

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Assoziation von freigesetzten Neurofilament-Leichtketten im Liquor und Serum mit
axonaler Schädigung bei der idiopathischen intrakraniellen Hypertension

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Johannes Jakob Halcour
aus Wuppertal

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 10.08.2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Tabellenverzeichnis.....	3
1. Einleitung und Ziel der Dissertation	4
1.1. Neurofilament als potenzieller Biomarker bei der Idiopathischen Intrakraniellen Hypertension.....	6
1.2. Basis der SiMoA-Technologie.....	8
2. Literaturdiskussion	10
2.1. Multiple Sklerose.....	10
2.2. Amyotrophe Lateralsklerose.....	10
2.3. Die Rolle von NfL beim Alterungsprozess.....	11
2.4. Idiopathische Intrakranielle Hypertension	11
3. Material und Methoden	13
3.1. Material	13
3.1.1. Lösungen und Reagenzien	13
3.1.2. Laborgeräte	14
3.1.3. Laborzubehör	14
3.2. Methoden.....	15
3.2.1. Studiendesign.....	15
3.2.2. Liquoruntersuchung.....	16
3.2.3. Bestimmung der sNfL-Konzentration mittels SiMoA-Technologie	16
3.2.4. Statistische Auswertung.....	17

4. Ergebnisse	18
4.1. Beschreibung der Kohorte	18
4.1.1. Demografische Angaben.....	18
4.1.2. Klinische Parameter	18
4.1.3. Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion	20
4.1.4. Therapie.....	21
4.1.5. Liquorparameter	22
4.2. Assoziationen verschiedener Parameter mit Neurofilament-Leichtketten	23
5. Diskussion.....	32
6. Zusammenfassung.....	36
Literaturverzeichnis	37
Danksagung.....	40
Lebenslauf	41

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AUC	Area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
cm	Zentimeter
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CI	Konfidenzintervall
CSF	Cerebrospinal fluid
CSF-NfL	Neurofilament-Leichtketten im Liquor
CV	Coefficient of variation
dl	Deziliter
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
fl	Femtoliter
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
ICP	Intracranial pressure
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IQR	Interquartilsabstand
IIH	Idiopathische intrakranielle Hypertension
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
nm	Nanometer
NfH	Neurofilament-Schwerketten

NfM	Neurofilament-Mittelketten
NfL	Neurofilament-Leichtketten
ONSD	Optikusscheiden-Durchmesser
p	P-Signifikanzwert
g	Gramm
pg	Piktogramm
QAlb	Albumin-Quotient
QIgA	Immunglobulin A-Quotient
QIgG	Immunglobulin G-Quotient
QIgM	Immunglobulin M-Quotient
QNfL	NfL-Quotient
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
ROC	Receiver Operating Characteristic
SD	Standardabweichung
SiMoA	Single-molecule arrays
sNfL	Neurofilament-Leichtketten im Serum
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der verschiedenen Neurofilamente und Freisetzung nach axonaler Schädigung

Abbildung 2: Abfolge eines Einzelmolekülnachweises mittels SiMoA-Technologie

Abbildung 3: Bildliche Darstellung des Einzelmolekülnachweises mittels SiMoA-Technologie

Abbildung 4: Korrelation zwischen sNfL und CSF-NfL

Abbildung 5: Korrelation zwischen Liquoreröffnungsdruck und CSF-NfL

Abbildung 6: Korrelation zwischen Liquoreröffnungsdruck und sNfL

Abbildung 7: Korrelation zwischen Liquoreröffnungsdruck und CSF-NfL/sNfL

Abbildung 8: Korrelation zwischen CSF-NfL/sNfL und CSF-NfL

Abbildung 9: Korrelation zwischen CSF-NfL/sNfL und sNfL

Abbildung 10: CSF-NfL, AUC

Abbildung 11: QNfL, AUC

Abbildung 12: sNfL, AUC

Abbildung 13: Transportweg des glymphatischen Systems

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Demografische Angaben

Tabelle 2: Klinische Parameter

Tabelle 3: Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion

Tabelle 4: Therapie der Idiopathischen intrakraniellen Hypertension

Tabelle 5: Liquorparameter

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Idiopathische intrakranielle Hypertension (IIH) ist charakterisiert durch Symptome und Zeichen eines erhöhten intrakraniellen Drucks (ICP). Diese Symptome beinhalten vor allem Kopfschmerzen und Beeinträchtigung des Sehnervs aufgrund von druckbedingtem Papillenödem. Darüber hinaus sind vorübergehende visuelle Verdunkelungen und Unschärfe, Rückenschmerzen, Nackenschmerzen, pulsierender Tinnitus, Schwindel, kognitive Störungen, radikuläre Schmerzen sowie horizontale Diplopie zu beobachten (1-4).

Typischerweise ist die IIH bei übergewichtigen Frauen im gebärfähigen Alter zu erwarten. Die Inzidenz liegt in dieser Gruppe bei 12-20 pro 100 000, während in der Gesamtbevölkerung nur rund 0.5-2 pro 100 000 von einer IIH betroffen sind (5).

Die Therapie beinhaltet eine Gewichtsreduktion in Kombination mit medikamentöser Behandlung, vorwiegend durch Acetazolamid und Topiramate (1, 5, 6). Für die akute Entlastung des erhöhten Hirndrucks stellt die Lumbalpunktion eine kurzfristig therapeutisch wirksame Therapieoption dar (7). Falls ein Risiko für dauerhafte irreversible Schäden des Sehnervs besteht, kann zusätzlich auf chirurgische Interventionen zurückgegriffen werden: Zum einen auf die mikrochirurgische Optikusscheidenfensterung, oder auf eine Liquorableitung mittels Shuntsystem (8, 9).

Die pathogenen Mechanismen der IIH sind noch unklar, aber im Fokus der ätiologischen Erklärungsansätze liegt die Dysregulation des intrakraniellen Drucks. Es wurden bisher drei wichtige Mechanismen beschrieben, die in einem erhöhten Hirndruck resultieren. Die Überproduktion von Liquor cerebrospinalis (CSF), eine Abflussobstruktion des CSF und ein erhöhter Druck im venösen Sinussystem (5). Durch Erforschung der Lymphgefäße des Zentralen Nervensystems (ZNS) (10) und des glymphatischen Systems (11) folgerten Lenck et al. (2018) ein pathologisches Zusammenspiel aus primärer Restriktion des venösen Liquorabflusses und einer sekundären Überlastung des glymphatischen Systems und einem daraus folgendem Überlauf des lymphatischen Abflusswegs (12).

Neurofilament-Leichtketten (NfL) sind einer der Hauptbestandteile des neuronalen Zytoskeletts und ausschließlich im zentralen und peripheren Nervensystem zu finden. Nach Schädigungen der Neurone oder ihrer Axone durch neurodegenerative, inflammatorische, vaskuläre oder traumatische Prozesse werden sie zuerst in den Liquor abgegeben. Infolgedessen transferieren sehr geringe Mengen der NfL in das Serum (13). Durch diese Mechanismen spielen die NfL bereits eine Rolle als Biomarker bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Multiplen Sklerose (MS) oder der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (13-15). Auch bei diesen beiden Erkrankungen wurde die Freisetzung von NfL in den Liquor in verschiedenen Studien beobachtet (16-18).

Kürzlich wurde in einer Studie das prognostische Potenzial von NfL erforscht, einen IIH-induzierten optischen Nervenschaden zu prognostizieren. Dort beobachteten die Autor*innen eine erhöhte NfL-Konzentration bei Patient*innen mit moderatem und schwerem Papillenödem im Vergleich zu Patient*innen mit geringem und keinem Papillenödem. Außerdem wurde eine erhöhte NfL-Konzentration im Liquor (CSF-NfL) in einen Zusammenhang mit der Entwicklung von bilateralen Gesichtsfelddefekten und bilateraler Atrophie des Sehnervs gebracht. Bedeutsam war in diesem Zusammenhang eine Korrelation zwischen der CSF-NfL-Konzentration mit dem maximalen Öffnungsdruck der Lumbalpunktion und mit dem Öffnungsdruck zur Zeit der Probenentnahme. Die NfL im Serum (sNfL) standen dabei in keinem Bezug zum Öffnungsdruck bei Lumbalpunktion (19).

Das Ziel dieser Arbeit ist zu erforschen, ob ein Zusammenhang zwischen NfL und dem Öffnungsdruck bei Lumbalpunktion, sowie anderen klinischen Parametern besteht. Dies soll geschehen, um NfL als möglichen Biomarker für die IIH zu evaluieren. Dabei werden sowohl Neurofilamente im Liquor als auch Neurofilamente im Serum betrachtet. Im Zuge der Betrachtung der NfL im Liquor und im Serum legten wir unser Augenmerk auf den Transport von NfL vom Liquor in das Serum und auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Darüber hinaus stellt das Verständnis der Pathomechanismen der IIH einen Interessenspunkt dar.

1.1. Neurofilament als potenzieller Biomarker bei der Idiopathischen Intrakraniellen Hypertension

In der bisherigen Routinediagnostik der IIH steht der klinische Symptomkomplex im Vordergrund der Erkrankung. Dieser beinhaltet Kopf- und retrobulbäre Schmerzen, Stauungspapillen, transiente Obskurationen, periphere Gesichtsfelddefekte, Tinnitus und eine Abduzensparese (1, 2, 9). Die neurologische und die augenärztliche Untersuchung liefert dabei Informationen über das Vorliegen von Symptomen. Dabei spielt die Untersuchung der Papille, des Gesichtsfelds, des Visus und der Bulbusmobilität eine ausschlaggebende Rolle. Darüber hinaus kann der erhöhte Optikusscheiden-Durchmesser (ONSD) per Ultraschall dargestellt werden (20). Außerdem stellt die Magnetresonanztomografie (MRT) ein wichtiges diagnostisches Mittel der IIH dar. Hierbei ist, durch Vorliegen von erhöhtem Hirndruck, ein gewundener N. opticus mit einem erweiterten perineuralen Liquorsaum („Optikusscheidenhydrps“) ein typischer Befund. Dazu zeigt sich eine Ausdünnung der Hypophyse, auch genannt „Empty Sella“. Zusätzlich kann es zu einer posterioren Abflachung des Bulbus oculi mit ausgeprägter Papille kommen. Diese Befunde sind allerdings nicht pathognomonisch für die IIH (21).

Nach dem MRT ist die Bestimmung des Liquoreröffnungsdrucks im Liegen eine häufig verwendete Diagnostik. Besteht ein klarer klinischer Hinweis auf eine IIH kann die Messung wiederholt werden, oder eine kontinuierliche lumbale Liquordruckmessung initiiert werden (22). Nun stellt sich die Frage, ob in Zukunft die NfL als potenzieller quantifizierbarer Biomarker und Verlaufsparemeter infrage kommen.

Neurofilamente sind Proteine, die in Neuronen vorkommen und dem Zytoskelett Stabilität verleihen (13). Dazu sind Neurofilamente wahrscheinlich auch für eine effektive Reizweiterleitung im ZNS bedeutsam. Neuroaxonale Schäden können verschiedenste Ursachen haben. Zum Beispiel können sie durch entzündliche, vaskuläre, traumatische oder neurodegenerative Prozesse entstehen. Durch solche Schäden des Nervensystems werden Neurofilament-Leichtketten zuerst in den Liquor und, in einem deutlich geringeren Maße, in das Serum des*der Patient*in ausgeschüttet (**Abb. 1b**). Kuhle et al. (2016) fanden in ihrer Studie heraus, dass eine enge Korrelation zwischen Konzentrationen von NfL im Liquor und im Serum besteht.

Somit kann man in der Zukunft eventuell, durch Bestimmung von NfL in der Peripherie, nervenschädigende Prozesse im ZNS entdecken (23).

