

III. Medizinische Klinik
Technische Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel)

**Serum-Spiegel pro- und antiinflammatorischer Zytokine bei
Multiple Sklerose-Patienten unter Interferon- β 1b-Therapie**

Christiane Wilke

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Chr. Peschel
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 01.07.2003 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003
angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiple Sklerose.....	1
1.1.1	Allgemeines.....	1
1.1.2	Pathologie.....	2
1.1.3	Klinik und Verlaufsformen.....	3
1.1.4	Ätiologie.....	7
1.1.5	Immunologie.....	9
1.1.6	Diagnostik.....	14
1.2	Zytokine und Multiple Sklerose.....	18
1.3	Therapie der Multiplen Sklerose.....	21
1.3.1	Bisherige Therapieansätze.....	21
1.3.2	Interferone.....	23
1.3.3	Interferone in der Therapie der MS.....	25
1.3.4	Interferon- β 1a.....	26
1.3.5	Interferon- β 1b (Betaferon®).....	27
1.3.6	Wirkweise von Interferon- β 1b.....	28
1.3.7	Nebenwirkungen von Interferon- β 1b.....	30
1.3.8	Kontraindikation von Interferon- β 1b.....	31
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	32
2	Material und Methoden.....	34
2.1	Studiendesign.....	34
2.2	Patienten.....	34
2.3	Abnahmezeiten der Patientenproben.....	35
2.4	Aufarbeitung und Aufbewahrung der Proben.....	35
2.5	Durchführung der Messungen.....	36
2.5.1	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	38
2.5.2	Löslicher Tumornekrosefaktor-Rezeptor II (sTNF-RII).....	39

2.5.3	Interleukin-6 (IL-6).....	40
2.5.4	Löslicher Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R).....	40
2.5.5	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R).....	41
2.5.6	Interleukin-1 β (IL-1 β).....	42
2.5.7	Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra).....	43
2.5.8	Interleukin-10 (IL-10).....	43
2.5.9	Neopterin.....	44
2.5.10	β 2-Mikroglobulin.....	45
3.3	Statistische Berechnungen.....	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Patienten.....	47
3.1.1	Klinischer Verlauf unter IFN- β 1b-Therapie.....	48
3.1.2	Nebenwirkungen unter IFN- β 1b-Therapie.....	48
3.2	Verlauf der Zytokinkonzentration unter IFN- β 1b-Therapie.....	49
3.2.1	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	49
3.2.2	Löslicher Tumornekrosefaktor-Rezeptor II (sTNF-RII).....	49
3.2.3	Interleukin-6 (IL-6).....	51
3.2.4	Löslicher Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R).....	54
3.2.5	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R).....	56
3.2.6	Interleukin-1 β (IL-1 β).....	58
3.2.7	Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra).....	58
3.2.8	Interleukin-10 (IL-10).....	60
3.2.9	Neopterin.....	62
3.2.10	β 2-Mikroglobulin.....	64
4	Diskussion.....	67
4.1	Interferon- β 1b zur Therapie der Multiplen Sklerose.....	67
4.2	Zytokine bei MS und unter Interferon- β 1b- Therapie.....	68
4.2.1	Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	68
4.2.2	Löslicher Tumornekrosefaktor- Rezeptor II (sTNF-RII).....	70
4.2.3	Interleukin-6 (IL-6).....	73

4.2.4	Löslicher Interleukin-6 -Rezeptor (sIL-6R).....	76
4.2.5	Löslicher Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R).....	77
4.2.6	Interleukin-1 β (IL-1 β).....	80
4.2.7	Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra).....	82
4.2.8	Interleukin-10 (IL-10).....	85
4.2.9	Neopterin.....	87
4.2.10	β 2-Mikroglobulin.....	89
4.3	Methodische Probleme.....	90
5	Zusammenfassung.....	92
6	Literaturverzeichnis.....	95
7	Anhang.....	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Symptome zu Beginn der Krankheit in %.....	3
Tabelle 1.2	Symptome im Krankheitsverlauf in %.....	4
Tabelle 1.3	Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.....	5
Tabelle 1.4	Prognostisch günstige und ungünstige Faktoren für den Verlauf der MS-Erkrankung.....	7
Tabelle 1.5	EDSS nach Kurtzke, Ausmaß der Behinderung bei MS.....	15
Tabelle 1.6	Diagnostische Kriterien für MS nach Poser.....	16
Tabelle 1.7	Neue diagnostische Kriterien der MS n. Mc Donald.....	17
Tabelle 1.8	Wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine.....	19
Tabelle 1.9	Vergleich von α -, β - und γ - Interferonen.....	24
Tabelle 1.10	Unterschiede zwischen den zur Behandlung der schubförmig-remittierend verlaufenden MS zugelassenen β -Interferonen.....	26
Tabelle 1.11	Hypothetische Effekte von Interferon- β	29
Tabelle 1.12	Häufige Nebenwirkungen der Interferon- β 1b-Therapie.....	31
Tabelle 1.13	Gemessene pro- und antiinflammatorische Zytokine und Entzündungsmarker.....	32
Tabelle 3.1	Mittelwerte m. Standardabweichung, Median, minimalem und maximalem Wert von Alter, Krankheitsdauer, Schub- frequenz, Anzahl der Schübe/Jahr und EDSS der Pat- ienten	47
Tabelle 3.2	Statistische Werte der sTNF-RII-Konzentration im Serum von 12 Patienten.....	50
Tabelle 3.3	Statistische Werte der IL -6-Konzentration im Serum von 18 Patienten	53
Tabelle 3.4	Vergleich der IL-6-Konzentration von 3 Patienten mit Mittelwert und Median aller gemessenen Konzentrationen...	54
Tabelle 3.5	Statistische Werte der sIL -6R-Konzentration im Serum von 12 Patienten.....	55

Tabelle 3.6	Statistische Werte der sIL -2R-Konzentration im Serum von 23 Patienten.....	57
Tabelle 3.7	Statistische Werte der IL -1ra-Konzentration im Serum von 18 Patienten.....	59
Tabelle 3.8	Statistische Werte der IL -10-Konzentration im Serum von 19 Patienten	61
Tabelle 3.9	Statistische Werte der Neopterin- Konzentration im Serum von 17 Patienten.....	63
Tabelle 3.10	Statistische Werte der β 2-Mikroglobulin- Konzentration im Serum von 13 Patienten.....	65
Tabelle 4.1	Nachweis von IL -1 β im Serum und Liquor von MS- Patienten in der Literatur.....	81
Tabelle Anhang	Demographie der Patienten #1-21.....	Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	ELISA.....	37
Abbildung 3.1	Mittelwerte der absoluten sTNF-RII-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	51
Abbildung 3.2	Mittelwerte der absoluten IL-6-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	53
Abbildung 3.3	Mittelwerte der absoluten sIL-6R-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	56
Abbildung 3.4	Mittelwerte der absoluten sIL-2R-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	57
Abbildung 3.5	Mittelwerte der absoluten IL-1ra-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	60
Abbildung 3.6	Mittelwerte der absoluten IL-10-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	62
Abbildung 3.7	Mittelwerte der absoluten Neopterin-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	64
Abbildung 3.8	Mittelwerte der absoluten β 2-Mikroglobulin-Konzentration im Serum zu 6 Meßzeitpunkten.....	65

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CP	chronisch-progredient
EAE	Experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EAISA	Enzyme Amplified Sensitivity Immuno-Assay
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
FS	Funktionssysteme
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
ICAM	Intrazelluläre Adhäsionsmoleküle
ICE	Interleukin-1-Converting-Enzyme
IFN	Interferon
IFN- β 1a	Interferon- β 1a
IFN- β 1b	Interferon- β 1b
IL	Interleukin
KDa	KiloDalton
KM	Kontrastmittel
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LJ	Lebensjahr
MAG	Myelinassoziertes Glykoprotein
MBP	Myelinbasisches Protein
MEIA	Mikropartikel-Enzymimmunoassay
MHC	Major-Histocompatibilitäts-Komplex
MIU	Millionen internationale Einheiten
MOG	Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
NK	Natürliche Killerzellen
NW	Nebenwirkungen

OD	Optische Dichte
PRIMS	Prevention of Relapses and Disability by Interferon- β 1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis
RM	Rückenmark
RNS	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
sIL-R	Lösliche Interleukin-Rezeptoren
SR	schubförmig-remittierend
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
TMB	Tetramethylbenzin
TNF	Tumornekrosefaktor
VEP	Visuell evozierte Potentiale
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Allgemeines

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) in Nordeuropa und Nordamerika. Sie befällt weltweit ca. 1,2 Mio. Menschen, in Deutschland rechnet man nach einer Hochrechnung aus dem Jahr 2000 (Hein et al., 2000) mit insgesamt 122.000 Erkrankten. Die Prävalenz in unseren Breiten beträgt etwa 149 pro 100.000, die Inzidenz liegt bei 61 Neuerkrankungen / 100.000 Einwohner /Jahr und nimmt weiter zu (Haupts, 2001).

Im Juli 1993 wurde Interferon- β 1b (IFN- β 1b) als erstes Medikament zur Behandlung der schubförmig-remittierenden Form der Multiplen Sklerose in den USA zugelassen, im Januar 1996 kam dieses Medikament in Europa auf den Markt. Sowohl das amerikanische als auch das europäische Zulassungsverfahren basiert auf einer in den USA und Kanada durchgeführten multizentrischen Doppelblindstudie. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass die subkutane Applikation von IFN- β 1b bei schubförmig-remittierender MS Zahl und Schwere der Schübe reduziert und zu einer Stabilisierung der kernspintomographisch nachweisbaren Läsionen führt (IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993 und 1995).

Die Einführung von IFN- β 1b in der Therapie der MS kann folglich als ein erster Schritt hin zu einer wirksameren Behandlung der Erkrankung angesehen werden, jedoch bleiben hinsichtlich der Wirkungsweise von IFN- β 1b viele Fragen weiter offen. Auch die Ätiologie der Erkrankung konnte in jahrzehntelanger intensiver Forschung bisher nicht vollständig aufgeklärt werden.

1.1.2 Pathologie

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Pathophysiologisches Hauptmerkmal der MS sind Läsionen der weißen Substanz des ZNS, sogenannte Entmarkungsherde (Plaques). Die Mark- bzw. Myelinscheide wird im ZNS durch Oligodendrozyten gebildet, die sich um das Axon wickeln, als Isolator fungieren und für die Reizleitung eine wichtige Rolle spielen.

Ein akuter Schub ist histologisch charakterisiert durch in der weißen Substanz verstreut liegende perivaskuläre entzündliche Infiltrate, die hauptsächlich aus antigenspezifischen autoreaktiven T-Zellen und Makrophagen bestehen (Martino et al., 1998). Wiederholte Episoden einer akuten Entzündungsreaktion im ZNS führen schließlich zur Schädigung der Myelinscheiden (Entmarkung) und damit zur Störung der neuronalen Erregungsleitung. Bei der chronischen MS findet man in den inaktiven Herden keinen aktiven Myelinabbau, es herrscht eine reaktive fibrilläre Gliose der Astrogliazellen vor (Lassmann, 1997), wodurch eine Verhärtung eintritt, die der Krankheit ihren Namen gegeben hat. In diesen chronisch inaktiven Läsionen ist die Anzahl der Oligodendrozyten deutlich reduziert oder sie fehlen komplett.

Zur Unterscheidung von aktiven und inaktiven Entmarkungsherden werden vor allem drei Kriterien herangezogen: Bei aktiven Entzündungsherden findet man eine erhöhte Zelldichte, eine unscharfe Begrenzung der Plaques von der Umgebung und die Präsenz von Abbauprodukten (Neutralfett) in den Makrophagen. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß das Entmarkungsmuster der Plaques bei verschiedenen MS-Patienten sehr heterogen ist (Lucchinetti et al., 2000). Der Entstehung der Plaques liegen unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zugrunde. Diese Beobachtung haben Konsequenzen für das Verständnis der MS-Pathogenese und das Design zukünftiger Therapieansätze.

Die Entmarkungsherde treten vor allem an bestimmten Prädilektionsherden auf: bevorzugt periventrikulär, im Hirnstamm, im Kleinhirn, im Rückenmark und im Nervus bzw. Tractus opticus.

Neben der Entmarkung spielt die axonale Schädigung eine Rolle vor allem in aktiven MS-Läsionen. Der Entstehungsmechanismus ist noch weitgehend unbekannt; es konnte jedoch in neueren Studien (Bitsch et al., 2000) eine Assoziation der

Axonschädigung mit der Anzahl von Makrophagen und CD8-positiven T-Lymphozyten in den Läsionen gezeigt werden.

1.1.3 Klinik und Verlaufsformen

Das typische Erkrankungsalter liegt zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr. Die Erkrankung befällt Frauen doppelt so häufig wie Männer (Mitrovic et al., 1999).

Früher wurden als entscheidende klinische Merkmale der Multiplen Sklerose (MS) die Charcotsche Trias (Intentionstremor, Nystagmus und skandierende Sprache) oder die Trias von Marburg (temporale Ablassung der Papillen, Paraspastik und fehlende Bauchhautreflexe) herausgestellt. Eingehende klinische Datenanalysen haben jedoch gezeigt, dass allein das disseminierte Symptombild und der Verlauf in Schüben und Remissionen als kennzeichnende Kriterien zu werten sind.

Klinik in %	1)	2)	3)	4)
Sensibilitätsstörungen	41,3	42	40	33
Sehstörungen	36,9	33	34	30
Gangstörungen	31,8			18
Paresen	23,4	44	39	ca. 16
Schwindel	8,0		5	
Sphinkterstörungen	5,5	9	5	
Feinmotorikstörungen	3,9			
Müdigkeit	1,6			
Epileptische Anfälle	0,7			
Psychische Störungen	0,6	4		

Tabelle 1.1: Symptome zu Beginn der Krankheit in %

1) Beer und Kesselring, 1988, N = 688; 2) Poser et al., 1986, N = 3248; 3) Matthews, 1985; 4) Paty und Poser, 1984, N = 461

Die klinisch sehr variable Symptomatik ist abhängig von der Lokalisation der Entmarkungsherde. Zu Beginn finden sich besonders (jeweils in abnehmender Häufigkeit, s. Tabelle 1.1) Gangstörungen und Paresen der unteren Extremitäten, Sensibilitätsstörungen, Sehstörungen bei Neuritis nervi optici, Koordinationsstörungen oder Störungen der Augenmotilität. Im weiteren

Krankheitsverlauf treten oft Miktions-, Defäkations- und Sexualektionsstörungen und psychische Veränderungen hinzu ([Kesselring, 1997], Tabelle 1.2).

Klinik	1)	2)
Remission	72	
• schubförmig		35
• primär progredient		19
• schubförmig-progredient		47
Pyramidenbahnläsion	99	>80
Visus-u. Augenmotilitätsstörungen	85	ca. 80
Blasenstörungen	82	57
Hirnstamm-/ Kleinhirnstörungen		75
Dysarthrie	55	20
Gleichgewichtsstörungen	80	
Sensibilitätsstörungen		83
Vibrations-/ Lagesinn	71	
Parästhesien	66	
Nystagmus	70	42
Gangataxie	55	
Mentale/ kognitive Ausfälle	45	

Tabelle 1.2: Symptome im Krankheitsverlauf in %

1) 111 autopsisch belegte Fälle (Poser et al., 1984)

2) 3248 Patienten, mittlere Krankheitsdauer 10,8 Jahre (Poser, 1986)

Im allgemeinen werden Schübe zum Ausschluß physiologischer Schwankungen definiert als das Auftreten eines neuen oder das Wiederauftreten eines früher vorhanden gewesenen Krankheitssymptoms zu irgendeinem Zeitpunkt (Matthews et al., 1991). Als Ausdruck eines Schubes sollen Symptome bewertet werden, die auf eine neue Läsion im ZNS zurückgeführt werden können oder andererseits auf eine Reaktivierung von Läsionen, die sich früher einmal bemerkbar gemacht haben (Poser et al., 1990). Die Symptome dürfen nicht durch hohe Temperaturen, Infekt, Begleiterkrankungen, Erschöpfung oder körperliche bzw. seelische Belastung ausgelöst sein, außerdem müssen seit dem letzten Schub mehr als vier Wochen vergangen sein (Poser et al., 1983). Dieses grenzt den akuten Schub von einer vorübergehenden Verschlechterung der Symptomatik im Rahmen äußerer Einflüsse und Begleiterkrankungen ab (sog. Pseudoschub).

Diese Unterscheidung ist für die klinische Beurteilung von Bedeutung, und von diesem Standpunkt aus lässt sich eine willkürliche Trennlinie von 24-48 Stunden Dauer rechtfertigen, auch wenn sich eine solche pathophysiologisch nicht begründen lässt. Allgemein anerkannt ist die Einteilung der Verlaufsformen nach Lublin et al., 1996 (Tabelle 1.3). Bei ca. 80 % der Patienten verläuft die MS schubförmig-remittierend, das bedeutet, dass neurologische Symptome akut auftreten bzw. sich akut verschlechtern und über mindestens 24 Stunden bestehen bleiben. Zwischen den unregelmäßig auftretenden Schüben kommt es zu einer teilweisen oder vollständigen Remission der Symptome. Der schubförmig-remittierende Verlauf der MS geht bei den meisten Patienten nach einigen Jahren in den sekundär chronisch-progredienten Verlauf über. So zeigen nach 10 Jahren ca. 50% der Patienten, deren Krankheit zu Beginn schubförmig verlief, einen sekundär chronisch-progredienten Verlauf. Es können auch bei dieser Verlaufsform noch Schübe auftreten, jedoch ist ein chronisches Fortschreiten der Symptome das charakteristische Merkmal (Poser et al., 1996).

Schubförmig-remittierend (Relapsing Remitting [RR])
= klar zeitlich abgrenzbarer Krankheitsschub mit kompletter od. inkompletter Remission; keine Krankheitsprogression im Schubintervall
Sekundär chronisch-progredienter Verlauf (Secondary Progressive [SP])
= initial schubförmiger Verlauf mit Übergang in einen chronisch progredienten Verlauf; superponierte Schübe od. temporäre Verbesserungen können auftreten, aber kein progressionsfreies Intervall
Primär chronisch-progredienter Verlauf (Primary Progressive [PP])
= von Krankheitsbeginn an chronisch progredienter Verlauf ohne Auftreten von Schüben; gelegentlich temporäre Plateaus bzw. Verbesserungen
Schubförmig-progredienter Verlauf (Relapsing Progressive [RP])
=primär progrediente Verlaufsform kombiniert mit eindeutig abgrenzbaren Schüben

Tabelle 1.3: Klinische Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (modifiziert nach [Lublin et al., 1996])

Bei ca. 10 % der MS-Patienten verläuft die Erkrankung von Beginn an chronisch-progredient. Dieser primär chronisch-progrediente Verlauf tritt häufig bei Patienten mit einem höherem Erkrankungsalter auf und ist prognostisch als eher ungünstig zu bewerten.

In der älteren Literatur wird regelmäßig eine Krankheitsdauer von der Diagnose MS bis zum Tod zwischen 13 und 20 Jahren angegeben (Weinshenker et al., 1987). Die Lebenserwartung von MS-Patienten war früher im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung um mindestens 14-18 Jahre verkürzt. Heute kann bei der Multiplen Sklerose mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von mindestens 25-30 Jahren gerechnet werden. Bei einem Drittel der Fälle ist sie länger als 30 Jahre. Für diejenigen Patienten, bei denen die Krankheit nach dem 50. Lebensjahr beginnt, ist die durchschnittliche Lebenserwartung 10 Jahre nach Krankheitsbeginn für Männer um 44% und für Frauen um 22% gegenüber der Durchschnittsbevölkerung vermindert (Phadke et al., 1988). Ein guter Indikator für die Überlebensdauer nach Krankheitsbeginn ist die Länge des Intervalls zwischen dem ersten und dem nächsten Schub.

Prognostisch günstige Faktoren sind ein niedriges Erkrankungsalter (vor dem 40. Lebensjahr), ein rein schubförmiger Verlauf, ein Beginn mit sensiblen oder Sehstörungen, ein monosymptomatischer Verlauf zu Beginn, eine Dauer der ersten Symptome von weniger als sechs Monaten, eine lang dauernde Remission nach dem ersten Schub, eine geringe Schubfrequenz zu Beginn sowie eine leere Familienanamnese und wahrscheinlich auch eine Schwangerschaft während der Erkrankung ([Weinshenker et al., 1991], Tabelle 1.4). Nach wie vor ist die „5-Jahres-Regel“ von Kurtzke hilfreich, die besagt, dass der Grad der Behinderung in den ersten fünf Jahren nach Krankheitsbeginn ein wichtiger prognostischer Marker für den weiteren Krankheitsverlauf ist und der Behinderungsgrad nach fünfjähriger Krankheitsdauer dreiviertel desjenigen nach 15 Jahren beträgt (Flachenecker u. Hartung, 1996).

Nur ganz selten ist die Multiple Sklerose selbst die unmittelbare Todesursache. In etwas mehr als der Hälfte der Fälle ist die Todesursache allerdings indirekt auf die Krankheit zurückzuführen, da sich in deren Folge Bronchopneumonien, Pyelonephritiden mit Urämie oder Sepsis entwickeln können (Allen et al., 1978).

Prognostisch günstig	Prognostisch ungünstig
niedriges Erkrankungsalter (<40.LJ)	Erkrankung nach dem 40. LJ
schubförmiger Verlauf	primär / sekundär chronischer Verlauf
monosymptomatischer Verlauf zu Beginn	Betroffensein multipler Systeme zu Beginn
Beginn m. sensiblen oder Sehstörungen	zerebelläre, psychiatrische od. RM-Symptome zu Beginn
Dauer des ersten Schubs < sechs Monate	Blasenstörungen zu Beginn
lange Remission nach erstem Schub	
geringe Schubfrequenz zu Beginn	
Schwangerschaft	
leere Familienanamnese	

Tabelle 1.4: Prognostisch günstige und ungünstige Faktoren für den Verlauf der MS-Erkrankung (modifiziert nach Weinshenker et al., 1991)

Sowohl die Einteilung der MS nach den verschiedenen Verlaufsformen als auch die Prognose gründen sich bislang noch auf rein klinische Beobachtungen. Durch den Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) in der Diagnostik der MS konnte gezeigt werden, dass ein wesentlicher Teil der Erkrankung subklinisch verläuft; in einer Studie von Lucchinetti et al., 1996 wurden histologisch Läsionen nachgewiesen, die nicht mit der gegenwärtigen Einteilung in die klinischen Verlaufsformen übereinstimmen. Diese Entwicklung zeigt, dass es notwendig ist, die rein klinische Klassifikation um paraklinische Faktoren zu ergänzen und möglicherweise neu zu definieren.

1.1.4 Ätiologie

Die Ursache der Multiplen Sklerose (MS) ist bis heute nicht geklärt; aufgrund von klinischen, immunologischen und genetischen Daten geht man jedoch von einer multifaktoriellen Erkrankung aus.

Eine familiäre Häufung der MS ist bereits lange bekannt (Oksenberg et al., 2001). Anhand von Zwillingsstudien konnte für monozygote Zwillinge eine Konkordanzrate von 25-30%, für dizygote Zwillinge von 2,3% und für Geschwister von 1,9% ermittelt

werden (Ebers et al., 1995). 15% der Patienten haben ein betroffenes Familienmitglied, wobei das Risiko für Geschwister am größten ist (Ebers, 1983).

Unter den genetischen Faktoren scheint eine Assoziation zu bestimmten Allelen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl.: *major histocompatibility complex* = MHC) eine Rolle zu spielen. Bei dem MHC handelt es sich um eine Gruppe von Genen auf dem Chromosom 6, die für die Humanen Leukozytenantigene (HLA) kodieren. Diese sind bei immunologischen Reaktionen für die Antigenpräsentation notwendig. Die MS ist schwach mit HLA-A3 und HLA-B7, stark dagegen mit der D2-Region, insbesondere mit HLA-DR2/Dw2 assoziiert. Für die deutsche Bevölkerung ist das Risiko, an MS zu erkranken, etwa vierfach erhöht, wenn das Allel HLA-DR2 exprimiert wird (Oksenberg et al., 1993). Der funktionelle Zusammenhang dieser Assoziation zwischen bestimmten HLA-Antigenen und der MS ist jedoch noch nicht geklärt.

Migrationsstudien (Compston et al., 1997) zeigen, dass das Erkrankungsrisiko für Migranten, die ihr Geburtsland vor dem 15. Lebensjahr verlassen, gleich dem der Einwohner des neuen Heimatlandes ist. Personen, die in höherem Alter emigrieren, nehmen hingegen das Erkrankungsrisiko ihres Ursprungslandes mit. Diese Beobachtungen lassen eine Verknüpfung der MS mit Umweltfaktoren in bestimmten geographischen Regionen vermuten, die in der Kindheit einwirken und nach einer Latenzzeit von einigen Jahren zur Manifestation der Erkrankung beitragen.

Verschiedensten viralen und bakteriellen Infektionen ist in der Vergangenheit eine Rolle bei der Entstehung der MS zugewiesen worden. MS-Exazerbationen treten drei- bis fünfmal häufiger im zeitlichen Zusammenhang mit Virusinfektionen auf (Sibley et al., 1985), serologische Assoziationen sind z.B. für das humane Herpesvirus 6, das Epstein-Barr-Virus und für *Chlamydia pneumoniae* gefunden worden. Die direkte Auslösung oder Verursachung der Erkrankung durch eine Virusinfektion konnte jedoch nicht belegt werden. Die Autoimmunantwort bei MS wird vermutlich durch die Ähnlichkeit von Virusantigenen mit enzephalitogenen Antigenen ausgelöst.

1.1.5 Immunologie

Die Pathomechanismen der Multiplen Sklerose (MS) sind bislang noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt. Nosologisch zählt die MS zu den Autoimmunkrankheiten, da nach dem heutigen Kenntnisstand bei der MS autoreaktive T-Lymphozyten (bzw. T-Zellen) Entzündungsreaktionen hervorrufen, die zu einer Demyelinisierung der Axone führen (Steinman, 1996). Um die komplexen Vorgänge dieser immunologischen Reaktion besser verstehen zu können, werden hier zunächst mögliche Autoantigene sowie die Zellen des Immunsystems, die bei der MS eine Rolle bei der Auslösung einer Entzündungsreaktion spielen und die Entzündungsmediatoren vorgestellt. Anschließend wird ein zusammenfassender Überblick über den Ablauf der zugrunde liegenden Autoimmunreaktion gegeben.

Zu den bislang am besten untersuchten Proteinen, die als Auslöser der Autoimmunreaktion bei MS in Frage kommen, zählen Bestandteile des Myelins wie das basische Myelinprotein (engl.: *myelin basic protein* = MBP), das Proteolipidprotein (PLP) sowie das myelinassoziierte Glykoprotein (MAG) und das Myelin-Oligodendroglia-Glykoprotein (MOG), die an der Myelinoberfläche lokalisiert sind (Brunner et al., 1989). Einige allgemein verbreitete virale Proteine, wie z.B. Masern-, Hepatitis B-, Influenza- und Adenoviren, weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine große Ähnlichkeit zu diesen Komponenten der Myelinscheide auf. Durch sogenanntes molekulares Mimikry (Kreuzreaktion zwischen viralen oder bakteriellen Antigenen und Autoantigenen) könnte eine unspezifische Aktivierung bzw. Autoimmunisierung der T-Zellen gegen das Myelin erfolgen (Wucherpfennig u. Strominger, 1995).

Die im Zentrum der Immunantwort stehenden T-Zellen sind in der Lage, über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene zu erkennen, wenn sie ihnen von körpereigenen, d.h. HLA-identischen Zellen dargeboten werden. HLA-Klasse-I-Moleküle (mit den Gen-Loci HLA-A, -B, -C) finden sich auf nahezu allen Körperzellen, präsentieren vorwiegend endogen produzierte (z.B. virale) Peptide und werden von einer T-Lymphozyten-Subpopulation erkannt, die den Oberflächenmarker CD8 trägt und meist eine zytotoxische Effektorfunktion besitzt. HLA-Klasse-II-Moleküle (mit den Gen-Loci HLA-DP, -DQ, -DR) sind dagegen in der Regel nur auf sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten (bzw. B-Zellen) vorhanden,

können auf anderen Zellen aber z.T. durch die Zytokine Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert werden. Sie werden von CD4-positiven T-Zellen, sogenannten T-Helferzellen erkannt, welche unerlässlich für die Auslösung der Immunantwort sind und nach Aktivierung ihrerseits anderen Immunzellen wie Makrophagen, B-Lymphozyten und zytotoxischen Lymphozyten zu Effektorfunktionen verhelfen.

Eine besondere Stellung bezüglich des Immunsystems nimmt das ZNS ein (Wekerle et al. ,1986). Es gilt als „immunprivilegiertes“ Organ, weil das Eindringen von Immunglobulinen, Entzündungsmediatoren und Zellen des Immunsystems erschwert ist. Erstens besitzt das ZNS keine lymphatische Drainage, welche den Lymphknoten wie in anderen Organen Antigene zuführen könnte. Zweitens werden im ZNS normalerweise keine HLA-Klasse-II-Moleküle exprimiert (und nur wenig HLA-Klasse-I-Moleküle), ohne die aber Antigene von den T-Zellen nicht erkannt werden können. Und drittens ist das ZNS durch die Blut-Hirn-Schranke abgedichtet.

Die Blut-Hirn-Schranke wird gebildet von einer durch „tight junctions“ abgedichteten Endothelzellschicht mit einer darunterliegenden Basalmembran und einem anschließenden dichten Filz von Astrozyten-Fußfortsätzen. Durch die genannten Umstände kann unter physiologischen Bedingungen eine Immunreaktion nicht innerhalb des ZNS initiiert werden. Allerdings sind außerhalb des ZNS aktivierte T-Zellen in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. In dem Fall, dass diese T-Zellen ein Antigen erkennen, das im ZNS vorkommt, kann eine lokale Schrankenstörung mit perivaskulärem Ödem und entzündlicher Infiltration auftreten. Über die Sekretion von IFN- γ und TNF- α können diese T-Zellen im ZNS die Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf Astrozyten und Mikrogliazellen induzieren und diese Zellen damit zur Antigenpräsentation befähigen. Durch die Effektormechanismen der aktivierten Immunzellen und die Sekretion toxischer Substanzen kann es schließlich zu Gewebsschädigungen und neurologischen Ausfällen kommen.

Die Hypothese einer Immunpathogenese der MS basiert im wesentlichen auf folgenden Beobachtungen (Fierz, 1997):

- 1) Tierexperimentelle Befunde
- 2) HLA-Assoziation

3) Immunhistologie der MS-Läsionen

4) Immunologische Laborparameter

ad 1) Von wesentlicher Bedeutung für das Konzept einer Immunpathogenese der MS sind verschiedene Tiermodelle, vor allem die experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), die entweder durch Immunisierung eines Versuchstieres (meist Nagern) mit homogenisiertem ZNS-Material bzw. gereinigten Komponenten davon (z.B. myelinbasischem Protein, MBP) oder aber durch Übertragung aktivierter enzephalitogener T-Zellen erzeugt wird. Bei Wahl geeigneter Tierspezies und bestimmter Versuchsbedingungen ähnelt die EAE der MS in Hinblick auf den Verlauf und die Immunhistologie der Läsionen (Lassmann, 1993; Wekerle et al., 1994).

ad 2) Da das HLA-System eine Schlüsselrolle in der Auslösung und Regulation von Immunreaktionen einnimmt, ist die Assoziation der MS zum HLA-System als Hinweis auf eine Beteiligung des Immunsystems an der Pathogenese der Erkrankung zu werten. Diese Assoziation betrifft vor allem die Gen-Loci DR und DQ der HLA-Klasse-II-Moleküle. Während 50-70% der MS-Kranken HLA-DR2-positiv sind, trifft dies nur für 20-30% der Gesamtbevölkerung zu (Wucherpfennig et al., 1991). Bei der Genanalyse mit Hilfe des Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus wurde gezeigt, dass besonders die Allele DRw15, DQw6 und Dw2 mit der MS assoziiert sind (Olerup u. Hillert, 1991; Tiwari et al., 1985). Des weiteren könnten Variationen in den Genen, die den T-Zellantigenrezeptor kodieren, so verändert sein, dass sie zu einer fehlgerichteten Immunantwort führen. Es wurden Assoziationen der MS sowohl mit Genen der T-Zellrezeptor- α -Kette auf Chromosom 14 als auch der β -Kette auf Chromosom 7 gefunden (Oksenberg et al., 1989).

ad 3) Die Analyse der MS-Läsionen ergibt, dass die zelluläre Infiltration der frischen Plaques hauptsächlich aus Makrophagen und T-Zellen besteht (Traugott et al., 1983). Die Anzahl dieser T-Zellen ist im Vergleich zu Normalpersonen erhöht (Olsson et al., 1992). Wie der immunhistologische Nachweis von Interleukin-2(IL-2)- Rezeptoren auf diesen Zellen zeigt, sind sie zumindest teilweise in aktiviertem Zustand (Zhang et al., 1994). Eine Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR) ist sowohl auf den T- und B-Zellen als auch auf Makrophagen, Endothelzellen und Astrozyten in den MS-Läsionen nachweisbar (Traugott et al., 1985). Dies deckt sich mit den oben beschriebenen Mechanismen einer durch aktivierte T-Lymphozyten initiierten Entzündungsreaktion.

ad 4) Verschiedene immunologische Laborparameter deuten auf eine Immunpathogenese der MS hin. Unter humoralen Parametern ist vor allem die regelmäßig anzutreffende intrathekale Immunglobulinproduktion zu nennen, die sich bei isoelektrischer Fokussierung der Liquorproteine als oligoklonale Banden darstellen (Tourtellotte u. Walsh, 1984). Außerdem gibt es Hinweise für eine intrathekale Aktivierung des Komplementsystems (Sanders et al., 1986). Auch über eine Beteiligung des zellulären Anteil des Immunsystems berichten zahlreiche pathologische Befunde: Bei 30-50% der Patienten ist die Zellzahl im Liquor erhöht, wobei es sich hauptsächlich um T-Zellen handelt, die zu einem beträchtlichen Teil aktiviert sind (Hafler et al., 1985). Die klonale Expansion und Persistenz von MBP-spezifischen T-Zellen im Blut konnte bisher nur bei einzelnen MS-Patienten gezeigt werden (Hohlfeld et al., 1995; Wucherpfennig et al., 1994).

