoutcome eines Patienten prognostizieren können, ist es besonders beim Neuauftreten einer MS kompliziert, eine geeignete Behandlungsstrategie festzulegen (Harris et al. 2017).

Es existieren über zehn von der European Medicine Agency (EMA) zugelassene krankheitsmodulierende Medikamente, die oral oder als Injektion/Infusion appliziert

werden können (Montalban et al. 2018). Durch antiinflammatorisch wirkende Substanzen kann indirekt eine protektive Wirkung auf die Axone erzielt werden, weshalb möglichst früh mit einer entsprechenden Therapie begonnen werden sollte (Brueck und Stadelmann 2003).

Neben dieser Langzeittherapie (immunmodulierende und immunsuppressive Therapien) werden Schübe gesondert behandelt. Die Standartherapie eines Schubes besteht in einer hochdosierten Steroidtherapie. Bei steroidresistenten Schüben können zudem Apheresetherapien durchgeführt werden. Ferner können Patienten symptomatische Therapien, beispielsweise zur Linderung einer Spastik, erhalten (Lipphardt et al. 2019).

1.8 Pathologie der multiplen Sklerose

MS-Läsionen können ubiquitär im Gehirn vorkommen. Makroskopisch erkennbare Prädilektionsorte sind periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell und im Rückenmark (Schörner et al. 1985).

Mikroskopisch präsentieren sich die Läsionen mit einer Entmarkung, Entzündung, Gliose und axonalem Schaden (Kuhlmann 2002). Es konnte gezeigt werden, dass aktive Plaques mit aktivem Myelinabbau vor allem früh beim CIS und einer RRMS auftreten, während zu späteren Zeitpunkten eher inaktive oder sog. „smoldering lesions“ nachweisbar sind (Frischer et al. 2015). Bei den smoldering lesions handelt es sich um Läsionen, welche sich langsam, einem Schwelbrand gleich, vergrößern. Auch komplett remyelinisierte Läsionen, sog. Shadow plaques, können vorkommen (Elliott et al. 2019).

1.8.1 Demyelinisierende Läsionsaktivitäten und *Normal Appearing White Matter*

Abhängig vom Fortschritt der Entmarkung können mikroskopisch verschiedene Aktivitätsstadien anhand unterschiedlicher Myelinabbauprodukte in Makrophagen unterschieden werden. Die frühesten Entmarkungsstadien werden als frühaktiv entmarkend (EA, von Early Active) bezeichnet. Eine entmarkende Läsion kann komplett frühaktiv entmarkend sein, oder aber nur im Randbereich. Beispielhaft ist eine Läsion mit verschiedenen Aktivitäten in Abbildung 2 dargestellt, wobei nicht immer alle Läsionsaktivitäten in einer Läsion nachweisbar sein müssen

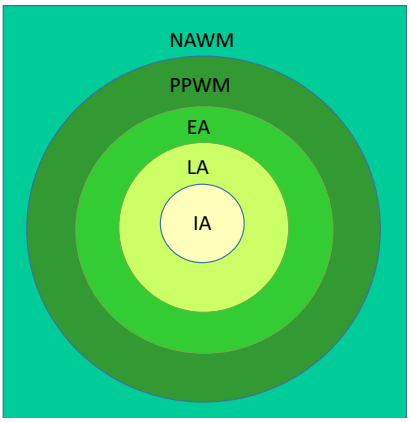


Abbildung 2 Schematische Darstellung einer Läsion

(Kuhlmann 2002). In den Makrophagen lassen sich in frühaktiv entmarkenden Läsionen die sog. großen (Protelipidprotein, kurz PLP; Myelin-Basisches Protein, kurz MBP) und kleinen (Myelin-assoziiertes Glykoprotein, kurz MAG; Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein, kurz MOG; 2‘,3‘-Cyclic Nucleotide 3’Phosphodiesterase, kurz CNP) Myelinproteine anfärben, hinweisend auf eine rezente Entmarkung.

Sind mikroskopisch nur noch die Abbauprodukte der großen Myelinproteine (PLP und MBP), aber keine Abbauprodukte von kleinen Myelinproteinen (CNP, MOG, MAG) anfärbbar, so ist der Myelinabbau weiter fortgeschritten und es handelt sich um eine spätaktive Läsion (LA, von Late Active).

Inaktive Läsionen (IA) sind vollständig demyelinisiert und in den Zytoplasmata der Makrophagen sind immunhistochemisch keine Myelinproteine nachweisbar.

Abgesehen von der Demyelinisierung in einer Läsion können auch Reparaturprozesse einsetzen und die Axone können remyelinisiert werden. Dies kann entweder nur im Randbereich einer Läsion stattfinden oder die gesamte Läsion kann remyelinisiert werden. Eine vollständig remyelinisierte Läsion wird als „Shadow Plaque“ bezeichnet und ist durch dünne, irregulär angeordnete Myelinscheiden charakterisiert.

Direkt um die Läsion befindet sich die periläsionale weiße Substanz (PPWM, von Periplaque White Matter) und angrenzend die normal erscheinende weiße Substanz (NAWM, von Normal Appearing White Matter) (Dziedzic et al. 2010).

Wenngleich die NAWM unauffällig myelinisiert erscheint, zeigen sich hier bei MS-Patienten in der Regel diffuse Veränderungen wie eine geringere Dichte der Axone, eine Mikrogliaaktivierung und eine gewisse lymphoide Entzündungsreaktion oder eine Astrogliose. Derzeit wird vermutet, dass die axonale Degeneration zum einen auf die diffuse Entzündung in der NAWM und zum anderen auf eine Waller´sche Degeneration zurückzuführen ist (Kutzelnigg et al. 2005; Dziedzic et al. 2010; Friese et al. 2014).

1.8.2 Immunsubtypen

In der Literatur wird eine Heterogenität der immunpathologischen Erscheinungen frühaktiv demyelinisierender Läsionen beschrieben. Dies betrifft die Anfärbbarkeit unterschiedlicher Myelinproteine, Komplement- und Immunglobulinablagerungen, die Lokalisation und Ausdehnung der Plaques und das Muster der Oligodendrozytenschädigung. Hiervon abgeleitet werden insgesamt vier Subtypen der Entmarkung, die auf eine unterschiedliche

Pathogenese der Läsionsentstehung hinweisen. Da der vierte Subtyp sehr selten ist und nur in Autopsien beschrieben wurde, wird er im Weiteren nicht mit berücksichtigt. Einen Überblick über die postulierte Pathogenese der Entmarkung in unterschiedlichen Immunsubtypen liefert Abbildung 3. Wichtig ist, das Läsionen eines Patienten immer den gleichen Subtyp aufweisen (intraindividuelle Homogenität), aber Läsionen verschiedener Patienten sich hinsichtlich des Immunsubtyps unterscheiden (interindividuelle Heterogenität) (Lucchinetti et al. 2000; Metz et al. 2014).

Verschiedene Studien liefern Hinweise darauf, dass die Mechanismen und Angriffspunkte dieser pathologischen Prozesse unterschiedlicher Genese sind und sich daher aus den Immunsubtypen eine individuell angepasste Therapie ableiten könnte (Keegan et al. 2005; Stork et al. 2018).

Immunsubtyp I	→	Entmarkung durch T-Zellen und Makrophagen
Immunsubtyp II	→	Entmarkung zusätzlich durch Antikörper- und Komplementablagerungen
Immunsubtyp III	→	Entmarkung zusätzlich durch Oligodendrogliopathie mit Apoptosen

Abbildung 3 Einteilung der Immunsubtypen

Der in Biopsien vorgefundene Immunsubtyp gibt keine Aufschlüsse über den späteren klinischen Verlauf eines Patienten. Langzeituntersuchungen fehlen bislang (Lucchinetti et al. 2000).

1.8.3 Der axonale Schaden

In der Literatur wird immer wieder beschrieben, dass die axonale Schädigung maßgeblich verantwortlich für das Ausmaß der Langzeitbehinderung sei (Kornek et al. 2000). Die Axonprotektion ist daher ein wesentliches Ziel von MS-Therapien (Bjartmar et al. 2000).

Dabei ist die axonale Schädigung ein kontinuierlicher Prozess, der in den frühesten Krankheitsstadien beginnt und in chronischen Erkrankungsstadien weiter voranschreitet. Histologisch können eine akute axonale Schädigung sowie ein axonaler Verlust durch Verminderung der axonalen Dichte unterschieden werden (Dziedzic et al. 2010).

1.8.3.1 Die akute axonale Schädigung

Die akute axonale Schädigung ist im frühen Krankheitsstadium am ausgeprägtesten, wobei die Stärke des Schadens von der Läsionsaktivität abhängig ist (Kornek et al. 2000). Die akute axonale Schädigung wird durch die Anfärbung des Amyloid Precursor Proteins (APP) sichtbar gemacht (s.u.), welches kurz nach der Demyelinisierung nachweisbar ist (Ferguson 1997; Brueck und Stadelmann 2003). Die frühe axonale Schädigung scheint maßgebend für das Langzeitoutcome eines Patienten zu sein (Ferguson 1997).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit RRMS und SPMS der akute axonale Schaden zu Beginn der Erkrankung signifikant höher war, als beispielsweise nach zehn Jahren Krankheitsdauer, jedoch waren APP-positive Sphäroide auch noch zu späteren Zeitpunkten nachweisbar. APP-positive Sphäroide überdauern weniger als 30 Tage und konnten in allen Krankheitsstadien, sowie auch in der PPWM angefärbt werden (Kuhlmann 2002).

Mittels der anti-APP-Färbung kann nicht zwischen APP-positiven Sphäroiden reversibel oder irreversibel geschädigter Axone unterschieden werden; es ist jedoch anzunehmen, dass ein Teil der Axone irreversibel zu Grunde geht (Ferguson 1997). Wenngleich sich das Ausmaß der akuten axonalen Schädigung in frühen Krankheitsstadien ausgeprägter als in späteren Krankheitsstadien darstellt, ist durch eine anhaltende Schädigung über Jahre ein deutlicher Verlust an Axonen im Krankheitsverlauf zu erwarten (Kuhlmann 2002).

1.8.3.2 Die Reduktion der axonalen Dichte

Über die Zeit bildet sich die akute Entzündung zurück und es kommt zur Narbenbildung (Sklerose) in der Läsion. Der axonale Schaden akkumuliert und das Hirn atrophiert. Der akkumulierte axonale Schaden führt zur chronischen Behinderung (Ferguson 1997; Harris et al. 2017). Histopathologisch ist die axonale Schädigung über den relativen Axonverlust in einer Läsion im Vergleich zur NAWM des gleichen Patienten beurteilbar (Kuhlmann 2002).

Es kommt jedoch nicht nur in den MS-Läsionen zu einem axonalen Verlust, sondern auch in der nicht-entmarkten weißen Substanz (PPWM und NAWM). Unterschiedliche pathologische Prozesse wie beispielsweise eine Waller´sche Degeneration können zur axonalen Schädigung in der PPWM und NAWM führen, auch ohne vorliegende Entzündungszeichen (Dziedzic et al. 2010). Neuere bildgebende Studien untersuchen

mittels Diffusions-MRTs, die mit DTI- (Diffusions-Tensor-Bildgebung) und CHARMED-Technik (Composite Hindered and Restricted Model of Diffusion) arbeiten, die Diffusionskapazität und Mikrostrukturen des augenscheinlich gesunden Hirngewebes von MS-Patienten. Dabei zeigte sich, dass Signalreduktionen im gesamten Hirngewebe symmetrisch angeordnet, auch außerhalb der Plaques in der NAWM, zu beobachten waren. Es zeigte sich zudem eine Korrelation zwischen aktivierter Mikroglia und diffusionsgeminderten Arealen in der NAWM (Moll et al. 2011; De Santis et al. 2019; Bezukladova et al. 2020).

Histologische Studien zeigten, dass die neuro-axonale Schädigung mit dem Voranschreiten der Langzeitbehinderung bei MS-Patienten korreliert (Barro et al. 2018). Eine reduzierte axonale Dichte wurde in dieser Arbeit durch die Silberimprägnation nach Bielschowsky sowie einer Färbung für die Neurofilament Leichtketten sichtbar gemacht (s.u.).

1.8.4 Neurofilamente

Bei Neurofilamenten (Nf) handelt es sich um spezifische neuronale Strukturproteine, die eine Untergruppe der Intermediärfilamente darstellen (Harris et al. 2017).

Nf sind Heteropolymere, die vier verschiedenen Untergruppen zugeordnet werden können: Neurofilament Leicht- (NfL), Mittel- (NfM) und Schwerketten (NfH) sowie α-Internexin im zentralen respektive Peripherin im peripheren Nervensystem (Al-Chalabi und Miller 2003; Kuhle et al. 2013). Nf werden bei axonaler Schädigung, unabhängig der Genese, beispielsweise bei neuronaler Degeneration oder Traumen, freigesetzt (Neselius et al. 2015; Bergman et al. 2016; Mañé-Martínez et al. 2016; Harris et al. 2017; Shahim et al. 2017). Somit besitzen sie das Potenzial als Biomarker zentrale und periphere Immunmechanismen widerzuspiegeln und eine fortlaufende axonale Schädigung und Neurodegeneration anzuzeigen. In der Literatur sind Studien über NfH und NfL beschrieben, die vermuten lassen, dass NfH eher den axonalen Schaden beziehungsweise die fortschreitende Behinderung und NfL die akute axonale Schädigung widergeben (Kuhle et al. 2013; Harris et al. 2017). Außerdem treten NfL regional unterschiedlich häufig auf und werden vor allem in dickkalibrigen myelinisierten Axonen tieferer Hirnschichten und des Rückenmarks exprimiert. Dies kann eventuell Aufschluss über die betroffene Region liefern (Zetterberg et al. 2013). Ein weiterer Vorteil ist, dass NfL mengenmäßig die am häufigsten vorkommenden Nf sind und bei Korrelationen mit gesunden Kontrollpatienten stets höhere

Konzentrationen als NfH zeigten (Kuhle et al. 2013). Es existiert eine Vielzahl publizierter Studien, die sich mit der Evaluierung der NfL im Serum als Biomarker beschäftigen. Aus diesen gehen folgende Erkenntnisse hervor: NfL überwinden die Blut-Hirn-Schranke und der NfL-Liquorspiegel korreliert mit jenem im Blutplasma (Kuhle et al. 2016a). Quantitativ sind im Blut ungefähr zwei Prozent der Nf Konzentration des Liquors (CSF) nachweisbar (Zetterberg und Svenningsson 2019). Zudem konnte in Studien gezeigt werden, dass die NfL-Konzentration mit dem Ausmaß der axonalen Schädigung, gemessen im Serum mittels Elektrochemilumineszenz, korreliert (Kuhle et al. 2016b). Weiterhin konnten keine geschlechterspezifischen Unterschiede der NfL-Konzentrationen festgestellt werden; mit zunehmender Alterung findet sich ein physiologischer Anstieg der NfL-Konzentration (Disanto et al. 2017; Kuhle et al. 2019).

Die aktuelle Studienlage zeigt zudem, dass sowohl im Serum, als auch im Liquor gemessene NfL-Konzentrationen positiv mit gadoliniumanreichernden Läsionen in der MRT sind. Es wurde beschrieben, dass sowohl die gadolinumanreichernden Läsionen an Volumen, als auch die Konzentration der sNfL-Werte nach klinischen Schüben zunehmen und bei Gabe von krankheitsmodulierenden Medikamenten abnehmen (Arrambide 2016; Kuhle et al. 2016b; Barro et al. 2018; Siller et al. 2019).

Neselius untersuchte das pathophysiologische Verhalten der NfL-Konzentrationen im CSF eines Amateurboxers nach Knock-out durch Kieferschlag, der jedoch keine klinische Zeichen einer Gehirnerschütterung aufwies. Sie konnte zeigen, dass die Konzentration zwei Wochen nach Ereignis am höchsten war, jedoch war dies die erste dokumentierte Messung in dieser Studie. Nach einer initialen Phase eines starken Abfalls der NfL-Konzentration folgte ein verlangsamter Abfall. Nach ungefähr 36 Wochen erreichte der Boxer eine NfL-Konzentration, die vergleichbar mit den Werten gesunder Kontrollpatienten war (Neselius et al. 2014).

In einer weiteren Studie mit wenigen Probanden wurde gezeigt, dass bereits kleinere Verletzungen der Hirnsubstanz zu einem Anstieg der NfL-Werte führen. In der Studie handelte es sich um die Einbringung eines intrathekalen Katheters mit einem Durchmesser von 14 mm zur Medikamentenapplikation. Bei dieser „kleinen“ Verletzung wurden nach drei Monaten noch signifikant erhöhte NfL-Konzentrationen gemessen, die sich nach sechs Monaten normalisiert hatten (Bergman et al. 2016).

1.9 Nachweismethoden der axonalen Schädigung

1.9.1 Akute axonale Schädigung (Färbung mit anti-Amyloid Precursor Protein-Ak)

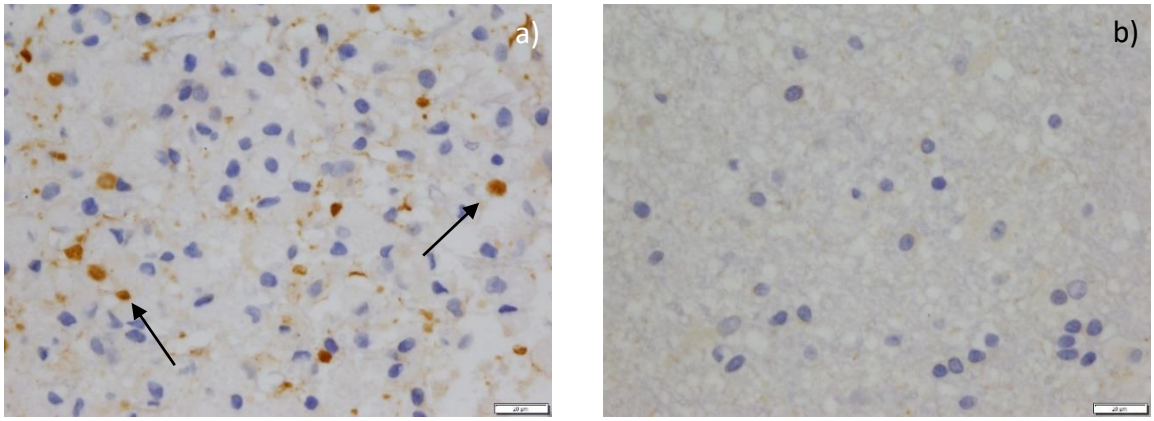


Abbildung 4 Die akute axonale Schädigung
a) in einer frühaktiven Läsion, axonale Sphäroide sind exemplarisch mit Pfeilen markiert; APP, 40x, Fall 167
b) keine abgrenzbare akute axonale Schädigung in der NAWM; APP, 40x, Fall 167

Bei dem Amyloid Precursor Protein (APP) handelt es sich um ein Membran-Glykoprotein, welches dem anterograden axonalen Transport in Neuronen unterliegt und nach Transsektion eines Axons in dessen proximalen Ende akkumuliert (Kuhlmann 2002). Sie treten etwa zwei bis drei Stunden nach Axondissektion auf (Zetterberg et al. 2013). Im gefärbten Gewebeschnitt zeigen sich die APP-positiven Sphäroide vor allem in den Läsionen, teils betont im Bereich des Läsionsrandes. Sie stellen sich entweder rundlich oder strangförmig entlang des Axons dar und dienen als Korrelat für die akute axonale Schädigung (Ferguson 1997).