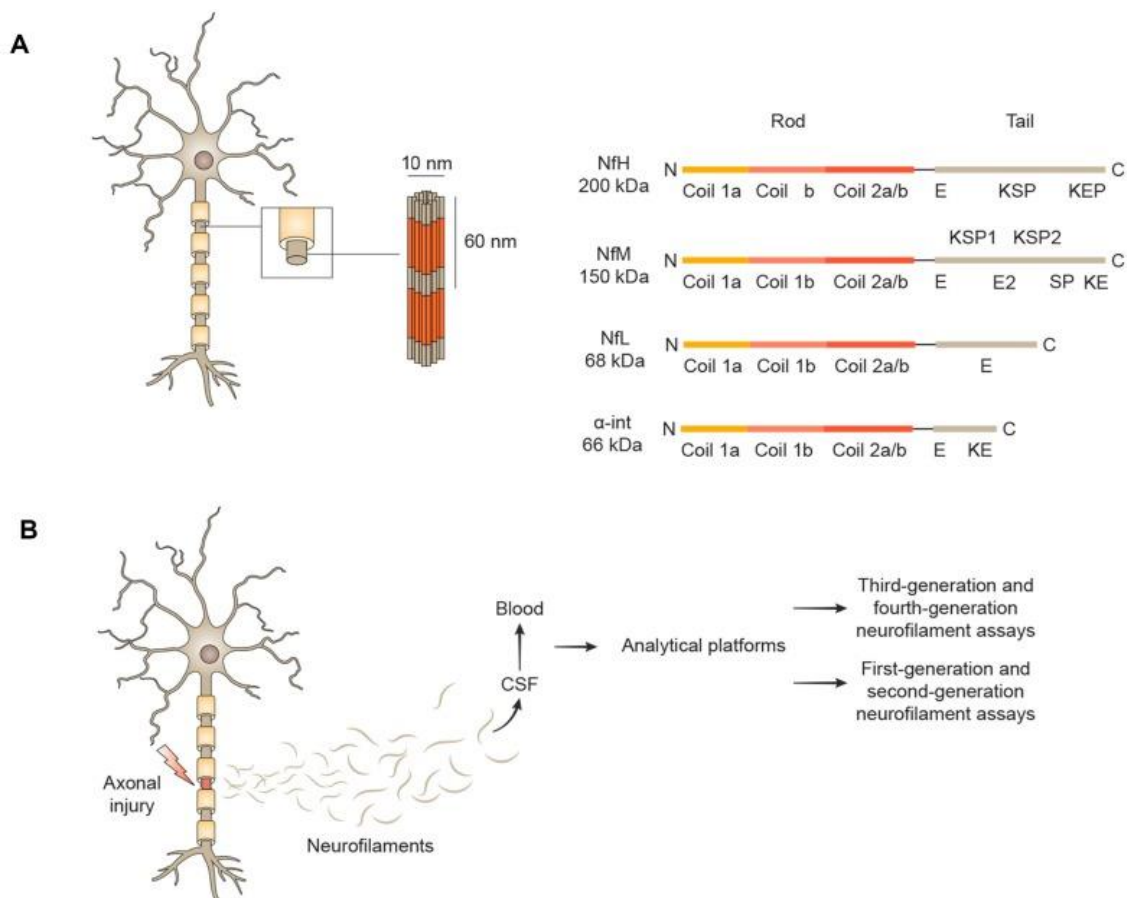


Abbildung 1: A: Struktur der verschiedenen Neurofilamente, B: Freisetzung des Neurofilaments nach axonaler Schädigung

Abbildung aus Gagliardi D. et al., *Int J Mol Sci* 2019 (24)

A: Hier zeigt sich die schematische Darstellung des Aufbaus der fünf Subtypen der Neurofilamente. Sie sind geordnet nach ihrer Molekülmasse in Kilodalton (kDa). Das α -Internexin stellt dabei die leichteste Variante dar und Neurofilament-Schwerketten (NfH) die schwerste. Eine Neurofilament-Leichtkette besitzt eine Molekülmasse von 68 kDa und ist ungefähr 10 Nanometer groß im Durchmesser.

B: Nach axonaler Schädigung werden Neurofilamente in den Liquor und daraufhin in das Serum freigesetzt. Der Übertritt in das Serum geschieht in nur sehr geringen Mengen, sodass die Messung (z.B. mittels ELISA) der Neurofilamente in der Vergangenheit ein Problem darstellte. Nun lassen sich, durch die SiMoA-Technologie, auch kleinste Konzentrationen von Neurofilamenten messen.

Neurofilamente sind sogenannte Intermediärfilamente und werden aufgrund ihres Durchmessers von etwa 10 Nanometer (nm) in diese Gruppe von Filamenten eingeteilt. Es zeigen sich fünf Subtypen der Neurofilamente im menschlichen Nervensystem: Peripherin, α -Internexin, Neurofilament-Leichtketten, Neurofilament-Mittelketten und Neurofilament-Schwerketten (13) (**Abb. 1a**).

In der klinischen Verwendung von Proteinen, wie NfL, als Biomarker müssten selbst minimal erhöhte Werte in sehr niedrig konzentrierten Proben probat quantifiziert werden. Diesen komplexen Vorgang ermöglicht jetzt nun der Einsatz der hochsensitiven single-molecule array (SiMoA)-Technologie.

1.2. Basis der SiMoA-Technologie

Die „single-molecule arrays“ sind die Grundpfeiler des technischen Verfahrens. Dabei handelt es sich um sehr kleine Reaktionskammern, die ein Fassungsvermögen von einem Femtoliter (fl) ($1 \text{ fl} = 10^{-15}$ Liter) besitzen. Somit ist die Detektion und Isolierung einzelner Moleküle gewährleistet (25). Die Technologie beinhaltet das schon bekannte „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) Nachweisverfahren. Das Verfahren beginnt mit dem klassischen Sandwich-ELISA Prinzip, bei dem eine Bindung der Zielmoleküle (Antigene) an eine mit Antikörper-besetzten magnetischen Kugel erfolgt. Die Antikörper auf der magnetischen Kugel werden „capture antibodies“ genannt. Durch die Bindung von Antigenen mit den „capture antibodies“ entstehen Komplexe der beiden Komponenten. Durch Einbringen von Detektionsantikörpern, die an Biotin gebunden sind, entsteht eine Bindung des Detektionsantikörpers und des Komplexes (**Abb. 2a, b**). Da in den zu messenden Proben meist eine besonders geringe Konzentration der Antigene vorherrscht, ist das Verhältnis von Antigen-Antikörper-Komplex zu Kugeln gering. Vorwiegend besteht ein Verhältnis von $< 1:1$. Folglich bindet ein Großteil der Kugeln entweder kein oder ein Zielmolekül. Dies lässt sich aus der Poisson-Verteilung schließen (26). Im nächsten Schritt werden alle Kugeln auf eine Platte aufgetragen, welche Reaktionskammern - „single-molecule arrays“- enthält. In eine einzelne Kammer passt nur genau eine Kugel (**Abb. 3a**). Nun folgt eine Inkubation der Reaktionskammern mit Enzymsubstrat, welches fluoreszierend ist. Im Anschluss werden die Kammern mit Silikon abgedichtet (**Abb. 2c**).

Im letzten Schritt werden die Fluoreszenzsignale erfasst. Somit können die Kugeln, welche Zielmoleküle gebunden haben, detektiert und so die Konzentration des Zielmoleküls errechnet werden. Dabei betrachtet man das Verhältnis der Quantität der Reaktionskammern mit enthaltenem Zielmolekül im Vergleich zu der Quantität der Reaktionskammern, die kein Zielmolekül enthalten (27) (**Abb. 3b**).

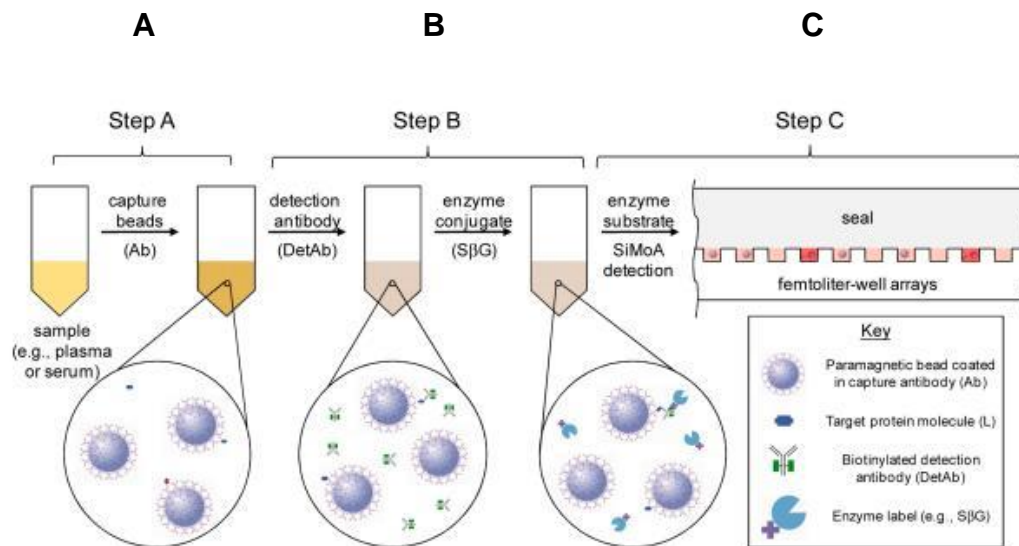


Abbildung 2: Abfolge eines Einzelmolekülnachweises mittels SiMoA-Technologie
A: Einbringung der magnetischen Kugeln mit gebundenen Antikörpern
B: Einbringung der Detektionsantikörper
C: Inkubation der Reaktionskammern mit Enzymsubstrat und Abdichtung mit Silikon

Abbildung aus Chang L. et al., J Immunol Methods 2012 (28)

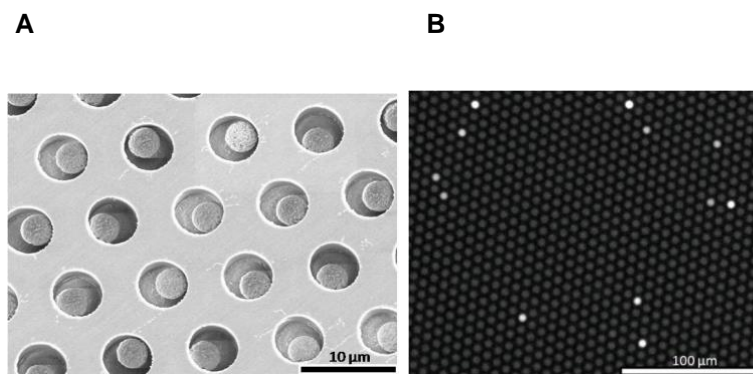


Abbildung 3: Bildliche Darstellung des Einzelmolekülnachweises mittels SiMoA-Technologie
A: Reaktionskammern mit magnetischen Kugeln gefüllt
B: Fluoreszenzsignale der Reaktionskammern bei erfolgreicher Bindung an den Zielmolekülen

Abbildung aus Rissin DM et al., Nat Biotechnol. 2010 (27)

2. Literaturdiskussion

Die Rolle von Neurofilament als Biomarker in neurologischen Erkrankungen lässt sich anhand verschiedener Studien der letzten Jahre diskutieren. Die Neurofilament-Leichtketten werden aufgrund von Nervenschäden durch verschiedene neurologische Erkrankungen in den Liquor und konsekutiv in das Serum freigesetzt, wobei die Ätiologie des Schadens keine Rolle spielt (13). Somit könnten NfL eine Rolle in der Diagnostik und in der Verlaufsbeurteilung von neurologischen Erkrankungen spielen. In der Vergangenheit wurde die Funktionalität von NfL als Biomarker in einigen Studien behandelt. Anhand der Multiplen Sklerose, der amyotrophen Lateralsklerose, dem Prozess des Alterns und der IIH lassen sich die bisherigen Studien zu dem Thema „NfL als Biomarker“ diskutieren.

