Aus der Klinik für Neurologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Sven Meuth

Translationale Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung von 4-Aminopyridin in Multipler Sklerose und entsprechenden Mausmodellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Valeria Koska

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Albrecht

Zweitgutachterin: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Kristina Spaniol

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Dietrich, M, Koska, V, Hecker, C, Göttle, P, Hilla, AM, Heskamp, A, Lepka, K, Issberner, A, Hallenberger, A, Baksmeier, C, Steckel, J, Balk, L, Knier, B, Korn, T, Havla, J, Martínez-Lapiscina, EH, Solà-Valls, N, Manogaran, P, Olbert, ED, Schippling, S, Cruz-Herranz, A, Yiu, H, Button, J, Caldito, NG, Gall, C von, Mausberg, AK, Stettner, M, Zimmermann, HG, Paul, F, Brandt, AU, Küry, P, Goebels, N, Aktas, O, Berndt, C, Saidha, S, Green, AJ, Calabresi, PA, Fischer, D, Hartung, H-P & Albrecht, P 2020, 'Protective effects of 4-aminopyridine in experimental optic neuritis and multiple sclerosis', *Brain*, vol. 143, no. 4, pp. 1127–1142.

<u>Zusammenfassung</u>

In der vorliegenden Arbeit wurde ein möglicher neuroprotektiver Effekt von 4-Aminopyridin bzw. Fampridin, einem Blocker von spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen, auf retinale Schichten bei Patienten mit Multipler Sklerose mittels Optischer Kohärenztomographie (OCT) untersucht und mit präklinischen Daten verglichen. Diese hatten sowohl in vitro als auch in vivo einen protektiven Effekt auf Oligodendrozyten und die Myelinscheide gezeigt sowie eine geringere retinale Degeneration bei Messung der inneren retinalen Schichten in der OCT im Mausmodell der Multiplen Sklerose, der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis mit Optikusneuritis (EAEON). In einer retrospektiven Multicenter-Studie wurden 52 MS-Patienten unter Fampridin-Therapie mit 51 gematchten Kontrollen longitudinal untersucht. Zur Baseline-Messung, nach ungefähr 12 und teilweise nach 24 Monaten erfolgte die Messung folgender Schichten: in einem peripapillären Ringscan wurde die retinale Nervenfaserschicht (pRNFL) erfasst. Ein makulärer Volumenscan lieferte Daten für die Dicke der makulären retinalen Nervenfaserschicht (mRNFL), des Komplexes aus innerer plexiformer und Ganglienzellschicht (mGCIPL) und der inneren nukleären Schicht (mINL) sowie die gesamtretinale Dicke (mTRT). Die Dickenänderungen wurden auf 12 bzw. 24 Monate annualisiert. Mittels verallgemeinerter Schätzungsgleichungen (generalized estimating equation; GEE) wurden beide Gruppen miteinander verglichen sowie für intra-individuelle inter-Augen-Korrelationen und mögliche Confounder (Alter, Geschlecht, Erkrankungsdauer, MS-Verlaufsform, immunmodulatorische Therapie) adjustiert. Wir wiesen einen signifikanten Einfluss der Fampridin-Therapie auf die mRNFL nach, welche bei den Kontroll-Patienten eine Dickenreduktion über 24 Monate zeigte, während sie in der Fampridin-Gruppe keine Änderung aufwies. In der pRNFL zeigte sich ein gegenläufiger Effekt, die übrigen Schichten zeigten keine Unterschiede. Eine Sub-Analyse untersuchte mögliche Unterschiede zwischen den Verlaufsformen der Multiplen Sklerose: schubförmig-remittierend, primär und sekundär progredient. Limitierend sind die geringe Fallzahl sowie das Studiendesign einer retrospektiven Studie. Daher ist eine prospektive Placebokontrollierte Studie mit Randomisierung der Gruppen von Nöten, um derartige Therapieeffekte zu verifizieren.

<u>Summary</u>

The present study aimed to detect a neuroprotective effect of 4-Aminopyridine/ Fampridine, a voltage-gated sodium channel blocker, on retinal layers of patients with multiple sclerosis using optic coherence tomography (OCT). The results were compared to preclinical data, which showed a protective effect on oligodendrocytes and Myelin in vitro and in vivo as well as a lesser decrease of inner retinal layers in a mouse model of MS, the experimental autoimmunoencephalomyelitis with opticus neuritis (EAEON). This multicentre, retrospective study compared 52 patients with Fampridine therapy with 51 matched controls. At baseline, after approximately 12 and partly after 24 months, the following data was obtained: a peripapillary ring scan measured the peripapillary retinal nerve fibre layer (pRNFL). In a macular volume scan the thickness of the macular retinal nerve fibre layer (mRNFL), the complex of inner plexiform and ganglion cell layer (mGCIPL) and inner nuclear layer (mINL) as well as the total retinal thickness (mTRT) were measured. Thickness changes were annualised. Both groups were compared using generalised estimating equations (GEE) adjusting for intra-individual inter-eye correlations as well as possible confounders (age, sex, disease duration, MS subtype, immunomodulatory medication). We found a significant effect of Fampridine on the mRNFL, which showed a thickness loss over the course of 24 months for the control group while the Fampridine group showed no thickness change. The pRNFL showed an opposed effect, the other layers no difference. A sub-analysis examined possible differences between the MS subtypes: relapsing remitting and primary and secondary progressive. The small study population as well as the retrospective study design limit the informative value of this study. A prospective, placebo-controlled randomised study is warranted to verify such protective effects of Fampridine.

Abkürzungsverzeichnis

mGCIPL: makulärer Komplex aus GCL und IPL
mGCL: makuläre Ganglienzellschicht
mINL: makuläre innere nukleäre Schicht
mIPL: makuläre innere plexiforme Schicht
mTRT: makuläre gesamtretinale Dicke (engl. total retinal thickness)
(p/m) RNFL: (peripapilläre/ makuläre) retinale Nervenfaserschicht
Δ v1 – v0: annualisierte Dickenänderung in μm nach 12 Monaten
Δ v2 – v0: annualisierte Dickenänderung in μ m nach 24 Monaten
4AP: 4-Aminopyridin = Fampridin
BTK: Brutons Tyrosin-Kinase-Inhibitor
CIS: Klinisch isoliertes Syndrom
DD: engl. Duration of Disease (Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt des Baseline-OCT)
DFA: US Food and Drug Administration
EAEON: experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis mit Opticusneuritis
EBV: Epstein-Barr-Virus
EDSS: Expanded Disability Status Scale
EDTRS: Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study
EMA: European Medicines Agency
FTY: Fingolimod
GEE: Generalised Estimations Equations (Allgemeine Schätzungsgleichung)
GSNO: S-Nitrosoglutathion
HON: Stattgehabte Optikusneuritis > 6 Monate vor Studienbeginn
JH: Johns Hopkins University Baltimore
LMU: Ludwig-Maximilians-Universität München
mOCP: murine Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
MS: Multiple Sklerose
MWU: Man-Whitney-U Test
NFAT: nuclear factor of activated T-cells
Nrf2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2

- OCT: Optische Kohärenztomografie
- ON: Optikusneuritis
- PPMS: Primär progrediente Multiple Sklerose
- RRMS: Schubförmig remittierende (relapsing-remitting) Multiple Sklerose
- S.F.: University of California San Francisco.
- SPMS: Sekundär progrediente Multiple Sklerose
- TU: Technische Universität München.
- v0: Baseline Visite
- v1(a): annualisierte Schichtdicke nach 12 Monaten
- v1: Visite nach 1 Jahr
- v2(a): annualisierte Schichtdicke nach 24 Monaten
- v2: Visite nach zwei Jahren
- VUMC: Vrije Universiteit Medical Center Amsterdam

Inhaltsverzeichnis

1	Einle	leitung1				
	1.1	Mul	tiple Sklerose	1		
	1.2	4-Ar	ninopyridin	2		
	1.3	Opti	ische Kohärenztomographie und MS	3		
	1.4	Präk	linische Untersuchung der Wirkung von 4AP	4		
	1.5	Ziele	e der Arbeit	5		
2	Mat	erial	und Methoden	6		
	2.1	Sticł	nprobe	6		
	2.1.3	1	Studienform	6		
	2.1.2	2	Patientenrekrutierung	6		
	2.1.3	3	Datengewinnung	6		
	2.1.4	4	Kontrollenmatching	7		
	2.2	Opti	ische Kohärenztomographie	8		
	2.3	Stat	istische Auswertung1	1		
	2.3.2	1	Allgemeines Vorgehen 1	1		
	2.3.2	2	Vergleich beider Gruppen 1	1		
	2.3.3	3	Statistische Kontrolle von möglichen Confoundern 1	1		
	2.3.4	4	Sub-Analyse: Unterschiede bei den MS-Verlaufsformen?1	2		
	2.3.	5	Untersuchung der Assoziation zwischen EDSS und Schichtdickenänderung1	2		
	2.4	Ethi	kvotum 1	2		
3	Erge	bniss	se 1	3		
	3.1	Dem	nographische Daten1	5		
3.2 Baseline Messung		Base	eline Messung1	6		
	3.3	Long	gitudinaler Vergleich1	6		
	3.3.3	1	Stattgehabte Opticus-Neuritis1	9		
	3.3.2	2	Klinischer Schub während des Beobachtungszeitpunktes1	9		
	3.4 Sub		-Analyse: MS-Verlaufsform 2	0		

3.4.1		Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose	20
3.4.2		Primär-progrediente Multiple Sklerose	22
	3.4.3	Sekundär-progrediente Multiple Sklerose	24
3	3.5 EDS	SS-Assoziation	26
4	Diskussi	on	30
5	Literatu	rverzeichnis	33

1 <u>Einleitung</u>

1.1 <u>Multiple Sklerose</u>

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine autoimmun-entzündliche neurologische Erkrankung, bei welcher es durch Inflammation und Demyelinisierung konsekutiv zu neuroaxonalem Schaden im Sinne einer Neurodegeneration kommt (Trapp & Nave 2008; Ferguson et al. 1997). Die MS verläuft in verschiedenen Formen, welche durch den klinisch-radiologischen Verlauf definiert werden (Lublin & Reingold 1996; Klineova & Lublin 2018). Der schubförmig remittierende Verlauf (RRMS) beschreibt eine episodische neurologische Verschlechterung mit kompletter oder partieller Remission der Symptomatik. Kommt es nach einer gewissen Zeit zu einer zusätzlichen Progression der neurologischen Symptomatik unabhängig von Schüben, handelt es sich um einen sekundär progressiven Verlauf (SPMS), es sind auch weiterhin Schübe zusätzlich zur Krankheitsprogression möglich. Bei der primär progressiven Form (PPMS) treten keine Schübe auf, von Beginn an erlebt der Patient eine schleichende Verschlechterung seines Zustands. In der Folge von inkomplett zurück gebildeten Schüben oder von Progression kommt es zu körperlichen Einschränkungen bis hin zur schweren Behinderung. Pathophysiologisch ist hier die Neurodegeneration durch neuroaxonalen Schaden als Ursache bekannt (Reich, Lucchinetti & Calabresi 2018). Insbesondere Gangstörungen stehen hier im Vordergrund. Quantifiziert wird das Ausmaß der Behinderung mittels des Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke 1983). Bildmorphologisch lässt sich hier ein Zusammenhang zwischen Behinderung und der Atrophie der grauen und weniger der weißen Substanz herstellen (Fisniku et al. 2008).