Außer in den Läsionen kann diese Färbung auch in der PPWM oder NAWM axonale Schäden zeigen, typischerweise jedoch in deutlich geringerer Menge (Kornek et al. 2000).

1.9.2 Reduktion der axonalen Dichte (Versilberung nach Bielschowsky)

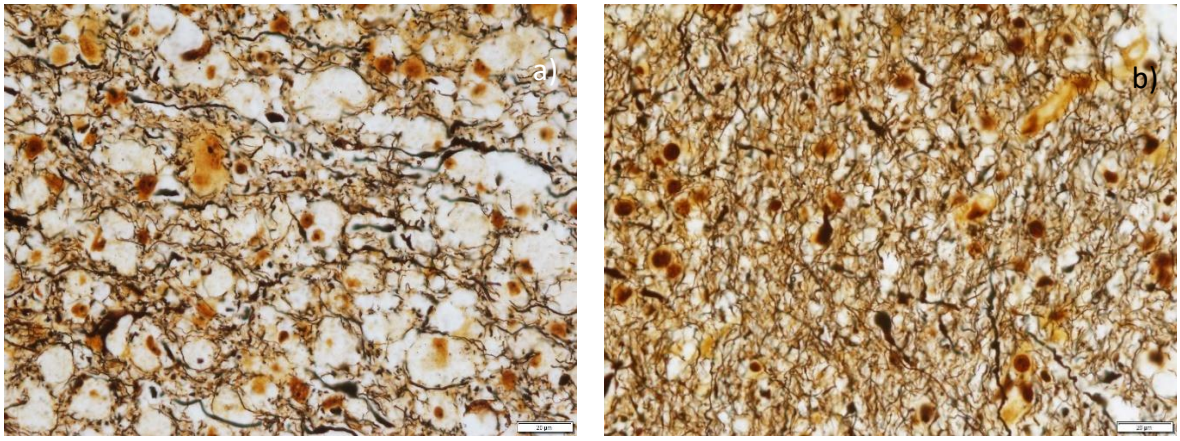


Abbildung 5 Die axonale Dichte
a) axonale Dichte in einer frühaktiven Läsion, Bielschowsky, 40x, Fall 167 b) axonale Dichte in der normal erscheinenden weißen Substanz, Bielschowsky, 40x, Fall 167

Die Versilberung nach Bielschowsky, benannt nach Max Bielschowsky (Bielschowsky 1903), färbt Neurofibrillen in Axonen braun-schwarz und dient der Erfassung der absoluten Dichte der Axone in einem Gewebsschnitt. Es kann eine relative Dichte in Vergleich mit der NAWM abgeschätzt werden. Auch in der Versilberung nach Bielschowky können sich axonale Sphäroide darstellen.

1.9.3 Reduktion der axonalen Dichte (Neurofilament Leichtketten-Färbung)

Mit der NEFL-Färbung lassen sich immunhistochemisch Neurofilament Leichtketten (anti-NEFL) anfärben. Es kommen wie bei der Versilberung nach Bielschowsky die Axone zur Darstellung.

1.10 Die SiMoA-Technologie

Mittels der SiMoA (Single Molecule Array) -Technik können Analyte in Konzentrationen im subfemtomolaren Bereich quantifiziert werden. Damit werden Sensitivitäten erreicht, die mit anderen Techniken wie dem konventionellen oder auf Elektrochemilumineszenz-basierenden Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA oder ECL) nicht erreicht werden können. Darüber hinaus wurde beschrieben, dass mehr als die Hälfte der mittels ELISA und ECL durchgeführten Vergleichsmessungen für sNfL unterhalb des Messbereiches lagen (Serum 54,5%, Liquor 60,6% der durchgeführten Messungen) und im direkten Vergleich somit nur Ergebnisse der SiMoA auswertbar waren (Kuhle et al. 2016a).

1.11 Ziel und Methodik der Doktorarbeit

Die MS ist eine sehr heterogene Erkrankung, die sich auf mannigfaltige Arten zeigen kann, sehr unterschiedlich im Hinblick auf die Krankheitsaktivität und -schwere verläuft und deshalb eine jeweils individuell angepasste Behandlung benötigt. Die Therapiemöglichkeiten für MS-erkrankte Menschen steigen stetig. Ein optimales Behandlungskonzept berücksichtigt die pathologischen Mechanismen, individuellen Gesundheitsrisiken und die Prognose eines Patienten. Daraus ergibt sich der dringende Bedarf eines Biomarkers, der im klinischen Alltag routinemäßig verwendet werden kann und die pathologischen Vorgänge bei dem einzelnen Patienten verlässlich widerspiegelt.

Ein geeigneter Biomarker zeichnet sich dadurch aus, dass mit seiner Hilfe Schubereignisse möglichst früh erkannt, subklinische Krankheitsaktivitäten detektiert und das Ansprechen und die Wirksamkeit von Medikamenten im Verlauf minimal invasiv und in Echtzeit überwacht werden können. Darüber hinaus kann ein zuverlässiger Biomarker dabei helfen den Krankheitsfortschritt und die Zunahme des Grades der Behinderung, durch eine frühe Beurteilung von Veränderungen, zu reduzieren.

Derzeit laufen zahlreiche Studien über NfL, mit der Zielsetzung seine Rolle als Biomarker zu evaluieren.

Ein Baustein hierbei ist zu verstehen, inwieweit die Neurofilament Leichtketten im Serum die axonale Schädigung im ZNS widerspiegeln und damit die ZNS-Pathologie abbilden.

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die im Serum gemessenen Konzentrationen der NfL mit histologischen Parametern der Axonschädigung korrelieren. Zum einen wurde hierbei die akute axonale Schädigung ermittelt, zum anderen die axonale Dichte untersucht.

Da die NfL-Konzentration von weiteren Faktoren wie beispielhaft dem Alter abhängig ist, wurden die Ergebnisse zudem mit epidemiologischen Daten korreliert. Auch die Relevanz für die klinische Behinderung der Patienten wurde analysiert.

Konkret wurden die Biopsien hinsichtlich ihrer Entmarkungsaktivität klassifiziert (sog. Staging), die akute axonale Schädigung anschließend in den verschiedenen Läsionsaktivitäten untersucht sowie die axonalen Reduktion in den verschiedenen Läsionsaktivitäten ermittelt. Die Konzentration der Neurofilament Leichtketten im Serum

der histologisch untersuchten Patienten wurde gemessen und die patientenbezogenen klinischen Daten ausgewertet (unter anderem Alter, Geschlecht, erfolgte Therapien, EDSS-Score). Letztendlich wurde eine multiple lineare Regressionsanalyse durchgeführt, um den Einfluss der histologisch nachgewiesenen axonalen Schädigung und weiterer klinischer Parameter auf die sNfL-Konzentrationen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienkohorte und Einschlusskriterien

Die vorliegende Studie basiert auf einer Kohorte mit 106 Patienten, bei denen histologisch eine MS diagnostiziert wurde. In dieser Studie sind Patienten mit allen Krankheitsverläufen einer MS vertreten (vgl. Lublin et al. 2014). Einschlusskriterien waren das Vorhandensein einer Hirnbiopsie (Bx) sowie Blutproben (im weiteren als Blutennahme, BE) zu einem bzw. zwei Zeitpunkten. Die humanen Biopsien wurden in verschiedenen neurochirurgischen Zentren zwischen 1991 und 2016 deutschlandweit gewonnen und zur Erst- oder Zweitbeurteilung in die Neuropathologie Göttingen gesendet. Sofern diese zur Erstbeurteilung gewonnen wurden, wurden diese nach der neuropathologischen Standardmethode in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Indikation zur Biopsieentnahme wurde nach atypischer Präsentation zum Ausschluss weiterer Differentialdiagnosen wie beispielsweise Tumorgeschehen gestellt. Die Blutproben wurden bei den Verlaufsuntersuchungen gewonnen. Diese wurden bei – 80 °C nach unserem Standardprotokoll eingefroren und aufbewahrt. Die Messung der sNfL-Konzentrationen erfolgte mittels SiMoA (Tuck et al. 2009). Die Blutproben der Kontrollkohorte stammen von jeweils fünf gesunden Frauen und Männern zwischen 34 und 60 Jahren (Median 50,5 Jahre). Alle Patienten haben zu dieser Studie schriftlich eingewilligt und das Studienprotokoll liegt dem lokalen Ethikkomitee vor.

2.2 Histologische Nachweismethoden

Die Morphologie und Entmarkung wurden mit Hilfe der Standardfärbungen Hämatoxylin-Eosin (HE) und Luxol-Fast-Blue-Period-Schiffsäure (LFB-Pas) beurteilt (Brück und Stadelmann 2003). Eine genauere Betrachtung der Entmarkung einer Hirnläsion erfolgte in den immunhistochemischen Färbungen MAG, MOG, CNP, MBP und PLP. Diese Färbungen werden bei entzündlich-entmarkenden Läsionen routinemäßig im histologischen Labor der Neuropathologie Göttingen gefärbt. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden folgende Primärantikörper verwendet: anti-Myelin-assoziiertes Glykoprotein (anti-MAG, Maus, mAK, MCA839G/plpc1, Bioyol/ Serotec), anti-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (anti-MOG, Kaninchen, mAK, Ab109746/EP4281, Abcam), anti-2´,3´-zyklische

Nukleotid-3´-Phosphodiesterase (anti-CNPase, Maus, mAK, SMI19R/CNP, Sternberger Monoclonals/ Covance), anti-Myelin-Basisches Protein (anti-MBP, Kaninchen, pAK, A0623, Dako), anti-Proteolipid Protein (anti-PLP, Maus, mAK, MCA839G/plpc1, Bioyol/ Serotec), anti-zytosolisches-Myeloid-Related-Protein 14 (anti-MRP14, Maus, pAK, Acris, BM40263, AEC), anti-KiM1P (Maus, pAK, Kiel, nicht kommerzieller AK). Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit der Biotin-Avidin-Methode durchgeführt.

In dieser Studie wurde ein besonderes Augenmerk auf die akute axonale Schädigung bzw. den axonalen Verlust gelegt. Die akute axonale Schädigung konnte mittels der anti-APP-Färbung und der axonale Verlust anhand der Bielschwosky-Versilberung und der Neurofilamentfärbung ausgewertet werden. Die genaue Darstellung der Axonfärbungen folgt weiter unten.

2.2.1 Staging

Die Aktivität der Demyelinisierung wurde nach Vorhandensein der Myelinabbauprodukte in den Makrophagen klassifiziert. Die Färbungen MAG, MOG und CNP färben kleine, die Färbungen PLP und MBP große Myelinproteine an. So finden sich in EA-Läsionen Abbauprodukte von sowohl kleinen als auch großen Myelinproteinen in den Gewebsmakrophagen. In LA-Läsionen sind nur noch Abbauprodukte großer Myelinprotein nachweisbar. In IA-Läsionen sind keine Makrophagen mit immunhistochemisch nachweisbaren Myelinproteinen mehr sichtbar. Teilweise kann eine Remyelinisierung, welche sich durch zarte und ungerichtet verlaufende Myelinscheiden auszeichnet, nachgewiesen werden. Das Gewebe, welches unmittelbar um einen Läsionsherd, d.h. laut unserer Definition zwei Gesichtsfelder (Gitter) des morphometrischen Zählgitters bei einer 40x Vergrößerung liegt, wird PPWM bezeichnet und übriges nicht-entmarktes Gewebe als NAWM.

2.2.2 Mapping

Um eine reproduzierbare Auswertung zu gewährleisten, wurde zu jedem Hirnschnitt eine Karte in Form einer Skizze oder Kopie des Präparats angelegt und die entsprechenden Entmarkungsaktivitäten eingetragen. So konnten entsprechende Gewebeareale auch auf den Folgeschnitten stets eindeutig wieder identifiziert und einheitlich ausgewertet werden.

2.2.3 Vorbereitung des Gewebes und Entparaffinierung

Im ersten Schritt wurden die Paraffinblöcke mit einem Schlittenmikrotom in 1 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Trocknung über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C. Um das Paraffin abzutropfen wurden die Schnitte nochmals 30 Minuten bei 45 °C in den Wärmeschrank gegeben.

Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte zunächst viermal zehn Minuten in Xylol getaucht und danach in einer absteigenden Alkoholreihe (Isoxylol, zweimal Isopropanol 100%, 90%, 70%, 50%) für je fünf Minuten rehydriert und in Aqua bidestillata fünf Minuten gewaschen.

2.2.4 Bielschowsky-Silberimprägnation

Im ersten Schritt wurden die entparaffinierten Schnitte 20 Minuten in einer 20%igen Silbernitrat-Lösung bei Raumtemperatur gebadet. Die Präparate wurden kurz in einer Küvette mit Aqua bidestillata gewaschen und danach in eine Lösung aus 20%iger Silbernitrat-Lösung mit 32%igem Ammoniak für 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde das Präparat kurz in einer Wasser-Ammoniak-Lösung geschwenkt und danach mit einer Lösung aus 20%iger Silbernitrat-Lösung, 32%igem Ammoniak und Entwickler schnell übergossen. Folgend wurden die Schnitte sofort in Aqua destillata gegeben, bis die sie tabakbraun wurden. Im letzten Schritt wurden die Schnitte für zwei Minuten in 2%ige Natriumthiosulfat-Lösung gegeben und darauffolgend mit Leitungswasser kurz abgespült. Es erfolgte die Weiterbehandlung in der aufsteigenden Alkoholreihe bis zu 100%igem Isopropanol (Isopropanol/Xylol kurz im Verhältnis 1:1, danach Xylol drei Mal für jeweils drei Minuten). Die Eindeckung erfolgte in DePeX.

2.2.5 Immunhistochemische Färbung des Amyloid Precursor Proteins (APP)

Die Vorbehandlung der entparaffinierten Schnitte erfolgte in der Mikrowelle mit Citratpuffer (10mM bei pH 6). Dazu wurden die Schnitte fünfmal jeweils drei Minuten in Plastikküvetten ohne Deckel gekocht, vor jedem Zyklus wurde Citratpuffer wieder aufgefüllt. Nach vorsichtigem Spülen mit Aqua destillata wurden die Präparate in einer Küvette mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) eingestellt. Zunächst wurde die endogene Peroxidase geblockt, mittels einer Lösung aus 3% H_2O_2 in PBS (45 ml PBS und 5 ml 30 % H_2O_2), anschließend erfolgte die dreimalige Spülung mit PBS. Die Präparate wurden

in das Coverplate-System eingebracht und erneut mit PBS gespült. Die Dichtigkeitsprüfung erfolgte über fünf Minuten. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Proteine blockiert, indem die Präparate für zehn Minuten in 10% FCS/PBS (Fetal Calf Serum in Phosphat Buffered Base) gelegt wurden (120 µl), hiernach wurde nicht gespült. Der APP-Maus-Antikörper (120 µl, 1:2000, Clone 22C11, mAK, Millipore, MAB348, DAB) wurde eingebracht, dies erforderte die Inkubation über Nacht im Kühlschrank bei 4°C. Im Anschluss wurde erneut mit PBS gespült. Nun erfolgte die Aufbringung des Sekundärantikörpers (biotinylierter Anti-Maus-Antikörper, Amersham, 1:200, Vorverdünnung 1:2 wurde auf 1:100 mit 10% FCS/PBS verdünnt). Dieser Vorgang benötigte eine Inkubationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde erneut mit PBS gespült. Nun wurde die Avidin-Peroxidase (POX, Sigma, 1:1000) eingebracht und 45 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Auch nach diesem Schritt wurde mit PBS gespült. Anschließend wurden je Küvette 50 ml PBS mit 1 ml DAB-Stammlösung zugesetzt und unter Sicht entwickelt. Danach wurden die Schnitte gründlich mit Aqua destillata gespült und die Objektträger in die Schaukel gelegt, wo sie 10 – 30 Sekunden mit Hämalaun behandelt und nochmals mit Aqua destillata abgespült wurden. Danach wurden die Präparate in HCL-Alkohol gedippt und fünf bis sieben Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Zum Schluss erfolgte wie oben beschrieben die aufsteigende Alkoholreihe (A. dest. zu Xylol) und Eindecken in DePeX.

2.2.6 Immunhistochemische Färbung der Neurofilament Leichtketten

Wie oben beschrieben wurden die Präparate entparaffiniert, rehydriert und mit Aqua destillata gespült. Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgte in der Mikrowelle mit Citratpuffer (10mM bei pH 6). Dazu wurden die Schnitte fünfmal jeweils drei Minuten in Plastikküvetten ohne Deckel gekocht. Die endogene Peroxidase wurde mit Hilfe einer Lösung aus 3% H_2O_2 in PBS (45 ml PBS und 5 ml 30 % H_2O_2) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss wurden die Objektträger in Feuchtkammern gelegt und mit Aqua bidest. und PBS gewaschen. Der Neurofilament-Leichtketten-Antikörper (ThermoFisher #13-0400, Mausantikörper, Clone DA2) in einer Lösung aus BSA-PBS im Verhältnis 1:100 wurde auf die Schnitte aufgebracht und das Gewebe im Kühlschrank bei 4° über Nacht in der Feuchtkammer im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit PBS gewaschen. Die Färbung wurde mit dem

Envision-System (Dako, K4063) durchgeführt. D.h. ein Sekundärantikörper gekoppelt an ein Dextran-Polymer mit zahlreichen HRP-Molekülen (Meerrettichperoxidase) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer aufgebracht. Für den sich anschließenden Färbeschritt wurde die DAB-Stammlösung verwendet. Die Präparate wurden mit EnVision 1:100 entwickelt. Zum Schluss folgte wie oben beschrieben die aufsteigende Alkoholreihe (A. dest. zu Xylol) und das Eindecken in DePeX.

