

Aus dem NeuroCure Clinical Research Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Innovative Bildgebungsverfahren zur Charakterisierung der Neurodegeneration im Verlauf
der Sehbahn bei Multipler Sklerose – Arbeiten zur Optischen Kohärenztomographie,
Magnetresonanztomographie und Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Caspar Friedrich Pfüller
aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung	4
Abstrakt / Abstract	4
Einführung	6
Fragestellungen	9
Methodik	9
Ergebnisse	14
Diskussion	16
Literaturverzeichnis	19
Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung	23
Ausgewählte Publikationen	25
1. Pfüller, Brandt et al. 2011	25
2. Dörr et al. 2011	32
3. Sinnecker et al. 2015	38
4. Sinnecker et al. 2012	48
Lebenslauf	55
Vollständige Publikationsliste	57
Danksagung	60

Abkürzungsverzeichnis

BPF	brain parenchymal fraction - Hirnparenchym-Anteil am Gesamtvolumen
CIS	clinically isolated syndrom - klinisch-isoliertes Syndrom
EDSS	Expanded Disability Status Scale
FACT	Functional Acuity Contrast Testing
FLASH	Fast Low Angle Shot
GEE	Generalized Estimating Equation Models - verallgemeinerte Schätzgleichungen
GMV	grey matter volume - Volumen der Grauen Substanz
MPRAGE	magnetization-prepared rapid acquisition and multiple gradient echo technique
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MS	Multiple Sklerose
MTR	Magnetization transfer ratio
NAA	N-Acetylaspartat
NAWM	normal-appearing white matter - normal erscheinende weiße Substanz
OCT	Optical coherence tomography - Optische Kohärenztomographie
PPMS	primary progressive multiple sclerosis - primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose
RNFL	retinal nerve fiber layer - retinale Nervenfaserschicht
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis - schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
SD-OCT	spectral domain OCT
SPMS	secondary progressive multiple sclerosis - sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose
TD-OCT	time domain OCT
TMV	Totales Makulavolumen
UHF-MRT	Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie
VEP	visuell evozierte Potentiale
WMV	white matter volume - Volumen der Weißen Substanz

Zusammenfassung

Abstrakt (Deutsch)

Hintergrund: Die Multiple Sklerose ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen, die zu Behinderung bereits im jungen Erwachsenenalter führen kann. Hierzu tragen im Krankheitsprozess sowohl neuroinflammatorische wie auch neurodegenerative Komponenten bei. Moderne bildgebende Verfahren wie die Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie (UHF-MRT), die Optische Kohärenztomographie (OCT) und die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) können benutzt werden, um diese neurodegenerativen Prozesse näher zu charakterisieren und im zeitlichen Verlauf zu beobachten.

Zielsetzung: Ziel ist es, die genannten Verfahren zur Charakterisierung von Kohorten von MS-Patienten einzusetzen und die Verfahren zueinander, sowie mit klinischen Parametern in Beziehung zu setzen oder diagnostisch zu nutzen.

Methodik: Patienten mit Multipler Sklerose oder Neuromyelitis optica wurden klinisch-neurologisch, mit Optischer Kohärenztomographie, Sehprüfungen, Untersuchungen der visuell evozierten Potentiale (VEP), (Ultrahochfeld-) Magnetresonanztomographie und Magnetresonanzspektroskopie untersucht.

Ergebnisse: Die in der Studie eingesetzten bildgebenden Verfahren konnten dazu beitragen, Neuroinflammation und Neurodegeneration bei an Multiple Sklerose erkrankten Patienten näher zu charakterisieren. So steht eine mittels OCT messbare Verdünnung retinaler Nervenfaserschichten (RNFL) in Zusammenhang mit dem per MRT gemessenen Hirnparenchymvolumen und Neurodegeneration anzeigenden Parametern, die mithilfe der Magnetresonanzspektroskopie untersucht wurden. Mithilfe der UHF-MRT konnte ein Zusammenhang zwischen dem Volumen und der entzündlichen Läsionslast der Sehstrahlung, der RNFL-Dicke, VEP-Latenzen und Einschränkungen des Sehvermögens dargestellt werden. Außerdem ließen sich mit der UHF-MRT auch neurodegenerative Aspekte im Sinne von bleibenden Parenchymdefekten innerhalb entzündlicher Läsionen und einer Verschmächtigung der Sehstrahlung nachweisen und die Detektion insbesondere kortikaler MS-Läsionen wurde im Vergleich zur konventionellen MRT verbessert.

Zusammenfassung: OCT, MRS und UHF-MRT sind Verfahren, die eine genauere Beschreibung von Neuroinflammation und Neurodegeneration bei MS-Patienten ermöglichen, wie hier vor allem für die Sehbahn gezeigt wurde. Sie sind nichtinvasiv und lassen sich zur näheren Charakterisierung des aktuellen Zustandes und zur Beobachtung des Krankheitsverlaufs von MS-Patienten benutzen.

Abstract (English)

Background: Multiple sclerosis (MS) is the most common disabling neurologic disease, that causes impairment in younger people. Both neuroinflammatory and neurodegenerative processes contribute to the pathogenesis of multiple sclerosis. Innovative imaging methods, such as ultra-high field magnetic resonance tomography (UHF-MRI), optic coherence tomography (OCT) and magnetic resonance spectroscopy (MRS) can be used for characterizing these neurodegenerative processes in detail and over time course.

Objective: To use the imaging methods mentioned above to further characterize cohorts of MS patients and to correlate the parameters with themselves as well as with clinical parameters and to evaluate their prognostic and diagnostic relevance.

Methods: Patients with multiple sclerosis were examined clinically, by OCT, visual acuity testing, examination of visually evoked potentials, ultra high field magnetic resonance tomography and magnetic resonance spectroscopy.

Results: The imaging methods used in these studies contributed to further characterize neuroinflammation und neurodegeneration in multiple sclerosis patients. A thinning of the retinal nerve fiber layer (RNFL) is correlated with brain parenchyma volume measured by MRI, and markers indicating ongoing neurodegenerative processes as detected by MRS. Using UHF-MRI, a correlation between optic radiation properties (such as inflammatory lesion load and its volume) and RNFL thickness, VEP latencies and visual impairment could be demonstrated. Furthermore, UHF-MRI demonstrated neurodegenerative aspects such as parenchymal defects within inflammatory lesions, an optic radiation thinning and allowed a more precise detection of MS lesions than conventional MRI, in particular cortical grey matter lesions.

Summary: OCT, MRS and UHF-MRI are feasible methods to provide a more detailed description of neuroinflammation and neurodegeneration in MS patients, as demonstrated in these studies particularly for the visual pathway. They are non-invasive and can be utilized for clinical to study the disease course and also in differential diagnostic procedures.

Einführung

Die Multiple Sklerose ist eine häufige neurologische Erkrankung, die typischerweise bereits im jungen Erwachsenenalter auftritt und oft zu bleibenden Behinderungen führt, die die Lebensqualität, die Mobilität oder die Teilnahme am Berufsleben einschränken.

Klinisch charakteristisch sind rasch neu auftretende neurologische Defizite, wie z. B. Paresen, Sensibilitätsstörungen, Sehstörungen, Augenbewegungs- und Koordinationsstörungen und andere, die sich vor allem in der Anfangsphase der Erkrankung schubartig manifestieren.(1) Da es oft wieder zu einer guten klinischen Rückbildung der Beschwerden kommt, wird diese Verlaufsform als schubförmig-remittierend (relapsing-remitting multiple sclerosis– RRMS) bezeichnet. Im späteren Krankheitsstadium lässt sich bei vielen Patienten ein progredienter schleichender klinischer Verlauf beobachten, bei dem keine oder zusätzliche aufgesetzte Schübe auftreten – diese Verlaufsform bezeichnet man als sekundär chronisch-progredient (secondary progressive multiple sclerosis - SPMS). Seltener (ca. 10 %) besteht von Beginn an ein chronisch-progredienter Verlauf ohne Auftreten von abgrenzbaren klinischen Schüben, den man als primär chronisch-progredient bezeichnet (primary progressive MS - PPMS), oder es treten andere als die genannten Verlaufsformen auf.(2) Als histologisches Korrelat für die neurologischen Defizite lassen sich entzündliche Demyelinisierungsherde, vor allem in der weißen Substanz, vor allem in Ventrikelnähe und balkenassoziiert, nachweisen. Pathophysiologisch wird dies als gegen die Myelinscheiden gerichtete Entzündungsreaktion erklärt, die vor allem durch autoimmune T-Zellen vermittelt wird. In der Folge kommt es durch Aktivierung auch anderer Zellpopulationen und humoraler Mechanismen im Rahmen der Entzündung zu einer fokalen Demyelinisierung im Zentralnervensystem, die als wichtigste Ursache für die Schübe bei der MS gilt.(3)

Der methodologische Goldstandard zum Nachweis dieser Veränderungen ist der Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT), die auch einen wichtigen Bestandteil der aktuellen diagnostischen Kriterien der Multiplen Sklerose darstellt, indem Anzahl und Verteilung entzündlicher Läsionen, sowie deren Auftreten im zeitlichen Verlauf bewertet wird.(4, 5) Zusätzlich kann die MRT aber auch sehr gut zur prognostischen Einschätzung in frühen Phasen der Erkrankung oder der Prodromalphase, in der man von einem sogenannten Klinisch-isolierten Syndrom (clinically isolated syndrome - CIS) spricht, und zur definitiven Diagnosestellung im Verlauf benutzt werden.(6, 7)

Zur klinischen Verlaufskontrolle und auch als Endpunkt im Rahmen von klinischen Studien wird die MRT standardmäßig eingesetzt. Gut etabliert ist die Untersuchung der aktuellen inflammatorischen Aktivität über den Nachweis sogenannter Kontrastmittel aufnehmender Läsionen, bei denen eine Darstellung entzündlicher Veränderungen über die lokale

Beeinträchtigung der Blut-Hirnschranke gelingt. Bleibende narbige Veränderungen der Markscheide können hingegen gut in T2-gewichteten Sequenzen abgebildet werden. Üblicherweise kommt es im Krankheitsverlauf zu einem kumulativen Anhäufen dieser Läsionen, die in ihrer Gesamtheit als „Läsionslast“ bezeichnet werden („T2 lesion load“), die nach Anzahl der Einzelläsionen oder dem errechneten Gesamtvolumen als Verlaufsparemeter dienen kann. Jedoch ist die Häufigkeit des Auftretens kontrastmittel-aufnehmender Läsionen und eine Zunahme der Läsionslast nicht direkt mit dem klinischen Verlauf assoziiert.(8, 9)

In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist der Begriff des klinisch-radiologischen Paradoxons, das eine mögliche Diskrepanz zwischen dem radiologischen Nachweis entzündlicher Veränderungen bei einer fehlenden klinischen Veränderung beschreibt. Auch die Umkehrung scheint relevant, bei der ein Patient eine klinische Verschlechterung erfährt, ohne dass sich ein zugrundeliegendes bildmorphologisches Korrelat finden lässt.(10)

Ein möglicher Ansatz zur Bearbeitung dieser Diskrepanz zwischen Klinik und Diagnostik liegt in der zusätzlichen Untersuchung auch der neurodegenerativen Komponente der MS, die zusätzlich zur Pathogenese der MS beiträgt. Neurodegenerative Prozesse sind auf histologischer Ebene prinzipiell bereits vor fast 150 Jahren beschrieben worden, rückten aber erst in den letzten zwei Jahrzehnten erneut, vor allem durch neue technische Möglichkeiten in der Bildgebung, wieder verstärkt in den Blickpunkt des Interesses.(11)

Es gibt Belege dafür, dass neurodegenerative Prozesse bereits früh im Krankheitsverlauf der MS auftreten. Sowohl eine lokale Degeneration in oder um die entzündlichen Läsionen selbst ist beschrieben worden, wie auch eine mögliche trakt-spezifische Degeneration und eine diffuse Neurodegeneration. In letzterem Kontext spricht man auch von der sogenannten „normal erscheinenden weißen Substanz“ („normal-appearing white matter“ - NAWM) – obwohl bereits eine Schädigung des Gewebes vorliegt, sich aber makroskopisch keine Läsionen abgrenzen lassen.(12-15)

Sowohl eine sekundäre Neurodegeneration als Folge demyelinisierender Prozesse wie auch eine primäre neuro-axonale Schädigung werden hierbei diskutiert. Der zeitliche Verlauf und die dabei auftretenden Wechselwirkungen sind jedoch bislang noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Zunehmend wird der neurodegenerativen Komponente ein größerer verursachender Anteil an kognitiven Störungen und progredienten und bleibenden klinischen Beeinträchtigungen als bisher zugesprochen. Das erklärt auch das Interesse, eine MS-spezifische Therapie nicht nur immunmodulatorisch oder immunsuppressiv zu gestalten, wie bislang allgemein etabliert, sondern zusätzlich die Patienten auch neuroprotektiv zu behandeln. Bislang ist die Datenlage für effektive neuroprotektive Therapien jedoch unzureichend.(16)

Dennoch werden in klinischen Studien zunehmend beschreibende Parameter zum Monitoring von Neurodegeneration zusätzlich zu den bewährten Markern der Neuroinflammation erhoben. Diese Parameter unterscheiden sich in bezug auf ihre Eigenschaften, die von Barkhof und Kollegen in einer Übersichtsarbeit gegenübergestellt worden sind.(17)

Kurz zusammengefasst müssen sich die auszuwählenden Messgrößen und Verfahren daran messen lassen, ob, und wie spezifisch sie die MS-Pathophysiologie abbilden können, ob sie reproduzierbare Ergebnisse liefern, Änderungen im Krankheitsverlauf erfassen können, mit klinischen Parametern, wie den neurologischen Defiziten korreliert sind, und ob sie auch Therapieeffekte abbilden können. Die getroffene Auswahl wird letztlich immer einen Kompromiss zwischen diesen Charakteristika, der Integrierbarkeit in die klinische Praxis und der generellen Verfügbarkeit und Aufwand der Messmethoden darstellen. Auch hier fällt der MRT eine große Rolle zu. Hervorzuheben ist hier die Möglichkeit, in einem Untersuchungsgang durch die Auswahl geeigneter Sequenzen die Untersuchung der Neurodegeneration direkt mit der Untersuchung der inflammatorischen Komponente (kontrastmittelaufnehmende Läsionen, Anzahl und Volumen der T2-Läsionen) zu kombinieren.

Als empfohlene Parameter sind hier die Parameter zur Beschreibung des Hirnvolumens (z. B. Hirnparenchym-Anteil am Gesamtvolumen – brain parenchymal fraction – BPF, das Volumen der Grauen Substanz - GMV und der Weißen Substanz – WMV und abgeleitete normalisierte Größen – NBV, NGMV, NWMV)(18, 19), die Detektion von T1-Hypodensitäten als Ausdruck von irreversiblen Gewebsuntergang(20, 21) und die Messung der *Magnetization transfer ratio* (MTR), die als Marker der strukturellen Integrität von Gewebe benutzt werden kann(22), zu nennen.

Zusätzlich nimmt die optische Kohärenztomographie einen zunehmenden Stellenwert in der Untersuchung neurodegenerativer Prozesse ein, indem nichtinvasiv retinale Strukturen dargestellt werden können, deren Veränderungen im Zusammenhang mit neurodegenerativen Veränderungen der Sehbahn und des Gesamtgehirns in der MS(23)(Review in (24) und (25)) stehen. Hierfür wurden inzwischen auch Vorgaben zur Qualitätssicherung für den Einsatz in klinischen Studien formuliert.(26)

Auch die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) kann als Methode, axonalen und neuronalen Schaden zu messen, verwendet werden. Hierbei wird vor allem die N-Acetylaspartat (NAA)-Konzentration gemessen, die als Marker der neuro-axonalen Integrität gilt. Auch in normal erscheinender weißer Substanz ohne Läsionsbefall ließen sich metabolische Veränderungen nachweisen.(27-29)

In jüngster Zeit sind auch Untersuchungen mittels Ultrahochfeld-MRT mit Feldstärken von 7 Tesla und mehr verfügbar. Hiermit sind aufgrund eines hohen Störabstandes noch feiner aufgelöste Untersuchungen anatomischer Strukturen, wie auch der Läsionen bei MS-Patienten, als mit der bisherigen konventionellen MRT möglich.(30-33)

Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit ist eine bessere Charakterisierung der Zusammenhänge zwischen einer bei MS-Patienten beobachteten retinalen Schädigung und anatomischen, neurochemischen und neurodegenerativen Veränderungen vor allem im Bereich der Sehbahn, aber mit diffusen degenerativen Prozessen des gesamten Gehirns. Dabei sollte auch die relativ neue Technik der Ultrahochfeld-MRT und die verbesserte Möglichkeit, kortikale Läsionen als Ausdruck einer direkten fokalen Neurodegeneration evaluiert werden.

Im Einzelnen untersuchen die durchgeführten Studien folgende Fragestellungen:

1. Lässt sich bei MS-Patienten ein Zusammenhang zwischen retinalen Veränderungen und den neurochemischen Veränderungen im Bereich der Sehbahn einerseits und einer globalen Atrophie andererseits zeigen?
2. Lassen sich per UHF-MRT nachgewiesene Veränderungen im Bereich der Sehstrahlung mit Veränderungen der Retina und der Sehfunktion in Beziehung bringen?
3. Wie erhöht sich die Detektionsgenauigkeit von vor allem auch kortikalen MS-Läsionen durch den Einsatz von UHF-MRT im Vergleich zum konventionellen MRT? Lassen sich auch neurodegenerative Aspekte in demyelinisierenden Läsionen nachweisen?

Methodik

Patienten und Kontrollen

Alle Patienten, nahmen an von der Ethikkommission genehmigten klinischen Studien teil und wurden vom NeuroCure Clinical Research Center der Charité Universitätsmedizin (Berlin) rekrutiert.