Die Pathogenese der MS ist vielschichtig und in vielen Details noch nicht verstanden. Etabliert ist die Hypothese der in der Peripherie aktivierten ZNS-Antigen spezifischen CD4+ T-Zellen, welche im Tiermodell nach Transfer in immunkompetente Tiere eine experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis mit Optikusneuritis (EAEON) auslösen konnten (Ben-Nun, Wekerle & Cohen 1981). Diskutiert wird, ob die CD4+ T-Zellen durch Kontakt mit Antigenen bzw. Antigenpräsentierenden Zellen aus dem ZNS aktiviert werden (Sospedra & Martin 2016), oder durch eine Kreuzreaktion mit einem Fremdantigen beispielsweise nach Impfungen oder viralen Infektionen (Fujinami & Oldstone 1985). Immer wiederkehrend wird die Rolle es Epstein-Barr-Virus (EBV) diskutiert. Eine aktuell Studie (Bjornevik et al. 2022), durchgeführt an Soldaten des US-Militärs, wies bei positiver EBV-Serologie ein erhöhtes Risiko an MS zu erkranken nach. ZNS-Antigen spezifische CD8+T-Zellen scheinen eine Rolle bei der Entwicklung eines ZNS-Schadens durch direktes Erkennen ihres Antigens auf den Neuronen zu spielen (Yshii et al. 2015). Darüber hinaus weist der Nachweis von oligoklonalen IgG Banden im Liquor auf eine Beteiligung der B-Zellen hin (Kabat, Moore & Landow 1942). Die monoklonalen anti-CD20-Antikörper Rituximab (Hauser et al. 2008),

Ocrelizumab (Mayer et al. 2019) und Ofatumumab (Hauser et al. 2020) nutzen dies therapeutisch. Im Rahmen des Entzündungsprozesses kommt es zu einer Migration von T-Zellen aus dem peripheren Blut in das Hirnparenchym, hierbei spielt das Oberflächenmolekül $\alpha 4\beta$ 1 Integrin eine Rolle, welches die Adhäsion der T-Zellen an aktivierte Endothelzellen der Bluthirnschranke vermittelt (Yednock et al. 1992). Der traficking agent Natalizumab verhindert diese Adhäsion. Eine neue Generation der MS-Therapie wird aktuell in Phase-3-Studien getestet: Brutons Tyrosin-Kinase Inhibitoren (BTK), bekannt aus der Onkologie, hemmen die B-Zell-Aktivierung und beeinflussen die B- und T-Zell-Interaktion (Li et al. 2022), in einer Phase 2 Studie wurde eine geringere Anzahl Kontrastmittel-aufnehmender Läsionen nachgewiesen (Montalban et al. 2019). Präklinisch wurde in Tiermodellen ein Einfluss auf die leptomeningeale Inflammation (Bhargava et al. 2021) sowie Remyelinisierung (Martin et al. 2020) gezeigt. Im Hirnparenchym kommt es kommt es zur Inflammation und Neurodegeneration (Frischer et al. 2009). Neben weiteren Mechanismen wird die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität als ursächlich für den neuroaxonalen Schaden in MS-Läsionen diskutiert, bei der es durch einen intrazellulären Ca²⁺-Einstrom zum Zelltod kommt; bereits im Jahr 1994 beschrieben Lipton und Rosenberg diesen Effekt ausführlich und diskutierten ein Vorkommen in diversen akut und chronisch neurodegenerativen Erkrankungen (Lipton & Rosenberg 1994). Auch in vivo konnte eine Erhöhung der Glutamatkonzentration via Magnetresonaz-Spektroskopie in und um MS-Läsionen nachgewiesen werden (Srinivasan et al. 2005). Im Jahr 2000 zeigten erste Experimente, welche eine Blockade der AMPA/ Kainat-Glutamatrezeptoren beinhalteten, in der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis im Tiermodell eine Verringerung des axonalen Schadens, ein vermehrtes Überleben der Olidodendrozyten sowie eine geringere Behinderung der Versuchstiere (Pitt, Werner & Raine 2000; Smith et al. 2000; Groom, Smith & Turski 2003).

Zur Behandlung der MS stehen mittlerweile diverse antiinflammatorische Agentien zur Verfügung, spezifisch anti-degenerative bzw. neuroprotektive Medikamente sind bisher nicht vorhanden.

1.2 <u>4-Aminopyridin</u>

4-Aminopyridin (4AP) ist ein oraler Kalium-Kanal-Blocker und wird seit längerem zur symptomatischen Therapie in der Neurologie eingesetzt (Leussink, Montalban & Hartung 2018). In seiner retardierten Form wurde 4AP sowohl von der *US Food and Drug Administration (FDA)* sowie der *European Medicines Agency (EMA)* zur symptomatischen Therapie von Gangstörungen im Rahmen der MS (*Expanded Disability Status Scale*, EDSS 4–7) zugelassen. Neben einer Verbesserung der motorischen und Geh-Fähigkeiten zeigte sich auch eine höhere Gehgeschwindigkeit (Goodman et al. 2007; Goodman et al. 2015; Goodman et al. 2010; Goodman et al. 2009; Hupperts et al. 2016). Eine weitere Arbeit konnte eine Verbesserung der Sehfähigkeit nachweisen (Horton et al. 2013).

Zuletzt wurden Effekte auf zerebrale Funktionen wie Kognition und Depression (Broicher et al. 2018) sowie Fatigue (Morrow, Rosehart & Johnson 2017) aufgezeigt.

Aktuell wird von einer Blockade von spannungs-abhängigen Kaliumkanälen und konsekutiver Verbesserung der axonalen Reizleitung als verantwortlichem Wirkmechanismus in der MS ausgegangen (Bostock, Sears & Sherratt 1981). Darüberhinaus ergeb sich Hinweise auf weitere Effekte des 4AP: so wiesen Schmalhofer et al. eine inhibierte T-Zell-Aktivierung nach (Schmalhofer et al. 2002). Auch wurden eine verringerte Demyelinisierung und Degeneration in der EAE im Tiermodell beschrieben (Jukkola et al. 2017).

1.3 Optische Kohärenztomographie und MS

Bei der optischen Kohärenztomographie (OCT) handelt es sich um ein nicht-invasives Verfahren, welches auf der Breitspektrum-Licht-Interferometrie beruht (Huang et al. 1991). Zunächst wurde es in der Ophthalmologie zur Darstellung der Netzhaut verwendet und hat seit einigen Jahren Einzug in die Neurologie gehalten. Gleich einer in vivo Histologie können die einzelnen retinalen Schichten dargestellt werden. In mittlerweile diversen Arbeiten konnten Veränderungen der retinalen Schichtdicken in MS-Patienten nachgewiesen werden, die erste Publikation beschrieb eine Reduktion der retinalen Nervenfaserschicht (RNFL), in welcher die Axone der retinalen Ganglienzellen verlaufen, welche den Sehnerv formen, bei Patienten mit MS (Parisi et al. 1999). Unabhängig von MS-Verlaufsform und stattgehabter Opticus-Neuritis (ON) konnten verringerte innere retinale Schichten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden (Albrecht et al. 2012). Auch einen Dickenverlust der Ganglienzellschicht (GCL), welche die Somata der retinalen Ganglienzellen enthält, wurde nach stattgehabter Opticus-Neuritis beobachtet (Syc et al. 2012). Eine Korrelation zwischen dem Dickenverlust der peripapillären retinalen Nervenfaserschicht (pRNFL) als innerste retinaler Schicht und einer Visusverschlechterung wurde publiziert (Trip et al. 2005; Talman et al. 2010). Ebenso konnten Zusammenhänge zwischen retinalen OCT-Messungen und Kernspintomographie-Untersuchungen festgestellt werden. Zu Beginn der MS weist ein Verlust an retinalen Axonen in der RNFL auf eine Schädigung der weißen Substanz hin (Young et al. 2013). In einer prospektiven Untersuchung über vier Jahre zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Atrophie des Komplexes aus Ganglienzell- und innerer plexiformer Schicht (GCIPL) und der Hirnatrophie, insbesondere der grauen Substanz, sowie der Läsionslastzunahme (Saidha et al. 2015). Eine weitere longitudinale Studie konnte eine moderate Korrelation zwischen RNFL-Verlust und Zunahme der Behinderung verdeutlichen (Garcia-Martin et al. 2017).

Zusammengefasst ist die Optische Kohärenztomographie mittlerweile eine etablierte Methode zur Intersuchung von neuroaxonalem Schaden, Neurodegeneration und -regeneration (Martínez-Lapiscina et al. 2014).

1.4 Präklinische Untersuchung der Wirkung von 4AP

Unter Führung von Michael Dietrich wurden in meiner Arbeitsgruppe sowohl in vitro als auch in vivo Experimente im Mausmodell der MS durchgeführt, um eine mögliche neuroprotektive Wirkung zu untersuchen (Dietrich et al. 2020). Der folgende Abschnitt zitiert aus der gemeinsamen Veröffentlichung (Dietrich et al. 2020). Im ersten Schritt wurde, wie bereits in vorherigen Studien etabliert, eine EAEON über 120 Tage durchgeführt (Dietrich et al. 2018), als Positiv-Kontrolle diente eine Fingolimod-Behandlung, eine immunmodulatorische Substanz zur Behandlung der MS, welches die Lymphozyten in den Lymphknoten sequestriert. Sowohl bei der prophylaktischen (7 Tage vor Immunisierung) als auch der frühen (ab dem Tag der Immunisierung) und späten Behandlung (ab Tag 14 nach Immunisierung) mit 4AP zeigte sich ein geringerer klinischer Behinderungsscore im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. In der OCT-Untersuchung wiesen die inneren retinalen Schichten eine geringere Degeneration im Verlauf von 120 Tagen auf, welches sich in der anschließenden histologischen Untersuchung der Retina in einer Reduktion des Verlusts der retinalen Ganglienzellzahl widerspiegelte. Auch nach Beendigung der Behandlung mit 4AP 21 Tage nach der Immunisierung zeigte sich ein prolongierter Effekt mit einer geringeren Behinderung der Mäuse über den weiteren Zeitverlauf, was auf einen über die symptomatische therapeutische Wirkung hinausgehenden Wirkmechanismus hinweist. Direkte neuroprotektive Effekte des 4AP konnten in mit den aus den Maus-Retinae gewonnenen Ganglienzell-Kulturen nicht nachgewiesen werden, hohe Konzentrationen des 4AP erwiesen sich als toxisch. In der histologischen Aufarbeitung der Sehnerven im Anschluss an die EAEON wiesen die mit dem Vehikel behandelten Tiere im Vergleich zu mit 4AP und Fingolimod behandelten Tieren größere Demyelinisierungsareale auf. Nach Fingolimod-Behandlung konnte zusätzlich eine Reduktion der Mikroglia-Aktivierung und T-Zell-Zahl nachgewiesen werden. Eine Kombinationstherapie von 4AP und Fingolimod führten zu einem akkumulierenden, abschwächenden Effekt auf den klinischen Behinderungsscore der Mäuse, war auf eine unterschiedliche Wirkweise der beiden Substanzen hindeutet. Ergänzend wurden Hirnschnitt-Kulturen aus C57BL/6J Mäusen Oxidationsstress mittels S-Nitrosoglutathion (GSNO) ausgesetzt, wobei sich unter 4AP-Behandlung ein geringerer Schaden an weißer Substanz und Myelin nachweisen ließ. Abschließend wurden murine Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (mOPCs) aus C57BL/6J Mäusen isoliert und näher untersucht, welche nach Behandlung mit 4AP sowohl ohne als auch mit Glutamat-induziertem Stress eine Reduktion der Caspase-Aktivität aufwiesen. Außerdem wurde die nukleäre Translokation von diversen Transkriptionsfaktoren untersucht, wobei sich kein Effekt auf den nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) nachweisen ließ, jedoch eine deutliche Erhöhung der Translokation des nuclear factor of activated T-cells (NFAT). Mittels fura2-basierter Calcium Messung konnte ein erhöhter Calcium-Einstrom in die mOPCs darstellt werden, welcher die NFAT-Translokation beeinflusst. Einen Einfluss auf die Differenzierung der mOPCs durch 4AP konnte mittels Myelin Basisprotein (MBP)-Färbung nicht aufgezeigt werden. Die spannungsgesteuerten Kalium-Kanäle scheinen bei diesem Effekt keine Rolle zu spielen, da unter der Kontroll-Behandlung von äquivalent untersuchten OPCs von Ratten mittels Tetraethylammonium (TEA, ebenfalls Blocker von spannungsabhängigen Kaliumkanälen) kein derartiger Einfluss detektiert werden konnte.

1.5 Ziele der Arbeit

In meiner Doktorarbeit sollte die neuroprotektive Wirkung von 4-Aminopyridin in Multipler Sklerose untersucht werden. Hierfür wurden Daten aus vorangegangen Untersuchungen mit entsprechenden Mausmodellen mit Patientendaten verglichen und so eine Translation vom präklinischen Experiment in die klinische Forschung durchgeführt. In ersten Tierversuchen hatte sich gezeigt, dass 4-Aminopyridin die Neurodegeneration der retinalen Nervenfaserschichten vermindert bzw. verlangsamt. Diese Entwicklung sollte auch in Augen von Patienten mit MS untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 <u>Stichprobe</u>

2.1.1 <u>Studienform</u>

Die Fragestellung wurde retrospektiv in einer Multicenter Studie untersucht. Die Fall-Gruppe bestand aus Patienten, welche 4-Aminopyridin einnahmen, die Kontroll-Gruppe aus MS-Patienten ohne dieses Medikament. Es wurden longitudinale Messungen ausgewertet.

2.1.2 Patientenrekrutierung

Die zu analysierende Stichprobe ergibt sich aus bereits mit dem OCT untersuchten Patienten, bei denen entsprechend den McDonald-Kriterien (2010) (Polman et al. 2011) eine MS diagnostiziert wurde und welche 4-Aminopyridin (2x10mg retard) einnehmen, und einer entsprechenden Kontrollgruppe. Der Kontrollarm setzt sich aus Patienten zusammen, welche in MS-Verlaufsform, Begleitmedikation sowie Erkrankungsdauer einem Patienten aus dem Studienarm entsprechen. Zu beachten ist, dass die Studienteilnahme in keinem Fall die Behandlung mit 4AP beeinflusste. Einflusskriterien waren das Alter (>18 Jahre) und die unterschriebene Weitere Einverständniserklärung. Des Weiteren mussten mindestens zwei OCT-Messungen pro Patienten durchgeführt worden sein: eine Baseline-Messung (v0) vor Beginn der Therapie mit 4AP sowie eine weitere (v1) nach mindestens neun Monaten. Dieser zeitliche Mindestabstand galt auch für die Kontrollkohorte. Optional war eine dritte Messung (v2) nach ebenfalls mindestens 9 weiteren Monaten. Ausschlusskriterien waren beispielsweise rezente Opticusneuritiden oder andere okuläre bzw. makuläre Pathologien wie bps. makuläre Drusen oder ein Glaukom, welche zu einer Verfälschung der OCT-Messung führen würden.