2.1. Multiple Sklerose

Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems, bei welcher lokale Entzündungsherde im Gehirn, sowie im Rückenmark auftreten. Dabei ist die Erkrankung durch viele verschiedene Verlaufsformen geprägt, welche die Beurteilung der Diagnostik und der Therapie erschweren. Disanto et al. (2017) zeigten in ihrer Kohorte von MS-Patient*innen eine starke Korrelation von Läsionen des Gehirns oder des Rückenmarks mit der sNfL-Konzentration (29). Diese Resultate sind ein Beispiel dafür, wie sNfL auch als klinisch relevanter Biomarker eingesetzt werden könnten. Zum einen um den aktuellen Status der Krankheit darzustellen und zum anderen um Ergebnisse von Therapiestrategien zu erfassen. In davor veröffentlichten Studien wurde bereits eine Assoziation zwischen der CSF-NfL-Konzentration und der sNfL-Konzentration dargestellt. Somit sind NfL aus dem Serum in der Lage Neurofilamente, die aus dem zentralen Nervensystem in das Liquor freigesetzt wurden, widerzuspiegeln (23).

2.2. Amyotrophe Lateralsklerose

Die amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist gekennzeichnet durch eine nicht heilbare Degeneration des motorischen Nervensystems und gehört zur Gruppe der Motorneuron-Krankheiten. Die Pathogenese der Krankheit ist noch nicht voll verstanden, aber proteinhaltige Einschlusskörperchen, die sich in Motorneuronen anlagern, sollen eine bedeutende Rolle spielen (30). Somit ist auch hier eine strukturelle Degeneration von Nerven vorhanden, welche eine Erhöhung der CSF-NfL

und der sNfL bewirkt. In einer 2015 veröffentlichten Studie von Lu et al. waren die sNfL-Konzentrationen in einer Kohorte von ALS-Patient*innen ungefähr viermal höher, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollkohorte. Die Autor*innen arbeiteten heraus, dass sNfL ein Potenzial für die Prognostik und für die Therapiebeurteilung von ALS besitzen (18).

2.3. Die Rolle von NfL beim Alterungsprozess

Neurofilament-Leichtketten stellen nicht nur einen Biomarker für neurologische Erkrankungen dar, sondern sind auch mit dem Prozess des Alterns assoziiert (13). In der Studie von Yilmaz et al. (2017) wurde festgestellt, dass sich der obere Referenzwert der CSF-NfL mit dem Alter erhöht. Dabei erhöht sich der Wert zwischen dem 20. und dem 50. Lebensjahr um das 2.5-fache und darüber hinaus verdoppelt sich der Wert schließlich bis zum 70. Lebensjahr (31). Die Erklärung für die altersabhängige Erhöhung der CSF-NfL-Konzentration ist noch nicht vollständig verstanden. Zum einen stellt der erniedrigte Umsatz der zerebrospinalen Flüssigkeit einen Erklärungsansatz dar (32). Zum anderen wird der langsame altersbedingte Schaden an den Neuronen als Grund für die Korrelation diskutiert (13). Durch die starke Korrelation zwischen CSF-NfL und sNfL kann diese Erhöhung der NfL-Konzentration auch im Serum messbar sein. Die Rolle von NfL als Biomarker hat mit dem Alter einen Einflussfaktor, der nicht außer Acht gelassen werden sollte. Viele neurologische Erkrankungen des höheren Alters könnten somit, unabhängig von der Erkrankung, höhere NfL-Konzentrationen aufweisen. In unserer Studie zeigte sich mit einem Median des Alters von 29 Jahren eine junge Kohorte. Die Aussagekraft wird somit nicht deutlich von einer altersbedingten Erhöhung der NfL-Konzentration beeinflusst.

2.4. Idiopathische Intrakranielle Hypertension

Die kürzlich veröffentlichte Studie von Beier et al. (2020) war der erste Schritt der Erforschung von NfL als Biomarker bei der IIH. Die Arbeit bezog sich vor allem auf die Erforschung des prognostischen Potenzials der NfL in Bezug auf den Auftritt eines optischen Nervenschadens. Dabei sammelten die Autor*innen Serum- und Liquorproben von 61 Patient*innen, bei denen klinisch die IIH vermutet oder diagnostiziert wurde. Hierbei beobachteten Beier et al. (2020) eine erhöhte NfL-Konzentration bei Patient*innen mit moderatem und schwerem Papillenödem im Vergleich zu Patient*innen mit geringem oder keinem Papillenödem. 35 Patient*innen

der Kohorte erfüllten die überarbeiteten Friedman Kriterien der IIH mit oder ohne Papillenödem. Bei diesem Teil der Kohorte wurde die CSF-NfL-Konzentration mit der Entstehung von bilateralen Gesichtsfelddefekten und einer bilateralen Atrophie des Sehnervs assoziiert. Bemerkenswert war die starke Korrelation zwischen der CSF-NfL-Konzentration mit dem maximalen Öffnungsdruck bei Lumbalpunktion und dem Öffnungsdruck zum Zeitpunkt der Probenentnahme ($r=0.67$, $p<0.001$). Die sNfL konnte die Studie in keinen Zusammenhang mit klinischen Parametern der IIH bringen. Das Resultat zeigte somit, dass CSF-NfL einen potenziellen Marker für die Prognostik von optischen Nervenschäden liefert (19).

Anknüpfend an diese Arbeit betrachteten wir auch den Öffnungsdruck bei Lumbalpunktion und andere klinische Parameter sowie zusätzlich die Liquorparameter mit besonderem Augenmerk auf die Integrität der Blut-Liquor-Schranke.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Lösungen und Reagenzien

Detektionsreagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102248
Bead Reagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102246
Streptavidin-β-galactosidase Reagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102250
Kalibrierungsreagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102255
Resorufin D-galactopyranoside Reagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 103159
Probenverdünnungspuffer	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102252

3.1.2. Laborgeräte

Automatisiertes Messinstrument für Single Molecule Arrays	Quanterix® Simoa™ HD-1 Analyzer®, Produktnummer 100438-R
Vortex-Schüttler	VWR® Analog
Zentrifugen	Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ X1 Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ 3 L-R Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 21
Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific™ MSC-Advantage™
-80° Labor-Gefrierschrank	Panasonic® Ultra-low temperature Freezer DU700VH

3.1.3. Laborzubehör

Microwell 96-Well Polypropylen- Platten mit V-Boden	Nunc®
Probenplatten für Single Molecule Arrays	Quanterix® Simoa™ Discs
Eppendorfgefäße 2,0 ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes
Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf Research®
Pipettenspitzen	STARLAB TipOne®
Akku-betriebene Pipettierhilfe	Hirschmann® Pipetus®
Serologische Einwegpipetten 5-25 ml	Greiner Bio-One™
Falcon Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-One™
Falcon Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One™
Mundschutz	HALYARD Health The lite one* Procedure Mask

3.2. Methoden

3.2.1. Studiendesign

Zwischen 2016 und 2020 wurden 62 Patient*innen der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Mainz mit der Diagnose der Idiopathischen intrakraniellen Hypertension und Papillenödem in eine Querschnittsstudie eingeschlossen. Die Diagnose der Idiopathischen intrakraniellen Hypertension wurde auf der Basis der überarbeiteten Friedman Kriterien getroffen. Diese Kriterien beinhalten (a) ein Papillenödem, (b) eine unauffällige neurologische Untersuchung mit Ausnahme einer Abduzensparese, (c) ein normal dargestelltes Hirnparenchym im MRT, (d) eine normwertige Komposition des Liquors, (e) ein erhöhter Eröffnungsdruck bei der Lumbalpunktion (≥ 25 cmH₂O)(33).

Einschlusskriterien: Diagnose der IIH gemäß den überarbeiteten Friedman Kriterien

Ausschlusskriterien: >60 Jahre

Zusätzlich zu demografischen Daten (Alter und Geschlecht), wurden einige klinische Parameter erhoben:

- 1) Größe, Gewicht und der daraus resultierende BMI
- 2) Sehnervenscheiden-Durchmesser (ONSD)
- 3) Liquoreröffnungsdruck im Liegen zum Zeitpunkt der Diagnose und zum Zeitpunkt der Probenentnahme
- 4) Stauungspapille bei Diagnosestellung
- 5) Beurteilung der Sehschärfe (Visus)
- 6) Kopfschmerzen bei Diagnosestellung
- 7) Begleiterkrankungen
- 8) Therapie zur Zeit der Probeentnahme

Nachdem eine Einverständniserklärung von allen Patient*innen eingeholt wurde, sammelte man gepaarte Serum- und Liquorproben und lagerte diese in Polypropylen-Röhrchen bei -80 °C. Die Lumbalpunktion wurde gemäß dem Standardverfahren der Universitätsmedizin Mainz als Teil der Diagnostik durchgeführt. Der Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion wurde durch ein Manometer erhoben. Der Ethikantrag (Antragsnummer 837.019.10) wurde durch die lokale Ethikkommission bewilligt. Alle Patient*innen stimmten dem Studieneinschluss schriftlich zu.

3.2.2. Liquoruntersuchung

Die Liquoranalyse wurde in einem standardisierten Verfahren als Teil der Routinediagnostik durchgeführt. Liquor, welcher mit Blut kontaminiert war, wurde nicht für die Auswertung dieser Studie verwendet. Die Liquorkonzentrationen von Albumin, Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) wurden mittels Immunnephelometrie bestimmt. Die Liquor-/Serum-Quotienten von Albumin (QAlb), IgA (QIgA), IgG (QIgG) und IgM (QIgM) definieren die Relation von der Liquorkonzentration zu der entsprechenden Serumkonzentration. Alle genutzten Referenzwerte beruhen auf der Definition gemäß Berlit (34).

3.2.3. Bestimmung der sNfL-Konzentration mittels SiMoA-Technologie

Die Serumproben der Kohorte wurden zusätzlich zum Zeitpunkt der Lumbalpunktion entnommen. Die Serumproben wurden in einem Standardverfahren maximal zwei Stunden nach Blutentnahme zentrifugiert, bei 2000 g über 10 Minuten bei Raumtemperatur. Direkt nach der Zentrifugation wurden die Proben einheitlich in Polypropylen-Tubes (300-600 µl/tube) gefüllt und bei -80 °C asserviert. Die sNfL-Konzentrationen wurden mittels des hochsensitiven „single-molecule array“ (SiMoA) Verfahrens ermittelt. Die Proben wurden in Duplikaten mehrere Runden mittels SiMoA HD-1 (Quanterix, USA) gemessen. Bei den Messungen wurden die NF-Light Advantage Kits (Quanterix) nach Vorgaben des Herstellers benutzt. Vor der ersten Untersuchung wurde Resorufin-β-D-galactopyranoside (RPG) bei 33 °C für 60 Minuten inkubiert. Für die Messungen wurde ein Variationskoeffizient (CV) eingeführt. Dieser Koeffizient stellt sich als Prozentzahl dar. Er wird errechnet durch Teilung der Standardabweichung beider Wiederholungen durch den Durchschnitt der beiden Wiederholungen multipliziert mit 100. Proben, die einen CV von über 20 % hatten oder Proben, bei denen ein Resultat fehlte, wurden zweimal gemessen (17). Schließlich bildet sich ein mittlerer Intra-Assay-CV von 6,2 %, der den Durchschnitt aller individuellen Proben CV's darstellt. Zwei tiefwertige und zwei hochwertige Kontrollen, die aus rekombinanten humanen NfL-Antigenen bestehen, wurden in jeden Probendurchlauf inkludiert. Dabei wurde die Platten Variation überprüft (Tief: Durchschnitt 8.8 pg/ml, inter-assay CV 13.6 %; Hoch: Durchschnitt 192.7 pg/ml, inter-assay CV 13,3 %). Die sNfL-Messungen wurden in Bezug auf die Kenntnis der klinischen Angaben verblindet durchgeführt.