2.2.7 Auswertungen

2.2.7.1 Akute axonale Schädigung (APP)

Die Auswertung der APP-positiven Sphäroide erfolge an einem Olympus BX40-Lichtmikroskop unter 1000x-Vergrößerung (10x Okular, 100x Objektiv), unter Zugabe von Immersionsöl auf den Objektträger. Es wurden mindestens drei und maximal 20 Gesichtsfelder unter Zuhilfenahme eines Zählgitters ausgewertet. Die auszuzählende Fläche hatte eine Größe von 10 000 µm². Abschließend wurden die gezählten APP-positiven Sphäroide mit dem Faktor 100 multipliziert, um auf die Anzahl APP-positiver Sphäroide pro mm² umzurechnen. Läsionen mit weniger als drei auszählbaren Gesichtsfeldern wurden von der Wertung ausgeschlossen.

2.2.7.2 Axonale Dichte (Bielschowsky Versilberung, NEFL)

Die quantitative Auswertung der axonalen Dichte erfolgte bei o.g. Mikroskop unter 400x-Vergrößerung (10x Okular, 40x Objektiv) unter Zuhilfenahme des morphometrischen Zählgitters von Zeiss nach Henry Rousseau. Hierzu wurden ebenfalls mindestens drei und maximal 20 Gesichtsfelder mit einer Größe von je 95 000 μm^2 ausgezählt. Dabei wurde die Anzahl der Axone bestimmt, die 25 mögliche Gitterkreuzungspunkten schnitten. Für jede Läsion wurde der Median der Kreuzungspunkte ermittelt. Biopsien, deren Größe für weniger als drei Gesichtsfelder ausreichte, wurden von der histologischen Zählung ausgeschlossen.

Die zusätzliche Auswertung der NEFL-gefärbten Schnitte erfolgte auf der Grundlage von 17 Gewebeschnitten. Durch technische Schwierigkeiten konnten keine aussagekräftigen NEFL-Färbungen gewonnen werden. Generell konnte kein signifikanter Vorteil gegenüber der Bielschwosky-Versilberung festgestellt werden. Allgemein war die Differenzierung

zwischen Neurofibrillen und anderen Hirnbestandteilen in dieser Färbung schwer möglich. Für Berechnungen in inaktiven Läsionsarealen standen zu wenige Daten zur Verfügung.

2.3 Messung der Neurofilament Leichtketten mittels SiMoA

Die Messung der NfL im Serum (sNfL) erfolgte bei dieser Studie mit einem Pipettierroboter, dem Quanterix SIMOA HD-1 Analyzer. Bei der SiMoA-Technik handelt es sich um einen sogenannten Bead-basierten Ansatz, d.h. die Festphase stellen in diesem Fall magnetische Kügelchen dar, an die die spezifischen Fängerantikörper gekoppelt sind. Die Beads haben einen Durchmesser von ~2,7 µm und sind mit etwa 250.000 Antikörpern/ Bead beschichtet. Zur Analyse werden die Proben mit den zu messenden Neurofilamenten und die Beads zusammengeführt und in spezielle Discs überführt. Die Discs enthalten 24 Arrays mit je etwa 250.000 Kavitäten mit einem Volumen von 40 – 50 fl. Das Volumen ist so bemessen, dass nur ein Bead mit anhängenden Immunkomplex aufgenommen werden kann. Dies erlaubt die Detektion einzelner Nf-Moleküle.

Vor Versuchsbeginn wurden die Proben sowie das Kit (Quanterix, NfL-Kit beta (260), Katalognummer 102350) für eine Stunde auf Raumtemperatur gebracht. Serumproben wurden gevortexed und anschließend für fünf Minuten bei 10000 g zentrifugiert, um partikuläres Material zu präzipitieren. Die Beads (s.u.) wurden durch Zugabe von 1ml Discovery Bead Diluent gewaschen, gevortexed und an einem Magneten präzipitiert. Das Lösungsmittel wurde entfernt, die Beads in 1ml Discovery Bead Diluent erneut resuspendiert und mit weiteren 4ml Discovery Bead Diluent verdünnt. Die Kalibrator-Stammlösung wurde auf eine Konzentration von 5000 pg/ml NfL mit Calibrator Diluent eingestellt und davon ausgehend eine Verdünnungsreihe mit 500 pg/ml als höchster Konzentration angesetzt. Bevor das Experiment gestartet wurde, wurden 340 µl Kalibratorverdünnungen sowie 106 µl jeder Probe in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt und mit einer Plastikfolie verschlossen. Die Verdünnung der Proben erfolgte während des Experimentes durch den Pipettierroboter (s.u.) im Verhältnis 1:4 mit Sample Diluent.

Um das Experiment zu starten, wurden die Barcodes sämtlicher benötigter Reagenzien (Beads, Detector Reagent, SBG Reagent, Sample Diluent und RGP Reagent) gescannt und die Reagenzien in die dafür vorgesehenen Positionen innerhalb des Pipettierroboters

gestellt. Dabei war es wichtig, dass die Beads nochmals für 30 Sekunden gevortexed wurden, um evtl. gebildete Aggregate aufzubrechen. Die Beads wurden während der gesamten Versuchsdauer geschüttelt, damit sie in Lösung blieben und sich nicht absetzten.

Serumproben wurden mit den Beads inkubiert, wobei in unserem Fall NfL-Proteine von den Fängerantikörpern gebunden wurden. Nach einem Waschschritt wurden die Komplexe aus Bead und Antigen mit einem biotinylierten Detektionsantikörper inkubiert, der ebenfalls an NfL band. Die Komplexe wurden erneut gewaschen, worauf die Zugabe von Streptavidin-β-galactosidase (SBG) erfolgte.

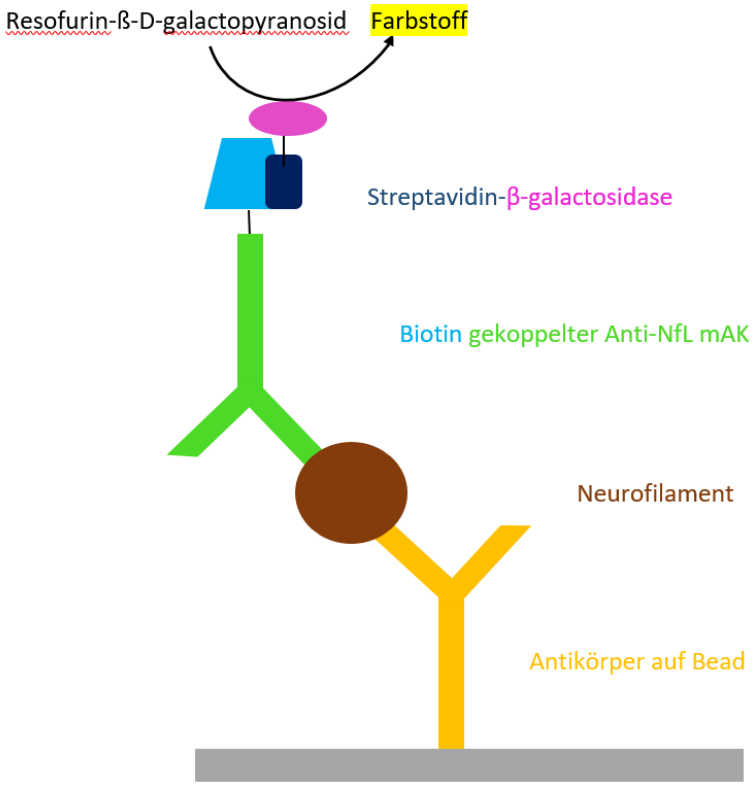


Abbildung 6 Funktionsprinzip eines SiMoA

mAK – monoklonaler Antikörper

Der gebildete Immunkomplex wurde wieder gewaschen und in Resofurin-ß-D-galactopyranosid (RGP) resuspendiert. Die Suspension wurde auf spezielle SiMoA Discs überführt. Die Beads sanken gravimetrisch in die Kavitäten ein und werden mit einem Mineralöl verschlossen, um ein Verdunsten des Mediums zu verhindern. Innerhalb von 30 Sekunden wurde RGP durch SBG hydrolysiert, wodurch ein Lichtsignal erzeugt wurde, welches von einer CCD Kamera detektiert wurde. Die NfL Konzentration in einer Probe wurde durch Interpolation des Lichtsignals gegen die Kalibrationskurve bestimmt.

2.4 Klinische Parameter

Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte sowohl zum Biopsiezeitpunkt, nach einem Jahr als auch beim letzten Follow-up. Die Daten wurden retrospektiv aus den Patientenunterlagen ermittelt oder bei sog. Study visits durch einen Neurologen erfasst. Im Rahmen von Studien zur Untersuchung biopsierter Patienten mit einer MS wurden die Patientenunterlagen in der Neuropathologie systematisch erfasst.

Erhobene Parameter waren: der Zeitraum zwischen den ersten Symptomen und der Biopsie, der Zeitraum zwischen der Biopsie und der ersten respektive zweiten BE, die beobachtete Krankheitsdauer, stattgehabte Schübe sechs Monate vor der Blutentnahme, eine folgende Schubtherapie (hochdosierte Steroide, Plasmapherese oder Immunadsorption) im Zeitraum sechs Wochen vor BE, sowie eine Therapie mit Immunmodulatoren/Immunsuppressiva (Interferon beta 1a, Interferon beta 1b, Glatirameracetat, Fingolimod, Natalizumab, Dimethylfumarat, Azathioprin, Rituximab, Mitoxantron und Cyclophosphamid), oder allgemein Steroiden (sowohl niedrig als auch hoch dosiert) sechs Wochen vor der BE. Für die Ermittlung des EDSS-Scores wurde ein abweichender Untersuchungszeitraum von jeweils drei Monaten zugelassen (gewertet wurden alle EDSS-Scores zwischen neun und 15 Monaten für die Ermittlung des EDSS-Scores nach einem Jahr).

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte durch Berechnungen mit dem Mann-Whitney-U-Test mit anschließender Bonferroni-Testung und einfacher linearer Regression unter Zuhilfenahme von Graphpad Prism 6, sowie multiplen linearen Regressionen in SSPS Statistics 25 für Windows. Die sNfL-Werte wurden mit dem Shapiro Wilk Test auf Normalverteilung überprüft. Zur Darstellung der sNfL-Werte im Verlauf wurde der Wilcoxon-Test angewendet. Für die Berechnung der Multiplen Linearen Regressionen wurden die sNfL-Werte logarithmisch transformiert. Die schriftliche Ausarbeitung erfolgte mit Microsoft Word, Excel und PowerPoint.

3 Ergebnisse

3.1 Epidemiologische und klinische Daten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 106 Patienten hinsichtlich ihrer NfL-Werte im Serum und der axonalen Schädigung in der Histologie untersucht. Die epidemiologischen und klinischen Patientendaten sind in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführt. Dabei beziehen sich das Ereignis Schub auf den Zeitraum sechs Monate und die Parameter Medikamenteneinnahme (Immunmodulatoren, Steroide allgemein, Schubtherapie) auf den Zeitraum sechs Wochen vor der ersten bzw. zweiten BE. Tabelle 2 listet die Krankheitsverläufe zum Zeitpunkt der Bx und beim letzten Follow-up auf. In denen sich anschließenden Berechnungen wurden vornehmlich die sNfL-Werte der ersten BE einbezogen.

Tabelle 1 Deskriptive Statistik der demographischen und klinischen Variablen der Patienten zum Zeitpunkt der Bx, der ersten und zweiten Blutentnahme

	MS-Patienten		
	Operationszeitpunkt (n = 106)	Erste BE (n = 106)	Zweite BE (n = 26)
Alter in Jahren, Mittelwert (Min – Max)	39,77 (9,46 – 85,73)	41,20 (11,21 – 86,67)	42,37 (15,45 – 65,23)
Geschlecht, m:w (%)	47 : 59 (44 : 56)		17 : 9 (65 : 35)
Zeitintervall Bx – BE, Monate, Median (Min – Max)	-	9,57 (-0,1 – 198,03)	20,83 (7,37 – 33,17)
Zeitintervall zwischen den ersten Symptomen und der Bx, Tage, Median (Min – Max)	34 (3 – 11 778)		
Krankheitsdauer (Bx – letztes Follow-up), Jahre, Median (Min – Max)		2,48 (0,02 – 17,47)	
EDSS-Score, Median	4	3	3
Steroide sechs Wochen vor BE, ja : nein	-	9 : 96 Keine Angabe: 1	1 : 25
Immunmodulatoren sechs Wochen vor BE, ja : nein	-	30 : 73 Keine Angabe: 3	10 : 16
Schubtherapie sechs Wochen vor BE, ja : nein	-	5 : 100 Keine Angabe: 1	1 : 25
Schub sechs Monate vor BE, ja : nein		22 : 81 Keine Angabe: 3	1 : 19 Keine Angabe: 6

Bx = Biopsie, BE = Blutentnahme, m = männlich, w = weiblich, EDSS = Expanded Disability Status Scale

Tabelle 2 Krankheitsverlauf der Patienten zum Zeitpunkt der Bx/ nach Indexattacke, die zur Biopsie führte und beim letzten Follow-up

	MS-Patienten	
	Zum Zeitpunkt der Bx (n = 106)	Beim letzten Follow-up (n = 106)
Krankheitsverlauf	M: 76 RR: 27 PR: 1 Unklar: 2	M: 44 RR: 46 PR: 1 sP: 8 Unklar: 7
M: monophasisch; RR: schubförmig (relapsing-remitting); PR: progredient relapsierend; sP: sekundär progredient		

3.2 Histologie

Alle Bx erfüllten die histopathologischen Diagnosekriterien einer entzündlich demyelinisierenden Erkrankung und zeigten somit die typischen histopathologischen Charakteristika einer MS. Folgend wurde die axonale Schädigung in den MS-Bx untersucht.

3.2.1 Akute axonale Schädigung in der anti-APP-Färbung

Die akute axonale Schädigung wurde mittels Anfärbung APP-positiver Sphäroide untersucht (Abb. 7). Ein Beispiel dieser Färbung ist in den Abbildungen 4a und b wiedergegeben. Die höchste Anzahl an APP-positiven Sphäroiden fand sich in EA-Läsionen (Median 130 Sphäroide/mm²). Es zeigten sich signifikant mehr akut geschädigte Axone in allen Läsionsarealen und der PPWM (Mediane: EA 130/mm^2; LA 65/mm²; IA 25/mm²; PPWM 30/mm²) gegenüber der per definitionem NAWM, in der sich jedoch ebenfalls einzelne APP-positive Sphäroide zeigten (Median 5/mm^2). Bei den Untersuchungen fanden sich lediglich zwischen der Anzahl der APP-positiven Sphäroide in den IA- und PPWM-Läsionen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,59$). Die übrigen Werte der akuten axonalen Schädigung unterschieden sich signifikant untereinander respektive von der NAWM. Signifikanzwerte in Abbildung 7.

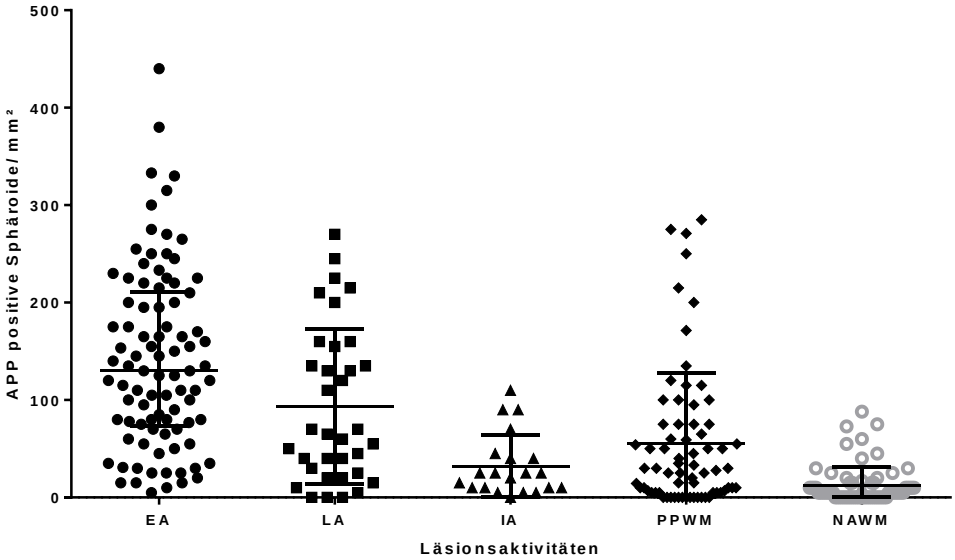


Abbildung 7: Die Anzahl APP-positiver Sphäroide in verschiedenen Läsionsaktivitäten sowie der NAWM.

Dargestellt sind der Median sowie die 25. und 75. Perzentile. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den IA-Läsionen und der PPWM ($p = 0,59$). Weitere Signifikanzwerte: EA, LA: $p < 0,01$; EA, IA: $p < 0,0001$; EA, PPWM: $p < 0,0001$; EA, NAWM: $p < 0,0001$; LA, IA: $p < 0,01$; LA, PPWM: $p < 0,01$; LA, NAWM: $p < 0,0001$; IA, PPWM: $p = 0,59$; IA, NAWM: $p < 0,001$; PPWM, NAWM: $p < 0,0001$

3.2.2 Axonale Dichte in der Bielschowsky-Versilberung

Anschließend wurde die axonale Dichte mittels der Bielschowsky-Versilberung untersucht (Beispielbild einer Färbung in Abbildung 5a und b, Grafik in Abbildung 8). Es wurden die gleichen Areale wie bei der anti-APP-Färbung ausgewertet. In der Versilberung nach Bielschowsky zeigte sich eine deutlich reduzierte Anzahl von Axonen in den Läsionsarealen im Vergleich zur NAWM. Hierbei zeigte sich die geringste axonale Dichte in inaktiven Läsionen (Median 5,28 Axone/25 Kreuzungspunkte). Eine vergleichbare axonale Dichte ließ sich in frühaktiven und spätaktiven Läsionen nachweisen (Mediane EA 6,2 Axone/25 Kreuzungspunkte und LA 5,85 Axone/25 Kreuzungspunkte). In der PPWM zeigte sich ebenfalls eine niedrigere axonale Dichte als in der NAWM (Mediane PPWM 8 Axone/25 Kreuzungspunkte und NAWM 9,05 Axone/25 Kreuzungspunkte). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der axonalen Dichte in früh- bzw. spätaktiven Läsionen ($p = 0,59$). Signifikanzwerte siehe Abbildung 8.