2.1.3 Datengewinnung

Da es sich um eine retrospektive Erhebung handelt, wurden alle verfügbaren Patientendaten ausgewertet. Zwischen Dezember 2015 und Dezember 2019 wurden die Patienten in den teilnehmenden Zentren rekrutiert: Universitätsklinikum der Heinrich Heine Universität Düsseldorf (HHU), Vrije Universiteit Medical Center Amsterdam (VUMC), University of California San Francisco (UCSF), Universitätsspital Zürich, Johns Hopkins Hospital Baltimore, Universitätsklinikum Barcelona Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), Technische Universität München (TU) und Charité Berlin. Schließlich ergab sich eine Studienpopulation von 52 4AP- und 51 Kontrollpatienten. Erstere waren durchschnittlich 53.23 ± 0.875, letztere 50.71±- 0.852 Jahre alt (p=0.040; zweiseitiger T-Test; Median 4AP: 55.0 Jahre, Kontrollen 51.00 Jahre), in beiden Gruppen fanden sich mehr Frauen als Männer (65.4 vs. 68.6 %; p=0.621). Neben den OCT-Messungen wurden allgemeine Patientendaten erfasst: MS-Verlaufsform, (antiinflammatorische) Begleitmedikation sowie EDSS in

den Intervallen vor der jeweiligen OCT-Untersuchung, Geburtsdatum, Erkrankungsjahr und Geschlecht. Ausgehend von Geburtsdatum und Erkrankungsjahr wurden das Alter und die Erkrankungsdauer (engl. *disease duration*, DD) zum Zeitpunkt des Baseline-OCT berechnet.

2.1.4 Kontrollenmatching

Für die Zuordnung von Kontrollpatienten wurde ein Matching-Protokoll ausgearbeitet, um jedem mit Fampridin behandelten Patienten einen Kontroll-Patienten zuordnen zu können. Da wir eher kleinere Fallzahlen bei erst rezenter Zulassung von Fampridin zum Zeitpunkt der Untersuchung erwarteten, war eine derartige Zusammenstellung der Kontroll-Gruppe notwendig, um die Unterschiede in allen Parametern so gering wie möglich zu halten und eine bessere Vergleichbarkeit der Gruppen zu ermöglichen. Hierfür wurden sechs Items ausgewählt, welche als mögliche *Confounder* in Frage kamen. Anschließend wurde eine Hierarchie der Items nach angenommener Relevanz erstellt:

- 1. MS-Subtyp (kodiert als 1=RRMS, 2=PPMS, 3= SPMS)
- 2. (Antiinflammatorische) Begleitmedikation in vier Kategorien:
 - 0. keine Medikation
 - 1. hochaktive Medikation: Natalizumab/ Fingolimod/ Alemtuzumab/ Rituximab
 - 2. Basismedikation: Glatiramercetat, Teriflunomid, Dimethylfumarat, Interferon beta
 - 3. Zytostatika: Mitoxantron/ Cyclophsophamid
- 3. Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt des Baseline-OCT (DD) in Kategorien:
 - 1. < 5 Jahre
 - 2. 5 bis 10 Jahre
 - 3. > 10.1 Jahre
- 4. Baseline pRNFL-Dicke: Einteilung nach den aus der gesamten Studienpopulation berechneten Tertilen:
 - 1. ≤77µm
 - 2. $77\mu m < pRNFL-Dicke \le 92\mu m$
 - 3. > 92μm
- 5. Alter zum Zeitpunkt des Baseline-OCT in Kategorien:
 - 1. 18-29 Jahre
 - 2. 30-39 Jahre
 - 3. 40-49 Jahre
 - 4. > 50 Jahre
- 6. Geschlecht:
 - 1. Männlich
 - 2. Weiblich

Die ersten drei Items beschreiben indirekt eine mögliche Krankheitsaktivität bzw. den Krankheitsverlauf und wurden als obligatorisch betrachtet, und mussten bei jedem Patienten-Match zutreffen. Die Items vier bis sechs wurden optional angewendet. Das heißt, bei mehreren in Frage kommenden Kontroll-Patienten, bei welchen die Items eins bis drei zutrafen, wurde mittels der weiteren Items ein Kontroll-Patient ausgewählt. Unterschiede in den Items zwischen Fall-Patient und Kontrolle wurden zusätzlich statistisch kontrolliert (s.u.).

2.2 Optische Kohärenztomographie

Die retinalen Schichten werden mittels Optischer Kohärenztomografie dargestellt. Durch Vergleich der Reflexion eines Referenzarms im Gerät mit dem Messarm im Gewebe können Querschnitte der Retina erstellt werden, auf denen die einzelnen Schichten gut zu erkennen sind. Mehrere solcher Schichtaufnahmen (=B-Scans) generieren ein dreidimensionales Bild der Retina. Alle bis auf ein Zentrum verwendeten das Spectralis™ Gerät der Firma Heidelberg Engineering zur Durchführung der OCT-Messungen, die Kollegen der Johns Hopkins Universität nutzen das spectral-domain Cirrus HD-OCT (Modell 4000, Software Version 6.0; Carl Zeiss Meditec) (Warner et al. 2011). Alle Aufnahmen entsprachen den Apostel Empfehlungen (Cruz-Herranz et al. 2016). Zunächst wurde in einem peripapillären Ringscan mit Zentrierung auf den Sehnervkopf die Dicke der peripapillären RNFL (pRNFL) bestimmt (Abbildung 1A). Bei dieser Messung werden in einem Durchmesser von 3,4mm 100 A-Scans, welche die Dicke der pRNFL messen, um den Sehnervkopf herum durchgeführt und anschließend automatisch der Mittelwert berechnet. Weiter wurde ein Volumenscan über der Macula lutea durchgeführt (Abbildung 1B), bei dem mehrere B-Scans zu einem Volumenscan zusammen gefügt werden. In Tabelle 1 sind Details bezüglich der Anzahl der B-Scans in den einzelnen Zentren aufgezeigt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software des jeweiligen OCT-Geräts: die B-Scans werden automatisch segmentiert, manuell werden eventuelle Abweichung korrigiert. Nach erfolgter Segmentation berechnet die Software das Volumen der einzelnen retinalen Schichten. Folgende Schichten wurden anschließend statistisch ausgewertet: makuläre gesamtretinale Dicke Dicke (mTRT), makuläre RNFL (mRNFL), makuläre GCIPL (mGCIPL) sowie makuläre innere nukleäre Schicht (mINL) (Abbildung 1C). Von allen Patienten wurden beide Augen gemessen, sofern ein Auge nicht aufgrund von Ausschlusskriterien (siehe oben) nicht verwendet werden durfte.



Abb. 1 Durchführung der optischen Kohärenztomographie. (A) Peripapillärer Ringscan um den Sehnervenkopf. Durchmesser 3,4mm. 100 A-Scans. (B) Makulärer Volumenscan, 25 B-Scans über der Macula lutea. (C) Makulärer Volumenscan, Aufzeigen der einzelnen Schichten in einem B-Scan.

Zentrum	Anzahl B-scans
Düsseldorf	25
San Francisco	19
Amsterdam	49
Zurich	25
Baltimore	Cirrus Macular Cube
	512x128 Protokoll
Barcelona	25
Technische Universität München	61
Ludwig-Maximillians University München	25
Berlin	61

Tabelle 1 Optische Kohärenztomographie – Technische Daten. Dargestellt ist die Anzahl der B-Scans der makulären Volumenscans der teilnehmenden Zentren.

OCT-Datenverarbeitung

Die Dicke der papillären RNFL (pRNFL, in µm), ermittelt mittels Ringscan, wurde direkt aus dem OCT-Auswertungsprogramm entnommen. Im Rahmen des Kontrollenmatchings berechneten wir aus den pRNFL-Werten zur Baseline-Messung der gesamten Studienpopulation drei Tertile. Wie oben beschrieben, errechnet das Auswertungsprogramm nach erfolgter Segmentierung des makulären Volumenscans die Volumina der einzelnen Schichten in mm³. Unter Verwendung der Formel für die Kreisformel und der durch die Auswertungsmaske (1,3,6mm Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study = EDTRS; siehe **Abbildung 2**) des OCT-Programms vorgegebenen Kreisfläche ließ sich so die durchschnittliche Dicke der einzelnen Schichten berechnen: mRNFL, mTRT, mGCIPL und mINL.



Abb. 2 Auswertung des makulären Volumenscans. Dargestellt wird die Auswertungsmaske 1,3,6 mm EDTRS der *Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study*.

2.3 Statistische Auswertung

2.3.1 <u>Allgemeines Vorgehen</u>

Retrospektiv wurden die Änderungen der Schichtdicken über die Zeit berechnet und zwischen beiden Gruppen verglichen. Zur Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel, GraphpadPrism sowie IBM SPSS Statistics 20 verwendet. Zwischen den Messzeitpunkten v0 und v1 bzw. v0 und v2 wurde die Änderung der Schichtdicken auf zwölf bzw. 24 Monate zur besseren Vergleichbarkeit annualisiert.

2.3.2 Vergleich beider Gruppen

Die Stichproben wurden zuerst bezüglich der demographischen Daten miteinander verglichen. Alter sowie Erkrankungsdauer zu Untersuchungsbeginn wurden mittels zweiseitigem T-Test verglichen, für den Vergleich von MS-Verlaufsform, Basistherapie und Geschlecht verwendeten wir den Chi-Quadrat-Test. Der ordinal skalierte EDSS wurde mittels Man-Whitney-U-Test verglichen. Ein Signifikanzniveau von p≥0.05 wurde als signifikant angesehen. Anschließend wurden die beiden Gruppen bezüglich der einzelnen Schichten in den OCT-Messungen untersucht. Es wurden zunächst die Mittelwerte mit Standardfehler der Baseline-Messung berechnet und beide Gruppen mittels zweiseitigem T-Test miteinander verglichen. Anschließend wurde die jährliche Dickenänderung für die Zeitpunkte v1 und v2 errechnet. Mittels des unten beschriebenen *Generezalized Estimation Equations Modells* (GEE) erfolgte der Vergleich der annualisierten Schichtdickenänderungen der 4AP-Gruppe mit denen der Kontroll-Gruppe.

2.3.3 Statistische Kontrolle von möglichen Confoundern

Schließlich erfolgte eine ausführliche Analyse des Datensatzes mit Hinblick auf den Einfluss möglicher *Confounder*. Auch Effekte der Inner-Subjekt-inter-Augen-Korrelation wurden untersucht. Hierfür nutzten wir erneut ein *Generalized Estimation Equations Modell* (GEE). Als Subjektvariabel wurde die für jeden Patienten erstellte Subjekt-Identifikationsnummer, als Innersubjektvariable die dichotome Variable "Auge" (1=rechts; 2=links) verwendet. Stetige Variablen waren das Alter sowie die Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der ersten OCT-Messung. Kategoriale Variablen waren die Therapie mit bzw. ohne Fampridin, die MS-Verlaufsform, der EDSS zum Zeitpunkt der ersten Messung, die Kategorie der (antiinflammatorischen) Begleitmedikation, die zuvor errechneten drei Percentile der pRNFL-Dicke sowie das Geschlecht.

In einer Sub-Analyse wurde zusätzlich der Effekt einer stattgehabten Optikusneuritis sowie eines klinischen Schubs während des Beobachtungszeitraums mit dem oben beschriebenen statistischen Modell untersucht.

11

2.3.4 Sub-Analyse: Unterschiede bei den MS-Verlaufsformen?

Zunächst berechneten wir die durchschnittlichen Änderungen der Schichtdicken über die Zeit wie bereits oben beschrieben, jedoch stratifiziert nach MS-Verlaufsform. Der anschließende Gruppenvergleich erfolge unter Verwendung des Man-Whitney-U-Tests, da aufgrund teilweise sehr kleiner Gruppengrößen keine Normalverteilung vorhanden war.

2.3.5 Untersuchung der Assoziation zwischen EDSS und Schichtdickenänderung

Der Median des EDSS (intervallskalierte Variable) wurde für die einzelnen Untersuchungszeitpunkte bestimmt und die Gruppen mittels Wilcoxon-Test für verbundene und mittels Man-Whitney-U-Test für nicht-verbundene Stichproben verglichen. Anschließend wurde eine mögliche Assoziation zwischen der Änderung des EDSS über die Zeit mit der Änderung der einzelnen Schichtdicken in der OCT-Untersuchung mittels der oben beschriebenen GEE-Modelle untersucht. Die Analyse erfolgte in den beiden Studienkohorten getrennt voneinander.

2.4 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hat das Dissertationsvorhaben am 04.12.2015 durch das Ethikvotum 4228R genehmigt. Die OCT-Messungen der Patienten erfolgen routinemäßig in der Neurologischen Klinik und sind durch das Ethikvotum 4389R abgedeckt.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 103 Patienten untersucht, 52 Fall-Patienten und 51 Kontrollen (**Abbildung 3**, Rekrutierungsprozess). 17 dieser Patienten wurden dem Düsseldorfer Patientenpool entnommen, die restlichen OCT-Datensätze wurden von kooperierenden Zentren in Amsterdam (VUMC; 4 Patienten), San Francisco (UCSF; 8 Patienten), Zürich (Universitätsspital; 6 Patienten), Baltimore (Johns Hopkins Hospital; 40 Patienten), Barcelona (Universitätsklinikum, 13 Patienten), München (LMU, 3 Patienten; TU 6 Patienten) und Berlin (Charité, 6 Patienten) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



Abb. 3 Rekrutierungsprozess. 4AP-Patienten = Fampridin-Patienten. HHU = Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. VUMC = Vrije Universiteit Medical Center Amsterdam. S.F. = University of California San Francisco. JH = Johns Hopkins University Baltimore. LMU = Ludwig-Maximilians-Universität München. TU = Technische Universität München.