3.2.4. Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen der Studie wurden mithilfe des Statistikprogramms SPSS 23.0 (IBM Corp, Armonk, NY) durchgeführt. Kontinuierliche Variablen wurden auf eine statistische Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test getestet. Im Fall einer Normalverteilung wurden die kontinuierlichen Variablen als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) beschrieben. Bei fehlender Normalverteilung wurden die Variablen durch ihren Median und den Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Kategoriale Variablen wurden als ganze Zahlen und Prozentwerte beschrieben. Assoziationen zwischen kontinuierlichen Variablen wurden mittels Korrelationsanalysen nach Spearman bestimmt. Assoziationen zwischen kontinuierlichen und kategorischen Variablen wurden durch die Nutzung von punktbiserialen Korrelationskoeffizienten bestimmt. Zum Vergleich der Mittelwerte zwischen kontinuierlichen Variablen wurde der t-Test (Student's t-Test) im Falle einer Normalverteilung herangezogen. Bei Ungleichverteilung wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die Fläche unter der Kurve („Area under the curve“, AUC) wurde vom sogenannten Receiver Operating Characteristic (ROC) hergeleitet. So wurden die sNfL, die CSF-NfL und das Verhältnis zwischen sNfL und CSF-NfL berechnet. Mithilfe dieses Verfahrens konnte durch Einbezug der Werte zwischen Patient*innen mit normalem Eröffnungsdruck und mit erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion unterschieden werden. Als Kontrolle für multiples Testen wurden die P-Werte angepasst gemäß des Benjamini-Hochberg Verfahrens mit einer Falscherkennungsrate von 0.1. Die P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Beschreibung der Kohorte

4.1.1. Demografische Angaben

Übereinstimmend mit der Geschlechterverteilung von IIH-Patient*innen in der Bevölkerung, ist ein Großteil der inkludierten Kohorte weiblich (93.5 %). Wichtig zu betonen ist, dass sich unsere Kohorte, mit einem Median von 29 Jahren, vergleichsweise jung darstellt. Somit konnten altersabhängige Anstiege der NfL-Konzentration vermieden werden, welche die Studienergebnisse verfälscht hätten. Trotz dessen gab es eine moderate Korrelation der sNfL-Konzentration mit dem Alter der Kohorte ($r=0.432$, $p=0.021$).

Tabelle 1

	Alter (Jahre)	Geschlecht, n (%)
Anzahl (%)		Männlich: 4 (6.5) Weiblich: 58 (93.5)
Median (IQR)	29.0 (24.0-36.3)	

4.1.2. Klinische Parameter

Gemäß den Erwartungen ist das Gewicht der Kohorte mit einem Mittelwert von 97.9 kg erhöht. Der Mittelwert des Body-Mass-Index (BMI) beträgt dabei 35.3 kg/m², was einer Adipositas Grad 2 entspricht. Von der Kohorte, welche 62 Patient*innen umfasst, haben 14.5 % kardiovaskuläre Risikofaktoren. 87.1 % gaben als Symptome Kopfschmerzen an, 66.1 % eine beeinträchtigte Sehschärfe, 16.1 % beklagten Gesichtsfeldausfälle und 11.3 % hatten eine Diplopie. Außerdem betrug der Durchmesser des Sehnervs im Mittelwert 0.66 cm (n=37).

Tabelle 2

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)	Mittelwert (\pmSD)
Krankheitsdauer (Jahre)		0 (0-6.5)	
Gewicht (kg)			97.9 \pm 18.7
BMI (kg/m²)			35.3 \pm 6.0
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Ja	9 (14.5)		
Nein	53 (85.5)		
Kopfschmerzen			
Ja	54 (87.1)		
Nein	8 (12.9)		
Beeinträchtigte Sehschärfe			
Ja	41 (66.1)		
Nein	21 (33.9)		
Gesichtsfeldausfälle			
Ja	10 (16.1)		
Nein	51 (82.3)		
Diplopie			
Ja	7 (11.3)		
Nein	55 (88.7)		
Durchmesser der Sehnervenscheide (cm)			0.66 \pm 0.06 (n=37)

4.1.3. Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion

Mit 87.1 % hatte ein Großteil der Kohorte einen erhöhten Eröffnungsdruck bei Probeentnahme. 12.9 % der Patient*innen hatten dagegen keinen erhöhten Eröffnungsdruck. Dabei stellt, laut Friedman, ein Eröffnungsdruck von >25 cmH₂O einen erhöhten Wert dar. Der Mittelwert des Eröffnungsdrucks erwies sich mit 39.1 cmH₂O höher zum Zeitpunkt der Diagnose als mit 34.4 cmH₂O zum Zeitpunkt der Probeentnahme.

Tabelle 3

Parameter	Anzahl (%)	Mittelwert (±SD)
Eröffnungsdruck zur Diagnosestellung (cmH₂O)		39.1 ± 9.1
Eröffnungsdruck zur Probeentnahme (cmH₂O)		34.4 ± 10.3
Erhöhter Eröffnungsdruck zur Probeentnahme		
Ja	54 (87.1)	
Nein	8 (12.9)	

4.1.4. Therapie

66.1 % der Kohorte nahm zum Zeitpunkt der Probeentnahme keine Medikation gegen die IIH ein. Dagegen wurden 33.9 % der Patient*innen medikamentös behandelt. Von diesen 33.9 % wurden 27.4 % mit Acetazolamid als Monotherapie behandelt und 6.5 % mit einer Kombination aus Acetazolamid + Topiramate oder Furosemid.

Tabelle 4

Parameter	Anzahl (%)
IIH-Medikation	
Ja	21 (33.9)
Nein	41 (66.1)
Art der Medikation	
Acetazolamid Monotherapie	17 (27.4)
Acetazolamid + Topiramate/Furosemid	4 (6.5)
Keine	41 (66.1)

4.1.5. Liquorparameter

Die Leukozytenzahl der Kohorte befindet sich im Referenzbereich. Zusätzlich liegen auch QAlb mit einem Mittelwert von 4.5 und das Gesamteiweiß im Liquor mit einem Mittelwert von 28.6 mg/dl, als Marker der funktionellen Blut-Hirn-Schranke im Normalbereich. Der Wert für CSF-NfL liegt im Median bei 508.9 pg/ml und der Wert für sNfL liegt im Median bei 5.7 pg/ml. QNfL liegt im Median bei 92.3 und hat einen Mittelwert von 133.2.

Tabelle 5

Parameter	Median (IQR)	Mittelwert (\pm SD)	Referenzwerte
Leukozytenzahl (/ μ l)	1 (1-2)		≤ 4
Gesamteiweiß (mg/dl)		28.6 \pm 9.2	15-40
QAlb		4.5 \pm 1.9	≤ 6.5 (<40 Jahre) ≤ 8 (>40 Jahre)
CSF-NfL (pg/ml)	508.9 (374-1108.9) (n=61)		
sNfL (pg/ml)	5.7 (4.5-8.4) (n=46)		
QNfL (CSF-NfL/sNfL)	92.3 (62.8-191.7) (n=45)	133.2 \pm 103.1	

4.2. Assoziationen verschiedener Parameter mit Neurofilament-Leichtketten

Die CSF-NfL-Konzentration und die sNfL-Konzentration korrelierten moderat zueinander ($r=0.663$, $p<0.001$; Abbildung 4).

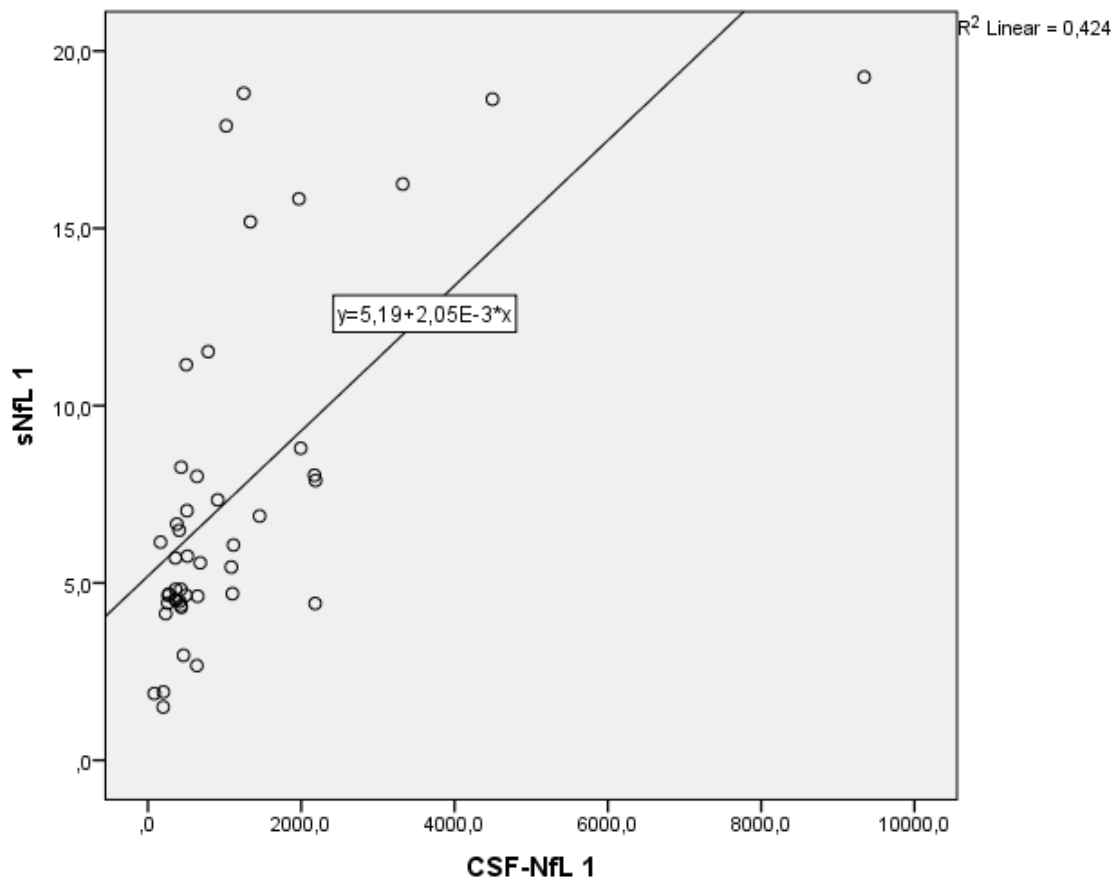


Abbildung 4: Korrelation zwischen sNfL und CSF-NfL

Dargestellt ist die Korrelation zwischen der sNfL- und der CSF-NfL-Konzentration. Die CSF-NfL-Konzentration ist dabei auf der x-Achse zu sehen und die sNfL-Konzentration auf der y-Achse.

Abkürzungen: sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum, CSF-NfL: Neurofilament-Leichtketten im Liquor

Interessanterweise zeigte sich eine Verbindung zwischen der Konzentration von CSF-NfL mit dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion zum Zeitpunkt der Probenentnahme ($r=0.419$, $p=0.009$; Abbildung 5).

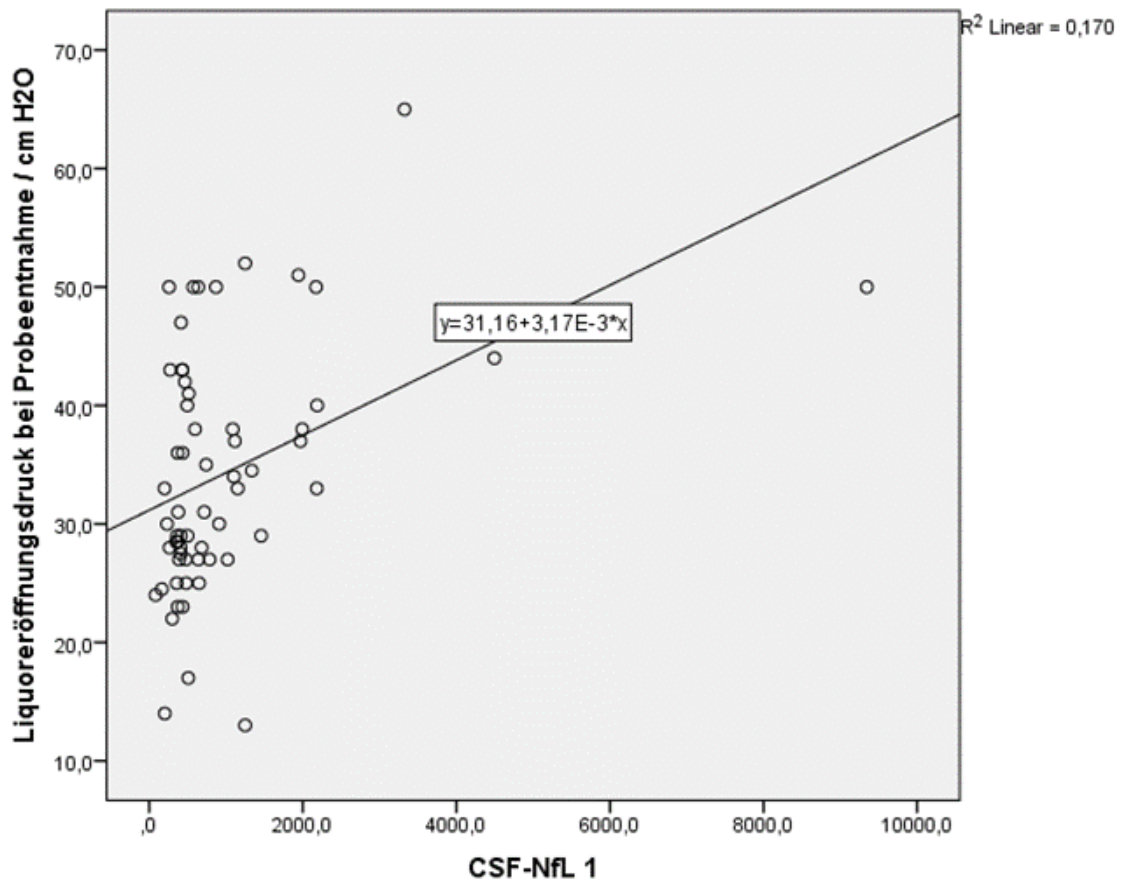


Abbildung 5: Korrelation zwischen Liquoreröffnungsdruck und CSF-NfL

Dargestellt ist eine Korrelation zwischen dem Liquoreröffnungsdruck bei Probeentnahme und der CSF-NfL-Konzentration. Die CSF-NfL-Konzentration ist dabei auf der x-Achse zu sehen und der Liquoreröffnungsdruck bei Probeentnahme auf der y-Achse.