Bei den MS-Patienten wurde die Diagnose je nach Rekrutierungszeitpunkt anhand der jeweils gültigen Revision der revidierten McDonald-Kriterien von 2005 bzw. 2010 zur Diagnosestellung der MS erneut überprüft, bzw. die Patienten mit klinisch-isoliertem Syndrom identifiziert.(4, 5)
Eine Unterteilung erfolgte nach dem klinischen Verlauf in RRMS, SPMS und PPMS

anhand der Lublin-Kriterien.(2)

Das Alter der Studienteilnehmer lag zwischen 19 und 60 Jahren.

Ausschlusskriterien der Studienteilnahme waren andere neurologische, ophthalmologische oder systemische Erkrankungen, die einen möglichen Einfluss auf die Beschaffenheit der Retina und damit Visus und OCT-Messungen haben könnten (z.B. Glaukom, Diabetes mellitus, Makuladegeneration des Alters, epiretinale Membranen). Refraktionsfehler von 5 Dioptrien oder mehr führten zum Ausschluss des betreffenden Auges aus der statistischen Auswertung. Weitere Ausschlusskriterien waren je nach Studie das Vorliegen eines akuten Schubes oder eine systemische Kortikosteroidgabe innerhalb von 30 Tagen vor der Untersuchung, je nach Studie auch eine akute Sehnervenentzündung innerhalb der letzten sechs Monate.

Einschlusskriterien waren eine stabile immunmodulatorische Behandlung oder keine kausale Therapie seit mindestens sechs Monaten, Expanded Disability Status Scale (EDSS) (34) zwischen 0 und 6,5. Gesunde Kontrollprobanden rekrutierten sich aus Verwandten von Patienten, klinischen Mitarbeitern oder sonstigen Freiwilligen.

Ethik

Die Studienprotokolle wurden von den lokalen Ethikkommissionen genehmigt und in Anlehnung an die aktuelle Version der Deklaration von Helsinki (1964), gemäß den Richtlinien zur guten klinischen Praxis (ICH-GCP) und dem anzuwendendem deutschen Recht durchgeführt. Alle Studienteilnehmer gaben zu Beginn der Studie nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung.

Klinische Untersuchung und visuelle Funktionstestung

Bei allen Studienteilnehmern wurde eine detaillierte medizinische Anamnese, insbesondere auch in Bezug auf stattgehabte Augenerkrankungen und Sehnerventzündungen, erhoben und eine standardisierte klinisch-neurologische Untersuchung durch erfahrene Untersucher zur Beurteilung des neurologischen Defizite auf der Grundlage des EDSS(34) und der davon abgeleiteten Beurteilung nach dem Neurostatus Manual durchgeführt.(35)

Zusätzlich wurde je nach Studie eine Refraktionsmessung und Bestimmung der Sehschärfe mithilfe von Snellen-Tafeln und eine Messung der Kontrastsensitivität mittels Functional Acuity Contrast Testing (FACT)(36) durchgeführt. VEP-Untersuchungen wurden unter einer Standardstimulation mit Schachbrettmuster von der Oz-Elektrode gegen die Cz-Referenzelektrode abgeleitet und der Mittelwert aus 40-80 Einzelableitungen errechnet.

Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die OCT ist ein nicht-invasives bildgebendes Verfahren, das auf der interferometrischen Auswertung von optischen Reflexions- und Streuungseigenschaften des untersuchten Objektes beruht. Es ist gut zur Untersuchung von biologischem Gewebe und so auch der Retina geeignet. Stark vereinfacht wird kurzkohärentes Licht in ein Untersuchungs- und ein Referenzsignal aufgeteilt. Das Untersuchungssignal wird in das zu untersuchende Gewebe geleitet, das Referenzsignal über eine Spiegelkonstruktion zurückgeworfen.

Am Detektor des Gerätes bildet sich aus der Überlagerung von Referenzsignal und dem vom Gewebe reflektierten und gestreuten Untersuchungssignal ein Interferenzmuster, das durch eine periodische Bewegung des Spiegelsystem (sogenannte time domain-OCT oder TD-OCT) oder eine spektrale Analyse (sogenannte spectral domain OCT oder SD-OCT) tiefenaufgelöst werden kann. Hierdurch werden die einzelnen Schichten der Retina abgrenz- und damit vermessbar.(37)

Die OCT-Untersuchung der Patienten erfolgte mit einem Time Domain OCT (TD-OCT), dem Stratus 3000 OCT (Carl Zeiss Meditec, Dublin, Kalifornien, USA). Die peripapilläre RNFL-Dicke wurde mit dem "Fast RNFL 3.4" Protokoll (Software Version 4.0) bestimmt, das die Dicke der RNFL mit einem 3,4 mm durchmessenden Ringscan um den Sehnervenkopf misst. Außerdem wurde das Makulagesamtvolumen (*Total Macular Volume – TMV*) mit dem "Fast Macular Thickness Map" Protokoll ermittelt, das das Volumen zwischen der Inneren Begrenzungsmembran („Inner Limiting Membrane“, ILM) und dem retinalen Pigmentepithel („Retinal Pigment Epithelium“, RPE) in einem festgelegten Kreisareal interpoliert. Nur qualitativ genügende Scans mit gut abgrenzbarer Schichtzuordnung wurden in die Auswertung einbezogen.(38)

In Sinnecker et al. 2015 wurden die Untersuchungen mit dem schnelleren und besser auflösenden Spectral Domain-OCT-Gerät Heidelberg Spectralis durchgeführt. Auch hier wurde ein Ringscan von ca. 3,4 mm Durchmesser durchgeführt und damit insgesamt 1536 A-Scans aufgenommen. Die Scans wurden auf korrekte Positionierung und Bildqualität nach den OSCAR-IB Richtlinien überprüft.(26)

Magnetische Resonanztomographie (MRT)

Die MRT-Messungen wurden mit einem 1,5 Tesla Scanner Avanto (Siemens Medical Systems, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die dreidimensionalen T1-gewichteten Aufnahmen („magnetization-prepared rapid acquisition and multiple gradient echo technique“, MPRAGE) wurden mit folgenden Parametern aufgenommen: Echozeit (TE) 3,09 ms, Repetitionszeit (TR) 1900 ms, Auflösung 1 mm³). Ausgehend von diesen Aufnahmen wurden die Parameter zur

Beschreibung des Hirnvolumens berechnet: der Anteil des Hirnparenchyms am Gesamtvolumen – *brain parenchymal fraction* - BPF, das Volumen der Grauen Substanz (GMV) und der Weißen Substanz (WMV) mit FSL SIENAX Version 4.1.4 berechnet. Hierbei wird zuerst das eigentliche Hirn vom umgebenden Schädel abgegrenzt. Im nächsten Schritt das so „extrahierte“ Hirn auf einen Standardraum registriert und normalisiert. Hiernach erfolgte eine Segmentation für die unterschiedlichen Gewebearten (Liquor, Graue und Weiße Substanz) und hieraus die entsprechenden Teilvolumina berechnet.(39)

Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie (UHF-MRT)

Die Ultrahochfeld-MRT-Untersuchungen wurden an einem 7 T Siemens Magnetom Tomographen an der Berlin Ultrahigh Field Facility (BUFF) durchgeführt. Verwendet wurde eine 24-Kanal-Kopfspule (Nova Medical). Das Messprotokoll umfasste eine zweidimensionale T2*-gewichtete Fast Low Angle Shot (FLASH) Sequenz mit einer räumlichen Auflösung von (0,5 x 0,5 x 2) mm (Echozeit (TE) 25,0 ms, Repetitionszeit (TR) 1820 ms). Außerdem wurde zur infra- und supratentoriellen kraniellen Darstellung eine Turbo Inversion Recovery Magnitude (TIRM) Sequenz (TE 9 ms, TR 16000 ms, Inversionszeit (TI) 2925,5 ms, räumliche Auflösung (1,0 x 1,0 x 3,0) mm) verwendet. Für die dreidimensionale T1-gewichtete Bildgebung wurde eine Magnetization Prepared Rapid Acquisition and Multiple Gradient Echoes (MPRAGE) Sequenz mit einer hohen räumlichen Auflösung von (1,0 x 1,0 x 1,0) mm benutzt (TE 2,98 ms, TR 2300 ms, TI 900 ms). Zusätzlich erfolgte bei 18 Patienten mit MS eine Bildgebung unter Verwendung eines 1,5 T MR-Tomographen (s. o.). Bei 13 MS-Patienten wurde eine ergänzende 1,5 T-DIR-Bildgebung (TE 103 ms, TR 7100 ms, Flipwinkel 180°, Auflösung 256 x 160, Field-of-View 310 mm x 193 mm) durchgeführt. Zur weiteren Bildanalyse und Nachbearbeitung wurde OsiriX verwendet (OsiriX Foundation, Version 3.8.1).

Vergleichende Analyse von Läsionen der grauen und weißen Substanz

Im Rahmen der Studie Sinnecker et al. 2012 wurden unabhängig voneinander zwei zeitlich versetzte Auswertungen der Aufnahmen durchgeführt. Dabei erfolgte initial die für sonstige Patientendaten verblindete Auswertung aller 1,5 T und 7 T MRT-Sequenzen einzeln, die Sequenzen wurden hierbei randomisiert ausgewertet (T. Sinnecker). Hiernach wurden die in der 7 T FLASH-Sequenz gefundenen Läsionen in den übrigen Sequenzen aufgesucht. Somit wurden in der zweiten Analyse die T1-Sequenzen in Kenntnis der in der T2-FLASH-Sequenz gefundenen Läsionen ausgewertet. (T. Sinnecker)

Magnetische Resonanzspektroskopie (MRS)

Die MRS wurde an einem experimentellen 3 Tesla Scanner (MEDSPEC 30/100, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany) in der Physikalisch Technischen Bundesanstalt (PTB) in Berlin durchgeführt.

In der periventrikulären „normal erscheinenden“ weißen Substanz („normal appearing periventricular white matter“, NAWM), d. h. in Gewebe ohne erkennbare größere Läsionen, wurden zwei Voxel der Größe 2 x 2 x 2 cm und im visuellen Cortex ein gemischter Graue-/Weiße-Substanz Voxel der Größe 3 x 2 x 2 cm untersucht.

In diesen wurden NAA und Creatinin(Cr)-Spektren zur Bestimmung von NAA und normalem NAA/Cr gemessen.(40)

Statistische Analyse

Es erfolgte eine Überprüfung der Messwerte auf eine Normalverteilung unter Zuhilfenahme von Histogrammen, Analyse der Schiefe und Steilheit der Verteilung und mit Shapiro-Wilk-Tests. Statistische Analysen wurden unter Einsatz verallgemeinerter Schätzungsgleichungen (sog. „Generalized Estimating Equation Models“, GEE) berechnet, die die intraindividuellen Abhängigkeiten zwischen den zwei Augen der Teilnehmer berücksichtigen. Da GEE keine (oder eine nur sehr eingeschränkte) Abschätzung der Effektstärke erlauben, wurden sie durch weitere statistische Verfahren ergänzt. Die Eingangsvariablen wurden zum einen vor der Durchführung der GEE normalisiert und hiermit ein angenähertes standardisiertes Beta bestimmt. Zum anderen wurden lineare Regressionen mit spezifischer Auswahl von Einzelmessungen durchgeführt. Die Kombination dieser Verfahren erlaubt eine Abschätzung der Effektstärke in Form von R² und damit einen Vergleich der Ergebnisse untereinander und mit den Ergebnissen anderer Messreihen. Zur Untersuchung des Effekts bestimmter Einflussgrößen außerhalb der OCT-Messungen wurden verschiedene parametrische und nichtparametrische Verfahren durchgeführt (Varianzanalyse, partielle Korrelation, Spearman- und Pearson-Korrelation, Pearson's Chi² Test, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney U Test). Zur Analyse wurde die Software SPSS Version 18 bis 20 (Chicago, IL, USA) benutzt. Eine erreichte Signifikanz wurde bei allen Tests für $p < 0,05$ festgelegt. Außer für die primären Endpunkte waren die Analysen explorativ. Das bedeutet, dass keine vorangegangene Fallzahlplanung oder eine Korrektur für multiples Testen durchgeführt wurde.

Ergebnisse

[1] Pfüller, Brandt et al. 2011(41) - Zusammenhang zwischen metabolischen Veränderungen im visuellen Cortex und Retinaveränderungen bei MS

In einer Gruppe von 86 RRMS-Patienten wurden Messungen der BPF, der RNFL sowie zusätzlich eine MRS-Untersuchung durchgeführt. In der statistischen Auswertung mittels einer GEE-Analyse korrelierte die Konzentration von N-Acetylaspartat im dem visuellen Cortex entsprechenden Voxel mit der Dicke der RNFL (stand. Beta = 0,191, p = 0,047). Der vermutete Zusammenhang zwischen BPF und RNFL konnte bestätigt werden (stand. Beta = 0,269, p = 0,001). In einem weiteren Schritt wurde überprüft, ob die Abnahme des NAA im visuellen Kortex lediglich ein vom globalen Hirnvolumen abhängiger Effekt ist und hierfür der Zusammenhang zwischen BPF mit NAA im visuellen Cortex Voxel überprüft. Hier fand sich keine Korrelation. In einer zusätzlich durchgeführten multivariaten GEE-Analyse zeigte sich eine voneinander unabhängige Assoziation von NAA im visuellen Cortex einerseits und der BPF andererseits (Stand. Beta = 0,188, p = 0,042 bzw. Stand. Beta = 0,244, p = 0,002) mit der RNFL-Dicke. Zwischen der RNFL-Dicke und der NAA-Konzentration in den NAWM Voxeln fand sich keine Korrelation. Außerdem zeigte sich hier ein Zusammenhang zwischen Reduktion von NAA im visuellen-Kortex-Voxel und einer stattgehabten Sehnerventzündung (ANOVA, p=0,046), der sich für die NAWM nicht nachweisen ließ.

[2] Dörr et al. 2011(42) - Zusammenhang zwischen Hirnatrophie und retinalen Veränderungen bei MS

In dieser Studie wurden insgesamt 104 RRMS-Patienten mit MRT und OCT untersucht. Hiervon hatten 29 Patienten eine einseitige und 13 Patienten eine beidseitige Sehnerventzündung. Es fand sich, wie auch in Pfüller, Brandt et al. gezeigt, eine Assoziation der BPF mit der RNFL-Dicke (GEE p < 0,0001). Auch der zusätzliche Parameter des totalen Makulavolumens (TMV) zeigte eine Korrelation mit der BPF (GEE p < 0,0001).

Da sich bei der Exploration der Daten ein Zusammenhang der BPF mit dem Alter zeigte (stand. Beta = - 0,334, p < 0,001), wurden die og. Analysen auch in Bezug auf das Alter kontrolliert durchgeführt, wo sich die gefundenen Zusammenhänge unabhängig vom Alter bestätigen ließen. Es fand sich außerdem ein Zusammenhang der RNFL mit der Krankheitsdauer (stand. Beta = -0,299, p < 0,001) und stattgehabten Entzündungen des Sehnervs (stand. Beta = -0,675, p <

0,001). TMV war ebenfalls mit stattgehabten Sehnervenzündungen assoziiert (stand. Beta -0,614, $p < 0,001$).

[3] Sinnecker et al. 2015(43) - Veränderungen der Sehstrahlung und der Zusammenhang mit Visus und Retinaveränderungen bei MS

In dieser Studie wurden insgesamt 30 MS-Patienten - 26 mit RR-MS und 4 mit klinisch-isoliertem Syndrom - und 12 gesunde Kontrollen untersucht. Es wurden UHF-MRT-Messungen, OCT- und VEP-Untersuchungen sowie Sehtests durchgeführt. Im Anschluss wurde die Sehstrahlung (optic radiation, OR) in den UHF-MRT-Aufnahmen gesondert analysiert. Es zeigte sich bei den MS-Patienten eine signifikant dünnere Sehstrahlung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

Weiterhin wurde die Sehstrahlung auf Läsionen hin untersucht. Hier konnte bereits in der frühen Phase des Krankheitsverlaufes (CIS und frühe MS) eine Mitbeteiligung der Sehstrahlung in der Mehrzahl der Patienten nachgewiesen werden. Bei den MS-Patienten fand sich eine Korrelation der Läsionslast der Sehstrahlung, repräsentiert durch das Läsionsvolumen, mit einer Verschmächtigung der Sehstrahlung und einer geringeren RNFL-Dicke. Dieser Zusammenhang konnte auch für Patienten ohne klinische Hinweise für eine stattgehabte Sehnervenzündung gezeigt werden und auch nach der Korrektur auf die gesamte T2-Läsionslast und allgemeine Atrophieparameter gezeigt werden. Es wurde zudem eine Korrelation der Läsionslast in der OR mit verlängerten VEP-Latenzen und Sehbeeinträchtigungen demonstriert.

[4] Sinnecker et al. 2012(44) - Vergleich der Läsionsdarstellung zwischen UHF-MRT und konventionellem MRT

In dieser Studie wurden 20 Patienten mit RR-MS und 14 gesunde Kontrollen mit Hilfe der UHF-MRT (7 Tesla) untersucht. Eine Untergruppe von 18 Patienten wurde zusätzlich mit konventioneller MRT (1,5 Tesla) untersucht.

In der 7T-Untersuchung ließen sich in T2*-gewichteten FLASH Sequenzen 604 zerebrale Läsionen nachweisen. In einer vergleichenden Analyse ließ sich jede dieser T2- Läsionen auch in den entsprechenden T1-gewichteten MPRAGE-Aufnahmen als Hypointensität wiederfinden. Im Vergleich hierzu ließen sich nur ungefähr 80% der T2-Läsionen (452 von 561) bei konventioneller Feldstärke detektieren.

Außerdem zeigte sich die 7T-MPRAGE-Sequenz der 7T-FLASH-Sequenz in der Sensitivität bei der Detektion von Läsionen überlegen und erfasste fast doppelt so viele Läsionen wie die vergleichbare Sequenz bei einer Feldstärke von 1,5 Tesla.