Die oben erwähnten Beobachtungen führen zu folgender Hypothese: Die Immunpathogenese der MS resultiert aus einer T-Zellreaktion, bei der irrtümlicherweise ZNS-Strukturen als Antigene erkannt werden. Die im Blut und Liquor von MS-Patienten gefundene erhöhte Anzahl von autoreaktiven T-Zellen sind gegen zahlreiche ZNS-Myelinbestandteile gerichtet. Wie es zu der initialen Autosensibilisierung der T-Zellen gegen diese Myelinbestandteile kommt, ist jedoch nach wie vor unklar. Man weiß lediglich, dass auch im peripheren Blut von Gesunden autoreaktive T-Zellen nachweisbar sind. Es wird vermutet, dass diese beispielsweise im Rahmen einer Virusinfektion aktiviert werden, wenn das Virus Antigene aufweist, die den Myelinbestandteilen ähneln. Eine weitere Hypothese vertritt die Ansicht, diese autoreaktiven T-Zellen könnten auch indirekt durch sogenanntes *molecular mimicry* oder das Wegfallen hemmender Regulationsmechanismen stimuliert werden. Ähnlich anderen Autoimmunerkrankungen ist vermutlich das Zusammentreffen mehrerer Faktoren notwendig, um den gewebedestruierenden Prozeß auszulösen.

Weitgehend geklärt ist im Folgenden, wie diese aktivierten Myelin-reaktiven T-Zellen (CD4+-T-Zellen) aus dem peripheren Blut durch die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS gelangen und dort zur Autoaggression und damit zur Demyelinisierung führen: Die aktivierten T-Zellen werden mit dem Blutstrom angeschwemmt, verlangsamen ihr Tempo und docken an Adhäsionsmolekülen (u.a. zunächst an Selektin, dann an sog. intrazellulären Adhäsionsmolekülen [ICAM-1]) an, die in der Gefäßwand sitzen und

deren Gegenstück sich auf den T-Zellen befindet. Chemotaktische Signale aus dem ZNS-Parenchym ermöglichen daraufhin die Einwanderung der T-Zellen in das ZNS. Dort angekommen müssen die T-Zellen reaktiviert und zur Vermehrung, d.h. zur Bildung von Zell-Klonen angeregt werden, bevor sie die Autoimmunreaktion auslösen können. Hierzu müssen sie auf das Autoantigen treffen, das ihnen beispielsweise von einer Mikrogliazelle präsentiert wird.

Gekennzeichnet sind diese reaktivierten T-Zellen, von denen es einen TH1-Typ und einen TH2-Typ gibt, durch die Ausschüttung ganz bestimmter Zytokine.

TH1-Zellen beeinflussen hauptsächlich die zelluläre Immunität und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-2, Interferon- γ , TNF- α und Lymphotoxin (=Tumornekrosefaktor- β [TNF- β]), die alle an der zur Demyelinisierung führenden Entzündungsreaktion beteiligt sind. Mit Hilfe dieser Zytokine werden aus dem peripheren Blut eingewanderte oder bereits im ZNS vorhandene Makrophagen und Mikrogliazellen aktiviert, d.h.:

1. die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose wird gesteigert,
2. die Bildung von Entzündungsmediatoren - vor allem von TNF- α - wird veranlaßt und
3. es kommt zu einer gesteigerten Synthese und Aktivierung von Komplementfaktoren (Sanders et al., 1986)

Alle unter 1.-3. genannten Vorgänge bewirken eine direkte Schädigung der Myelinscheiden. Damit fungieren Makrophagen und Mikrogliazellen über drei verschiedene Wege als die eigentlichen Effektorzellen des entzündlichen Demyelinisierungsprozesses.

TH2-Zellen beeinflussen die humorale Immunität und produzieren vor allem die Zytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 (IL-10). Auch Antikörper, freigesetzt von B-Zellen, die zuvor vom TH2-Typ der reaktivierten T-Zellen aktiviert wurden, können das Komplementsystem aktivieren und so die Myelinscheiden direkt schädigen. Die autoreaktiven T-Zellen können aber auch zirkulierenden Autoantikörpern aus dem peripheren Blut den Durchtritt durch die Blut-Hirn-Schranke ermöglichen, woraufhin diese, im ZNS angekommen, ebenfalls das Komplementsystem aktivieren und so die Myelinscheiden direkt schädigen. Daneben haben TH2-Zellen bei MS aber auch günstige Eigenschaften: Sie produzieren, wie

oben erwähnt, die Interleukine IL-4 und IL-10, die wiederum die TH1-Zellen hemmen und damit antiinflammatorisch wirken.

1.1.6 Diagnostik

Die Multiple Sklerose (MS) beginnt häufig mit unspezifischen Symptomen wie Ermüdung oder Sensibilitätsstörungen, so dass die Diagnosestellung zunächst Schwierigkeiten bereiten kann. Erst aus dem Krankheitsverlauf kann ersichtlich werden, dass es sich um MS handelt. Zur Beschreibung des natürlichen Krankheitsverlaufs bei der MS dienen Verlaufsform, Häufigkeit, Schwere und Dauer von Schüben, die Lebenserwartung sowie der Schweregrad der Behinderung (Weinshenker et al., 1995).

Die durchschnittliche Schubrate pro Patient und Jahr ist entsprechend der Abhängigkeit von Alter und langfristigem Krankheitsverlauf in verschiedenen Untersuchungen ausgesprochen variabel. Eine Zusammenstellung aller Daten (Weinshenker et al., 1987) ergab Schwankungen von 0,14 Schüben bis 1,1 Schüben pro Jahr. Diese Unterschiede wurden weitgehend der verschiedenartigen Definition eines Schubes, der unterschiedlichen Zeit seit Krankheitsbeginn sowie der Art der Datenerhebung zugeschrieben. Daraus ergibt sich, dass die Schubrate allein kein geeignetes Maß ist, um die Krankheitsaktivität zu beschreiben oder eventuell sogar Therapieeffekte zu bewerten.

Eine standardisierte Dokumentation des neurologischen Defizits eines MS-Patienten ist anhand der von Kurtzke (1983) aufgestellten *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) möglich, die den Grad der MS bedingten Behinderung wiedergibt. Hierbei wird aus der Beeinträchtigung der einzelnen Funktionssysteme (FS) ein Wert zwischen 0 (keine Beeinträchtigung) und 10 (Tod durch MS) ermittelt. Eine EDSS \leq 4,5 beschreibt Patienten, die weitgehend uneingeschränkt mobil sind, während Patienten mit EDSS \geq 5,0 in Abhängigkeit von der Einschränkung der Gehstrecke beurteilt werden (s. auch Tabelle 1.5).

EDSS-Grad	Klinik
0,0	Normale neurologische Untersuchung (in allen funktionellen Systemen (FS))
1,0	Keine Behinderung, minimale Abnormität in einem FS
1,5	Keine Behinderung, minimale Abnormität in mehr als einem FS
2,0	Minimale Behinderung in einem FS
2,5	Minimale Behinderung in 2 FS
3,0	Mäßiggradige Behinderung in einem FS oder leichte Behinderung in 3 oder 4 FS, aber noch voll gehfähig
3,5	Voll gehfähig, aber mit mäßiger Behinderung in einem FS und 1 oder 2 FS-Grad 2 oder 2 FS-Grad 3 oder 5 FS-Grad 2
4,0	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 500 m. Aktiv während ca. 12 Stunden pro Tag trotz relativ schwerer Behinderung
4,5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für mindestens 300 m. ganztägig arbeitsfähig. Gewisse Einschränkung der Aktivität: benötigt minimale Hilfe, relativ schwere Behinderung
5,0	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 200 m. Behinderung schwer genug, um tägliche Aktivität zu beeinträchtigen
5,5	Gehfähig ohne Hilfe und Rast für etwa 100 m. Behinderung schwer genug, um normale tägliche Aktivität zu verunmöglichen
6,0	Bedarf intermittierend oder auf der einen Seite konstanter Unterstützung durch Krücke, Stock oder Schiene, um etwa 100 m ohne Rast zu gehen
6,5	Benötigt konstant beiderseits Hilfsmittel, um etwa 20m ohne Rast zu gehen
7,0	Unfähig, selbst mit Hilfe mehr als 5 m zu gehen, weitgehend an den Rollstuhl gebunden. Bewegt Rollstuhl selbst, transferiert ohne Hilfe
7,5	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu tun. An den Rollstuhl gebunden. Benötigt Hilfe für Transfer. Bewegt Rollstuhl selbst aber vermag nicht den ganzen Tag im Rollstuhl zu verbringen
8,0	Weitgehend an Bett oder Rollstuhl gebunden, pflegt sich weitgehend selbständig. Meist guter Gebrauch der Arme
8,5	Weitgehend ans Bett gebunden, auch während des Tages. Einige Funktionen der Arme und der Körperpflege erhalten
9,0	Hilfloser Patient im Bett, kann essen und kommunizieren
9,5	Gänzlich hilfloser Patient. Unfähig zu essen, zu schlucken oder zu kommunizieren
10,0	Tod infolge Multiple Sklerose

Tabelle 1.5: Expanded disability status scale (EDSS) nach Kurtzke , 1983. Ausmaß der Behinderung bei Multiple Sklerose

8 Funktionssysteme (FS): Motorik, Zerebellum, Hirnstamm, Sensibilität, Blase und Mastdarm, Visus, mentale Funktionen und Andere) werden von 0-6 bewertet. Grad 0= normal, Grad 1= abnorme Zeichen ohne Behinderung, Grad 2= leichte Behinderung, Grad 3-6= mäßige bis schwere Behinderung

Anhand evozierter Potentiale wird die Geschwindigkeit gemessen, mit der visuelle, sensible oder akustische Reize zu einer Antwort des Großhirns führen. Aus Verzögerungen können Rückschlüsse auf Entmarkungsherde in bestimmten Lokalisationen im ZNS gezogen werden. Mit dieser Methode können selbst Herde nachgewiesen werden, die klinisch bisher nicht in Erscheinung getreten sind (Swanson, 1989).

Charakteristische Liquorbefunde für eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS sind der Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese sowie der Nachweis oligoklonaler IgG-Banden (= eine Subfraktion der γ -Globuline) in der isoelektrischen Fokussierung, die im Liquor, aber nicht im Serum des Patienten auftreten. Bei klinisch gesicherter MS sind diese Befunde bei 80 bis 90% der Patienten nachweisbar. Sie sind jedoch keinesfalls pathognomonisch für MS, sondern können nur im Zusammenhang mit anderen erhobenen Befunden die Diagnose wahrscheinlicher machen.

Diagnosekriterien	Schübe	Nachweis von Läsionen		Liquor
		klinisch	paraklinisch	IgG/ oligo- klonale Banden
Klinisch sichere MS				
1.	2	2		
2.	2	1 und	1	
Laborgestützt sichere MS				
1.	2	1 oder	1	+
2.	1	2		+
3.	1	1 und	1	+
Klinisch wahrscheinliche MS				
1.	2	1		
2.	1	2		
3.	1	1 und	1	
Laborgestützt wahrscheinliche MS				
1.	2			+

Tabelle 1.6: Diagnostische Kriterien für MS nach Poser et al., 1983

Bis vor kurzem stützte sich die Diagnosestellung MS auf die diagnostischen Kriterien nach Poser et al., 1985 unter Berücksichtigung der Anamnese, der subjektiven Symptome und der objektiven klinischen Befunde (Tabelle 1.6). Die Kriterien von Poser stammen aus einer Zeit, als die Magnetresonanztomographie (MRT) erst Einzug in die Diagnostik der MS hielt und deren möglicher prädiktiver Wert für den Verlauf der Erkrankung noch nicht absehbar war.

Klin. Präsentation (Zahl der Schübe)	Klinisch objektivierbare Läsion	Weitere erforderliche Kriterien
2 oder mehr	2 oder mehr	keine; Klin. Evidenz ausreichend
2 oder mehr	1	räumliche Dissemination im MRT <i>oder</i> pos. Liquorbefund ¹ u. 2 oder mehr MS-typ. Läsionen im mRT <i>oder</i> weitere klin. Schub
1	2 oder mehr	zeitliche Dissemination i MRT ² <i>oder</i> 2. klinischer Schub
1(mono- symptomatische Prä- sentation)	1	räumliche Dissemination im MRT od. 2 u. mehr MS-typ. Läsionen im MRT m. pos. Liquorbefund und zeitliche Dissemination im MRT oder 2. klinischer Schub
0 (primär progredienter Verlauf)	1	positiver Liquorbefund und räumliche Dissemination im MRT ≥ 9 T2-Läsionen im Gehirn oder ≥ 2 Läsionen im RM oder 4-8 Gehirn-und 1 RM-Läsion oder pos. VEP ³ +4-8 MRT-Läsionen oder pos. VEP+≥ 4 MRT-u. 1 RM-Läsion und zeitliche Dissemination im MRT oder Kontinuierliche Progression für 1 Jahr

Tabelle 1.7: Neue diagnostische Kriterien der MS nach Mc Donald et al., 2001

¹Positiver Liquorbefund: Nachweis oligoklonaler Banden bzw. eines erhöhten Liquor-IgG-Index vor

²MRT-Kriterien für eine zeitliche Dissemination: KM aufnehmende Läsion ≥ 3 Monate nach klin. Schub an anderer Lokalisation als vorangegangener Schub oder neue KM aufnehmende oder T2-hyperintense Läsion i. einem 2. MRT im Abstand von ≥ 3 Monaten.

³Pathologische VEP, die typisch für MS sind (Latenzverzögerung bei gut erhaltener Konfiguration)

Mittels MRT ist die direkte Darstellung von Entmarkungsherden im ZNS möglich, mit Hilfe der Anreicherung des Kontrastmittels (KM) Gadolinium gelingt es darüber hinaus, gerade entstehende Herde von alten vernarbten Läsionen zu differenzieren und somit die Dissemination der Krankheit im Zeitverlauf nachzuweisen. Bei 90-97% der Patienten mit klinisch gesicherter MS können auf diese Weise Herde nachgewiesen werden (Wallace et al., 1992). Die Befunde des MRT können auch zu Verlaufskontrollen z.B. unter medikamentöser Therapie herangezogen werden.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung des MRT wurden die Diagnosekriterien nach Poser von einer internationalen Konsensus-Gruppe um Mc Donald et al., 2001 überarbeitet (Tabelle 1.7). Gemäß dieser neuen Kriterien läßt sich bereits dann eine MS diagnostizieren, wenn nach dem ersten Krankheitsschub mit klinisch nachweisbaren Auffälligkeiten in mindestens einem Funktionssystem in einem weiteren MRT (\geq drei Monate nach Schubereignis) mehrere entzündliche Herde in definierter Lage vorhanden sind, wovon mindestens einer Gadolinium anreichert. Praktisch bedeutet dies, dass die Diagnose MS drei Monate nach Auftreten des ersten Schubes gestellt werden kann.

1.2 Zytokine und MS

Die an einer Immunreaktion beteiligten Zellen stehen untereinander durch direkten Zell-Zellkontakt und durch die Sekretion von Zytokinen in Verbindung. Als Zytokine wird eine heterogene Gruppe von Proteinen bezeichnet, die von einer Vielzahl von Zellen produziert werden und eine wichtige Rolle in der Regulierung von Zellaktivität und -wachstum spielen. Gemeinsame Eigenschaften von Zytokinen (Balkwill u. Burke, 1989) sind ihr niedriges Molekulargewicht und ihre Interaktion mit spezifischen Oberflächenrezeptoren. Zytokine werden meist lokal und zeitlich begrenzt produziert, wobei sie bereits in sehr niedrigen (picomolaren) Konzentrationen wirksam sind, hauptsächlich auf parakriner/autokriner, weniger auf endokriner Ebene. Fast alle Zytokine besitzen vielfältige Funktionen. Die Interaktion der Zytokine untereinander ist äußerst komplex und läßt sich als ein Netzwerk verstehen: Zytokine können sich gegenseitig induzieren und üben sowohl synergistische und additive als auch antagonistische Effekte auf die Zellfunktionen aus. Zytokine steuern Umfang und Dauer entzündlicher und immunologischer

Reaktionen. Vereinfacht kann man unterscheiden zwischen proinflammatorischen Zytokinen, die eine Entzündungs- bzw. Immunreaktion fördern und antiinflammatorischen bzw. inhibitorischen Zytokinen, die einen hemmenden Einfluß auf eine Immunreaktion ausüben oder eine direkte antagonistische Wirkung gegenüber proinflammatorischen Zytokinen besitzen.

Zytokin-Rezeptoren sind für die Transduktion eines Zytokinsignals in das Zellinnere und damit für die Auslösung der biologischen Wirkung verantwortlich (Zola et al., 1996). Die Rezeptordichte ist ebenso Regulationsmechanismen unterworfen wie die Zytokinproduktion selbst. Einige Zytokine können die Expression ihres eigenen (autologen) Rezeptors induzieren. Dies geschieht aber auch durch heterologe Zytokine, so induziert z.B. IL-1 die Expression des IL-2-Rezeptors.

Neben membrangebundenen gibt es auch eine Vielzahl von löslichen Rezeptoren. Sie entstehen entweder durch Abspaltung der membranständigen Rezeptoren oder durch eigene Syntheseprozesse. Lösliche Rezeptoren können als Ergebnis einer Zellaktivierung induziert werden und so mit der Aktivität von immunvermittelten Erkrankungen korrelieren (Ibelgauffs, 1995). In der Regel blockieren lösliche Rezeptoren die Aktivität des spezifisch gebundenen Zytokins, können aber auch, wie im Fall des löslichen IL-6-Rezeptors (sIL-6R), eigene biologische Wirkungen auslösen oder agonistische Effekte vermitteln.

Proinflammatorische Zytokine	Antiinflammatorische Zytokine
TNF- α	löslicher TNF-Rezeptor
IL-1	IL-1 Rezeptorantagonist
IL-2	löslicher IL-2 Rezeptor
IL-6	löslicher IL-6 Rezeptor
TGF- β	
	IL-10

Tabelle 1.8: Wichtige pro- und antiinflammatorische Zytokine

Zytokine spielen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (MS) eine Schlüsselrolle. Besonders im Modell der EAE konnten unterschiedliche Aspekte der Immunpathogenese genauer analysiert werden. Eine wichtige Anregung für die vorliegende Arbeit stammt aus der Beobachtung, dass das Muster der Zytokin-

Expression in den zentralnervösen Entzündungsherden bei der EAE in Abhängigkeit von der Erkrankungsphase starken Veränderungen unterworfen ist (Kalman u. Lublin, 1993). Im akuten Schub der Erkrankung kommt es zu einem Anstieg der Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-2, IFN- γ und TNF- α bei gleichzeitig verminderter Produktion der antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und „*transforming growth factor*“ (TGF)- β (Navikas und Link, 1996). In der Phase der Erholung dominieren wiederum die antiinflammatorischen Zytokine wie IL-10 (Kennedy et al., 1992) und TGF- β (Khoury et al., 1992; Link, 1998). Zytokine spielen bei der EAE also eine wichtige Rolle und zwar zunächst in der Initiierung und Potenzierung der autoimmunen Reaktion und später in deren Hemmung.

Neben dieser Steuerfunktion immunologischer Reaktionen üben Zytokine auch eine direkte Effektorfunktion aus. *In-vitro*-Studien zeigten, dass TNF- α und TNF- β zytotoxisch auf Oligodendrozyten wirken (Selmaj et al., 1991a), welche für die Bildung der Markscheiden innerhalb des ZNS verantwortlich sind. Diese *in-vitro*-Befunde sowie die Ergebnisse am Modell der EAE können nicht direkt auf die MS übertragen werden, jedoch deuten sie darauf hin, dass Zytokine auch für die Pathogenese der MS von Bedeutung sein können. In den letzten Jahren sind zahlreiche Arbeiten erschienen, die sich mit der Rolle von Zytokinen im Krankheitsverlauf auseinandersetzten. Dabei kamen unterschiedliche experimentelle Methoden zum Einsatz:

- a) Analyse der Zytokin-Expression im Hirngewebe verstorbener MS-Patienten mittels immunhistologischer und molekularbiologischer Techniken (Cannella u. Raine, 1995; Selmaj et al., 1991b; Wucherpfennig et al., 1992)
- b) Analyse der *in-vitro*-Sekretion von Zytokinen durch Zellen aus dem Blut bzw. Liquor von MS-Patienten (Beck et al., 1991; Glabinski et al., 1991; Matsuda et al., 1991; Rudick u. Ransohoff, 1992)
- c) Analyse der Expression von Zytokin-mRNA in Zellen aus dem Blut bzw. Liquor von MS-Patienten (Link et al., 1994; Rieckmann et al., 1994)
- d) Analyse der Zytokinspiegel in Serum und Liquor von MS-Patienten

Zu letzterer Methode sind bisher mehrere Untersuchungen vorgelegt worden, die sich insbesondere mit proinflammatorischen Zytokinen befaßten. So berichteten Sharief et al., 1991 über eine Korrelation zwischen TNF- α -Spiegeln im Liquor von

Patienten mit chronisch-progredienter MS und einer Progression der Erkrankung. Zusätzlich soll TNF- α auch eine Rolle bei der Schrankenstörung spielen: Die Lokalisation von Orten erhöhter Permeabilität in der BHS stimmt mit lokal erhöhten Konzentrationen von TNF- α überein (Sharief et al., 1992). Andere Autoren sahen allerdings keinen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von TNF- α im Liquor bzw. Serum der MS-Patienten und dem klinischen Verlauf der immunologischen Laborparametern (Gallo et al., 1991; Hauser et al., 1990). Ebenso kontrovers wird die Bedeutung der Messung von Interleukin-2 und löslichem Interleukin-2-Rezeptor diskutiert (Freedman et al., 1992; Gallo et al., 1991; Peter et al., 1991; Trotter et al., 1990). Insgesamt konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob der Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen mit dem Auftreten einer erhöhten Krankheitsaktivität bzw. einer Krankheitsprogression assoziiert ist.

Über den Nachweis und die Rolle von antiinflammatorischen Zytokinen im Serum oder Liquor von MS-Patienten liegen bisher weniger Studien vor. Da es bei der MS bei schubförmigem Verlauf zu spontanen Remissionen kommt und der Entzündungsprozeß lokal beschränkt ist, werden neben proinflammatorischen auch entzündungshemmende Mechanismen wirksam sein, z.B. antiinflammatorische Zytokine (Merrill, 1992). So ist z.B. IL-10 ein stark wirksames antiinflammatorisches Zytokin, das in *in-vitro*-Studien ein wirksamer Suppressor der EAE bei Ratten ist; der Effekt wird über eine Unterdrückung der von TNF- α induzierten Expression von MHC-Klasse-II-Proteinen erzielt (Rott et al., 1994).

1.3 Therapie der Multiplen Sklerose

1.3.1 Bisherige Therapieansätze der Multiplen Sklerose

Bei der Therapie der Multiplen Sklerose (MS) sind die Akutbehandlung durch Kortikosteroide und eine langfristige Behandlung zur Prophylaxe von erneuten Schüben und Fortschreiten der Behinderung zu unterscheiden.

Kortikosteroide bewirken eine breite und unspezifische Hemmung von Entzündungsmechanismen, die Hemmung der perifokalen Hirnödembildung sowie das Abdichten der Blut-Hirn-Schranke. Kortikosteroide eignen sich für die Therapie

des akuten Schubs, ein sicherer Effekt auf die Langzeitprognose ist allerdings nicht nachgewiesen (Barnes et al., 1997).

Bis Anfang der 90er Jahre beschränkte sich die langfristige Behandlung der MS auf unspezifisch wirkenden Immunsuppressiva [Azathioprin und Cyclosporin A (Steinbrecher et al., 1995)] und Zytostatika (Mitoxantron, Methotrexat und Cyclophosphamid). Diese Therapien zeichnen sich durch eine unspezifische Hemmung der humoralen und zellulären Immunreaktivität (Cyclophosphamid) aus. Cyclosporin A greift zwar präziser in die Zytokinfreisetzung von T-Zellen ein, wirkt hierdurch aber ebenfalls unspezifisch immunsupprimierend. Insgesamt ist ihr Platz in der Langzeitbehandlung der MS aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils (vor allem Nephro- und Kardiotoxizität und Blutdrucksteigerung) und des mangelnden Wirksamkeitsnachweises umstritten.

Die neueren Erkenntnisse in der Immunpathologie der MS haben zur Entwicklung sogenannter immunmodulierender Medikamente geführt, die spezifischer in die gestörte Immunreaktion eingreifen sollen.

Glatirameracetat (Copaxone®) führt durch Bindung an HLA-Klasse-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen zu einer Verschiebung im Bereich der T-Helferzellen weg von einer zytotoxischen TH1-Antwort hin zu einer eher protektiven TH2-Antwort (Duda et al., 2000). Aktivierte TH2-Zellen passieren die BHS und kreuzreagieren mit dem MBP, werden aktiviert und bilden antiinflammatorische Zytokine (Haupts et al., 2001). Es unterdrückt die mit Myelinzerstörung verbundene Immunantwort unabhängig vom primären antigenen Triggermechanismus und wirkt weitgehend MS-spezifisch.

Intravenöse Immunglobuline (IVIg) repräsentieren den humoralen Schenkel des Immunsystems und haben eine Vielzahl von Wirkungen auch durch Einfluß auf den zellulären Schenkel (Verminderung von T-Zell-Proliferation und Aktivierung) sowie durch Interaktionen mit Zytokinen (Anti-IL-1 und TNF- α -Effekte). Die Wirksamkeit von IVIg bei Patienten mit schubförmig-remittierender MS konnte in mehreren Studien, jedoch mit noch kleinen Fallzahlen gezeigt werden (Pöhlau et al., 1996; Achiron et al., 1998).

Im Rahmen der immunmodulatorischen Therapie der MS nehmen die Interferone eine besonders wichtige Rolle ein.

1.3.2 Interferone

Interferone (IFN), die ihren Namen der Interferenz mit Virusinfektionen in Zellkulturen verdanken, wurden erstmals 1957 von Isaacs und Lindemann beschrieben (Isaacs u. Lindemann, 1957). Sie sind eine Familie natürlich vorkommender Proteine mit einem Molekulargewicht von 15 bis 21 kDa.

Es gibt über 20 verschiedene Interferone, die in zwei Klassen unterteilt werden. IFN- α , IFN- β und IFN- γ gehören zu den Klasse-I-IFN, während IFN- γ ein Klasse-II-IFN ist. Während es 18 IFN- α -Gene gibt, existiert nur ein IFN- β -Gen. Das IFN- β -Gen befindet sich auf dem Chromosom 9 nahe dem IFN- α -Cluster, natürliches IFN- β hat 166 Aminosäuren und ist glykosiliert. Klasse-I-IFN besitzen große Strukturähnlichkeiten und vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an den gleichen Rezeptor. IFN- α wird hauptsächlich von Leukozyten, IFN- β von Fibroblasten und IFN- γ von Lymphozyten gebildet (Jakobs et al., 1994).

Sie zeigen die folgenden vier Wirkqualitäten:

- **Immunmodulierende** Aktivitäten sind sehr vielfältig. Sie betreffen vornehmlich die Aktivierung der T-Zellen in all ihren Subfamilien und die der natürlichen Killerzellen (NK), die Aktivierung der Makrophagen und der B-Zellen mit der Antikörperproduktion, die Induktion von HLA-Antigenen und β 2-Mikroglobulin, die Induktion von Tumornekrosefaktoren TNF- α und TNF- β , die Expression des Fc-Anteils des IgG, des tumoriziden und antiinflammatorischen Systems IDO und Neopterin.
- **Antiviral** sind Interferone, insbesondere das IFN- β , wirksam gegen alle bislang geprüften humanpathogenen Viren *in vitro* (es fehlt demnach eine Virusspezifität), gegen alle akuten Viruserkrankungen *in vivo* und gegen chronische Viruserkrankungen, wenn das Virusgenom noch nicht im Zellgenom integriert ist. Zahlreiche molekulare Mechanismen tragen in ihrer Summe zum antiviralen Geschehen bei. Eine mit Viren infizierte Zelle bildet Interferone, die dann an anderen noch nicht infizierten Zellen Wirkungen entfalten, die einer Virusvermehrung entgegenwirken. So wird die Anheftung von Viren an der Zellmembran erschwert, es werden Gene aktiviert, welche die Replikation der DNA hemmen, mRNA abbauen und damit die Proteinsynthese in virusbefallenen

Zellen unterbinden. Daneben aktivieren Interferone natürliche Killerzellen, die selektiv virusbefallene Zellen abtöten.

- **Antiproliferativ** wirken Interferone auf alle sich teilenden Zellen. Besonders auffällig tritt diese teilungshemmende Eigenschaft bei sich schnell teilenden Geweben in Erscheinung, gleichgültig, ob gut- oder bösartig. Der entscheidende Mechanismus scheint hier die Fähigkeit von Interferonen zu sein, den Zellteilungszyklus in einer bestimmten Phase, dem Übergang von der G1- zur G2-Phase, anzuhalten.
- **Zelldifferenzierend** bewirken Interferone, dass neoplastische Zellen unter ihrem Einfluß von entarteten, entdifferenzierten Zellen wieder zu normalen Zellen differenzieren, der maligne Phänotyp wird reversibel. Hierbei sind der Einfluß auf endokrine Wachstumsfaktoren, die Hemmung oder Induktion von Onkogenen und die Modulation der Expression tumorassoziierter Antigene von Bedeutung.

Zu den menschlichen Interferonen zählen nahezu 30 verschiedene Proteine und Glykoproteine, die ihre Wirkung weitgehend artspezifisch entfalten, wobei dem γ -Interferon die ausgeprägteste, den α -Interferonen die geringste Artspezifität zukommt. Menschliche Interferone wirken also nur beim Menschen und eingeschränkt beim Menschenaffen (Schellekens et al., 1981).

Gängige Bezeichnung	α -Interferon	β -Interferon	γ -Interferon
Ältere Bezeichnung	Typ I Interferon	Typ I Interferon	Typ II Interferon
Subtypen	ca. 25	1	1
Induktion	Viren	Doppelstrang-RNS	Mitogene
Aminosäuren	150-175	166	146
Homologie zu IFN- α	80-100%	30%	zufällige
Strukturgen	Chromosom 9	Chromosom 9	Chromosom 12
Rezeptorgen	Chromosom 21	Chromosom 21+?	Chromosom 6

Tabelle 1.9: Vergleich von α -, β - und γ -Interferon

Tierversuche lassen daher nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Wirksamkeit menschlicher Interferone beim Menschen zu, so dass die wichtigsten pharmakologischen Informationen über Interferon- β aus Studien an Humanzellen in Kulturen sowie beim Menschen selbst stammen.

1.3.3 Interferone in der Therapie der Multiplen Sklerose

Der therapeutische Einsatz von Interferonen bei der Multiplen Sklerose (MS) basierte auf der Hypothese, dass eine akute oder eine vorausgegangene persistierende Virusinfektion für die Manifestation des MS verantwortlich sein könnte (Jakobs et al., 1994). Da die antivirale Wirkung der Interferone bereits bekannt war, wurden in den siebziger Jahren zwei Studien mit natürlichem IFN- α (nIFN- α) und nIFN- β durchgeführt (Ververken et al., 1979; Fog et al., 1980). Insgesamt wurden neun MS-Patienten mit chronisch-progredientem Krankheitsverlauf über einen Zeitraum von 15 Monaten mit nIFN- α und nIFN- β behandelt, das intramuskulär verabreicht wurde. In beiden Studien konnte kein Einfluß der IFN auf den Krankheitsverlauf nachgewiesen werden. Der fehlende therapeutische Effekt wurde darauf zurückgeführt, dass Interferone die Blut-Hirn-Schranke nicht in ausreichender Menge passieren können (Ververken et al., 1979).

In den nachfolgenden Studien wurde nIFN- β intrathekal verabreicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Schubrate bei MS-Patienten mit schubförmig-remittierender MS reduziert wurde (Jakobs et al., 1986). Das nIFN wurden von den Patienten gut vertragen, jedoch stellten die wiederholten Lumbalpunktionen ein erhöhtes Infektionsrisiko dar. Zusätzlich war die Gewinnung des nIFN bei nur relativ geringer Ausbeute sehr aufwendig und kostenintensiv (Jakobs et al., 1994).

Erst mit der Möglichkeit zur gentechnologischen Herstellung der körpereigenen Substanz in größerem Umfang, also der Entwicklung von rekombinantem IFN (rIFN) in den achtziger Jahren kehrte man unter der Vorstellung der gestörten Blut-Hirn-Schranke bei MS-Patienten zur systemischen Verabreichung der IFN zurück (Knobler et al., 1984). Die intravenöse Therapie mit rIFN- γ führte zu einer Zunahme der Schubrate bei MS-Patienten mit schubförmig-remittierender MS (Panitch et al., 1987). Auch für rIFN- α 2 konnte kein positiver Einfluß auf den Krankheitsverlauf gezeigt werden (Camenga et al., 1986). In einer späteren Studie wurde rIFN- α 2a hochdosiert systemisch verabreicht und führte zu einer Abnahme der Schubrate (Durelli et al., 1994).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei β -Interferone zur Behandlung der schubförmig-remittierend verlaufenden MS zugelassen: Interferon- β 1a (Avonex™), Interferon- β 1a (Rebif®) und Interferon- β 1b (Betaferon®).