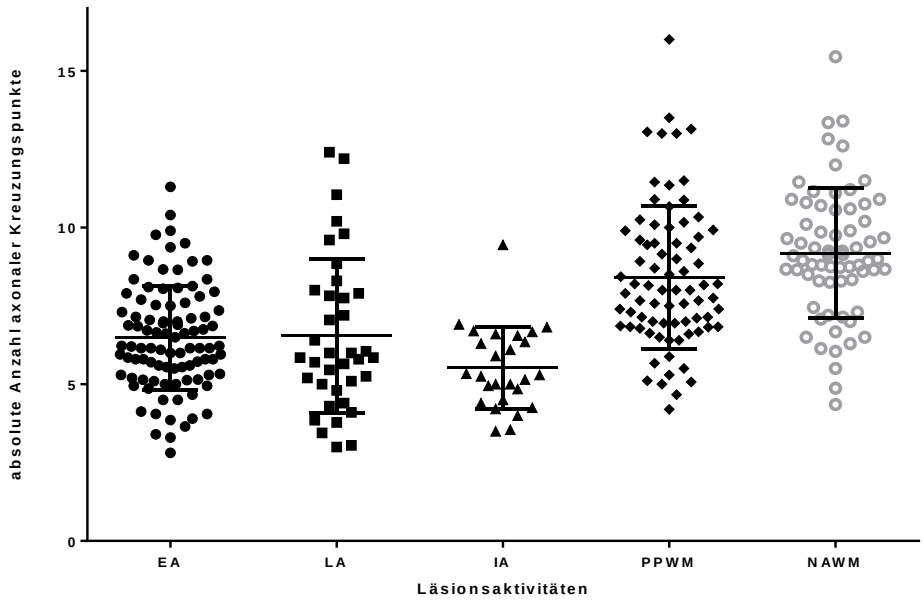


Abbildung 8: Die axonale Dichte in den verschiedenen Läsionsaktivitäten sowie der NAWM in der Bielschowsky-Versilberung.

Dargestellt sind der Median, sowie die 25. und 75. Perzentile. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen der axonalen Dichte der früh- bzw. spätaktiven Läsionen (p= 0,58). Weitere Signifikanzwerte: EA, IA: p < 0,01; EA, PPWM: p < 0,0001; EA, NAWM: p < 0,0001; LA, IA: p < 0,0001; LA, PPWM: p < 0,0001; LA, NAWM: p < 0,0001; IA, PPWM: p < 0,0001; IA, NAWM: p < 0,0001; PPWM, NAWM: p = 0,01

3.2.3 Axonale Dichte in der NEFL-Färbung

Da das Ziel dieser Arbeit die Korrelation histologischer Parameter mit den sNfL im Serum war, untersuchten wir die NfL auch in den histologischen Schnitten (Abbildung 9). Die axonale Dichte konnte mittels der NEFL-Färbung jedoch qualitativ nicht hinreichend abgebildet werden, so dass eine umfassende Berechnung nicht möglich war. Darüber hinaus gab es nur einen erfassten Wert für inaktive Läsionsareale, sodass hierzu keine Testung auf Signifikanz möglich war. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen früh- und spätaktiven Läsionen im Vergleich zur NAWM (EA, NAWM: p < 0,001; LA, NAWM p < 0,01) und der PPWM zur NAWM (p < 0, 01). Signifikanzwerte in Abbildung 9.

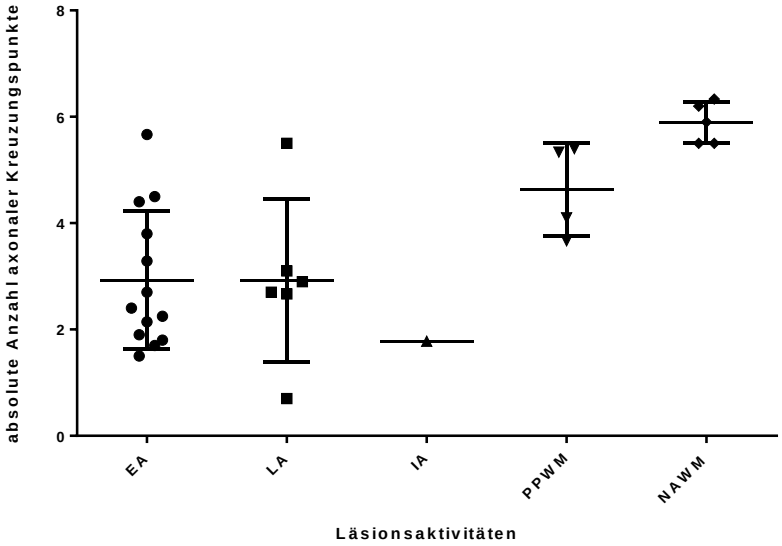


Abbildung 9: Die axonale Dichte in verschiedenen Läsionsaktivitäten sowie der NAWM in der NEFL-Färbung. Dargestellt sind jeweils der Median und die 25. und 75. Perzentile. Für Korrelationen mit der IA-Läsion existierten zu wenige Werte. Signifikanzwerte: EA, LA: p = 0,79; EA, PPWM: p = 0,06; EA, NAWM: p = 0,01; LA, PPWM: p = 0,11; LA, NAWM: p < 0,01; PPWM, NAWM: p < 0,01

3.2.4 Die axonale Schädigung in Bezug auf das Geschlecht

Bei der Untersuchung der Unterschiede in Bezug auf das Ausmaß der axonalen Schädigung in Abhängigkeit des Geschlechts fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Menge der APP-positiven Sphäroide oder der axonalen Dichte, ausgewertet mittels der Bielschowsky-Versilberung und der anti-NEFL-Färbung. Signifikanzwerte im Anhang.

3.2.5 Axonale Schädigung in Bezug auf das Alter

Als nächstes wurde ermittelt, ob die axonale Schädigung eine Altersabhängigkeit zeigte. In den einfachen linearen Regressionen zeigte sich weder eine Korrelation zwischen den APP-positiven Sphäroiden und dem Alter, noch der axonalen Dichte (sowohl gezählt in der Bielschowsky-Versilberung als auch der anti-NEFL-Färbung). Signifikanzwerte im Anhang.

3.3 Neurofilament Leichtketten im Serum

3.3.1 Neurofilament Leichtketten im Serum hirnbiopsierter Patienten

Von den Patienten mit der histologisch ausgewerteten Axonschädigung standen mir Serumproben zur Messung der sNfL zur Verfügung. Die Seren waren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bx entnommen worden. Die erste BE erfolgte im Median nach 9,6 und die Follow-up BE nach 20,8 Monaten (siehe Tabelle 1).

Die sNfL-Werte waren bei der Baseline-BE (1. BE) höher als bei der Follow-up-Untersuchung (2. BE) (Mediane: 58,95 pg/ml Baseline; 21,34 pg/ml im Follow-up; Abbildung 10a). Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme war der Median der sNfL-Werte biopsierter MS-Patienten signifikant höher als bei der zweiten Blutentnahme ($p < 0,0001$) und der, der gesunden Kontrollgruppe (11,03 pg/ml, $p < 0,0001$). Beim Vergleich der sNfL-Werte des Follow-ups und der gesunden Kontrollgruppe haben sich die Werte angenährt, zeigten jedoch noch einen signifikanten Unterschied ($p < 0,001$).

Bei der Verlaufsbetrachtung der sNfL-Werte zeigte sich, dass bis auf zwei Fälle, bei den übrigen Patienten ($n = 24$) ein Rückgang der sNfL-Werte im zeitlichen Verlauf zu vermerken war (Median von 84,96 pg/ml auf 22,29 pg/ml). Siehe Abbildung 10b.

Diese beiden Fälle wiesen generell eher niedrige sNfL-Werte auf. Gründe für die geringe Erhöhung der Werte (von 22,73 pg/ml auf 32,12 pg/ml bzw. von 15,51 pg/ml auf 21,31 pg/ml) könnten physiologisch geringe Schwankungen der sNfL-Konzentration sein.

Der Patient mit dem bei Weiten höchsten sNfL-Wert wies eine Konzentration von 3101,15 pg/ml auf. Dabei handelte es sich um ein 14,45 Jahre altes Kind mit einem fulminanten Krankheitsverlauf, bei dem die BE einen Monat nach der stereotaktischen Bx stattgefunden hat.

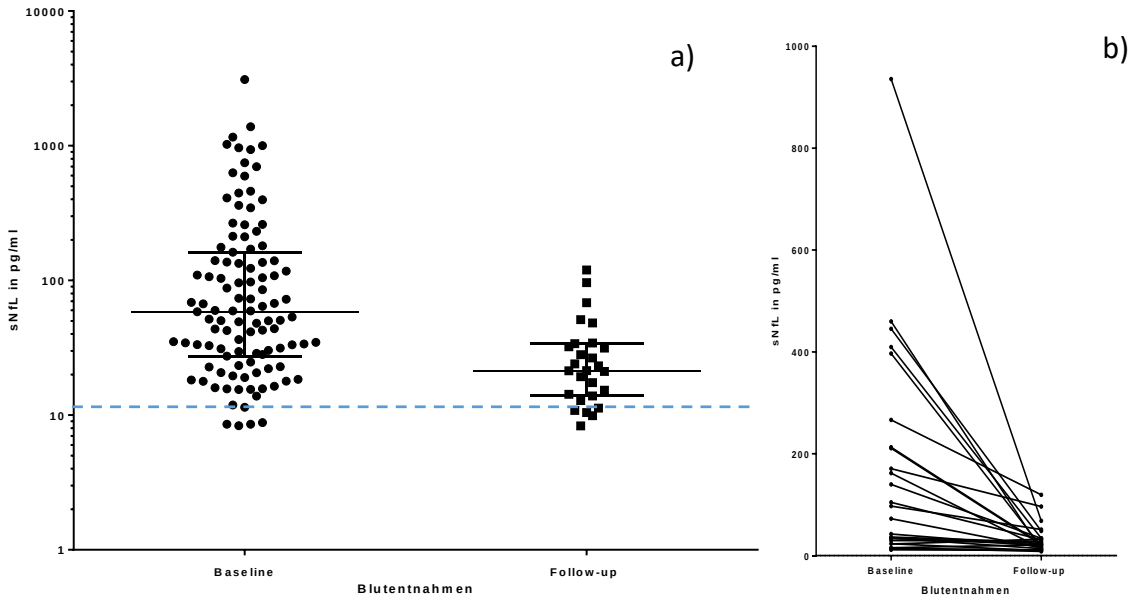


Abbildung 10: sNfL-Werte biopsierter MS-Patienten zum Zeitpunkt der ersten (Baseline), zweiten (Follow-up) BE und gesunde Kontrollen
[a)] sowie sNfL-Werte im Verlauf [b)] a) Die gesunde Kontrollgruppe wurde lediglich mit dem Median (blau gestrichelte Linie) dargestellt. Die sNfL-Werte bei der ersten BE sind signifikant höher (58,95 pg/ml) als bei der zweiten BE (21, 34 pg/ml), oder der gesunden Kontrollgruppe (11,03 pg/ml). Die sNfL-Konzentration der zweiten BE ist noch signifikant höher als bei den gesunden Kontrollen. Abgebildet sind der Median, 25. und 75. Perzentile b) Dargestellt wurden alle Fälle, bei denen zwei BEs zur Verfügung standen. Die beiden sNfL-Werte eines Patienten sind durch eine Linie miteinander verbunden. Bis auf zwei Ausnahmen mit initial bereits geringen Werten fallen die sNfL-Werte im Verlauf (von im Median 84,96 pg/ml auf 22,29 pg/ml).

Als nächstes überprüfte ich, welche Faktoren einen Einfluss auf die Höhe der sNfL-Werte haben.

3.3.2 Vergleich sNfL-Werte in Bezug auf das Alter

Die einfache lineare Regression zeigte keine Korrelation (p = 0,8964) zwischen den sNfL-Werten und dem Alter, wie sie in der Literatur zu finden sind (vergleiche Barro et al. 2018). In der multiplen linearen Regression war jedoch ein Einfluss des Alters auf den sNfL-Wert zu sehen (vergleiche 3.4.4).

3.3.3 Vergleich der sNfL-Werte in Bezug auf den zeitlichen Abstand zur Biopsie

In den einfachen linearen Regressionen zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den sNfL-Werten der ersten und zweiten BE (n = 132) und dem zeitlichen Abstand zur Bx (p = 0,01, Abbildung 11). Dies bestätigte sich auch in der multiplen linearen Regression (vgl. 3.4.4).

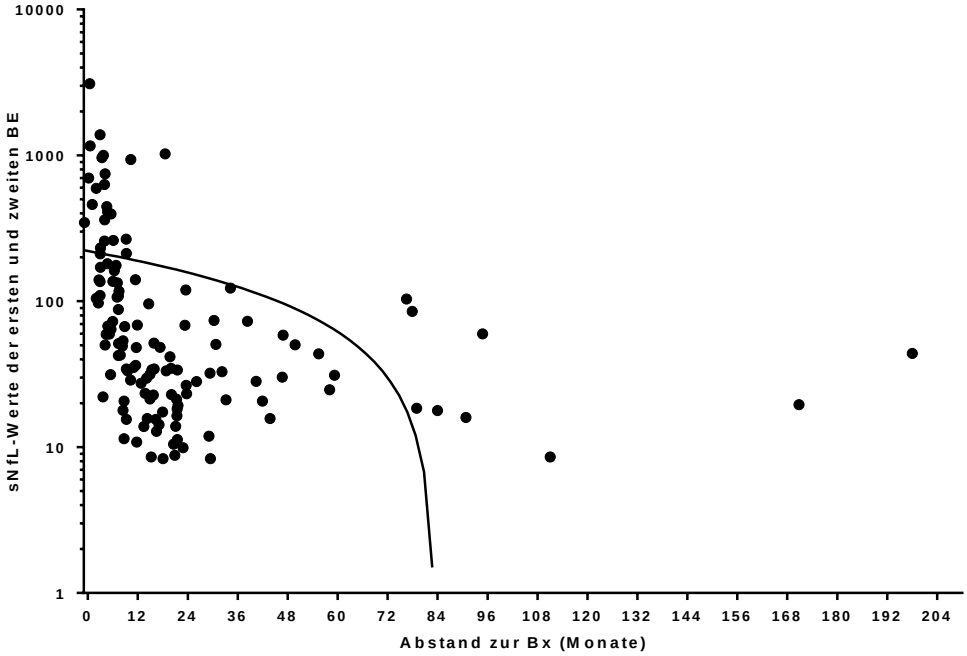


Abbildung 11: Korrelation zwischen den sNfL-Werten und dem zeitlichen Abstand der ersten und zweiten BE zur Bx
Die sNfL-Werte fallen signifikant im zeitlichen Verlauf (p = 0,01). Zur Übersichtlichkeit wurde eine logarithmische Skala für die sNfL-Werte gewählt.

3.3.4 Vergleich der sNfL-Werte zwischen den Geschlechtern

Bei der Betrachtung der sNfL-Werte zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Patienten (p = 0,5287).

3.3.5 Vergleich der sNfL-Werte bei Schubereignis vor der Blutentnahme

Im Gruppenvergleich zeigte sich, dass Patienten, die sechs Monate vor der BE einen Schub erlitten hatten, signifikant höhere sNfL-Werte aufwiesen, als jene Patienten ohne Schubsymptomatik (p < 0,001). Dennoch zeigten einige Patienten auch schubunabhängig vergleichsweise hohe sNfL-Werte.

Diese Beobachtung konnte in der multiplen linearen Regression bestätigt werden (siehe 3.4.4). Signifikanzwerte im Anhang.

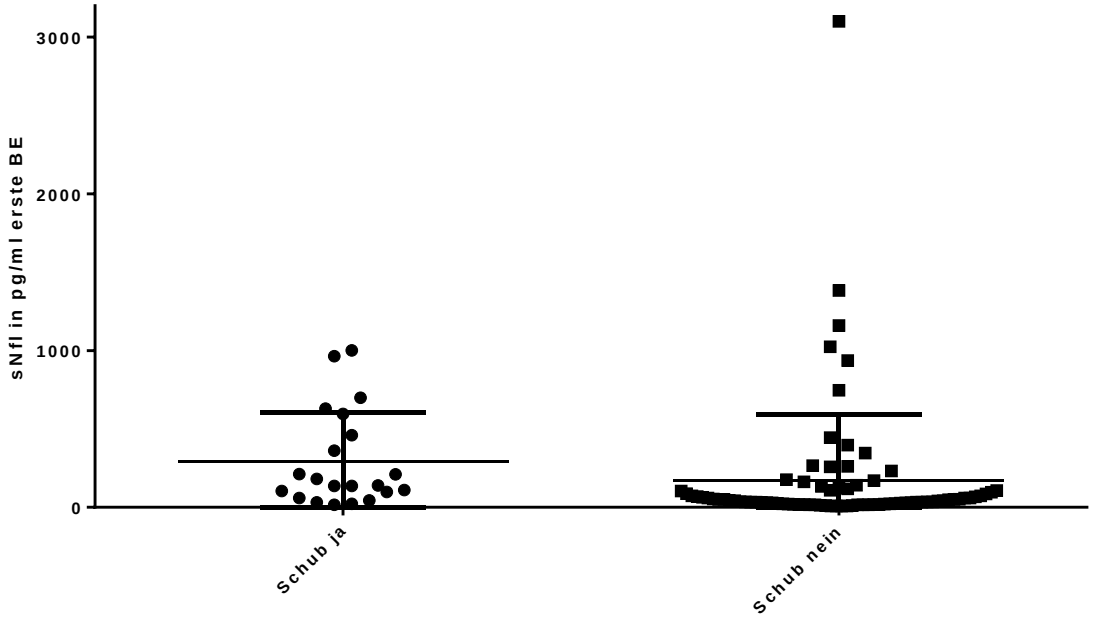


Abbildung 12: sNfL-Werte in Abhängigkeit eines Schubereignisses sechs Monate vor erster BE
Patienten mit Schub vor BE haben signifikant höhere sNfL-Werte als Patienten ohne Schubereignis ($p < 0{,}001$). Dargestellt sind der Median, 25. und 75. Perzentile.