Ausgeschlossen wurden anschließend in der 4AP-Kohorte ein Auge aufgrund einer retinalen Narbe und zwei aufgrund fehlender Daten sowie in der Kontroll-Kohorte ein Auge aufgrund einer rezenten Optikusneuritis und eins wegen fehlender Daten. Die von der John's Hopkins Universität zur Verfügung gestellten Patientendaten enthielten lediglich Angaben zur pRNFL und mGCIPL. Zuzüglich bei den Folge-Messungen auftretenden fehlenden Daten ergibt sich insgesamt die in **Abbildung 4** aufgezeigte Verteilung der jeweils zu den einzelnen Messzeitpunkten und in den einzelnen Schichten vorhandenen Daten.



Abb. 4 Übersicht über nach Ausschluss von Augen aufgrund fehlender Daten vorhandene Daten. 4AP = Fampridin. ON = Optikusneuritis. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexiforme Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht.

3.1 Demographische Daten

In dieser multicenter-Studie konnten letztendlich 52 4AP- und 51 Kontrollpatienten eingeschlossen werden. Erstere waren durchschnittlich 53.23 ± 0.875, letztere 50.71±- 0.852 Jahre alt (p=0.040; zweiseitiger T-Test), in den folgenden Analysen wurde u.a. für das Alter als möglichen *Confounder* kontrolliert. In beiden Gruppen fanden sich mehr Frauen als Männer (65.4 vs. 68.6 %; p=0.621). In den weiteren untersuchten Kategorien wie MS-Verlaufsform, Erkrankungsdauer sowie der Basis-Medikation fanden sich keine Unterschiede (siehe **Tabelle 2, Demographische Daten der beiden Studienkohorten**) (Dietrich et al. 2020).

	Einheit	4AP	Kontrollen	Statistik
n		52	51	
				t(204)=-2.066;
Alter	Jahre: MW ± SF	53.23 ± 0.875	50.71±- 0.852	p=0.040;
				zweiseitig
Geschlecht	% weiblich	65.4	68.6	X ² (1)=0.245;
Geschiecht	78 Weiblich	05.4	08.0	p=0.621
	% RRMS	15.4	15.7	$X^{2}(2)=0.571$
MS-Verlaufsform	% PPMS	38.5	43.1	(2)=0.371,
	% SPMS	46.2	41.2	p=0.752
				t(204)=-0.102;
Erkrankungsdauer	Jahre: MW ± SF	13.58 ± 0.903	13.45 ± 0.859	p=0.919;
	N/1\N/	1 895	4 610	zweiseitig
FDSS	Median	5	4.010	U=2824; z=-
2000	N	38	41	1.025; p=0.305
	% 1 (<77µm)	30.7	35	
pRNFI -Tertil	% 2 (77-92µm)	33.7	33.3	X ² (2)=0.611;
	% 2 (>92µm)	35.6	31.3	p=0.737
	% keine	51.9	60.8	
Baseline	% Aktiv	21.2	19.6	$X^{2}(3)=3.317$
Medikation	% Basis	17.3	15.7	n=0.345
	% Mito/ Cyclo	9.6	3.9	P 0.0 10
		5.0	5.5	

Tabelle 2 Demographische Daten der beiden Studienkohorten. 4AP = Fampridin. MW = Mittelwert. SF = Standardfehler. RRMS = schubförmig-remittierende Multiple Sklerose. PPMS = primär-progrediente Multiple Sklerose. SPMS = sekundär-progrediente Multiple Sklerose. EDSS = Expanded Disability Status Scale. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. Aktiv: Natalizumab/ Fingolimod/ Alemtuzumab/ Rituximab. Basis: Glatiramercetat, Teriflunomid, Dimethylfumarat, Interferon beta. Mito/ Cyclo: Mitoxantron/ CyclophsophamidAlter sowie Erkrankungsdauer wurden mittels zweiseitigem T-Test verglichen. Geschlecht, MS-Verlaufsform, pNRLF-Tertil und die Basis-Medikation wurden mittels Chi-Quadrat-Test verglichen. Der EDSS der beiden Gruppen wurde mithilfe des Man-Whitney-U-Tests untersucht.

3.2 Baseline Messung

Im ersten Schritt untersichten wir die jeweiligen Schichtdickten zum Zeitpunkt der ersten Messung mittels eines zweiseitigen t-Tests, welche in **Tabelle 3** und **Abbildung 5** dargestellt werden. Sowohl in der peripapillären RNFL als auch in allen makulär gemessenen Schichten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

	4AP	Kontrollen	Statistik
pRNFL [µm]	85.500 ± 1.412 (n=100)	83.720 ± 1.441 (n=99)	t(197)=-0.884; p=0.378
mTRT [µm]	298.642 ± 2.369 (n=62)	292.943 ± 2.593 (n=60)	t(120)=-1.625; p=0.107
mRNFL [µm]	30.325 ± 0.741 (n=61)	30.683 ± 0.764 (n=60)	t(119)=0.336; p=0.737
mGCIPL [μm]	63.574 ± 0.885 (n=97)	63.735 ± 0.986 (n=99)	t(194)=0.122; p=0.903
mINL [μm]	38.874 ± 0.533 (n=97)	38.928 ± 0.485 (n=99)	t(194)=0.075; p=0.941

Tabelle 2 Schichtdicken zur Baseline-Messung. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdicken in µm zum Zeitpunkt der ersten OCT-Messung jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. Vergleich mittels zweiseitigem t-Test. 4AP = Fampridin. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. Signifikanzniveau $p \le 0.05$.



Abb. 5 Schichtdicken zur Baseline-Messung. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdicken in µm zum Zeitpunkt der ersten OCT-Messung. 4AP = Fampridin. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht.

3.3 Longitudinaler Vergleich

Anschließend wurde die Änderung der Schichtdicken über die Zeit zwischen den beiden Studienkohorten miteinander verglichen. Die entsprechenden Daten sind in **Tabelle 4** zu finden. Die v1-Messung erfolgten in der 4AP-Gruppe 14.8 \pm 0.6 Monate nach der Baseline-Messung, in der Kontroll-Gruppe nach 16.6 \pm 0.9 Monate (p=0.105, zweiseitiger t-Test). Zwischen der Baseline- und v2-Messung lagen im Durchschnitt 28.2 \pm 1.3 Monate bei den Fampridin-Patienten und 32.0 \pm 2.0 Monate bei den Kontroll-Patienten (p=0.126, zweiseitiger T-Test). Die Änderungen der Schichtdicken wurden jeweils auf 12 (Δ v1-v0) und 24 Monate (Δ v2-v0) annualisiert. Der statistische Vergleich erfolgte mittels GEE-Analyse unter Kontrolle der intra-Subjekt-inter-Augen-Korrelation sowie der weiteren *Confounder* Alter, Geschlecht, MS-Verlaufsform, Basis-Therapie, EDSS sowie Baseline-pRNFL-Tertil (Dietrich et al. 2020).

	440	Kontrollen	Statistik: GEE 4AP vs.
	445	Kontronen	Kontrollen
pRNFL [μm]	-		
Δ ν1-ν0	-0.631 ± 0.319	0.270 ± 0.639	p = 0.798; n = 98/97
Δ ν2-ν0	-1.810 ± 0.417	0.320 ± 1.208	p = 0.137; n = 42/51
mTRT [μm]			
Δ ν1-ν0	-1.595 ± 0.618	-0.976 ± 0.630	p = 0.512; n = 61/59
Δ ν2-ν0	-1.351 ± 0.600	-2.064 ± 0.451	p = 0.330; n = 28/29
mRNFL [μm]			
Δ ν1-ν0	0.068 ± 0.198	-0.253 ± 0.157	p = 0.011; n = 60/59
Δ ν2-ν0	-0.022 ± 0.267	-0.622 ± 0.220	p < 0.001; n = 27/29
mGCIPL [µm]	-		
Δ ν1-ν0	-0.393 ± 0.164	-0.236 ± 0.163	p = 0.213; n = 96/94
Δ ν2-ν0	-0.230 ± 0.274	-0.577 ± 0.191	p = 0.883; n = 45/50
mINL [μm]			
Δ ν1-ν0	-0.214 ± 0.107	-0.077 ± 0.098	p = 0.679 ; n=96/94
Δ v2-v0	-0.471 ± 0.148	0.024 ± 0.116	p = 0.001 ; n=45/50

Tabelle 4 Longitudinaler Vergleich der Änderung der Schichtdicken im Verlauf von zwei Jahren. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdickenänderungen in µm jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. Der Gruppenvergleich zwischen den beiden Kohorten erfolgte mittels der GEE-Modelle unter Kontrolle der intra-Subjekt-inter-Augen-Korrelation sowie der *Confounder* Alter, Geschlecht, Erkrankungsdauer, MS-Verlaufsform, Basistherapie, pRNFL-Tertil sowie EDSS. 4AP = Fampridin. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. V0 = Baseline-Messung. $\Delta v1-v0$ = annualisierte Dickenänderung nach 12 Monaten $\Delta v2-v0$ = annualisierte Dickenänderung nach 24 Monaten). GEE: Generalised Estimations Equations. Signifikanzniveau p≤0.05, signifikante Werte fettgedruckt.



Abb. 6 Änderung der Schichtdicken im Verlauf von zwei Jahren. Dargestellt werden die jähelichen Dickenänderungen in µm nach 1 bzw. 2 Jahren. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. VO = Baseline-Messung. Δ = Änderungsrate pro Jahr. GEE: Generalised Estimations Equations. *Signifikanzniveau p≤0.05.

In der peripapillären Bestimmung der RNFL zeigte sich in der Fampridin-Kohorte ein Dickenverlust über die Zeit, während die Dicke in der Kontroll-Kohorte konstant blieb. Diese Tendenz zeigte sich in der GEE-Analyse jedoch nicht signifikant (**Abbildung 6A**). Der makuläre Volumenscan beschrieb bei der Messung der gesamtretinalen Dicke (mTRT) eine Abnahme im Verlauf von zwei Jahren, welche in beiden Kohorten zu verzeichnen war. Die Fampridin-Patienten verloren im Durchschnitt 1.351 ± 0.600 µm, während die Retina der Kontroll-Patienten um 2.064 ± 0.451 mm abnahm. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied (**Abbildung 6B**). Die makuläre RNFL zeigte nun in der Kontroll-Kohorte im Vergleich zur 4AP-Kohorte einen signifikant höheren Dickenverlust sowohl nach zwölf (4AP: 0.068 ± 0.198 µm; Kontrollen: -0.253 ± 0.157 µm; p=0.011) als auch nach 24 Monaten (4AP: -0.022 ± 0.267 µm; Kontrollen: -0.622 ± 0.220 µm; p<0.001) (**Abbildung 6C**). Der makuläre GCIPL-Komplex wiederum zeigte in der Kontroll-Gruppe einen stetigen Verlust an Dicke im Verlauf von zwei Jahren, in der 4AP-Gruppe wiederum kam ein Dickenverlust nach einem Jahr zur Darstellung, welcher sich nach dem zweiten Jahr wieder aufhob. Auch hier konnte in den GEE-Modellen kein Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden (**Abbildung 6D**). Die mINL zeigte in der 4AP-Gruppe einen Dickenverlust über die Zeit, welcher im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach 24 Monaten mit -0.471 \pm 0.148 µm (4AP) im Vergleich zu 0.024 \pm 0.116 µm (Kontrolle) signifikant war (p < 0.001, GEE) (**Abbildung 6E**) (Dietrich et al. 2020).

3.3.1 <u>Stattgehabte Opticus-Neuritis</u>

Ergänzend dazu führten wir eine Erweiterung des GEE-Modells um den *Confounder* einer Optikusneuritis > 6 Monate vor Studienbeginn (HON) durch, um den Einfluss auf die Baseline-Werte sowie auf die Hauptanalyse zu untersuchen. Von 71 Patienten waren Daten vorhanden und flossen in die Analyse ein. 24 Augen waren von einer Optikusneuritis vor dem Studienzeitraum betroffen, 14 davon aus der 4AP-Gruppe. Eine stattgehabte Optikusneuritis hatte einen signifikanten Einfluss auf die Baseline-Werte der Schichten pRNFL, mTRT, mRNFL (jeweils p<0.001; GEE) und mGCIPL (p=0.001; GEE). Auf die Dickenänderung der mRNFL nach 24 Monaten hatte die HON ebenfalls einen signifikanten Einfluss (p=0.007; GEE). Der im GEE-Modell errechnete Einfluss der 4AP-Therapie auf die Dickenänderung der mRNFL nach 12 und 24 Monaten war in dieser Analyse nicht mehr signifikant (12 Monate: p=0.059; 24 Monate: p=0.151; GEE). Auch auf die Änderung der Schichtdicke der mINL hatte die HON nach 24 Monaten einen Einfluss (p=0.020; GEE), auch hier war der Therapieeinfluss des 4AP nach 24 Monaten nicht mehr signifikant (p=0.159; GEE) (Dietrich et al. 2020).