	Interferon-b 1b	Interferon-b 1a
Handelsname	Betaferon®	Avonex™ Rebif®
Glykosilierung	nicht glykosiliert	glykosiliert
Herstellungsart	E.coli-Zelle	CHO-Zelle (chinesische Hamster-Ovarzelle)
Größe	165 Aminosäuren	166 Aminosäuren
Anmerkung	Methionin Pos1 fehlt, Austausch 17	humanidentisch

Tabelle 1.10: Unterschiede zwischen den zur Behandlung der schubförmig-remittierend verlaufenden MS zugelassenen β -Interferonen (aus Schmidt u. Hofmann, 2002)

1.3.4 Interferon-b 1a

Das glykosilierte Interferon- β 1a wird in Säugetierzellen (Ovarzellen chinesischer Hamster) hergestellt und entspricht hinsichtlich Struktur, Aminosäuresequenz und Glykosilierung praktisch dem natürlich vorkommenden IFN- β aus Fibroblasten. Zugelassen für die Therapie der schubförmig verlaufenden Multiplen Sklerose (MS) sind Interferon- β 1a (Avonex™, Biogen) und Interferon- β 1a (Rebif®, Serono).

In der Zulassungsstudie um Jakobs 1996 für Interferon- β 1a (Avonex™) der Firma Biogen, USA wurden 301 Patienten mit schubförmiger MS über zwei Jahre mit einer Standard-Dosis von 6 MIU (30 μ g) IFN- β 1a einmal pro Woche, intramuskulär verabreicht, behandelt. Primärer Zielparameter dieser Studie war die Krankheitsprogression, gemessen an Veränderungen auf der EDSS-Skala. Sekundäre Zielkriterien waren Schubfrequenz und im MRT Zahl und Volumen Gadolinium-anreicherender und T2-gewichteter Läsionen. Nach Ende des Beobachtungszeitraums zeigte sich sowohl eine signifikante Verzögerung der Krankheitsprogredienz bei mit IFN- β 1a behandelten MS-Patienten als auch eine signifikante Reduktion der Schubrate.

In der sog. PRIMS (*prevention of relapses and disability bei IFN- β 1a subcutaneously in multiple sclerosis*) -Studie, 1998 mit Interferon- β 1a (Rebif®) der Firma Serono, Schweiz erhielten 560 MS-Patienten zunächst über zwei Jahre entweder 6 MIU (22 μ g) oder 12 MIU (44 μ g) subcutan dreimal pro Woche. Hinsichtlich des primären Zielparameters der Studie, der Reduktion der Schubrate, kam es zu einer signifikanten Schubreduktion sowohl nach zwei Jahren als auch nach Verlängerung der Studie nach vier Jahren. Auch die Reduktion der Anzahl aktiver Läsionen im MRT war signifikant.

1.3.5 Interferon β -1 β (Betaferon®)

Seit 1988 wurden in den USA und in Kanada im Rahmen einer doppelblind-plazebokontrollierten multizentrischen Studie (IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993) 372 Patienten mit schubförmig verlaufender Multiple Sklerose (MS) und leichter bis moderater Behinderung mit Interferon beta-1 β ([IFN- β 1 β] Betaferon®, Schering, Deutschland) behandelt. Die Patienten erhielten entweder 8 Millionen internationale Einheiten (8 MIU) IFN- β , 1,6 MIU IFN- β oder Placebo. Die Medikation wurde jeden zweiten Tag subkutan verabreicht, wobei sich die Patienten die Substanz selbst injizierten. Als primäre Endpunkte der Studie wurden die Schubrate pro Jahr sowie der Anteil schubfreier Patienten definiert. Weitere Endpunkte waren der Zeitraum bis zum Auftreten des ersten Schubs unter Therapie, die Schwere der Schübe, Veränderungen in der EDSS und das Auftreten und die Entwicklung von Läsionen im MRT.

Nach zwei Jahren Behandlungsdauer ergab sich eine signifikante Schubreduktion unter der hochdosierten IFN- β -Behandlung gegenüber Placebo (31 % der Patienten mit 8 MIU IFN- β ohne Schub gegenüber 16% in der Placebo-Gruppe), wobei dieser Effekt schon nach einem Jahr signifikant wurde. Schwere und mittelschwere Schübe wurden unter IFN- β sogar um 50% reduziert (Lublin et al., 1995). Darüber hinaus waren bei den mit IFN- β behandelten Patienten signifikant weniger Krankenhauseinweisungen und weniger Krankenhaustage zu verzeichnen. Auch die Begleitmedikation mit Kortikoiden war signifikant seltener notwendig. Diese klinischen Resultate deckten sich mit den MRT-Befunden: 327 Patienten wurden einmal pro Jahr mittels MRT untersucht, 52 Patienten alle sechs Wochen

(=Substudie). Die MRT-Untersuchungen zeigten eine signifikant stärkere Zunahme der „total disease burden“ (= mm² der Fläche der Entzündungsherde) in der Placebogruppe gegenüber der Hochdosis-Gruppe und in der Substudie einen drastischen Abfall der Aktivität um 80%, des Auftretens von aktiven Läsionen um 83% und der Zahl neuer Läsionen um 75% (IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993 a und 1993b).

Die Studie wurde fünf Jahre weitergeführt, und es zeigte sich ein beständiger Nutzen bezüglich der Schubrate. Der Unterschied zwischen der Verum- und der Placebogruppe war in den ersten beiden Jahren hochsignifikant, dann nicht mehr. Die fehlende Signifikanz im Verlauf könnte auf die generelle Abnahme der Schubrate über die Zeit auch in der Placebogruppe zurückzuführen sein, die zu einer Verminderung der statistischen Power führte. Von der ursprünglichen Studienpopulation hatten 217 Patienten nach vier Jahren eine weitere MRT-Untersuchung. In der Hochdosis-Gruppe fand sich über die gesamte Zeit keine signifikante Progression der MRT-Läsionen, während sich die Placebogruppe diesbezüglich signifikant verschlechterte. Eine bestätigte Progression der Behinderung trat bei den mit IFN-β1b behandelten Patienten deutlich seltener auf als in der Placebogruppe, die statistische Signifikanz für diesen Parameter wurde allerdings verfehlt (IFNB-Multiple Sclerosis Study Group 1995).

Seit Ende 1995 ist IFN-β zur Behandlung der schubförmig-remittierenden MS in Deutschland zugelassen.

1.3.5 Wirkweise von Interferon-b 1b

Obwohl die obengenannte Therapiestudie einen Vorteil für Patienten mit schubförmig-remittierender Multiple Sklerose (MS) unter der Behandlung mit IFN-β demonstriert hat, fehlt nach wie vor eine allgemein akzeptierte Erklärung für die beobachteten Effekte. Es ist jedoch bekannt, dass die auf die biologischen Reaktionen modifizierend wirkenden Eigenschaften des IFN-β durch seine Interaktion mit spezifischen Zellrezeptoren entstehen, die sich an der Oberfläche der menschlichen Zellen befinden. Durch die Anbindung von IFN-β an diese Rezeptoren kommt es zur Expression verschiedener Interferon-induzierter Genprodukte (z.B. 2',5'-Oligoadenylatsynthetase, Proteinkinase und Indoleamin 2,3-Dioxygenase), die

als Mediatoren der biologischen Wirkung von IFN- β gelten (Farrar u. Schreiber, 1993, Johnson et al., 1994; Weinstock-Guttman et al., 1995). Wie dies nun zu einer klinischen Wirkung bei MS führt, ist noch unbekannt, jedoch zeigen immunologische Untersuchungen folgende Ergebnisse:

Der Effekt von IFN- β auf IFN- γ ist komplex. Kurz nach Behandlungsbeginn kommt es zunächst zu einem Anstieg der IFN- γ -sezernierenden Zellen; erst nach zwei- bis dreimonatiger Behandlung fallen sie wieder ab und bleiben dann unter dem Ausgangswert. Diese Wirkung auf IFN- γ könnte die anfänglichen Nebenwirkungen der Therapie in Form von grippeähnlichen Symptomen erklären.

IFN- β 1b reduziert sowohl die Expression von HLA-Klasse-II-Genprodukten auf Makrophagen als auch die Bildung von Entzündungsmediatoren durch Makrophagen (Arnason und Reder, 1994; Goodkin 1994; Weinstock-Guttman et al., 1995), die durch Produktion freier Sauerstoffradikale und NO an der Demyelinisierung bei MS beteiligt sind.

Immunaktivierende Effekte	Erhöhung MHC-Klasse-I-Expression (Miller et al., 1996)
	Erhöhung der IgG-Produktion
	Aktivitätszunahme zytotoxischer T-Zellen
	Induktion löslicher Adhäsionsmoleküle (s-ICAM)
Immunmodulierende Effekte	Verminderung der IFN- γ -Produktion
	Verminderung der IFN- γ -induzierten MHC-Klasse-II-Expression
	Erhöhung von IL-10- und TGF- β -Produktion
	Verstärkung der T-Suppressorzellen-Funktion
	Reduktion der Transmigration von Immunzellen

Tabelle 1.11: Hypothetische Effekte von Interferon - β (Mäurer et al., 2001)

Zusätzlich hemmt IFN- β 1b die T-Zellproliferation, wodurch die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α reduziert wird. Des Weiteren stellt es zu einem gewissen Grad die sogenannte Suppressorfunktion der CD8-T-Zellen wieder her, hauptsächlich durch ein Verschieben des Gleichgewichts in Richtung TH2-Reaktionsmuster. Dies könnte die Reduktion der Schubrate erklären. Über eine Reduktion der Expression von Adhäsionsmolekülen vermag IFN- β 1b die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zu verringern und somit den Einstrom

aktivierter T-Lymphozyten (Soilu-Hänninen et al., 1995; Leppert et al., 1996). Der Vorzug des IFN- β 1b besteht demnach darin, dass es an verschiedensten physiologischen Angriffspunkten ansetzt, so dass im komplexen Immunnetzwerk schwerer gegenregulatorische Mechanismen aktiviert werden können.

Das in dieser Studie eingesetzte Interferon β -1b wurde hergestellt von der Firma Schering, Berlin und ist als Betaferon® auf dem Markt.

Betaferon® ist ein gereinigtes lyophilisiertes Eiweißprodukt, das mit Hilfe rekombinanter DNS-Technologie hergestellt und zur Verabreichung mittels Injektion zubereitet wird. Betaferon® (IFN- β 1b) wird durch die bakterielle Fermentation eines Stammes von *Escherichia coli* erzeugt, der ein gentechnisch angefertigtes Plasmid mit dem Gen für das modifizierte menschliche Interferon *betaser17* trägt. Die strukturellen Unterschiede zwischen IFN- β 1b und natürlichem Human-Interferon- β bestehen sowohl in der Substitution des Cysteins durch Serin in Position 17 der Aminosäurenkette als auch im Fehlen des Methionins in Position 1 und der Kohlenhydrat-Nebenkette. IFN- β 1b ist ein hochgereinigtes Eiweiß mit 165 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 18,5 KDa.

Eine Injektionsflasche Betaferon® enthält 0,3mg (9,6 MIU) IFN- β 1b. Die empfohlene Dosis beträgt 0,25mg (8,0 MIU), enthalten in 1 ml der rekonstituierten Lösung, die jeden zweiten Tag subkutan injiziert wird.

1.3.6 Nebenwirkungen von Interferon- β 1b

Nach Verabreichung von IFN- β 1b kann es an den Einstichstellen zu Reaktionen (85%) und Nekrosen (5%) kommen. Der pathogenetische Mechanismus ist unklar; diskutiert werden Mikrothromben und Vaskulitis. In der Regel nimmt die Häufigkeit von Reaktionen an den Injektionsstellen mit der Zeit ab. Häufig treten im Zusammenhang mit der IFN- β 1b-Behandlung grippeartige Symptome (Fieber, Schüttelfrost, Muskelschmerz, Unwohlsein, Schwitzen) auf. Auch die Häufigkeit dieser Symptome nimmt mit der Zeit ab.

Systemische NW	Müdigkeit, Fieber, Grippe- oder allg. Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen, Myalgien, Arthralgien, Verdauungsbeschwerden u. Gewichtsverlust, Übelkeit und Erbrechen, Schwitzen, Haarausfall
Lokale NW	Rötung, Entzündung und Nekrosen der Injektionsstelle, Schmerzen
Hämatologische NW	Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Anämie
Zentralnervöse NW	Konzentrationsschwierigkeiten, Verwirrung, vermehrte Spastik, Angstzustände, emotionale Labilität, Depression, Suizidalität,
Sonstige NW	Erhöhung der Transaminasen, Sinusitis, Dysmenorrhoe, Menstruationsstörungen

Tabelle 1.12: Häufige Nebenwirkungen der Interferon- β 1b- Therapie (Modifiziert nach [Obert et al., 2000])

Starke Überempfindlichkeitsreaktionen (seltene, aber starke akute Reaktionen wie Bronchospasmus, Anaphylaxie und Urtikaria) können auftreten. Bei Frauen vor der Menopause kann es zu Menstruationsstörungen kommen. Nebenwirkungen, die das zentrale Nervensystem betreffen, z.B. Depressionen, Angstzustände, emotionale Labilität, Suizidneigung und Verwirrung werden beobachtet. Auch Laborveränderungen im Sinne einer Leukopenie bzw. Erhöhung des GPT-Wertes können beobachtet werden. Niedrige Serumkalzium,- erhöhte Harnsäure- und erhöhte GOT-Werte scheinen im Zusammenhang mit der IFN- β 1b-Therapie zu stehen (Walther et al., 1996).

1.3.7 Kontraindikationen von Interferon- β 1b

IFN- β 1b ist in folgenden Fällen kontraindiziert:

- Schwangerschaft
- schwere depressive Störungen und / oder Suizidneigung in der Anamnese
- Hypersensibilität gegenüber natürlichem oder rekombinantem Interferon- β 1b, Humanalbumin oder einem anderen Bestandteil dieser Zubereitungsform
- Leberinsuffizienz
- durch Behandlung nicht adäquat kontrollierte Epilepsie
- starke Überempfindlichkeitsreaktionen

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Immunpathologie der MS haben zur Entwicklung und zum Einsatz von Interferon β -1b (IFN- β 1b) in der Therapie der MS geführt.

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass IFN- β 1b die Schubfrequenz der MS signifikant reduziert und auch zu einer Abnahme der im MRT-nachweisbaren Läsionen führt. In welcher Weise aber genau die zur Zeit bekannten immunologischen Regulationsvorgänge durch die Gabe von IFN- β 1b moduliert werden, ist nicht bekannt. Die Mehrzahl der ablaufenden Regulationsvorgänge wurde bislang *in vitro* beobachtet. Auch der Effekt von IFN- β 1b auf die am Krankheitsverlauf der MS beteiligten Zytokine wurde bisher zum größten Teil nur *in vitro* nachgewiesen. Es ist deshalb interessant zu untersuchen, ob sich die *in vitro* gewonnenen Daten auf die komplexere Situation *in vivo* übertragen lassen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie wurde die Konzentration von den folgenden 10 pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bzw. Entzündungsmarkern in einer homogenen Gruppe von 23 MS-Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf im Serum unter der Therapie mit IFN- β 1b über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten bestimmt.

Zytokine	
Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	Solubler Tumornekrosefaktor-Rezeptor II (sTNF-R II)
Interleukin-6 (IL-6)	Solubler Interleukin-6 Rezeptor (sIL-6R)
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA)
Interleukin-10 (IL-10)	Solubler Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R)
Neopterin	β 2-Mikroglobulin (β 2-M)

Tabelle 1.13: Gemessene pro- und antiinflammatorische Zytokine und Entzündungsmarker

Eine *in vivo* Messung von diesen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Entzündungsparametern unter der Therapie von IFN- β 1b sollte einerseits die

vorliegenden *in vitro* Daten bestätigen und könnte darüber hinaus Hinweise auf das Wirkprinzip der Therapie geben.

Der Großteil der bisher durchgeführten Studien zum Nachweis von Zytokinen bei MS- Patienten ohne und mit IFN- β 1b beschäftigte sich nur mit der Messung der Zytokine zu einem einzigen Zeitpunkt. Aus dem Grund war eine Aussage über den longitudinalen Verlauf der Zytokinspiegel bisher nur unzureichend möglich. Eine Longitudinaluntersuchung könnte aber weitere Hinweise auf den Wirkmechanismus von IFN- β 1b geben.

Zusätzlich zu der Konzentrationsbestimmung wurde der klinische Verlauf der Erkrankung und die auftretenden Nebenwirkungen der Therapie überwacht, um eine mögliche Korrelation von klinischen Parametern und den einzelnen Laborparametern zu erfassen. Desweiteren sollten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der bisherigen Literatur verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Studie wurden seit Januar 1996 insgesamt 24 aufeinanderfolgende Patienten auf Interferon- β 1b (IFN- β 1b) eingestellt.

Die Patienten wurden am Tag vor der ersten IFN- β 1b-Injektion stationär einbestellt, und es wurde ihnen Routinelaborparameter abgenommen. Am darauffolgenden Tag begann die Therapie mit einer ersten Injektion am Morgen. Begleitend fanden ab diesem Tag über drei Monate insgesamt je sechs Blutabnahmen statt. Zu jedem dieser sechs Zeitpunkte wurde eine Anamnese erhoben und eine neurologische Untersuchung durchgeführt.

2.2 Patienten

Die 24 Patienten erfüllten die von Poser *et al.* formulierten diagnostischen Kriterien einer sicheren MS (Statistik s. Abschnitt Ergebnisse Tabelle 3.1).

Einer der Patienten mußte jedoch schon nach drei Wochen aus der Studie ausgeschlossen werden, da er die Kriterien der geforderten schubförmig-remittierenden Form der MS nicht mehr erfüllte.

Bei Studienbeginn wurde keiner der Patienten immunsuppressiv behandelt, eine Schwangerschaft oder andere Erkrankungen neben der MS lagen nicht vor. Die Patienten wurden ausführlich über die Studie aufgeklärt und gaben zur Teilnahme ihr Einverständnis.

2.3 Abnahmezeiten der Proben

Die Blutprobenabnahme geschahen zu folgenden Zeitpunkten:

1. die erste Abnahme am ersten Tag vor Beginn der IFN- β 1b -Injektion als Leerwert,
2. die zweite Probenentnahme 8-10 Stunden nach der ersten Injektion, um eine mögliche kurzfristige Reaktion auf das injizierte IFN- β 1b zu erfassen,
3. die dritte Probenentnahme 24 Stunden nach der ersten Injektion,
4. die vierte Probenentnahme am fünften Tag 10 Stunden nach der dritten Injektion und im weiteren Verlauf
5. nach vier Wochen und
6. nach drei Monaten.

Diese fünfte und sechste Probenentnahme dienten dazu, langfristige Wirkungen zu erfassen. Der Abnahmezeitpunkt lag bei diesen kurz vor einer Injektion, um die Langzeitwirkung des IFN- β 1b unbeeinflusst von akuten Frühreaktionen betrachten zu können.

Zusätzlich wurde bei einem kleinen Teil des Patientenkollektivs nach sechs Monaten nochmals eine Blutprobe entnommen, diesmal wieder nach einer IFN- β 1b -Injektion, um zu überprüfen, ob nach diesem längeren Zeitraum kurzfristige Reaktionen auf IFN- β 1b noch vorhanden sind.

2.4 Aufarbeitung und Aufbewahrung der Proben

Die entnommenen Blutproben wurden sofort nach der Abnahme bei 3000 Umdrehungen pro Minute 15 Minuten lang in einer Mikroliter-Zentrifuge bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das überstehende Serum wurde anschließend in 8-10 Eppendorf-Küvetten zu je mindestens 1000 μ l aliquotiert und unverzüglich bei -80°C tiefgefroren. Insgesamt wurden während des Beobachtungszeitraums 784 Plasmaproben gesammelt und bearbeitet.

2.5 Durchführung der Messungen

Nachdem von jedem Patienten jeweils sechs Serumproben gesammelt waren, wurde die Konzentration des jeweiligen Zytokins im Serum mittels käuflicher Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assays (ELISA) bestimmt. Im Prinzip handelt es sich bei dem ELISA um eine Antigen-Antikörper-Reaktion (s. Abbildung 2.1). Da Zytokine vornehmlich autokrin (das Zytokin wirkt auf die sezernierende Zelle) oder parakrin (die Zielzelle ist in der unmittelbaren Umgebung der sezernierenden Zelle) wirken, an lösliche Rezeptoren gebunden vorliegen und meist eine recht kurze Halbwertszeit haben, stellt die Messung der Zytokine und ihrer Rezeptoren ein Problem dar. Mit der sogenannten Sandwich-ELISA-Methode können Interleukine (IL) sowie lösliche Interleukinrezeptoren (sIL-R) mit hoher Spezifität und Sensitivität quantitativ nachgewiesen werden.

Jede der verwendeten ELISA-Mikrotiter-Platten enthielt 96 Vertiefungen („wells“), so dass pro Mikrotiter-Platte neben der Standardreihe je sechs Plasmaproben von sechs Patienten getestet werden konnten. Vor Testbeginn wurden sämtliche Plasmaproben langsam auf Raumtemperatur gebracht, anschließend mittels eines Vortexers leicht durchmischt und drei Minuten in einer Universal-Tischzentrifuge von Hettich zentrifugiert. Auch die Testkomponenten wurden auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt.

Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe für den Standard mit sechs Verdünnungsschritten angesetzt. Um die notwendige Verdünnung und die richtige Standardkurve herauszubekommen, wurde vor jeder Testung eine Probemessung nach Herstellerangaben durchgeführt. Die benutzten Nährmedien wurden mitgetestet, um deren Zytokin- oder löslichen Rezeptorgehalt auszuschließen. In der Regel wurde ein Verdünnungsfaktor von 2 empfohlen. Für sämtliche Verdünnungen wurde der in den Testkits enthaltene Verdünnungspuffer verwendet. Nach Gabe einer einheitlichen Menge von Probenpuffer in jede Vertiefung der Testplatte mit einer Pipette wurden Standards und (ggf. verdünnte) Proben mittels Einweg-Pipettenspitzen in je zwei Vertiefungen pipettiert. Die mit einer Klebefolie verschlossene Platte wurde in der Regel zwei Stunden inkubiert. In dieser Zeit reagierte das zu untersuchende Zytokin mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper (AK), mit dem die Wände der Vertiefungen beschichtet waren.

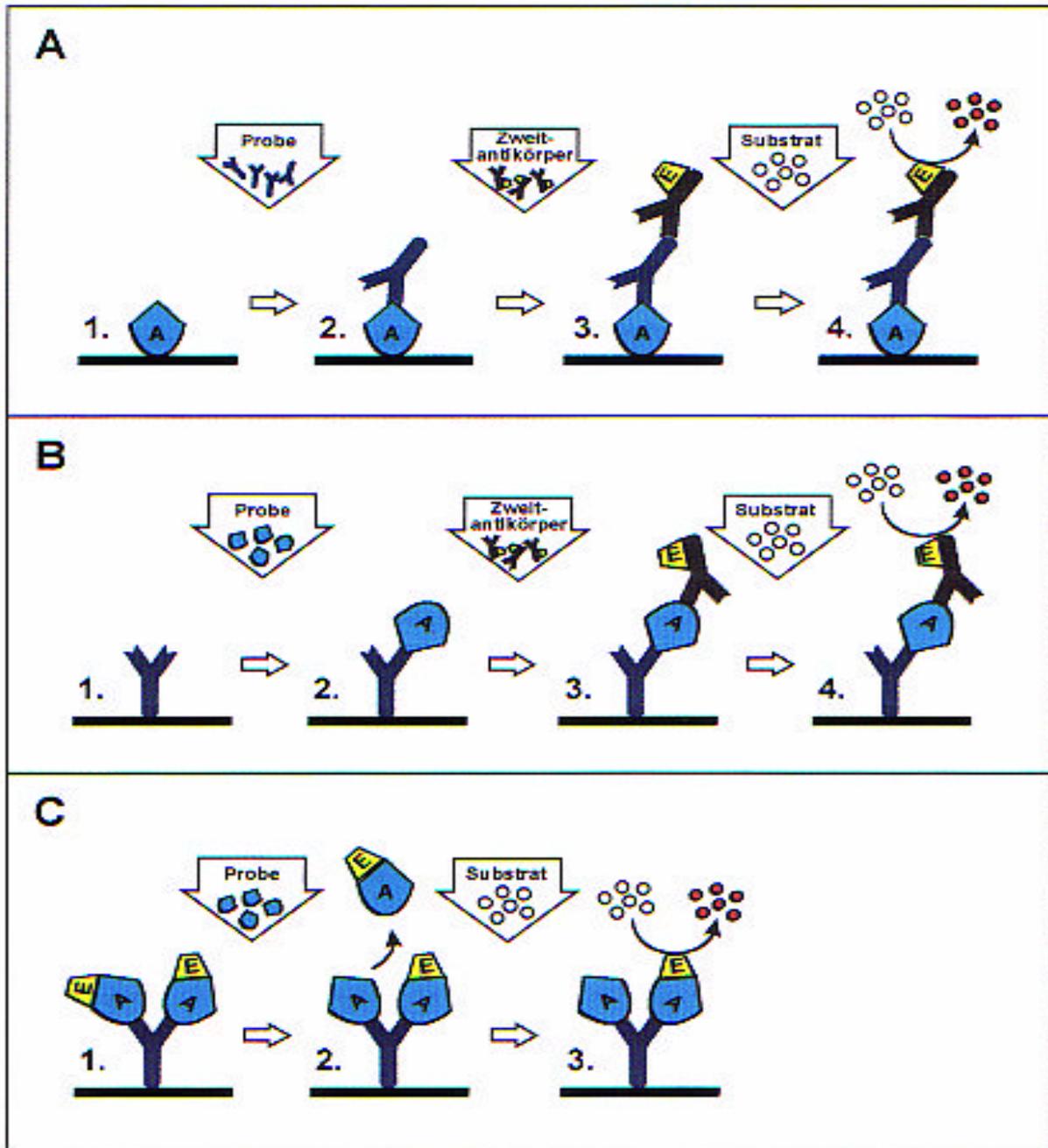


Abbildung 2.1: Funktion der ELISA:

A: An eine Oberfläche gebundenes Antigen (1.) wird von dem in der Probe befindlichen Antikörper erkannt (2.). Mit Enzym (E) markierter Zweit-Antikörper bindet an den Komplex (3.), und die Reaktion wird durch Farbumschlag des hinzugegebenen Substrats sichtbar gemacht und quantifiziert (4.).

B: Sandwich-ELISA: Ein gebundener spezifischer Antikörper (1.) bindet das in der Probe befindliche Antigen (A; 2.). Der markierte Zweit-Antikörper erkennt ein weiteres Epitop des Antigens (3.).

C.: Kompetitiver ELISA: Mit Enzym markiertes Antigen wird an einem Antikörper gebunden (1.). Nicht markiertes Antigen aus der Probe verdrängt das markierte Antigen (2.) und über die noch vorhandene Enzymaktivität (3.) kann die Konzentration des Antigens in der Probe berechnet werden. Alternativ kann die Probe auch mit markiertem Antigen vermischt werden

Daraufhin erfolgte das Dekantieren und viermalige Waschen mit 400 µl Waschlösung pro Vertiefung mittels eines Washers der Firma "Dynatech MRW". So konnten überschüssige Bestandteile der Proben und Standards entfernt werden, ohne dass bestehende Antigen-Antikörper-Komplexe von den Wänden der Vertiefungen gelöst wurden. Nach Zugabe von enzymmarkierten polyklonalen Antikörpern konnte sich in der Inkubationszeit ein Sandwich-Komplex aus dem wandständigen Antikörper, dem Zytokin und dem enzymmarkierten Antikörper bilden, bevor abermals dekantiert und gewaschen wurde, um die überschüssigen enzymmarkierten Antikörper zu entfernen. Mit der Zugabe einer chromogenen Substratlösung (Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid) begann die Bildung eines farbigen Endprodukts. Beendet wurde die Farbreaktion mit Zugabe einer Stopplösung (Salzsäure). Zuletzt erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte mittels eines Microplate-Readers. Nach Erstellen der Standardkurve und Vergleich der photometrisch gemessenen Rohwerte mit den Standardwerten konnten die unbekannt Konzentrationen ermittelt werden. Um Pipettierungsungenauigkeiten vorzubeugen, wurden sämtliche Proben doppelt bestimmt. Ergaben sich hierbei grobe Ungenauigkeiten, so wurden die entsprechenden Proben in einem späteren Test kontrolliert. Dies war allerdings nur in Ausnahmefällen notwendig, da die Abweichungen vom Mittelwert unter 4% blieben.

2.5.1 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Für die Messung des TNF- α wurde ein TNF- α Quantikine ELISA der Firma R&D Systems Europe verwendet.

Mikrotiterstreifen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliches TNF- α beschichtet waren, wurden in der benötigten Anzahl in den Halter eingesetzt. Zunächst wurden 200µl des Assay -Verdünnungspuffers und darauffolgend je 200µl der Standardseren und der zu untersuchenden Proben in die Vertiefungen gegeben. Die abgedeckte Platte wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren wurde die Mikrotiter-Platte mit Phosphatpufferwaschlösung (20ml Waschpufferkonzentrat verdünnt mit destilliertem Wasser auf 500ml aufgefüllt) von ungebundenen Materialien befreit. 200µl einer enzymgebundenen Anti-TNF- α -Konjugatlösung (enthält polyklonale Anti-TNF- α -Antikörper mit antimikrobiellem Mittel

und inertem Farbstoff) wurden hinzupipettiert und weitere zwei Stunden lang bei Raumtemperatur belassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde von dem fünf Minuten vorher gemischten Substrat jeweils 100µl von Farblösung A (Wasserstoffsuperoxyd) und Farblösung B (TMB = Tetramethylbezidin) hinzugefügt und 20 Minuten lang ohne Lichteinwirkung bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 50µl Stopplösung (2N H₂SO₄) pipettiert, um die Farbreaktion zu beenden. Innerhalb von 30 Minuten nach Hinzugabe der Stopplösung wurde bei 450 nm die Absorption der einzelnen Vertiefungen gemessen und die Konzentration von TNF-α in den Patientenseren bestimmt.

Die Sensitivität des TNF-α Assays wird mit 4,4 pg/ml angegeben.

2.5.2 Löslicher Tumornekrosefaktor-Rezeptor II (sTNF-R p75)

Für die Messung des sTNF-R wurde ein sTNF-R-Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay (EAISA) der Firma Biosource Europe verwendet.

Mikrotiterstreifen, die mit einem oligoklonalen Anti sTNF-R-Antikörper beschichtet waren, wurden in der benötigten Anzahl in den Mikrotiterrahmen gedrückt. 50µl der Standards und der Proben wurden in die Vertiefungen hineinpipettiert. 200µl des Enzymkonjugats (an HRP gekoppeltes Anti-sTNF-R) wurde dazu gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler inkubiert. Nach dem Dekantieren und dreimaligem Waschen mit der hergestellten Phosphatpuffer-Lösung wurden die ungebundenen Bestandteile entfernt. 50µl der Farbsubstratlösung (TMB Chromogen) wurden dazugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur ohne Lichteinwirkung auf dem Schüttler inkubiert. Die enzymatische Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 200µl Stopplösung (H₂SO₄) gestoppt. Die Absorption der einzelnen Vertiefungen wurde bei 450 nm abgelesen und die sTNF-R-Konzentration bestimmt.

Die Sensitivität des verwendeten sTNF-R-Immunoassays wird mit <0,1 ng/ml angegeben.

2.5.3 Interleukin-6(IL-6)

Für die Messung des IL -6 wurde ein IL -6 Quantikine ELISA der Firma R&D Systems Europe verwendet.

Mikrotiterplatten, die mit monoklonalen Antikörpern gegen menschliches IL-6 beschichtet waren, wurden in der gewünschten Anzahl in den Halter eingesetzt. Zunächst wurden 100µl des Assay-Verdünnungspuffers und darauffolgend je 100µl der Standardseren und der zu untersuchenden Proben in die Vertiefungen gegeben, bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ausschütten des Inhalts der Mikrotiter-Platte wurde mit Phosphatpufferwaschlösung (20ml Waschpufferkonzentrat verdünnt mit destilliertem Wasser, auf 500ml aufgefüllt) vier Mal gewaschen. 200µl Anti-IL-6-Konjugatlösung (enthält polyklonale Anti-IL-6-Antikörper mit antimikrobiellem Mittel und inertem Farbstoff) wurden hinzupipettiert und weitere zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschzyklus wurde vier Mal wiederholt. Jeweils 100µl von Farblösung A (Wasserstoffsuperoxyd) und Farblösung B (TMB) wurden hinzugefügt und 20 Minuten lang ohne Lichteinwirkung bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden in jede Vertiefung 50µl Stopplösung (H₂SO₄) pipettiert, um die Farbreaktion zu beenden. Innerhalb von 30 Minuten nach Hinzugabe der Stopplösung wurde bei 450 nm die Absorption der einzelnen Vertiefungen gemessen und die Konzentration von IL-6 in den Patientenseren bestimmt.

Die Sensitivität des IL-6 ELISA- Kits wird mit <0,7 pg/ml angegeben.

2.5.4 Löslicher Interleukin-6 Rezeptor (sIL-6R)

Für die Messung des löslichen IL-6 Rezeptors (sIL-6R) wurde ein Cytoscreen-ELISA der Firma Biosource International verwendet.