3.3.6 Vergleich der sNfL-Werte bei Medikamentengabe vor der Blutentnahme

Die Medikamentengabe wurde für die Berechnungen in immunmodulatorische Therapien bzw. Immunsuppressiva (Interferon beta 1a, Interferon beta 1b, Glatirameracetat, Fingolimod, Natalizumab, Dimethylfumarat, Azathioprin, Rituximab, Mitoxantron und Cyclophosphamid), Steroide allgemein (sowohl Gabe niedrigdosierter als auch hochdosierter Steroide) sowie Schubtherapien (hochdosierte Steroide und Plasmapherese oder Immunadsorption) aufgeteilt. In den Gruppenvergleichen zeigten sich keine signifikant niedrigeren oder höheren sNfL-Werte bei Patienten, die Immunmodulatoren/ Immunsuppressiva vor der BE bekamen und den Patienten ohne solch eine Therapie ($p = 0{,}3$). Jedoch zeigte sich in den einfachen Gruppenvergleichen, dass Patienten mit einer Steroideinnahme höhere sNfL-Werte hatten ($p = 0{,}001$) als die anderen Patienten. Diese Ergebnisse bestätigten sich in der multiplen linearen Regression. Dort konnte auch ein signifikanter Einfluss einer Therapie mit Immunmodulatoren oder Immunsuppressiva sechs Wochen vor der BE gezeigt werden. Ein signifikanter Einfluss einer stattgehabten Schubtherapie sechs Monate vor BE konnte nicht gezeigt werden ($p = 0{,}57$). Siehe auch 3.4.4.

3.3.7 Vergleich der sNfL-Werte bei offener oder stereotaktischer Biopsie

Als nächstes wurde der Einfluss der Operationstechnik (offene versus stereotaktische Bx) in Bezug auf die sNfL-Werte untersucht, da wir postulierten, dass eine offene Operation eine ausgeprägtere Gewebeschädigung und damit höhere sNfL-Werte verursachen könnte. Bei 102 von 106 Patienten fanden sich Informationen über die Art der Operation. 72 Patienten hatten eine stereotaktische und 30 Patienten eine offene Bx. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der sNfL-Konzentration nach den unterschiedlichen Operationsverfahren (p = 0,71).

3.4 Korrelationen zwischen der axonalen Schädigung und den Neurofilament Leichtketten im Serum

Als nächstes überprüfte ich, ob die von mir in ZNS-Läsionen und in der NAWM gefundene axonale Schädigung mit den sNfL korreliert. Hier aufgeführt sind zunächst nur die einfachen linearen Regressionen; die Berechnung mit der multiplen linearen Regression folgt in Abschnitt 3.4.4.

3.4.1 Korrelationen der akuten axonalen Schädigung (APP-positive Sphäroide) mit den sNfL

Hierfür wurde zunächst untersucht, ob die akute axonale Schädigung einen Einfluss auf die sNfL-Werte hat. Bei Berechnungen der einfachen Regressionen zwischen den APP-positiven Sphäroiden (in EA-, LA-, IA-Läsionen, der PPWM und der NAWM) und den sNfL-Konzentrationen war kein statistischer Zusammenhang zu beobachten. In dieser Gleichung war es nicht möglich, mehrere Einflussfaktoren, wie beispielsweise das Alter, zu berücksichtigen. Signifikanzwerte im Anhang.

3.4.2 Korrelationen der axonalen Dichte (Bielschowsky-Versilberung) mit den sNfL

Bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der axonalen Dichte und den sNfL-Werten (in EA-, LA-, IA-Läsionen, der PPWM und der NAWM) zeigte sich bei Betrachtung nur einer Variablen eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der axonalen Dichte in der Bielschowsky-Versilberung und den sNfL-Werten für die NAWM bei der zweiten Blutentnahme (p = 0,02; Abbildung 11). Je geringer die axonale Dichte in der NAWM war,

desto höher waren die sNfL-Werte bei der zweiten Blutabnahme. Die weiteren Korrelationen verliefen negativ.

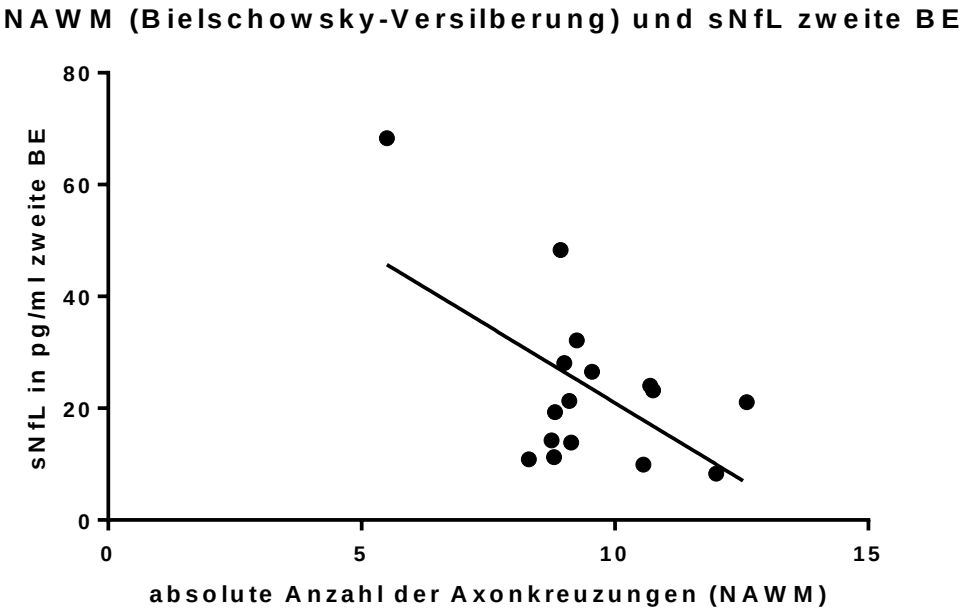


Abbildung 13 Korrelation zwischen den sNfL-Werten der zweiten BE und der axonalen Dichte in der NAWM in der Bielschowsky-Versilberung.
Es zeigt sich eine signifikant negative Korrelation (p = 0,02) zwischen den sNfL-Werten zum Zeitpunkt der zweiten BE und der axonalen Dichte in der NAWN. Abhängige Variable ist der sNfL-Wert in pg/ml des Follow-ups. Unabhängige Variable ist die absolute Anzahl axonaler Kreuzungspunkte.

In Regressionen mit multiplen Variablen konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden, da die Stichprobe nicht ausreichend groß war. Des Weiteren war die Kohorte zu klein für ein Bootstrapping, um eine größere Stichprobengröße zu simulieren.

3.4.3 Korrelationen der NEFL-Färbung mit sNfL

Bei der Korrelation zwischen der axonalen Dichte in der NEFL-Färbung und den sNfL-Werten zeigte sich kein Zusammenhang (p = 0,38).

3.4.4 Annäherung eines Modells zur Erklärung der sNfL-Werte

Die einfachen linearen Regressionen können den Einfluss verschiedener Faktoren auf die sNfL-Werte nicht gleichzeitig berechnen. Daher führte ich eine multiple lineare Regressionsanalyse durch. Um sicherzustellen, dass keine Zusammenhänge durch den Einfluss von weiteren Faktoren übersehen wurden, wurden neben den Variablen, die bereits in den einfachen linearen Regressionen eine Korrelation zeigten, zunächst auch alle

anderen Parameter in die Gleichung aufgenommen und schrittweise ausgeschlossen, bis nur noch Parameter mit signifikantem Einfluss auf die sNfL-Werte vorhanden waren.

In der folgenden Berechnung wurden alle sNfL-Konzentrationen der ersten BE eingeschlossen. Der Zeitraum der gewerteten Medikamenteneinnahme wurde für sechs Wochen vor der ersten BE gewählt, um einen möglichen Einfluss kurz vor diesem Ereignis zu beurteilen und der Zeitraum für ein Schubereignis innerhalb von sechs Monaten vor BE, da in dieser Kohorte die Kontrollbesuche oftmals nicht zeitiger nach Schubereignis organisiert werden konnten.

Diese Gleichung zeigt einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den APP-positiven Sphäroiden in EA-Läsionen, welche die akute axonale Schädigung anzeigen, und den sNfL-Werten. Für andere Läsionsaktivitäten oder die axonale Dichte (sowohl in der Bielschowsky-Versilberung als auch in der immunhistochemischen NEFL-Färbung) konnten keine Zusammenhänge beobachtet werden, daher wurden diese Parameter im folgenden Modell nicht mehr berücksichtigt. Darüber hinaus fanden sich weitere nicht-histologische Parameter mit einem Einfluss auf die sNfL-Werte:

1) Patienten mit einer Steroidgabe und/oder der Gabe eines Immunmodulators/ Immunsuppressivums sechs Wochen bzw. 2) einem Schubereignis sechs Monate vor der ersten BE zeigten höhere sNfL-Werte als Patienten ohne diese Parameter. 3) Ältere Patienten hatten generell höhere sNfL-Werte als jüngere und 4) je weiter entfernt die BE von der Bx lag, desto mehr fielen die Werte ab. Die Modellzusammenfassung ist in Tabelle 3 aufgeführt. Für dieses Modell beträgt das korrigierte R^2 45,5 %, dies bedeutet, dass mit Hilfe dieses Modells 45,5 % der Varianzen erklärt werden können.

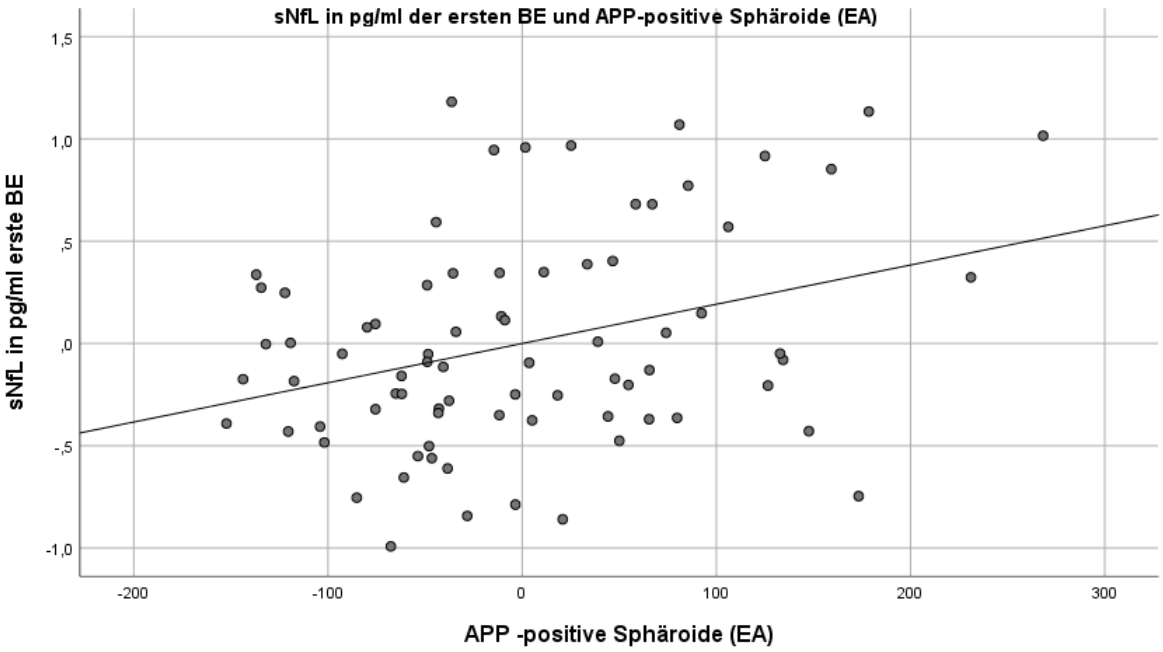
Tabelle 3 Modell zur Erklärung von sNfL-Werten

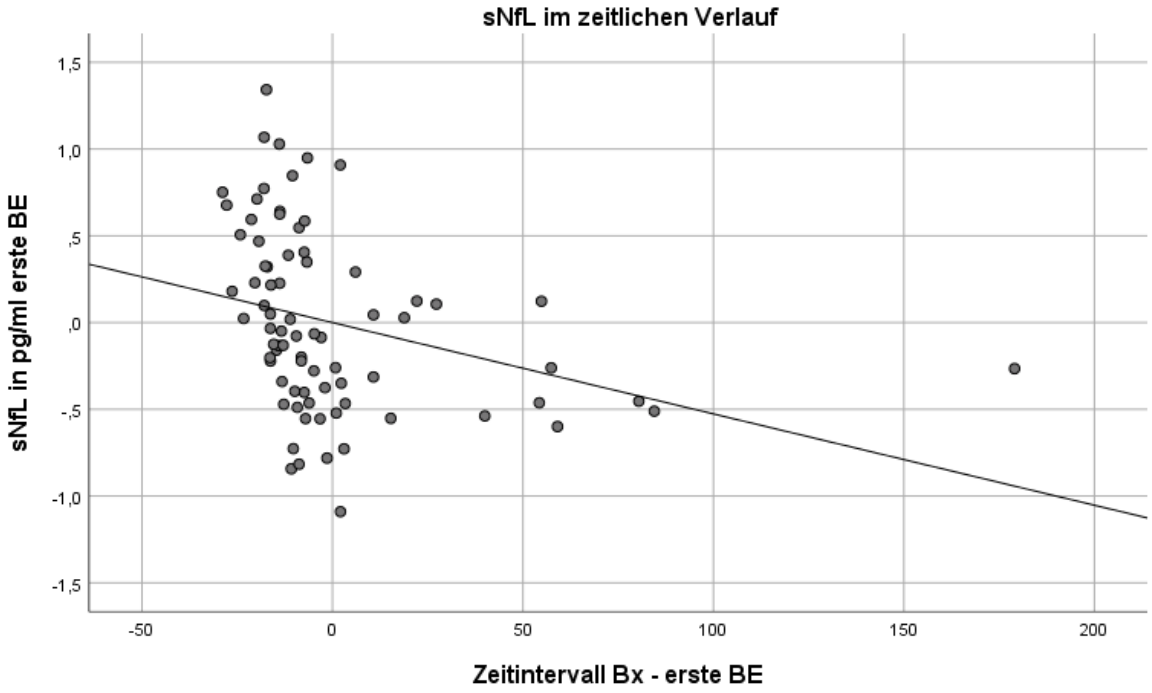
Modell zur Erklärung von sNfL-Werten			
N = 78	Unstandardisierter Koeffizient	T	Signifikanz
APP-positive Sphäroide in der EA- Läsion	0,02	3,712	< 0,01
Zeitintervall zwischen Bx und erster BE	< -0,01	-2,22	< 0,03
Immunmodulatoren/Immunsuppressiva sechs Wochen vor BE	0,28	2,3	0,02
Steroide allgemein sechs Wochen vor BE	0,723	3,41	< 0,00
Schub sechs Monate vor BE	0,42	2,8	< 0,01
Alter (Jahre) zum Zeitpunkt der BE	0,02	4,47	< 0,01
Abhängige Variable: sNfL der ersten BE, korrigiertes R^2 = 45,5 %			

Dargestellt sind alle Variablen, die einen signifikanten Einfluss auf die sNfL-Werte zeigten: APP-positive Sphäroide (EA), Zeitintervall zwischen Bx und erster BE, Steroide allgemein sechs Wochen vor der BE, Immunmodulatoren/ Immunsuppressiva sechs Wochen vor BE, Schub sechs Monate vor der BE und das Alter zum Zeitpunkt der BE. Abgebildet sind der unstandardisierte Koeffizient, T und die Signifikanz.

Die im Folgenden dargestellten Grafiken wurden aus der obigen multiplen linearen Regression berechnet. Folglich sind die Achseneinteilungen in nicht plausiblen Skalierungen dargestellt. Auf Grafiken der dichotomen Parameter wurde verzichtet.

Grafisch abgebildet ist, dass höhere APP-Werte in EA- Läsionen mit höheren sNfL-Werten korrelieren ($p < 0,01$; Abbildung 14a), ein längerer zeitlicher Abstand zur Bx zu niedrigeren sNfL-Werten führt ($p < 0,01$; Abbildung 14b) und sNfL-Werte mit dem Alter ansteigen…… ($p < 0,01$; Abbildung 14c).


sNfL in pg/ml der ersten BE und APP-positive Sphäroide (EA)
sNfL in pg/ml erste BE
1,5
1,0
,5
,0
-,5
-1,0
-200
-100
0
100
200
300
APP -positive Sphäroide (EA)


sNfL im zeitlichen Verlauf
sNfL in pg/ml erste BE
1,5
1,0
,5
,0
-,5
-1,0
-1,5
-50
0
50
100
150
200
Zeitintervall Bx - erste BE

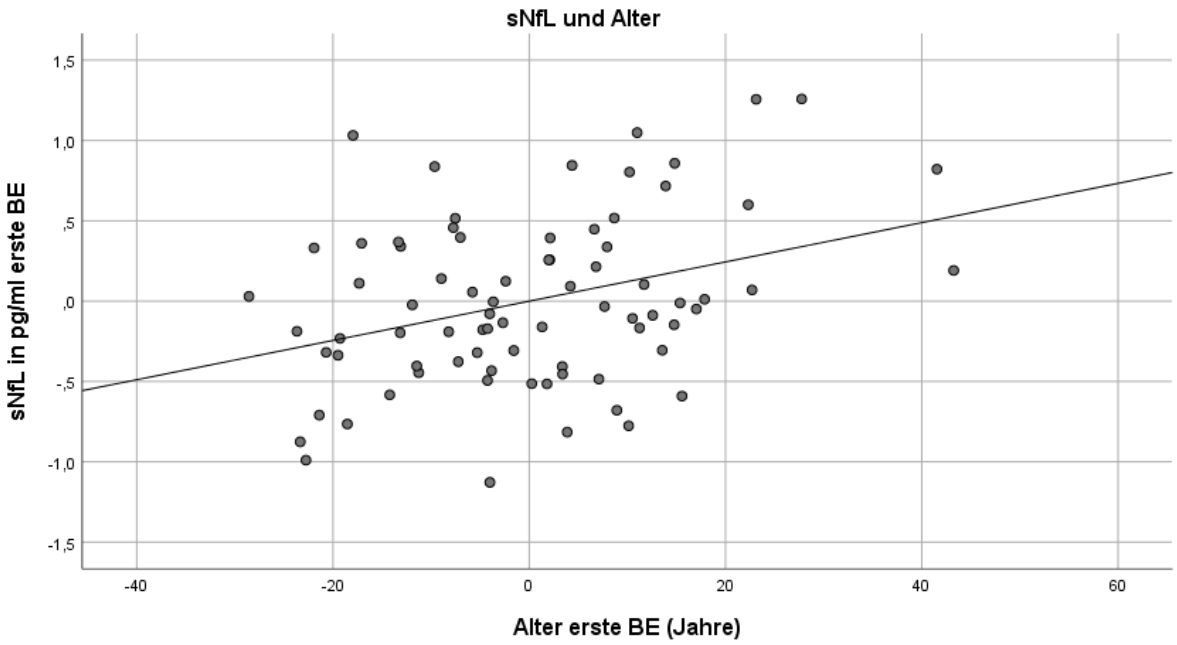


Abbildung 14: Partielle Regressionsplots des Modells mit sNfL
Abhängige Variable ist der sNfL-Wert zum Zeitpunkt der ersten BE. Unabhängige Variablen sind APP-positive Sphäroide in der EA-Läsion (a), Zeitintervall zwischen der Bx und der ersten BE (b) und Alter zum Zeitpunkt der ersten BE (c). *a)* Die sNfl-Werte korrelieren positiv mit den APP-positiven Sphäroiden in frühaktiven Läsionen ($p < 0,01$). b) Die Höhe der sNfL-Werte korreliert negativ mit der vergangenen Zeit zwischen Bx und BE ($p < 0,01$). c) Höhere sNfL-Werte korrelieren positiv mit einem höheren Alter ($p < 0,01$). Nicht dargestellt: Patienten mit Steroidgabe bzw. Therapie eines Immunmodulators/ Immunsuppressivums sechs Wochen und einem Schubereignis sechs Monate vor BE hatten höhere Werte als die Patienten ohne diese Ereignisse. Die Achsenbeschriftungen sind durch den Berechnungsvorgang abweichend skaliert.