3.3.2 <u>Klinischer Schub während des Beobachtungszeitpunktes</u>

In einer weiteren Analyse wurde das GEE-Modell erweitert, um den Einfluss eines klinischen Schubs während des Beobachtungszeitraums zu untersuchen. Vier Patienten der ausgewerteten Kohorte mit erfassten Daten zu dieser Fragestellung (59 Patienten) erlitten einen klinischen Schub (keine Optikusneuritis) in den ersten 12 Monaten des Beobachtungszeitraums, drei davon aus der Fampridin-Gruppe. 26 4AP- und 33 Kontroll-Patienten erlitten keinen Schub innerhalb der ersten 12 Monate. Nach erneuter Berechnung der GEE zeigte sich lediglich auf die Dickenänderung der mGCIPL ein signifikanter Einfluss durch den stattgehabten Schub (p=0.026; GEE). Hierdurch ergab sich im Gruppenvergleich zwischen 4AP-Patienten und den Kontrollen ebenfalls ein signifikanter Unterschied (p=0.042; GEE) (Dietrich et al. 2020).

Vier Patienten der ausgewerteten Kohorte (Information über stattgehabten Schub innerhalb des Beobachtungszeitraums, 32 Patienten) erlitten einen Schub innerhalb der gesamten 24 Monate, drei von ihnen aus der 4AP-Gruppe. 13 4AP- und 16 Kontroll-Patienten zeigten keinen Schub in diesem Zeitraum. Ein stattgehabter Schub hatte einen signifikanten Einfluss auf die Dickenänderung nach 24 Monaten in den Schichten pRNFL, mTRT und mRNFL. Der Einfluss der 4AP-Therapie wurde hierdurch nicht verändert. Lediglich die Dickenänderung der mINL war nach zusätzlicher Kontrolle für einen stattgehabten Schub nicht mehr signifikant zwischen den beiden Therapiegruppen (p=0.320; GEE) (Dietrich et al. 2020).

3.4 Sub-Analyse: MS-Verlaufsform

In einer Sub-Analyse wurde untersucht, ob es innerhalb der einzelnen MS-Verlaufsformen einen Unterschied bezüglich des Einflusses der Therapie mit Fampridin gibt. Zunächst berechneten wir die durchschnittlichen Änderungen der Schichtdicken über die Zeit nach Stratifikation nach MS-Verlaufsform. Anschließend erfolgte ein Gruppenvergleich beider Studienkohorten unter Verwendung des Man-Whitney-U-Tests (MWU; teilweise sehr kleine Gruppen).

3.4.1 Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose

Die Patienten mit einer schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose (siehe Tabelle 5) zeigten in der Kontroll-Kohorte einen signifikant stärkeren Dickenverlust der mTRT über 24 Monate als in der Fampridin-Kohorte (4AP: -0.070 ± 0.696 µm; Kontrolle: -3.445 ± 0.437 µm; p=0.011; MWU). Bei Analyse der mRNFL wiesen wir bereits in der Baseline-Messung eine signifikant höhere Dicke in der Kontrolle-Gruppe im Vergleich zur 4AP-Gruppe nach (4AP: 27.630 ± 1.898 μm; Kontrolle: 34.059 ± 1.449µm; p=0.034; MWU). Hier wiesen die 4AP-Patienten eine Dickenzunahme der mRNFL über 12 Monate auf, während die Kontroll-Patienten einen Dickenverlust verzeichneten (4AP: 1.005 ± 0.386µm; Kontrolle: -0.153 ± 0.351 µm; p=0.024; MWU). In der pRNFL hingegen zeigte sich in der 4AP-Gruppe ein stärkerer Dickenverlust nach 24 Monaten im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (4A): - $0.751 \pm 0.475 \,\mu\text{m}$; Kontrolle -0.594 $\pm 0.241 \,\mu\text{m}$; p=0.009 MWU). Die mGCIPL zeigte einen signifikant stärkeren Dickenverlust nach 24 Monaten in der Kontroll-Gruppe nach (4AP: -0.001 \pm 0.272 μ m; Kontrolle ± -0.747 0.283 μm; p=0.009; MWU). In der mINL konnte die Analyse einen Dickenverlust bei den 4AP-Patienten und eine Dickenzunahme bei den Kontroll-Patienten nach 12 Monaten nachweisen (4AP: -0.566 ± 0.176µm; Kontrolle: 0.271 ± 0.249µm; p=0.020; MWU), dieser Unterschied kehrte sich nach 24 Monaten um und zeigte nun einen stärkeren Dickenverlust in der Kontroll-Kohorte, jedoch ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Auf eine graphische Abbildung wurde aufgrund der sehr geringen Fallzahl in dieser Untergruppe verzichtet.

	4AP	Kontrollen	Statistik: 4AP vs. Kontrollen	
pRNFL [μm]				
v0	81.600 (4.320)	88.250 (4.115)	U=99.0; z=-0.832; p=0.405; n=15/16	
Δ ν1-ν0	0.125 (1.079)	-0.530 (0.347)	U=78.0; z=-1.663; p=0.096; n=15/16	
Δ v2-v0	-0.751 (0.475)	-0.594 (0.241)	U=0.0; z=-2.598; p=0.009; n=6/4	
mTRT [μm]				
v0	295.047 (6.581)	299.725 (4.395)	U=106.0; z=-0.554; p=0.579; n=15/16	
Δ v1-v0	-2.019 (0.814)	-0.664 (0.482)	U=86.0; z=-1.347; p=0.178; n=15/16	
Δ ν2-ν0	-0.070 (0.696)	-3.445 (0.437)	U=0.0; z=-2.598; p=0.009; n=6/4	
mRNFL [μm]				
v0	27.630 (1.898)	34.059 (1.449)	U=64.0; z=-2.217; p=0.027; n=15/16	
Δ v1-v0	1.005 (0.386)	-0.153 (0.351)	U=56.0; z=-2.534; p=0.011; n=15/16	
Δ v2-v0 0.381 (0.272) -0.269 (0.328) U=4.0; z=-1.732; p=0.		U=4.0; z=-1.732; p=0.083; n=6/4		
mGCIPL [µm]				
v0	60.707 (2.971)	64.693 (1.943)	U=90.0; z=-1.189; p=0.235; n=15/16	
Δ v1-v0	-0.959 (0.303)	-0.047 (0.403)	U=72.0; z=-1.910; p=0.056; n=15/16	
Δ v2-v0	-0.001 (0.272)	-0.747 (0.283)	U=0.0; z=-2.598; p=0.009; n=6/4	
mINL [μm]				
v0	36.377 (0.663)	36.048 (0.319)	U=96.0; z=-0.950; p=0.342; n=15/16	
Δ ν1-ν0	-0.566 (0.176)	0.271 (0.249)	U=42.0 z=-3.088; p=0.002; n=15/16	
Δ v2-v0	-0.263 (0.139)	-0.885 (0.439)	U=8.0; z=-0.866; p=0.386; n=6/4	

Tabelle 5 Änderungen der Schichtdicken bei Patienten mit RRMS. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdicken in µm zum Zeitpunkt der ersten OCT-Messung sowie die jährliche Änderung nach 12 bzw. 24 Monaten. Jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. RRMS = schubförmig remittierende Multiple Sklerose. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. v0 = Baseline-Messung. Δ v1 – v0 = annualisierte Dickenänderung nach 12 Monaten. Δ v2 – v0 = annualisierte Dickenänderung nach 24 Monaten. Gruppenvergleich mittels Man-Whitney-U-Test.

3.4.2 Primär-progrediente Multiple Sklerose

Die Gruppe von Patienten mit primär progredienter MS war größer, sodass hier eine graphische Darstellung der Ergebnisse (**Tabelle 6**) in **Abbildung 7** erfolgte. Die Baseline-Werte der beiden Therapiegruppen unterschieden sich in keiner Schicht signifikant. Die 4AP-Patienten zeigten in der pRNFL einen stärkeren Dickenverlust, welcher nach 24 Monaten signifikant war (4AP: -1.926 ± 0.823 µm; Kontrollen: -1.075 ± 0.583 µm; p= 0.019; MWU) (**Abbildung 7A**). Ein ähnlicher Verlauf lässt sich in der mTRT darstellen, jedoch ohne Signifikanzniveau zu erreichen (**Abbildung 7B**). In der mRNFL zeigt sich nach 12 Monaten ein paralleler Verlauf der Dickenreduktion, nach 24 Monaten zeigen hier die Kontroll-Patienten eine stärkere Dickenreduktion (**Abbildung 7C**), jedoch ebenfalls ohne signifikanten Unterschied. Die Fampridin-Patienten wiesen in der mGCIPL im Beobachtungszeitraum ebenfalls einen stärkeren Dickenverlust als die Kontroll-Gruppe auf, welcher nach 12 Monaten signifikant war (4AP: -0.734 ± 0.394 µm; Kontrollen: -0.205 ± 0.334 µm; p=0.014; MWU) (**Abbildung 7D**). In der mINL schließlich zeigten sich keine Gruppenunterschiede (**Abbildung 7E**).

	4AP	Kontrollen	Statistik: 4AP vs. Kontrollen	
pRNFL [μm]				
v0	91.59 (1.978)	88.23 (2.076)	U=722.0; z=-1.584; p=0.113; n=41/44	
Δ v1-v0	-0.364 (0.257)	0.680 (0.770)	U=672.0; z=-1.870; p=0.061; n=41/44	
Δ v2-v0	-1.926 (0.823)	-1.075 (0.583)	U=82.0; z=-2.342; p=0.019; n=14/22	
mTRT [μm]				
v0	295.206 (3.468)	290.182 (4.617)	U=408.0; z=-0.187; p=0.852; n=28/30	
Δ v1-v0	-2.492 (1.520)	-1.447 (1.389)	U=324.0; z=-1.495; p=0.135 n=28/30	
Δ v2-v0	-3.389 (1.508)	-0.243 (1.105)	U=68.0; z=-0.117; p=0.907; n=10/14	
mRNFL [μm]				
v0	31.258 (1.039)	30.603 (1.071)	U=372.0; z=-0.747; p=0.455; n=28/30	
Δ ν1-ν0	-0.404 (0.219)	-0.386 (0.172)	U=408.0; z=-0.187; p=0.852; n=28/30	
Δ v2-v0	0.166 (0.752)	-1.188 (0.507)	U=48.0; z=-1.292; p=0.197; n=10/14	
mGCIPL [µm]				
v0	64.849 (1.350)	64.172 (1.702)	U=884.0; z=-0.158; p=0.874; n=41/44	
Δ ν1-ν0	-0.734 (0.394)	-0.205 (0.334)	U=590.0; -2.469; p=0.014; n=41/42	
Δ v2-v0	-1.916 (0.413)	-0.517 (0.361)	U=176.0; z=-0.599; p=0.54; n=18/22	
mINL [μm]				
v0	37.054 (0.901)	38.132 (0.876)	U=830.0; z=-0.633; p=0.526; n=41/44	
Δ v1-v0	-0.223 (0.241)	-0.225 (0.171)	U=708.0; z=-1.395; p=0.163; n=41/42	
Δ v2-v0	-0.472 (0.337)	-0.20 (0.095)	U=168.0; z=-0.817; p=0.414; n=18/22	

Tabelle 6 Änderungen der Schichtdicken bei Patienten mit PPMS. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdicken in µm zum Zeitpunkt der ersten OCT-Messung sowie die jährliche Änderung nach 12 bzw. 24 Monaten. Jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. PPMS = primär progrediente Multiple Sklerose. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. v0 = Baseline-Messung. $\Delta v1 - v0$ = annualisierte Dickenänderung nach 12 Monaten. $\Delta v2 - v0$ = annualisierte Dickenänderung nach 24 Monaten. Gruppenvergleich mittels Man-Whitney-U-Test.



Abb. 7 Änderung der Schichtdicken im Verlauf von zwei Jahren bei Patienten mit PPMS. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdickenänderungen in µm nach 12 bzw. 24 Monaten. Jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. v0 = Baseline-Messung. v1 = Messung nach 12 Monaten. v2 = Messung nach 24 Monaten. GEE: Generalised Estimations Equations. *Signifikanzniveau p≤0.05. Gruppenvergleich mittels Man-Whitney-U-Test.