Abkürzungen: CSF-NfL: Neurofilament-Leichtketten im Liquor

Im Gegensatz dazu bildete sich keine Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion zum Zeitpunkt der Probenentnahme ($r=0.017$, $p=0.980$; Abbildung 6).

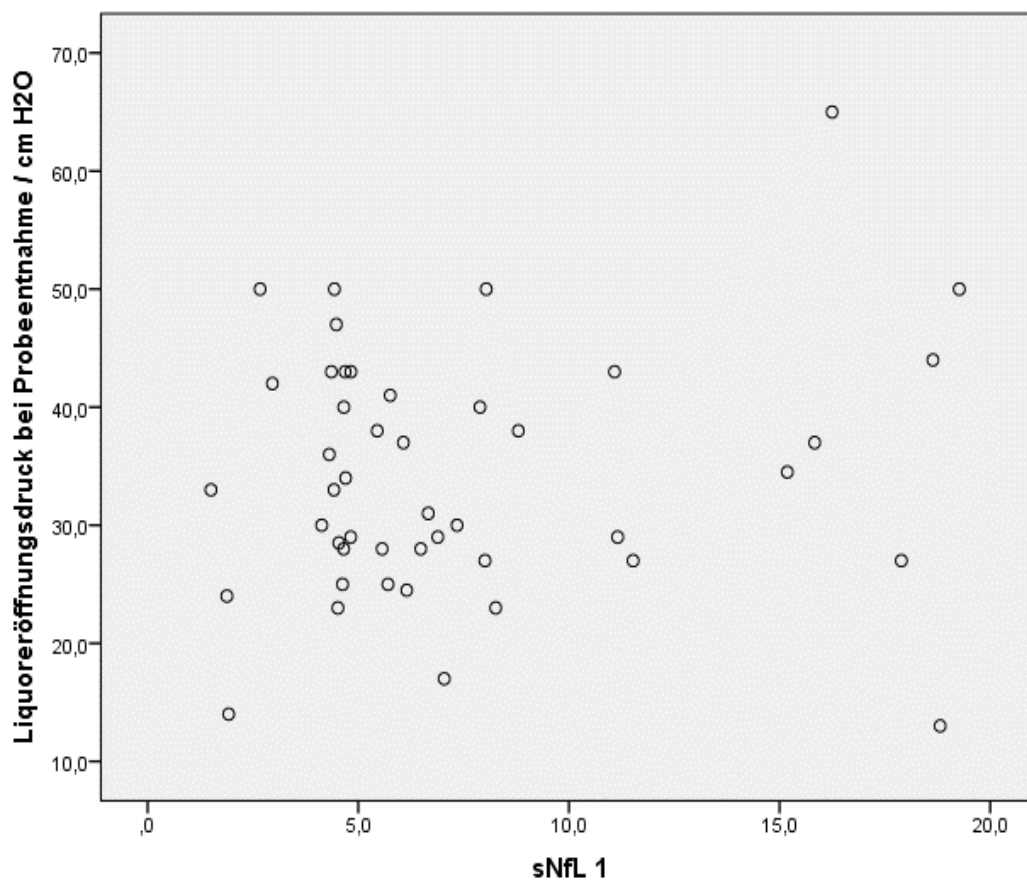


Abbildung 6: Korrelation zwischen Liquoreröffnungsdruck und sNfL

Dargestellt ist eine Korrelation zwischen dem Liquoreröffnungsdruck bei Probeentnahme und der sNfL-Konzentration. Die sNfL-Konzentration ist dabei auf der x-Achse zu sehen und der Liquoreröffnungsdruck bei Probeentnahme auf der y-Achse.

Abkürzungen: sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

Es zeigte sich eine fehlende Assoziation der sNfL-Konzentration und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion in Verbindung mit einer relativ schwachen Korrelation der CSF-NfL-Konzentration und der sNfL-Konzentration. Daraus lässt sich die Hypothese aufstellen, dass ein verminderter Transfer von NfL vom Liquor in das Serum durch den erhöhten Druck im System entsteht. Interessanterweise steigt der Korrelationskoeffizient r , welcher die Korrelation zwischen der CSF-NfL-Konzentration und der sNfL-Konzentration misst, von 0.663 auf 0.857, wenn man nur Patient*innen mit normalem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion in die Korrelationsanalyse

inkludiert. Diese Assoziation erreichte jedoch keine Signifikanz nach Korrektur für multiples Testen. Der p Wert betrug vor der Benjamini-Hochberg Korrektur 0.014 und nach der Korrektur 0.071. Der Grund für die fehlende Signifikanz ist wahrscheinlich die relativ geringe Anzahl an Patient*innen mit normalem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion, bei gleichzeitiger Verfügbarkeit von Liquor- und Serumproben (n=7). Bezugnehmend auf das Konzept von QAlb, als Marker für die Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke, kalkulierten wir das Verhältnis der CSF-NfL-Konzentration und der sNfL-Konzentration, als Marker einer funktionellen Liquor-Blut-Durchlässigkeit (QNfL). Auffallend war, dass die Korrelation zwischen QNfL und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion noch höher war als jene zwischen der CSF-NfL-Konzentration mit dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion (0.541, p=0.002; Abbildung 7).

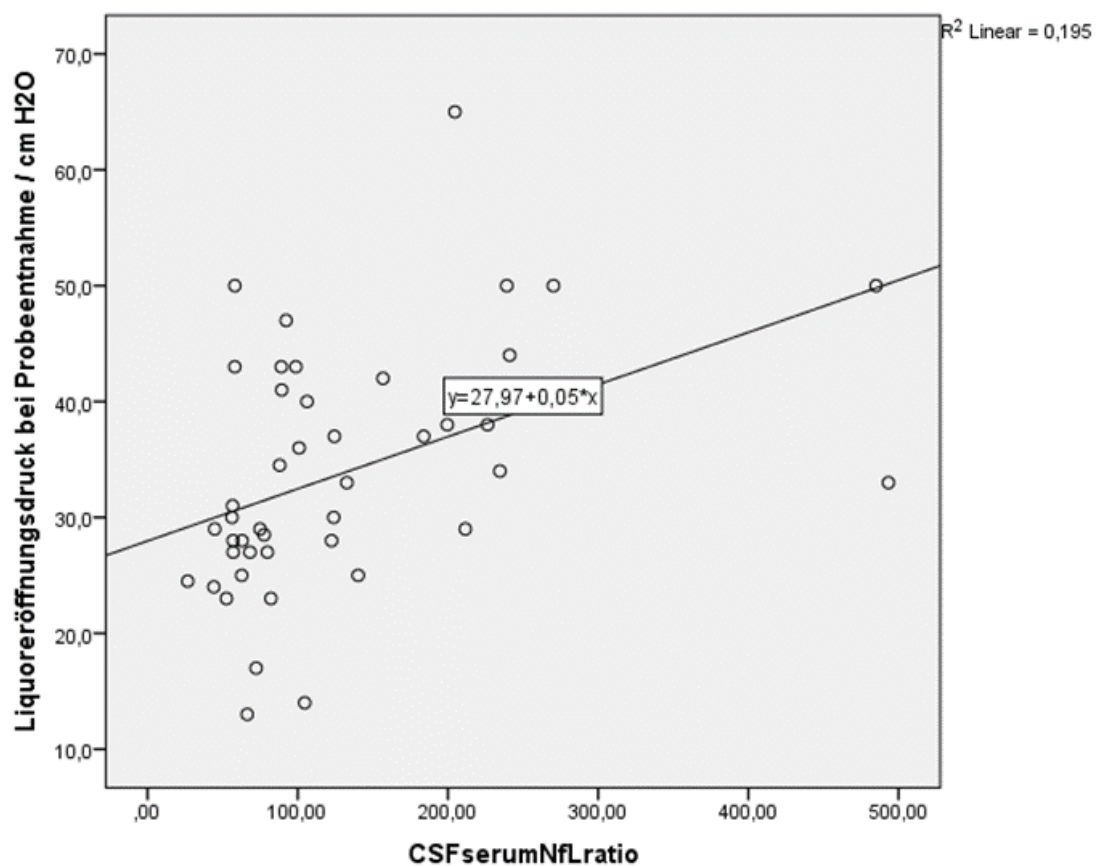


Abbildung 7: Korrelation zwischen Liquoreröffnungsdruck und CSF-NfL/sNfL Quotient

Dargestellt ist die Korrelation zwischen dem Liquoreröffnungsdruck bei Probeentnahme und dem Verhältnis von der CSF-NfL-Konzentration zu der sNfL-Konzentration (QNfL). QNfL ist dabei auf der x-Achse zu sehen und der Liquoreröffnungsdruck bei Probeentnahme auf der y-Achse.

Abkürzungen: QNfL: Verhältnis von Neurofilament-Leichtketten im Liquor zu Neurofilament-Leichtketten im Serum

Die Patient*innenauswahl für die Kalkulation dieser Korrelationen schloss 45 Patient*innen ein, welche sowohl Liquor- als auch Serumproben zur Verfügung stellten. Um auszuschließen, dass die Korrelation durch die Patient*innenauswahl beeinflusst wurde, führten wir eine Korrelationsanalyse zwischen der CSF-NfL-Konzentration und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion in der gleichen Kohorte (n=45) durch. Im Gegenzug stellte sich hier ein kleinerer Korrelationskoeffizient ($r=0.343$) als für QNfL dar. QNfL dagegen war stark assoziiert mit der CSF-NfL-Konzentration ($r=0.705$, $p<0.001$; Abbildung 8), aber nicht assoziiert mit der sNfL-Konzentration ($r=0.050$, $p=0.962$; Abbildung 9).