Bei 10 Patienten konnten direkt kortikale Läsionen nachgewiesen werden, hiervon waren 6 rein kortikale Läsionen und 37 gemischte leukokortikale Läsionen, die sich bei 7 T auch in den T1-gewichteten MPRAGE-Aufnahmen nachweisen ließen. In der konventionellen MRT ließ sich bei 1,5 T hier wiederum nur ungefähr die Hälfte der Läsionen darstellen.

Die Studie beinhaltete darüber hinaus auch Verlaufsuntersuchungen bei einer Subgruppe von 8 Patienten. Sämtliche in der Voruntersuchung gefundenen T1-Hypointensitäten ließen sich nach im Schnitt nach über einem Jahr durchgeführten Folgeuntersuchungen wieder auffinden und können daher als sogenannte „black holes“ angesehen werden.

Diskussion

Die ausgewählten Publikationen beschäftigen sich mit dem Zusammenhang zwischen fokalen, regionalen und globalen neurodegenerativen Prozessen in der MS. Je nach verwendetem Messverfahren lassen sich die Auswirkungen strukturell, metabolisch oder funktionell beschreiben.

Es konnte demonstriert werden, dass

- 1) dass sich ein Zusammenhang zwischen retinalen Veränderungen und globaler Hirnatrophie auch in unserer Kohorte von MS-Patienten reproduzieren lässt (Pfüller, Brandt et al. 2011 und Dörr et al. 2011)
- 2) Zusammenhänge zwischen retinalen Veränderungen und sowohl metabolischen (Pfüller, Brandt et al. 2011) wie auch strukturellen Veränderungen im Bereich der Sehbahn im Sinne von Läsionslast und Atrophie (Sinnecker et al. 2015) bestehen
- 3) die UHF-MRT einen direkten Nachweis von neurodegenerativen Veränderungen im Sinne von T1-Hypointensitäten und von kortikalen Läsionen erlaubt und dabei die Sensitivität der konventionellen MRT deutlich übertrifft (Sinnecker et al. 2012)

Die eingesetzten Methoden waren dabei nichtinvasiv und wurden von den Patienten und Probanden gut vertragen.

Dennoch sind auch gewisse methodologische Einschränkungen zu diskutieren. So bietet das Ultrahochfeld-MRT eine höhere lokale Auflösung, ist jedoch auch anfälliger für Artefakte, u. a. durch Feldinhomogenitäten, und Fehlzuordnungen nachgewiesener lokaler Veränderungen oder vaskulärer Strukturen als postentzündliche Läsionen.(31) Außerdem ist die bisherige Verbreitung von UHF-MRT-Scannern ein klarer limitierender Faktor. Nebenwirkungen sind in

unserer Kohorte nicht beobachtet worden, sind aber häufiger als in der konventionellen MRT zu erwarten.

In Pfueller, Brandt et al. und Dörr et al. wurden die OCT-Messungen mit einem TD-OCT-Gerät durchgeführt. Im Vergleich zu aktuellen SD-OCT-Geräten, wie bei Sinnecker et al. 2015 eingesetzt, gelten sie aus heutiger Sicht als technisch unterlegen, und liefern eine schlechtere lokale Auflösung und zeigen mehr Bildartefakte bei gleichzeitig längeren Messzeiten.(45) Hier wird inzwischen allgemein der Einsatz von SD-OCT-Geräten als Standard empfohlen und Qualitätsrichtlinien für die Durchführung von OCT-Messungen im Rahmen klinischer Studien erarbeitet und veröffentlicht.(26)

Die MRS ist ein prinzipiell gut geeignetes Verfahren, um neurodegenerative Prozesse abzubilden. Limitierend sind hier lange Messzeiten und die Notwendigkeit, die zu messenden Voxel vor der Messung festlegen zu müssen, was eine post-hoc Analyse unmöglich macht. Läsionen und andere strukturelle Veränderungen innerhalb eines Messvoxels sind denkbare Störeinflüsse.

Zur Adressierung einiger der genannten Limitierungen kämen volumetrische Verfahren infrage, die auch eine nachträgliche Auswertung von Neurodegeneration beschreibenden Parametern nach bereits erfolgten MRT-Messungen möglich macht. Hier ist z. B. die Bestimmung von cortical thinning zu nennen oder die Voxel based Morphometry, die allerdings in den beschriebenen Studien nicht zur Auswertung kamen.(46-48) Sämtliche Studien, bis auf Sinnecker et al 2012, sind als reine Querschnittsuntersuchungen ausgelegt. Bei longitudinalen Studien sollte der Erkenntnisgewinn durch Aussagen über den Verlauf lokaler, regionaler und globaler neurodegenerativer Prozesse deutlich höher sein und möglicherweise lassen sich hier künftig auch zusätzliche Aussagen, wie z. B. zur Wirksamkeit einer begleitenden medikamentösen Therapie treffen. Hierbei gilt es dann auch, die Herausforderungen zu beherrschen, die sich durch unterschiedliche Messzeitpunkte ergeben, wie zum Beispiel die Gewährleistung der Vergleichbarkeit von MRT-Untersuchungen durch eine geeignete Schichtauswahl, das Verwenden vergleichbarer Scanner, regelmäßiger Abgleich der klinischen Einschätzungen (Vermeidung von untersucherbedingten Störfaktoren) und die mögliche Normalisierung/Normierung von Daten. Auch die statistische Auswertung wird in longitudinalen Studien im Vergleich zu Querschnittsuntersuchungen deutlich komplexer und anspruchsvoller. Trotz größeren logistischen, apparativen und personellen Aufwandes und komplizierterer statistischer Auswertung ist diese Art von Studien in jedem Fall zu unterstützen und zu bevorzugen.

Die zusammengefassten Arbeiten liefern weitere Beiträge zum Verständnis der Neurodegeneration in der MS. Dabei wurde eine frühe Beeinträchtigung auch des visuellen Systems nachgewiesen – sowohl strukturell wie auch funktionell. Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, in welcher zeitlichen Abfolge die einzelnen Schadensprozesse in der MS ablaufen. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass multifaktorielle Schadensprozesse gleichzeitig ablaufen, die jedoch auf unterschiedliche Weise miteinander interagieren und sich gegenseitig unter bestimmten Bedingungen verstärken können. So könnte das Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes von lokalen neuroinflammatorischen Läsionen und einer primären lokalen und diffusen Neurodegeneration zu einer sekundären traktsspezifischen Degeneration vor- und nachgeschalteter neuronaler Zentren führen, hier werden sowohl retrograde wie auch anterograde Degeneration diskutiert.

Dies lässt sich im Verlauf dann auch anhand funktioneller Defizite nach Überschreiten einer klinischen Schwelle nachweisen.

Mit diesem Konzept ließen sich auch die unterschiedlichen Phänotypen der MS und oligosymptomatische Verläufe erklären.(49) Hierfür spricht, dass es Hinweise für bereits früh im Krankheitsverlauf ablaufende diffuse Neurodegeneration gibt(50, 51), jedoch auch Hinweise für eine lokale Degeneration, z. B. der Retina.(52) Hier wurde in den letzten Jahren verstärkt diskutiert, ob es eine Untergruppe von MS-Patienten gibt, die eine besonders ausgeprägte retinale Schädigung aufweisen und ob diese einen indikativen oder gar prognostischen Wert für den allgemeinen Krankheitsverlauf hat. Hier ergaben sich jedoch abhängig von der untersuchten Kohorte unterschiedliche Befunde.(53, 54)

Eine wichtige Rolle spielt sicher auch das Ausmaß und die Lokalisation degenerativer Veränderungen im Verhältnis zur inflammatorischen Aktivität, die die klinische Präsentation und den Übergang in die chronische Phase mit beeinflussen. Neu ist die Erkenntnis, dass sich mithilfe der 7T-Bildgebung neurodegenerative Veränderungen auch in entzündlichen Läsionen früh nachweisen lassen. Dies legt die Durchführung einer frühen kombinierten sowohl antiinflammatorisch, neuroprotektiv wie auch eine neurorestaurativ und remyelinisierend wirkenden Therapie nahe. Bislang konnte jedoch die Wirksamkeit einer solchen Therapie noch nicht systematisch nachgewiesen werden und wird der Gegenstand intensiver weiterer Forschung in der nächsten Zeit sein.

Literaturverzeichnis

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002 Apr 6;359:1221–31.
2. Lublin FD, Reingold SC. 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*. 1996 Apr;46(4):907–11.
3. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):913–9.
4. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H-P, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the ‘McDonald Criteria’. *Ann Neurol*. 2005 Dec;58(6):840–6.
5. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb;69(2):292–302.
6. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *Lancet Neurol*. 2012 Feb;11(2):157–69.
7. Brex PA, Miszkief KA, O’Riordan JI, Plant GT, Moseley IF, Thompson AJ, et al. Assessing the risk of early multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes: the role of a follow up MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001 Mar;70(3):390–3.
8. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkief KA, Benton CE, Lanyon R, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2008 Mar;131(Pt 3):808–17.
9. Daumer M, Neuhaus A, Morrissey S, Hintzen R, Ebers GC. MRI as an outcome in multiple sclerosis clinical trials. *Neurology*. 2009 Feb 24;72(8):705–11.
10. Barkhof F. The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol*. 2002 Jun;15(3):239–45.
11. Charcot M. Histology of sclerotic plaques. *Gaz Hôp*. 1868;(141):554–8.
12. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998 Jan 29;338(5):278–85.
13. Reich DS, Smith SA, Gordon-Lipkin EM, Ozturk A, Caffo BS, Balcer LJ, et al. Damage to the optic radiation in multiple sclerosis is associated with retinal injury and visual disability. *Arch Neurol*. 2009 Aug;66(8):998–1006.
14. De Stefano N, Matthews PM, Filippi M, Agosta F, De Luca M, Bartolozzi ML, et al. Evidence of early cortical atrophy in MS: relevance to white matter changes and disability. *Neurology*. 2003 Apr 8;60(7):1157–62.
15. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2015 Feb;14(2):183–93.

16. Comi G. Disease-modifying treatments for progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2013 Oct;19(11):1428–36.
17. Barkhof F, Calabresi PA, Miller DH, Reingold SC. Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. *Nat Rev Neurol.* 2009 May;5(5):256–66.
18. Rudick RA, Fisher E, Lee JC, Simon J, Jacobs L. Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. *Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. Neurology.* 1999 Nov 10;53(8):1698–704.
19. Rudick RA, Lee J-C, Nakamura K, Fisher E. Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci.* 2009 Jul 15;282(1-2):106–11.
20. van Walderveen MA, Barkhof F, Hommes OR, Polman CH, Tobi H, Frequin ST, et al. Correlating MRI and clinical disease activity in multiple sclerosis: relevance of hypointense lesions on short-TR/short-TE (T1-weighted) spin-echo images. *Neurology.* 1995 Sep;45(9):1684–90.
21. van den Elskamp IJ, Lembecke J, Dattola V, Beckmann K, Pohl C, Hong W, et al. Persistent T1 hypointensity as an MRI marker for treatment efficacy in multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl.* 2008 Jul;14(6):764–9.
22. Chen JT, Collins DL, Atkins HL, Freedman MS, Arnold DL, Canadian MS/BMT Study Group. Magnetization transfer ratio evolution with demyelination and remyelination in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 2008 Feb;63(2):254–62.
23. Gordon-Lipkin E, Chodkowski B, Reich DS, Smith SA, Pulicken M, Balcer LJ, et al. Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology.* 2007 Oct 16;69(16):1603–9.
24. Petzold A, de Boer JF, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, Green A, et al. Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2010 Sep;9(9):921–32.
25. Bock M, Paul F, Dörr J. [Diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: the value of optical coherence tomography]. *Nervenarzt.* 2013 Apr;84(4):483–92.
26. Tewarie P, Balk L, Costello F, Green A, Martin R, Schippling S, et al. The OSCAR-IB consensus criteria for retinal OCT quality assessment. *PloS One.* 2012;7(4):e34823.
27. De Stefano N, Filippi M. MR spectroscopy in multiple sclerosis. *J Neuroimaging Off J Am Soc Neuroimaging.* 2007 Apr;17 Suppl 1:31S – 35S.
28. Husted CA, Goodin DS, Hugg JW, Maudsley AA, Tsuruda JS, de Bie SH, et al. Biochemical alterations in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter detected by in vivo 31P and 1H spectroscopic imaging. *Ann Neurol.* 1994 Aug;36(2):157–65.
29. Fu L, Matthews PM, De Stefano N, Worsley KJ, Narayanan S, Francis GS, et al. Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain J Neurol.* 1998 Jan;121 (Pt 1):103–13.

30. Kollia K, Maderwald S, Putzki N, Schlamann M, Theysohn JM, Kraff O, et al. First clinical study on ultra-high-field MR imaging in patients with multiple sclerosis: comparison of 1.5T and 7T. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009 Apr;30(4):699–702.
31. Tallantyre EC, Morgan PS, Dixon JE, Al-Radaideh A, Brookes MJ, Morris PG, et al. 3 Tesla and 7 Tesla MRI of multiple sclerosis cortical lesions. *J Magn Reson Imaging JMRI*. 2010 Oct;32(4):971–7.
32. Sinnecker T, Kuchling J, Dusek P, Dörr J, Niendorf T, Paul F, et al. Ultrahigh field MRI in clinical neuroimmunology: a potential contribution to improved diagnostics and personalised disease management. *EPMA J*. 2015;6(1):16.
33. Kuchling J, Sinnecker T, Bozin I, Dörr J, Madai VI, Sobesky J, et al. [Ultrahigh field MRI in context of neurological diseases]. *Nervenarzt*. 2014 Apr;85(4):445–58.
34. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983 Nov;33(11):1444–52.
35. Definitions_0410-2_s.pdf [Internet]. [cited 2015 Apr 22]. Available from: http://www.neurostatus.net/media/specimen/Definitions_0410-2_s.pdf
36. Bock M, Brandt AU, Kuchenbecker J, Dörr J, Pfueller CF, Weinges-Evers N, et al. Impairment of contrast visual acuity as a functional correlate of retinal nerve fibre layer thinning and total macular volume reduction in multiple sclerosis. *Br J Ophthalmol*. 2012 Jan;96(1):62–7.
37. Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, et al. Optical coherence tomography. *Science*. 1991 Nov 22;254(5035):1178–81.
38. Cheung CYL, Leung CKS, Lin D, Pang C-P, Lam DSC. Relationship between retinal nerve fiber layer measurement and signal strength in optical coherence tomography. *Ophthalmology*. 2008 Aug;115(8):1347–51, 1351.e1–2.
39. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, Johansen-Berg H, et al. Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *NeuroImage*. 2004;23 Suppl 1:S208–19.
40. Schubert F, Gallinat J, Seifert F, Rinneberg H. Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *NeuroImage*. 2004 Apr;21(4):1762–71.
41. Pfueller CF, Brandt AU, Schubert F, Bock M, Walaszek B, Waiczies H, et al. Metabolic changes in the visual cortex are linked to retinal nerve fiber layer thinning in multiple sclerosis. *PloS One*. 2011;6(4):e18019.
42. Dörr J, Wernecke KD, Bock M, Gaede G, Wuerfel JT, Pfueller CF, et al. Association of retinal and macular damage with brain atrophy in multiple sclerosis. *PloS One*. 2011;6(4):e18132.
43. Sinnecker T, Oberwahrenbrock T, Metz I, Zimmermann H, Pfueller CF, Harms L, et al. Optic radiation damage in multiple sclerosis is associated with visual dysfunction and retinal thinning--an ultrahigh-field MR pilot study. *Eur Radiol*. 2015 Jan;25(1):122–31.

44. Sinnecker T, Mittelstaedt P, Dörr J, Pfueller CF, Harms L, Niendorf T, et al. Multiple sclerosis lesions and irreversible brain tissue damage: a comparative ultrahigh-field strength magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol*. 2012 Jun;69(6):739–45.
45. Bock M, Brandt AU, Dörr J, Pfueller CF, Ohlraun S, Zipp F, et al. Time domain and spectral domain optical coherence tomography in multiple sclerosis: a comparative cross-sectional study. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2010 Jul;16(7):893–6.
46. Calabrese M, Atzori M, Bernardi V, Morra A, Romualdi C, Rinaldi L, et al. Cortical atrophy is relevant in multiple sclerosis at clinical onset. *J Neurol*. 2007 Sep;254(9):1212–20.
47. Prinster A, Quarantelli M, Orefice G, Lanzillo R, Brunetti A, Mollica C, et al. Grey matter loss in relapsing-remitting multiple sclerosis: a voxel-based morphometry study. *NeuroImage*. 2006 Feb 1;29(3):859–67.
48. Sepulcre J, Sastre-Garriga J, Cercignani M, Ingle GT, Miller DH, Thompson AJ. Regional gray matter atrophy in early primary progressive multiple sclerosis: a voxel-based morphometry study. *Arch Neurol*. 2006 Aug;63(8):1175–80.
49. Bielekova B, Kadom N, Fisher E, Jeffries N, Ohayon J, Richert N, et al. MRI as a marker for disease heterogeneity in multiple sclerosis. *Neurology*. 2005 Oct 11;65(7):1071–6.
50. Filippi M, Bozzali M, Rovaris M, Gonen O, Kesavadas C, Ghezzi A, et al. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain J Neurol*. 2003 Feb;126(Pt 2):433–7.
51. Sbardella E, Tomassini V, Stromillo ML, Filippini N, Battaglini M, Ruggieri S, et al. Pronounced focal and diffuse brain damage predicts short-term disease evolution in patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2011 Dec;17(12):1432–40.
52. Oberwahrenbrock T, Ringelstein M, Jentschke S, Deuschle K, Klumbies K, Bellmann-Strobl J, et al. Retinal ganglion cell and inner plexiform layer thinning in clinically isolated syndrome. *Mult Scler Houndmills Basingstoke Engl*. 2013 Dec;19(14):1887–95.
53. Saidha S, Syc SB, Ibrahim MA, Eckstein C, Warner CV, Farrell SK, et al. Primary retinal pathology in multiple sclerosis as detected by optical coherence tomography. *Brain J Neurol*. 2011 Feb;134(Pt 2):518–33.
54. Brandt AU, Oberwahrenbrock T, Ringelstein M, Young KL, Tiede M, Hartung HP, et al. Primary retinal pathology in multiple sclerosis as detected by optical coherence tomography. *Brain J Neurol*. 2011 Nov;134(Pt 11):e193; author reply e194.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Caspar Pfüller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Innovative Bildgebungsverfahren zur Charakterisierung der Neurodegeneration im Verlauf der Sehbahn bei Multipler Sklerose – Arbeiten zur Optischen Kohärenztomographie, Magnetresonanztomographie und Ultrahochfeld-Magnetresonanztomographie‘ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 23.11.2015

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Caspar Pfüller hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Pfueller CF*, Brandt AU*, Schubert F, Bock M, Walaszek B, Waiczies H, Schwentek T, Dörr J, Bellmann-Strobl J, Mohr C, Weinges-Evers N, Ittermann B, Wuerfel J, Paul F. *Metabolic changes in the visual cortex are linked to retinal nerve fiber layer thinning in multiple sclerosis*. PLoS ONE. 2011;6(4):e18019

Beitrag im Einzelnen:

CFP hat das Manuskript mit Brandt AU verfasst, klinische Untersuchungen der Patienten und in großem Umfang Messungen durchgeführt und ausgewertet, an der statistischen Auswertung anteilig mitgewirkt

Publikation 2: Dörr J, Wernecke KD, Bock M, Gaede G, Wuerfel JT, **Pfueller CF**, Bellmann-Strobl J, Freing A, Brandt AU*, Paul F*. *Association of Retinal and Macular Damage with Brain Atrophy in Multiple Sclerosis*. PLoS ONE. 2011 Apr 8;6(4):e18132

Beitrag im Einzelnen:

CFP hat in großem Umfang klinische Untersuchungen und Messungen durchgeführt und ausgewertet, sowie das Manuskript kritisch überarbeitet.