3.4.3 <u>Sekundär-progrediente Multiple Sklerose</u>

Zuletzt wurde auch die Untergruppe der Patienten mit sekundär progredienter MS untersucht (**Tabelle 7, Abbildung 8**). Einzig die mTRT zeigte einen signifikanten Unterschied in der Baseline-Messung, die 4AP-Patienten wiesen eine dickere Schicht auf (4AP: 304.104 ± 3.936 µm; Kontrollen: 286.251 ± 3.825 µm; p=0.002; MWU). In der pRNFL zeigte sich nach 12 Monaten eine parallele Entwicklung der Schichtdicken, während nach 24 Monaten die 4AP Patienten einen größeren Dickenverlust aufwiesen (**Abbildung 8A**), jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus. Die Dickenänderung der mTRT verlief in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied (**Abbildung 8B**). In der mRNFL konnte nach 24 Monaten in der Fampridin-Kohorte eine geringere Dickenreduktion aufgezeigt werden (**Abbildung 8C**), jedoch ohne signifikanten Unterschied. Der mGCIPL-Komplex hingegen zeigte in der 4AP-Gruppe eine Dickenzunahme, während es in der Kontroll-Gruppe zu einer Reduktion kam (**Abbildung 8D**). Nach 24 Monaten war dieser Unterschied signifikant (4AP: $0.345 \pm 0.455 \mu$ m; Kontrollen: $-0.585 \pm 0.265 \mu$ m; p=0.021; MWU). die mINL zeigte zunächst keinen Unterschied der Dickenänderung nach 12 Monaten. Nach 24 Monaten jedoch

	4AP	Kontrollen	Statistik: 4AP vs. Kontrollen	
pRNFL [μm]				
v0	81.82 (1.862)	79.42 (2.105)	U=760.0; z=-1.234; p=0.217; n=45/40	
Δ v1-v0	-0.852 (0.573)	-0.631 (0.452)	U=730.0; z=-1.145; p=0.252; n=45/38	
Δ v2-v0	-2.151 (0.612)	-0.707 (0.529)	U=258.0; z=-0.363; p=0.717; n=22/25	
mTRT [μm]				
v0	304.104 (3.936)	286.251 (3.825)	U=56.0; z=-3.137; p=0.002; n=20/15	
Δ v1-v0	-0.190 (0.590)	-0.433 (0.451)	U=148.0; z=-0.067; p=0.947; n=20/15	
Δ v2-v0	-1.119 (1.028)	-1.297 (0.467)	U=58.0; z=-0.812; p=0.417; n=12/12	
mRNFL [μm]				
v0	31.964 (1.210)	28.563 (1.476)	U=92.0; z=-1.936; p=0.053; n=20/15	
Δ v1-v0	-0.074 (0.448) -0.139 (0.466) U=140.0; z=-0.334; p=0.739		U=140.0; z=-0.334; p=0.739; n=20/15	
Δ v2-v0 -0.135 (0.452) -0.409 (0.265)		U=64.0; z=-0.63; p=0.643; n=12/12		
mGCIPL [µm]				
v0	63.345 (1.301)	63.070 (1.536)	U=830.0; z=-0.448; p=0.654; n=44/40	
Δ v1-v0	0.031 (0.168)	-0.356 (0.175)	U=736.0; z=-1.2900; p=0.197; n=44/40	
Δ v2-v0	0.345 (0.455)	-0.585 (0.265)	U=202.0; z=-2.304; p=0.021; n=24/27	
mINL [μm]				
v0	41.506 (0.770)	41.271 (0.690)	U=822.0; z=-0.520; p=0.603; n=44/40	
Δ v1-v0	0.149 (0.136)	-0.077 (0.130)	U=806.0; z=-0.663; p=0.507; n=44/40	
Δ ν2-ν0	-0.842 (0.219)	0.240 (0.204)	U=128.0; z=-3.442; p=0.001; n=24/25	

nahm die mINL in der 4AP-Gruppe ab, während die Kontroll-Patienten keine Reduktion erfuhren (4AP: -0.842 \pm 0.219 µm; Kontrollen: 0.240 \pm 0.204 µm; p=0.001; MWU) (**Abbildung 8E**).

Tabelle 7 Änderungen der Schichtdicken bei Patienten mit SPMS. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdicken in µm zum Zeitpunkt der ersten OCT-Messung sowie die jährliche Änderung nach 12 bzw. 24 Monaten. Jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. SPMS = sekundär progrediente Multiple Sklerose. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. v0 = Baseline-Messung. Δ v1 – v0 = annualisierte Dickenänderung nach 12 Monaten. Δ v2 – v0 = annualisierte Dickenänderung nach 24 Monaten. Gruppenvergleich mittels Man-Whitney-U-Test.



Abb. 8 Änderung der Schichtdicken im Verlauf von zwei Jahren bei Patienten mit SPMS. Aufgezeigt werden die durchschnittlichen Schichtdickenänderungen in µm nach 1 bzw. 2 Jahren. Jeweils unter Angabe des Mittelwertes und Standardfehlers. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht. v0 = Baseline-Messung. v1 = Messung nach 12 Monaten. v2 = Messung nach 24 Monaten. GEE: Generalised Estimations Equations. *Signifikanzniveau p≤0.05. Gruppenvergleich mittels Man-Whitney-U-Test.

3.5 EDSS-Assoziation

Zuletzt wurde eine mögliche Assoziation zwischen der zeitlichen Entwicklung des EDSS und der Änderungen der einzelnen Schichtdicken analysiert. Im Verlauf vom untersuchten Zeitraum von zwei Jahren ließ sich in beiden Gruppen ein Anstieg im EDSS nachweisen, welcher jedoch weder im Vergleich zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten noch im Gruppenvergleich zwischen den beiden Kohorten einen signifikanten Unterschied aufwies (siehe **Tabelle 8** und **Abbildung 9**).

ED	SS	4AP	Kontrollen	Statistik ^b
v0	Median (n)	5 (38)	4 (41)	p=0.305
v1	Median (n); p ^a	5.5 (34); p=0.096	4.333 (38) p=0.380	p=0.088
Δ v1-v0	Median (n)	0 (34)	0 (38)	p=0.814
v2	Median (n); p ^a	6.0 (17); p=0.120	5.544 (15); p=0.078	p=0.588
Δ ν2-ν0	Median (n)	0 (17)	0 (15)	p=0.931

Tabelle 8 Änderung des EDSS über die Zeit. Dargestellt werden der Baseline-Wert v0 sowie die annualisierten Scores zum Zeitpunkt v1 und v2. Zudem wurden die annualisierten Änderungen zwischen den Zeitpunkten v0 und v1 sowie v0 und v2 berechnet. ^a Gruppenvergleich v1 bzw. v2 gegen v0 mittels Wilcoxon-Test. ^b Gruppenvergleich 4AP gegen Kontrollen mittels Man-Whitney-U-Test. *EDSS = Expanded Disability Status Scale.* 4AP= Fampridin. v0= Baseline-Messung. v1 = Messung nach 12 Monaten. v2 = Messung nach 24 Monaten. Δ v1 – v0 = annualisierte Dickenänderung nach 12 Monaten. Δ v2 – v0 = annualisierte Dickenänderung nach 24 Monaten.



Abb. 9 Verlauf des EDSS über die Zeit. EDSS = Expanded Disability Status Scale.

Folgend analysierten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen den Änderungen im EDSS und den Änderungen der einzelnen Schichten über den Zeitraum der untersuchten zwei Jahre (**Tabelle 9**) mittels der bereits beschriebenen GEE-Modelle.

Assoziations	faktoren		4AP	к	ontrollen	
Faktor 1	Faktor 2	В	p(n)	В	p (n)	
pRNFL [µm]	pRNFL [μm]					
EDSS Δ 12 Monate	Δ12 Monate	0.265	p=0.378; n=68	0.693	p=0.313; n=73	
EDSS 12 Monate	12 Monate	2.408	p=0.069; n=68	-2.268	p=0.064; n=73	
EDSS Δ 24 Monate	Δ 24 Monate	-0.456	p=0.353; n=32	2.709	p=0.070; n=30	
EDSS 24 Monate	24 Monate	-0.030	p=0.993; n=32	0.801	p=0.528; n=30	
mTRT [μm]						
EDSS & 12 Monate	Δ 12 Monate	0.448	p=0.293; n=53	-0.096	p=0.835; n=48	
EDSS 12 Monate	12 Monate	2.443	p=0.310; n=53	-4.441	p=0.002; n=48	
EDSS Δ 24 Monate	Δ 24 Monate	-0.178	p=0.830; n=28	4.097	p<0.001; n=15	
EDSS 24 Monate	24 Monate	-1.562	p=0.773; n=28	-0.885	p=0.792; n=15	
mRNFL [μm]						
EDSS Δ 12 Monate	Δ12 Monate	0.122	p=0.453; n=52	-0.229	p=0.249; n=48	
EDSS 12 Monate	12 Monate	0.995	p=0.095; n=52	-2.032	p<0.001; n=48	
EDSS Δ 24 Monate	Δ 24 Monate	-0.383	p=0.113; n=27	-0.400	p=0.485; n=15	
EDSS 24 Monate	24 Monate	-0.496	p=0.720; n=27	-0.559	p=0.523; n=15	
mGCIPL [μm]						
EDSS Δ 12 Monate	Δ12 Monate	0.137	p=0.649; n=66	0.300	p=0.106; n=71	
EDSS 12 Monate	12 Monate	1.446	p=0.058; n=66	-1.390	p=0.112; n=71	
EDSS Δ 24 Monate	Δ 24 Monate	0.295	p=0.417; n=33	0.462	p=0.211; n=29	
EDSS 24 Monate	24 Monate	1.940	p=0.380; n=33	0.216	p=0.881; n=29	
mINL [μm]				•		
EDSS Δ 12 Monate	Δ 12 Monate	0.131	p=0.439; n=66	0.052	p=0.631; n=71	
EDSS 12 Monate	12 Monate	0.475	p=0.293; n=66	0.300	p=0.490; n=71	
EDSS Δ 24 Monate	Δ 24 Monate	-0.10	p=0.934; n=33	0.461	p=0.052; n=29	
EDSS 24 Monate	24 Monate	-0.814	p=0.281; n=33	0.154	p=0.837; n=29	

Tabelle 9 Assoziation der Veränderungen des EDSS mit der Änderung der Schichtdicken. Die Berechnungen erfolgten mittels GEE-Modellen unter Kontrolle von Erkrankungsdauer und Geschlecht, stratifiziert nach Behandlungs-Kohorten. Faktor 1 = EDSS (*Expanded Disability Status Scale*): annualisierte Änderung über 12 bzw. 24 Monate (Δ 12 bzw. Δ 24 Monate) sowie annualisierter Status zum Messpunkt 12 bzw. 24 Monate. Faktor 2: entsprechend annualisierte Dickenänderung bzw. annualisierte Dicke nach 12 bzw. 24 Monaten. pRNFL = peripapilläre retinale Nervenfaserschicht. mTRT = makuläre gesamtretinale Dicke. mRNFL = makuläre retinale Nervenfaserschicht. mGCIPL = makuläre Ganglienzell- und innere plexifome Schicht. mINL = makuläre innere nukleäre Schicht.

Wir konnten nachweisen, dass in der Kontroll-Gruppe ein höherer EDSS nach zwölf Monaten mit einer dünneren makulären gesamtretinalen Dicke (mTRT: B=-0.441; p=0.002; GEE) und einer dünneren makulären retinalen Nervenfaserschicht (mRNFL: B=-2.032; p<0.001; GEE) assoziiert waren. In der Fampridin-Kohorte konnte dieser Effekt nicht aufgezeigt werden (mTRT: B=2.443; p=0.310 // mRNFL: B=0.995; p=0.095 // jeweils GEE). In der pNRLF sowie der mGCIPL und mINL konnte in keiner der Therapiegruppen ein Unterschied beschrieben werden (Dietrich et al. 2020).

4 <u>Diskussion</u>

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Einfluss von Fampridin auf die neuronale Degeneration in der Retina in einer longitudinalen Studie bei MS-Patienten untersucht. In kurzen Beobachtungszeiträumen kann die Kontrolle des *EDSS* diskrete Veränderungen schlechter erfassen, sodass sich die Verlaufsmessung mittels nicht-invasiver *in vivo* Messung retinaler Parameter leichter vom präklinischen ins klinische Setting übertragen ließ. Aufgrund zunehmender Verfügbarkeit und Einbettung in die klinische Routine sowie Etablierung als verlässlicher Verlaufsparameter bietet sich die Optische Kohärenztomographie ebenfalls an. Gemeinsam mit dem IMSVISUAL Konsortium (Balcer et al. 2018) konnten insgesamt 52 Patienten mit longitudinalen OCT-Messungen sowie 51 gematchte Kontrollen identifiziert werden. Die zuvor bereits im Tiermodell aufgezeigten protektiven Effekte konnten teilweise auch in den Humandaten reproduziert werden (Dietrich et al. 2020). Die Ergebnisse wurden gemeinsam in der Zeitschrift Brain nach einem *Peer-Review* (Englisch Gutachten durch Fachleute) veröffentlicht (Dietrich et al. 2020). Trotz unterschiedlicher OCT-Protokolle und -Geräte in der humanen Population ist die Vergleichbarkeit der Daten bereits in der Vergangenheit bestätigt worden (Gonzalez Caldito et al. 2018).