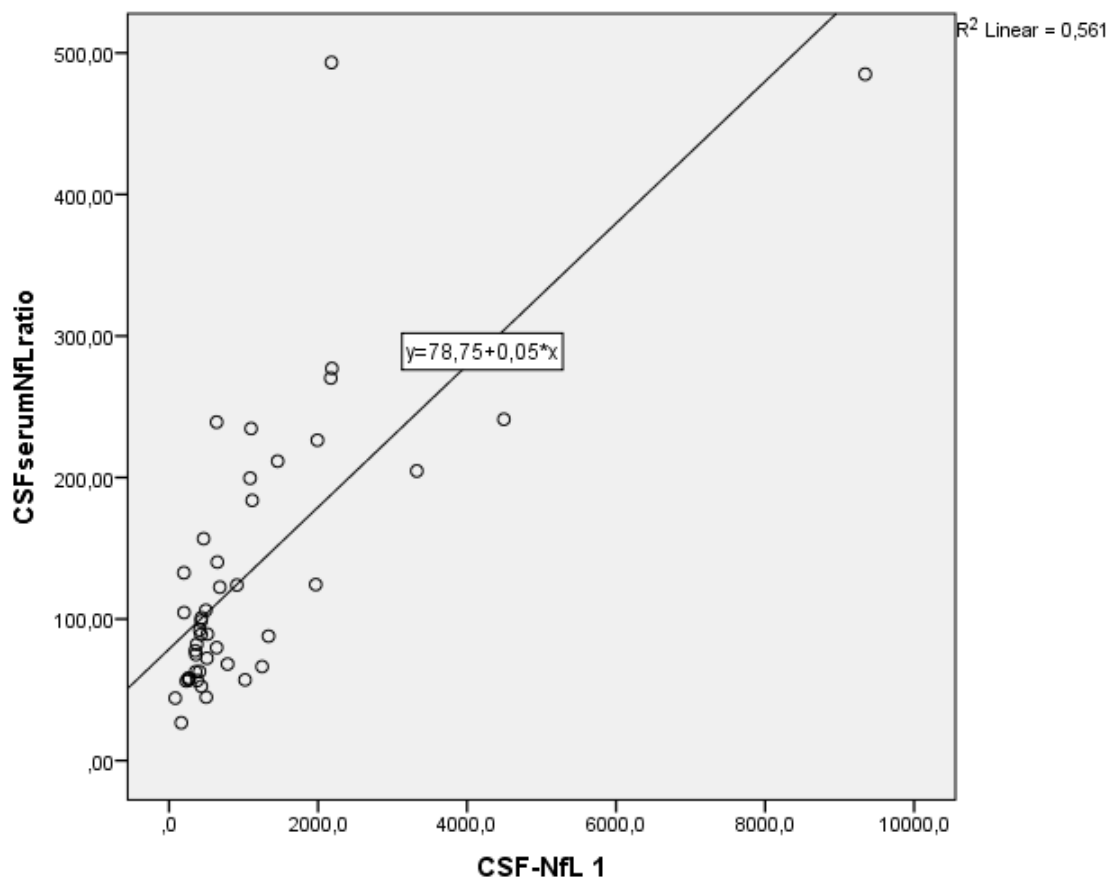


Abbildung 8: Korrelation zwischen CSF-NfL/sNfL Quotient und CSF-NfL

Abgebildet ist die Korrelation zwischen dem Verhältnis von der CSF-NfL-Konzentration zu der sNfL-Konzentration (QNfL) und der CSF-NfL-Konzentration. Die CSF-NfL-Konzentration ist dabei auf der x-Achse abgebildet und QNfL auf der y-Achse.

Abkürzungen: QNfL: Verhältnis von Neurofilament-Leichtketten im Liquor zu Neurofilament-Leichtketten im Serum, CSF-NfL: Neurofilament-Leichtketten im Liquor

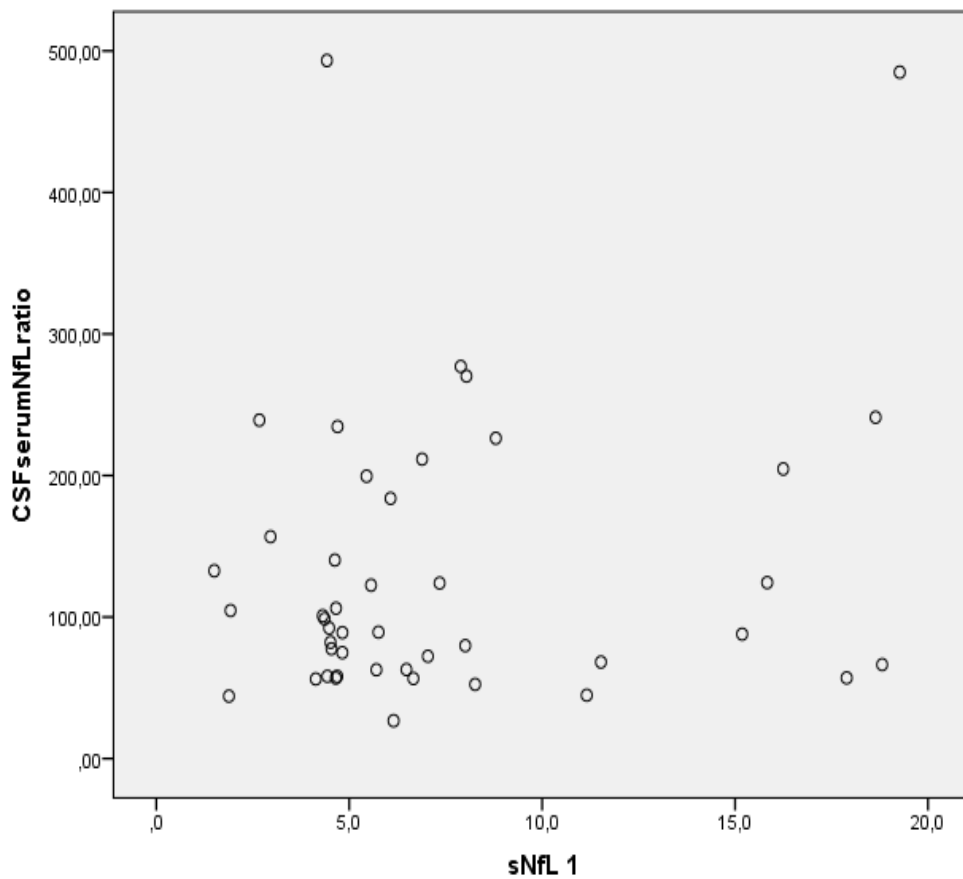


Abbildung 9: Korrelation zwischen CSF-NfL/sNfL Quotient und sNfL

Dargestellt ist die Korrelation zwischen dem Verhältnis von der CSF-NfL-Konzentration zu der sNfL-Konzentration (QNfL) und der sNfL-Konzentration. Die sNfL-Konzentration ist dabei auf der x-Achse zu sehen und QNfL auf der y-Achse.

Abkürzungen: QNfL: Verhältnis von Neurofilament-Leichtketten im Liquor zu Neurofilament-Leichtketten im Serum, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

In einer Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve) haben CSF-NfL-Konzentrationen (AUC 0.767, 95 % CI 0.578-0.955; Abbildung 10) und QNfL (AUC 0.805, 95 % CI 0.648-0.961; Abbildung 11) ermöglicht, zwischen Patient*innen mit erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion und Patient*innen mit normalem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion zu unterscheiden. sNfL hingegen besitzen eine geringe Unterscheidungskraft (AUC 0.542, 95 % CI 0.276-0.808; Abbildung 12).

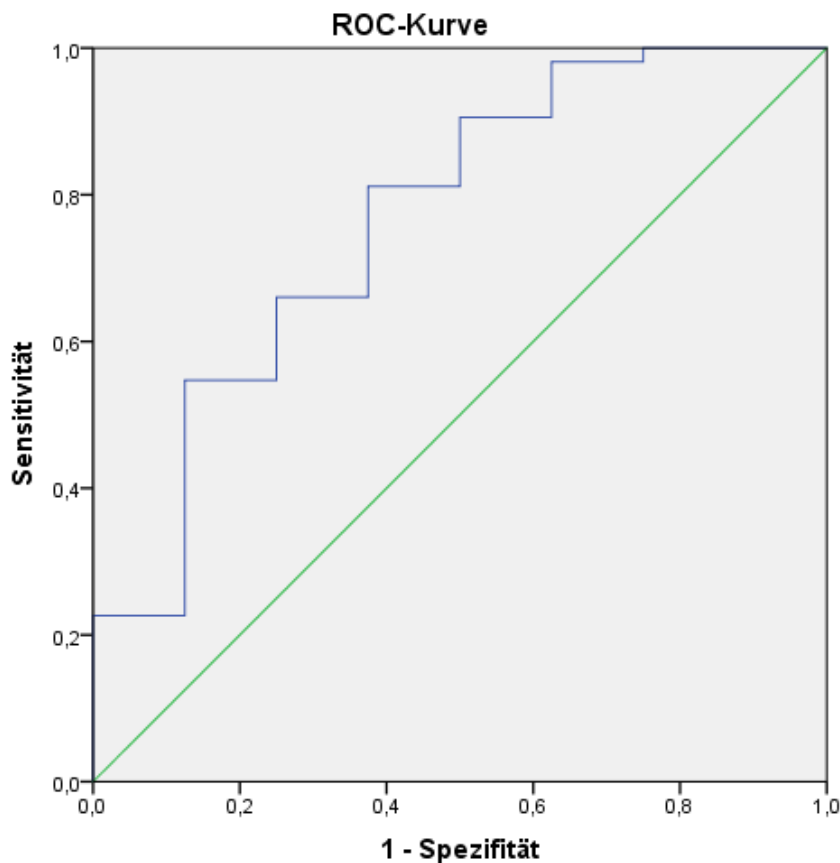


Abbildung 10: CSF-NfL, AUC 0.767 (95 % CI 0.578-0.955)

Abgebildet ist die ROC-Kurve der CSF-NfL-Konzentration, dabei ist die Sensitivität auf der y-Achse zu sehen und die Spezifität auf der x-Achse. Das Konfidenzintervall wurde auf 95 % festgelegt.

Abkürzungen: AUC: Fläche unter der Kurve (Area under the curve).

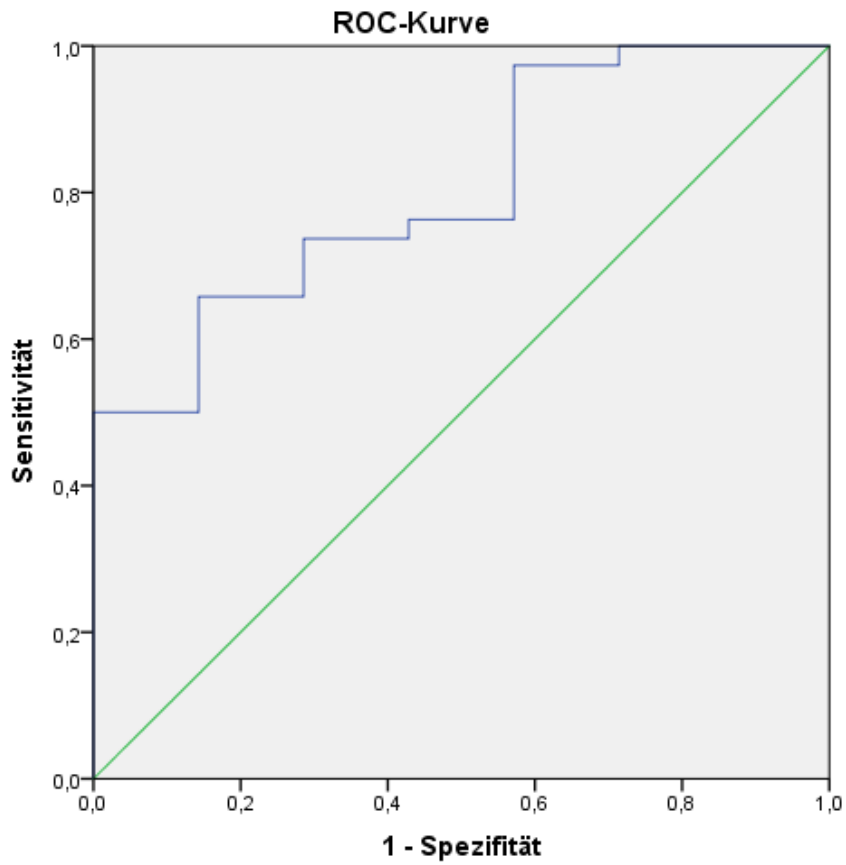


Abbildung 11: QNfL, AUC 0.805 (95% CI 0.648-0.961)

Dargestellt ist die ROC-Kurve der QNfL-Konzentration, wobei die Sensitivität auf der y-Achse und Spezifität auf der x-Achse zu sehen ist. Das Konfidenzintervall wurde auf 95 % festgelegt.