3.5 Korrelationen zwischen den Neurofilament Leichtketten im Serum und der klinischen Behinderung

Zuletzt schaute ich, ob die sNfL mit der klinischen Behinderung der Patienten korrelieren. Die klinische Behinderung wurde mittels des EDSS-Scores untersucht. Es zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen den sNfL-Werten der ersten BE und den EDSS-Werten zum Zeitpunkt der Biopsie ($p = 0,02$, Abbildung 15).

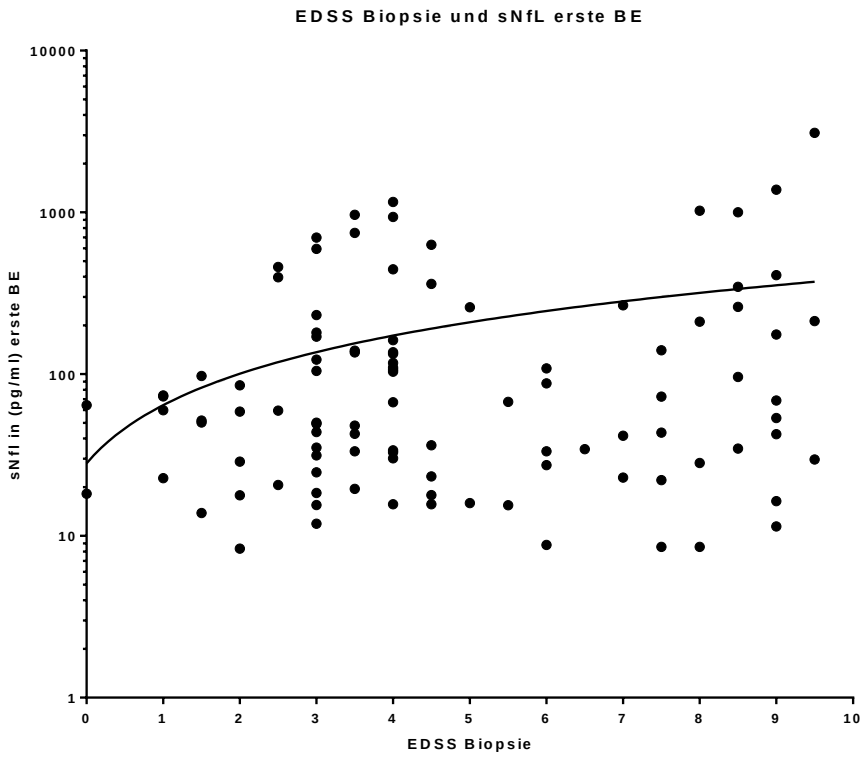
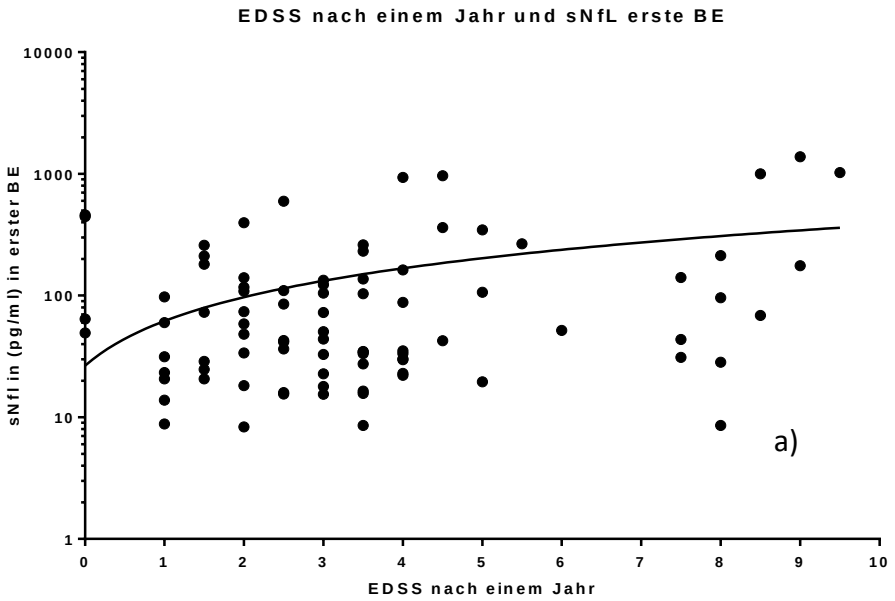


Abbildung 15: Korrelation zwischen sNfL-Werten der ersten BE und dem EDSS zum Zeitpunkt der Biopsie. Es besteht eine positive Korrelation zwischen den sNfL-Werten (in pg/ml als abhängige Variable) und dem EDSS zum Zeitpunkt der Biopsie (unabhängige Variable). Logarithmierte Darstellung ($p = 0,02$).

Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen den sNfL-Werten der ersten BE und dem EDSS-Scores in der Verlaufsuntersuchung nach einem Jahr ($p < 0,01$) und mit dem EDSS-Score zum Zeitpunkt der letzten Verlaufsuntersuchung ($p < 0,001$; Abbildung 16a und b).



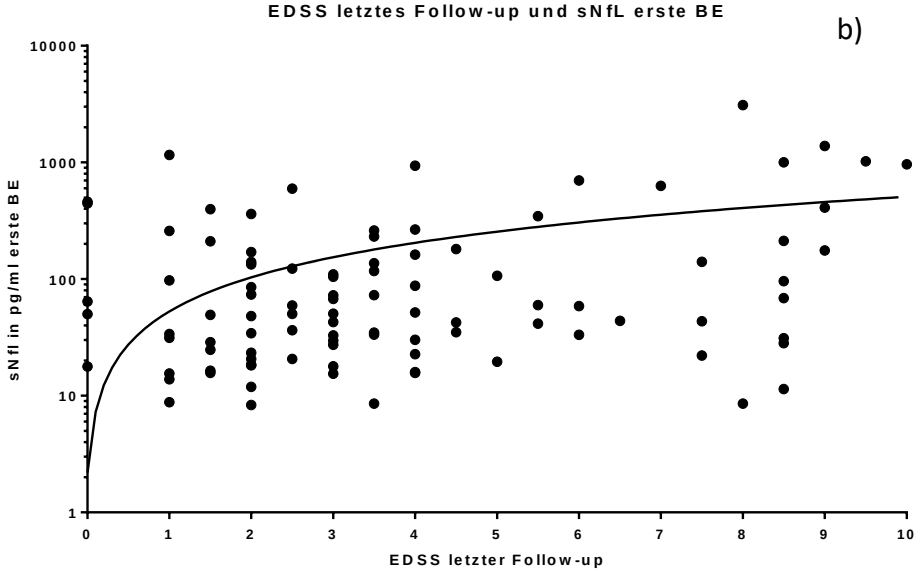


Abbildung 16: sNfL-Werte korrelieren mit dem EDSS-Score nach einem Jahr und beim letzten Follow-up. a) sNfL (pg/ml) der ersten BE als abhängige Variable und dem EDSS-Score nach einem Jahr als unabhängige Variable ($p < 0{,}01$). b) sNfL (pg/ml) der ersten BE als abhängige und dem EDSS-Score zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups als unabhängige Variable ($p < 0{,}001$). Logarithmierte Darstellung.

4 Diskussion

Derzeit werden viele Studien mit NfL als potentiellen Biomarker für das Monitoring verschiedener neurologischer Erkrankungen durchgeführt. Dabei können die sNFL auch bei der Überwachung des Krankheitsverlaufes und Therapieansprechens von Patienten mit einer MS von Nutzen sein. In Studien wurde bereits gezeigt, dass sNfL mit dem Alter, stattgehabten Schüben und dem derzeitigen Krankheitsverlauf korrelieren (Disanto et al. 2017). Zum weiteren Verständnis wurde in dieser Doktorarbeit die Korrelation zwischen dem Serumparameter mit histologischen Parametern zur Erfassung der akuten axonalen Schädigung bzw. der axonalen Reduktion in einem Gewebeschnitt beleuchtet. Da es sich bei den Neurofilament Leichtketten um Strukturproteine der Axone handelt, die bei einem Schub oder einer Hirngewebsdegeneration anderer Genese frei werden, wird angenommen, dass diese die Pathologie im zentralen Nervensystem widerspiegeln. Zum aktuellen Zeitpunkt existieren zahlreiche klinische Studien, die die Nf mit klinischen oder MRT-Parametern korrelieren, allerdings sind keinerlei vergleichbare histologische Studien in der Literatur zu finden.

Um den Einfluss vieler verschiedener Faktoren auf die sNfL-Werte beurteilen zu können, wurden auch multiple lineare Regressionen durchgeführt, da in einfachen linearen Regressionen keine Störfaktoren (weitere Einflussfaktoren) berücksichtigt werden können. Zunächst wurden einfache Regressionen berechnet, später dann verschiedene Modelle. Somit zeigten sich unter Umständen zunächst Signifikanzen, die später nicht bestätigt werden konnten und umgekehrt. In dieser Studie wurde nur das beste Modell vorgestellt (jenes, welches die höchste Varianz erklärt), da durch teils fehlende Informationen die Kohortengröße der unterschiedlichen ausgetesteten Regressionen schwankten.

4.1 Neurofilament im Serum

MS-Patienten mit einer durch eine Bx diagnostizierten MS stellen häufig eine Patientengruppe mit besonders schweren Krankheitsverläufen dar. Die Patienten in unserer Studienkohorte imponierten initial mit sehr hohen sNfL-Werten (im Median 58,59 pg/ml bei der ersten BE) im Vergleich zur Literatur: Patienten mit einer RRMS zeigten im Median eine sNfL-Konzentration von 12,6 pg/ml und Patienten mit einem CIS von 10,1 – 32,9 pg/ml (Barro et al. 2017; Kuhle et al. 2019; Bittner et al. 2020). Hierbei muss

berücksichtigt werden, dass die Angaben der sNfL-Werte untereinander nur eingeschränkt verglichen werden können, wenn sie nicht mit demselben SiMoA ausgewertet wurden. Es zeigten sich bei unseren gesunden Kontrollen jedoch eher niedrige Werte im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen (in unserer Kohorte: 11,03 pg/ml und in publizierten Kontrollkohorten 23,6 pg/ml (Barro et al. 2017) und 16,3 pg/ml (Kuhle et al. 2019)). Dies unterstreicht, dass die sehr hohen sNfL-Werte unserer Patienten einen schweren Krankheitsverlauf widerspiegeln, welcher zur Bx führte.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass auch in den Follow-up-Untersuchungen die Konzentrationen der Nf der Patientenkohorte noch signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht war. Trotz der Einschränkung, dass in unserer Studie nur wenige Kontrollwerte gesunder Probanden zur Verfügung standen und deshalb keine Alterskorrelation in dieser Gruppe durchgeführt wurde, ist eine Annäherung der beiden Werte deutlich sichtbar, dies könnte eine anhaltende NfL-Freisetzung im Krankheitsverlauf abbilden (Abbildung 10a).

Weitere Studien zeigen, dass biopsierte Patienten, mit initial schwerer Klinik, im weiteren Krankheitsprozess häufig einen MS-typischen Verlauf haben (Pittock 2005, Abbildung 10). In unserer Studie erlitt nur ein Patient vor dem zweiten Follow-up einen Schub. Dies lässt im Hinblick auf die deutlich gesunkenen Follow-up Konzentrationen vermuten, dass sich der Krankheitsverlauf bzw. die neuroaxonale Schädigung nach einer akuten Phase stabilisiert.

Zur Dynamik der freigesetzten NfL nach einer Schädigung existieren verschiedene Studien: In einer Studie bei Boxern wurde gezeigt, dass die Höhe der NfL im Liquor mit der Anzahl stattgehabter Kopfschläge bzw. der subjektiven und objektiven Intensität des Kampfes korrelierte (Zetterberg et al. 2013). Zudem wurde dargestellt, dass bei Amateurboxern, auch ohne Symptome einer Gehirnerschütterung nach stattgehabten Schlägen, erhöhte sNfL-Werte im Vergleich zu deren Ausgangswerten, beziehungsweise im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, auftraten. Lumbalpunktionen zeigten, dass innerhalb des ersten Messzeitraums von sechs Tagen (nach dem Kampf mit Kopfschlag) die Werte umso höher waren, je später innerhalb des Messzeitraums gemessen wurde. Auch nach einer zweiten Lumbalpunktion 14 Tage später waren diese Werte noch erhöht. In der sich anschließenden Studie wurde die erste Messung 14 Tage nach Kampf durchgeführt und die sNfL-Werte im weiteren Verlauf beobachtet. Alle Werte waren an Tag 14 stark erhöht und fielen im

zeitlichen Verlauf ab. Eine Normalisierung der Werte erfolgte ungefähr 36 Wochen nach Kampf (Neselius et al. 2012; Neselius et al. 2014). Darüber hinaus konnte in einer über vier Jahre angelegten Studie gezeigt werden, dass die sNfL-Konzentrationen bei Patienten mit einem neu diagnostizierten CIS oder einer frühen RRMS (mittlere Erkrankungsdauer zwei Monate) unabhängig einer medikamentösen Therapie im Verlauf bis zum Follow-up nach zwei respektive vier Jahren sanken (Bittner et al. 2020). Weitere Studien zeigten, dass bereits ein kleiner operativer Eingriff, wie die Einbringung eines intrathekalen Katheters, zu einer deutlichen Steigerung der sNfL-Werte eines Patienten im Vergleich zu zuvor erhoben Referenzwerten führte. Eine Normalisierung der sNfL-Konzentrationen wurde nach sechs bis 12 Monaten gemessen (Bergman et al. 2016). Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass sich sNfL-Konzentrationen nach ungefähr sechs bis neun Monaten normalisieren, wenn keine weitere Freisetzung von Nf durch eine anhaltende oder neu einsetzende neuroaxonale Schädigung erfolgt (Neselius et al. 2014; Bergman et al. 2016; Bittner et al. 2020).

Auch in unserer Studie zeigte sich ein deutlicher Abfall der sNfL-Werte im Verlauf. Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen den sNfL-Konzentrationen und dem zeitlichen Abstand zur Bx (vgl. 3.3.3). Die Bx der Patienten dieser Studie wurden im Zusammenhang mit klinischen Schüben durchgeführt (im Median 34 Tage nach Auftreten einer klinischen Symptomatik), sodass von einem deutlichen Anstieg im Rahmen des Schubgeschehens mit nachfolgendem physiologischen Abfall bei Rekonvaleszenz auszugehen ist.

Da bereits kleine Hirnverletzungen mit einem stark erhöhten sNfL-Wert einhergehen, nahmen wir an, dass die Art der Bx-gewinnung der Patienten einen Einfluss auf die sNfL-Konzentration haben könnte, nämlich, dass offene Operationen mit einer stärkeren Freisetzung von Nf einhergehen könnten als stereotaktische Bx (Bergman et al. 2016). Diese Vermutung bestätigte sich nicht in den Berechnungen (vgl. 3.3.7). Ob die operativen Eingriffe insgesamt zu einer Erhöhung der sNfL-Werte führten, konnten wir leider nicht ermitteln, da uns keine Blutabnahmen direkt vor und nach der Bx zur Verfügung standen.

Die NfL-Werte im Serum korrelieren in unserer Studie positiv mit stattgehabten Schüben im Zeitraum sechs Monate vor BE (vgl. 3.3.5 bzw. 3.4.4, Tabelle 3). Zu diesem Ergebnis gelangten ebenfalls Disanto und Bittner, die in Studien feststellten, dass hohe sNfL-Werte positiv mit stattgehabten Schüben 60 Tage vor BE, beziehungsweise in einem Beobachtungszeitraum von zwei Jahren, korrelierten (Disanto et al. 2017; Bittner et al.

2020). Somit kann gezeigt werden, dass Schübe einen axonalen Schaden verursachen und zu höheren sNfL-Konzentrationen führen. Schübe sind das klinische Korrelat für neu aufgetretene entmarkende ZNS-Läsionen. Es ist bekannt, dass in diesen eine deutliche akute axonale Schädigung nachweisbar ist, wie wir es auch in vorliegender Studie zeigen konnten (Kuhlmann 2002).