Publikation 3: Sinnecker T, Oberwahrenbrock T, Metz I, Zimmermann H, **Pfueller CF**, Harms L, Ruprecht K, Ramien C, Hahn K, Brück W, Niendorf T, Paul F, Brandt AU, Dörr J, Wuerfel J. Optic radiation damage in multiple sclerosis is associated with visual dysfunction and retinal thinning--an ultrahigh-field MR pilot study. Eur Radiol. January 2015;25(1):122–31.

Beitrag im Einzelnen:

CFP hat klinische Untersuchungen und Messungen durchgeführt und ausgewertet, sowie das Manuskript kritisch überarbeitet.

Publikation 4: Sinnecker T, Mittelstaedt P, Dörr J, **Pfueller CF**, Harms L, Niendorf T, Paul F, Wuerfel J. et al. Multiple sclerosis lesions and irreversible brain tissue damage: a comparative ultrahigh-field strength magnetic resonance imaging study. Arch Neurol. June 2012;69(6):739–45.

Beitrag im Einzelnen:

CFP hat klinische Untersuchungen und Messungen durchgeführt und ausgewertet, sowie das Manuskript kritisch überarbeitet.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Metabolic Changes in the Visual Cortex Are Linked to Retinal Nerve Fiber Layer Thinning in Multiple Sclerosis

Caspar F. Pfueller^{1*}, Alexander U. Brandt^{1,2,3}, Florian Schubert⁴, Markus Bock¹, Bernadeta Walaszek⁴, Helmar Waiczies^{4,5}, Thomas Schwentek⁴, Jan Dörr¹, Judith Bellmann-Strobl⁵, Christian Mohr³, Nicoletta Weinges-Evers¹, Bernd Ittermann⁴, Jens T. Wuerfel^{1,3¶}, Friedemann Paul^{1,5¶}

1 NeuroCure Clinical Research Center, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **2** gfnmediber GmbH, Berlin, Germany, **3** Institute of Neuroradiology, University Luebeck, Luebeck, Germany, **4** Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig und Berlin, Germany, **5** Experimental and Clinical Research Center, Charité Universitätsmedizin Berlin and Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

Abstract

Objective: To investigate the damage to the retinal nerve fiber layer as part of the anterior visual pathway as well as an impairment of the neuronal and axonal integrity in the visual cortex as part of the posterior visual pathway with complementary neuroimaging techniques, and to correlate our results to patients' clinical symptoms concerning the visual pathway.

Design, Subjects and Methods: Survey of 86 patients with relapsing-remitting multiple sclerosis that were subjected to retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT) measurement by optical coherence tomography, to a routine MRI scan including the calculation of the brain parenchymal fraction (BPF), and to magnetic resonance spectroscopy at 3 tesla, quantifying N-acetyl aspartate (NAA) concentrations in the visual cortex and normal-appearing white matter.

Results: RNFLT correlated significantly with BPF and visual cortex NAA, but not with normal-appearing white matter NAA. This was connected with the patients' history of a previous optic neuritis. In a combined model, both BPF and visual cortex NAA were independently associated with RNFLT.

Conclusions: Our data suggest the existence of functional pathway-specific damage patterns exceeding global neurodegeneration. They suggest a strong interrelationship between damage to the anterior and the posterior visual pathway.

Citation: Pfueller CF, Brandt AU, Schubert F, Bock M, Walaszek B, et al. (2011) Metabolic Changes in the Visual Cortex Are Linked to Retinal Nerve Fiber Layer Thinning in Multiple Sclerosis. PLoS ONE 6(4): e18019. doi:10.1371/journal.pone.0018019

Editor: Christoph Kleinschnitz, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Germany

Received: September 24, 2010; **Accepted:** February 22, 2011; **Published:** April 6, 2011

Copyright: © 2011 Pfueller et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Excellence Cluster 257 of the German Research Foundation to NeuroCure Clinical Research Center and the grant KF2286101FO9 from the German Ministry of Economics awarded both to NeuroCure Clinical Research Center and gfnmediber, a company co-managed by Alexander U Brandt, who is also a guest scientist in the NeuroCure Clinical Research Center. Therefore the authors mention gfnmediber as a funder of this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Alexander U Brandt is the deputy CEO of gfnmediber and a guest scientist in the NeuroCure Clinical Research Center (NCRC). There is no conflict of gfnmediber's company interests with the current study; Alexander U Brandt contributed to the study merely in his role of a guest scientist in the NCRC. As the grant KF2286101FO9 from the German Ministry of Economics was awarded both to NeuroCure Clinical Research Center and gfnmediber and gfnmediber is employing Alexander U Brandt, the authors include gfnmediber GmbH, Berlin, Germany as a funding source. This does not alter their adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: caspar.pfueller@charite.de

¶ These authors contributed equally to this work.

¶ These authors also contributed equally to this work.

Introduction

Already in the 19th century, Charcot reported a regular occurrence of neuronal and axonal degeneration beyond demyelination in multiple sclerosis (MS) [1]. Unfortunately, these findings were neglected by the research community for a long time, and consequently MS was seen as a primarily demyelinating condition, with relative preservation of axons and neurons [2]. However, within the past two decades, Charcot's initial descriptions enjoyed a revival, mainly by the advent of advanced microscopic imaging techniques, such as the combination of fluorescent immunocytochemistry with confocal microscopy.

Several groups could show that independently of the demyelination process neuronal and axonal breakdown contribute to central nervous system (CNS) tissue damage and the resulting functional deficits in different stages in the course of MS [3]. It is now well accepted that MS is not only a demyelinating CNS disease but has also a considerable neurodegenerative component [4]. In the light of these findings, therapeutic strategies that specifically address the neurodegenerative component of MS are in the focus of the research. Also in neuroimaging, there is a shift of research interest from a mere depiction of the inflammatory aspects of the disease such as T2- and contrast enhancing lesion load which only correlate modestly with the clinical disease course

and neurological disability (the so-called clinico-radiological paradox[5]) to improved techniques to quantify and monitor neurodegeneration. Brain atrophy is considered to represent at least partially axonal and neuronal loss in MS[6] and shows a strong association with some clinical disease-related measures. It can be quantified by various techniques, e.g. the calculation of the so-called brain parenchymal fraction (BPF) [7–8] but its appropriateness as primary endpoint in clinical trials on neuroprotective therapies still remains to be proven.

In recent years, optical coherence tomography (OCT) evolved as a valuable non-invasive diagnostic tool to image unmyelinated retinal CNS axons and thus to depict MS-related neurodegeneration (reviewed in [9],[10]). Based on the concept that ongoing diffuse neurodegeneration in the brain will also affect the retinal CNS axons, different groups reported reduced retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT) in MS patients versus healthy controls[11–12] and could show that RNFLT correlates well with brain atrophy and physical and cognitive disability[13–16].

Proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) emerged as technique to quantify MS-related neuronal and axonal damage by measuring the brain N-acetyl-aspartate (NAA) concentration, a presumed marker of axonal and neuronal integrity (reviewed in [17]). In line with the change of paradigm on MS pathology, ¹H-MRS provides evidence for metabolic alterations in normal appearing white matter in MS [18–19].

Against the background of these findings, we were interested whether changes in RNFLT indicating alterations of the anterior visual pathway are linked to impaired neuronal and axonal integrity in the visual cortex as part of the posterior visual pathway. We performed a cross-sectional study to investigate the association of RNFLT with NAA of the normal appearing white matter and the visual cortex as measured by ¹H-MRS, and with BPF as a parameter of global brain tissue loss.

Methods

Participants

Using an exploratory cross-sectional study design, relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) patients fulfilling the current panel criteria[20] were prospectively recruited between September 2007 and February 2009. The study was approved by the ethics committee of Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany and

all participants gave informed written consent according to the 1964 Declaration of Helsinki. Patients with MS met the following criteria: age 18-55 years, stable immunomodulatory therapy with glatiramer acetate for at least six months prior to inclusion, EDSS between 0 and 6.5, no acute relapse and no systemic steroid treatment within 30 days prior to enrolment. Patients with ophthalmologic disorders or medical conditions with impact on retinal nerve fiber layer (e.g. diabetes, glaucoma) were not included. The patients included in this study are the sub-group of patients recruited for an ongoing clinical drug trial with glatiramer acetate as required co-medication, from whom baseline data of both 1.5T MR imaging and 3T magnetic resonance spectroscopy were available. Demographic data are summarized in Table 1.

Clinical and visual assessment

Medical history, particularly with respect to visual symptoms, was taken from all study participants. Based on the documented previous history of optic neuritis (ON), we defined three subgroups of patients – patients with no, unilateral and bilateral optic neuritis. None of the study subjects had suffered from acute optic neuritis within the last 6 months before recruitment to the study. All participants underwent a complete ophthalmologic examination, including non-contact tonometry, visual acuity testing by using Snellen charts, Nieden charts and functional acuity contrast testing, spheric refractive error testing and cylindrical refractive error testing. Patients who showed a non-MS related eye pathology were excluded from OCT measurements. Neurological disability in MS patients was assessed by the expanded disability status scale (EDSS) [21].

Optical coherence tomography

RNFLT was measured with a Stratus 3000 OCT (Carl Zeiss Meditec, Dublin, California) using the “fast RNFL 3.4” protocol (software version 4.0). Three 3.4 mm diameter circular scans were acquired over 1.92 seconds. A good quality image was defined as an image with generalised signal distribution, a reflectance signal from either RNFL or retinal pigment epithelium strong enough to identify either layer, no missing parts caused by eye movements, and a signal strength of ≥8 of 10 [22]. The segmentation line defining the upper and lower border of the RNFL was required to be on the internal limiting membrane and lower border of the

Table 1. Summary of demographic data, mean RNFLT, mean BPF, mean normal-appearing white matter (NAWM) NAA concentrations, mean visual cortex (VC) NAA concentrations.

	All Patients	NON/NON Patients	NON/ON Patients	ON/ON Patients
Patients (%)	86 (100)	53 (61.6)	20 (23.3)	13 (15.1)
Age, mean (range), y	41 (21–60)	40 (21–60)	41 (24–60)	41 (32–56)
Disease Duration, mean (range), m	71 (4–271)	65 (4–271)	92 (11–193)	68 (7–147)
EDSS, median (range)	2.0 (0.0–6.0)	2.0 (0.0–6.0)	2.0 (1.0–4.5)	2.5 (0–4.5)
Min. RNFLT Average, mean (SD; range), μm	91.3 (15; 46–123)	97.3 (10; 74–123)	84.6 (17.3;46–111)	75 (14.2; 56–104)
BPF, mean (SD; range)	0.851 (0.031; 0.77–0.918)	0.855 (0.032; 0.77–0.918)	0.849 (0.03; 0.791–0.913)	0.838 (0.026; 0.789–0.872)
NAWM NAA, mean (SD; range), mmol/l	13.079 (1.354; 7.652–15.807)	13.192 (1.25; 10.909–15.807)	12.994 (1.714; 7.652–15.65)	12.746 (1.212; 11.026–15.344)
VC NAA, mean (SD; range), mmol/l	13.471 (1.017; 11.176–16.086)	13.601 (1.023; 11.176–16.086)	13.43 (0.996; 11.57–14.783)	13.002 (0.948; 11.401–14.651)

(NON/NON – no previous optic neuritis, NON/ON – previous unilateral optic neuritis, ON/ON - previous bilateral optic neuritis). doi:10.1371/journal.pone.0018019.t001

RNFL. Images which did not meet these criteria were excluded. The OCT A-scan data were digitally exported in a blinded fashion.

Magnetic resonance imaging and brain parenchymal fraction calculation

MRI measurements were performed on a 1.5 tesla scanner (Avanto, Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany). A three-dimensional T1-weighted image (MPRAGE) was acquired according to the following protocol: T_R 1.9 ms, T_E 3.09 ms, T_1 1.1 ms, flip angle 15° , matrix size 1 mm^3 . Brain tissue volume, normalized for subject head size, was estimated applying SIENAX[23–24], part of FSL [25]. SIENAX starts by extracting brain and skull images from the single whole-head input data [26]. The brain image is then affine-registered to MNI152 space (using the skull image to determine the registration scaling) [27–28] in order to obtain the volumetric scaling factor to be used as normalization for head size. Next, tissue-type segmentation with partial volume estimation is carried out in order to calculate total volume of brain tissue [29].

MR spectroscopy

MR measurements were carried out on a 3 tesla scanner (MEDSPEC 30/100, Bruker Biospin, Ettlingen, Germany). T₁-weighted images were acquired using MDEFT (modified driven equilibrium Fourier transform, with $T_E = 3.8$ ms, $T_R = 20.53$ ms; 128 contiguous slices, 1.5 mm thick; 1-mm in-plane (x-y) resolution). After localized shimming, magnetic resonance spectra were recorded from two voxels located in left and right normal appearing periventricular white matter ($2 \times 2 \times 2\text{ cm}^3$), and a voxel centered on the visual cortex ($3 \times 2 \times 2\text{ cm}^3$) (Fig. 1). The PRESS (point resolved spectroscopy) sequence preceded by water suppression (3 Gauss CHESS pulses of 25.6 ms duration) was used throughout. Details of the procedure for metabolite quantification were previously published [30]. For one metabolite spectrum eight subspectra of 16 phase cycled scans each were recorded with $T_R = 3$ s and $T_E = 80$ ms. Before further processing, the 8 metabolite subspectra were corrected for eddy currents using water-unsuppressed spectra (T_R and T_E as above), automatically corrected for frequency and phase shifts, and added together to give 128 averages. Spectral quantification was carried out using a time domain-frequency domain fitting procedure that involves background estimation by regularization [31]. Any residual contributions by macromolecules are accommodated in the baseline by the fitting procedure. Mean uncertainties corresponding to Cramér-Rao lower bounds with added uncertainties from the background modelling[31] for the fitting of NAA were as small as 2.1% for the visual cortex voxel and 2.4% for the normal-appearing white matter voxels. The fitted NAA amplitudes were corrected for different coil loading by an aqueous metabolite phantom used for spectrum analysis and the individual subject's head (principle of reciprocity), and for transverse relaxation effects using mean T_2 values measured earlier at 3 T for normal-appearing white matter [32] and cortical regions [30]. Longitudinal relaxation effects were neglected because T_1 was assumed to be similar in the aqueous phantom and in brain tissue. Metabolite concentrations were corrected for cerebrospinal fluid (CSF) in the voxels studied by using the CSF fractions obtained by segmenting the T₁-weighted images with SPM2 (www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/spm2.html).

Statistical analysis

RNFLT, ¹H-MRS and BPF data were analyzed for normal distribution using skewness and kurtosis of data histograms. All

data was within +/-1.5 skewness and kurtosis. Additionally, Shapiro-Wilk tests were performed to check for normal distribution. According to these tests, RNFLT, BPF, visual cortex NAA were normally distributed whereas NAA in normal-appearing white matter was not (Shapiro-Wilk test, $p = 0.037$).

Correlation between normal-appearing white matter NAA and visual cortex NAA and BPF was assessed using Pearson's correlation coefficient, counterchecked with Spearman's correlation due to the distribution of the normal-appearing white matter NAA. Association of normal-appearing white matter and visual cortex NAA and BPF with RNFLT was tested with Generalized Estimating Equation Models (GEE) to adjust for inter-eye dependencies within patients using RNFLT as the dependent variable and BPF, visual cortex voxel NAA or normal-appearing white matter NAA as single independent variables. Finally, a GEE with BPF and visual cortex NAA as independents and RNFLT as dependent variable was used to calculate the independent association of BPF and visual cortex NAA with RNFLT (combined model). Since GEE function in PASW 18 does not provide standardized output for coefficients, we approached this issue in the following way: RNFLT, BPF and visual cortex NAA were transformed to standardized z-values and each GEE was performed again with these z-values instead of the original values (standardized Beta, see Table 2).

Analyses of variance were performed with BPF, visual cortex NAA or normal-appearing white matter NAA as dependent variable and history of ON as nominal independent factor to identify group differences regarding BPF, visual cortex NAA and normal-appearing white matter NAA between patients with history of bilateral optic neuritis, patients with history of unilateral optic neuritis and without previous optic neuritis. Differences in age, EDSS and disease duration between these groups defined by history of optic neuritis were assessed with Kruskal-Wallis tests, differences in gender with Pearson's Chi Square analysis.