Die Plasma-sIL-6R-bestimmung benötigte eine Verdünnung von 1:5 bzw. 1:10, denn nur so blieb die am Ende des Tests gemessene optische Dichte innerhalb des durch die Standards begrenzten Meßbereich. Mikrotiterstreifen, die mit einem spezifischen Anti-IL-6R-Antikörper beschichtet waren, wurden in der benötigten Anzahl in den Mikrotiterrahmen gedrückt. 50µl der lyophilisierten sIL-6R-Standards und der verdünnten Plasmaproben sowie 50µl der biotinylierten Anti-sIL-6R-Antikörper

wurden in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Diese Anti-sIL-6R-Antikörper waren gegen ein anderes Epitop des sIL-6R gerichtet. Die Platte wurde abgedeckt und zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die sIL-6R-Moleküle wurden auch im Beisein von IL-6 an die Oberfläche der Vertiefungen gebunden. Nach Dekantieren und viermaligem Waschen mit je 400µl Waschlösung wurden 100µl verdünntes Streptavidin-Peroxidase-Konjugat in alle Vertiefungen hineinpipettiert. Streptavidin bindet an Biotin. Durch die Verwendung einer Biotin-Streptavidin-Brücke wurde eine Verstärkung und damit eine erhöhte Sensitivität erzielt. Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Waschzyklus wurde wiederholt und 100µl Farblösung (TMB-Substrat Chromogen) zugegeben, um mit dem gebundenen Enzym einen Farbkomplex zu bilden. Die Platte wurde abgedeckt und 30 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 100µl Stopplösung wurde die Farbreaktion beendet. Die Absorption jeder Vertiefung wurde bei 450 nm abgelesen und die sIL-6R-Konzentration interpoliert.

Die Sensitivität des Cytoscreen sIL-6R-ELISA wird mit <8ng/ml angegeben.

2.5.5 Löslicher Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R)

Für die Bestimmung des sIL-2R wurde ein Milenia IL-2R EIA der Firma Biermann GmbH verwendet.

Mikrotiterstreifen wurden in ausreichender Anzahl in den Mikrotiterrahmen gedrückt. 25µl der Standards und der Patientenseren wurden in die Vertiefungen hineinpipettiert. Erst wurden 100µl einer ligandengebundenen monoklonalen IL-2R Antikörper- Konjugatlösung und darauffolgend 100µl einer enzymgebundenen monoklonalen IL-2R-Antikörper-Enzym-Konjugatlösung (mit Meerrettich Peroxidase konjugiert) in jede Vertiefung dazugegeben. Die Mikrotiter-Platte wurde abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Weiterhin wurden 25µl einer multivalenten Anti-IL-2R-Lösung hinzugefügt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach dem Dekantieren wurde mit 300µl verdünnter Salinpuffer-Waschlösung viermal gewaschen. 200µl des fünf Minuten vorher gemischten Substrats (2 Tabletten TMB gelöst in 25 ml IL-2R Peroxidpuffer) wurden in die Vertiefungen hineinpipettiert und 30 Minuten bei

Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Durch Hinzufügen von 50µl Stopplösung wurde die Reaktion beendet. Innerhalb von 15 Minuten nach Hinzugabe der Säure wurde bei 450 nm die Absorption der einzelnen Vertiefungen abgelesen und die sIL-2R-Konzentration in den Patientenseren bestimmt.

Die Sensitivität des Milenia IL-2R Kits wird mit 16 U/ml angegeben.

2.5.6 Interleukin-1b (IL-1b)

Für die Messung des Interleukin-1β wurde ein Quantikine ELISA der Firma R&D Systems Europe verwendet.

Mikrotiterplatten, die mit monoklonalen AK gegen menschliches IL-1β beschichtet waren, wurden in der benötigten Anzahl in den Mikrotiter-Rahmen eingesetzt. Zunächst wurden 50µl des Assay -Verdünnungspuffers und im Anschluß je 200µl der Standardseren und der zu untersuchenden Proben in die Vertiefungen gegeben. Die abgedeckte Platte wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Dekantieren wurde die Mikrotiter-Platte drei Mal mit Phosphatpufferwaschlösung (20ml Waschpufferkonzentrat verdünnt mit destilliertem Wasser auf 500ml aufgefüllt) gespült. 200µl einer enzymgebundenen Anti-IL-1β -Konjugatlösung (enthält polyklonale Anti-IL-1β-Antikörper mit antimikrobiellem Mittel und inertem Farbstoff) wurden hinzupipettiert und weitere zwei Stunden lang bei Raumtemperatur belassen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde von dem 15 Minuten zuvor gemischten Substrat jeweils 100µl von Farblösung A (Wasserstoffsperoxyd) und Farblösung B (TMB) hinzugefügt und 20 Minuten lang lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde in jede Vertiefung 50µl Stopplösung (2N Schwefelsäure) pipettiert, um die Farbreaktion zu beenden. Die Absorption der einzelnen Vertiefungen wurde innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen und die Konzentration von IL-1β in den Patientenseren bestimmt.

Die Sensitivität des IL-1β-Assays wird mit <1 pg/ml angegeben.

2.5.7 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)

Für die Messung des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) wurde ein Quantikine ELISA der Firma R&D Systems Europe verwendet.

Mikrotiterstreifen, die mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-1ra beschichtet waren, wurden in gewünschter Zahl in den Mikrotiterrahmen eingesetzt. 50µl Assay-Diluent wurden in alle Vertiefungen hineinpipettiert, 200µl der Standards und der Plasmaproben dazugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dekantieren und viermaligem Waschen mit Waschlösung wurde 200µl Anti-IL-1ra-Konjugatlösung hinzugefügt und die Mikrotiter-Platte wieder zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Dekantieren und viermaligem Auswaschen wurden 200µl eines zuvor gemischten Substrats aus Farblösung A und Farblösung B dazupipettiert und zwanzig Minuten ohne Lichteinwirkung bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 50µl Stopplösung wurde die Farbreaktion gestoppt, innerhalb von 30 Minuten die Absorption in den Vertiefungen gemessen und anhand der Standardkurve die Konzentration des IL-1ra bestimmt.

Die Sensitivität des IL-1ra-Immunoassays wird mit 20 pg/ml angegeben

2.5.8 Interleukin-10 (IL-10)

Für die Messung des Interleukin-10 (IL-10) wurde ein Titerzyme IL-10 EIA Kit der Firma PerSeptive Biosystems verwendet.

Mikrotiterstreifen, die mit einem spezifischen monoklonalen Anti-IL-10 beschichtet waren, wurden in der benötigten Anzahl in den Mikrotiterrahmen gedrückt. 100µl der Standardseren und der zu untersuchenden Plasmaproben wurden in die Vertiefungen hineinpipettiert, abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach Dekantieren und viermaligem Waschen mit 400µl des verdünnten Waschpuffers wurden 100µl des IL-10-Antiserums (von neugeborenem Kalb) dazugegeben. Die Mikrotiter-Platte wurde abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden 100µl Streptavidin-HRP-Konjugatlösung (mit Meerrettich (horseradish)-Peroxidase konjugiertes Streptavidin) in die Vertiefungen

pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 100µl der Farblösung (TMB und Wasserstoffsuperoxyd) dazugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Durch je 100µl Stopplösung (1 N HCl) wurde die enzymatische Reaktion unterbrochen. Innerhalb von 30 Minuten nach Hinzugabe der Stopplösung wurde die Absorption der einzelnen Vertiefungen bei 450nm gemessen und im EIA-AID-Programm die Konzentration des IL-10 bestimmt.

Die Sensitivität des IL-10 EIA Kits wird mit < 1 pg/ml angegeben.

2.5.9 Neopterin

Die Bestimmung von Neopterin wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Mainz mit dem ELItest® der Firma Brahms, Hennigsdorf durchgeführt.

Der ELItest® Neopterin ist ein quantitativer kompetitiver ELISA zur direkten Bestimmung von Neopterin im Serum. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte sind mit anti-Neopterin-Antikörpern (polyklonal, Schaf) beschichtet. Nach Zugabe des Enzymkonjugats (Neopterin/alkalische Phosphatase-Konjugat) zu Standards und Kontrollseren bzw. den Patientenproben konkurriert das Neopterin aus den Patientenseren mit dem Neopterin-Enzymkonjugat um die im Unterschluß vorliegenden Bindungsstellen des Antikörpers, wodurch Festphasen-gebundene Immunkomplexe (anti-Neopterin-Antikörper/ Neopterin bzw. Neopterin-Enzymkonjugat) gebildet werden. Ein anschließender Waschgang sorgt für die Entfernung sämtlicher nichtgebundener Reaktionspartner. Durch Zugabe des Substrats 4-Nitrophenylphosphat erfolgt der Start der Enzymreaktion, wobei die im Neopterin-Enzymkonjugat enthaltene alkalische Phosphatase die Phosphatabspaltung des 4-Nitrophenylphosphats unter Bildung des gelben 4-Nitrophenols katalysiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Alkalisierung mit Natronlauge beendet. Bei konstanter Reaktionszeit ist die Farbintensität (gemessenen in optischer Dichte OD) von der Menge des gebundenen Enzymkonjugats abhängig und damit umgekehrt proportional zu Neopterin-Konzentration des Patientenserums. Hohe Neopterinwerte entsprechen somit einer niedrigen optischen Dichte. Die optische Dichte wird in einem Plattenphotometer bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm gemessen. Die Ermittlung der Ergebnisse

erfolgt durch Erstellung einer Standardkurve (optische Dichte versus Konzentration der Neopterin-Standards), aus der die Neopterin-Konzentration der Patientenproben direkt abgelesen wird.

Die Sensitivität des ELItest® Neopterin wird mit 2 nmol/l angegeben.

2.5.10 β 2-Mikroglobulin

Die Bestimmung von β 2-Mikroglobulin wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Mainz mit einem AxSYM Assay der Firma Abbott, Deutschland durchgeführt.

Dieser Assay ist ein Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA), der auf der Sandwich-Technik basiert. Die Wells der Mikrotiterstreifen sind mit Antikörpern beschichtet, die gegen eine definierte Bindungsstelle des β 2-Mikroglobulins gerichtet sind. Die Patientenproben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem enzymmarkierten Antikörper (E-AK) inkubiert. Dieser E-AK ist gegen ein anderes Epitop des β 2-Mikroglobulins gerichtet und bildet mit bereits gebundenem Antigen einen Sandwich-Komplex. Nicht gebundener E-AK wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung hinzugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional zur Antigen-Konzentration in den Standards und den Patientenproben. Die Extinktionen werden mit einem Mikrotiterplatten-Reader gemessen und anhand einer zu erstellenden Standardkurve werden die β 2-Mikroglobulin-Konzentrationen berechnet.

Die Sensitivität des Abbott- β 2-Mikroglobulin-MEIA wird mit 1,02 μ g/l angegeben.

2.6 Statistische Berechnung

Die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse aus Berechnung und Messung erfolgte mittels Wilcoxon Signed Rank Test (nicht-parametrischer Test für paarige Stichproben) unter Benutzung des Statistik-Programms „Stat View 4.0“ (Integrated Data Analysis and Presentation System, Abacus Concepts Inc. Berkeley, 1992). Dieser Prüfung wurde die Auswertung durch den Friedman-Test vorgeschaltet, einem verteilungsfreien Test, durch den Gruppenunterschiede von verbundenen Stichproben ausgewertet werden können.

Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die Mittelwerte der bestimmten Konzentrationen; für signifikante Unterschiede muß $p < 0,05$, für hochsignifikante $p < 0,01$ gelten. Die Bestimmung des Mittelwertes der gemessenen Konzentration jeweils vor Beginn der Therapie soll als Normalwert für dieses Patientenkollektiv gelten. Nach Bildung dieses Mittelwertes und Berechnung der Standardabweichung wurde der obere Grenzwert als Mittelwert plus dessen zweifacher Standardabweichung festgelegt. Zur Überprüfung diente der Vergleich mit den Angaben der Firmen. Als Referenzwerte bezeichnet man Konzentrationswerte, oberhalb derer man von einem pathologischen Befund ausgehen muß.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

23 Patienten im Alter zwischen 17 und 43 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 31,33 Jahren (Standardabweichung [= SD]: $\pm 7,28$) wurden im Rahmen dieser Studie unter der Therapie mit Interferon- β 1b (IFN- β 1b) untersucht. Der Frauenanteil betrug 78,3 %. Die mittlere Krankheitsdauer vor Beginn der Therapie betrug 39,05 Monate (entspricht 3,25 Jahren) bei einer Standardabweichung von 31,92, was besagt, dass die Krankheitsdauer einer großen Schwankung von acht bis 146 Monaten unterlag. Mit einer mittleren Schubfrequenz von 4 (SD $\pm 3,56$) ergibt sich eine jährliche Schubrate von 1,42 vor Therapiebeginn.

Die Erhebung des Behinderungsgrades mit Hilfe des EDSS-Score ergab einen Mittelwert von 2,21 (SD $\pm 1,39$), wobei der niedrigste Score bei 0 lag, der höchste bei fünf.

Die Minimum- und Maximum-Werte gehen aus der untenstehenden Tabelle hervor.

	Alter	Krankheitsdauer		Schübe	Schübe/Jahr	EDSS
		Monate	Jahre			
Anzahl	23					
Mittelwert	31,33	39,05	3,25	4	1,42	2,21
SD	7,28	31,93	2,66	3,56	0,80	1,39
Median	33	33	2,75	3	1,44	2
Minimum	17	8	0,66	2	0,24	0
Maximum	43	146	12,16	18	3,6	5

Tabelle 3.1 Mittelwerte (MW) m. Standardabweichung (SD), Median, minimalem und maximalem Wert von Alter (in Jahren), Krankheitsdauer, Schubfrequenz, Anzahl der Schübe/Jahr und EDSS der Patienten

3.1.1 Klinischer Verlauf unter der Therapie

Bei drei der 23 Patienten (13%) kam es innerhalb der Beobachtungszeitraums von einem Jahr zum Therapieabbruch. Gründe hierfür waren Krankheitsprogression oder vermutete Unwirksamkeit des Arzneimittels sowie Nichtakzeptanz von unerwünschten Arzneimittelwirkungen.

Eine Übersicht über die einzelnen demographischen und klinischen Parameter der Patienten unter der Therapie mit Interferon- β 1b zeigt eine Tabelle im Anhang.

3.1.2 Nebenwirkungen unter der IFN- β 1b -Therapie

18 der 23 Patienten (78,2%) berichteten bis zum Ende des Beobachtungszeitraums über Nebenwirkungen (NW). Die häufigsten NW waren grippeähnliche Symptome, die von allen 18 Patienten berichtet wurden, sowie Reaktionen an den Injektionsstellen, die bei sieben Patienten beobachtet wurden.

Die grippeähnlichen Symptome traten ca. ein bis zwei Stunden nach den Injektionen auf und äußerten sich überwiegend als Unwohlsein und subfebrile Temperaturen bis 38°C. Fünf der 18 Patienten (27,7%) zeigten ausgeprägtere Symptome mit Temperaturen über 38,5°C, Schüttelfrost, Kopf- und Gliederschmerzen. Bei allen 18 Patienten bildeten sich die grippeähnlichen Symptome unter Begleitmedikation (Paracetamol, 1000mg) zurück.

Bei 16 Patienten traten die NW nach zwei Monaten nicht mehr auf, eine Begleitmedikation war nicht mehr nötig. Zwei Patienten zeigten bis in den vierten Monat der Therapie stärkere grippeähnliche Symptome.

Unspezifische Symptome wie Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Leistungsminderung wurden von sechs Patienten (26 %) beschrieben, diese Symptome traten nach Beginn der Therapie unabhängig vom Injektionszeitpunkt auf. Bei der Kontrolluntersuchung nach drei Monaten wurden die Symptome nicht mehr angegeben.

Sieben Patienten (30,4 %) meldeten Lokalreaktionen an der Injektionsstelle in Form von Rötungen ohne weitere Entzündungszeichen, im Mittel verschwanden die Rötungen nach drei bis vier Tagen. Bei einem Patienten mußte die Therapie nach drei Monaten wegen des Auftretens von Spritzenabszessen unterbrochen werden. Von fünf Patienten (21,7 %) wurden folgende Stimmungsschwankungen beobachtet: häufigere Gereiztheit, Grübeln, innere Unruhe, labilere Stimmung. Depressive Verstimmungen traten nicht auf.

Bei einem der 23 Patienten (13 %) traten schwerere NW wie Ohrenscherzen, vermehrter Harndrang sowie Übelkeit in Verbindung mit mäßigem Alkoholkonsum auf, wobei ein kausaler Zusammenhang mit der INF- β 1b-Therapie nicht sicher ist. Ein Patient berichtete über Sehstörungen in Form von Doppelbildern und Verschwommensehen, die eine halbe Stunde nach der Injektion auftraten und sich nach 13-14 Stunden zurückbildeten.

3.2 Verlaufsbeobachtung der Zytokinkonzentrationen unter IFN- β 1b-Therapie

3.2.1 Tumornekrosefaktor - α (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor - α (TNF- α) konnte in keinem Serum des Patientenkollektivs nachgewiesen werden, d.h. seine Konzentration lag unterhalb des bei dem hier benutzten ELISA der Firma R&D Systems Europe meßbaren Wert von 4,4 pg/ml.

3.2.2 Löslicher Tumornekrosefaktor- Rezeptor II (sTNF-R II)

Der lösliche Tumornekrosefaktor-Rezeptor-II (sTNF-R II) wurde bei insgesamt 12 Patienten bestimmt. Die Firma Biosource Europe gibt für den verwendeten sTNF-R-EAISA eine Sensitivität von <0,1 ng/ml an. Der Referenzwert von sTNF-RII liegt bei 4,17 ng/ml (ermittelt anhand einer Kontrollgruppe von 117 gesunden Probanden). Die angegebenen Konzentrationen sind Mittelwerte.

Vor Therapiebeginn lag die durchschnittliche sTNF-RII-Konzentration bei 3,06 ng/ml (Standardabweichung [SD] = 0,35). Aus der untenstehenden Tabelle lässt sich entnehmen, dass die Konzentration kurz nach der ersten Injektion zwar auf 3,18 ng/ml anstieg, aber erst 24 Stunden später mit 3,50 ng/ml signifikant ($p = 0,005$) über dem Ausgangswert lag. Am fünften Tag sank die Konzentration im Mittel auf 3,27 ng/ml. Bei einem p -Wert von 0,0546 ist diese Konzentrationsänderung grenzwertig nicht signifikant. Nach einem Monat lag die sTNF-RII-Konzentration mit 3,73 ng/ml hochsignifikant ($p = 0,0047$) über dem Ausgangswert von 3,06 ng/ml. Auch im weiteren Verlauf stieg die durchschnittliche Konzentration des sTNF-RII nach drei Monaten mit einem p -Wert = 0,007 hochsignifikant auf 3,63 ng/ml an.

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	12	12	12	12	12	12
Mittelwert	3,06	3,18	3,50	3,27	3,73	3,63
SD	0,35	0,49	0,48	0,55	0,60	0,67
Median	3,13	3,20	3,45	3,18	4,66	4,79
Minimum	2,59	2,30	2,90	2,68	2,52	2,23
Maximum	3,65	3,85	4,52	4,55	4,66	4,79

Tabelle 3.2: Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Minimal- und Maximalwert der sTNF-RII-Konzentrationen (in ng/ml) im Serum von 12 Patienten zum Zeitpunkt 0 (Leerwert), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- Die gemessenen sTNF-RII-Konzentrationen zeigten zu allen Zeitpunkten eine geringe Streuung mit einer maximalen Spannweite von 2,56 ng/ml.
- Vergleicht man die gemessene Ausgangskonzentration des sTNF-RII vor Therapiebeginn mit der angegebenen Referenzkonzentration (4,17 ng/ml), so lag sie mit 3,06 ng/ml deutlich darunter. Auch zu den späteren Meßzeitpunkten wurde der Referenzwert nicht erreicht, so dass alle hier gemessenen durchschnittlichen Konzentrationen niedriger waren als der Vergleichswert.

- Innerhalb der ersten 24 Stunden stieg die sTNF-RII-Konzentration stetig signifikant an, sank bis zum fünften Tag wieder ab, lag aber langfristig bei den Messungen nach einem bzw. drei Monaten hochsignifikant über dem Ausgangswert vor Therapiebeginn.

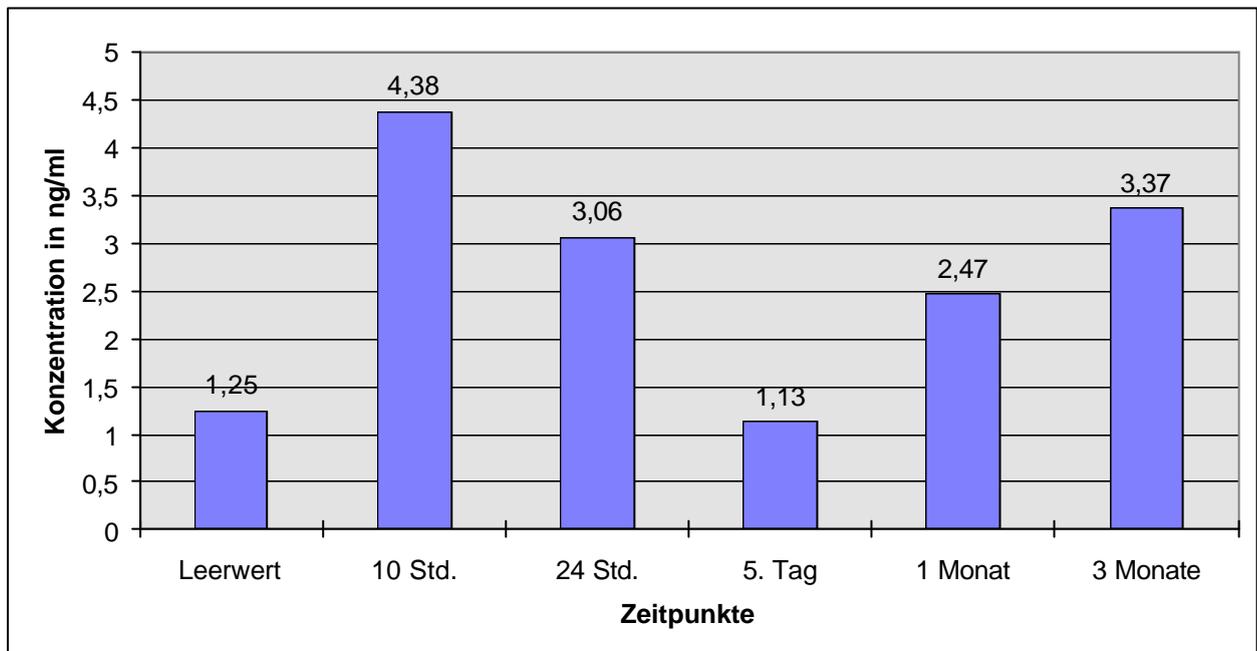


Abbildung 3.1: Mittelwerte der absoluten sTNF-RII-Konzentration (in ng/ml) im Serum zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

3.2.3 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) wurde bei 18 der 23 Patienten bestimmt. Die Sensitivität des verwendeten ELISA der Firma R&D Systems Europe wurde mit 0,7 pg/ml angegeben. Als Referenzwert kann die von der Herstellerfirma angegebene Konzentration eingesetzt werden: bei 33 von 40 der gesunden Kontrollpersonen wurde eine Konzentration < 3,13 pg/ml gemessen, bei sieben eine Konzentration zwischen 3,13 und 12,5 pg/ml.

Die durchschnittliche IL-6-Konzentration vor Beginn der Therapie mit IFN- β 1b lag bei 4,36 pg/ml mit einer hohen Standardabweichung von 12,38. Bei 15 (83,3%) der 18 Patienten konnte die IL-6-Konzentration nicht bestimmt werden, da die gemessene

Konzentration unterhalb des hier minimal meßbaren Wertes von 0,7 pg/ml lag. So errechnet sich ein Median von 0 mit einer Spannweite von 0 bis 45,02 pg/ml.

Zehn Stunden nach der ersten Injektion stieg die Konzentration im Mittel auf 46,65 pg/ml (SD = 14,00) an und war bei allen 18 Patienten nachweisbar. Dieser Konzentrationsanstieg ist hochsignifikant ($p = 0,0002$). Nach 24 Stunden errechnete sich eine IL-6-Konzentration von 8,73 pg/ml. Auch hier konnte die IL-6-Konzentration nur bei drei Patienten bestimmt werden, so dass sich ein Median von 0 mit einer Streuung von 0 bis 114,47 ergibt. Diese Konzentration ist im Vergleich zum ersten Leerwert im Mittel zwar gestiegen, die Veränderung aber ist nicht signifikant ($p = 0,108$). Vergleicht man die Konzentration von 8,73 pg/ml mit dem 10-Stundenwert, so ist der Konzentrationsabfall signifikant ($p = 0,015$). Das untenstehende Säulendiagramm macht diese Dynamik optisch deutlich. Am fünften Tag, zehn Stunden nach der dritten Injektion, zeigte sich eine Konzentration von 11,30 pg/ml. Dieser Wert konnte nur bei 13 Patienten gemessen werden, alle anderen Werte lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Der Median liegt bei 0 mit einer Spannweite von 0 bis 76,03 pg/ml. Das bedeutet, dass am fünften Tag die IL-6-Konzentration im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ($p = 0,027$) angestiegen ist. Nach einem Monat lag die IL-6 Konzentration im Mittel bei 4,08 pg/ml, was einen leichten Konzentrationsanstieg im Vergleich zum Ausgangswert bedeutet, der aber nicht signifikant ist ($p = 0,285$). Nach drei Monaten zeigte sich ein weiterer leichter Konzentrationsanstieg auf 5,16 pg/ml mit einer großen Streubreite von 0 bis 49,98 pg/ml. Auch dieser Konzentrationsanstieg ist im Vergleich zum Ausgangswert nicht signifikant ($p = 0,108$). Sowohl beim Einmonats- als auch beim Dreimonatswert konnte die IL-6-Konzentration nur bei drei der 18 Patienten gemessen werden.

Bei fünf der 18 Patienten wurde stichprobenweise die IL-6-Konzentration nach sechs Monaten untersucht. Die hier gemessene durchschnittliche Konzentration lag bei 1,94 pg/ml, wobei nur zwei der fünf Patienten nachweisbare Konzentrationen aufwiesen. Diese Konzentrationsänderung ist mit einem p-Wert von 0,179 nicht signifikant im Vergleich zum Ausgangswert.

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Mon.	3 Mon.	6 Mon.
Anzahl	18	18	18	18	18	18	5
Mittelwert	4,36	46,65	8,73	11,30	4,80	5,16	1,94
SD	12,37	14,00	6,54	5,51	3,23	3,40	1,27
Median	0	32,74	0	0	0	0	0
Minimum	0	4,14	0	0	0	0	0
Maximum	45,02	268,25	114,47	76,03	52,46	49,98	6,28

Tabelle 3.3: Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Minimal- und Maximalwert der IL-6-Konzentrationen (in pg/ml) im Serum von 18 Patienten zum Zeitpunkt 0 (Leerwert), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten; bei fünf Patienten Berechnung der Werte auch nach sechs Monaten

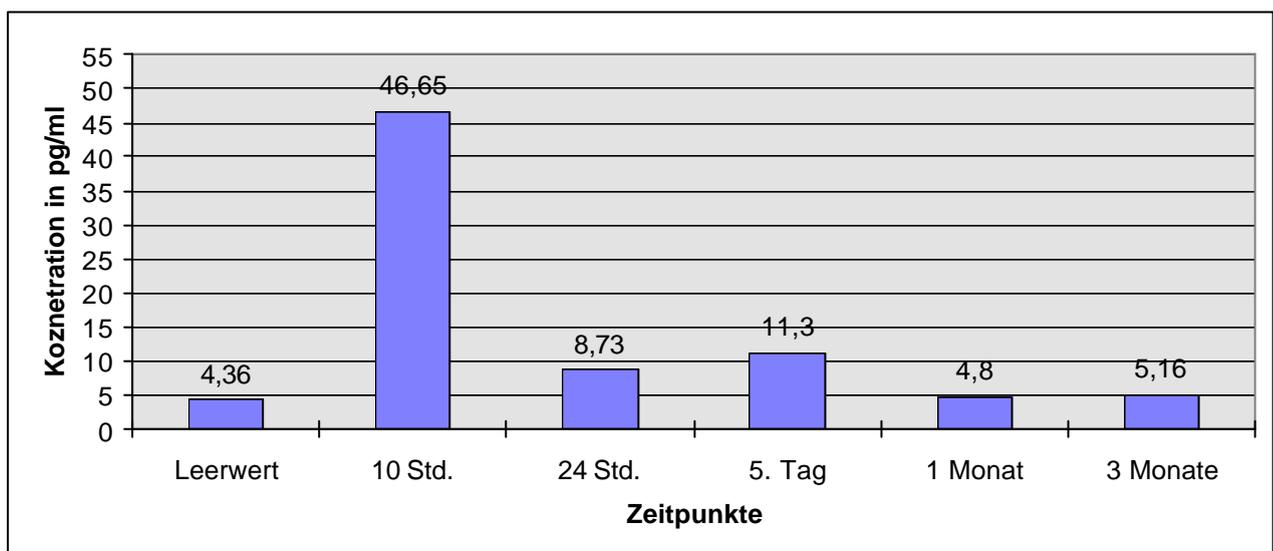


Abbildung 3.2: Mittelwerte der absoluten IL-6-Konzentration (in pg/ml) zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- ein Großteil der Patienten (83,3%) zeigte nur bei der zweiten Messung, also 10 Stunden nach Therapiebeginn, IL-6-Konzentrationen über der Nachweisgrenze, zu den anderen Zeitpunkten war die Konzentration nicht nachweisbar.
- die drei Patienten, bei denen zu allen Zeitpunkten die IL-6-Konzentration nachweisbar war, prägen den optischen Eindruck des Säulendiagramms.

- nur der kurzfristige Konzentrationsanstieg nach 10 Stunden war signifikant, im weiteren Verlauf waren die Konzentrationsänderungen nicht signifikant.
- der vermutete langfristige Konzentrationsanstieg des IL-6 konnte durch eine zu einem späteren Zeitpunkt (nach sechs Monaten) durchgeführte Messung nicht bestätigt werden.

Besonderheiten bei drei der 18 Patienten:

Bei den Patienten #13, #15 und #16 war die IL-6-Konzentration, im Gegensatz zu den anderen 15 Patienten, durchgehend zu jedem Zeitpunkt meßbar. Die IL-6-Ausgangskonzentration (= Leerwert) lag signifikant über den bekannten Referenzwerten der Herstellerfirma. Bis auf Patient #16 war der signifikante Konzentrationsanstieg 10 Stunden nach Therapiebeginn deutlich höher als bei den übrigen Patienten.

Patienten	Leerwert	10 Stunden	24 Stunden	5 Tage	1 Monat	3 Monate
Patient #13	30,14	99,59	36,34	76,02	28,30	38,82
Patient #15	45,02	268,25	114,47	69,82	52,46	49,98
Patient #16	3,40	26,90	6,39	5,63	4,88	4,14
Vergleich m. Mittelwert	4,36	46,65	8,73	11,30	4,80	5,16
Vergleich m. Median	0	4,14	0	0	0	0

Tabelle 3.4: Vergleich der IL-6-Konzentration (in pg/ml) der Patienten #13, #15, und #16 mit dem Mittelwert und Median aller gemessenen Konzentrationen der anderen Patienten

3.2.4 Löslicher Interleukin-6 Rezeptor (sIL-6R)

Der lösliche Interleukin-6 Rezeptor (sIL-6R) wurde bei 12 der 23 Patienten bestimmt. Die Sensitivität des sIL-6R-ELISA der Firma Biosource International wurde mit <8 ng/ml beschrieben. In einer Normalwertstudie mit 29 gesunden Blutspendern wurde als Referenzwert ein Bereich von 113-131 ng/ml mit einem Median von 210 ng/ml ermittelt. Die durchschnittlich gemessene sIL-6R-Konzentration vor Beginn der Therapie betrug 33,43 ng/ml (SD = 4,84) mit einer Spannweite von 22,75- 37,0

ng/ml. 10 Stunden nach der ersten Injektion fiel die Konzentration auf 31,4 ng/ml und 24 Stunden nach der ersten Injektion auf durchschnittlich 30,85 ng/ml ab. Beide Konzentrationsänderungen sind nicht signifikant ($p = 0,35$ und $p = 0,33$). Am fünften Tag, 10 Stunden nach der dritten IFN- β 1b-Injektion, stieg die sIL-6R-Konzentration ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,18$) auf 31,63 ng/ml an. Nach einem Monat lag die sIL-6R-Konzentration durchschnittlich bei 33,94 ng/ml, nach insgesamt drei Monaten bei 32,68 ng/ml. Keine der genannten Konzentrationsänderungen war signifikant ($p = 0,43$ bzw. $p = 0,38$).

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	10	10	10	10	10	10
Mittelwert	33,43	31,4	30,85	31,63	33,94	32,68
SD	4,84	5,51	5,8	3,92	5,01	7,62
Median	34,88	31,55	31,55	30,6	33,8	36,25
Minimum	22,75	20,10	20,80	25,20	27,40	18,15
Maximum	37,00	40,00	38,95	37,25	40,00	40,00

Tabelle 3.5: Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung (SD), Median, Minimal- und Maximalwert der sIL-6R-Konzentrationen (in ng/ml) im Serum von 10 Patienten zum Zeitpunkt 0 (Leerwert), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- Keine der gemessenen Konzentrationsänderungen von sIL-6R unter der Therapie mit IFN- β 1b war signifikant.
- Bei einem durchschnittlichen Ausgangswert von 33,43 ng/ml sank die Konzentration minimal auf 30,85 ng/ml 24 Stunden nach Therapiebeginn ab.
- Die sIL-6R-Konzentration stieg im weiteren Verlauf nach einem Monat maximal auf 33,94 ng/ml an, lag damit wieder fast bei dem Wert vor Therapiebeginn; nach drei Monaten lag die Konzentration bei 32,68 ng/ml.