Bei der medikamentösen Therapie der MS wurde zwischen der Dauertherapie mit Immunmodulatoren/Immunsuppressiva, einer Schubtherapie (hochdosierte Steroide, Plasmapherese und Immunadsorption) und allgemein einer Steroidtherapie (hochdosierte und niedrigdosierte Steroide einschließend) unterschieden. Hiermit sollte einerseits die Therapie zur Schubminderung gegenüber einer Akuttherapie während einer Exazerbation abgegrenzt und andererseits ein direkter Steroideffekt untersucht werden. In der Literatur finden sich sinkende sNfL-Werte unter einer Behandlung mit Immunmodulatoren im Vergleich zu untherapierten MS-Patienten (Kuhle et al. 2019; Siller et al. 2019; Delcoigne et al. 2020). In unserer Studie zeigte sich paradoxerweise, dass eine Steroidgabe oder eine Therapie mit Immunmodulatoren/Immunsuppressiva sechs Wochen vor der Blutentnahme mit höheren sNfL-Werten korrelierte. Dies impliziert möglicherweise, dass Patienten, die klinisch besonders schwer betroffen waren, mit Medikamenten behandelt wurden, und dass sich eine potentiell senkende Wirkung auf die sNfL-Werte der Therapien zum Untersuchungszeitpunkt noch nicht entfalten konnten. Weniger wahrscheinlich erscheint, dass die Therapien selbst höhere sNfL-Werte verursachen (vgl. 3.3.6 und 3.4.4). Einen ähnlichen Zusammenhang zeigte Bittner, in dessen Studie die Patienten mit einer folgenden intensiven medikamentösen Therapie zu Beginn die höchsten sNfL-Konzentrationen aufwiesen (Bittner et al. 2020).

Allgemein lässt sich zu unserer Studienkohorte feststellen, dass die sNfL-Werte älterer Patienten generell höher als die Jüngerer waren. Diese Erkenntnis konnte bereits aus verschiedenen Studien gewonnen werden (Disanto et al. 2017; Lewczuk et al. 2018; Kuhle et al. 2019). In der vorliegenden Studie ist diese Korrelation anhand der multiplen linearen Regression nachvollziehbar; die Berechnung bildet folglich die physiologische Konzentrationserhöhung im Alterungsprozess ab (vgl. 3.3.2 und 3.4.4).

Ein geschlechterspezifischer Konzentrationsunterschied der sNfL konnte in vorangegangen Studien nicht festgestellt werden, wie auch in der vorliegenden Studie (Kuhle et al. 2016b; Disanto et al. 2017).

4.2 Die akute axonale Schädigung

In dieser Doktorarbeit wurde vornehmlich die Fragestellung behandelt, ob sNfL-Werte mit der histologisch nachweisbaren Axonschädigung korrelieren. In histologischen Studien konnte gezeigt werden, dass in den frühen Krankheitsstadien eine ausgeprägte axonale Schädigung vorliegt (Bitsch 2000; Kuhlmann 2002). Die Literatur zeigt, dass die APP-positiven Sphäroide mit dem T-Zellinfiltrat in den Läsionen (eine signifikante Korrelation wurde für CD8+ Lymphozyten gefunden) sowie Makrophagen/ Mikroglia assoziiert sind (Kuhlmann 2002). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass APP-positive Sphäroide besonders im frühen Stadium der MS (innerhalb eines Jahres nach Symptombeginn) bei allen Läsionsaktivitäten und in der PPWM auftreten, aber auch noch über zehn Jahre nach Krankheitsbeginn nachweisbar sein können (Bitsch 2000). Die Bx unserer Kohorte zeigten ebenfalls, dass in allen Läsionen, sowie der PPWM und NAWM APP-positive Sphäroide vorhanden waren und dies auch Patienten betraf, die erst drei Jahre oder später nach deren ersten Symptomen biopsiert wurden (vergleiche 3.2.1).

In der Literatur finden sich einige Studien, die das histopathologische Erscheinungsbild der MS untersucht haben. Hierbei finden sich sehr unterschiedliche Angaben bezüglich der Anzahl der APP-positiven Sphäroide in den Läsionen, der PPWM und NAWM. Die in unserer Studie erhobenen Werte für füh- /spät- und inaktive Läsionen sind niedriger als in anderer Studien beschrieben (in dieser Studie EA 130/mm², LA 65/mm² und IA 25/mm² versus EA 730 – 4126/mm², LA 3985/mm² und IA 23 – 560/mm² (Ferguson 1997; Kornek et al. 2000; Dziedzic et al. 2010). Es finden sich in der Literatur Sphäroidwerte in der PPWM von 7 – 107/mm², im Vergleich zu unserer Auswertung mit 30/mm² (Kornek et al. 2000; Dziedzic et al. 2010). Der Median der APP-positiven Sphäroide in der NAWM in unserer Studie war 5/mm² und wurde in einer vergleichbaren Studie mit 6 – 41/mm² angegeben (Kornek et al. 2000). Ursache für die voneinander abweichenden Werte könnte eine unterschiedlich hohe Sensitivität der APP-Färbung in den unterschiedlichen Laboren sein (Vgl. Abbildung 4). Zudem gibt es keine definierte Größe, ab wann ein Sphäroid gewertet wird, und dies kann von den jeweiligen Untersuchern unterschiedlich gehandhabt worden sein.

Zum anderen könnte die Zusammensetzung der Kohorte die unterschiedlichen Werte erklären: In älteren Studien wurde häufig zwischen einer akuten und chronischen MS unterschieden. So beschrieb beispielsweise Kornek in ihrer Studie an überwiegend Autopsien von Patienten mit kurzer Krankheitsdauer und schwerem Krankheitsverlauf,

dass diese höhere APP-Werte zeigten, als Patienten mit einem chronischen Krankheitsverlauf (Kornek et al. 2000). Eine akute MS ist nicht streng definiert, weshalb diese Begrifflichkeit in dieser Studie nicht als solche aufgeführt wird. Bei uns wurden Bx untersucht und keine Autopsien, die natürlicherweise einen schwereren Krankheitsverlauf aufweisen. In unserer Studie wurden zudem 15 Patienten eingebunden, die ihre diagnostische Bx über drei Jahre nach den ersten MS-Symptomen erhielten und deshalb niedrigere Werte zeigen könnten (Kuhlmann 2002). Des Weiteren konnte dargelegt werden, dass Kinder mehr APP-positive Sphäroide in den verschiedenen Läsionsarealen als Erwachsene hatten und somit das Alter zum Zeitpunkt der Bx Einfluss auf die Sphäroide in den Läsionen hat (Pfeifenbring et al. 2015). Unsere Studienkohorte hat einen breiten Altersquerschnitt, wobei zum Zeitpunkt der Bx nur fünf Patienten 15 Jahre alt oder jünger waren.

Wir konnten in der vorliegenden Studie zeigen, dass die APP-positiven Sphäroide als Marker der akuten axonalen Schädigung positiv mit den sNfL-Werten in den frühaktiven Läsionen korrelierten (Vgl. 3.4.1 und 3.4.4). Somit konnten wir den Nachweis erbringen, dass sNfL-Werte in der Tat die akute axonale Läsionspathologie widerspiegeln. Dies bedeutet, dass die axonale Schädigung, gezeigt durch die Anzahl der APP-positiven Sphäroide in frischen MS-Läsionen, neben anderen Parametern die Höhe der sNfL-Werte beeinflusst.

4.3 Die axonale Dichte

Zuvor untersuchten wir die akute axonale Schädigung mit Hilfe der anti-APP-Färbung, um sNfL Erhöhungen durch eine rezente Axonschädigung in den Krankheitskontext einordnen zu können. Die Betrachtungen zeigten Korrelationen mit akut geschädigten Axonen in aktiven MS-Läsionen, die den ausgeprägtesten Schaden aufwiesen. Neben dem akuten axonalen Schaden lässt sich histopathologisch der permanente Axonverlust, in dieser Studie anhand der Bielschowsky-Versilberung untersucht, nachvollziehen.

Verschiedene Studien zeigen, dass die axonale Reduktion in den Läsionen am höchsten ist (Bitsch 2000; Bjartmar et al. 2000; Kutzelnigg et al. 2005). Bei Patienten mit langer Krankheitsdauer trat ein bis zu 80 %iger Axonverlust in Rückenmarksläsionen im Vergleich zur NAWM auf (Bjartmar et al. 2000). Wir konnten in unseren histologischen Auswertungen

ebenfalls zeigen, dass die axonale Dichte in den Läsionen signifikant geringer ist als in der PPWM oder NAWM (vergleiche 3.2.2).

Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die NAWM pathologischen Prozessen unterliegt und deren axonale Schädigung einen Teil zur klinischen Behinderung eines Patienten beiträgt (Kutzelnigg et al. 2005). Dabei besteht zum einen eine verminderte axonale Dichte sowie eine Atrophie des Gewebes (Rudick et al. 1999; Evangelou, et al. 2000; Paolillo et al. 2000). Als Ursachen für eine axonale Reduktion werden eine Waller´sche Degeneration, dies meint ein zugrunde gehen der Axone distal einer Läsion, oder eine direkte Schädigung der Axone in der NAWM diskutiert (Dziedzic et al. 2010; Bezukladova et al. 2020). Es wurde gezeigt, dass vor allem bei den progredienten MS-Formen eine globale diffuse Entzündungsreaktion im Gehirn und den Meningen auftritt. Dabei besteht in der gesamten makroskopisch unauffälligen NAWM eine gewisse axonale Reduktion, wobei diese vermehrt im Bereich um eine Läsion auftritt und der axonale Schaden über die Zeit akkumuliert (Kutzelnigg et al. 2005). Die axonale Dichte bei MS-Patienten ist signifikant im Vergleich zu der axonalen Dichte der Kontrollgruppe gemindert (Evangelou, et al. 2000; Lovas et al. 2000; Dziedzic et al. 2010). Laut Literatur befindet sich der prozentuale axonale Verlust in der NAWM zwischen 7,2 – 57 % im Vergleich zu gesunden Kontrollen (je nach Hirnregion, ausgewertet anhand unterschiedlicher Färbungen und Marker (Bjartmar et al. 2000; Evangelou, et al. 2000; Lovas et al. 2000; Dziedzic et al. 2010)). Dziedzic zeigte in einer Studie anhand der Bielschowsky-Versilberung eine Reduktion der Axone in der PPWM, in dieser Studie als unauffällig myelinisiertes Hirngewebe um eine Läsion definiert, um 7,2 % im Vergleich zur weißen Substanz von gesunden Kontrollen (Dziedzic et al. 2010). In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die NAWM, die definitionsgemäß keine Entmarkung aufweist, weite Schwankungen in der axonalen Dichte aufweist. Es zeigten sich Werte von 4,35 – 15,45 Axonkreuzungen/25 mögliche Kreuzungspunkte. Dies könnte für eine individuelle und variable Minderung der Axone bei einem Patienten sprechen.

Neben den histopathologischen Untersuchungen existieren zahlreiche MRT-Studien, die Veränderungen in der Bildgebung dokumentieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es bei der MS zu einer generalisierten Hirnatrophie kommt (Rudick et al. 1999). In Studien wurde mittels Magnetresonanzspektroskopie gezeigt, dass N-Acetylaspartat (NAA), eine Aminosäure, welche in hohen Konzentrationen in Neuronen und Axonen vorkommt und als Marker zur Erkennung der axonalen Dichte des Hirngewebes dient, bei Patienten mit

MS im gesamten Gehirn vermindert im Vergleich zu gesunden Kontrollen ist (Filippi 2003). Überdies konnte dargelegt werden, dass auch Patienten ohne klinische Behinderung und mit kurzer Krankheitsdauer einer verminderte axonale Dichte der NAWM gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe hatten. Somit könnte die axonale Schädigung in der NAWM bereits früh im Krankheitsverlauf und unabhängig von den demyelinisierenden Läsionen auftreten (De Stefano et al. 2002).

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die MTR (Magnetisierungstransfer-Ratio) der NAWM, welche auch die axonale Schädigung untersucht, mit dem EDSS-Score der MS-Patienten korrelierte (De Santis et al. 2019).

In Bezug auf die sNfL-Werte beobachtete Kuhle, dass diese auch bei Patienten erhöht waren, die keine dazu passenden gadoliniumanreichernden Läsionen in der Bildgebung aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass sNfL auch den progredienten axonalen Schaden in der NAWM widerspiegeln könnten, wenngleich in der Bildgebung keine neuen Läsionen beobachtet werden (Kuhle et al. 2019). Vertiefend konnte dargelegt werden, dass höhere sNfL-Werte mit einer verminderten Dichte der NAWM, gemessen mittels DTI, korrelieren und somit die mikrostrukturellen Veränderungen widerspiegeln (Saraste et al. 2021).

Im Gegensatz zu der ersten BE, bei der eine Korrelation der akuten axonalen Schädigung in frischen Läsionen mit den sNfL-Werten gezeigt werden konnte, fand sich in unserer Studie bei der zweiten BE in der einfachen linearen Regression ein Zusammenhang zwischen der axonalen Dichte in der NAWM und den sNfL-Werten (vgl. 3.4.2). Wir postulieren, dass die sNfL-Werte der zweiten BE eher eine schubunabhängige, chronische Axonschädigung widerspiegeln. Wenngleich sich in der NAWM auch nur ein geringer akuter axonaler Schaden zeigt, kann dieser dauerhaft akkumulieren, zu einer chronischen Axonschädigung führen und damit eine verminderte axonale Dichte bedingen. Hierbei ist auch zu bedenken, dass die NAWM ein wesentlich größeres Volumen als die entmarkten Läsionen ausmacht, sodass auch eine geringe axonale Schädigung in einem größeren Volumen zu erhöhten sNfL-Werten beitragen kann. Neben der axonalen Schädigung in der NAWM können auch weitere Faktoren, unabhängig von Schüben und gadoliniumanreichernden Läsionen, zu einer Erhöhung der sNfL-Werte führen, wie beispielsweise „smoldering lesions“, die chronisch aktive Plaques darstellen (Elliott et al. 2019).

In frühaktiven Läsionen konnte keine Korrelation zwischen der axonalen Dichte und den sNfL nachgewiesen werden. In diesen Läsionen können die Axone durch ein Ödem auseinandergedrängt sein, und es ist daher schwierig, den tatsächlichen axonalen Verlust zu bestimmen.

Somit lässt sich an dieser Stelle ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der axonalen Dichte in der NAWM als Marker der chronischen Axonschädigung und den sNfL-Werten im Krankheitsverlauf (und schubunabhängig) annehmen. Dieser Zusammenhang konnte in einer multiplen linearen Regression jedoch nicht abgebildet werden, da die Stichprobengröße nicht ausreichend groß war. Für eine aussagekräftige Regression sollten für jede aufgeführte Variable in einer multiplen linearen Regression Informationen von zehn Patienten zur Verfügung stehen. In unserem Fall wäre eine geeignete Menge somit eine Kohorte mit mindestens 60 Patienten. Die Gruppe war ebenfalls zu klein, um ein Bootstrapping durchzuführen, das heißt eine größere Kohorte zu simulieren. Ein größeres Patientenkollektiv könnte diesbezüglich weitere Rückschlüsse liefern.

4.4 Die Neurofilament Leichtketten-Färbung

Neurofilament Leichtketten, die wir im Serum gemessen haben, können auch in situ im Hirngewebe dargestellt werden. Es wäre somit zu postulieren, dass eine Reduktion der NEFL-positiven Axone im Gewebe mit den sNfL-Werten korreliert. Leider zeigte sich eine schlechte Färbequalität und so konnten durch diese technischen Schwierigkeiten nur wenige NEFL-Fälle ausgezählt werden. Dabei zeigte sich, dass signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Läsionsaktivitäten beobachtet werden können. Eine abschließende Korrelation zwischen den histologischen und Serumparametern konnte jedoch nicht vollzogen werden.

4.5 Korrelationen mit dem EDSS-Score

Abschließend wurde Korrelationen zwischen den sNfL-Werten der ersten BE und dem EDSS-Score zum Zeitpunkt der Bx, ein Jahr nach der Bx und zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups des Patienten durchgeführt (Vgl. 3.5). In allen Gleichungen zeigten sich signifikante Korrelationen zwischen den Serumwerten und dem EDSS-Score. Disanto beschrieb bereits 2015 einen Zusammenhang zwischen erhöhten sNfL-Konzentrationen

und einem höheren EDSS-Score. Damit zeigte sich, dass hohe sNfL-Werte nicht nur mit einer ausgeprägten Behinderung zum Zeitpunkt der Biopsie korrelierten, sondern auch mit der zukünftigen Behinderung. Einschränkend muss an dieser Stelle bedacht werden, dass die beobachtete Krankheitsdauer in dieser Studie eher kurz ist (2,48 Jahre im Median).

4.6 Weitere Überlegungen

In dieser Studie konnte unseres Wissens nach zum ersten Mal gezeigt werden, dass die sNfL-Werte mit der histologisch nachgewiesenen Axonschädigung korrelieren. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass hohe sNfL-Werte mit den APP-positiven Sphäroiden in den frühaktiven Läsionen korrelieren, jedoch wurde in dieser Studie nicht das jeweilige Läsionsvolumen berücksichtigt. Weiterführende Studien sollten das Läsionsvolumen zur präziseren Untersuchung der akuten axonalen Schädigung und des axonalen Verlustes des gesamten Gehirnes, beispielsweise mittels MRT-Untersuchung, beinhalten. Es liegen bereits Studien mit einer positiven Korrelation zwischen den sNfL-Werten und dem Läsionsvolumen vor (Kuhle et al. 2016b; Disanto et al. 2017). Modelle, die sowohl histologische als auch MRT-Parameter berücksichtigen könnten noch präzisere Modelle für die Ursache erhöhter sNfL-Werte liefern. Da auch die Waller´sche Degeneration wesentlich zu der axonalen Schädigung und vermutlich zur klinischen Behinderung beiträgt, sollte diese zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden. Dies könnte unter anderem sichern, ob es in der NAWM zu einer dauerhaften sNfL-Freisetzung unabhängig von neu entstehenden Läsionen kommt (Dziedzic et al. 2010; Singh et al. 2017).

5 Zusammenfassung

Die MS zählt zu den chronisch entzündlichen Autoimmunkrankheiten des zentralen Nervensystems. In Folge der axonalen Schädigung während eines Schubes oder auch schubunabhängig im Krankheitsverlauf werden NfL aus Axonen freigesetzt. Es wurde gezeigt, dass die Nf im CSF und Serum miteinander korrelieren (Kuhle et al. 2016b). Deshalb wird in vielen Studien die Rolle der sNfL als reliabler und minimal invasiver Biomarker zur Erfassung des Krankheitsverlaufs und Therapieansprechens evaluiert (Bergman et al. 2016; Disanto et al. 2016; Kuhle et al. 2016c; Siller et al. 2019; Zetterberg und Svenningsson 2019).

Die vorliegende Studie befasst sich vor allem mit der Korrelation von sNfL mit histologischen und klinischen Parametern. Dazu wurden in 106 Bx von MS-Patienten die frühe axonale Schädigung und die axonale Dichte quantifiziert. Darüber hinaus wurden 106 BEs gewonnen und mit Hilfe der SiMoA-Technologie in Bezug auf ihre NfL-Konzentration untersucht. Bei 26 Patienten erfolgte eine zweite Follow-up-Untersuchung.