All statistical tests were performed using PASW 18 (SPSS, Chicago, IL, USA). For all calculations, statistical significance was established at $p < 0.05$. Data sets with partly missing data as indicated under results were not excluded from sub-analyses. All tests should be understood as constituting exploratory data analysis, such that no adjustments for multiple testing were made.

Results

86 RRMS patients were recruited. Three patients were excluded from OCT analysis due to non-MS related retinal pathologies. All other eyes were included and were analyzable with an RNFLT signal strength ≥ 8 . Data from ¹H-MRS measurements were available for all patients. In five patients BPF analysis was not performed due to insufficient image quality (e.g. motion artifacts). Patients in the three subgroups defined by history of optic neuritis did not differ significantly regarding age (Kruskal-Wallis, $p = 0.947$), disease duration (Kruskal-Wallis, $p = 0.172$), EDSS (Kruskal-Wallis, $p = 0.829$) or gender (Chi-Square, $p = 0.768$). Clinical and demographical data including history of optic neuritis, RNFLT, BPF and ¹H-MRS are given in Table 1.

BPF correlates with RNFLT but not with NAA concentration in visual cortex and normal-appearing white matter

BPF correlated with RNFLT (GEE, CI95% low = $0.55\ \mu\text{m}/\%$, high = $2.11\ \mu\text{m}/\%$, $p < 0.001$). There was no correlation between visual cortex NAA concentration and BPF (Pearson, $p = 0.161$) or normal-appearing white matter NAA concentration and BPF (Pearson, $p = 0.540$). Comparing the BPF in the three subgroups

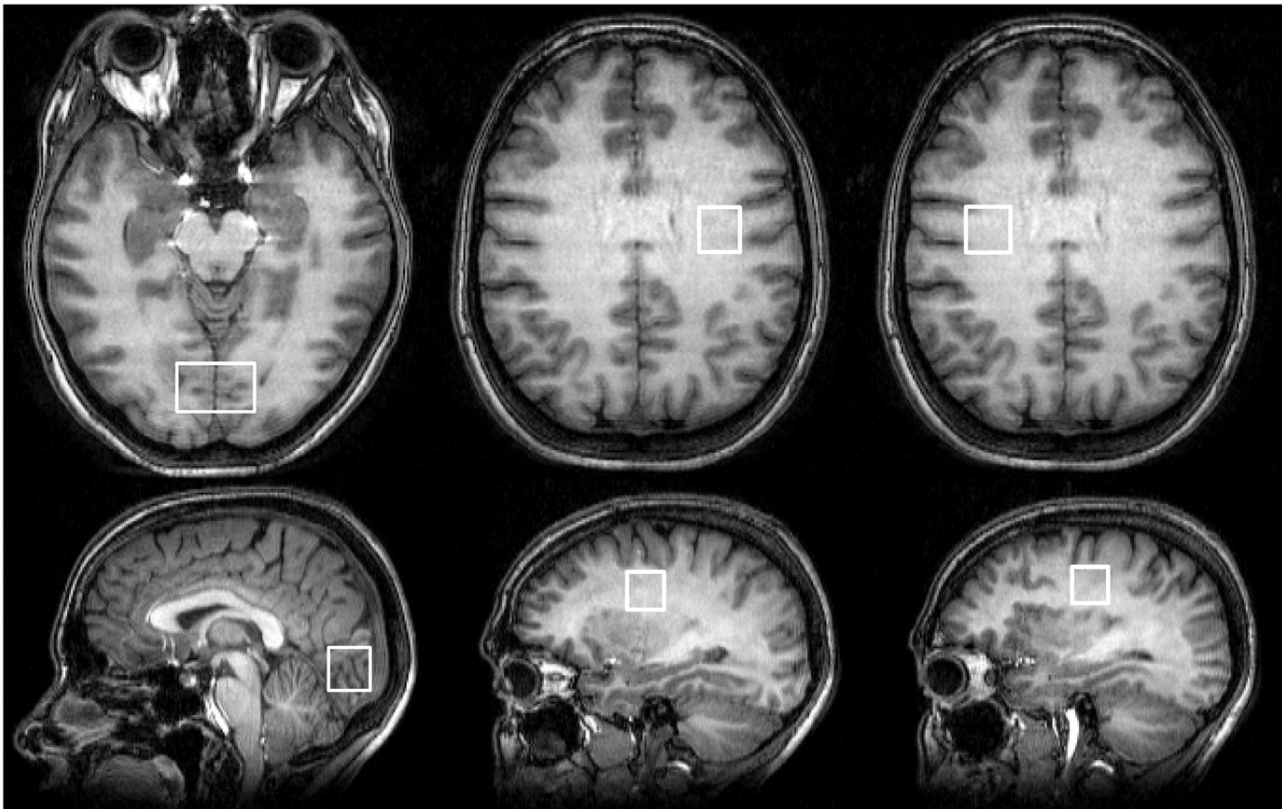


Figure 1. ¹H-MRS voxel placement. Visual representation of typical voxel placement for MR spectroscopy. In each patient, NAA concentrations were measured in a visual cortex voxel (VC) and two normal-appearing white matter voxels (NAWM).
doi:10.1371/journal.pone.0018019.g001

defined by history of optic neuritis there was a trend towards lower BPF in patients with previous episodes of optic neuritis (ANOVA, $p = 0.055$) (Figure 2A and B). Further statistical details, including a calculated standardized coefficient, are provided in Table 2.

RNFLT correlates with NAA concentration in the visual cortex but not in the normal-appearing white matter

We found a correlation between RNFLT and visual cortex NAA concentration (GEE, Confidence Interval (CI)95% low = $0.03 \mu\text{m}/(\text{mmol}/\text{l})$, high = $5.61 \mu\text{m}/(\text{mmol}/\text{l})$, $p = 0.047$). The subgroups regarding history of optic neuritis differed in their visual cortex NAA concentration, indicating that patients with previous unilateral or bilateral optic neuritis exhibited lower NAA levels than those without optic neuritis (ANOVA, $p = 0.046$), (Figure 2C and D). There was no correlation between RNFLT and NAA concentration in the normal-appearing white matter (GEE,

CI95% low = $-1.26 \mu\text{m}/(\text{mmol}/\text{l})$, high = $2.44 \mu\text{m}/(\text{mmol}/\text{l})$, $p = 0.531$), nor a difference in normal-appearing white matter NAA concentration between subgroups regarding the history of optic neuritis (ANOVA, $p = 0.429$) (Figure 2E and F). (Further statistical details, including a calculated standardized coefficient, are provided in Table 2.)

BPF and visual cortex NAA concentrations are independently associated with average RNFLT

Using visual cortex NAA concentration and BPF as independent variables in a multivariate GEE analysis, we found that both BPF (CI 95% low = $0.45 \mu\text{m}/\%$, high = $1.96 \mu\text{m}/\%$, $p = 0.002$) and visual cortex NAA concentration (CI 95% low = $0.10 \mu\text{m}/(\text{mmol}/\text{l})$, high = $5.47 \mu\text{m}/(\text{mmol}/\text{l})$, $p = 0.042$) are independently associated with RNFLT. Further statistical details, including a calculated standardized coefficient, are provided in Table 2.

Table 2. Statistical data for GEE and combined model GEE (NAWM = normal-appearing white matter, VC = visual cortex).

	Variable	Dependent Variable	B (Std. Error; 95% CI)	standardized B (Std. Error; 95% CI)	Chi-Square	P value
GEE 1	VC-NAA	RNFLT	2.823 (1.4238; .033–5.614)	.191 (.0964; .002–.380)	3.932	.047
GEE 2	BPF	RNFLT	132.907 (39.941; 54.625–211.190)	.269 (.0809; .111–.428)	11.073	.001
GEE Combined model	BPF	RNFLT	120.448 (38.3810; 45.223–195.673)	.244 (.0777; .092–.396)	9.848	.002
	VC-NAA	RNFLT	2.784 (1.3720; .095–5.473)	.188 (.0929; .006–.370)	4.117	.042

doi:10.1371/journal.pone.0018019.t002

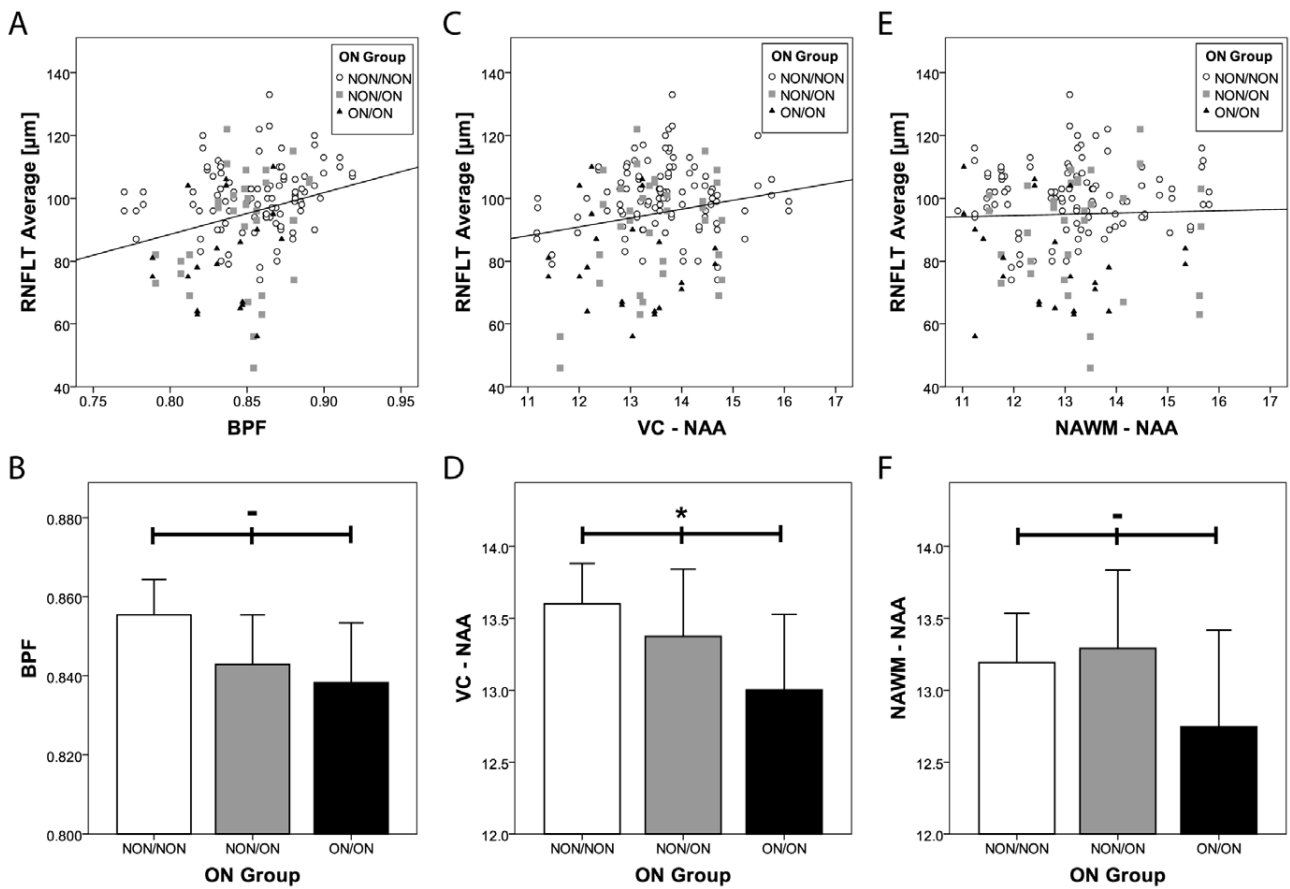


Figure 2. Correlation of RNFLT with BPF and ¹H-MRS parameters. a) Depicted is the average RNFLT, every symbol representing a single eye examined together with the corresponding BPF values. The symbols represent the patient’s previous history of optic neuritis (open circles – no previous optic neuritis, grey squares - unilateral optic neuritis, black triangles – bilateral optic neuritis) A linear correlation function was calculated by a Generalised Linear Model to account for intra-individual inter-eye relationships ($p=0.001$). b) Mean BPF was calculated for three groups that were defined based on their previous history of optic neuritis (white bar – no previous optic neuritis, grey bar - unilateral optic neuritis, black bar – bilateral optic neuritis). The (-) symbol indicates a trend, but a missing significant correlation of group differences as calculated by ANOVA ($p=0.055$). Error bars represent $2 \times$ standard error of the mean (SEM). c) RNFLT averages are shown in relation to corresponding NAA concentrations in the visual cortex (VC). The correlation is significant ($p=0.047$). d) Mean visual cortex voxel (VC) NAA and the significance of group differences was calculated for optic neuritis groups as in b). The asterisk indicates statistically significant ($p=0.046$) group differences. Error bars represent $2 \times$ standard error of the mean (SEM). e) RNFLT averages are shown in relation to corresponding NAA concentrations in normal-appearing white matter (NAWM). The symbols are coded as in a). No significant correlation was found ($p=0.531$). f) Mean NAA in normal-appearing white matter (NAWM) and the significance of group differences was calculated for optic neuritis groups as in b) ($p=0.429$). Error bars represent $2 \times$ standard error of the mean (SEM). doi:10.1371/journal.pone.0018019.g002

Discussion

This cross-sectional study is the first to investigate MS-related axonal and neuronal damage in a large number of patients by three different imaging modalities including OCT, brain atrophy measurement by MRI, and ¹H-MRS of the visual cortex and normal-appearing white matter at 3 T. Our main findings are that (i) RNFLT is correlated with NAA concentration in the visual cortex but not in the normal-appearing white matter, (ii) visual cortex NAA concentrations are lower in patients with previous optic neuritis than in those without, (iii) both visual cortex NAA and BPF are independently associated with RNFLT, and (iv) BPF and RNFLT show a significant association.

The novel multimodal imaging approach merging OCT and MRI and the additional application of ¹H-MRS at 3 T, yielding an improved signal-to-noise ratio compared to 1.5 T [17] enabled us to investigate not only the relationship between brain atrophy

and RNFL reduction which had already been assessed previously in smaller patient cohorts [13] [15] and by us in a larger patient cohort (Dörr et al., submitted), where we analyzed the association of RNFLT and the total macular volume with global brain atrophy, but to evaluate also the association between disease-related damage of the anterior part (RNFLT by OCT) and that of the retrogeniculate part of the visual pathway (NAA in the visual cortex by ¹H-MRS). Thus, our combined OCT and ¹H-MRS data may suggest an interconnection of MS-associated neurodegeneration in both parts of the visual pathway. The multivariate statistical model revealed that the correlation of RNFLT reduction with lower NAA concentrations is not a mere consequence of global brain tissue loss as one could assume given the correlation of RNFLT with BPF in both our work and that of others [13][15]. On the contrary, loss of NAA in the visual cortex appears to be associated with thinning of the RNFL independently from brain atrophy. These findings could indicate that – beyond an

undoubted diffuse neurodegenerative process in MS which is detectable by measurement of global brain tissue loss and also by RNFL measurements - additional progressive neurodegenerative damage may evolve in specific tracts or functional systems such as the visual pathway. This assumption is further supported by previous studies describing visual pathway damage in MS by means of voxel-based morphometry, diffusion tensor imaging or magnetization transfer ratio [33–35], and damage to other functional systems such as pathways involved in learning and memory [36–37]. The connection between the anterior and posterior visual pathway damage raises the question of a mutual interdependency of these alterations and implicates the possible existence of transsynaptic damage processes in the anatomical correlates of the visual pathway in MS. This concept has already been described recently for glaucoma [38–39] and in the context of amblyopia [40] and in congenital or acquired homonymous hemianopia [41]. In this regard, the lateral geniculate nucleus (LGN) as region of change-over from axons deriving from the anterior visual pathway to neurons from which axons forming the optic radiation emerge is of importance. Interestingly, a histopathological study of neuronal changes in the LGN by Evangelou et al. [42] strongly supports the concept of transsynaptic degeneration. In this context, Green et al. could show just recently by a larger histopathological study, that retinal atrophy and intraretinal inflammation may exceed previous assumptions, indicating that also other structures of the foremost part of the visual pathway, as the retinal inner nuclear layer, may be affected by transsynaptic axonal and neuronal degeneration, not only the retinal nerve fiber layer [43]. This hypothesis is further supported by our findings of lower RNFL thickness in patients with previous optic neuritis compared to those without, in line with earlier reports [12] [44–45], and concordantly also lower visual cortex NAA concentrations in patients with previous optic neuritis. However, the underlying pathophysiological mechanisms remain to be elucidated, including the direction of damage cascades (anterograde, retrograde) and their temporal evolution. These mechanisms cannot be deduced from cross-sectional studies, as these only provide a description of the current status within a narrow time-frame.