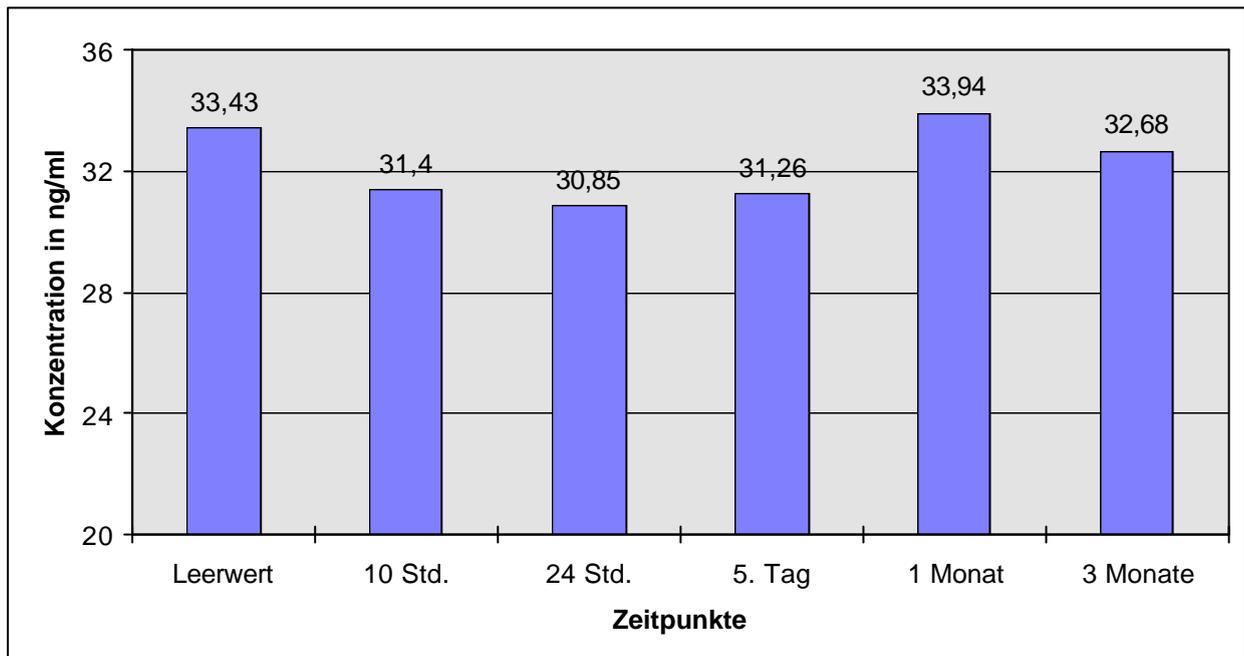


Abbildung 3.3.: Mittelwerte der absoluten sIL-6R-Konzentration (in ng/ml) zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

3.2.5 Löslicher Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R)

Der lösliche Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R) wurde bei allen 23 Patienten bestimmt. Die Sensitivität des hier verwendeten Milenia IL-2R-Kits der Firma Biermann GmbH wurde mit 16 U/ml angegeben. Der Referenzwert des sIL-2R lagen bei einer Kontrollgruppe von 51 gesunden Blutspendern in einem Bereich von 85 bis 961 U/ml. sIL-2R war in allen Serumproben nachweisbar. Vor Therapiebeginn lag die durchschnittliche sIL-2R-Konzentration bei 311,13 U/ml (mit einer hohen Standardabweichung [SD] von 105,69). 10 Stunden nach der ersten Injektion stieg die Konzentration im Mittel auf 318,13 U/ml an, sank bis zum nächsten Tag jedoch wieder auf 314,52 U/ml ab. Beide Konzentrationänderungen sind nicht signifikant ($p = 0,31$ und $p = 0,88$). Am fünften Tag war die Konzentration nicht signifikant auf 344,35 U/ml angestiegen. Erst im weiteren Verlauf stieg die Konzentration des sIL-2R nach einem Monat hochsignifikant ($p = 0,0067$) auf 377,61 U/ml, nach drei Monaten sogar auf 394,83 U/ml ($p = 0,0011$) an.

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	23	23	23	23	23	23
Mittelwert	311,13	318,13	314,52	344,35	377,61	394,83
SD	105,69	131,48	115,64	123,14	145,13	163,77
Median	279	315	279	324	369	369
Minimum	180	108	126	144	126	54
Maximum	630	612	585	657	810	846

Tabelle 3.6: Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichung (SD), Mediane mit kleinstem und maximalstem Wert der sIL-2R-Konzentration (in U/ml) im Serum von 23 Patienten zum Zeitpunkt 0 (Leerwert), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

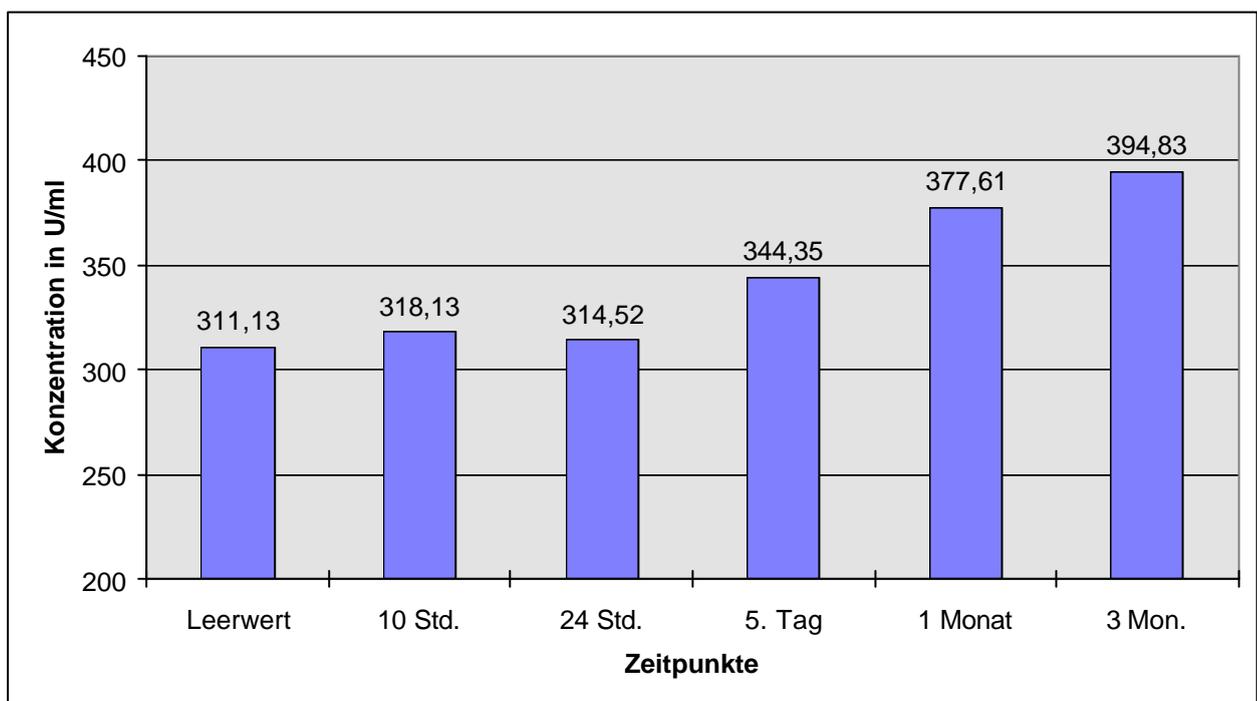


Abbildung 3.4.: Mittelwerte der absoluten sIL-2R-Konzentration (in U/ml) zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- Die hier gemessenen Konzentrationen überschritten über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht den Referenzwert (mit der Spannweite von 85 bis 961 U/ml).

- Innerhalb der ersten 24 Stunden schwankten die durchschnittlichen Konzentrationen nicht signifikant. Erst im weiteren Verlauf stieg die Ausgangskonzentration von 311,13 U/ml signifikant auf 344,35 U/ml, am fünften Tag und langfristig bis zum dritten Monat hochsignifikant auf 394,83 U/ml an.

3.2.6 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 β (IL-1 β) konnte bei keinem der Patienten im Serum nachgewiesen werden, d.h. die gemessene Konzentration lag unterhalb des bei dem hier verwendeten Quantikine ELISA der Firma R&D Systems meßbaren Wert von <1pg/ml.

3.2.7 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)

Der Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) wurde bei 18 Patienten bestimmt und war in allen Serumproben nachweisbar. Die Sensitivität des hier verwendeten ELISA der Firma R&D Systems Minneapolis, USA lag bei ca. 20 pg/ml. Als Referenzwert gilt die von der ELISA-Hersteller angegebene durchschnittliche IL-1ra-Konzentration von 201 pg/ml mit einer Spannweite von 0 - 1050 pg/ml (ermittelt anhand einer Kontrollgruppe von 138 gesunden Probanden). Gruss et al., 1992 fanden mit dem ELISA desselben Herstellers bei 49 gesunden Kontrollpersonen eine durchschnittliche IL-1ra- Serumkonzentration von 310 pg/ml und eine Spannweite von 216-818 pg/ml.

Die bei 18 MS-Patienten gemessene durchschnittliche IL-1ra-Konzentration vor Beginn der Therapie betrug 276,56 pg/ml (SD = 112,88) mit einer Spannweite von 86 - 534 pg/ml. Nach der ersten Injektion stieg die Konzentration nach 10 Stunden hochsignifikant auf 2705,3 pg/ml ($p = 0,0002$) an und lag damit deutlich oberhalb der Normalwertgrenze. Nach 24 Stunden sank die Konzentration im Mittel auf 841,89 pg/ml, dieser Konzentrationsabfall innerhalb von 14 Stunden ist hochsignifikant ($p = 0,0002$). Vergleicht man den nach 24 Stunden gemessenen Wert mit der Ausgangskonzentration, dann ist auch dieser Wert im Vergleich zum Ausgangswert

signifikant erhöht ($p = 0,0002$). Am fünften Tag, 10 Stunden nach der dritten Injektion, stieg die durchschnittliche Konzentration wieder hochsignifikant ($p = 0,0002$) auf 1563,03 pg/ml an. Nach einem Monat betrug die Konzentration durchschnittlich 414,67 pg/ml und hatte sich nach drei Monaten auf durchschnittlich 389,22 pg/ml eingependelt. Beide Werte liegen signifikant über der Konzentration vor Therapiebeginn ($p = 0,0108$ bzw. $p = 0,0176$). Dies zeigt, dass die IL-1ra-Konzentration nach dem ersten drastischen Anstieg über die Normalwertgrenze hinaus zwar wieder deutlich abfällt, die nach einem bzw. drei Monaten gemessenen Konzentrationen aber deutlich signifikant über dem Ausgangswert liegen.

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	18	18	18	18	18	18
Mittelwert	276,56	2705	841,89	1563	414,67	389,22
SD	112,88	610,73	374,46	585,28	310,48	172,14
Median	293		709	1595	332,5	362,5
Minimum	86	1012	467	377	191	138
Maximum	534	3000	1726	2596	1561	733

Tabelle 3.7: Anzahl der gemessenen Proben, Mittelwerte und Standardabweichung (SD), Median mit kleinstem und maximalstem Wert der IL-1ra-Konzentration (in pg/ml) im Serum von 18 Patienten zum Zeitpunkt 0 (Leerwert), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- Alle gemessenen Werte unterliegen einer großen Streubreite.
- Der IL-1ra-Ausgangswert (276,56 pg/ml) vor Beginn der Therapie lag innerhalb des vom ELISA-Hersteller angegebenen Referenzbereichs von 201 - 310 pg/ml.
- Innerhalb der ersten Stunden stieg die IL-1ra-Konzentration hochsignifikant auf 2705,3 pg/ml und lag damit deutlich oberhalb des angegebenen Grenzwertes von 1050 pg/ml.
- Nachdem die IL-1ra-Konzentration zunächst wieder absank, stieg sie nach der dritten Injektion hochsignifikant auf 1563,03 pg/ml an und hatte nach einem bzw. drei Monaten Konzentrationen erreicht, die signifikant über dem Ausgangswert lagen.

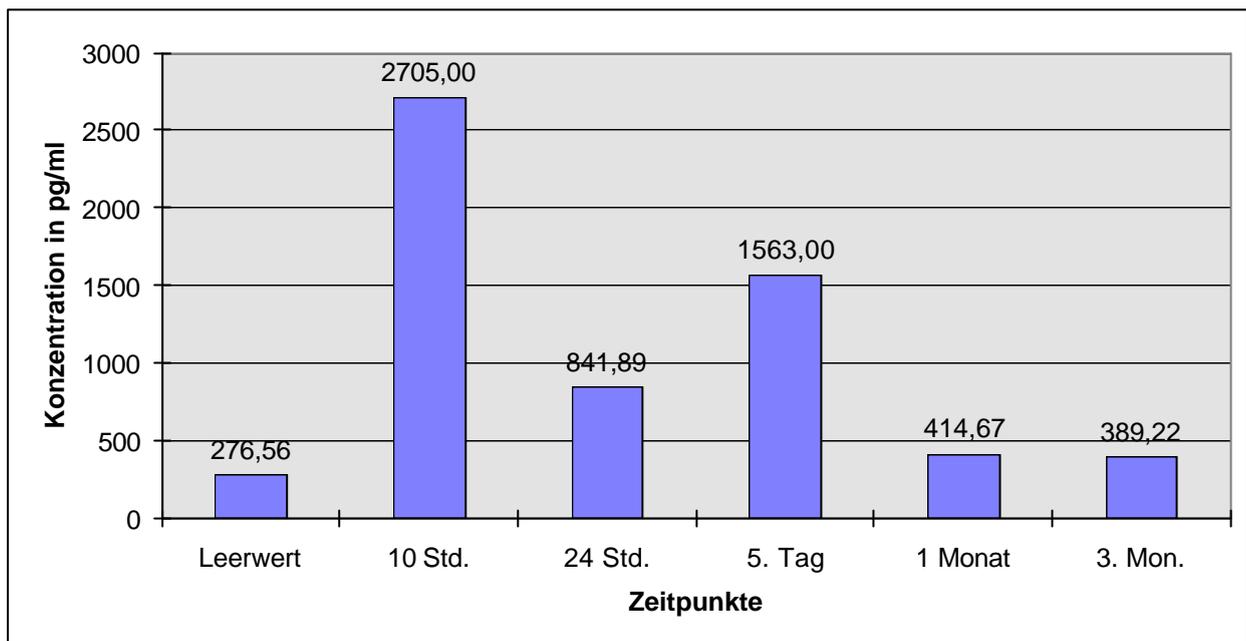


Abbildung 3.5: Mittelwerte der absoluten IL-1ra-Konzentration (in pg/ml) zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

3.2.8 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) wurde bei 19 der 23 Patienten bestimmt. Die Sensitivität des Titerzyms IL-10 Kit EIA der Firma Perseptive Biosystems wurde mit <1 pg/ml angegeben.

Die durchschnittliche IL-10-Konzentration vor der ersten IFN- β 1b-Injektion lag bei 1,25 pg/ml (SD = 2,0). Bei acht (34,8%) der 19 Patienten konnte IL-10 jedoch nicht nachgewiesen werden, d.h. die gemessene Konzentration lag unterhalb des oben angegebenen Wertes von 1 pg/ml. So errechnet sich auch ein Median von 0 mit einer Spannweite von 0 bis 6,88 pg/ml. 10 Stunden nach der ersten Injektion stieg die Konzentration im Mittel auf 4,38 pg/ml (mit einer hohen SD von 5,07) an. Hier konnte IL-10 bei drei (13,04%) der Patienten nicht gemessen werden, der Median lag bei 3,13 mit einer Spannweite von 0 bis 18,13 pg/ml. Trotz der deutlichen Streuung war die Konzentrationsänderung im Wilcoxon-Test signifikant ($p = 0,026$). Nach 24 Stunden errechnete sich eine IL-10-Konzentration von 3,06 pg/ml (SD = 6,20). Hier ist mittels der untenstehenden Tabelle und der Verteilungsdarstellung im bloßen

optischen Vergleich ersichtlich, dass es bei den gemessenen Konzentrationen erhebliche Schwankungen unter den Patienten gab (Median betrug 0,94 pg/ml mit einer Spannweite von 0 bis 26,88 pg/ml). Die Konzentrationssteigerung auf 3,06 pg/ml ausgehend vom sogenannten Leerwert vor Beginn der Therapie ist mit einem p-Wert von 0,0995 nicht signifikant. Am fünften Tag zeigte sich eine durchschnittliche IL-10-Konzentration von 1,13 pg/ml. Dieser Wert bedeutet einen Abfall der Konzentration unter den Ausgangswert vor Beginn der Therapie. Da auch hier bei neun Patienten (39,13%) die gemessene Konzentration unterhalb von 1 pg/ml lag, errechnet sich ein Median von 0 mit Schwankungen von 0 bis 6,88 pg/ml. Nach einem Monat konnte ein Konzentrationsanstieg auf 2,47 pg/ml gemessen werden, der aber nicht signifikant ist ($p = 0,6103$). Nach drei Monaten zeigte sich ein weiterer Konzentrationsanstieg im Mittel auf 3,37 pg/ml mit einer großen Streubreite von 0 bis 25 pg/ml. Verglichen mit dem Ausgangswert ist auch diese Veränderung nicht signifikant ($p = 0,3109$).

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	19	19	19	19	19	19
Mittelwert	1,25	4,38	3,06	1,13	2,47	3,37
SD	2,07	5,07	6,20	2,22	4,85	6,33
Median	0	3,13	0,94	0	0,63	0
Minimum	0	0	0	0	0	0
Maximum	6,88	18,13	26,88	6,88	20	25

Tabelle 3.8: Anzahl der gemessenen Proben, Mittelwerte und Standardabweichung (SD), Median mit kleinstem und maximalstem Wert der IL-10-Konzentration (in pg/ml) im Serum von 19 Patienten zum Zeitpunkt 0 (Leerwert), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Bei dem Vergleich der Konzentration am fünften Tag nach Therapiebeginn, als die durchschnittliche Konzentration auf 1,13 pg/ml abgesunken war, mit der Konzentration von 3,37 pg/ml am Ende des Beobachtungszeitraums nach drei Monaten, zeigt sich mit einem p-Wert von 0,065, dass der Anstieg nur knapp nicht signifikant ist.

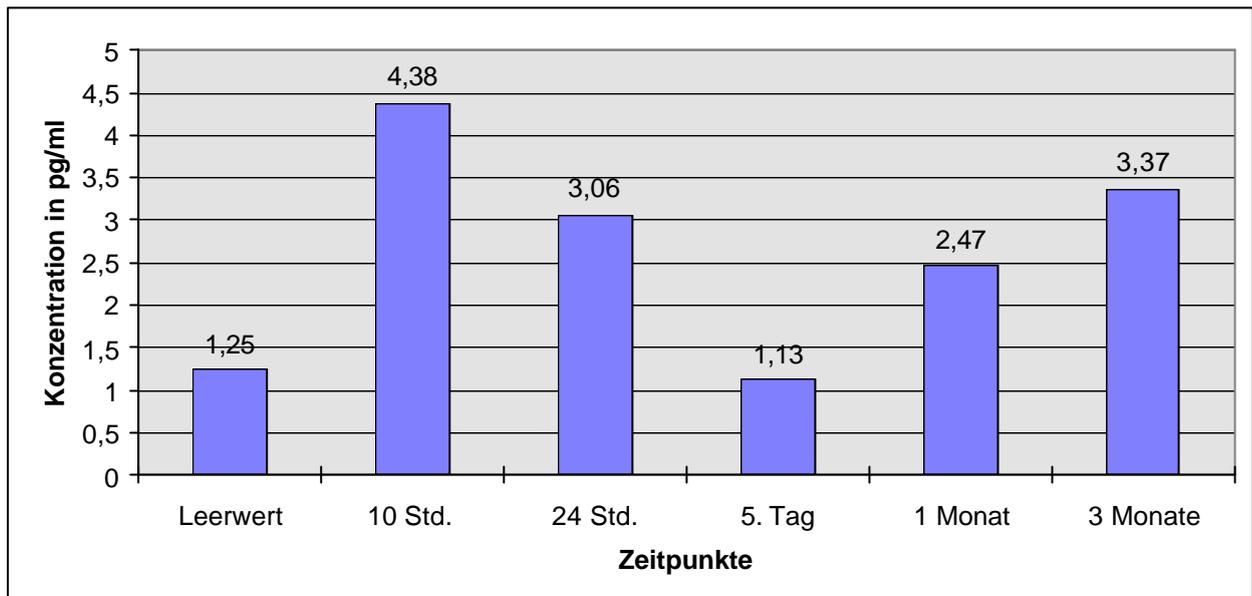


Abbildung 3.6: Mittelwerte der absoluten IL-10-Konzentration (in pg/ml) im Serum zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- Der Anstieg der IL-10-Konzentration am ersten Tag 10 Stunden nach Therapiebeginn war signifikant erhöht gegenüber dem Ausgangswert.
- Alle anderen Konzentrationswerte im weiteren Verlauf der Messungen unterlagen einer so großen Streuung, dass die Veränderungen im Vergleich zum Ausgangswert nicht signifikant sind.

3.2.9 Neopterin

Neopterin wurde bei 17 Patienten bestimmt und war in allen Serumproben nachweisbar.

Die Sensitivität des verwendeten ELItest® Neopterin der Firma Brahms wurde mit 2 nmol/l angegeben. Der Referenzwert im Serum, ermittelt aus einem Kollektiv von 345 gesunden Probanden lag bei $5,4 \pm 2,3$ nmol/l.

Die bei 17 MS-Patienten gemessene durchschnittliche Neopterin-Konzentration vor Beginn der IFN- β 1b-Therapie lag bei 5,85 nmol/l (SD = 0,89) mit einer Spannweite von 4,3 - 7,3 nmol/l. Nach der ersten IFN- β 1b-Injektion stieg die Konzentration nach

10 Stunden signifikant ($p = 0,007$) im Mittel auf 7,69 nmol/l, nach 24 Stunden hochsignifikant ($p = 0,0003$) auf durchschnittlich 14,04 nmol/l an. Am fünften Tag, 10 Stunden nach der dritten IFN- β 1b-Injektion sank die Konzentration durchschnittlich auf 11,46 nmol/l ab, lag damit aber mit einem p-Wert von 0,0004 immer noch hochsignifikant über der Ausgangskonzentration von 5,85 nmol/l. Nach einem Monat lag die durchschnittliche Konzentration bei 12,01 nmol/l und hatte sich nach drei Monaten auf durchschnittlich 10,61 nmol/l eingependelt. Beide Werte liegen deutlich signifikant über der Konzentration vor Therapiebeginn (zu beiden Zeitpunkten $p = 0,0003$).

Vergleicht man die Neopterin-Konzentration direkt nach der ersten Injektion mit der Konzentration am Ende des Meßzeitraums nach drei Monaten, so zeigt sich eine signifikante Erhöhung ($p = 0,0148$) von durchschnittlich 7,68 nmol/l auf 10,61 nmol/l.

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	17	17	17	17	17	17
Mittelwert	5,85	7,69	14,04	11,46	12,01	10,61
SD	0,89	2,63	3,90	2,91	4,30	2,49
Median	6,0	6,6	14,0	11,1	11,4	10,4
Minimum	4,3	5,2	7,1	6,5	7,3	5,0
Maximum	7,3	14,0	21,0	18,0	26,0	14,0

Tabelle 3.9: Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Median, minimaler und maximaler Wert der absoluten Neopterin-Konzentration (in nmol/l) im Serum zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem und nach drei Monaten

Zusammenfassung:

- Die Ausgangskonzentration von Neopterin lag mit 5,85 nmol/l signifikant über dem Referenzwert von $< 5,4$ nmol/l.
- Innerhalb der ersten 24 Stunden stieg die Neopterin-Konzentration hochsignifikant auf 14,04 nmol/l an.
- Die Konzentration sank im weiteren Verlauf zwar wieder ab, lag aber mit einer Konzentration von 10,61 nmol/l nach drei Monaten immer noch deutlich über der Ausgangskonzentration.

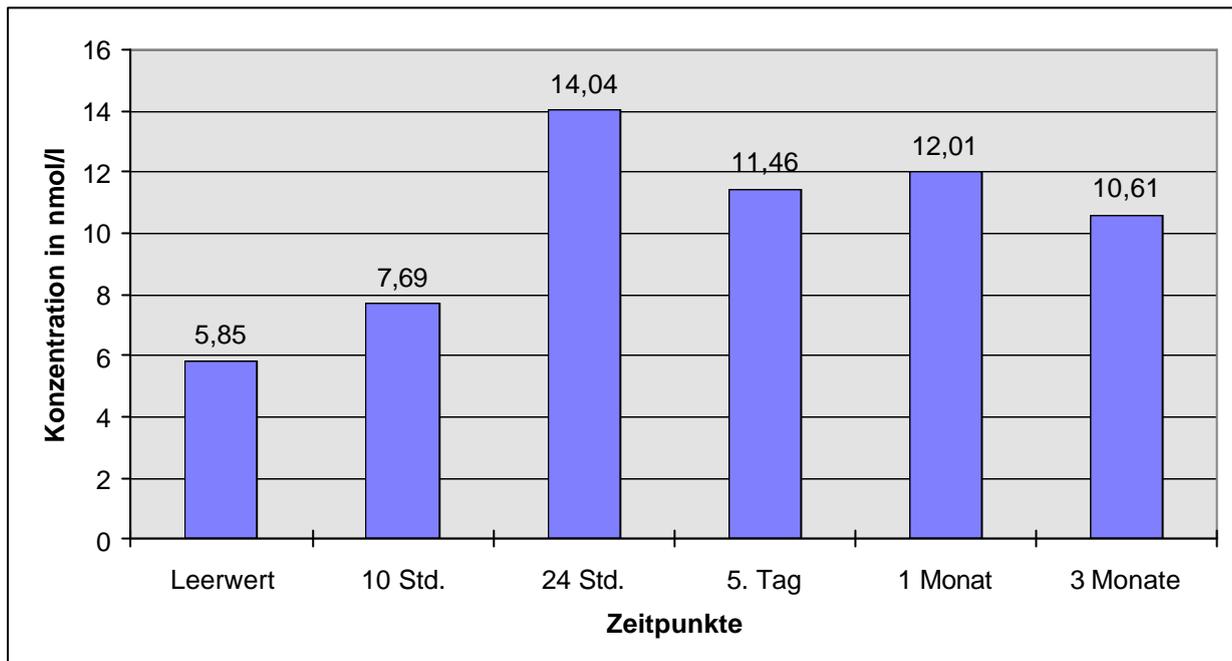


Abbildung 3.7: Mittelwerte der absoluten Neopterin-Konzentration (in nmol/l) im Serum zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am fünften Tag nach der dritten Injektion, nach einem Monat und nach drei Monaten

3.2.10 β 2-Mikroglobulin

β 2-Mikroglobulin wurde bei insgesamt 13 der Patienten bestimmt. Die Sensitivität des von Zentrallabor der Universitätsklinik Mainz verwendeten AxSym β 2-Mikroglobulin Assays der Firma Abbott lag bei 1,02 μ g/l. Als Referenzwert gilt die von der Firma Abbott angegebene Konzentration von 0,99 mg/l, die Standardabweichung liegt bei 0,16 mg/l.

β 2-Mikroglobulin war in allen Serumproben nachweisbar. Vor der Therapie mit IFN- β 1b lag die durchschnittliche β 2-Mikroglobulin-Konzentration bei 1,25 mg/l. 10 Stunden nach der ersten Injektion sank die Konzentration im Mittel auf 1,19 mg/l, stieg im weiteren Verlauf nach 24 Stunden jedoch wieder auf durchschnittlich 1,54 mg/l an. Beide Konzentrationsänderungen sind nicht signifikant ($p = 0,916$ bzw. $p = 0,091$). Am fünften Tag, 10 Stunden nach der dritten IFN- β 1b-Injektion stieg die durchschnittliche β 2-Mikroglobulin-Konzentration ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,66$) auf 1,42 mg/l an. Nach 1 Monat lag die Konzentration im Mittel bei 1,51 mg/l, nach

insgesamt drei Monaten bei durchschnittlich 1,37 mg/l. Keine der genannten Konzentrationsänderungen waren signifikant ($p = 0,09$ bzw. $p = 0,34$).

	Leerwert	10 Std.	24 Std.	5.Tag	1 Monat	3 Monate
Anzahl	13	13	13	13	13	13
Mittelwert	1,25	1,19	1,54	1,42	1,51	1,37
SD	0,34	0,11	0,33	0,26	0,40	0,30
Median	1,14	1,15	1,45	1,40	1,55	1,35
Minimum	0,85	1,04	1,18	0,88	0,98	0,65
Maximum	1,93	1,39	2,40	1,83	2,36	1,86

Tabelle 3.10: Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Median, minimaler und maximaler Wert der absoluten β 2-Mikroglobulin-Konzentration (in mg/l) im Serum zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am 5. Tag nach der 3. Injektion, nach 1 Monat und nach 3 Monaten

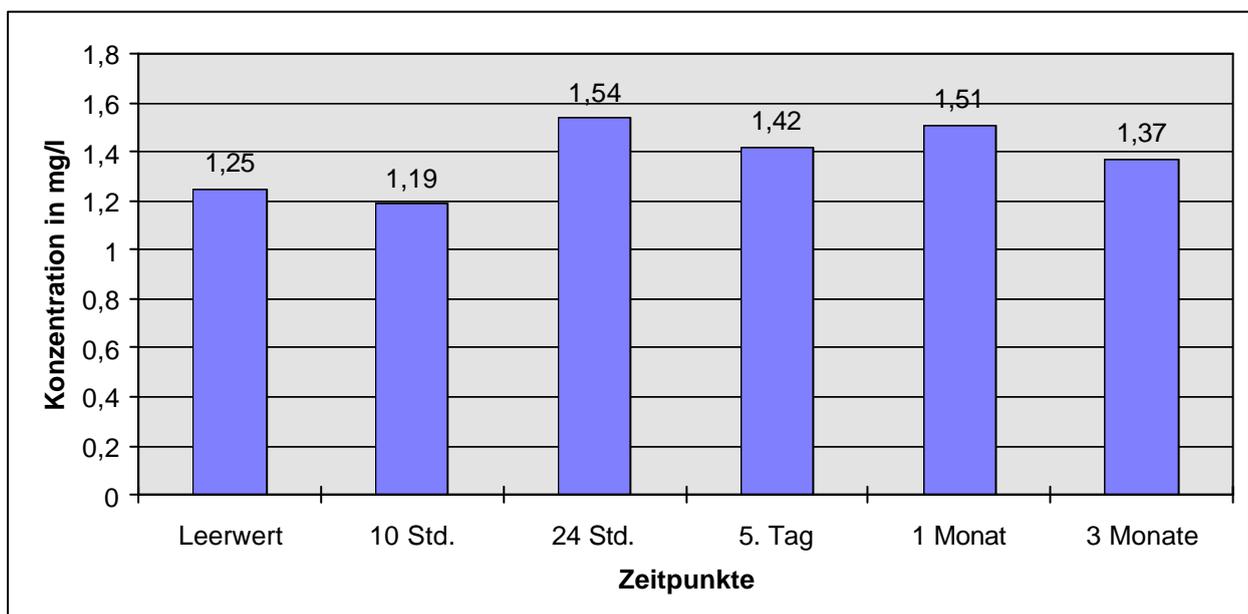


Abbildung 3.8: Mittelwerte der absoluten β 2-Mikroglobulin-Konzentration (in mg/l) im Serum zum Zeitpunkt 0 (vor der ersten Injektion), 10 und 24 Stunden nach der ersten Injektion, am 5. Tag nach der 3. Injektion, nach 1 Monat und nach 3 Monaten

Zusammenfassung:

- Keine der gemessenen Konzentrationsänderungen von β 2-Mikroglobulin unter der Therapie mit INF- β 1b war signifikant.
- Nach der ersten Injektion sank die β 2-Mikroglobulin-Konzentration zunächst ab, stieg mit 1,5 mg/l nach 24 Stunden auf den höchsten gemessenen durchschnittlichen Wert an, fiel am fünften Tag auf 1,42 mg/l ab, lag nach einem Monat bei durchschnittlich 1,51 mg/l und nach drei Monaten bei 1,31 mg/l.

4 Diskussion

4.1 Interferon- β 1b zur Therapie der Multiplen Sklerose

Die erste große Studie mit einem Beta-Interferon-Präparat zur Behandlung der Multiplen Sklerose wurde Anfang der neunziger Jahre in den USA und Kanada mit Interferon- β 1b (IFN- β 1b) durchgeführt und publiziert (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993). In dieser Studie wurde IFN- β 1b an 372 Patienten mit schubförmiger MS und leichter bis moderater Behinderung untersucht. Wichtigste Zielgrößen waren Schubfrequenz und Schweregrad der Schubsymptome sowie Progredienz der bleibenden neurologischen Ausfallserscheinungen.

Nach zwei Jahren Behandlungsdauer ergab sich eine signifikante Schubreduktion unter der höher dosierten IFN- β 1b-Behandlung (8 Mio. Einheiten) gegenüber Placebo von 33%. Darüber hinaus konnte die Anzahl schwerer Schübe um den Faktor 2 reduziert werden, und es waren nach zwei Jahren deutlich mehr Patienten in der Hochdosisgruppe schubfrei (31% versus 16%). Die Kaplan-Meier Analyse zeigte in der Hochdosisgruppe einen anhaltend günstigen Trend für die Verminderung einer Progression der Multiplen Sklerose. Nach fünf Jahren zeigte sich immer noch ein Nutzen der Therapie bezüglich der Schubrate, wobei der Unterschied zwischen Placebo- und Hochdosisgruppe nicht mehr signifikant war. Die Gesamtzahl der Entzündungsherde und die Zahl neuer Herde im ZNS, dokumentiert durch MRT-Untersuchungen, war in der Hochdosisgruppe auch nach 5 Jahren signifikant vermindert (IFNB-Multiple Sclerosis Study Group, 1995).

Obwohl die zitierte Studie einen eindeutigen Vorteil für Patienten mit schubförmig-remittierend verlaufender MS unter Behandlung mit IFN- β 1b zeigte, fehlt nach wie vor eine allgemein akzeptierte Erklärung für die Wirkungsweise der Therapie. Die Mehrzahl der ablaufenden Regulationsvorgänge wurde bisher *in vitro* beobachtet.