Wir konnten eine geringere Atrophierate der makulären RNFL bei den mit Fampridin behandelten Patienten im Vergleich zu den Kontroll-Patienten nachweisen. Die peripapilläre RNFL hingegen zeigte eine genau gegenläufige Tendenz ohne Erreichen des Signifikanzniveaus. Dieser Widerspruch ist teilweise auf die unterschiedliche Anzahl an untersuchten Augen in den jeweiligen Schichten zurückzuführen, da die Kollegen der Johns Hopkins University keine Daten zur mRNFL erhoben haben. Zuletzt scheint die makuläre RNFL, obwohl sie insgesamt dünner als um den Kopf des Sehnerven ist, sensitiver Atrophien aufzuzeigen (Stellmann et al. 2017). Die gesamtretinale Dicke sowie die Dicke des GCIPL-Komplexes zeigten im makulären Volumenscan eine annähernd parallel verlaufende Reduktion ohne signifikanten Gruppenunterschied. Syc et al. konnten in einer prospektiven Untersuchung nach Opticus-Neuritis eine signifikante Reduktion der mGCIPL nach drei sowie sechs Monaten nachweisen (Syc et al. 2012) und zeigten damit ähnliche Effekte in der akuten Phase der Erkrankung. Möglicherweise weist die mRNFL eine Neurodegeneration schneller auf als der GCIPL-Komplex, welcher die Zellsomata und den Dendritenbaum der retinalen Ganglienzellen enthält, während in der mRNFL nur die Axone enthalten sind. Der Dickenverlust der mGCIPL fiel geringer aus als in einer vorherigen Studie der KollegInnen Balk et al (Balk et al. 2016), welche in einem Zeitraum von zwei Jahren einen Dickenverlust von durchschnittlich 1,1 µm beobachteten. Die makuläre INL zeigte keine relevante Dickenänderung, ähnlich wie in unserer Kontroll-Kohorte (Balk et al. 2016). Die Fampridin-Kohorte unserer Studie hingegen wies nach 24

30

Monaten eine höhere Dickenreduktion der mINL nach. Die Ursache hierfür verbleibt unklar, denkbar wäre die Abnahme eines (entzündlichen) Ödems in dieser Schicht. Longitudinale Untersuchungen der gesamtretinalen Dicke (mTRT) sind bisher nicht erfolgt, unsere Studie hat unabhängig von der Behandlung mit Fampridin eine Dickenreduktion über die Zeit auch in der chronischen Krankheitsphase aufgezeigt.

Wie bereits vorherige Studien zeigten (Albrecht et al. 2012), hatte eine stattgehabte Optikusneuritis einen signifikanten Einfluss auf die Baseline Werte aller Schichten.

Bereits im Jahr 2009 wurden unterschiedliche Dicken der pRNFL bei verschiedenen MS-Verlaufsformen beschrieben (Costello et al. 2009), Patienten mit SPMS zeigten hier geringe Werte als diejenigen mit RRMS oder einem Klinisch isolierten Syndrom (CIS). In der longitudinalen Untersuchung zeigten sich jedoch in allen Gruppen keine signifikanten Änderungen. Henderson et al. beschrieben eine signifikante Dickenreduktion der pRNFL und dem makulären Volumen bei Patienten mit SPMS im Vergleich zu gesunden Kontrollen, jedoch nicht bei Patienten mit PPMS (Henderson et al. 2008). Die vorliegenden Ergebnisse der Analyse bei Patienten mit schubförmigremittierender MS sind aufgrund der sehr geringen Fallzahl mit Vorsicht zu genießen und sollten in einem größeren Rahmen erneut untersucht werden. Bei den Patienten mit primär und sekundär progredienter MS zeigte sich in den Schichten pRNFL, mTRT und mRNFL ein annähernd paralleler Verlauf zwischen beiden Gruppen, jedoch eine Dickenzunahme der mGCIPL in der Fampridin-Gruppe bei Patienten mit SPMS. Diese unterschiedliche Entwicklung könnte ein Hinweis auf unterschiedliche pathophysiologische Abläufe beider Krankheitsentitäten sein.

Um longitudinale Veränderungen und insbesondere Atrophieraten über zwei Jahre untersuchen zu können, war die Fallzahl in dieser Studie gering. Zudem ist der Indikations-Bias bei retrospektiver Auswahl von bereits therapierten Patienten zu beachten. Mittels vorher definierter Matching-Kriterien zur Zuordnung der 4AP-Patienten und ihren Kontroll-Patienten wurde versucht, diesen Bias so gering wie möglich zu halten und möglichst gleichmäßige Gruppen zu erhalten. Die demographischen Daten zur Baseline-Messung zeigen entsprechend bis auf das in der Fampridin-Gruppe höhere Alter keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen auf. Auch die Schichtdicken zur Baseline-Messung unterschieden sich nicht. Dringend ist eine prospektive Studie nötig, welche mittels Randomisierung die Gruppen einteilt, um die Nachteile einer retrospektiven Studie umgehen zu können.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden aufgrund der Zulassungssituation (Gehbehinderung mit EDSS 4 – 7) notgedrungen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium ohne akute Optikusneuritis vorgenommen, und haben somit die chronische retinale Degeneration untersucht. Ursächlich

hierfür ist die Zulassung von Fampridin nur für Patienten mit einer Gehbehinderung in einem Krankheitsstadium, in welchem Optikusneuritiden nur noch selten vorkommen. Im Gegensatz hierzu wurden die präklinischen Versuche in einem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis mit Optikusneuritis durchgeführt und konsekutiv die akute Neurodegeneration erfasst. Eine prospektive randomisierte Studie mit Fokus auf den Effekt einer Fampridin-Therapie in der akuten Optikusneuritis könnte hier ggf. in einem kürzeren Beobachtungszeitraum bereits entsprechende Ergebnisse erzielen.

Die von uns verwendete Wirkstoffkonzentration in den Tier-Modellen war ungefähr dreimal höher als die Äquivalentdosis in der Behandlung von Patienten mit MS. Auch der Zusatznutzen von Fampridin auf eine Therapie mit Fingolimod konnte aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht auf die Humandaten übertragen werden. Hier würde sich zusätzlich großes Potential für die konkomitante Therapie zu einer bestehenden Immunmodulation ergeben.

Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten nach Bestätigung in einer prospektiven randomisierten Studie einen großen Einfluss auf die Therapie der MS erlangen. Trotz der Vielzahl an immunmodulatorischen Therapien fehlt es aktuell an protektiven Ansätzen für axonale und neuronale Degeneration. Nachdem bereits in präklinischen Daten ein indirekter neuroprotektiver Effekt von Fampridin nachgewiesen werden konnte (Dietrich et al. 2020), erfolgte nun die Untersuchung in einer retrospektiven Studie in Patienten mit MS. Gemäß der Zulassung wird Fampridin Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium und einer Gehbehinderung (EDSS 4 – 7) zur symptomatischen Behandlung verschrieben. Bei fehlendem Therapieeffekt, zum Beispiel einer Verbesserung im 25-Foot-Walk, wird es wieder abgesetzt. Sollte sich der mögliche neuroprotektive Effekt in folgenden Studien bestätigen, könnte das Medikament deutlich mehr Patienten unabhängig vom rein symptomatischen Effekt verschreiben werden können.

5 Literaturverzeichnis

Albrecht, P, Ringelstein, M, Muller, AK, Keser, N, Dietlein, T, Lappas, A, Foerster, A, Hartung, HP, Aktas, O & Methner, A 2012, 'Degeneration of retinal layers in multiple sclerosis subtypes quantified by optical coherence tomography', Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England), vol. 18, no. 10, pp. 1422–1429.

Balcer, LJ, Balk, LJ, Brandt, AU, Calabresi, PA, Martinez-Lapiscina, EH, Nolan, RC, Paul, F, Petzold, A & Saidha, S 2018, 'The International Multiple Sclerosis Visual System Consortium: Advancing Visual System Research in Multiple Sclerosis', *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society*, vol. 38, no. 4, pp. 494–501.

Balk, LJ, Cruz-Herranz, A, Albrecht, P, Arnow, S, Gelfand, JM, Tewarie, P, Killestein, J, Uitdehaag, BMJ, Petzold, A & Green, AJ 2016, 'Timing of retinal neuronal and axonal loss in MS: a longitudinal OCT study - PubMed', *Journal of neurology* [12 August 2020].

Ben-Nun, A, Wekerle, H & Cohen, IR 1981, 'The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis', *European Journal of Immunology*, vol. 11, no. 3, pp. 195–199.

Bhargava, P, Kim, S, Reyes, AA, Grenningloh, R, Boschert, U, Absinta, M, Pardo, C, van Zijl, P, Zhang, J & Calabresi, PA 2021, 'Imaging meningeal inflammation in CNS autoimmunity identifies a therapeutic role for BTK inhibition', *Brain*, vol. 144, no. 5, pp. 1396–1408.

Bjornevik, K, Cortese, M, Healy, BC, Kuhle, J, Mina, MJ, Leng, Y, Elledge, SJ, Niebuhr, DW, Scher, AI, Munger, KL & Ascherio, A 2022, 'Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis', *Science (New York, N.Y.)*, vol. 375, no. 6578, pp. 296–301. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35025605/.

Bostock, H, Sears, TA & Sherratt, RM 1981, 'The effects of 4-aminopyridine and tetraethylammonium ions on normal and demyelinated mammalian nerve fibres', *The Journal of physiology*, vol. 313, pp. 301–315.

Broicher, SD, Filli, L, Geisseler, O, Germann, N, Zörner, B, Brugger, P & Linnebank, M 2018, 'Positive effects of fampridine on cognition, fatigue and depression in patients with multiple sclerosis over 2 years', *Journal of neurology*, vol. 265, no. 5, pp. 1016–1025.

Costello, F, Hodge, W, Pan, YI, Freedman, M & DeMeulemeester, C 2009, 'Differences in retinal nerve fiber layer atrophy between multiple sclerosis subtypes', *Journal of the neurological sciences*, vol. 281, 1-2, pp. 74–79.

Cruz-Herranz, A, Balk, LJ, Oberwahrenbrock, T, Saidha, S, Martinez-Lapiscina, EH, Lagreze, WA, Schuman, JS, Villoslada, P, Calabresi, P, Balcer, L, Petzold, A, Green, AJ, Paul, F, Brandt, AU & Albrecht, P 2016, 'The APOSTEL recommendations for reporting quantitative optical coherence tomography studies', *Neurology*, vol. 86, no. 24, pp. 2303–2309.

Dietrich, M, Helling, N, Hilla, A, Heskamp, A, Issberner, A, Hildebrandt, T, Kohne, Z, Küry, P, Berndt, C, Aktas, O, Fischer, D, Hartung, H-P & Albrecht, P 2018, 'Early alpha-lipoic acid therapy protects from degeneration of the inner retinal layers and vision loss in an experimental autoimmune encephalomyelitis-optic neuritis model', *Journal of neuroinflammation*, vol. 15, no. 1, p. 71.

Dietrich, M, Koska, V, Hecker, C, Göttle, P, Hilla, AM, Heskamp, A, Lepka, K, Issberner, A, Hallenberger, A, Baksmeier, C, Steckel, J, Balk, L, Knier, B, Korn, T, Havla, J, Martínez-Lapiscina, EH, Solà-Valls, N, Manogaran, P, Olbert, ED, Schippling, S, Cruz-Herranz, A, Yiu, H, Button, J, Caldito, NG, Gall, C von, Mausberg, AK, Stettner, M, Zimmermann, HG, Paul, F, Brandt, AU, Küry, P, Goebels, N, Aktas, O, Berndt, C, Saidha, S, Green, AJ, Calabresi, PA, Fischer, D, Hartung, H-P & Albrecht, P 2020, 'Protective effects of 4-aminopyridine in experimental optic neuritis and multiple sclerosis', *Brain*, vol. 143, no. 4, pp. 1127–1142.

Ferguson, B, Matyszak, MK, Esiri, MM & Perry, VH 1997, 'Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions', *Brain : a journal of neurology*, 120 (Pt 3), pp. 393–399.

Fisniku, LK, Chard, DT, Jackson, JS, Anderson, VM, Altmann, DR, Miszkiel, KA, Thompson, AJ & Miller, DH 2008, 'Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis', *Annals of neurology*, vol. 64, no. 3, pp. 247–254. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18570297/.

Frischer, JM, Bramow, S, Dal-Bianco, A, Lucchinetti, CF, Rauschka, H, Schmidbauer, M, Laursen, H, Sorensen, PS & Lassmann, H 2009, 'The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains', *Brain*, vol. 132, Pt 5, pp. 1175–1189.

Fujinami, RS & Oldstone, MB 1985, 'Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity', *Science*, vol. 230, no. 4729, pp. 1043–1045.

Garcia-Martin, E, Ara, JR, Martin, J, Almarcegui, C, Dolz, I, Vilades, E, Gil-Arribas, L, Fernandez, FJ, Polo, V, Larrosa, JM, Pablo, LE & Satue, M 2017, 'Retinal and Optic Nerve Degeneration in Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 5 Years', *Ophthalmology*, vol. 124, no. 5, pp. 688–696. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187977/.

Gonzalez Caldito, N, Antony, B, He, Y, Lang, A, Nguyen, J, Rothman, A, Ogbuokiri, E, Avornu, A, Balcer, L, Frohman, E, Frohman, TC, Bhargava, P, Prince, J, Calabresi, PA & Saidha, S 2018, 'Analysis

of Agreement of Retinal-Layer Thickness Measures Derived from the Segmentation of Horizontal and Vertical Spectralis OCT Macular Scans', *Current eye research*, vol. 43, no. 3, pp. 415–423.