References

1. Charcot JM (1868) Histologie de la sclérose en plaques. *Gazette des Hôpitaux* 141: 554–558.
2. Ropper AH, Brown RJ (2005) Adams and Victor's Principles of Neurology. 8th edition. McGraw-Hill Medical.
3. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, et al. (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278–285.
4. Vogt J, Paul F, Aktas O, Müller-Wielisch K, Dörr J, et al. (2009) Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 66: 310–322.
5. Barkhof F (2002) The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol* 15: 239–245.
6. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ (2002) Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125: 1676–1695.
7. Bermel RA, Bakshi R (2006) The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 5: 158–170.
8. Rudick RA, Fisher E, Lee JC, Simon J, Jacobs L (1999) Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology* 53: 1698–1704.
9. Frohman EM, Fujimoto JG, Frohman TC, Calabresi PA, Cutter G, et al. (2008) Optical coherence tomography: a window into the mechanisms of multiple sclerosis. *Nat Clin Pract Neurol* 4: 664–675.
10. Barkhof F, Calabresi PA, Miller DH, Reingold SC (2009) Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. *Nat Rev Neurol* 5: 256–266.
11. Parisi V, Manni G, Spadaro M, Colacino G, Restuccia R, et al. (1999) Correlation between morphological and functional retinal impairment in multiple sclerosis patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2520–2527.
12. Bock M, Brandt AU, Dörr J, Kraft H, Weinges-Evers N, et al. (2010) Patterns of retinal nerve fiber layer loss in multiple sclerosis patients with or without optic neuritis and glaucoma patients. *Clin Neurol Neurosurg* 112(8): 647–52.
13. Gordon-Lipkin E, Chodkowski B, Reich DS, Smith SA, Pulicken M, et al. (2007) Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* 69: 1603–1609.
14. Grazioli E, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Lincoff N, Baier M, et al. (2008) Retinal nerve fiber layer thickness is associated with brain MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 268: 12–17.
15. Siger M, Dziegielewska K, Jasek L, Bieniek M, Nicpan A, et al. (2008) Optical coherence tomography in multiple sclerosis: thickness of the retinal nerve fiber layer as a potential measure of axonal loss and brain atrophy. *J Neurol* 255: 1555–1560.
16. Toledo J, Sepulcre J, Salinas-Alaman A, García-Layana A, Murie-Fernandez M, et al. (2008) Retinal nerve fiber layer atrophy is associated with physical and cognitive disability in multiple sclerosis. *Mult. Scler* 14: 906–912.
17. De Stefano N, Filippi M (2007) MR spectroscopy in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 17(Suppl 1): 31S–35S.
18. Husted CA, Goodin DS, Hugg JW, Maudsley AA, Tsuruda JS, et al. (1994) Biochemical alterations in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter detected by in vivo 31P and 1H spectroscopic imaging. *Ann Neurol* 36: 157–165.
19. Fu L, Matthews PM, De Stefano N, Worsley KJ, Narayanan S, et al. (1998) Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain* 121(Pt 1): 103–113.
20. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung H, et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 58: 840–6.
21. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444–1452.

Acknowledgments

We thank our study nurses Antje Els, Franziska Lipske and Cordula Rudolph, and Susan Pikol for expert technical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CFP AUB JTW FP. Performed the experiments: CFP FS MB BW HW JD FP. Analyzed the data: CFP AUB FS MB TS CM JTW. Contributed reagents/materials/analysis tools: AUB FS MB CM BI JTW. Wrote the paper: CFP AUB JTW FP. Collection of clinical data: CFP AUB MB JD JBS NWE FP. Study supervision: CFP AUB FP. Set-up of imaging procedures: FS MB BI JTW. Optical coherence tomography supervision: MB.

22. Cheung CYL, Leung CKS, Lin D, Pang C, Lam DSC (2008) Relationship between retinal nerve fiber layer measurement and signal strength in optical coherence tomography. *Ophthalmology* 115: 1347–1351, 1351.e1-2.
23. Smith SM (2002) Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp* 17: 143–155.
24. Smith SM, De Stefano N, Jenkinson M, Matthews PM (2001) Normalized accurate measurement of longitudinal brain change. *J Comput Assist Tomogr* 25: 466–475.
25. Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TEJ, et al. (2004) Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 23(Suppl 1): S208–219.
26. Smith SM, Zhang Y, Jenkinson M, Chen J, Matthews PM, et al. (2002) Accurate, robust, and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *Neuroimage* 17: 479–489.
27. Jenkinson M, Bannister P, Brady M, Smith S (2002) Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *Neuroimage* 17: 825–841.
28. Jenkinson M, Smith S (2001) A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Med Image Anal* 5: 143–156.
29. Zhang Y, Brady M, Smith S (2001) Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Trans Med Imaging* 20: 45–57.
30. Schubert F, Gallinat J, Seifert F, Rinneberg H (2004) Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *Neuroimage* 21: 1762–1771.
31. Elster C, Schubert F, Link A, Walzel M, Seifert F, et al. (2005) Quantitative magnetic resonance spectroscopy: semi-parametric modeling and determination of uncertainties. *Magn Reson Med* 53: 1288–1296.
32. Schubert F, Seifert F, Elster C, Link A, Walzel M, et al. (2002) Serial 1H-MRS in relapsing-remitting multiple sclerosis: effects of interferon-beta therapy on absolute metabolite concentrations. *MAGMA* 14: 213–222.
33. Sepulcre J, Goñi J, Masdeu JC, Bejarano B, Vélaz de Mendizábal N, et al. (2009) Contribution of white matter lesions to gray matter atrophy in multiple sclerosis: evidence from voxel-based analysis of T1 lesions in the visual pathway. *Arch.Neurol* 66: 173–179.
34. Reich DS, Smith SA, Gordon-Lipkin EM, Ozturk A, Caffo BS, et al. (2009) Damage to the optic radiation in multiple sclerosis is associated with retinal injury and visual disability. *Arch Neurol* 66: 998–1006.
35. Audoin B, Fernando KTM, Swanton JK, Thompson AJ, Plant GT, et al. (2006) Selective magnetization transfer ratio decrease in the visual cortex following optic neuritis. *Brain* 129: 1031–1039.
36. Fink F, Eling P, Rischkau E, Beyer N, Tomandl B, et al. (2010) The association between California Verbal Learning Test performance and fibre impairment in multiple sclerosis: evidence from diffusion tensor imaging. *Mult. Scler* 16: 332–341.
37. Benedict RHB, Ramasamy D, Munschauer F, Weinstock-Guttman B, Zivadinov R (2009) Memory impairment in multiple sclerosis: correlation with deep grey matter and mesial temporal atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 80: 201–206.
38. Gupta N, Greenberg G, de Tilly LN, Gray B, Polemidiotis M, et al. (2009) Atrophy of the lateral geniculate nucleus in human glaucoma detected by magnetic resonance imaging. *Br J Ophthalmol* 93: 56–60.
39. Gupta N, Yücel YH (2003) Brain changes in glaucoma. *Eur J Ophthalmol* 13(Suppl 3): S32–35.
40. Barnes GR, Li X, Thompson B, Singh KD, Dumoulin SO, et al. (2010) Decreased gray matter concentration in the lateral geniculate nuclei in human amblyopes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 1432–1438.
41. Jindahra P, Petrie A, Plant GT (2009) Retrograde trans-synaptic retinal ganglion cell loss identified by optical coherence tomography. *Brain* 132: 628–634.
42. Evangelou N, Konz D, Esiri MM, Smith S, Palace J, et al. (2001) Size-selective neuronal changes in the anterior optic pathways suggest a differential susceptibility to injury in multiple sclerosis. *Brain* 124: 1813–1820.
43. Green AJ, McQuaid S, Hauser SL, Allen IV, Lyness R (2010) Ocular pathology in multiple sclerosis: retinal atrophy and inflammation irrespective of disease duration. *Brain* 133: 1591–1601.
44. Trip SA, Schlottmann PG, Jones SJ, Altmann DR, Garway-Heath DF, et al. (2005) Retinal nerve fiber layer axonal loss and visual dysfunction in optic neuritis. *Ann.Neurol* 58: 383–391.
45. Costello F, Hodge W, Pan YI, Freedman M, DeMeulemeester C (2009) Differences in retinal nerve fiber layer atrophy between multiple sclerosis subtypes. *J Neurol Sci* 281: 74–79.
46. Bock M, Brandt AU, Dörr J, Pfueller CF, Ohlraun S, et al. (2010) Time domain and spectral domain optical coherence tomography in multiple sclerosis: A comparative cross-sectional study. *Mult Scler* 2010 Jul; 16(7): 893–6.
47. Talman LS, Bisker ER, Sackel DJ, Long DA, Galetta KM, et al. (2010) Longitudinal study of vision and retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67: 749–760.

Association of Retinal and Macular Damage with Brain Atrophy in Multiple Sclerosis

Jan Dörr^{1*}, Klaus D. Wernecke², Markus Bock¹, Gunnar Gaede¹, Jens T. Wuerfel³, Caspar F. Pfueller¹, Judith Bellmann-Strobl^{1,4}, Alina Freing¹, Alexander U. Brandt^{1,5,9}, Paul Friedemann^{1,4,9}

1 NeuroCure Clinical Research Center, Charité - Universitaetsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **2** Sophisticated Statistical Analysis GmbH and Charité - Universitaetsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **3** Institute of Neuroradiology, University Luebeck, Luebeck, Germany, **4** Experimental and Clinical Research Center, Charité - Universitaetsmedizin Berlin and Max-Delbrück Center for Molecular Medicine Berlin, Berlin, Germany, **5** gfnmediber GmbH, Berlin, Germany

Abstract

Neuroaxonal degeneration in the central nervous system contributes substantially to the long term disability in multiple sclerosis (MS) patients. However, in vivo determination and monitoring of neurodegeneration remain difficult. As the widely used MRI-based approaches, including the brain parenchymal fraction (BPF) have some limitations, complementary in vivo measures for neurodegeneration are necessary. Optical coherence tomography (OCT) is a potent tool for the detection of MS-related retinal neurodegeneration. However, crucial aspects including the association between OCT- and MRI-based atrophy measures or the impact of MS-related parameters on OCT parameters are still unclear. In this large prospective cross-sectional study on 104 relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients we evaluated the associations of retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT) and total macular volume (TMV) with BPF and addressed the impact of disease-determining parameters on RNFLT, TMV or BPF. BPF, normalized for subject head size, was estimated with SIENAX. Relations were analyzed primarily by Generalized Estimating Equation (GEE) models considering within-patient inter-eye relations. We found that both RNFLT ($p = 0.019$, GEE) and TMV ($p = 0.004$, GEE) associate with BPF. RNFLT was furthermore linked to the disease duration ($p < 0.001$, GEE) but neither to disease severity nor patients' age. Contrarily, BPF was rather associated with severity ($p < 0.001$, GEE) than disease duration and was confounded by age ($p < 0.001$, GEE). TMV was not associated with any of these parameters. Thus, we conclude that in RRMS patients with relatively short disease duration and rather mild disability RNFLT and TMV reflect brain atrophy and are thus promising parameters to evaluate neurodegeneration in MS. Furthermore, our data suggest that RNFLT and BPF reflect different aspects of MS. Whereas BPF best reflects disease severity, RNFLT might be the better parameter for monitoring axonal damage longitudinally. Longitudinal studies are necessary for validation of data and to further clarify the relevance of TMV.

Citation: Dörr J, Wernecke KD, Bock M, Gaede G, Wuerfel JT, et al. (2011) Association of Retinal and Macular Damage with Brain Atrophy in Multiple Sclerosis. PLoS ONE 6(4): e18132. doi:10.1371/journal.pone.0018132

Editor: Rafael Linden, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

Received: November 3, 2010; **Accepted:** February 24, 2011; **Published:** April 8, 2011

Copyright: © 2011 Dörr et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Excellence Cluster 257 of the German Research Foundation to NeuroCure Clinical Research Center, grant KF2286101FO9 from the German Ministry of Economics to NeuroCure Clinical Research Center and gfnmediber GmbH (www.gfnmediber.de) and a limited research grant by TEVA Pharma GmbH, Germany (www.teva-deutschland.de). These funders played no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Besides their scientific affiliation at the Charité, Alexander U. Brandt and Klaus-Dieter Wernecke are employed by gfnmediber (AU Brandt) and SoStAna (KD Wernecke, www.sostana.com). Alexander U. Brandt contributed to this project (study design, statistical analysis and preparation of the manuscript) in his role as scientist and not as employee of gfnmediber GmbH. Apart from partial funding (grant KF2286101FO9 from the German Ministry of Economics) the company gfnmediber GmbH had no further role in this project. Klaus-Dieter Wernecke contributed to this project (study design, statistical analysis) in his role as scientist at the Charité and not as CEO of SoStAna. The company SoStAna itself had no role in this project.

Competing Interests: Alexander U. Brandt is deputy CEO of gfnmediber GmbH and guest scientist at the NeuroCure Clinical Research Center (NCRC). Alexander U Brandt contributed to the study merely in his role of a guest scientist at the NCRC. Klaus-Dieter Wernecke is CEO of Sophisticated Statistical Analysis (SoStAna) and scientist at the Charité, Berlin. Klaus-Dieter Wernecke contributed to the study merely in his role as a scientist at the Charité. There are no patents, products in development or marketed products to declare with the current study and these affiliations did not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials. All other authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jan-markus.doerr@charite.de

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Increasing evidence documents that neuronal and axonal damage within the central nervous system (CNS) contributes substantially to the development of permanent disability in multiple sclerosis (MS) [1,2,3]. However, in vivo quantification and longitudinal monitoring of neurodegenerative processes remain a challenging task. Whole brain atrophy expressed by brain parenchymal fraction (BPF) is a frequently used MRI-based surrogate parameter for neurodegeneration within the CNS [4,5,6] and an inverse relation of BPF and disability progression

has been consistently demonstrated [7,8]. However, all MRI-based measures of brain atrophy have some important disadvantages. Besides limited availability, time consumption and costs, crucial confounders such as hydration status, inflammation, demyelination and age have to be accounted for [5]. Thus, a need for reliable, inexpensive and easily assessable complementary surrogate markers for neuroaxonal degeneration still remains. During the past two decades, optical coherence tomography (OCT) has emerged into a fascinating tool for the non invasive and reproducible in vivo studying of retinal neuroaxonal damage [9]. In MS patients, OCT has been consistently shown to detect

thinning of the peripapillary retinal nerve fiber layer (RNFL) which is most probably due to a diffuse damage of retinal axons and at least in part independent of a previous optic neuritis (ON) [10,11,12]. Moreover, the determination of total macular volume (TMV) has been suggested as a marker for neuronal loss in MS patients [13]. Therefore, OCT might be a valuable tool for quantification and monitoring of both axonal and neuronal damage in MS [14,15]. However, data on association between retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT) and MS-determining parameters such as disease severity and disease duration are still inconsistent [15]. Whereas some studies found an association between RNFLT and disease duration [11,16] both parameters were not related in other studies [17,18]. Furthermore, data regarding the relation between OCT parameters and MRI measures for neurodegeneration are not yet consistent and a consensus on the most relevant parameter has yet to be reached [5,15]. To date, the association between OCT parameters and BPF has been addressed in only two studies. Gordon-Lipkin et al. reported an association between RNFLT and BPF but not between TMV and BPF in a small cohort of 40 MS patients [19]. In another small study, Siger et al. found a correlation between RNFLT and BPF only in the subgroup without a history of ON [20]. Thus, the relation between OCT-based measures and BPF as an established MRI-based measure for neurodegeneration is not yet clear.

The aims of our prospective cross-sectional study were (i) to investigate the association between retinal neuroaxonal damage, measured by RNFLT and TMV, and cerebral neurodegeneration, measured by BPF, in a homogenous and sufficiently large cohort of patients with relapsing remitting (RR)MS and (ii) to evaluate the influence of important aspects such as age, disease duration, disease severity and ON history on RNFLT, TMV and BPF, respectively.

Methods

Ethics Statement

The study was approved by the local ethics committee of Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany, and all participants gave informed written consent according to the 1964 Declaration of Helsinki.

Patients

RRMS patients fulfilling the current panel criteria [21] were prospectively recruited from baseline visit of an ongoing clinical trial. All patients met the following criteria: age between 18 and 60 years, definite RRMS [21], expanded disability status scale (EDSS) between 0 and 6.5 [22], stable immunomodulatory treatment with glatiramer acetate for at least six months (this was an inclusion criterion of the ongoing clinical trial, patients were recruited from), no acute relapse (including optic neuritis) and no systemic steroid treatment within 30 days prior to enrolment. Medical history, particularly with respect to visual symptoms was taken from all study participants. All participants underwent a complete ophthalmologic examination including visual acuity testing, spheric and cylindrical refractive error testing and non-contact tonometry. Patients with ophthalmologic disorders or medical conditions with impact on OCT parameters (e.g. diabetes, glaucoma) were not included.

Optical Coherence Tomography

All OCT examinations were carried out on a Stratus 3000 OCT (OCT3, Carl Zeiss Meditec, Dublin, USA). RNFLT was measured using the “fast RNFL 3.4” protocol (software version

4.0). Three 3.4 mm diameter circular scans were acquired over 1.92 seconds. The OCT A-scan data were digitally exported in a blinded fashion and average RNFLT was calculated. As no specific real time volume scan protocol is available we used the “Fast Macular Thickness Map” protocol for determination of TMV which interpolates the area between the real time line scans to construct a circular model of the fovea and macula. Six radial line scans with 128 A-scans per line and a scan area of 6-mm diameter circle were acquired over 1.92 seconds. The maximum of 786.432 data points for fast protocols was obtained. For controlled manual export of the TMV data in mm³ we used the analysis protocol “Retinal Thickness/Volume Tabular”. A good quality image was defined as an image with generalized signal distribution, a reflectance signal from RNFL or retinal pigment epithelium strong enough to identify either layer, no missing parts caused by eye movements and a signal strength of ≥ 8 of 10 [23]. The segmentation line that defines the upper border of the retina was required to be on the internal limiting membrane and the lower border was required to be on the lower border of the RNFL (for RNFLT) or between the inner and outer photoreceptor layer of the RNFL (for TMV). Images not meeting these criteria were excluded.

Magnetic Resonance Imaging

All MRI measurements were performed on a 1.5 Tesla scanner (Avanto, Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany). A three-dimensional T1-weighted sequence (MPRAGE) was acquired from all participants according to the following protocol: TR 1.900 ms, TE 3.09 ms, TI 1,100 ms, flip angle 15°, resolution 1 mm³. Brain tissue volume, normalized for subject head size, was estimated with SIENAX [24,25], part of FSL [26]. SIENAX starts by extracting brain and skull images from the single whole-head input data [27]. The brain image is then affine-registered to MNI152 space (using the skull image to determine the registration scaling) [28,29]. This is primarily in order to obtain the volumetric scaling factor, to be used as normalization for head size. Next, tissue-type segmentation with partial volume estimation is carried out in order to calculate total volume of brain tissue [30].