Abkürzungen: AUC: Fläche unter der Kurve (Area under the curve).

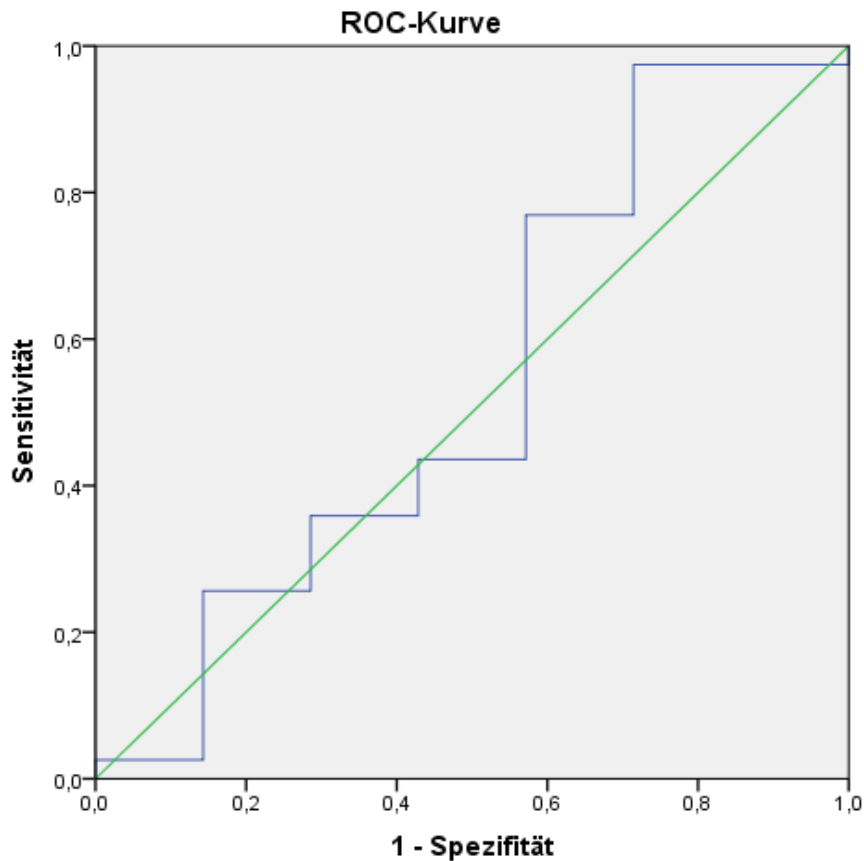


Abbildung 12: sNfL, AUC 0.542 (95 % CI 0.276-0.808)

Dargestellt ist die ROC-Kurve der sNfL-Konzentration, wobei die Sensitivität auf der y-Achse und die Spezifität auf der x-Achse zu sehen ist. Das Konfidenzintervall wurde auf 95 % festgelegt.

Abkürzungen: AUC: Fläche unter der Kurve (Area under the curve).

Der Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion bei Patient*innen, die schon medikamentös behandelt wurden, war geringer als bei denen ohne medikamentöse Therapie. Außerdem zeigte sich bei dieser Kohorte eine negative Korrelation mit der Krankheitsdauer ($r=-0.517$, $p<0.001$).

Darüber hinaus wurden erhöhte Konzentrationen von Proteinen im Liquor auch mit der Krankheitsdauer ($r=0.346$, $p=0.046$) und dem Alter ($r=0.402$, $p=0.041$) assoziiert. Die Konzentration von CSF-NfL korrelierte zusätzlich mit Diplopie ($r=0.356$, $p=0.043$).

5. Diskussion

Wir beobachteten eine starke Korrelation zwischen CSF-NfL-Konzentrationen und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion, dagegen waren sNfL-Konzentrationen unabhängig von einem erhöhtem Eröffnungsdruck. Als Grund für diese Diskrepanz könnte eine funktionelle Liquor-Abflussstörung in Frage kommen. Diese Abflussstörung wird durch ein erhöhtes Verhältnis von CSF-NfL zu sNfL dargestellt (QNfL).

Wie auch Beier et al. in einer Studie 2020 zeigten (19), observierten wir eine positive Korrelation von CSF-NfL-Konzentrationen mit dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion zum Zeitpunkt der Probeentnahme. Diese Korrelation konnte für sNfL-Konzentrationen nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten nur CSF-NfL-Konzentrationen ermöglichen zwischen Patient*innen mit erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion (>25 cmH₂O) und Patient*innen mit normalem Eröffnungsdruck zu unterscheiden. Hierbei zeigten die sNfL-Konzentrationen dagegen eine sehr schwache Unterscheidungskraft. Dieser Aspekt war auffällig, da sich in anderen neurologischen Erkrankungen die Assoziation von der sNfL-Konzentration mit klinischen Ergebnisparametern ähnlich abbildete, wie zu den Assoziationen der CSF-NfL-Konzentration (23, 29, 35, 36). Darüber hinaus stellte sich auch die Assoziation zwischen der CSF-NfL-Konzentration und der sNfL-Konzentration schwächer dar als bei anderen neurologischen Erkrankungen (36), besonders bei Patient*innen mit erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion. Diese Beobachtungen leiteten uns zu der Hypothese, dass ein erhöhter intrakranieller Druck mit einem reduzierten Transfer von NfL vom Liquor in das Serum assoziiert ist. Somit könnte eine Schädigung der Durchlässigkeit in der Blut-Liquor-Schranke vorliegen. Der Pathomechanismus der zur IIH führt ist noch nicht vollständig verstanden; eine wichtige Hypothese ist aber der verminderte Abfluss von Liquor durch eine Blockierung, welche konsekutiv einen erhöhten intrakraniellen Druck bewirkt (5). Durch das exklusive extrathekale Vorkommen von Albumin, wird der Quotient der Albumin-Konzentration im Liquor zum Serum (QA_{lb}) häufig als Indikator für die Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke verwendet (37). Der Weg über die Blut-Liquor-Schranke stellt die einzige Möglichkeit dar, wie Albumin in den Liquor gelangen kann. NfL dagegen sind stabilisierende Gerüstproteine, welche nur von peripheren und zentralen Nerven, exprimiert werden (13). Auf dieser Erklärung basierend, könnte das Verhältnis zwischen Liquor- und

Serum-Konzentrationen von NfL (QNfL) als potenzieller Stellvertreter dienen, um die Funktionalität der Blut-Liquor-Schranke darzustellen. Dabei ist es wichtig, dass kein peripherer Nervenschaden im Zuge einer peripheren Neuropathie vorliegt. Die Wichtigkeit dieser Annahme wird durch eine kürzlich erschienene Studie von Körtvelyessy et al. (2020) untermauert. Diese nutzte den Quotienten der NfL-Konzentration in Liquor zu Serum (QNfL) als Mittel für die Bestimmung der Herkunft von NfL, in einer Kohorte von Patient*innen mit Guillain-Barré-Syndrom (GBS). Die Autor*innen observierten eine starke Assoziation zwischen der Konzentration von sNfL und QNfL, wohingegen die Konzentration von CSF-NfL unabhängig von QNfL war. Diese Beobachtungen brachten sie zu der Erkenntnis, dass der periphere Schaden der Nerven in ihrer Kohorte größer war als der zentrale Schaden (38). Im Kontrast zu der genannten Kohorte von GBS-Patient*innen korrelierte in unserer Kohorte QNfL stark mit der Konzentration von CSF-NfL. Dies könnte dafürsprechen, dass in unserer eher jungen Kohorte von IIH-Patient*innen eine zentrale Freisetzung von NfL ohne begleitende periphere Neuropathie stattfand. Diese Annahme stünde im Einklang mit den Ergebnissen von Beier et al. (2020), die eine Assoziation zwischen Konzentrationen von CSF-NfL mit permanentem Schaden des Sehnervs und maximalem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion feststellten. Daraus entsteht die Schlussfolgerung, dass die CSF-NfL-Konzentration den Druck-induzierten Schaden des Sehnervs widerspiegelt (19).

In unserer Kohorte mit IIH-Patient*innen zeigte sich eine stärkere Korrelation zwischen QNfL und erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion als bei der CSF-NfL-Konzentration und dem Eröffnungsdruck. Zusätzlich scheint ein isolierter Schaden des Sehnervs im Wesentlichen nicht zu einer Erhöhung der NfL-Konzentration bei Patient*innen mit Multipler Sklerose und klinisch isoliertem Syndrom beizutragen (39). Deshalb nehmen wir an, dass ein erhöhter intrakranieller Druck zu einer Beeinträchtigung des Abflusses der NfL mit konsekutivem Ungleichgewicht zwischen NfL-Konzentrationen im Liquor und im Serum führt. Diese These wird auch dadurch unterstützt, dass der Mittelwert des Verhältnisses von CSF-NfL zu sNfL (QNfL) deutlich höher ist, als in zuvor veröffentlichten, gesunden Kontrollgruppen (133.2 vs. 26.7) (38). Obwohl die Mechanismen, die den Abfluss von Liquor kontrollieren, noch ungenau definiert sind, werden die Arachnoidalgranulationen und Lymphgefäße für diese Regulation in Betracht gezogen (5). Darüber hinaus wurde kürzlich von Lenck et al. (2018) vorgeschlagen, dass eine anfängliche Störung des Transports der interstitiellen

Flüssigkeit durch das sogenannte glymphatische System in den Liquor und in die Sinusvenen eine hydrodynamische Kaskade auslösen könnte (12). Das glymphatische System wurde das erste Mal 2012 von Iliff et al. beschrieben (**Abb. 13**) (11). Das System bildet einen Transportweg von Flüssigkeiten über das gesamte Gehirn. Dabei spielen der para-arterielle Zufluss von subarachnoidalem Liquor in das Interstitium (**Abb.13a**) und die Beseitigung der interstitiellen Flüssigkeit entlang großkalibriger Venen (**Abb.13b**) eine bedeutende Rolle. Außerdem wurde festgestellt, dass entlang dieses Systems interstitiell gelöste Stoffe, wie zum Beispiel Beta-Amyloid, abtransportiert werden (**Abb.13c**) (11).

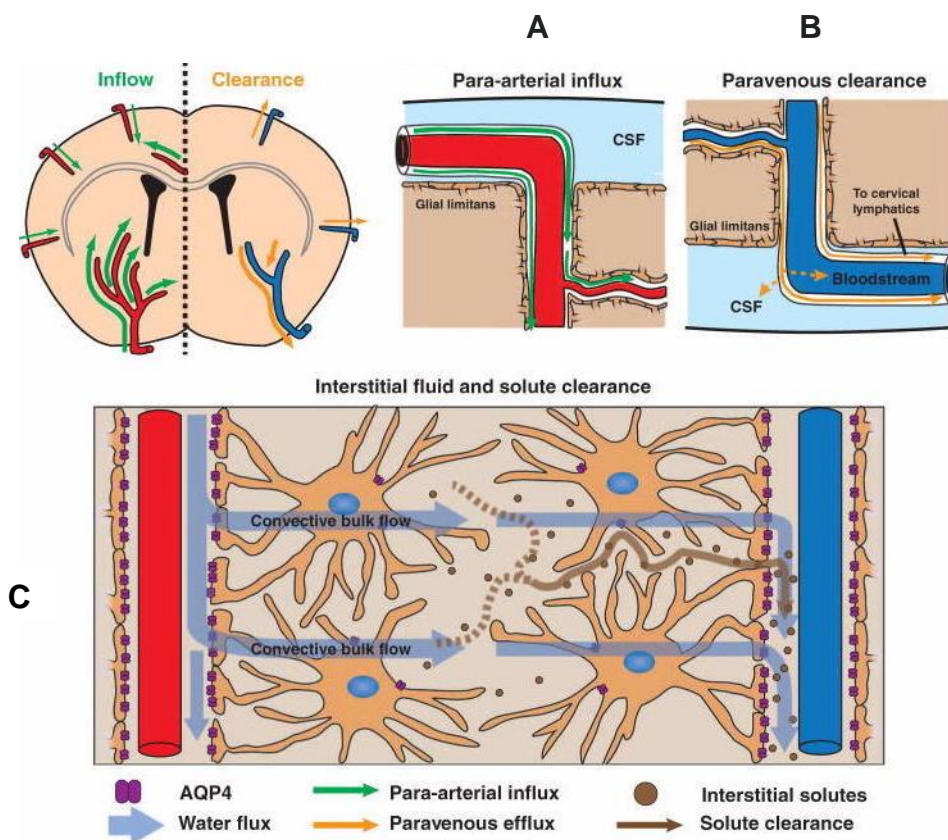


Abbildung 13: Transportweg des glymphatischen Systems

A: Paraarterieller Zufluss von subarachnoidalem Liquor in das Interstitium

B: Paravenöse Beseitigung interstitieller Flüssigkeit

C: Abtransport interstitiell gelöster Flüssigkeiten

Abbildung aus Jeffrey J Iliff et al., Sci Transl Med 2012 (11)

Man könnte annehmen, dass das glymphatische System auch für einen Teil des Transports von NfL vom Hirnparenchym in den Liquor und folgend auch in das Serum

verantwortlich ist. Jedoch ist momentan nicht bekannt, welche anatomischen Strukturen in den Vorgang der Freisetzung von NfL involviert sind.