Goodman, AD, Bethoux, F, Brown, TR, Schapiro, RT, Cohen, R, Marinucci, LN, Henney, HR & Blight, AR 2015, 'Long-term safety and efficacy of dalfampridine for walking impairment in patients with multiple sclerosis. Results of open-label extensions of two Phase 3 clinical trials', *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), vol. 21, no. 10, pp. 1322–1331.

Goodman, AD, Brown, TR, Edwards, KR, Krupp, LB, Schapiro, RT, Cohen, R, Marinucci, LN & Blight, AR 2010, 'A phase 3 trial of extended release oral dalfampridine in multiple sclerosis', *Annals of neurology*, vol. 68, no. 4, pp. 494–502.

Goodman, AD, Brown, TR, Krupp, LB, Schapiro, RT, Schwid, SR, Cohen, R, Marinucci, LN & Blight, AR 2009, 'Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis. A randomised, double-blind, controlled trial', *The Lancet*, vol. 373, no. 9665, pp. 732–738.

Goodman, AD, Cohen, JA, Cross, A, Vollmer, T, Rizzo, M, Cohen, R, Marinucci, L & Blight, AR 2007, 'Fampridine-SR in multiple sclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study', *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, vol. 13, no. 3, pp. 357–368.

Groom, AJ, Smith, T & Turski, L 2003, 'Multiple sclerosis and glutamate', *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 993, 229-75; discussion 287-8. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12853317/.

Hauser, SL, Bar-Or, A, Cohen, JA, Comi, G, Correale, J, Coyle, PK, Cross, AH, Seze, J de, Leppert, D, Montalban, X, Selmaj, K, Wiendl, H, Kerloeguen, C, Willi, R, Li, B, Kakarieka, A, Tomic, D, Goodyear, A, Pingili, R, Häring, DA, Ramanathan, K, Merschhemke, M & Kappos, L 2020, 'Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis', *The New England journal of medicine*, vol. 383, no. 6, pp. 546– 557.

Hauser, SL, Waubant, E, Arnold, DL, Vollmer, T, Antel, J, Fox, RJ, Bar-Or, A, Panzara, M, Sarkar, N, Agarwal, S, Langer-Gould, A & Smith, CH 2008, 'B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis', *The New England journal of medicine*, vol. 358, no. 7, pp. 676–688.

Henderson, APD, Trip, SA, Schlottmann, PG, Altmann, DR, Garway-Heath, DF, Plant, GT & Miller, DH 2008, 'An investigation of the retinal nerve fibre layer in progressive multiple sclerosis using optical coherence tomography', *Brain : a journal of neurology*, vol. 131, Pt 1, pp. 277–287.

Horton, L, Conger, A, Conger, D, Remington, G, Frohman, T, Frohman, E & Greenberg, B 2013, 'Effect of 4-aminopyridine on vision in multiple sclerosis patients with optic neuropathy', *Neurology*, vol. 80, no. 20, pp. 1862–1866. Huang, D, Swanson, E, Lin, C, Schuman, J, Stinson, W, Chang, W, Hee, M, Flotte, T, Gregory, K, Puliafito, C & et, a 1991, 'Optical coherence tomography', *Science*, vol. 254, no. 5035, pp. 1178–1181.

Hupperts, R, Lycke, J, Short, C, Gasperini, C, McNeill, M, Medori, R, Tofil-Kaluza, A, Hovenden, M, Mehta, LR & Elkins, J 2016, 'Prolonged-release fampridine and walking and balance in MS. Randomised controlled MOBILE trial', *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, vol. 22, no. 2, pp. 212–221.

Jukkola, P, Gu, Y, Lovett-Racke, AE & Gu, C 2017, 'Suppression of Inflammatory Demyelinaton and Axon Degeneration through Inhibiting Kv3 Channels', *Frontiers in molecular neuroscience*, vol. 10, p. 344.

Kabat, EA, Moore, DH & Landow, H 1942, 'AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS', *Journal of Clinical Investigation*, vol. 21, no. 5, pp. 571–577.

Klineova, S & Lublin, FD 2018, 'Clinical Course of Multiple Sclerosis', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 8, no. 9, a028928.

Kurtzke, JF 1983, 'Rating neurologic impairment in multiple sclerosis. An expanded disability status scale (EDSS)', *Neurology*, vol. 33, no. 11, p. 1444.

Leussink, VI, Montalban, X & Hartung, H-P 2018, 'Restoring Axonal Function with 4-Aminopyridine. Clinical Efficacy in Multiple Sclerosis and Beyond', *CNS drugs*.

Li, R, Tang, H, Burns, JC, Hopkins, BT, Le Coz, C, Zhang, B, Barcelos, IP de, Romberg, N, Goldstein, AC, Banwell, BL, Luning Prak, ET, Mingueneau, M & Bar-Or, A 2022, 'BTK inhibition limits B-cell-T-cell interaction through modulation of B-cell metabolism: implications for multiple sclerosis therapy', *Acta neuropathologica*, vol. 143, no. 4, pp. 505–521.

Lipton, SA & Rosenberg, PA 1994, 'Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders', *The New England journal of medicine*, vol. 330, no. 9, pp. 613–622.

Lublin, FD & Reingold, SC 1996, 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis', *Neurology*, vol. 46, no. 4, pp. 907–911.

Martin, E, Aigrot, M-S, Grenningloh, R, Stankoff, B, Lubetzki, C, Boschert, U & Zalc, B 2020, 'Bruton's Tyrosine Kinase Inhibition Promotes Myelin Repair', *Brain plasticity (Amsterdam, Netherlands)*, vol. 5, no. 2, pp. 123–133.

Martínez-Lapiscina, EH, Sanchez-Dalmau, B, Fraga-Pumar, E, Ortiz-Perez, S, Tercero-Uribe, AI, Torres-Torres, R & Villoslada, P 2014, 'The visual pathway as a model to understand brain damage in multiple sclerosis', *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, vol. 20, no. 13, pp. 1678–1685.

Mayer, L, Kappos, L, Racke, MK, Rammohan, K, Traboulsee, A, Hauser, SL, Julian, L, Köndgen, H, Li, C, Napieralski, J, Zheng, H & Wolinsky, JS 2019, 'Ocrelizumab infusion experience in patients with relapsing and primary progressive multiple sclerosis: Results from the phase 3 randomized OPERA I, OPERA II, and ORATORIO studies', *Multiple sclerosis and related disorders*, vol. 30, pp. 236–243.

Montalban, X, Arnold, DL, Weber, MS, Staikov, I, Piasecka-Stryczynska, K, Willmer, J, Martin, EC, Dangond, F, Syed, S & Wolinsky, JS 2019, 'Placebo-Controlled Trial of an Oral BTK Inhibitor in Multiple Sclerosis', *The New England journal of medicine*, vol. 380, no. 25, pp. 2406–2417.

Morrow, SA, Rosehart, H & Johnson, AM 2017, 'The effect of Fampridine-SR on cognitive fatigue in a randomized double-blind crossover trial in patients with MS', *Multiple sclerosis and related disorders*, vol. 11, pp. 4–9.

Parisi, V, Manni, G, Spadaro, M, Colacino, G, Restuccia, R, Marchi, S, Bucci, MG & Pierelli, F 1999, 'Correlation between morphological and functional retinal impairment in multiple sclerosis patients', *Investigative ophthalmology & visual science*, vol. 40, no. 11, pp. 2520–2527.

Pitt, D, Werner, P & Raine, CS 2000, 'Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis', *Nature medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 67–70.

Polman, CH, Reingold, SC, Banwell, B, Clanet, M, Cohen, JA, Filippi, M, Fujihara, K, Havrdova, E, Hutchinson, M, Kappos, L, Lublin, FD, Montalban, X, O'Connor, P, Sandberg-Wollheim, M, Thompson, AJ, Waubant, E, Weinshenker, B & Wolinsky, JS 2011, 'Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria', *Annals of neurology*, vol. 69, no. 2, pp. 292–302.

Reich, DS, Lucchinetti, CF & Calabresi, PA 2018, 'Multiple Sclerosis', *The New England journal of medicine*, vol. 378, no. 2, pp. 169–180.

Saidha, S, Al-Louzi, O, Ratchford, JN, Bhargava, P, Oh, J, Newsome, SD, Prince, JL, Pham, D, Roy, S, van Zijl, P, Balcer, LJ, Frohman, EM, Reich, DS, Crainiceanu, C & Calabresi, PA 2015, 'Optical coherence tomography reflects brain atrophy in multiple sclerosis: A four-year study', *Annals of neurology*, vol. 78, no. 5, pp. 801–813.

Schmalhofer, WA, Bao, J, McManus, OB, Green, B, Matyskiela, M, Wunderler, D, Bugianesi, RM, Felix, JP, Hanner, M, Linde-Arias, A-R, Ponte, CG, Velasco, L, Koo, G, Staruch, MJ, Miao, S, Parsons, WH, Rupprecht, K, Slaughter, RS, Kaczorowski, GJ & Garcia, ML 2002, 'Identification of a new class

of inhibitors of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3, with immunosuppressant properties', *Biochemistry*, vol. 41, no. 24, pp. 7781–7794.

Smith, T, Groom, A, Zhu, B & Turski, L 2000, 'Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists', *Nature medicine*, vol. 6, no. 1, pp. 62–66.

Sospedra, M & Martin, R 2016, 'Immunology of Multiple Sclerosis', *Seminars in Neurology*, vol. 36, no. 2, pp. 115–127.

Srinivasan, R, Sailasuta, N, Hurd, R, Nelson, S & Pelletier, D 2005, 'Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T', *Brain*, vol. 128, Pt 5, pp. 1016– 1025.

Stellmann, J-P, Cetin, H, Young, KL, Hodecker, S, Pöttgen, J, Bittersohl, D, Hassenstein, A, Oberwahrenbrock, T, Heesen, C & Siemonsen, S 2017, 'Pattern of gray matter volumes related to retinal thickness and its association with cognitive function in relapsing-remitting MS', *Brain and Behavior*, vol. 7, no. 2, e00614.

Syc, SB, Saidha, S, Newsome, SD, Ratchford, JN, Levy, M, Ford, E, Crainiceanu, CM, Durbin, MK, Oakley, JD, Meyer, SA, Frohman, EM & Calabresi, PA 2012, 'Optical coherence tomography segmentation reveals ganglion cell layer pathology after optic neuritis', *Brain : a journal of neurology*, vol. 135, Pt 2, pp. 521–533.

Talman, LS, Bisker, ER, Sackel, DJ, Long, DA, Galetta, KM, Ratchford, JN, Lile, DJ, Farrell, SK, Loguidice, MJ, Remington, G, Conger, A, Frohman, TC, Jacobs, DA, Markowitz, CE, Cutter, GR, Ying, G-S, Dai, Y, Maguire, MG, Galetta, SL, Frohman, EM, Calabresi, PA & Balcer, LJ 2010, 'Longitudinal study of vision and retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis', *Annals of neurology*, vol. 67, no. 6, pp. 749–760.

Trapp, BD & Nave, K-A 2008, 'Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?', *Annual review of neuroscience*, vol. 31, pp. 247–269.

Trip, SA, Schlottmann, PG, Jones, SJ, Altmann, DR, Garway-Heath, DF, Thompson, AJ, Plant, GT & Miller, DH 2005, 'Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis', *Annals of neurology*, vol. 58, no. 3, pp. 383–391.

Warner, CV, Syc, SB, Stankiewicz, AM, Hiremath, G, Farrell, SK, Crainiceanu, CM, Conger, A, Frohman, TC, Bisker, ER, Balcer, LJ, Frohman, EM, Calabresi, PA & Saidha, S 2011, 'The impact of utilizing different optical coherence tomography devices for clinical purposes and in multiple sclerosis trials', *PloS one*, vol. 6, no. 8, e22947.

Yednock, TA, Cannon, C, Fritz, LC, Sanchez-Madrid, F, Steinman, L & Karin, N 1992, 'Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin', *Nature*, vol. 356, no. 6364, pp. 63–66.

Young, KL, Brandt, AU, Petzold, A, Reitz, LY, Lintze, F, Paul, F, Martin, R & Schippling, S 2013, 'Loss of retinal nerve fibre layer axons indicates white but not grey matter damage in early multiple sclerosis', *European journal of neurology*, vol. 20, no. 5, pp. 803–811. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23369013/.

Yshii, L, Gebauer, C, Bernard-Valnet, R & Liblau, R 2015, 'Neurons and T cells: Understanding this interaction for inflammatory neurological diseases', *European Journal of Immunology*, vol. 45, no. 10, pp. 2712–2720.

Danksagung

Ich danke Herrn **Univ-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth** für die Möglichkeit, die Promotion in seiner Klinik durchführen zu können.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. med. Philipp Albrecht** für die Konzeption dieser Arbeit, die wissenschaftlichen Betreuung und die hilfreiche Unterstützung und die Begleitung während des gesamten Promotionszeitraums.

Ich danke Herrn **Dr. rer. nat. Michael Dietrich** für die Anleitung, Hilfe bei Problemstellungen und die guten Ratschläge.

Ebenso danke ich meinen **Eltern, meinem Bruder und meinen Großmüttern** sowie meinem **Lebensgefährten** für die uneingeschränkte Unterstützung sowie die aufmunternden Worte.