Zunächst konnte in dieser Kohorte reproduziert werden, dass sNfL-Werte positiv mit dem Alter sowie negativ mit dem zeitlichen Abstand zwischen der BE und Bx korrelieren und die sNfL-Werte keine Geschlechtsabhängigkeit zeigen. Darüber hinaus fand sich, dass die Gabe von Steroiden und Immunmodulatoren/ Immunsuppressiva sechs Wochen vor der BE mit signifikant höheren sNfL-Werten korrelierte, dies spiegelt möglicherweise die Behandlung von schwerer betroffenen Patienten wider. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Patienten, die einen Schub innerhalb der letzten sechs Monate vor BE erlitten, signifikant höhere Werte aufwiesen, als die Vergleichsgruppe ohne vorhergehenden Schub.

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmalig die Korrelationen von histologischen Parametern mit den sNfL-Werten. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Korrelation zwischen den APP-positiven Sphäroiden in frühaktiven Läsionen und den Neurofilament Leichtketten im Serum. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der axonale Schaden in aktiven MS-Läsionen, nachgewiesen in der Bx, sich in den sNfL-Werten widerspiegelt. Oder umgekehrt konnte gezeigt werden, dass hohe NfL-Konzentrationen im Serum zeigen, dass histologisch ein ausgeprägter axonaler Schaden in Hirnläsionen entsteht.

Durch eine unzureichende Kohortengröße wurde in dieser Studie nur in einer einfachen Regression gezeigt, dass zudem ein Zusammenhang zwischen der axonalen Dichte in der

NAWM und der zweiten BE besteht. D.h. unabhängig von entmarkten Läsionen und klinischen Schüben ist zu vermuten, dass der sNfL-Wert schubunabhängig eine schleichende axonale Schädigung der NAWM anzeigt. In einer größeren Kohorte könnte diese Beobachtung unter Berücksichtigung weiterer Einflussfaktoren näher untersucht werden.

Wie bereits in einer publizierten Studie beschrieben, korrelieren die sNfL-Werte mit dem EDSS-Score zum Zeitpunkt der Bx (Disanto et al. 2017). Darüber hinaus zeigen sich auch signifikante Korrelationen mit dem EDSS-Score nach einem Jahr und zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups, also mit der zukünftigen Behinderung. Dies untermauert die Wichtigkeit der axonalen Schädigung für die klinische Behinderung der MS-Patienten und sNfL als wertvollen Biomarker für diese pathologischen Prozesse.

6 Anhang

6.1 Histologische Parameter

6.1.4 Keine signifikanten Unterschiede zwischen der akuten axonalen Schädigung bezüglich des Geschlechts in den Läsionsarealen und der NAWM

Läsionsaktivität	P value
EA	0,6219
LA	0,6749
IA	0,9250
PPWM	0,5099
NAWM	0,5910

6.1.5 Keine signifikanten Unterschiede der axonale Dichte in der Bielschowsky-Versilberung bezüglich des Geschlechts in den Läsionsarealen und der NAWM

Läsionsaktivität	P value
EA	0,5337
LA	0,5958
IA	0,1710
PPWM	0,8991
NAWM	0,8483

6.1.6 Keine signifikanten Unterschiede der axonalen Dichte in der NEFL-Färbung bezüglich des Geschlechts in verschiedenen Läsionsarealen in der NAWM

Läsionsaktivität	P value
EA	0,3129
LA	0,1607
IA	Zu wenige Werte
PPWM	Zu wenige Werte

NAWM	0,6

6.1.7 Keine Korrelation zwischen der akuten axonalen Schädigung und dem Alter in verschiedenen Läsionsarealen und der NAWM

Läsionsaktivität	P value
EA	0,6514
LA	0,9761
IA	0,6109
PPWM	0,3438
NAWM	0,9731

6.1.8 Keine Korrelation zwischen der axonalen Dichte in der Bielschowsky-Versilberung bezüglich des Alters in verschiedenen Läsionsarealen und der NAWM

Läsionsaktivität	P value
EA	0,0608
LA	0,8399
IA	0,9826
PPWM	0,6846
NAWM	0,5011

6.1.9 Keine Korrelation zwischen der axonale Dichte in der NEFL-Färbung bezüglich des Alters in verschiedenen Läsionsarealen und der NAWM

Läsionsaktivität	P value
EA	0,8315
LA	0,5594
IA	zu wenige Werte
PPWM	0,1841
NAWM	0,9766

6.2 Serumparameter

6.2.5 Signifikante erhöhte sNfL-Werte bei Schubereignis sechs Monate jedoch nicht sechs Wochen vor der Blutentnahme

P value (sechs Wochen)	P value (sechs Monate)
0,1510	<0,001

7 Literaturverzeichnis

Al-Chalabi A, Miller CCJ (2003): Neurofilaments and neurological disease. BioEssays 25, 346–355

Arrambide G (2016): Neurofilament light chain level is a weak risk factor for the development of MS. Neurology 87, 1076–1084

Barro C, Leocani L, Leppert D, Comi G, Kappos L, Kuhle J (2017): Fluid biomarker and electrophysiological outcome measures for progressive MS trials. Mult Scler J 23, 1600–1613

Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, Leppert D, Gobbi C, Granziera C, Yaldizli Ö, et al. (2018): Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. Brain 141, 2382–2391

Bergman J, Dring A, Zetterberg H, Blennow K, Norgren N, Gilthorpe J, Bergenheim T, Svenningsson A (2016): Neurofilament light in CSF and serum is a sensitive marker for axonal white matter injury in MS. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation 3, 271

Bezukladova S, Tuisku J, Matilainen M, Vuorimaa A, Nylund M, Smith S, Sucksdorff M, Mohammadian M, Saunavaara V, Laaksonen S, et al. (2020): Insights into disseminated MS brain pathology with multimodal diffusion tensor and PET imaging. Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation 7, 691

Bhan A, Jacobsen C, Myhr KM, Dalen I, Lode K, Farbu E (2018): Neurofilaments and 10-year follow-up in multiple sclerosis. Mult Scler J 24, 1301–1307

Bitsch A (2000): Acute axonal injury in multiple sclerosis: Correlation with demyelination and inflammation. Brain 123, 1174–1183

Bittner S, Steffen F, Uphaus T, Muthuraman M, Fleischer V, Salmen A, Luessi F, Berthele A, Klotz L, Meuth SG, et al. (2020): Clinical implications of serum neurofilament in newly diagnosed MS patients: A longitudinal multicentre cohort study. EBioMedicine 56, 102807

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

Brueck W, Stadelmann C (2003): Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. Neurol Sci 24, 265–267

Charcot J (1868): Histologie de la sclérose en plaques. Gaz Hôp Paris 554–8

De Santis S, Granberg T, Ouellette R, Treaba CA, Herranz E, Fan Q, Mainero C, Toschi N (2019): Evidence of early microstructural white matter abnormalities in multiple sclerosis from multi-shell diffusion MRI. NeuroImage Clin 22, 101699

De Stefano N, Narayanan S, Francis SJ, Smith S, Mortilla M, Tartaglia MC, Bartolozzi ML, Guidi L, Federico A, Arnold DL (2002): Diffuse Axonal and Tissue Injury in Patients With Multiple Sclerosis With Low Cerebral Lesion Load and No Disability. Arch Neurol 59, 1565

Delcoigne B, Manouchehrinia A, Barro C, Benkert P, Michalak Z, Kappos L, Leppert D, Tsai JA, Plavina T, Kieseier BC, et al. (2020): Blood neurofilament light levels segregate treatment effects in multiple sclerosis. Neurology 94, 1201–1212

Disanto G, Adiutori R, Dobson R, Martinelli V, Dalla Costa G, Runia T, Evdoshenko E, Thouvenot E, Trojano M, Norgren N, et al. (2016): Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. J Neurol Neurosurg Psychiatry 87, 126–129

Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, Zecca C, Blennow K, Zetterberg H, Leppert D, et al. (2017): Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis: Serum NfL as a Biomarker in MS. Ann Neurol 81, 857–870

Dziedzic T, Metz I, Dallenga T, König FB, Müller S, Stadelmann C, Brück W (2010): Wallerian Degeneration: A Major Component of Early Axonal Pathology in Multiple Sclerosis: Wallerian degeneration in MS. Brain Pathol 20, 976–985

Elliott C, Wolinsky JS, Hauser SL, Kappos L, Barkhof F, Bernasconi C, Wei W, Belachew S, Arnold DL (2019): Slowly expanding/evolving lesions as a magnetic resonance imaging marker of chronic active multiple sclerosis lesions. Mult Scler J 25, 1915–1925

Evangelou, N, Esiri, M, Smith, S, Palace J, Matthews F (2000): Quantitative Pathological Evidence for Axonal Loss in Normal Appearing White Matter in Multiple Sclerosis. Ann Neurol 47, 391–395

Fangerau T, Schimrigk S, Haupts M, Kaeder M, Ahle G, Brune N, Klinkenberg K, Kotterba S, Mohring M, Sindern E, Multiple sclerosis study group (2004): Diagnosis of multiple sclerosis: comparison of the Poser criteria and the new McDonald criteria. Acta Neurol Scand 109, 385–389

Ferguson B (1997): Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. Brain 120, 393–399

Filippi M (2003): Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. Brain 126, 433–437

Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014): Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. Nat Rev Neurol 10, 225–238

Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, Mandrekar J, Bramow S, Metz I, Brück W, et al. (2015): Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque: Dynamic Nature of MS Plaque. Ann Neurol 78, 710–721

Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Höftberger R, Bagnato F, Grabner G, Trattnig S, Pfeifenbring S, Brück W, Lassmann H (2016): The topograpy of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. Brain 139, 807–815

Harris V, Tuddenham J, Sadiq S (2017): Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. Degener Neurol Neuromuscul Dis Volume 7, 19–29

Harroud A, Richards JB (2018): Mendelian randomization in multiple sclerosis: A causal role for vitamin D and obesity? Mult Scler J 24, 80–85

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) (2013): Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet 45, 1353–1360

Katz Sand I (2015): Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis: Curr Opin Neurol 28, 193–205

Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, et al. (2005): Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. The Lancet 366, 579–582

Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T, Linington C, Schmidbauer M, Lassmann H (2000): Multiple Sclerosis and Chronic Autoimmune Encephalomyelitis. Am J Pathol 157, 267–276

Kuhle Jens, Plattner K, Bestwick JP, Lindberg RL, Ramagopalan SV, Norgren N, Nissim A, Malaspina A, Leppert D, Giovannoni G, Kappos L (2013): A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. Mult Scler J 19, 1597–1603

Kuhle J., Malmeström C, Axelsson M, Plattner K, Yaldizli Ö, Derfuss T, Giovannoni G, Kappos L, Lycke J (2013): Neurofilament light and heavy subunits compared as therapeutic biomarkers in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 128, 33–36

Kuhle J, Barro C, Andreasson U, Derfuss T, Lindberg R, Sandelius Å, Liman V, Norgren N, Blennow K, Zetterberg H (2016a): Comparison of three analytical platforms for quantification of the neurofilament light chain in blood samples: ELISA, electrochemiluminescence immunoassay and Simoa. Clin Chem Lab Med CCLM 54, 1655-1661

Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Soneson C, Bonnier G, Yaldizli Ö, Regeniter A, Derfuss T, Canales M, others (2016b): Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. Mult Scler J 22, 1550–1559

Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, Dahlke F, Tomic D, Leppert D, Kappos L (2019): Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. Neurology 92, 1007–1015

Kuhlmann T (2002): Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. Brain 125, 2202–2212

Kurtzke JF (2015): On the origin of EDSS. Mult Scler Relat Disord 4, 95–103

Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005): Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. Brain 128, 2705–2712

Lewczuk P, Ermann N, Andreasson U, Schultheis C, Podhorna J, Spitzer P, Maler JM, Kornhuber J, Blennow K, Zetterberg H (2018): Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. Alzheimers Res Ther 10, 71

Lipphardt M, Mühlhausen J, Kitze B, Heigl F, Mauch E, Helms H-J, Müller GA, Koziolek MJ (2019): Immunoadsorption or plasma exchange in steroid-refractory multiple sclerosis and neuromyelitis optica. J Clin Apheresis 34, 381–391

Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S (2000): Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. Brain 123, 308–317

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, et al. (2014): Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. Neurology 83, 278–286

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, 707–714

Mañé-Martínez MA, Olsson B, Bau L, Matas E, Cobo-Calvo Á, Andreasson U, Blennow K, Romero-Pinel L, Martínez-Yélamos S, Zetterberg H (2016): Glial and neuronal markers in cerebrospinal fluid in different types of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 299, 112–117

Martyn CN, Gale CR, Cn M, Cr G (1997): The epidemiology of multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 95, 3–7

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung H-P, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, et al. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. Ann Neurol 50, 121–127

Metz I, Weigand SD, Popescu BFG, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2014): Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions: Pathologic Heterogeneity in MS. Ann Neurol 75, 728–738

Moll NM, Rietsch AM, Thomas S, Ransohoff AJ, Lee J-C, Fox R, Chang A, Ransohoff RM, Fisher E (2011): Multiple sclerosis normal-appearing white matter: Pathology-imaging correlations. Ann Neurol 70, 764–773

Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, Clanet M, Comi G, Derfuss T, Fazekas F, et al. (2018): ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. Eur J Neurol 25, 215–237

Neselius S, Brisby H, Theodorsson A, Blennow K, Zetterberg H, Marcusson J (2012): CSF-Biomarkers in Olympic Boxing: Diagnosis and Effects of Repetitive Head Trauma. PLoS ONE 7, 33606

Neselius S, Brisby H, Granholm F, Zetterberg H, Blennow K (2014): Monitoring concussion in a knocked-out boxer by CSF biomarker analysis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 23, 2536–2539

Neselius S, Brisby H, Granholm F, Zetterberg H, Blennow K (2015): Monitoring concussion in a knocked-out boxer by CSF biomarker analysis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 23, 2536–2539

Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X (2018): Multiple sclerosis: clinical aspects. Curr Opin Neurol 31, 752–759

Paolillo A, Pozzilli C, Gasperini C, Giugni E, Mainero C, Giuliani S, Tomassini V, Millefiorini E, Bastianello S (2000): Brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with 'black holes', disease duration and clinical disability. J Neurol Sci 174, 85–91

Pfeifenbring S, Bunyan RF, Metz I, Röver C, Huppke P, Gärtner J, Lucchinetti CF, Brück W (2015): Extensive acute axonal damage in pediatric multiple sclerosis lesions: Axonal Damage in Pediatric MS. Ann Neurol 77, 655–667

Pittock SJ (2005): Clinical course, pathological correlations, and outcome of biopsy proved inflammatory demyelinating disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 76, 1693–1697

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 69, 292–302

Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. Ann Neurol 13, 227–231

Rudick RA, Fisher E, Lee, J-C, Simon J, Jacobs L (1999): Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. Neurology 53, 1698–1704

Saraste M, Bezukladova S, Matilainen M, Tuisku J, Rissanen E, Sucksdorff M, Laaksonen S, Vuorimaa A, Kuhle J, Leppert D, Airas L (2021): High serum neurofilament associates with diffuse white matter damage in MS. Neurol - Neuroimmunol Neuroinflammation 8, 926

Sastre-Garriga J, Tintoré M, Rovira A, Nos C, Río J, Thompson AJ, Montalban X (2004): Specificity of Barkhof Criteria in Predicting Conversion to Multiple Sclerosis When Applied to Clinically Isolated Brainstem Syndromes. Arch Neurol 61, 222

Schörner VW, Köhler D, Baum K, Girke W (1985): Das Erscheinungsbild der multiplen Sklerose im magnetischen Resonanztomogramm ". Fortgeschr Röntgenstr 5, 487–494

Shahim P, Zetterberg H, Tegner Y, Blennow K (2017): Serum neurofilament light as a biomarker for mild traumatic brain injury in contact sports. Neurology 88, 1788–1794

Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, Barro C, Uphaus T, Groppa S, Kappos L, Zipp F, Bittner S (2019): Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. Mult Scler J 25, 678–686

Singh S, Dallenga T, Winkler A, Roemer S, Maruschak B, Siebert H, Brück W, Stadelmann C (2017): Relationship of acute axonal damage, Wallerian degeneration, and clinical disability in multiple sclerosis. J Neuroinflammation 14, 57

Stork L, Ellenberger D, Beißbarth T, Friede T, Lucchinetti CF, Brück W, Metz I (2018): Differences in the Reponses to Apheresis Therapy of Patients With 3 Histopathologically Classified Immunopathological Patterns of Multiple Sclerosis. JAMA Neurol 75, 428

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol 17, 162–173

Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE, Rom W, Sanda M, Sorbara L, Stass S, et al. (2009): Standard Operating Procedures for Serum and Plasma Collection: Early Detection Research Network Consensus Statement Standard Operating Procedure Integration Working Group. J Proteome Res 8, 113–117

Waubant E, Lucas R, Mowry E, Graves J, Olsson T, Alfredsson L, Langer-Gould A (2019): Environmental and genetic risk factors for MS: an integrated review. Ann Clin Transl Neurol 6, 1905–1922

Zetterberg H, Svenningsson A (2019): Serum neurofilament light and prediction of multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. Neurology 92, 313–314

Zetterberg H, Smith DH, Blennow K (2013): Biomarkers of mild traumatic brain injury in cerebrospinal fluid and blood. Nat Rev Neurol 9, 201–210

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. med. Wolfgang Brück dafür bedanken, dass ich am Institut für Neuropathologie an diesem Thema forschen durfte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Kollegen des Instituts für Neuropathologie bedanken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen Doktoranden für das angenehme Miteinander, Schirin Stephan für die gemeinsame Zeit, Dr. Niels Kruse für die Durchführung der Experimente an der SiMoA, Mareike Gloth für ihre technische Assistenz und Sven Müller für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Patientendaten.

Allen studentischen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Statistik und Herrn Leha für die Hilfestellungen bei der statistischen Ausarbeitung.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. med. Lidia Stork für den intensiven Austausch während der gesamten Forschungszeit und für die zahlreichen Anleitungen und Gespräche um diese Studie und darüber hinaus.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. med. Imke Metz für die Anregung zu dieser Studie. Vielen Dank für die sehr gute und umfassende Betreuung über die gesamte Zeit mit vielen Gesprächen und Mikroskopiereinheiten. Durch ihre stete Motivation und ausführliches Feedback konnte diese Doktorarbeit an meinem zweiten Studienort vollendet werden.