Statistical Analysis

The study was a prospective observational study with a primary endpoint defined by a regression approach with BPF as target and RNFLT and age as independent variables, allowing for the history of ON. The necessary sample size was calculated using assumptions from the study of Gordon-Lipkin [19]. For this calculation the reported, less pronounced R² values from the whole MS group were used, since the RRMS subgroup’s sample size was small and therefore of limited validity. Since no sample size calculation is available for that approach in Generalized Estimating Equations (GEE’s) so far, the sample size calculation was based on linear multiple regression using the random model that supposes both target and predictor variables as random and should thus deliver a feasible estimation of the sample size required for GEE. A squared multiple correlation R² of 0.21 for RNFLT plus age on BPF (Gordon-Lipkin *et al.*, 2007) would be detected with 95% power (alpha=0.05, two-sided, k=3 predictors) for n=86 patients using the random model with an exact distribution. Considering a drop-out rate of 20% the final required sample size was estimated to n=103 patients. Sample size was calculated using G*Power 3.1.2 (University of Duesseldorf, Germany) [31].

Normal distribution of outcome parameters BPF, RNFLT and TMV (the latter two considering an influence of history of ON) was tested using Shapiro-Wilk’s test. For BPF, RNFLT and TMV the assumption of normality was not rejected.

The evaluation of the primary endpoint was accomplished by a GEE analysis with BPF as target variable and RNFLT and age as independent variables, taking into account the history of ON. Data of both eyes were included as repeated measures in order to account for inter-eye correlations. The working correlation matrix was defined as exchangeable (compound symmetry), i.e. the two eye-measurements were supposed equally correlated and independent from the sequence.

To address the diagnostic comparability of RNFLT or TMV with BPF in a second step, GEE analyses were performed with average RNFLT or TMV as independent variables and BPF as dependent variable while allowing for the history of ON, including again the data of both eyes as repeated measures and with an exchangeable corresponding working correlation matrix.

The influence of age, disease duration and disease severity (as expressed by EDSS) on BPF, RNFLT or TMV was analyzed in a third step: GEE analyses were performed with age, disease duration and EDSS (while allowing for the history of ON) as independent variables and with either BPF, RNFLT or TMV as dependent variable, using the same GEE-model specifications as before.

Since GEE in PASW 18 does not provide an output for standardized effect sizes or regression coefficients, we actualized this issue in the following way: age, disease duration, EDSS, RNFLT, TMV and BPF were transformed to standardized values and each GEE was performed with these z-values instead of the original values, thus achieving a better comparability with other data and understanding the effect sizes and associations.

To be able to compare our data to results reported by Gordon-Lipkin [19] the thinner RNFLT and TMV from each patient's eyes were selected ("minimum RNFLT" and "minimum TMV") and used in partial correlations between BPF, minimum RNFLT and minimum TMV controlling for age. Since partial correlations do not account for inter-eye correlations, results from these tests should be interpreted carefully and used only in the context of comparability to the mentioned paper.

Significance in all tests was achieved with $p < 0.05$. Beside the primary endpoint, all statistical evaluations should be understood as constituting exploratory data analysis, such that no adjustments for multiple testing have been made.

Statistical analysis was performed using PASW 18 (SPSS/IBM, Chicago, IL, USA).

Results

Cohort demographics

Our cohort included 104 patients (208 eyes) with RRMS. All patients underwent clinical evaluation, OCT examination and brain MRI. All patients with a complete data set were included in the subsequent analysis. 62 (60%) patients never had ON on either eye, whereas 29 patients (28%) had a history of unilateral and 13 patients (12%) of bilateral ON. Mean BPF, normalized for subject head size was 0.852 (SD 0.033), mean RNFLT was 95.2 μm (SD 14.2 μm) and average TMV was 6.769 mm^3 (SD 0.489 mm^3). Disease duration in this study was defined as time from establishment of MS diagnosis to enrolment in the trial. Patients' demographics and statistics are summarized in Table 1.

Association of OCT parameters with brain atrophy

The primary endpoint of our study was defined as the association between BPF and RNFLT, using BPF as target and RNFLT and age as independent variables and taking into account the history of ON, which corresponds to the study by Gordon-Lipkin [19]. In our study, the association was evaluated by GEE analysis accounting for within-patient inter-eye dependencies. In

Table 1. Description of study cohort with demographic and disease parameters.

RRMS-Patients	n	104
Eyes	n	208
Gender	Male	35 (34%)
	Female	69 (66%)
Age	Mean (SD)	39.7 (8.8)
	Range	20–59
Disease Duration [Months]	Mean (SD)	68.2 (58.6)
	Range	3–269
EDSS	Median	2.0
	Range	0.0–6.0
History of ON	NON/NON	62 (60%)
	NON/ON	29 (28%)
	ON/ON	13 (12%)
BPF	Mean (SD)	0.852 (0.032)
	Range	0.77–0.922
Average RNFLT [μm]	Mean (SD)	95.2 (14.2)
	Range	46–133
TMV [mm^3]	Mean (SD)	6.769 (0.489)
	Range	5.455–7.674

RRMS = relapsing remitting Multiple sclerosis; (N)ON = (non) optic neuritis; SD = standard deviation, BPF = brain parenchymal fraction, RNFLT = retinal nerve fiber layer thickness, TMV = total macular volume.
doi:10.1371/journal.pone.0018132.t001

our cohort, BPF was predicted by patients' age and RNFLT, however the standardized coefficient for the association between RNFLT and BPF was extremely low (table 2).

Next, we analyzed the associations between RNFLT or TMV and BPF by a GEE model, which only factors the history of ON and thus reflects better the diagnostic situation. GEE with BPF as target and RNFLT as independent variable and accounting for the history of ON showed a stronger though still weak association for RNFLT (table 3 and figure 1a). Interestingly, TMV was also associated with BPF when using the same model with TMV as independent variable (table 3 and figure 1b).

With respect to the comparability of our data to results reported by Gordon-Lipkin [19], we additionally performed partial correlation analyses controlling for age and using minimum RNFLT or minimum TMV and BPF as variables. In line with the

Table 2. Generalized Estimating Equations for the association of RNFLT with BPF as primary endpoint.

	Beta	stand. Beta	CI95% Low	CI95% High	p
BPF ON					0.617
age	-0.002	-0.457	-0.611	-0.303	<0.001
RNFLT	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.001	0.021

Results from GEEs with RNFLT and age as independent variables and controlling for history of optic neuritis and BPF as dependent variable. The standardized Beta was calculated as described in the methods section. RNFLT = retinal nerve fiber layer thickness, ON = history of optic neuritis, CI = confidence interval.
doi:10.1371/journal.pone.0018132.t002

Table 3. Generalized Estimating Equations for the association of RNFLT or TMV with BPF.

	GEE controlled for ON			Partial Correlation controlled for age	
	Beta	stand. Beta	p	R	p
RNFLT	<0.0001	0.0001	0.019	0.269	0.006
TMV	<0.0001	0.0002	0.004	0.369	<0.001

Results from GEEs with RNFLT or TMV as independent values and controlling for history of optic neuritis and BPF as dependent variable are given in columns 2–4. The standardized Beta was calculated as described in the methods section. Additionally, partial correlation coefficients controlling for age are displayed in the last two columns to allow comparability to previous results [19]. P-values are given in parentheses. RNFLT = retinal nerve fiber layer thickness, TMV = total macular volume, ON = history of optic neuritis, GEE = Generalized Estimating Equations.

doi:10.1371/journal.pone.0018132.t003

GEE analyses, we found a significant but moderate correlation between RNFLT and BPF and between TMV and BPF (table 3).

Influence of age, disease duration and severity

Having demonstrated that on the one hand both RNFLT and TMV associate with brain atrophy and on the other hand, in the same cohort age is strongly predictive for BPF, we asked whether the three parameters RNFLT, TMV and BPF are linked to distinct aspects of the disease such as age, disease duration and disease severity as determined by EDSS. Therefore, we performed GEE modeling with BPF, RNFLT or TMV as dependent variables and age, disease duration and EDSS as independent variables and correcting for history of ON. Data are presented in table 4. In summary, the analyses confirmed that BPF is substantially determined by both the patients’ age (p<0.001) and

EDSS (p<0.001). Notably, in our cohort BPF was not linked to disease duration. For RNFLT our data confirmed the impact of a previous ON as the history of ON was associated with a lower RNFLT (p<0.001). Importantly, the only other parameter that showed a significant impact on RNFLT was disease duration (p<0.001). Neither age nor EDSS were linked to RNFLT. For TMV the only determining parameter was ON history (p<0.001). TMV was neither linked to the duration or severity of the disease nor to the patients’ age.

Discussion

Investigating the associations between OCT parameters and BPF as an established MRI measure for neurodegeneration in a cross-sectional prospective study on 104 RRMS patients we here report an association between global brain atrophy and both thinning of the RNFL and reduction of macular volume. In line with previous studies, reduction of both average RNFLT and TMV was linked to the history of ON. Importantly, apart from the impact of ON, RNFL thinning correlated closely with disease duration whereas BPF was determined by age and disease severity. TMV associated neither with disease duration, disease severity nor age.

The strengths of our study are the large sample size, the prospective design, the homogeneity of our study cohort including exclusively RRMS patients on a stable immunomodulatory treatment, the evaluation of the influence of disease duration, disease severity and age on RNFLT, TMV or BPF in the same population, and a statistical approach taking within-patient inter-eye relations into account. On the other hand, with respect to our cohort characteristics which reflect patients with relatively short disease duration and mild to moderate disability, our results should not be uncritically transferred to MS populations with different characteristics.

Although OCT receives increasing attention as future tool for the detection and monitoring of neurodegenerative processes in MS the evaluation of the actual value of this technique remains difficult.

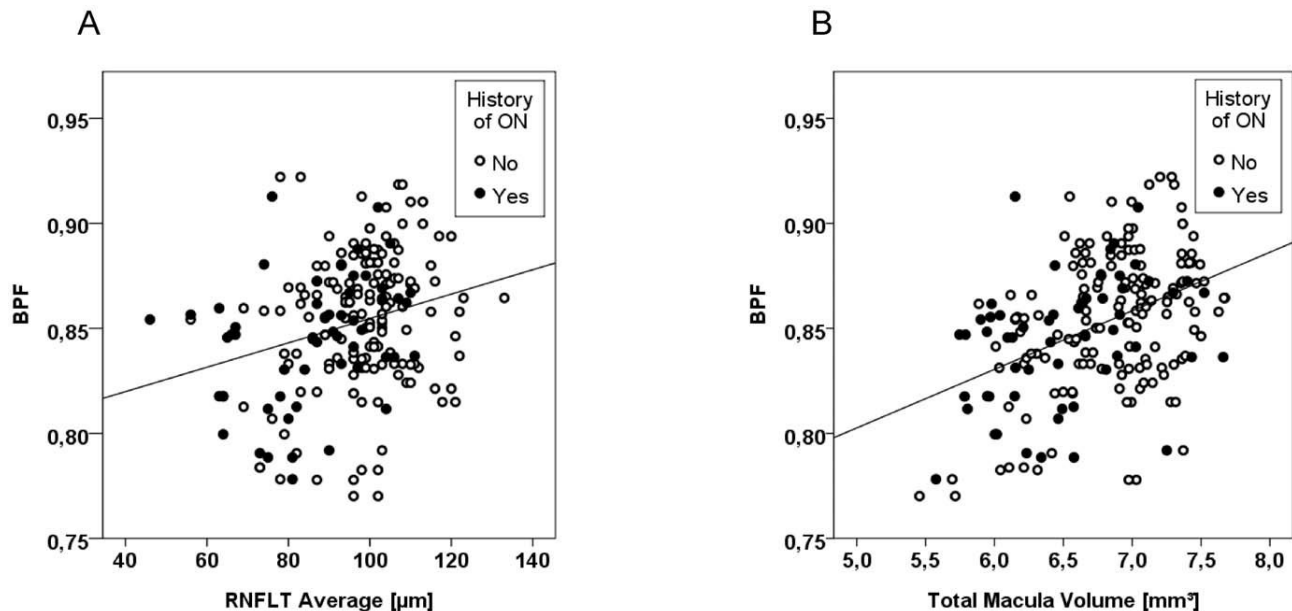


Figure 1. Association between BPF and OCT parameters in patients with RRMS. Patients (individual eyes) are labeled according to the history of optic neuritis (ON). Lines are derived from linear regression analyses with R² given in parentheses. Statistical significance level was calculated by Generalized Estimating Equation models controlling for the history of ON. A) Retinal nerve fiber layer thickness (RNFLT) vs. BPF (0.073, p = 0.019). B) Total macular volume (TMV) vs. BPF (0.113, p = 0.001). doi:10.1371/journal.pone.0018132.g001

Table 4. Correlation between age, disease duration and severity with BPF, RNFLT and TMV.

		Beta	stand. Beta	CI95% Low	CI95% High	p
BPF	age	-0.001	-0.334	-0.499	-0.168	<0.001
	duration					0.098
	EDSS	-0.005	-0.223	-0.390	-0.057	<0.001
	ON					0.067
RNFLT	age					0.585
	duration	-0.073	-0.299	-0.471	-0.128	<0.001
	EDSS					0.201
	ON	-9.597	-0.675	-0.906	-0.444	<0.001
TMV	age					0.230
	duration					0.088
	EDSS					0.240
	ON	-0.300	-0.614	-0.818	-0.410	<0.001

Beta coefficients, standardized Beta coefficients, confidence interval for standardized beta coefficients and p values are provided as calculated by Generalized Estimating Equations accounting for inter-eye dependencies with age, duration, EDSS and history of optic neuritis as independent variables and RNFLT, TMV or BPF as dependent variables. For better clarity, coefficients are only given for factors that reached statistical significance. Standardized Beta was calculated as described in the Methods section. BPF = brain parenchymal fraction, RNFLT = retinal nerve fiber layer thickness, TMV = total macular volume, ON = history of optic neuritis, CI = confidence interval.
doi:10.1371/journal.pone.0018132.t004

This is mainly, because on the one hand, the interrelations between neurodegenerative processes in the retina and the brain are still under investigation and on the other hand, the impact of disease-related aspects such as duration and severity and disease-unrelated parameters such as age on OCT parameters is not yet clear [5,15]. The only published two previous studies addressing the correlation of OCT parameters with BPF included only a limited number of patients (between 18 and 40) or inhomogeneous disease courses and did not account for within-patient inter-eye relations [19,20]. In the present cohort we used a statistical model which allows adjusting for within-patient inter-eye relations and corrected for the history of ON, which we consider an appropriate approach in a population with different ON status. Our primary endpoint reflects the statistical model used by Gordon-Lipkin and was primarily defined for the estimation of the sample size. However, for the evaluation of associations between BPF and RNFLT or TMV we favor our second GEE model which does not account for disease duration, disease severity or age and thus represents a rather diagnostic than pathophysiological point of view. Since GEE does not provide standardized output for correlation coefficients we additionally calculated a “standardized Beta” in order to provide a better conception of the effect sizes. Using this model, the association between BPF and RNFLT was significant but weak (table 3, figure 1a). Interestingly, when applying the same statistical approach as Gordon-Lipkin et al., which however does not account for inter-eye dependencies, we also found an association between minimum RNFLT and BPF but with a moderate partial correlation coefficient (table 3), which is in line with Gordon-Lipkin [19]. In contrast to Siger et al. who found an association of RNFLT and BPF only in a cohort subgroup without ON [20], in our study the correlation was evident in the total cohort.

With respect to TMV our data (according to both GEE and partial correlation analyses; table 3) contrast Gordon-Lipkin et al., who did not find a correlation between TMV and BPF and

suggested that “in a cohort of patients with MS with a mean duration of disease of approximately 10 years, TMV may be less informative than in a cohort with a longer history of MS” [19]. Our data rather indicate, that TMV in fact reflects global brain atrophy already after a mean disease duration of approximately five years and even in patients with a predominantly mild clinical disability (table 1) and suggest that damage to retinal ganglion cells occurs already in earlier phases of the disease. That in turn would be in line with grey matter damage detected early in the disease course by MRI or histopathology [32,33,34]. The differences in our data compared to previous data [19,20] may be at least partially explained by the larger sample size in our study and the different cohort characteristics. The different effect sizes estimated by GEE and partial correlations might indicate, that at least in a cohort with a comparably short disease duration and mild disability, partial correlation analysis with minimum RNFLT/TMV not factoring inter-eye dependencies, might overestimate the strength of associations. It remains to be seen whether in a currently running longitudinal study factoring the changes within the parameters over time the standardized beta will conform to the partial r.

Numerous studies have addressed the relations between RNFLT, TMV or BPF with disease duration, disease severity, ON history and age in individual cohorts with different characteristics (summarized and meta-analyzed in two recent major review articles [5,15]). However, data are still inconsistent. For example, a correlation between disease duration and thinning of RNFL has been reported in some studies [11,16,20,35] whereas others did not find a correlation [17,18]. Consequently, the ability of each marker RNFLT, TMV and BPF, respectively, to capture distinct aspects of the disease remains unclear. Evaluating the impact of disease duration, severity and age on each of the MRI and OCT parameters within the same cohort by GEE and correcting for the ON history, we here demonstrate that BPF might be a good parameter for the evaluation of the disease severity as, in line with previous reports [8], it associated best with the EDSS. On the other hand, our observations that in the same experimental setting RNFLT but not BPF were linked to the disease duration and that furthermore BPF but not RNFLT was substantially confounded by the patients’ age, which is in line with previous reports [19], suggest that RNFLT is the better parameter for duration-related issues such as longitudinal monitoring in clinical trials. The relevance of TMV remains elusive, as TMV was not associated with any of the parameters. TMV captures not only the retinal nerve fiber layer, but also deeper layers of the retina, which in particular in combination with the use of time-domain OCT might render TMV a less specific parameter for neuroaxonal degeneration. Furthermore, as the sample size calculation was based on RNFLT this study was not powered to primarily investigate the role of TMV. Not surprisingly, our data moreover confirmed the impact of ON on RNFLT and TMV demonstrated in previous studies [12,15].