Auch der Effekt von IFN- β 1b auf die am Krankheitsverlauf der MS beteiligten Zytokine wurde bisher zum größten Teil nur *in vitro* nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurden acht Zytokine bzw. Zytokinrezeptoren und zusätzlich Neopterin und β 2-Mikroglobulin *in vivo* im Serum von MS-Patienten (n = 23) vor und unter der Therapie mit IFN β -1b über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten gemessen. Zusätzlich wurde der klinische Verlauf der Erkrankung und die auftretenden Nebenwirkungen beobachtet und in einzelnen Fällen mit der Konzentration der einzelnen Zytokine im Therapieverlauf korreliert.

4.2. Zytokine bei MS und unter Interferon- β 1b -Therapie

4.2.1 Tumornekrosefaktor -(TNF-) alpha:

Es werden zwei Typen von Tumornekrosefaktor unterschieden, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β). Beide Zytokine werden in enger Nachbarschaft zu dem HLA-Gen auf Chromosom 6 kodiert und binden an die gleichen TNF-Rezeptoren. Unterschiede bestehen in ihrer molekularen Regulation und ihrer biologischen Wirkung.

TNF- α wird vorwiegend von aktivierten Monozyten sezerniert, ferner von T- (besonders CD4+-) und B-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und auch ZNS-spezifischen Astrozyten und Mikrogliazellen. TNF- α konnte (in Astrozyten, Mikrogliazellen und Endothelzellen) in akuten und chronischen aktiven, nicht aber in inaktiven MS-Läsionen immunhistochemisch nachgewiesen werden (Selmaj et al., 1991a; Cannella B.C., Raine C.S., 1995). TNF- α wirkt über Bindung an den membranständigen TNF-Rezeptor. Im akuten Schub der MS befinden sich die T-Zellen im aktivierten Zustand. Da besonders auf aktivierten T-Zellen die TNF-Rezeptordichte erhöht ist, vermittelt TNF- α laut Vasalli et al., 1992 seine Wirkung besonders im akuten Schub.

TNF- α zeigt verschiedene Wirkungen: Durch vermehrte Induktion von Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM-1 (Barten, D.M., Ruddle, N.H., 1994) an der inneren Wand der Blutgefäße erleichtert es den Durchtritt von Leukozyten durch die Blut-Hirn-Schranke. TNF- α spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von HLA-

Klasse-II-Molekülen und Adhäsionsmolekülen auf Astrozyten (Cannella und Raine, 1989), die für die antigenspezifische Aktivierung von T-Lymphozyten notwendig sind. Neben diesen indirekten Effekten wirkt TNF- α auch direkt zytotoxisch durch Schädigung von Oligodendrozyten, was zu einer Demyelinisierung von Nervenfasern führen kann (Selmaj und Raine, 1988). Weiterhin fördert TNF- α die Proliferation von Astrozyten und kann somit zu der reaktiven Gliose beitragen, die für MS-Plaques typisch ist. In einer anderen Studie von Vartanian et al., 1995 konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden. Des Weiteren führt TNF- α zu einer Akkumulation von Entzündungszellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten, es bewirkt außerdem eine vermehrte Produktion von IL-1 und IL-6 (Zoja et al., 1991).

In verschiedenen Untersuchungen konnte eine erhöhte Konzentration von TNF- α im akuten Schub der MS nachgewiesen werden (Rieckmann et al., 1994; Spuler et al., 1996). Es ließ sich zeigen, daß die Höhe der Konzentration von TNF- α mit der Schwere und dem Fortschreiten der Krankheit korrelierten (Rieckmann et al., 1995).

Unter der Therapie mit IFN- β 1b zeigte sich in einer Studie von Brod et al., 1996 eine verminderte TNF- α -Bildung durch stimulierte Monozyten, dieses Ergebnis wurde von Coclet-Ninin et al. 1997 bestätigt. Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich eine Reduktion der TNF-Bildung (Kivisakk et al., 1997, Matusevicius et al., 1998).

Mittels des in der vorliegenden Arbeit verwendeten ELISA ließ sich der TNF- α in keinem Serum des Patientenkollektivs nachweisen, d.h. seine Konzentration lag unterhalb des bei dem hier benutzten ELISA der Firma R&D Systems Europe meßbaren Wertes von 4,4 pg/ml. Somit kann die durch die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse der oben zitierten Studien naheliegende Vermutung, dass IFN- β 1b seine Wirkung unter anderem über eine verminderte TNF- α -Bildung vermittelt, durch die *in vivo* Messungen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Dieses Ergebnis führt zu der Überlegung, ob es eine Rolle spielt, welche Nachweismethoden verwendet werden: Die oben zitierten Studienergebnisse wurden durch *in vitro* Messungen gewonnen. *In vivo* Messungen gestalten sich nach wie vor schwierig. Es wurden aber in den letzten Jahren ELISA mit hoher Sensitivität entwickelt, mit denen zunehmend auch der Nachweis geringerer Zytokinspiegel möglich wird. Es ist auch denkbar, dass Unterschiede in der Probenbehandlung (z.B. Aufbewahrung der

Proben bei unterschiedlichen Temperaturen) für die unterschiedlichen Ergebnisse mitverantwortlich sind. Nicoletti et al., 2001 diskutierten, dass Meßergebnisse möglicherweise dadurch verfälscht würden, dass statt des TNF- α lösliche TNF-Rezeptoren oder TNF-Antikörper an die wandgebundenen Antikörper des ELISA binden und das zumessende Zytokin demnach nicht erfaßt würde. Ebenfalls denkbar wäre, dass TNF- α an den löslichen Rezeptor statt an den Antikörper des ELISA bindet.

Angesichts der bekannten proinflammatorischen Wirkung von TNF- α in Zusammenhang mit der MS wurden mehrfach Ansätze zur Hemmung der TNF- α -Biosynthese bzw. der Hemmung seiner biologischen Wirkung unternommen (Andersen et al., 1993; Klinkert et al., 1997), wegen erheblicher Nebenwirkungen und technischer Probleme aber bisher nicht weiterverfolgt.

4.2.2 Löslicher Tumornekrosefaktor-Rezeptor (sTNF-R)

Lösliche Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (sTNF-R) sind zirkulierende, natürlich vorkommende Inhibitoren von TNF- α , die unter Stimulation von TNF-Ausschüttung durch *shedding* von membranständigen Rezeptoren abgestoßen werden. Sie existieren in zwei Formen, als löslicher TNF-R I (sTNF-R p55) mit einem Molekulargewicht von 55 Kilodalton (kDa) und als löslicher TNF-R II (sTNF-R p75) mit einem Molekulargewicht von 75 kDa. Beide Rezeptoren besitzen strukturelle Ähnlichkeiten, sie gehören zur TNF-Rezeptorfamilie. Beide Formen binden sowohl TNF- α als auch TNF- β *in vitro* und *in vivo* und hemmen deren biologische Aktivität kompetitiv durch Konkurrenz mit dem Membranrezeptor um freie Liganden auf den Zielzellen. Lösliche TNF-Rezeptoren sind im Urin und Serum von gesunden Individuen nachweisbar. Individuelle Unterschiede sind beträchtlich, scheinen aber bei ein und demselben Individuum über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr konstant zu sein.

Die physiologische Rolle des sTNF-R ist zu großen Teilen noch nicht geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass der sTNF-R im Tiermodell die Entstehung von bzw. die Demyelinisierung bei der EAE verhindern kann (Stoll et al., 1993, Selmaj et al., 1995).

Bei Patienten mit MS konnten erhöhte Konzentrationen von sTNF-R sowohl im Serum als auch im Liquor nachgewiesen werden, besonders bei Patienten zwischen

zwei Schüben der schubförmig-remittierenden Form der MS. Die höchsten Konzentrationen wurden vier Wochen nach einem Schub gemessen, was zu der Vermutung führte, dass es eine negative Korrelation zwischen sTNF-R-Bildung und Krankheitsaktivität gibt (Puccini-Sohler et al., 1995; Spuler et al., 1996; Bongianni et al., 1997). In einer anderen Studie hingegen fand sich eine vermehrte Expression von sTNF-R-mRNA sechs Wochen vor klinischer und im MRT dokumentierter Krankheitsaktivität (Martino et al., 1997).

Bei einer Untersuchung des Konzentrationsverhaltens von sTNF-R I und II unter IFN- β 1a *in vivo* wurde sowohl kurz- als auch langfristig ein signifikanter Konzentrationsanstieg beider löslicher Rezeptoren über einen Meßzeitraum von 12 Monaten beobachtet (Perini et al., 2000). Bei Ossege et al., 1998 konnte unter der Therapie mit IFN- β 1b *in vitro* eine kurzfristig vermehrte sTNF-R-mRNA-Bildung durch stimulierte Monozyten nachgewiesen werden, langfristig (nach sechs Monaten) fiel die sTNF-R-mRNA-Konzentration auf den Ausgangswert ab; bei der *in vivo* Messung der sTNF-R-Konzentration im Serum konnte ein Anstieg nur während der ersten 24 Stunden dokumentiert werden, danach war keine Änderung zum Ausgangswert meßbar. Die untersuchten Patienten befanden sich alle im Schubintervall. Coclet-Ninin et al., 1997 untersuchten *in vitro* die Wirkung von IFN- β 1b auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β und TNF- α sowie ihrer Inhibitoren IL-1ra und sTNF-R durch stimulierte Monozyten. In dieser Studie stellte sich ein Anstieg der TNF- α -Konzentration ein. Die Konzentration von sTNF-R jedoch blieb unbeeinflusst. Laske et al., 2001 untersuchten die sTNF-R-Konzentration unter IFN- β 1b-Therapie in Korrelation zum klinischen Verlauf und zu der MRT-Aktivität. Als sogenannte „MRT-Responder“ wurden die Patienten bezeichnet, bei denen es in den ersten 12 Monaten der Therapie zu einer signifikanten Abnahme der mittels MRT meßbaren zerebralen Krankheitsaktivität kam. Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Konzentrationsanstieg von sTNF-R I und II innerhalb des Meßzeitraums von 15 Monaten. Bei den MRT-Respondern wurden höhere Konzentrationen gemessen als bei den MRT-Nonrespondern. Desweiteren wurde bei Patienten mit niedriger Schubrate (0-1 Schub/ 15 Monate) ebenfalls eine höhere Konzentration gemessen als bei Patienten mit mehr als einem Schub in diesem Zeitraum. Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem sTNF-R-Konzentrationsanstieg und einem Therapieerfolg. In dieser

Studie wurden sTNF-R-Messungen nur alle drei Monate durchgeführt, die signifikante, im MRT nachweisbare Abnahme der zerebralen Veränderungen ließ sich jedoch bereits im Verlauf der ersten drei Monate nachweisen. Die Bestimmung von sTNF-R in den ersten drei Monaten könnte möglicherweise eine Aussage über das Ansprechen bestimmter Patienten auf die Therapie erlauben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der soluble TNF-Rezeptor Typ II (sTNF-R II) unter der Therapie mit IFN- β 1b bestimmt. Er war in allen Serumproben nachweisbar. Die sTNF-RII-Konzentration lag zu jedem der Meßzeitpunkte unterhalb des von der Herstellerfirma des verwendeten ELISA angegebenen Referenzwertes. Zusammenfassend stieg die sTNF-RII-Konzentration innerhalb der ersten 24 Stunden stetig signifikant an, sank bis zum fünften Tag wieder ab, lag aber langfristig bei den Messungen nach einem bzw. drei Monaten hochsignifikant ($p = 0,0047$ bzw. $0,007$) über dem Ausgangswert vor Therapiebeginn.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen unter IFN- β 1b einen signifikanten Anstieg von sTNF-R II. Da der sTNF-R II, wie bereits erwähnt, die proinflammatorische Wirkung des Zytokins TNF- α antagonisiert, könnte innerhalb des komplexen Zytokinnetzwerks der Konzentrationsanstieg von sTNF-R II unter INF- β 1b eine mögliche Erklärung für die Wirksamkeit der IFN- β 1b -Therapie sein.

Wie es zu der Induktion von sTNF-R II durch IFN- β 1b kommt, ist unklar. Eine denkbare Erklärung ist eine indirekte Wirkung über IL-10. Unter IFN- β 1b kommt es zu einem Konzentrationsanstieg von IL-10. Dickensheets et al., 1997 konnten zeigen, dass IL-10 wiederum die Expression von TNF-R II auf der Zelloberfläche von Monozyten bewirkt. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre die direkte Beeinflussung von IFN- β 1b auf die intrazelluläre Genexpression von sTNF-R II verbunden mit sekundär vermehrtem *shedding* dieser Rezeptoren von der Zelloberfläche. In Bezug auf die Studie von Laske et al., 2001 läßt sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen dem klinischen Verlauf der Patienten unter der Therapie und der sTNF-R II-Konzentration finden, so dass sich der sTNF-R II nach diesem Ergebnissen nicht als Surrogatparameter eignet.

4.2.3 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von 26 kDa. Es wird vor allem von aktivierten Monozyten und Makrophagen, T- und B-Lymphozyten als Antwort auf IL-1 und TNF- α synthetisiert, aber auch von Astrozyten und Gliazellen (Thomson et al., 1994). Der Rezeptor für IL-6 besteht aus einem 60 kDa-Bindungsprotein (gp 60) und einer 130 kDa-Untereinheit (gp 130), über die das Signal weitergeleitet wird. Die Zusammenlagerung von gp 130 durch die Interaktion mit Zytokinen und spezifischen Bindungsproteinen ist wahrscheinlich notwendig für das Zustandekommen eines Signals. Sezernierte lösliche IL-6 Rezeptoren können ebenfalls IL-6 binden und Signale über gp130 weiterleiten.

IL-6 hat ein weites Wirkungsspektrum. Neben vielen Wachstums- und Steuerfunktionen hat IL-6 Auswirkungen auf die Stimulation von B-Lymphozyten und damit auf die Differenzierung in antikörperbildende (IgG-bildende) Plasmazellen sowie Auswirkungen auf die Induktion von Akute-Phase-Proteine. Es stellt mit TNF- α zusammen das am weitesten verbreitete und potenteste proinflammatorische Zytokin dar. Im Widerspruch dazu konnte eine mögliche antiinflammatorische Wirkung von IL-6 sowohl durch Hemmung von TNF- α und IL-1 β als auch durch die Induktion des antiinflammatorisch wirksamen IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) nachgewiesen werden (Tilg et al., 1994). Die durch Frei et al., 1989 nachgewiesene intrathekale IL-6-Produktion bei akuter Meningoenzephalitis zeigte in der Hinsicht einen hoffnungsvollen Therapieansatz: Unter IL-6-Wirkung kam es zu einer vermehrten Bildung von antiviralen Antikörpern und einer verbesserten neuronalen Wiederherstellung.

Die Rolle von IL-6 für die Pathogenese der MS ist nicht vollständig geklärt. IL-6 konnte in akuten und chronischen MS-Läsionen nachgewiesen werden, hauptsächlich assoziiert mit Astrozyten, weniger mit Monozyten oder Makrophagen (Maimone et al., 1997). In zahlreichen Studien ist eine erhöhte Konzentration von IL-6 nachgewiesen worden:

- Sowohl im Plasma als auch im Liquor (Maimone et al., 1993) von MS-Patienten konnten vor allem während eines Schubs erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen werden (Stelmasiak et al., 2001).

- Auch bei Patienten mit chronisch-progressiv verlaufender MS wurden in Kulturen von unstimulierten Monozyten (PBMN) erhöhte IL-6-Konzentrationen nachgewiesen (Maimone et al. 1993).
- Bei durch Con A stimulierten Monozyten zeigte sich *in vitro* während und nach einem Schub eine vermehrte Bildung von IL-6 (Schluep et al., 1998).

Die vermehrte systemische und intrathekale IL-6-Produktion ist vereinbar mit der bei MS-Patienten auftretenden B-Zell-Überaktivität und führt zu einer gesteigerten B-Zelldifferenzierung in Plasmazellen, die vermehrt gewebss destruierende Autoantikörper bilden. Interessanterweise konnte in MS-Modellen, wie oben angedeutet, aber auch eine andere Wirkung von IL-6 aufgezeigt werden: Bei durch „Theilers murines Encephalitis-Virus“ induzierter MS führte die Gabe von rhIL-6 zu einer deutlichen Verminderung sowohl der Entzündung als auch der Demyelinisierung im Rückenmark (Rodriguez et al., 1994). Auch im EAE-Modell kam es nach Gabe von IL-6 zu einer Verlangsamung der Entmarkungsprogression (Willenbourg et al., 1995).

Erst in jüngster Zeit beschäftigten sich Studien mit dem Verhalten von IL-6 bei MS-Patienten unter der Therapie mit IFN- β 1b. Es konnte wiederholt ein signifikanter Konzentrationsanstieg von IL-6 im Serum und Liquor von MS-Patienten unter IFN- β 1b nachgewiesen werden (Özenci et al., 2000). Langfristig entsprach die IL-6-Konzentration unter IFN- β 1b allerdings den Werten vor Therapiebeginn (Brod et al., 1997). Brod et al., 1996 sowie Montalban et al., 2000 sahen diesen durch stimulierte T-Lymphozyten *in vitro* hervorgerufenen vor allem initialen IL-6-Konzentrationsanstieg im Zusammenhang mit den sogenannten grippeähnlichen Symptomen zu Beginn der Therapie und darin einen möglichen negativen Einfluß auf die antiinflammatorische Wirkung von IFN- β 1b. Da jedoch auch gezeigt wurde, dass IL-6 die Bildung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β stimuliert (Rincon et al., 1997, Daftarian et al., 1996), wird andererseits auch ein Beitrag des IL-6 zur antiinflammatorischen Wirkung von IFN- β 1b diskutiert (Nicoletti et al., 2000). 1997 untersuchten Kivisakk et al., inwiefern die *in vitro* mRNA-Expression verschiedener Zytokine durch IFN- β 1b beeinflusst wird: Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der IL-6-mRNA-Expression.

In der vorliegenden Studie wurden bereits vor Therapiebeginn signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen gemessen. Diese Ergebnisse decken sich mit den u.a. von

Stelmasiak et al., 2000 gewonnenen Erkenntnissen, dass bei MS-Patienten die IL-6-Konzentration erhöht ist. Einschränkend muß erwähnt werden, dass die IL-6-Konzentration vor Therapiebeginn bei 83,3% der Patienten unterhalb der Nachweisgrenze des hier verwendeten ELISA lag. Zeitgleich zum initialen IL-6-Konzentrationsanstieg kam es bei 77,7% der Patienten zu Therapie-Nebenwirkungen (in Form von grippeähnlichen Symptomen), die ähnlich wie die IL-6 Konzentration im weiteren Verlauf - mit wenigen Ausnahmen - abklagen. Das Ausmaß der Nebenwirkungen korreliert mit dem Anstieg der IL-6-Konzentration, was die Ergebnisse von Brod et al., 1996 bestätigt. Kurz nach Beginn der Therapie stieg die IL-6-Konzentration bei allen Patienten hochsignifikant an, sank im weiteren Verlauf jedoch deutlich ab und lag nach drei Monaten mit einer durchschnittlichen Konzentration von 5,16 pg/ml nicht signifikant oberhalb des Ausgangswertes vor Therapiebeginn. Wie auch bei Brod et al., 1997 konnte in der vorliegenden Arbeit keine langfristig signifikante Konzentrationsänderung von IL-6 unter der Therapie mit IFN- β 1b nachgewiesen werden.

Bei drei der Patienten war die IL-6-Konzentration bereits vor Therapiebeginn signifikant erhöht und stieg auch beim nächsten Meßzeitpunkt deutlich stärker an als bei den anderen Patienten. Aufgrund des aus diesen ersten Berechnungen des Mittelwertes vermuteten langfristigen Konzentrationsanstiegs des IL-6 bei diesen Patienten unter IFN- β 1b-Therapie wurde stichprobenweise bei einem Viertel der Patienten die IL-6-Konzentration auch nach sechs Monaten untersucht. Vergleicht man jedoch die IL-6-Konzentration zu diesem Zeitpunkt mit dem Ausgangswert vor Therapiebeginn, ergibt sich auch nach 6 Monaten kein signifikanter Konzentrationsanstieg. Die oben erwähnte erhöhte IL-6-Ausgangskonzentration von drei Patienten korreliert jedoch mit dem Ausmaß der Therapie-Nebenwirkungen. Dieses Ergebnis erhärtet die Vermutung, daß IL-6 durch sein proinflammatorisches Potential für die initialen Therapie-Nebenwirkungen verantwortlich ist.

Ob generell vor Therapiebeginn die Bestimmung von IL-6 als Surrogatparameter sinnvoll ist, müssen zukünftige Studien mit einem größeren Patientenkollektiv zeigen. Zu bedenken bleibt jedoch, daß IL-6 durch sein weites Wirkungsspektrum auch von zahlreichen anderen Vorgängen im Körper beeinflusst werden kann, so daß die Interpretation von Konzentrationsschwankungen schwierig bleibt.

4.2.4 Löslicher Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R)

Der lösliche Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R) hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Er entsteht entweder durch alternatives *splicing* oder durch *shedding*. Das IL-6-Rezeptor-System besteht aus zwei Membranproteinen, einem Liganden bindenden Rezeptor (gp80) und einem nicht bindenden Glykoprotein (gp130). Bindet der Ligand IL-6 an gp80, kommt es zu einer Konformationsänderung und zu einer Assoziation zwischen gp80 und gp130, wobei gp130 dimerisiert wird und das biologische Signal auslöst. IL-6 wird dabei im Zellinneren rasch abgebaut. Dieser als *internalization* bezeichnete Vorgang geht mit einer Reduktion der Oberflächenrezeptoren einher. Eine solche negative Regulation (*down-regulating*) des IL-6R durch seinen Liganden schützt wahrscheinlich den Organismus vor Überstimulation. Der universelle Signaltransducer gp130, der auch von anderen Mediatoren wie z.B. vom Leukämie inhibierenden Faktor (LIF) benutzt wird, liegt im extrazellulären Rezeptoranteil. Daher ist auch die lösliche Form des IL-6-Rezeptors nach Bindung an IL-6 in der Lage, als Ligand-Rezeptorkomplex mit gp130 zu reagieren und Zielzellen entsprechend zu aktivieren. Dieses Funktionsprinzip erklärt, warum Zellen von IL-6 aktiviert werden, die selbst kein IL-6 binden können, sondern nur gp130 an ihrer Oberfläche tragen - sie werden auch ohne membranständigen IL-6-Rezeptor sensitiv für dieses Zytokin (Hirota et al., 1996).

Der lösliche IL-6-Rezeptor fungiert im Gegensatz zu anderen Zytokinrezeptoren mit seinem Liganden als Agonist (Hibi et al., 1990). Der Komplex aus IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor (sIL-6R) kann seinen Zielzellen auch weiterhin Signale übermitteln. Neben der membranverankerten Form von gp130 sind auch lösliche Varianten beschrieben (Hibi et al., 1996). Bei Anwesenheit entsprechender Mengen der löslichen Form des Signaltransducers gp130 (sgp130) führt die Assoziation von IL-6 mit gp130 zur negativen Regulation der Ligandenwirkung auf die Zielzellen (Müller-Neven et al., 1998).

Padberg et al., 1999 fanden bei MS-Patienten im Serum eine signifikant erhöhte sIL-6R-Konzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, Stelmasiak et al., 2001 konnten dieses Ergebnis bestätigen und untersuchten die erhöhte sIL-6R-Konzentration in Korrelation zur EDSS-Skala: Die sIL-6R-Konzentration bei Patienten mit einem EDSS-Score > 5 war dreifach erhöht gegenüber Patienten mit einem EDSS-Score < 3.

In der vorliegenden Arbeit entsprach die Konzentration des sIL-6R vor Therapiebeginn mit IFN- β 1b mit durchschnittlich 33,43 ng/ml der in den oben zitierten Studien genannten sIL-6R-Konzentration von MS-Patienten unabhängig von der Krankheitsaktivität. Im Verlauf der IFN- β 1b-Therapie konnte keine signifikante Konzentrationsänderung gemessen werden, die sIL-6R-Konzentration schwankte zwischen 30 und 34 ng/ml. Diese Ergebnisse decken sich mit den Messungen von Bongioanni et al., 2000, die die Konzentration von sIL-6R unter IFN- β 1b bei Patienten mit klinisch stabiler MS über einen Zeitraum von 9 Monaten untersuchten. Zur Beurteilung bzw. Interpretation dieser Ergebnisse jedoch fehlen weitere Vergleichsdaten über das Verhalten von sIL-6R unter der Therapie mit IFN- β 1b an einem größeren Kollektiv MS-kranker Patienten.

Des Weiteren lässt sich die Frage nach der Bedeutung der in der Literatur beschriebenen Konzentrationserhöhung des sIL-6R in Bezug auf die Pathogenese der MS aufgrund der pleiotropen Wirkung von IL-6 noch nicht eindeutig beantworten.

4.2.5 Löslicher Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R)

Interleukin-2 (IL-2= T-Zell-Wachstumsfaktor), ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von 14-16 kDa, wird von T-Zellen produziert. IL-2 spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation von T- und B-Zell-abhängigen immunologischen Vorgängen. T-Helferzellen erkennen mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors Antigene und HLA-Klasse-II-Antigene, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen angeboten werden. Auf diese Weise werden T-Helferzellen aktiviert und empfänglich für das gleichzeitig von antigenpräsentierenden Zellen gebildete IL-1. Es folgt eine Differenzierung der T-Helferzellen in IL-2- und IFN- γ produzierende und - nach Ausbildung des Rezeptors für IL-2 - in IL-2 reaktive T-Zellen. IL-2 fördert die Expression von IL-2-Rezeptoren auf aktivierten T-Zellen, die Proliferation von aktivierten T-Helferzellen sowie von B- und NK-Zellen und induziert die Produktion von IL-1, TNF und IFN- γ . Durch die beschriebene Wirkung von IL-2 auf T- und B-Zellaktivierung lässt sich im Rahmen der Pathogenese der MS eine proinflammatorische Wirkung ableiten. IL-2 positive Zellen sind immunhistochemisch in den MS-Plaques nachweisbar (Hofman et al., 1986).

Der lösliche IL-2 Rezeptor (sIL-2R) hat ein Molekulargewicht von 42 kDa. Er wird wie das Zytokin IL-2 von Monozyten und aktivierten T-Zellen gebildet und abgegeben. sIL-2R fängt IL-2 vor seiner Bindung am zellständigen IL-2-Rezeptor ab und verhindert somit die Aktivierung der T-Zellen, er ist also ein Negativregulator des IL-2 (Rudick et al., 1986) und verhindert somit eine Überstimulation.

Die Bedeutung von IL-2 und sIL-2R für die Pathogenese der MS und das Verhalten der beiden Parameter im Serum und Liquor von MS-Patienten mit und ohne IFN-beta-1b-Therapie ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden. Die Studien erbrachten widersprüchliche Ergebnisse (Sivieri et al., 1998).

Bei Untersuchungen von MS-Patienten, bei denen die Diagnose neu gestellt wurde, und die noch in keine immunsuppressive Therapiestudie miteinbezogen waren, zeigte sich bei Musette et al., 1996 mittels PCR-Messung eine deutlich reduzierte IL-2-mRNA-Expression. Eine andere Studie untersuchte *in vitro* die IL-2-Produktion durch stimulierte periphere Monozyten (PMC) bei MS-Patienten sowohl im als auch außerhalb des akuten Schubs: In beiden Gruppen war die IL-2-Bildung vermindert (Wandinger et al., 1997), was die von Freedman et al. bereits 1992 *in vivo* gemessenen Ergebnisse bestätigte. Aber auch erhöhte Konzentrationen von IL-2 wurden nachgewiesen: IL-2 war nach den Ergebnissen aus der Studie von Selleberg et al., 1997 im Liquor von MS-Patienten signifikant erhöht.

Die unterschiedlichen Studienergebnisse lassen sich unter anderem auf verschiedene diagnostische Methoden zurückführen. So wurden z. B. ELISA-Kits mit unterschiedlicher Sensitivität verwendet (Ott et al., 1993, Gallo et al., 1991). Des Weiteren wurden erhöhte IL-2-Konzentrationen häufig bei MS-Patienten mit chronisch-progressiven Verlauf gemessen, so dass entsprechende Ergebnisse in Studien mit MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem Verlauf dahingehend interpretiert wurden, dass es sich um Patienten mit langfristig progressiverem Verlauf handeln könnte (Trotter et al., 1990).

Unter der Therapie von IFN- β 1b wurde *in vitro* eine vermehrte IL-2-Produktion gemessen (Arnason, 1996, Rep et al., 1996, Brod et al., 1996). Rep et al., 1999 fanden dagegen eine verminderte Konzentration von IL-2-produzierenden CD8+-T-Zellen unter IFN- β 1b-Therapie (Messung mittels Flowzytometrie).

Über das Verhalten von sIL-2R bei MS liegen weniger Daten vor. Die Datenlage ist jedoch einheitlicher als bei IL-2: In verschiedenen Studien zeigte sich wiederholt eine erhöhte Konzentration von sIL-2R im Serum von MS-Patienten, besonders im und kurz nach einem Schub (Sivieri et al., 1998) sowie im Vergleich zu gesunden Probanden (Freedman et al., 1992). Die sIL-2R-Konzentration außerhalb eines Schubs (Sharief et al., 1993) war jedoch nicht erhöht. Möglicherweise ist dieser Konzentrationsanstieg von sIL-2R als Gegenregulation des Immunsystems gegen die ablaufende Entzündungsreaktion während des MS-Schubs zu verstehen.

Aufgrund der mutmaßlichen Beziehung des sIL-2R zu der Krankheitsaktivität bei MS wurde wiederholt über die Bedeutung des sIL-2R als Surrogatparameter für Krankheitsaktivität oder -progression spekuliert. Da jedoch die sIL-2R-Konzentration starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterliegt und die bisherigen Studienergebnisse nur aus einer kleinen Gruppe von Patienten und von einem einzelnen Meßzeitpunkt stammen, werden von Sivieri et al., 1998 weitere Studien an einem größeren Patientenkollektiv gefordert, um zuverlässigere Aussagen darüber machen zu können. Ott et al., 1993 und Shaw et al., 1995 konnten bei der Untersuchung von IL-2 und sIL-2R im Serum und im Liquor von MS-Patienten keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe nachweisen.

Ferrarini et al., 1998 untersuchten die sIL-2R-Konzentration unter IFN- β 1b-Therapie über einen Zeitraum von 12 Monaten: Es kam zu einem geringgradigen Konzentrationsanstieg, der zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

In der vorliegenden Arbeit war sIL-2R in allen Serumproben nachweisbar. Über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg überschritten die gemessenen Konzentrationen nicht den Referenzwert. Innerhalb der ersten 24 Stunden schwankten die durchschnittlichen Konzentrationen nicht signifikant. Erst im weiteren Verlauf stieg die Ausgangskonzentration zunächst signifikant, langfristig sogar hochsignifikant an. Das bedeutet, dass es hier unter der Therapie mit IFN- β 1b zu einer vermehrten Bildung von sIL-2R kommt, jedoch nicht über die physiologische sIL-2R-Konzentration hinaus. Dies könnte u.a. bedeuten, dass durch die verminderte Schubfrequenz und -schwere unter IFN- β 1b eine vermehrte sIL-2R-Bildung nicht notwendig ist. Es wäre interessant zu untersuchen, wie sich die sIL-2R-Konzentration unter IFN- β 1b vor, während und nach einem Schub verhält.

4.2.6 Interleukin-1b (IL-1b)

IL-1 ist ein Zytokin mit einem Molekulargewicht von 17,5 kDa. Es liegt in wirkungsgleicher Alpha- und Beta-Form vor. IL-1 α und IL-1 β sind Spaltprodukte zellgebundener Vorläufer, die von verschiedenen auf Chromosom 2 lokalisierten Genen kodiert und anschließend prozessiert werden. Die biologisch inaktive IL-1 β -Proform wird durch das IL-1 β -Converting-enzyme (ICE) proteolytisch in das biologisch wirksame Zytokin IL-1 β gespalten. IL-1 wird von Makrophagen und Mikroglia produziert, nach neuesten Erkenntnissen aber nicht von Astrozyten (Liu et al., 1998). Es ist neben TNF eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine (Dinarello, 1991). Die biologischen Wirkungen von IL-1 beruhen vor allem auf der Induktion von Entzündungsmediatoren (z.B. Prostaglandin E₂, Kollagenase und Phospholipase A₂) und anderen Zytokinen (z.B. IL-6).

Für die Pathogenese der MS ist insbesondere der Effekt von IL-1 auf die T-Zellen von Bedeutung. IL-1 induziert die IL-2-Sekretion sowie die Expression von IL-2-Rezeptoren auf T-Zellen und fördert somit die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen (Arai et al., 1990). IL-1 induziert Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen (Jiang et al. 1997), steigert die Permeabilität des Endothels und wirkt somit synergistisch zu TNF- α und IFN- γ bei der Adhäsion und Extravasation von aktivierten T-Zellen (McCarron et al., 1993). IL-1 wirkt auch direkt toxisch auf Myelin und Oligodendrozyten.

Zahlreiche Untersuchungen haben sich in den letzten Jahren mit der Rolle von IL-1 bei EAE und MS auseinandergesetzt. Durch die Gabe eines löslichen IL-1-Rezeptors, der IL-1 bindet und damit eine IL-1-antagonistische Funktion besitzt, konnte die Symptomatik der EAE gemildert und die Krankheitsdauer verkürzt werden (Jakobs et al., 1991).

Bei der MS ist IL-1 in aktiven Plaques vorhanden, wie immunhistologisch (Hofman et al., 1986) und auf mRNA-Ebene mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) nachgewiesen werden konnte (Wucherpfennig et al., 1992). Widersprüchlich sind dagegen die Ergebnisse aus *in vivo* Studien über die spontane IL-1-Sekretion mononukleärer Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten. Während einige Studien über eine erhöhte Produktion von IL-1 α (Matsuda et al., 1991) bzw. IL-1 β (Hauser et al., 1990; Reder et al., 1998) bei MS-Patienten im akuten Schub berichteten, konnte

in anderen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied der IL-1-Produktion zwischen Schub und Remission festgestellt werden (Selmaj et al., 1988, Rieckmann et al., 1994). Bei Rudick u. Ransohoff, 1992 lagen die IL-1 β -Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze der Assays. Schließlich sei noch auf weitere zahlreiche Veröffentlichungen hingewiesen, die sich mit der Messung von IL-1 β in Serum/Liquor von MS-Patienten befaßten und ebenfalls zu teilweise gegensätzlichen Ergebnissen kamen (Tabelle 4.1).