Aus den Ergebnissen unserer Studie lassen sich folgende Hypothesen schließen, welche in der Zukunft durch andere Studien weiter erforscht werden könnten:

- 1.) Erhöhter intrakranieller Druck bei Patient*innen mit einer IIH könnte zu einer Störung des Abflusses von NfL vom Liquor in das Serum in Kombination mit erhöhter Freisetzung von NfL von beschädigten Neuronen in den Liquor führen.

- 2.) Abflussstörungen von NfL vom Liquor in das Serum könnten auch die fehlende Assoziation zwischen der sNfL-Konzentration und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion sowie die schwache Korrelation zwischen sNfL und CSF-NfL begründen.

- 3.) Der genaue Pathomechanismus, welcher zu einem erhöhtem Hirndruck führt, ist noch unbekannt. Aber eventuell ist die gleiche Struktur, die für den Abfluss von NfL vom Liquor in das Serum verantwortlich ist, auch involviert in der Pathogenese der IIH (siehe Lenck et al. 2018) (12).

6. Zusammenfassung

In der Arbeit zeigte sich ein Zusammenhang zwischen den CSF-NfL-Konzentrationen und dem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion. Außerdem waren die sNfL-Konzentrationen unabhängig von einem erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion. Dieser Kontrast könnte durch eine Liquor Abflussstörung bei den Patient*innen begründet sein, welche sich auch durch einen erhöhten Quotienten von CSF-NfL zu sNfL darstellt (QNfL). Dazu kommt eine nur schwache Korrelation zwischen der CSF-NfL-Konzentration und der sNfL-Konzentration.

Darüber hinaus diskutierten wir die Rolle von QNfL als potenziellen Marker für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. In der Kohorte stellte sich eine stärkere Assoziation zwischen QNfL und erhöhtem Eröffnungsdruck bei Lumbalpunktion als zwischen der CSF-NfL-Konzentration und dem Eröffnungsdruck dar.

Außerdem stellte sich heraus, dass QNfL stark mit der Konzentration von CSF-NfL assoziiert war. Dieser Fakt könnte auf eine NfL-Freisetzung in den zentralen Neuronen hindeuten, die zum Beispiel durch die in Kombination mit der IIH häufig auftretenden Optikusatrophie entstehen kann.

Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man folgern, dass der erhöhte intrakranielle Druck bei der IIH zu der Abflussstörung vom Liquor in das Serum führen kann. Andersherum könnten die Strukturen, die für den Abfluss von Liquor verantwortlich sind, auch bei der Entstehung der Erkrankung beteiligt sein. Somit stellt die Pathogenese ein komplexes Gebilde dar, welches bis heute noch nicht komplett erforscht und verstanden ist.

Literaturverzeichnis

1. Mollan SP, Davies B, Silver NC, Shaw S, Mallucci CL, Wakerley BR, et al. Idiopathic intracranial hypertension: consensus guidelines on management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(10):1088-100.
2. Digre KB, Bruce BB, McDermott MP, Galetta KM, Balcer LJ, Wall M. Quality of life in idiopathic intracranial hypertension at diagnosis: IIH Treatment Trial results. *Neurology*. 2015;84(24):2449-56.
3. Hatem CF, Yri HM, Sørensen AL, Wegener M, Jensen RH, Hamann S. Long-term visual outcome in a Danish population of patients with idiopathic intracranial hypertension. *Acta Ophthalmol*. 2018;96(7):719-23.
4. Yri HM, Fagerlund B, Forchhammer HB, Jensen RH. Cognitive function in idiopathic intracranial hypertension: a prospective case-control study. *BMJ Open*. 2014;4(4):e004376.
5. Markey KA, Mollan SP, Jensen RH, Sinclair AJ. Understanding idiopathic intracranial hypertension: mechanisms, management, and future directions. *Lancet Neurol*. 2016;15(1):78-91.
6. Wall M, McDermott MP, Kieburtz KD, Corbett JJ, Feldon SE, Friedman DI, et al. Effect of acetazolamide on visual function in patients with idiopathic intracranial hypertension and mild visual loss: the idiopathic intracranial hypertension treatment trial. *Jama*. 2014;311(16):1641-51.
7. Scoffings DJ, Pickard JD, Higgins JN. Resolution of transverse sinus stenoses immediately after CSF withdrawal in idiopathic intracranial hypertension. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;78(8):911-2.
8. Hoffmann J, Mollan SP, Paemeleire K, Lampl C, Jensen RH, Sinclair AJ. European Headache Federation guideline on idiopathic intracranial hypertension. *The Journal of Headache and Pain*. 2018;19(1):93.
9. U. W. Idiopathische intrakranielle Hypertension (IIH), S1-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2019.
10. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015;523(7560):337-41.
11. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012;4(147):147ra11.
12. Lenck S, Radovanovic I, Nicholson P, Hodaie M, Krings T, Mendes-Pereira V. Idiopathic intracranial hypertension: The veno glymphatic connections. *Neurology*. 2018;91(11):515-22.
13. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):577-89.
14. Teunissen CE, Khalil M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012;18(5):552-6.

15. Bridel C, van Wieringen WN, Zetterberg H, Tijms BM, Teunissen CE, Alvarez-Cermeño JC, et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2019;76(9):1035-48.
16. Benatar M, Wu J, Andersen PM, Lombardi V, Malaspina A. Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Ann Neurol.* 2018;84(1):130-9.
17. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain.* 2018;141(8):2382-91.
18. Lu CH, Macdonald-Wallis C, Gray E, Pearce N, Petzold A, Norgren N, et al. Neurofilament light chain: A prognostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology.* 2015;84(22):2247-57.
19. Beier D, Korsbæk JJ, Madsen JS, Olsen DA, Molander LD, Hagen SM, et al. Neurofilament light chain as biomarker in idiopathic intracranial hypertension. *Cephalalgia.* 2020;40(12):1346-54.
20. Rowe FJ. Assessment of visual function in idiopathic intracranial hypertension. *Br J Neurosurg.* 2011;25(1):45-54.
21. Rohr AC, Riedel C, Fruehauf MC, van Baalen A, Bartsch T, Hedderich J, et al. MR imaging findings in patients with secondary intracranial hypertension. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011;32(6):1021-9.
22. Bono F, Salvino D, Tallarico T, Cristiano D, Condino F, Fera F, et al. Abnormal pressure waves in headache sufferers with bilateral transverse sinus stenosis. *Cephalalgia.* 2010;30(12):1419-25.
23. Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Sonesson C, Bonnier G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler.* 2016;22(12):1550-9.
24. Gagliardi D, Meneri M, Saccomanno D, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Diagnostic and Prognostic Role of Blood and Cerebrospinal Fluid and Blood Neurofilaments in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Review of the Literature. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).
25. Rissin DM, Walt DR. Digital readout of target binding with attomole detection limits via enzyme amplification in femtoliter arrays. *J Am Chem Soc.* 2006;128(19):6286-7.
26. Rissin DM, Walt DR. Digital concentration readout of single enzyme molecules using femtoliter arrays and Poisson statistics. *Nano Lett.* 2006;6(3):520-3.
27. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol.* 2010;28(6):595-9.
28. Chang L, Rissin DM, Fournier DR, Piech T, Patel PP, Wilson DH, et al. Single molecule enzyme-linked immunosorbent assays: theoretical considerations. *J Immunol Methods.* 2012;378(1-2):102-15.
29. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2017;81(6):857-70.

30. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, Corr EM, Logroscino G, Robberecht W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17071.
31. Yilmaz A, Blennow K, Hagberg L, Nilsson S, Price RW, Schouten J, et al. Neurofilament light chain protein as a marker of neuronal injury: review of its use in HIV-1 infection and reference values for HIV-negative controls. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(8):761-70.
32. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J Neurol Sci*. 1994;122(2):189-203.
33. Friedman DI, Liu GT, Digre KB. Revised diagnostic criteria for the pseudotumor cerebri syndrome in adults and children. *Neurology*. 2013;81(13):1159-65.
34. P. B. *Klinische Neurologie*. Springer Verlag, Heidelberg. 2011.
35. Bacioglu M, Maia LF, Preische O, Schelle J, Apel A, Kaeser SA, et al. Neurofilament Light Chain in Blood and CSF as Marker of Disease Progression in Mouse Models and in Neurodegenerative Diseases. *Neuron*. 2016;91(1):56-66.
36. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R, Topping J, Nissim A, Malaspina A, et al. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One*. 2013;8(9):e75091.
37. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci*. 2001;184(2):101-22.
38. Körtvelyessy P, Kuhle J, Düzel E, Vielhaber S, Schmidt C, Heinius A, et al. Ratio and index of Neurofilament light chain indicate its origin in Guillain-Barré Syndrome. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020;7(11):2213-20.
39. Engel S, Steffen F, Uphaus T, Scholz-Kreisel P, Zipp F, Bittner S, et al. Association of intrathecal pleocytosis and IgG synthesis with axonal damage in early MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(3).

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Familie und meinen Freund*innen die mich stets unterstützten in allen Phasen dieser Arbeit.

Darüber hinaus danke ich meinem Betreuer der Doktorarbeit.

Er motivierte mich stets und konnte mir Freude am wissenschaftlichen Arbeiten vermitteln.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johannes Jakob Halcour

Geburtsdatum: 25.07.1995

Geburtsort: Wuppertal

Schulbildung

2002 - 2006 Grundschule Sillerstraße in Wuppertal

2006 - 2014 Erzbischöfliches St-Anna Gymnasium in Wuppertal

28.06.2014 allgemeine Hochschulreife

Praktika

01.09.2014 - 31.10.2014 Pflegepraktikum im St. Joseph Krankenhaus, Wuppertal,
auf der Station der rheumatologischen Orthopädie

01.03.2015 - 31.05.2015 Praktikum in der allgemeinmedizinischen Praxis
Dr. Halcour, Frau Maiwald, Wuppertal

01.07.2015 - 31.07.2015 Pflegepraktikum im Petrus Krankenhaus, Wuppertal,
auf der Intensivstation

01.09.2018 - 30.09.2018 Famulatur in der Sportmedizinischen Ambulanz der
Bergischen Universität Wuppertal

18.06.2018 - 18.08.2018 Famulatur im Ev. Krankenhaus Mettmann im Bereich der
Anästhesie, Intensivmedizin und Notfallmedizin

Ausbildung

08.01.2016 Ausbildung zum Rettungssanitäter abgeschlossen

Hochschulausbildung

Vier Semester der Humanmedizin an der Stradiņš-Universität Riga:

02.02.2018 Anerkennung der ärztlichen Vorprüfung

Acht Semester der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz:

07.10.2021 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Mainz

22.11.2022 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im GPR Rüsselsheim

Wissenschaftlicher Werdegang

Die Daten dieser Dissertation wurden bei Fluids and Barriers of the CNS unter dem Titel „Elevated neurofilament light chain CSF/serum ratio indicates impaired CSF outflow in idiopathic intracranial hypertension“ zur Publikation angenommen