In summary, our cross-sectional data on the association between both RNFLT and TMV with BPF point to a significant but weak association which was at least in our cohort independent of a previous ON. RNFLT and BPF but not TMV are linked to certain aspects of MS. Whereas BPF reflects in the first place the severity of the disease, RNFLT might be the better parameter for monitoring axonal damage longitudinally. Thus we conclude that in addition to BPF at least RNFLT is a promising complementary parameter to evaluate early neurodegenerative processes in RRMS patients. The eligibility of TMV as surrogate marker requires further evaluation. Longitudinal studies and studies on patients with a longer disease duration and higher disability are necessary to corroborate the relevance of these parameters and to clarify the remaining questions. We therefore suggest that both

RNFLT and TMV should be included as standard secondary endpoints in clinical trials addressing neurodegeneration in MS.

Acknowledgments

We thank our study nurses Cordula Rudolph, Franziska Lipske, Katharina Stoesslein, and Antje Els for excellent support and Susan Pikol for excellent technical assistance.

References

- De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, et al. (1998) Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121(Pt 8): 1469–1477.
- De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, et al. (2001) Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 58: 65–70.
- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R (1999) Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12: 295–302.
- Rudick RA, Fisher E, Lee JC, Simon J, Jacobs L (1999) Use of the brain parenchymal fraction to measure whole brain atrophy in relapsing-remitting MS. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology* 53: 1698–1704.
- Barkhof F, Calabresi PA, Miller DH, Reingold SC (2009) Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. *Nat Rev Neurol* 5: 256–266.
- Chard DT, Griffin CM, Parker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, et al. (2002) Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 125: 327–337.
- Kalkers NF, Bergers E, Castelijns JA, van Walderveen MA, Bot JC, et al. (2001) Optimizing the association between disability and biological markers in MS. *Neurology* 57: 1253–1258.
- Fisher E, Rudick RA, Simon JH, Cutter G, Baier M, et al. (2002) Eight-year follow-up study of brain atrophy in patients with MS. *Neurology* 59: 1412–1420.
- Hee MR, Izatt JA, Swanson EA, Huang D, Schuman JS, et al. (1995) Optical coherence tomography of the human retina. *Arch Ophthalmol* 113: 325–332.
- Frohman E, Costello F, Zivadinov R, Stuve O, Conger A, et al. (2006) Optical coherence tomography in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 5: 853–863.
- Fisher JB, Jacobs DA, Markowitz CE, Galetta SL, Volpe NJ, et al. (2006) Relation of visual function to retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ophthalmology* 113: 324–332.
- Bock M, Brandt AU, Dorr J, Kraft H, Weinges-Evers N, et al. (2010) Patterns of retinal nerve fiber layer loss in multiple sclerosis patients with or without optic neuritis and glaucoma patients. *Clin Neurol Neurosurg*.
- Burkholder BM, Osborne B, Loguidice MJ, Bisker E, Frohman TC, et al. (2009) Macular volume determined by optical coherence tomography as a measure of neuronal loss in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66: 1366–1372.
- Sergott RC, Frohman E, Glanzman R, Al Sabbagh A (2007) The role of optical coherence tomography in multiple sclerosis: expert panel consensus. *J Neurol Sci* 263: 3–14.
- Petzold A, de Boer JF, Schippling S, Vermersch P, Kardon R, et al. (2010) Optical coherence tomography in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* 9: 921–932.
- Pucyo V, Martin J, Fernandez J, Almarcegui C, Ara J, et al. (2008) Axonal loss in the retinal nerve fiber layer in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 14: 609–614.
- Henderson AP, Trip SA, Schlottmann PG, Altmann DR, Garway-Heath DF, et al. (2008) An investigation of the retinal nerve fibre layer in progressive multiple sclerosis using optical coherence tomography. *Brain* 131: 277–287.
- Klistorner A, Arvind H, Nguyen T, Garrick R, Paine M, et al. (2008) Axonal loss and myelin in early ON loss in postacute optic neuritis. *Ann Neurol* 64: 325–331.
- Gordon-Lipkin E, Chodkowski B, Reich DS, Smith SA, Pulicken M, et al. (2007) Retinal nerve fiber layer is associated with brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* 69: 1603–1609.
- Siger M, Dziegielewska K, Jasek L, Bieniek M, Nicpan A, et al. (2008) Optical coherence tomography in multiple sclerosis: thickness of the retinal nerve fiber layer as a potential measure of axonal loss and brain atrophy. *J Neurol* 255: 1555–1560.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, et al. (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol* 58: 840–846.
- Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444–1452.
- Cheung CY, Leung CK, Lin D, Pang CP, Lam DS (2008) Relationship between retinal nerve fiber layer measurement and signal strength in optical coherence tomography. *Ophthalmology* 115: 1347–1351, 1351 e1341–1342.
- Smith SM (2002) Fast robust automated brain extraction. *Hum Brain Mapp* 17: 143–155.
- Smith SM, De Stefano N, Jenkinson M, Matthews PM (2001) Normalized accurate measurement of longitudinal brain change. *J Comput Assist Tomogr* 25: 466–475.
- Smith SM, Jenkinson M, Woolrich MW, Beckmann CF, Behrens TE, et al. (2004) Advances in functional and structural MR image analysis and implementation as FSL. *Neuroimage* 23 Suppl 1: S208–219.
- Smith SM, Zhang Y, Jenkinson M, Chen J, Matthews PM, et al. (2002) Accurate, robust, and automated longitudinal and cross-sectional brain change analysis. *Neuroimage* 17: 479–489.
- Jenkinson M, Bannister P, Brady M, Smith S (2002) Improved optimization for the robust and accurate linear registration and motion correction of brain images. *Neuroimage* 17: 825–841.
- Jenkinson M, Smith S (2001) A global optimisation method for robust affine registration of brain images. *Med Image Anal* 5: 143–156.
- Zhang Y, Brady M, Smith S (2001) Segmentation of brain MR images through a hidden Markov random field model and the expectation-maximization algorithm. *IEEE Trans Med Imaging* 20: 45–57.
- Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG (2009) Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 41: 1149–1160.
- De Stefano N, Matthews PM, Filippi M, Agosta F, De Luca M, et al. (2003) Evidence of early cortical atrophy in MS: relevance to white matter changes and disability. *Neurology* 60: 1157–1162.
- Audoin B, Davies G, Rashid W, Fisniku L, Thompson AJ, et al. (2007) Voxel-based analysis of grey matter magnetization transfer ratio maps in early relapsing remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 13: 483–489.
- Schirmer L, Albert M, Buss A, Schulz-Schaeffer WJ, Antel JP, et al. (2009) Substantial early, but nonprogressive neuronal loss in multiple sclerosis (MS) spinal cord. *Ann Neurol* 66: 698–704.
- Talman LS, Bisker ER, Sackel DJ, Long DA, Jr., Galetta KM, et al. (2010) Longitudinal study of vision and retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67: 749–760.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FP AUB JTW. Performed the experiments: JD MB GG CFP JBS. Analyzed the data: KDW AUB JD AF. Contributed reagents/materials/analysis tools: KDW JTW AF. Wrote the paper: JD AUB. Revised article for important intellectual content: JD KDW MB GG JTW CFP JBS AF AUB FP.

Tim Sinnecker, Timm Oberwahrenbrock, Imke Metz, Hanna Zimmermann & Caspar F. Pfueller, Lutz Harms, Klemens Ruprecht, Caren Ramien, Katrin Hahn & Wolfgang Brück, Thoralf Niendorf, Friedemann Paul, Alexander U. Brandt & Jan Dörr, Jens Wuerfel

Optic radiation damage in multiple sclerosis is associated with visual dysfunction and retinal thinning – an ultrahigh-field MR pilot study

Eur Radiol (2015) 25:122–131

DOI [10.1007/s00330-014-3358-8](https://doi.org/10.1007/s00330-014-3358-8)

Eur Radiol (2015) 25:122–131

Tim Sinnecker, Paul Mittelstaedt, Jan Dörr, Caspar F. Pfueller, Lutz Harms,
Thoralf Niendorf, Friedemann Paul, Jens Wuerfel

Multiple Sclerosis Lesions and Irreversible
Brain Tissue Damage
A Comparative Ultrahigh-Field Strength Magnetic Resonance Imaging Study

Arch Neurol. 2012;69(6):739-745. Published online February 20, 2012.

doi:10.1001/archneurol.2011.2450

Arch Neurol. 2012;69(6):739-745.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Caspar Pfüller - Komplette Publikationsliste

Gaede G, Tiede M, Lorenz I, Brandt AU, **Pfueller C**, Dörr J et al.
Safety and preliminary efficacy of deep transcranial magnetic stimulation in MS-related fatigue.

Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2017 Dec 13;5(1):e423. doi: 10.1212/NXI.0000000000000423. eCollection 2018 Jan.

Schmitz-Hübsch T, Brandt AU, **Pfueller C**, Zange L, Seidel A, Kühn AA et al.
Accuracy and repeatability of two methods of gait analysis - GaitRite™ und Mobility Lab™ - in subjects with cerebellar ataxia.

Gait Posture. 2016 Jul;48:194-201. doi: 10.1016/j.gaitpost.2016.05.014. Epub 2016 May 25.

Brandt AU, Meinert-Bohn E, Rinnenthal JL, Zimmermann H, Mikolajczak J, Oberwahrenbrock T, Papazoglou S, **Pfüller CF** et al.
Afferent Visual Pathway Affection in Patients with PMP22 Deletion-Related Hereditary Neuropathy with Liability to Pressure Palsies.

PLoS One. 2016 Oct 17;11(10):e0164617. doi: 10.1371/journal.pone.0164617. eCollection 2016.

Sinnecker T, Oberwahrenbrock T, Metz I, Zimmermann H, **Pfueller CF**, Harms L, et al.
Optic radiation damage in multiple sclerosis is associated with visual dysfunction and retinal thinning--an ultrahigh-field MR pilot study. Eur Radiol. January 2015;25(1):122–31.

Finke C, Schlichting J, Papazoglou S, Scheel M, Freing A, Soemmer C, Pech L, Pajkert A, **Pfüller C**, Wuerfel J, Ploner C, Paul F, Brandt A. Altered basal ganglia functional connectivity in multiple sclerosis patients with fatigue. Mult Scler. 12 November 2014;

Leuenberger T*, **Pfueller CF***, Luessi F, Bendix I, Paterka M, Prozorovski T, et al.
Modulation of dendritic cell immunobiology via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase. PLoS ONE. 2014;9(7):e100871.

*geteilte Erstautorenschaft

Gaede G, Hellweg R, Zimmermann H, Brandt AU, Dörr J, Bellmann-Strobl J, Zangen A, Paul F, **Pfueller CF**. Effects of deep repetitive transcranial magnetic stimulation on brain-derived neurotrophic factor serum concentration in healthy volunteers. Neuropsychobiology. 2014;69(2):112–9.

Behrens J, **Pfüller C**, Mansow-Model S, Otte K, Paul F, Brandt AU. Using perceptive computing in multiple sclerosis - the Short Maximum Speed Walk test. J Neuroeng Rehabil. 2014;11:89.

Sinnecker T, Bozin I, Dörr J, **Pfueller CF**, Harms L, Niendorf T, et al. Periventricular venous density in multiple sclerosis is inversely associated with T2 lesion count: a 7 Tesla MRI study. Mult Scler. March 2013;19(3):316–25.

Hackmack K, Weygandt M, Wuerfel J, **Pfueller CF**, Bellmann-Strobl J, Paul F, et al. Can we overcome the „clinico-radiological paradox“ in multiple sclerosis? J Neurol. October 2012;259(10):2151–60.

Sinnecker T, Dörr J, **Pfueller CF**, Harms L, Ruprecht K, Jarius S, et al. Distinct lesion morphology at 7-T MRI differentiates neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Neurology*. 14. August 2012;79(7):708–14.

Sinnecker T, Mittelstaedt P, Dörr J, **Pfueller CF**, Harms L, Niendorf T, et al. Multiple sclerosis lesions and irreversible brain tissue damage: a comparative ultrahigh-field strength magnetic resonance imaging study. *Arch Neurol*. June 2012;69(6):739–45.

Streitberger K-J, Sack I, Krefting D, **Pfüller C**, Braun J, Paul F, et al. Brain viscoelasticity alteration in chronic-progressive multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2012;7(1):e29888.

Riek K, Millward JM, Hamann I, Mueller S, **Pfueller CF**, Paul F, et al. Magnetic resonance elastography reveals altered brain viscoelasticity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroimage Clin*. 2012;1(1):81–90.

Borisow N, Döring A, **Pfueller CF**, Paul F, Dörr J, Hellwig K. Expert recommendations to personalization of medical approaches in treatment of multiple sclerosis: an overview of family planning and pregnancy. *EPMA J*. 2012;3(1):9.

Doepf F, Würfel JT, **Pfueller CF**, Valdueza JM, Petersen D, Paul F, et al. Venous drainage in multiple sclerosis: a combined MRI and ultrasound study. *Neurology*. November 8 2011;77(19):1745–51.

Veauthier C, Radbruch H, Gaede G, **Pfueller C**, Dörr J, Bellmann-Strobl J, et al. Fatigue in multiple sclerosis is closely related to sleep disorders: a polysomnographic cross-sectional study. *Mult Scler*. May 2011;17(5):613–22.

Bock M, Brandt AU, Kuchenbecker J, Dörr J, **Pfueller CF**, Weinges-Evers N, et al. Impairment of contrast visual acuity as a functional correlate of retinal nerve fiber layer thinning and total macular volume reduction in multiple sclerosis. *Br J Ophthalmol* [Internet].

Weygandt M, Hackmack K, **Pfüller C**, Bellmann-Strobl J, Paul F, Zipp F, et al. MRI pattern recognition in multiple sclerosis normal-appearing brain areas. *PLoS ONE*. 2011;6(6):e21138.

Pfueller CF, Paul F. Imaging the visual pathway in neuromyelitis optica. *Mult Scler Int*. 2011;2011:869814.

Pfueller CF, Brandt AU, Schubert F, Bock M, Walaszek B, Waiczies H, et al. Metabolic changes in the visual cortex are linked to retinal nerve fiber layer thinning in multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18019.

*geteilte Erstautorenschaft

Dörr J, Wernecke KD, Bock M, Gaede G, Wuerfel JT, **Pfueller CF**, et al. Association of retinal and macular damage with brain atrophy in multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e18132.

Döring A, **Pfueller CF**, Paul F, Dörr J. Exercise in multiple sclerosis -- an integral component of disease management. *EPMA J*. 2011;3(1):2.

Bock M, Brandt AU, Dörr J, Kraft H, Weinges-Evers N, Gaede G, **Pfueller CF**, Herges K, Radbruch H, Ohlraun S, Bellmann-Strobl J, Kuchenbecker J, Zipp F, Paul F. Patterns of

retinal nerve fiber layer loss in multiple sclerosis patients with or without optic neuritis and glaucoma patients. *Clin Neurol Neurosurg.* October 2010;112(8):647–52.

Weinges-Evers N, Brandt AU, Bock M, **Pfueller CF**, Dörr J, Bellmann-Strobl J, et al. Correlation of self-assessed fatigue and alertness in multiple sclerosis. *Mult Scler.* September 2010;16(9):1134–40.

Bock M, Brandt AU, Dörr J, **Pfueller CF**, Ohlraun S, Zipp F, et al. Time domain and spectral domain optical coherence tomography in multiple sclerosis: a comparative cross-sectional study. *Mult Scler.* July 2010;16(7):893–6.

Bendix I*, **Pfueller CF***, Leuenberger T, Glezeva N, Siffrin V, Müller Y, et al. MAPK3 deficiency drives autoimmunity via DC arming. *Eur J Immunol.* May 2010;40(5):1486–95.
*geteilte Erstautorenschaft

Urbanek C, Weinges-Evers N, Bellmann-Strobl J, Bock M, Dörr J, Hahn E, Neuhaus AH, Opgen-Rhein C, Ta TM, Herges K, **Pfueller CF**, Radbruch H, Wernecke KD, Ohlraun S, Zipp F, Dettling M, Paul F. Attention Network Test reveals alerting network dysfunction in multiple sclerosis. *Mult Scler.* January 2010;16(1):93–9.

Dörr J, Radbruch H, Bock M, Wuerfel J, Brüggemann A, Wandinger KP, Zeise D, **Pfueller CF**, Zipp F, Paul F. Encephalopathy, visual disturbance and hearing loss-recognizing the symptoms of Susac syndrome. *Nat Rev Neurol.* December 2009;5(12):683–8.

Pfueller CF, Seipelt E, Zipp F, Paul F. Multiple sclerosis following etanercept treatment for ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol.* October 2008;37(5):397–9.

Paul F, **Pfueller CF**, Wuerfel JT, Egerer K, Tanczos B, Baumgart DC, et al. Celiac antibodies in the diagnostic workup of white matter lesions. *Neurology.* 15. July 2008;71(3):223–5.

Waiczies S, Bendix I, Prozorovski T, Ratner M, Nazarenko I, **Pfueller CF**, et al. Geranylgeranylation but not GTP loading determines rho migratory function in T cells. *J Immunol.* 1. November 2007;179(9):6024–32.

Nogai A, Siffrin V, Bonhagen K, **Pfueller CF**, Hohnstein T, Volkmer-Engert R, et al. Lipopolysaccharide injection induces relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis in nontransgenic mice via bystander activation of autoreactive CD4+ cells. *J Immunol.* 15. July 2005;175(2):959–66.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung der Dissertation unterstützt haben – vor allem bei den engsten Kollegen der Arbeitsgruppe Klinische Neuroimmunologie des NCRC.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Dr. Alexander U. Brandt und meinen Betreuer Prof. Dr. med. Friedemann Paul, mit denen die Zusammenarbeit viel Spaß gemacht hat und intensiv und motivierend war.

Vielen Dank auch den freiwilligen Patienten und Probanden, ohne die diese Art von Forschung nicht denkbar wäre.

Nicht zuletzt möchte ich auch bei meiner lieben Familie für den Zuspruch und Ansporn danken.