Autoren	MS-Patienten Aktivität u. Verlaufsform				IL-1 β / Serum	IL-1 β / Liquor
	aktiv	stabil	CP	SR		
Hauser et al., 1991	X	X			n.b..	53 %/ 20 %
Peter et al., 1991			X		6 %	0 %
Trotter et al., 1991			X		39 %	n.b.
Tsukada et al., 1996			X	X	0 %	0 %
Weller et al., 1991			X	X	0 %	0 %
Nicoletti et al., 2000		X			0 %	n.b.

Tabelle 4.1: Nachweis von IL-1 β im Serum und Liquor von MS-Patienten in der Literatur: angegeben ist jeweils, in wieviel Prozent der untersuchten Proben IL-1 β im Serum bzw. Liquor nachgewiesen wurde (von jedem Patienten wurde nur eine Serum- und Liquorprobe analysiert). CP= Chronisch-progredient; SR= Schubförmig-remittierend, n.b.: nicht bestimmt

Über das Verhalten von IL-1 β unter IFN- β 1b-Therapie liegen bisher wenige widersprüchliche Daten vor. Bei der Untersuchung von Kulturen von humanen Mikrogliazellen und Astrozyten zeigte sich nach der Gabe von IFN- β 1b eine Suppression der IL-1-Expression (Liu, 1998). Bei Coclet-Ninin et al., 1997 und Jungo et al., 2001 fand sich nach Gabe von IFN- β 1b *in vitro* eine signifikant verminderte Produktion von IL-1 durch stimulierte Monozyten (PBMC). Nicoletti et al., 2000 konnten IL-1 β mittels ELISA nicht messen, weder während einer stabilen Phase der MS noch unter der Therapie mit IFN- β 1b.

In der vorliegenden Arbeit war IL-1 β zu keinem Zeitpunkt der Messungen nachweisbar, d.h. die gemessenen Konzentrationen lagen unterhalb des bei dem hier verwendeten ELISA meßbaren Wertes von <1 pg/ml. Ursächlich hierfür könnte sein, dass soluble IL-1-Rezeptoren oder Zytokin-Antikörper mit dem betreffenden IL-

IL-1 β interferieren und damit die Meßergebnisse beeinflussen (Bendtsen et al., 1994). Des Weiteren ist - ähnlich wie bei *in vivo* Messungen von TNF- α - zu überlegen, ob eine Änderung der Meßbedingungen (verbesserte Meßmethoden mit höherer Sensitivität) in Zukunft die Möglichkeiten zum Nachweis des IL-1 β (unter IFN- β 1b-Therapie) *in vivo* verbessern könnte, um die vorliegenden, durch *in vitro* Messungen gewonnenen Daten zu bestätigen und darüber hinaus exaktere Hinweise auf das Wirkprinzip von IFN- β 1b zu bekommen.

4.2.7 Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra)

Der Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) gehört zur IL-1-Familie. Die Aminosäuresequenz von IL-1ra ist mit IL-1 α zu 19% und mit IL-1 β zu 26% homolog (Arend, 1991). IL-1ra bindet an beiden IL-1-Rezeptoren mit derselben Affinität wie IL-1 selbst, ohne die normalerweise bei der Rezeptorbindung ablaufenden Prozesse der intrazellulären Signaltransduktion zu initiieren, d.h. es löst an der Zielzelle keine Wirkung aus (Eisenberg et al., 1990, Arend, 1991).

Diese Funktion wurde wiederholt in Studien am MS-Modell EAE *in vitro* und *in vivo* getestet (Martin et al., 1995): IL-1 induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Astrozyten und ermöglicht es somit proinflammatorischen Zytokinen, die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu passieren. Zudem induziert es die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- α im ZNS. Durch Applikation von rhIL-1ra *in vivo* kam es zu einer abgeschwächten perivaskulären Infiltration von Zellen in das ZNS (Hong et al., 1993). Auch die TNF- α -Produktion wurde vermindert (Everaerd et al., 1994). Damit ist IL-1ra das einzige derzeit bekannte Zytokin mit einer spezifischen Rezeptor-antagonistischen Funktion.

IL-1ra mit einem Molekulargewicht von 17,3 kDa kann eine intakte Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Ist diese Schranke zerstört, ermöglicht es auch IL-1ra den Durchtritt und es kann im ZNS seine IL-1-inhibitorische Wirkung vermitteln. Es gibt Anzeichen dafür, dass rhIL-1ra durch kompetitiven Antagonismus am IL-1-Transporter der Blut-Hirn-Schranke den aktiven Transport von radioaktivmarkiertem IL-1 in das ZNS blockiert (Banks et al., 1993). Diese Wirkung könnte die IL-1-

Konzentration von IL-1 im ZNS vermindern und somit die beginnende Entzündung im ZNS limitieren.

Um die Bedeutung des IL-1ra für den Verlauf der MS zu untersuchen, wurde die IL-1ra-Konzentration bei MS-Patienten im Serum bestimmt: Dabei zeigte sich eine erhöhte Konzentration des IL-1ra bei MS-Patienten im Schub, wohingegen die Konzentration in der Remissionsphase im Normbereich lag (Nicoletti et al., 1996). Wie es zu der vermehrten Produktion von IL-1ra im Schub kommt, ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die vermehrte IL-1ra-Bildung durch IL-1 selbst, aber auch durch andere Zytokine hervorgerufen wird.

Unter der Therapie mit IFN- β 1b zeigte sich ein signifikanter Anstieg der IL-1ra-Konzentration (Nicoletti et al., 1996, Coclet-Ninin et al., 1997), die Werte waren vergleichbar mit den Durchschnittswerten der MS-Patienten während eines Schubs. Bei der Untersuchung der Wirkung von IFN- β 1b auf Kulturen von Mikroglia und Astrozyten zeigte sich, dass IFN- β 1b die Bildung von IL-1ra durch Mikroglia induziert (Liu et al., 1998). Die IL-1-Bildung dagegen wurde unterdrückt, somit zeigt auch diese Studie, dass IFN- β 1b den IL-1ra:IL-1-Quotienten zu Gunsten von IL-1ra verschiebt.

Perini et al., 2000 untersuchten *in vivo* sowohl den kurz- als auch langfristigen Einfluß von IFN- β 1a auf die Konzentration von IL-1ra: Innerhalb der ersten 24 Stunden stieg die Konzentration signifikant auf das Vierfache an, sank aber innerhalb der nächsten drei Tage auf die Ausgangskonzentration ab. In den darauffolgenden 12 Monaten konnte weiterhin jeweils 24 Stunden nach der Injektion ein signifikanter Konzentrationsanstieg, 72 Stunden nach der letzten Injektion ein Konzentrationsabfall von IL-1ra gemessen werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, spielen genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS. Vielfach wurde für IL-1 bzw. IL-1ra eine bestimmte Allelkombination mit erhöhter Wahrscheinlichkeit, an MS zu erkranken bzw. mit der Schwere der Erkrankung in Verbindung gebracht. Schrijver et al., 1999 fanden heraus, dass die IL-1ra Allel 2+ / IL-1 β Allel 2-Kombination einen Einfluß auf die Stärke der Krankheitsaktivität hat. Demnach haben MS-Patienten mit dieser Allel-Kombination eine signifikant raschere Progression auf der EDSS-Skala. In einer Meta-Analyse (Feakes et al., 2000) der Studien der vergangenen Jahre konnte

jedoch keine Korrelation bestimmter Allel-Kombinationen mit der Schwere der Erkrankung gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit war IL-1ra in allen Serumproben zu allen Meßzeitpunkten (vor Therapiebeginn und unter der Therapie mit IFN- β 1b) nachweisbar und lag vor Beginn der Therapie innerhalb des vom ELISA-Hersteller angegebenen Referenzbereichs. Nach Beginn der Therapie kam es zunächst zu einem hochsignifikanten Konzentrationsanstieg von IL-1ra, im weiteren Verlauf sank die Konzentration ab, stieg aber bis zum fünften Therapietag wieder an und pendelte sich nach einem bzw. drei Monaten auf einem Niveau deutlich oberhalb des Ausgangswertes ein.

Dieser Konzentrationsanstieg von IL-1ra entspricht den bei Perini et al., 2000 gewonnenen Ergebnissen und könnte vor dem Hintergrund der bekannten antiinflammatorischen Wirkung von IL-1ra eine Erklärung für die immunmodulatorische Wirksamkeit von IFN- β 1b sein.

Des weiteren führt dieser Konzentrationsverlauf zu folgenden Überlegungen: Bei den in diese Studie eingeschlossenen MS-Patienten lag die IL-1ra-Konzentration vor Beginn der Therapie mit IFN- β 1b im Normbereich. Da zu den Einschlusskriterien der Studie Schubfreiheit gehörte, bestätigt dies die bereits durch die Arbeit von Nicoletti et al., 1996 gewonnenen Ergebnisse, laut der die IL-1ra-Konzentration bei MS-Patienten im Schub zwar erhöht ist, außerhalb des Schubs - wie bei den MS-Patienten hier - aber im Normbereich liegt.

In der vorliegenden Arbeit lag die IL-1ra-Konzentration unter IFN- β 1b zwar signifikant über dem Normbereich, erreichte aber nicht die von Nicoletti beschriebenen Konzentrationen. Bei Nicoletti entsprach die Konzentration von IL-1ra bei den Patienten, die mit IFN- β 1b behandelt wurden, zum Zeitpunkt sechs Monate nach Therapiebeginn der Konzentration bei Patienten im Schub (Exazerbations-Phase). Diese Korrelation wurde interpretiert als ein Zeichen dafür, dass „ exogen“ gegebenes IFN- β 1b durch die IL-1ra-Bildung den körpereigenen Abwehrmechanismus während des Schubes bei MS nachahmt. Da nun der progressive Verlauf der MS aber durch die physiologisch erhöhte IL-1ra-Konzentration während des Schubes nicht gestoppt wird, bleibt zu klären, inwiefern das durch IFN- β 1b gebildete IL-1ra zu den erwiesenen positiven Effekten des IFN- β 1b bei der MS beiträgt. Möglicherweise ist die erhöhte IL-1ra-Konzentration

während eines Schubes aber auch schon im Rahmen der Abwehrreaktion zu verstehen und limitiert den Schub dann.

4.2.8 Interleukin-(IL-) 10

Interleukin-10 (IL-10), der sogenannte Zytokinsynthese-Inhibitionsfaktor, ist ein 18 kDa Zytokin, das hauptsächlich vom TH2-Typ der CD4⁺ T-Helferzellen, aber auch von aktivierten B-Zellen und Makrophagen produziert wird. IL-10 hemmt die Produktion humaner T-Zellen und die Zytokinproduktion von Makrophagen, somit also die Bildung von IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ und TNF- α (Kazuyuki und Tosato, 1992). Des Weiteren bewirkt IL-10 eine verminderte Bildung von antigenpräsentierenden Zellen durch verminderte Expression von HLA-Klasse-II-Molekülen auf ihrer Oberfläche (De Waal et al., 1991; Del Prete et al., 1993). Es bewirkt eine Hemmung der T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion, d.h. es ist antiinflammatorisch wirksam (Abbas et al., 1994).

Da der Antigenpräsentation im ZNS eine große Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben wird, ist das Verhalten von IL-10 bei MS-Patienten sowohl in stabilen Phasen als auch im Schub häufig Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen. Am Modell der EAE konnte gezeigt werden, dass ein drastischer Anstieg der IL-10-mRNA und ein damit einhergehender Abfall der mRNA für IL-2, IL-6 und IFN- γ nachweisbar war (Kennedy et al., 1992). Ebenfalls im EAE-Modell kam es bei Mäusen, denen IL-10 fehlte, zu einem beschleunigten Verlauf der EAE. Die oft beschriebene Besserung der Symptome bei der EAE stellte sich bei diesen Mäusen nicht ein (Samoilova et al., 1998). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte Cannella et al., 1996, dass IL-10 auf den Verlauf der EAE bei Mäusen keinen positiven Einfluß hatte. Zu keinem Zeitpunkt der Studie wurde die EAE durch IL-10 verbessert.

Salmaggi et al., 1996 fanden bei MS-Patienten unabhängig von der Krankheitsaktivität eine geringere IL-10-Serumkonzentration als bei gesunden Probanden. Dieser Konzentrationsunterschied konnte von Özenci et al., 2000 und Nicoletti et al., 2000 nicht bestätigt werden. Bei Untersuchungen durch Rieckmann et al., 1994 sowie Cua et al., 2001 fand sich eine vermehrte IL-10-mRNA-Expression sowohl im Blut als auch im ZNS von MS-Patienten mit schubförmig-remittierendem

Verlauf während der stabilen Krankheitsphasen, wohingegen während eines Schubs die IL-10-Konzentration vermindert war (Ferrante et al., 1998, Schlupe et al., 1999). Bei Messungen von IL-10 im Liquor von MS-Patienten konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Carrieri et al., 1998).

Diese Ergebnisse führen zu der Überlegung, ob ein MS-Schub erst dann zustande kommen kann, wenn - aus nicht bekannten Gründen - die immunsuppressive Wirkung von IL-10 aufgrund seiner verminderten Konzentration nicht ausreicht. Ebenso wäre möglich, dass die gemessene verminderte IL-10-Konzentration durch einen erhöhten IL-10-Verbrauch im Schub zustande kommt (Salmaggi et al., 1996). Cua et al., 2001 interpretierten die erhöhte IL-10-Konzentration im Schubintervall als notwendig für die Stabilisierung oder als mögliche Prävention vor einem erneuten Schub.

Betrachtet man die bisherigen Erkenntnisse über die Funktion und Wirkung von IL-10 und die in der Einleitung diskutierte Wirkungsweise von IFN- β 1b, dann wäre unter der Therapie mit IFN- β 1b ein Anstieg von IL-10 zu erwarten. Bei Nicoletti et al., 2000 wurde der Verlauf der IL-10-Konzentration nur innerhalb der ersten 24 Stunden nach Therapiebeginn beobachtet: In diesem Zeitraum kam es zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg. Rep et al., 1999 untersuchten den IL-10-Plasmaspiegel einer Gruppe von MS-Patienten mit stabilem Krankheitsverlauf über sechs Monate. Nach einem Monat unter IFN- β 1b wurde ein signifikanter Konzentrationsanstieg gemessen, in den folgenden Monaten fiel die IL-10-Konzentration annähernd auf den Ausgangswert ab. In ebenfalls langfristiger angelegten Studien konnte gezeigt werden, dass es sowohl nach sechs als auch nach 12 Monaten IFN- β 1b-Therapie zu keiner signifikanten IL-10-Konzentrationsänderung kommt (Khademi et al., 2000, Gayo et al., 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten einen signifikanten Konzentrationsanstieg von IL-10 direkt nach Therapiebeginn. Die im Verlauf der Therapie gemessenen Konzentrationsänderungen unterlagen jedoch einer großen Streuung. Es zeigte sich ein deutlicher, aber nicht signifikanter Konzentrationsanstieg vom fünften Tag nach Therapiebeginn bis zum dritten Monat. Eine Tendenz der IL-10-Konzentrationsentwicklung für die folgenden Monate ist aus den Ergebnissen nicht abzulesen.

Im Zusammenhang mit den oben zitierten Studienergebnissen wäre demnach die Untersuchung der IL-10-Konzentration nach sechs oder auch 12 Monaten von großer Bedeutung. Die Wirksamkeit von IFN- β 1b bei der MS wird neben der Hemmung proinflammatorischer Zytokine in Verbindung gebracht mit der Initiierung bzw. Aufrechterhaltung immunsuppressiver Vorgänge durch Steigerung der Bildung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 durch TH2-Zellen oder Monozyten.

Zusammenfassend konnten die bisherigen Studienergebnisse den erwarteten Konzentrationsanstieg von IL-10 unter der Therapie von IFN- β 1b nicht bestätigen. Der positive Einfluß von IFN- β 1b auf den Verlauf der MS scheint demnach nicht durch eine langfristige positive Konzentrationsänderung von IL-10 hervorgerufen zu werden bzw. erklärt werden zu können. Andererseits ist sowohl durch IL-10 eine Suppression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α als auch ein hemmender Einfluß von IFN- β 1b auf IL-6 und TNF- α nachgewiesen worden. Neben der direkten Wirkung von IFN- β 1b auf die IL-6- und TNF- α -bildenden Zellen ist auch eine indirekte Wirkung über IL-10 denkbar, so dass sich die immunsuppressive Wirkung von IFN- β 1b nicht über eine meßbare Konzentrationsänderung von IL-10, sondern über die Veränderungen von IL-6 und TNF- α äußern könnte.

4.2.9 Neopterin

Neopterin ist ein niedermolekulares Abbauprodukt von Guanosintriphosphat (GTP), welches als energiereiche Verbindung in der Proteinbiosynthese und im Zuckerstoffwechsel eine Rolle spielt. Es kann in allen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit beträgt 90 Minuten.

Die biologische Bedeutung der Neopterin-Sekretion ist noch nicht vollständig geklärt, Neopterin gilt jedoch als empfindlicher Indikator für die Entstehung, Ausbreitung und Persistenz von Entzündungen im menschlichen Körper (Giovannoni et al., 1995) und damit verbunden für die Aktivierung des zellulären Immunsystems. Die Stimulierung von T-Lymphozyten führt zur Produktion von IFN- γ . Dieses bewirkt die Produktion und Freisetzung von Neopterin, und zwar hauptsächlich durch Makrophagen. Daher ist die Konzentration bei allen Erkrankungen erhöht, bei denen zelluläre Immunphänomene eine Rolle spielen. Neopterin hat gegenüber Zytokinen den

Vorteil, dass seine biologische Halbwertszeit nur über die renale Ausscheidung bestimmt wird, die Halbwertszeit und damit die labordiagnostische Zugänglichkeit von Zytokinen jedoch durch verschiedene komplexe, oben bereits beschriebene Vorgänge beeinflusst wird.

Neben anderen biologische Substanzen hat sich Neopterin als Marker für die Krankheitsaktivität bei der MS bewährt (Sørensen et al., 1999). Die Neopterin-Konzentration entsprach bei MS-Patienten zwischen zwei Schüben der von gesunden Probanden (Bansil et al., 1992), wohingegen die Neopterin-Konzentration im akuten Schub sowohl im Serum als auch im Liquor stark erhöht war (Fierz et al., 1987). Philippe et al., 1996 sahen eine signifikante Korrelation zwischen IFN- γ -Konzentration, dem Neopterin-Spiegel und dem Ausmaß von klinischen Symptomen im MS-Schub, und somit Neopterin als Surrogatparameter für erhöhte IFN- γ -Konzentration im Rahmen vermehrter entzündlicher Aktivität im MS-Schub. Eine andere Studie untersuchte MS-Patienten, die sich klinisch in Remission befanden, in der MRT-Untersuchung aber aktive entzündliche Läsionen zeigten (Shaw et al., 1995). Bei der Hälfte der Patienten zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Neopterin im Vergleich zu Kontrollpersonen. Diese Studie läßt die Vermutung zu, dass die Neopterin-Konzentration mit der vorhandenen Krankheitsaktivität von asymptomatischen MS-Patienten korreliert.

Laut Cirelli et al., 1996 spiegelt Neopterin die antiproliferative, antivirale und immunmodulatorische Wirkung von IFN- β wider. Bei der Untersuchung von Neopterin unter der Therapie mit IFN- β zeigte sich ein signifikanter Konzentrationsanstieg in den ersten 12 Stunden, der im gesamten Meßzeitraum (über sieben Tage) anhielt (Williams und Witt, 1998, Cook et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit kam es in den ersten 24 Stunden nach Therapiebeginn zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg von Neopterin. Im weiteren Verlauf kam es zu einem leichten Rückgang der Neopterin-Konzentration, die Werte lagen aber am Ende des Meßzeitraums nach 3 Monaten weiterhin signifikant über dem Ausgangswert.

In der Vergangenheit wurde mehrfach behauptet, dass Neopterin die biologische Aktivität von Interferonen widerspiegelt und somit als Verlaufskontrolle zur Optimierung der Therapie mit Interferonen herangezogen werden kann. Betrachtet

man den sowohl bei Cook et al., 2001 als auch in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Konzentrationsanstieg von Neopterin unter IFN- β -1b Therapie, spiegelt die Neopterin-Konzentration möglicherweise die anhaltende Wirkung von IFN- β 1b wider und könnte die bisherige Interpretation bestätigen. Es bleibt jedoch zu klären, ob in dem Zusammenhang routinemäßige Messungen von Neopterin im klinischen Alltag Anwendung finden.

Ob Neopterin jedoch als Surrogatparameter für akute entzündliche Läsionen im ZNS als Vorboten für einen MS-Schub dienen kann, ohne dass bereits klinische Symptome faßbar sind, bleibt offen, da erhöhte Werte auch bei anderen entzündlichen Vorgängen im ZNS gefunden wurden, Neopterin also nicht spezifisch für MS ist.

4.2.10 β 2-Mikroglobulin

β 2-Mikroglobulin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 11,8 kDa und einer Länge von 100 Aminosäuren. Interferone, auch β -Interferon, induzieren HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Antigene auf Astrozyten, Makrophagen und anderen Zellen. β 2-Mikroglobulin wurde als leichte Kette der HLA-Antigene identifiziert. Deshalb korreliert die Induktion von β 2-Mikroglobulin mit der Induktion von HLA-Antigenen der Klasse I und der Klasse II auf Monozyten. Die Expression der Antigene wird indirekt angezeigt durch die Erhöhung des β 2-Mikroglobulinspiegels. β 2-Mikroglobulin wird im Serum bestimmt.

β 2-Mikroglobulin gilt wie auch Neopterin im allgemeinen als empfindlicher Marker für das Vorhandensein von Interferon-Aktivität auf zellulärer Ebene des Organismus, also als Marker für entzündliche Vorgänge im Körper, bezogen auf MS auch als Marker für die Krankheitsaktivität. In einem Vergleich von Konzentrationen verschiedener Zytokine und sogenannter biologischer Marker wie Neopterin und β 2-Mikroglobulin bei MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen zeigte sich kein signifikanter Konzentrationsunterschied von β 2-Mikroglobulin (Ott et al., 1993). Bjerrum et al., 1988 fanden bei der Untersuchung von MS-Patienten eine Korrelation zwischen β 2-Mikroglobulin-Konzentration im Liquor und der Krankheitsaktivität.

Unter der Therapie mit IFN- β 1b kam es bei Liberati et al., 1994 zu einem β 2-Mikroglobulin-Konzentrationsanstieg nach 12 bis 24 Stunden, in den darauffolgenden Messungen wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht. In der Studie von Williams und Witt, 1998 stieg die Konzentration von β 2-Mikroglobulin im Serum unter der Therapie von IFN- β 1b in den ersten 12 Stunden signifikant an und blieb während des gesamten Meßzeitraums von sieben Tagen konstant auf diesem Niveau.

In der vorliegenden Arbeit stieg die β 2-Mikroglobulin-Konzentration nach Therapiebeginn mit IFN- β 1b innerhalb der ersten 24 Stunden zwar leicht an, die Konzentrationsveränderungen waren jedoch in diesem Zeitraum wie auch im weiteren Verlauf nicht signifikant, so dass die Ergebnisse der zitierten Studien hier nicht bestätigt werden konnten.

Auch bei β 2-Mikroglobulin als Marker für die biologische Aktivität von IFN- β 1b ist zu diskutieren, ob er sich als Surrogatparameter für das Ansprechen der IFN- β 1b-Therapie eignet. Generell liefert die Bestimmung von β 2-Mikroglobulin nur dann verwertbare Aussagen, wenn klinisch fest umrissene Fragestellungen bestehen und zuvor abgeklärt wurde, dass keine weitere Erkrankung besteht, die die Bildung und Ausscheidung von β 2-Mikroglobulin beeinflusst.

4.3 Methodische Probleme

Die immer wieder beobachteten widersprüchlichen Studienergebnisse können durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Zum einen gibt es bei den einzelnen Studien Unterschiede im Krankheitsverlauf (schubförmig-remittierend bzw. chronisch-progredient), in der Dauer der Erkrankung, der Behinderung der Patienten und der Krankheitsaktivität zum Zeitpunkt der Zytokinbestimmung. Zum anderen werden unterschiedliche Nachweismethoden eingesetzt, bei denen die Sensitivität stark variiert und Zytokinspiegel, die von einem RIA gemessen werden, höher liegen als die von einem ELISA gemessenen Werte. Es ist auch denkbar, dass Unterschiede in der Probenbehandlung (z.B. Aufbewahrung der Proben bei unterschiedlichen Temperaturen) für die differierenden Ergebnisse mitverantwortlich sind.

Weitere Ursache für Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen stehen in Zusammenhang mit den besonderen Eigenschaften der

Zytokine: Sie werden lokal sezerniert, an fixe oder lösliche Rezeptoren gebunden, schnell von umgebenden Zellen aufgenommen und verstoffwechselt und haben somit eine kurze Halbwertszeit. Außerdem verändern sich Zytokin-Konzentrationen interindividuell, in Abhängigkeit von Alter, körperlicher Fitness bzw. Aktivität, Ernährung und psychischen Einflüssen (Özenci et al., 2000).

Daraus ergeben sich zusammenfassend folgende Probleme bei der kausalen Interpretation von Ergebnissen: Monokausale Zusammenhänge zwischen zwei Zytokinkonzentrationen oder zwischen einer Medikamentengabe und der Veränderung einer Zytokinkonzentration lassen sich nur eingeschränkt aus dem komplexen interdependenten Zusammenhang isolieren bzw. isoliert betrachten.

5 Zusammenfassung

Die in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse über die Immunpathogenese der Multiplen Sklerose (MS) haben zur Entwicklung und zum Einsatz von Interferon- β 1a und Interferon- β 1b (IFN- β 1b) in der Therapie der MS geführt.

In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass IFN- β 1b die Frequenz und den Schweregrad von Schüben bei der MS signifikant reduziert sowie die durch MRT objektivierbare Krankheitsaktivität senkt. In welcher Weise aber die immunologischen Regulationsvorgänge durch die Gabe von IFN- β 1b moduliert werden, ist nach wie vor nicht genau bekannt. Zytokinen wird sowohl durch ihre proinflammatorische als auch antiinflammatorische Funktion eine Schlüsselrolle in der Immunpathogenese der MS zugesprochen.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, durch *in vivo*-Bestimmung von ausgewählten Zytokinen die bisher vorliegenden, meist *in vitro* gewonnenen Daten zu bestätigen und weitere Hinweise über den Wirkmechanismus von IFN- β 1b zu bekommen.

Es wurden Serumspiegel von acht Zytokinen (vier pro- und vier antiinflammatorische Zytokine) sowie von β 2-Mikroglobulin und Neopterin bei insgesamt 23 Patienten mit klinisch gesicherter, schubförmig-remittierend verlaufender MS unter der Therapie mit IFN- β 1b zu sechs verschiedenen Meßzeitpunkten über einen Zeitraum von drei bis sechs Monaten bestimmt. Nach Aufarbeitung der Zytokine erfolgte die Zytokinbestimmung mittels ELISA in einem hämatologischen Labor der Universitätsklinik Mainz. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Ergebnisse erfolgte mittels des Wilcoxon Signed Rank Test unter Benutzung des Statistik-Programms „Stat View 4.0“.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α waren zu keinem Meßzeitpunkt mittels ELISA nachweisbar. *In vivo*-Bestimmungen der beiden Zytokine sind im Vergleich zu *in vitro* Messungen nach wie vor schwierig, des weiteren könnten die

Messungen beeinflusst sein durch unterschiedliche Probenbehandlungen, verschiedene Nachweismethoden und die Interaktionen der Zytokine mit Antikörpern und Rezeptoren.

Der lösliche TNF-Rezeptor II (s TNF-R II) stieg unter der Therapie mit IFN- β 1b signifikant an. Da sTNF-R II die proinflammatorische Wirkung von TNF- α antagonisiert, liefert der gemessene Konzentrationsanstieg einen Hinweis für die immunmodulatorische Wirksamkeit von IFN- β 1b.

IFN- β 1b stimuliert die Bildung von Interleukin-6 (IL-6) signifikant innerhalb der ersten 24 Stunden nach Therapiebeginn, im weiteren Verlauf sinkt die IL-6-Konzentration auf den Ausgangswert vor Therapiebeginn ab. Unter IFN- β 1b kommt es demnach nicht zu einem langfristigen IL-6-Konzentrationsanstieg. Der initiale Konzentrationsanstieg korreliert mit den Therapie-Nebenwirkungen, vor allem in Form von grippeähnlichen Symptomen und deutet daraufhin, daß IL-6 durch sein proinflammatorisches Potential unter anderem für die Therapie-Nebenwirkungen verantwortlich ist.

Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bei MS-Patienten in erhöhter Konzentration meßbar; unter der Therapie mit IFN- β 1b sind keine signifikanten Konzentrationsänderungen zu messen gewesen, was sich mit Ergebnissen der Studie um Bongioanni et al., 2000 deckt.

Die Konzentration des löslichen IL-2-Rezeptors (sIL-2R) stieg unter IFN- β 1b signifikant an, lag aber nicht über dem angegebenen Referenzwert. Da sIL-2R als ein Gegenregulator des proinflammatorischen Zytokin IL-2 - vor allem während eines MS-Schubs - gilt, zeigt dieses Konzentrationsverhalten möglicherweise, dass unter IFN- β 1b durch Senkung von Schubfrequenz und-schwere eine Hochregulierung von sIL-2R nicht stattfindet.

Unter IFN- β 1b kam es zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg von IL-1ra, wobei der Anstieg zu Beginn der Therapie am deutlichsten war. Vor dem Hintergrund der bekannten antiinflammatorischen Wirkung von IL-1ra könnte sein Anstieg Ausdruck einer antiinflammatorischen Wirkungsweise von IFN- β 1b sein.

Interleukin-10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisch wirksames Zytokin, das bei der MS die T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion hemmt. In der vorliegenden Studie kam

es unter IFN- β 1b initial zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg, der weitere Konzentrationsanstieg war jedoch nicht signifikant, so dass zwar ein kurzzeitiger Effekt, nicht aber der klinische Langzeiteffekt von IFN- β 1b auf den MS-Verlauf durch eine vermehrte Induktion von IL-10 zu erklären ist.

Neopterin stieg unter der IFN- β 1b-Therapie an, wobei der Konzentrationsanstieg am deutlichsten direkt nach Therapiebeginn war. Da Neopterin als ein Parameter für die biologische Aktivität von Interferonen gilt, könnte es als Verlaufskontrolle für die IFN- β 1b-Therapie eingesetzt werden; es bleibt jedoch - vor allem durch langfristig angelegte Studien - zu klären, ob die routinemäßige Bestimmung von Neopterin im klinischen Alltag Anwendung findet.

Der geringe Konzentrationsanstieg von β 2-Mikroglobulin unter IFN- β 1b war nicht signifikant, so dass sich β 2-Mikroglobulin nicht als Marker für die Aktivität von IFN- β 1b und den Therapieerfolg eignet, zumal die β 2-Mikroglobulin-Konzentration stark von anderen entzündlichen wie auch Nieren-Erkrankungen beeinflusst wird.

Zusammenfassend lässt sich mit dem hier beobachteten Konzentrationsanstieg von sTNF-R II und IL-1ra die immunmodulatorische Wirkung von IFN- β 1b erklären.

Dass der erwartete Konzentrationsanstieg der ebenfalls antiinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-10 und sIL-2R hier nicht gefunden wurde, könnte zum Einen an der Schwierigkeit liegen, monokausale Zusammenhänge in einem komplexen interdependenten System wie dem Immunsystem mit seinem komplexen Zytokin-Netzwerk bestimmen zu wollen. Zum Anderen zeigt es, dass zukünftig weitere langfristig angelegte Studien mit einem größeren Patientenkollektiv erforderlich sind, um weitere, detailliertere Informationen über den Wirkmechanismus von IFN- β 1b zu bekommen.

6 Literaturverzeichnis

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J S. Cytokines S.239-256 In: Abbas, A K., Lichtman, A.H., Pober, J.S (Eds.) Cellular and molecular immunology, W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto (1994)

Allen, I.V., Millar, J.H.D., Hutchinson, M.J. General disease in necropsy-proven cases of multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 4 (1978):279-284

Arai, K., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., Yokota, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59 (1990):783-836

Arend, WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 88 (1991):1445-1451

Arnason, B.G.W. Interferon beta in multiple sclerosis. *Neurology* 43 (1993):641-643

Arnason, B.G.W. interferon beta in multiple sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 81 (1996):1-11

Arnason, B.G.W., Reder, A.T. Interferons and multiple sclerosis. *Clinical Neuropharmacology* 17 (1994): 495-547

Banks, W.A., Kastin, A.J., Gutierrez, E.G. Interleukin-1 alpha in blood has direct access to cortical brain cells. *Neurosci Lett.* 163 (1993) :41-44

Bansil S., Mithen FA., Singhal, BS., Cook, SD., Rohowsky-Kochan, C Elevated neopterin levels in Guillain-Barre-Syndrome. Further evidence of immune activation. *Arch neurol* 49 (1992): 1277-1280

Barten, D.M., Ruddle, N.H. Vascular cell adhesion molecule-1 modulation by tumor necrosis factor in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 51 (1994):123-133

Beck, J., Rondot, P., Jullien, P., Wietzerbin, J., Lawrence, D.A. TGF- β -like activity produced during regression of exacerbations in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 84 (1991): 452-455

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

Brod, S.A., Marshall, G.D., Henninger, E.M., Sriram, S., Khan, M., Wolinsky, J.S. Interferon- β 1b treatment decreases tumor necrosis factor- α and increases interleukin-6 production in multiple sclerosis. *Neurology* 46 (1996):1633-1638

Brod, S.A., Nelson, L.D., Khan, M., Wolinsky, J.S. IFN-beta 1b treatment of relapsing multiple sclerosis has no effect on CD3-induced inflammatory or counterregulatory anti-inflammatory cytokine secretion ex vivo after nine month. *Int. J. Neurosci.* 90 (1997): 135-140

Camenga, D.L., Johnson, K.P., Alter, M., Engelhardt, C.D., Fishman, P.S., Greenstein, J.I., Haley, A.S., Hirsch, R.L., Kleiner, J.E., Kofie, V.Y., Koski, C.L., Margulies, S.L., Panitch, H.S., Valero, R. Systemic recombinant α -2 interferon therapy in relapsing multiple sclerosis. *Arch Neurol* 43 (1986): 1239-1246

Cannella, B.C., Raine, C.S. Cytokines up-regulate Ia expression in organotypic cultures of CNS tissue. *J Neuroimmunol* 24 (1989):239-248

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

Cannella, B.C. IL-10 fails to abrogate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 45 (1996): 735-746

Carrieri, P.B.B., Provitera, V., De Rosa, T., Tartaglia, G., Gorga, F., Perrella, O. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Neurology* 50 (1998):373-382

Charcot, J.M. *Lessons sur les maladies du systeme nerveux faites a la Salpetriere.* A Delahaye, Paris (1884)

Compston, A., Sadovnick, A.D. Epidemiology and genetics of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 5 (1992):175-181

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

Coclet-Ninin, J., Dayer, J.M., Burger D. Interferon-beta not only inhibits interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α but stimulates interleukin-1 receptor antagonist production in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur Cytokine Netw.* 8 (1997): 345-349

Cua, DJ., Hutchins, B., LaFace, DM., Stohlamn, S., Coffman RL. Central Nervous System Expression of IL-10 inhibits Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal Immunol* 166 (2001) 602-608

Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagotti, R., Romagnani, S. Human IL-10 is produced by both Type 1 Helper (Th1) and Type 2 Helper (Th2) cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150 (1993): 353-360

De Waal R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo M.G., Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., Vries, J.E de (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T-cell proliferation by diminishing the antigen presenting capacity of monocytes via downregulation of class II histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174 (1993): 915-924

Dinarello C.A. Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmun diseases. *Curr Op Immunol* 3 (1991): 941-948

Durelli :, Bongioanni, M.R., Cavallo, R., Ferrero, B., Ferrio, M.F., Bradac, G.B., Riva, A., Vai, S., Geuna, M., Bergamini, L., Bergamasco, B. Chronic systemic high-dose recombinant interferon alpha-2a reduces exacerbation rate, MRI sign of disease activity and lymphocyte interferon gamma production in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 44 (1994): 406-413

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

Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, N.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., Thompson, R.C. Primary structure and functional expression from

complementary DNA of a known interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343 (1990): 341-346

Everaerd, B., Broukaert, P., Fiers, W. Recombinant IL-1 receptor antagonist protects against TNF-induced lethality in mice. *J Immunol.* 152 (1994): 5041-5049

Farrar, M.A., Schreiber, R.D. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Ann Rev Immunol* 11 (1993): 571-611

Feakes R., Sawcer, S., Broadley, S., Corradu F., Roxburgh, R., Gray, J., Clayton, D., Compston, A Interleukin-1-receptor antagonist (IL-1ra) in multiple sclerosis. *J neuroimmunol* 105 (2000); 96-101

Ferrante, P., Fusi, ML., Saresella, M., Caputo, D., Biasin, M., Trabattoni, D., Salvaggio, A., Clerici, E., De Vries, J.E., Aversa, G., Cazzullo, C.L., Clerici, M. Cytokine production and surface marker expression in acute and stable multiple sclerosis: Altered IL-12 production and augmented signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-expression lymphocytes in acute multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 43 (1998):340-349

Ferrarini, A.M., Sivieri, S., Bulian, P., Buttarello, M., Biasi, G., Tavalato, B., Gallo, P. Time-course of interleukin-2 receptor expression in interferon beta- treated multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 84 (1997):213-217

Fierz, W. Genetik und Immunologie. In: Kesselring, J. (ed.): *Multiple Sklerose*. Kohlhammer, Stuttgart; (1997) S. 46-69

Flachenecker, P., Hartung HO. Krankheitsverlauf und Prognose der Multiplen Sklerose. 2. Teil: Prädiktiver Wert klinischer und paraklinischer Faktoren. *Nervenarzt* 67 (1996): 444-451

Freedman, M.S., Muth, K.L., Trotter, J.L., Yoshizawa, C.N., Antel, J.P. Prospective serial analysis of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 42 (1992): 1596-1601

Frei, K., Malipiero, U.V., Leist, TP., Zinkernagel, T.P., Schawab, ME., Fontana, A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral disease. *Eur J Immunol* 19 (1989): 689-694

Frei, K., Fredrikson, S., Fontana, A., Link, H. Interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 31 (1991) : 147-153

Gallo, P., Piccino, M.G., Krzalic, L., Tavolato, B. Tumor necrosis factor alpha (TNF) and neurological disease: failure in detection TNF in the cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis, AIDS dementia complex and brain tumors. *J Neuroimmunol.* 23 (1989): 41-44

Gallo, P., Piccino, M.G. Immune activation in MS: study of IL-2, sIL-2R and IFN-gamma levels in serum and cerebrospinal fluid. *J Neurol Sci.* 92 (1989): 9-15

Gallo, P., Piccino, M.G., Tavolato, B., Siden, A. A longitudinal study on IL-2, sIL-2R, IL-4 and IFN- γ in multiple sclerosis CSF and serum. *J Neurol Sci* 101 (1991): 227-232

Gayo, A., Mozo, L., Suarez, A., Tunon, A., Lahoz, C., Gutierrez C. Long-term effect of INF- β 1b treatment on the spontaneous and induced expression of IL-10 and TGF β in MS patients. *J Neurol Sciences* 179 (2000); 43-49

Giovannoni, G., Lai, M., Kidd, D. Serial urinary neopterin excretion as an immunological marker of disease activity in multiple sclerosis. In: Annual Meeting of the Charcot Foundation, Brussels (1995)

Goodkin D.E. Interferon beta-1b. *Lancet* 344 (1994): 1057-1060

Hafler, D.A., Fox, D.A., Manning, M.E., Schlossmann, S.F., Reinherz, E.L., Weiner H.L. *In vivo* activated T lymphocytes in the peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *N Eng J Med* 312 (1985): 1405-1411

Haupts, M. Hochrechnung der Zahl an Multiple Sklerose erkrankten Patienten in Deutschland. *Nervenarzt*; 72 (2001): 161

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

Hauser, S.L., Doolittle, T.H., Lincoln, R., Brown, R.H., Dinarello, C.A. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients. Frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* 40 (1990); 1735-1739

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

Hibi M., Murakami M., Saito M Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp 130. *Cell* 63 (1990): 1149-1156

Hibi, M., Nakajima, K., Hirano, T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mod Med* 74 (1996): 1-12

Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T., Taga, T. Accelerated nerve regeneration in mice by upregulated expression of interleukin (IL) 6 and IL-6 receptor after trauma. *J Exp Med* 183 (1996): 2627-2634

Hofman, F., v. Hanwehr, R.I., Dinarello, C.A., Mizel, S.B., Hinton, D., Merrill, J.E. Immunoregulatory molecules and IL 2 receptors identified in multiple sclerosis brain. *J Immunol* 136 (1986): 3239-3245

Hohlfeld, R., Meinl, E., Weber, F., Zipp, F., Schmidt, S., Sotgiu, S., Goebels, N., Voltz, R., Spuler, S., Iglesias, A., Wekerle, H. The role of autoimmune T lymphocytes in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurology* 45 (1995, suppl 6):33-38

Hong, L., Imeri, L., Opp, M.R., Postlethwaite, A.E., Seyer, J.M. Intercellular adhesion molecule-1 expression induced by interleukin (IL)-1 beta or an IL-1 beta fragment is blocked by an IL-1 receptor antagonist and a soluble IL-1 receptor. *J Neuroimmunol* 44 (1993): 163-170

Jakobs, L., Salazer, A.M., Herndon, R., Reese, P.A., Freeman, A., Josefowicz, R., Cuetter, A., Husain, F., Smith, W.A., Ekes, R. Multicenter double-blind study of effect of intrathecally administered natural human fibroblast interferon on exacerbations of multiple sclerosis. *Lancet* 2 (1986) : 1411-1413

Jakobs, L., Johnson, K.P. A brief history of the use of interferons as treatment of multiple sclerosis. *Arch neurol.* 51 (1994): 1245-1252

Jacobs, LD., Cookfair, DL., Rudick, RA. Intramuscular interferon- β 1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 49(1996): 285-294

Jiang, H., Williams, G.J., Dhib-Jalbut, S.(1997) The effect of interferon beta -1b on cytokine-induced adhesion molecule expression. *Neurochem Int.* **30**:449-453

Johnson, H.M., Bazer, F.W., Szente, B.E., Japre, M.A. How interferons fight disease. *Sci Am* 5 (1994): 180-190

Jungo, F., Dayer, J.M., Modoux, C., Hyka, N., Burger D IFN- β inhibits the ability of T lymphocytes to induce TNF- α and IL-1 β production in monocytes upon direct cell-cell contact. *Cytokine* 14/5 (2001); 272-282

Kalman, B., Lublin, F.D. Immunopathogenic mechanisms in experimental allergic encephalomyelitis. *Curr Op Neurol Neurosurg* 6 (1993): 182-188

Kazuyuki, T., Tosato, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol* 148 (1992): 1143-1148

Kennedy, M.K., Torrance, D.S., Picha, K.S., Mohler, K.M. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 149 (1992): 2496-2505

Kesselring, J. Klinik. In: Kesselring, J.(Hrsgbr.) Multiple Sklerose. Kohlhammer, Stuttgart ; (1997) S. 96

Khademi, M., Wallström, E., Andersson, M., Piehl, F., Dimarco, R., Olsson, T. Reduction of both pro- and antiinflammatory cytokines after 6 months of interferon beta-1a treatment of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 103 (2000); 202-210

Khoury, S.J., Hancock, W.W., Weiner, H.L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor β , interleukin 4 and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 176 (1992): 1355-1364

Kivisakk, P., Tian, W., Fredrikson, S., Lonk, H., Soderstrom, M. Multiple sclerosis: Myelin basic protein induced mRNA expression of proinflammatory cytokines in mononuclear cells is suppressed by interferon-beta 1b *in vitro*. *Eur J Neurol.* 4 (1997): 460-467

Knobler, R.L., Panitch, H.S., Braheny, S.L., Sipe, J.C. Rice, G.P.A. Huddlestone, J.R., Francis, G.S., Hooper, C.J., Kamin-Lewis, R.M., Johnson, K.P., Oldstone,

- M.B.A., Merigan, T.C. () Systemic alpha-interferon therapy of multiple sclerosis. *Neurology* 34 1984: 1273-1279
- Kurtzke, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33 (1983): 1444-1452
- Kurtzke, J.F. Epidemiology of multiple sclerosis. In: Vinken, P.J., Bruyn, G.W., Klawans, H.L., Koetsier, J.C. (Eds.) *Handbook of clinical neurology, demyelinating diseases*. Elsevier, Amsterdam, New York (1985) 259-287
- Laske, C., Oschmann, P., Tofighi, J., Kuehne, S.b., Diehl H., Bregenzer, T., Kraus, J., Bauer, R., Chatzimanolis N., Kern, A., Traupe, H., Kaps, M Induction of sTNF-R1 and sTNF-R2 by interferon beta-1b in correlation with clinical and MRI activity. *Acta Neurol Scand.* 103 (2001): 105-113
- Lassmann, H. (Pathologische Anatomie und experimentelle Modelle. In: Kesselring, J.(Hrsgbr.) *Multiple Sklerose*. Kohlhammer, Stuttgart 1997) 18-45
- Leppert, D., Hauser, S.L., Kishiyama, J.L. et al. Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. *FASEB Journal (Bethesda)* 9 (1995): 1473-1481
- Liberati, AM., Garofani, P., DeAngelis V. (Double blind randomized phase I study on the clinical tolerance and pharmacodynamics of natural and recombinant interferon β given intravenously. *J Interferon res.* 12 1994); 61-69
- Link, J., Söderström, M., Olsson, T., Höjeberg, B., Ljungdahl, A., Link, H. Increased transforming growth factor- β , interleukin-4, and interferon- γ in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36 (1994): 379-386
- Link, H. The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 4 (1998): 12-15
- Liu, J.S.H., Amaral, T.D., Brosnan, C.F., Lee, S.C. IFNs are critical regulators of IL-1 receptor antagonist and IL-1 expression in human microglia. *J Immunol.* 161 (1998): 1989-1996
- Lublin, F. Klinische Ergebnisse der Interferon beta-1b-Studie. In: Toyka, K., Arnason, B.G.W., Hartung, HP., Li, D., Lublin, F., Miller, D. (Eds.) *Interferon beta-1b zur Behandlung der Multiplen Sklerose*. *Nervenarzt* (1995): 7-10

Lublin, F., Reingold S. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 46 (1996): 907-911

Lucchinetti, C., Brück, W., Rodriguez, M Distinct patterns of Multiple Sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis. *Brain Pathol* 6 (1996); 259-274

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

Mäurer, M., Gold, R., Toyka, K.V., Rieckmann, P. Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose mit rekombinanten Interferon- β -Präparaten. *Nervenarzt*, 72 (2001): 108-116

Maimone, D., Gregory, S., Arnason, B.G.W., Reder, A.T. (1991) Cytokine levels in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **32**:67-74

Maimone, D., Reder, A.T., Gregory, S. T-cell lymphokine-induced secretion of cytokines from patients with multiple sclerosis. *Cell Immunol* 146 (1993): 96-106

Maimone, D., Guazzi, C.G., Annunziata, P. IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* 146 (1997):59-65

Martin, D., Near, S.L. Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on experimental allergic encephalomyelitis in rats. *J Neuroimmunol.* 61 (1995): 241-245

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

Matthews, W.B. (ed) *Mc Alpine's Multiple sclerosis.* 2nd ed. Churchill Livingstone, London (1991)

Matsuda, M., Tsukada, N., Miyagi, K., Yanagisawa, N. Increased interleukin-1 production by peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 102 (1991): 100-104

Matsuda; Tsukada Increased levels of sTNF-R in patients with MS and HTLV-1 associated myelopathy 52(1994): 33-40

McCarron, R.M., Wang, L., Racke, M.K., McFarlin, D.E., Spatz, M. Cytokine-regulated adhesion between encephalitogenic T lymphocytes and cerebrovascular endothelial cells. *J Neuroimmunol* 43 (1993): 23-30

Mc Donald, Wl., Compston, A., Edan, G et al., Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis. Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 50 (2001); 121-127

Merrill, J.E., Strom, S.R., Ellison, G.W., Myers, L.W. *In vitro* study of mediators of inflammation in multiple sclerosis *J Clin Immunol* 9 (1989):84-96

Merrill, J.E. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother* 12(1992): 167-170

Mitrovic, B., Stock, G., Perez HD., Dinter H. Molekular Aspekte der Behandlung der Multiplen Sklerose. In: „Handbuch der molekularen Medizin“ Band 5, Erkrankungen des Zentralnervensystems. Ganten, D., Ruckpaul, K. (Hrsg.)Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1999 S. 411-445

Montalban, X., Duran, I., Rio, J., Saez-Torres, I., Tintore, M., Marinez-Caceres, EM. Can we predict flu-like symptoms in patients with multiple sclerosis treated with interferon- β ? *J Neurol* 247 (2000); 259-262

Müller-Neven, G., Küster, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A., Graeve, L., Wijdenes, J., Heinrich, PC. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp 130 on IL-6 responses. *J Immunol.* 161 (1998): 6347-6355

Musette, P., Benveniste, O., Lim, A., Bequet, D., Kourilsky, P., Dormont, D., Gachelin, G. The pattern of production of cytokine mRNA is markedly altered at the onset of multiple sclerosis. *Res Immunol.* 147 (1996): 435-441

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

Nicoletti, F., Patti, F., Di-Marco, R., Zacccone, P., Nicoletti, A., Meroni, P.L., Reggio, A. Circulating serum levels of IL-1ra in patients with relapsing-remitting multiple

sclerosis are normal during remission phases but significantly increased either during exacerbations or in response to IFN-beta treatment. *Cytokine* 8 (1996): 395-400

Nicoletti, F., DiMarco, R., Patti, F., Zaccone, P., L'Episcopo, MR., Reggio, E., Xiang, M., Nicoletti, A., Reggio, A. Short-term treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis patients with interferon (IFN)- β 1b transiently increases the blood levels of interleukin (IL)-6, IL-10 and IFN-gamma without significantly modifying those of IL-1b, IL-2, IL-4 and tumor necrosis factor- α . *Cytokine* 12/6 (2000): 682-687

Özenci, V., Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Pashenkov, M., Fredrikson, S., Link, H. Multiple sclerosis: Pro- and antiinflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN- β . *J Neuroimmunol* 108 (2000): 236-243

Olerup, O., Hillert, J. HLA class II associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38 (1991): 1-15

Oksenberg, J.R., Sherritt, M., Begovich, A.B., Erlich, H.A., Bernard, C.C., Cavalli-Sforza, L.L., Steinman, L. T-cell receptor Valpha and Cbeta alleles associated with multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989): 988-992

Olsson, T., Sun, J., Hillert, J., Hojeberg, B., Ekre H.P., Andersson, G., Olerup, O., Link, H. Increased numbers of t cells recognizing multiple myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 22 (1992): 1083-1087

Ossege LM., Sindern, E., Petzold, T., Malin, JP. Immunomodulatory effects of interferon- β in vivo: induction of the expression of transforming growth factor -b1 and its receptor type II. *J Neuroimmunol* 91 (1998); 73-81

Ott, M., Demisch, L., Engelhardt, W., Fischer P.A. Interleukin-2, soluble interleukin-2-receptor neopterin, L-tryptophan and β 2-microglobulin levels in CSF and serum of patients with relapsing-remitting or chronic-progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 241 (1993): 108-114

Padberg, F., Feneberg, W., Schmidt, S., Schwarz, MJ., Körschenhausen, D., Greenberg, BD., Nolde, T., Müller, N., Trapmann, H., König, N., Möller, HJ., Hampel, H (CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp 130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999): 218-223

-
- Panitch, H.S., Hrisch, R.L., Schindler, J., Johnson, K.P. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: Exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37 (1987): 1097-110
- Perini, P., Tiberio, M., Sivieri, S., Facchinetti, A., Biasi, G., Gallo, P. Interleukin-1 receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type I and II and soluble E-selectin serum levels in multiple sclerosis patients receiving weekly intramuscular injections of interferon-beta 1a. *Eur Cytokine Netw* 11(1) (2000); 81-6
- Peter, J.B., Boctor, F.N., Tourtellotte, W.W. Serum and CSF levels of IL-2, sIL-2R, TNF- α and IL-1 β in chronic progressive multiple sclerosis: Expected lack of clinical utility. *Neurology* 41 (1991): 121-123
- Phadke, J.G. Survival pattern and cause of death in patients with multiple sclerosis: results from an epidemiological survey in north east Scotland. *L Neuro Neurosurg Psychiat* 50 (1988): 523-531
- Philippe, J., Debruyne, J., Leroux-Roels, G., Williams, A., Dereuck J. In-vitro Tnf- α , IL-2 and IFN- γ production as markers of relapses in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 98(1996); 286-290
- Pöhlau, D., Federlein, J., Postert, T. Wirkmechanismen intravenöser Immunglobuline. *Fortschr. Med* 31 (1996a): 42-48
- Poser, C.M. Exacerbations, activity and progression in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 37 (1980): 471-474
- Poser, C.M., Paty, D.W., Scheinberg, L.C., et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13 (1983): 227-231
- PRIMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon- β 1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. A Randomised double-blind placebo-controlled study of Interferon- β 1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352 (1998): 1498-1504
- Puccini-Sohler; Rieckmann A. Soluble form of TNF-Receptors in CSF and serum of HTLV-1 associated myelopathy and other neurological diseases 242 (1995): 239-242
- Reder, A.T., Genc, K., Bykosh, P.V., Porrini, A.M. Monocyte activation in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 4 (1998): 162-168

Rep, M.H., Hintzen, R.Q., Polman, C.H., van Lier, R.A. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin.10 secretion by activated human T-cells. *J Neuroimmunol.* 67 (1996): 111-118

Rep, M.H.G., Schrijver, H.M., Van-Lopik, T., Hintzen, R.Q., Roos, M.T.L., Ader, H.J., Polman, C.H., Van-Lier, R.A.W. Interferon (IFN)- beta treatment enhances CD 95 and interleukin 10 expression but reduces interferon-gamma producing T cells in MS patients. *J Neuroimmunol* 96(1999): 92-100

Rieckmann, P., Albrecht, M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Brooks, A., Luer, W., Poser, S. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology* 44 (1994): 1523-1526

Rieckmann, P., Albrecht M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Brooks, A., Luer, W., Poser, S. Tumor necrosis factor alpha-messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 37 (1995): 82-88

Rieckmann, P., Gold, R., Toyka, K. Erfolgreiche Behandlung der Multiplen Sklerose mit Beta-Interferonen. *Internist*, 40 (1999): 119-125

Rodriguez, M., Pavelko, K.D., McKinney, C.W., Leibowitz, JL. Recombinant human IL-6 suppresses demyelination in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 153 (1994): 3811-3821

Rott, O., Fleischer, B., Cash, E. Interleukin-10 prevents experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 24(1994); 1434-1440

Rudick, R.A., Ransohoff, R.M. Cytokine secretion by multiple sclerosis monocytes. Relationship to disease activity. *Arch Neurol* 49 (1992): 265-270

Salmaggi, S., Dufour, A., Eoli, M., Corsini, E., La Mantia, L., Massa, G., Nespolo, A., Milanese, C. Low serum interleukin-10 levels in multiple sclerosis: further evidence for decreased systemic immunosuppression. *J Neurol* 243 (1996): 13-17

Samoilova, E.B., Horton, J.L., Chen, Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: Roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol* 188 (1998): 118-124

Sanders, M.E., Coski, C.L., Robbins, D., Shin, M.L., Frank, M.M., Joiner, K.A. Activated terminal complement in cerebrospinal fluid in Guillain-Barre-Syndrome and multiple sclerosis. *J Immunol* 136 (1986): 4456-4459

Schellekens H., De Reus, A., Bolhuis, R. The activity of human interferons in Rhesus monkeys. In: De Maeyer, E., Galasso, G., Schellekens, H. (eds) *The biology of the interferon system*. Elsevier, Amsterdam (Biomedical Press, (1981) 335-338)

Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S.C., Dinarello, C.A. Correlations and interactions in the production of IL-6, IL-1 and tumor necrosis factor in human blood mononuclear cells. *Blood* 75 (1990): 40-47

Schlupe, M., Van Melle, G., Henry, H., Stadler, C., Roz' th-Wicky, B., Magistretti, P.J. In vitro cytokine profiles as indicators of relapse activity and clinical course in multiple sclerosis. *Mult Scler* 6 (1998): 198-202

Schrijver, H.M., Crusius, J.B.A., Uitdehaag, B.M.J., García González, M.A., Kostense, P.J., Polman, C.H., Peña, A.S. Association of Interleukin-1 β und interleukin-1 receptor antagonist genes with disease severity in MS. *Neurology*, 52 (1999): 595-599

Selleberg, F., Bendtzen, K., Christiansen, M., Frederiksen, J. Cytokines and soluble IL-4 in patients with acute optic neuritis and multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 4 (1997): 59-67

Selmaj, K. Raine, C.S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte in vitro. *Ann Neurol* 21 (1988): 339-346

Selmaj, K., Raine, C.S., Cannella, B., Brosnan, C.F. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87 (1991b): 949-954

Selmaj, K., Raine, C.S., Cannella, B., Brosnan, C.F. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 147 (1991a): 1522-1529

Sharief, M.K., Hentges, R. Association between tumor necrosis factor- α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325 (1991): 467-472

Shaw, C.E., Dunbar, P.R., Macaulay, H.A., Neale, T.J. Measurement of immune markers in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients during clinical remission. *J Neurol* 242 (1995): 53-58

Sibley WA., Bamford CR., Clark, K., Clinical viral infections and multiple sclerosis. *Lancet* 1(1985): 1313-1315

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

Sørensen, PS Biological markers in body fluids for activity and progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5 (1999): 287-290

Soilu-Hänninen, M., Salmi, A., Salonen, R. Interferon- β downregulates expression of VLA-4 antigen and antagonizes interferon- γ -induced expression of HLA_DQ on human peripheral blood monocytes. *J Neuroimmunol.* 60 (1995): 99-106

Spuler; Yoursy, MS: prospective analysis of TNF- α and 55 KDa TNF-R in CSF and serum with clinical and MRI activity *J Neuroimmunol* 66 (1996):57-64

Steinbrecher A, Dichgans J, Martin R. Diagnostik und Therapie der multiplen Sklerose. *Nervenheilkunde* 14 (1995): 180-188

Stelmasiak, Z., Koziol-Montewka, M., Dobosz, B., Rejdak, K IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients. *Med Sci Monit* 7(5) (2001): 914-918

Stoll, G., Jung, S., Jander, S., van der Meide, P., Hartung, HP Tumor necrosis factor- α in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 45 (1993); 175-182

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*, 45 (1993): 1277-1285

The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: Final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 45 (1995): 1277-1285

-
- Thomson, A. (ed; 1994) *The Cytokine Handbook*, 2nd Ed. London, Academic Press.
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M.B., Dinarello, C.A., Mier, J.W. Interleukin-6 as an antiinflammatory cytokine: Induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83 (1994): 113-118
- Tiwari, J.L., Terasaki, P.I. (eds.) *HLA and disease associations*. Springer, Berlin Heidelberg, New York (1985), 152-167
- Tourtellotte, W.W., Walsh, M.J. Cerebrospinal fluid profile in multiple sclerosis. In: Poser, C.M. (ed.) *The diagnosis of multiple sclerosis*. Thieme Stratton Inc., New York (1984) 165-174
- Traugott, U., Scheinberg, L.C., Raine, C.S. On the presence of Ia-positive endothelial cells and astrocytes in multiple sclerosis lesions and its relevance to antigen presentation. *J Neuroimmunol* 8 (1985): 1-14
- Traugott, U., Reinherz, E.L., Raine, C.S. Multiple sclerosis: distribution of T-cells, T-cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol* 4 (1983): 201-221
- Traugott, U., Lebon, P. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 24 (1988): 243-251
- Trotter, J.L., v.d. Veen, R.C., Clifford, D.B. Serial studies of serum interleukin-2 in chronic progressive multiple sclerosis patients: occurrence of 'bursts' and effect of cyclosporine. *J Neuroimmunol* 28 (1990):9-14
- Vartanian, T., Li, Y., Zhao, M., Stefansson, K. Interferon- γ -induced oligodendrocyte cell death: Implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1 (1995): 732-742
- Vassalli, P. The pathogenesis of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10 (1992): 411-452
- Ververken, D., Carton, H., Billiau, A. Intrathecal administration of interferon in MS patients. In: Karcher, D., Lownthal, A., Strosberg, A.D., (eds.) *Humoral Immunity in Neurological Disease*. New York, NY: Plenum Publishing Corp; (1979) 625-627
- Walther, E.U., Dietrich, E., Hohlfeld, R. Therapie der multiplen Sklerose mit Interferon β -1b. *Nervenarzt*. 67 (1996): 452-456

Wandinger, K.Pk., Wessel, K., Neustock, P., Siekhaus, A., Kirchner, H. Diminished production of type-I interferons and interleukin-2 in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 149 (1997): 87-93

Weinshenker, B.G., Ebers, G.C. The natural history of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 14 (1987): 255-261

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

Weinshenker, B.G. The natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 13 (1995): 119-146

Weinstock-Guttman, B., Ransohoff, R.M., Kinkel, R.P., Rudick, R.A. The interferons: biological effects, mechanism of action, and use in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 37(1995): 7-15

Wekerle, H., Linington, C., Lassmann, H., Meverman R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 9 (1986); 271-277

Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C. Animal models. *Ann Neurol* 36 (1994): 47-53

Williams, G.J., Witt, P.L. comparative study of the pharmacodynamic and pharmacologic effects of Betaseron® registered and AVONEX™. *J Interferon Cytokine Res* 18 (1998): 967-975

Wucherpfennig, K.W., Zhang, J., Witek, C., Matsui, M., Modabber, Y., Ota, K., Hafler, D.A. Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* 152 (1994): 5581-5592

Wucherpfennig, K.W., Weiner, H.L., Hafler, D.A. T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunology Today* 12 (1991): 277-282

Wucherpfennig, K.W., Newcombe, J., Li, H., Keddy, C., Cuzner, M.L., Hafler, D. T cell receptor V α -V β repertoire and cytokine gene expression in active multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 175 (1992): 993-1002

Zhang, J., Marcovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., Hafler, D.A. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179 (1994): 973-984

Zoja, C., Wang, J.M., Bettoni, S., Sironi, M., Renzi, D., Chiaffarino, F., Abboud, H.E., Van Damme, J., Antovani, A., Remuzzi, G., Rambaldi, A. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce gene expression and production of leucocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells. *Am J Path* 138 (1991): 991-1003

Zola, H. Analysis of receptors for cytokines and growth factors in human disease. *Dis Markers* 12 (1996): 225-240

Patienten	Alter (i. Jahren)	Krankheitsdauer		Schübe ¹	Schübe/Jahr	EDSS ²
		Monate	Jahre			
#1	29	19	1,58	3	1,64	1
#2	24	45	3,75	7	1,68	1,5
#3	33	24	2	2	1	0
#4	43	20	1,66	3	1,8	3
#5	37	26	2,16	5	2,28	3
#6	35	38	3,16	6	1,8	2,5
#7	34	146	12,16	18	1,41	5
#8	39	36	3	2	0,6	4
#9	37	63	5,25	2	0,38	4
#10	27	10	0,83	3	3,6	3
#11	17	15	1,25	2	1,56	2
#12	39	46	3,83	3	0,84	3
#13	24	21	1,75	3	1,68	1
#14	23	12	1	2	2,04	0
#15	38	33	2,75	2	0,72	2
#16	39	8	0,66	2	2,64	4
#17	39	36	3	3	0,96	1
#18	36	84	7	2	0,24	3
#19	29	72	6	5	0,84	1,5
#20	26	48	4	6	1,44	1
#21	20	18	1,5	3	0,75	1
Mittelwerte	31,33	39,05	3,25	4	1,42	2,21

Tabelle Anhang: Demographie der Patienten #1-21: Alter der Patienten, Krankheitsdauer, Schübe, Schübe/ Jahr und EDSS zu Beginn der Studie

¹ Schübe seit Krankheitsbeginn

² EDSS = Expanded disability status scale : Bewertung der Krankheitsprogression

Danksagung

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. Ch. Peschel aus München und Herrn Dr. E. Lensch aus Mainz für die freundliche Überlassung des Themas, die Betreuung und die Durchführung der Korrekturen aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Ursel Petrat aus Mainz für die Betreuung und Hilfestellung bei der Durchführung der Tests und Herrn Dr. Laudahn aus Hamburg für die sehr hilfreiche Unterstützung bei der statistischen Bearbeitung der erhobenen Daten.

Des weiteren möchte ich allen Personen danken, die durch ihre freundliche Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben:

- den Mitarbeitern des hämatologischen Labors von Herrn Professor Dr. Ch. Peschel und des Liquor-Labors der neurologischen Klinik der Universität Mainz
- meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten, mit reger Anteilnahme die vorliegende Arbeit verfolgten und mir in jeder Situation beistanden

Schließlich gilt mein Dank allen Patienten, die durch ihre Bereitschaft zu Teilnahme an der Studie diese Arbeit ermöglichten.

Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: „Serumspiegel pro- und antiinflammatorischer Zytokine bei Multiple Sklerose-Patienten unter Interferon- β 1b-Therapie“ in der hämatologischen Klinik des Klinikums der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Professor Dr. Christian Peschel und Herrn Dr. Eckart Lensch ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung der Arbeit nur die gemäß § 6 Abs. 5 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe die Dissertation in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Technischen Universität München ist mir bekannt.

München, den 18.06.2003

Christiane Wilke

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christiane Wilke
Anschrift: Geschwister-Scholl-Strasse 103
20251 Hamburg
Telefon: 040 / 46 777 082
Geburtsdatum/-ort: 28. Februar 1972, Neuss
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch

Ausbildung

1978-1982 Grundschule in Roßdorf bei Darmstadt
1982-1991 Gymnasium in Darmstadt und Hannover
06/91 Abitur; Leistungskurse: Alt-Griechisch, Geschichte, Biologie
07/91-04/92 Freiwilliges Soziales Jahr, Pflegedienst Agnes-Karll-Krankenhaus, Hannover

Studium

4/92-03/98 Joh.-Gutenberg-Universität Mainz, Studium der Humanmedizin
04/98-05/99 Praktisches Jahr, LMU München
1.Tertial: Innere Medizin, Krh. München-Schwabing
2.Tertial: Neurologie, Groote-Schuur-Hospital, Kapstadt, Südafrika
3.Tertial: Chirurgie, Krh. München-Schwabing
04/99 3. Staatsexamen, LMU München

Beruflicher Werdegang

07/00-12/01 Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Ev. Krankenhaus Alsterdorf, Hamburg
seit 01/02 Assistenzärztin, Innere Medizin, Ev. Krankenhaus Alsterdorf, Hamburg

Publikation

6/98 Poster-Präsentation: Kongreß der European Neurological Society, Nizza
Titel Interleukin-6 and Interleukin-10 during interferon beta-1b therapy in multiple sclerosis patients
E. Lensch, Ch. Wilke, F. Thömke. C. Peschel