

Medizinische Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin  
aus der Medizinischen Klinik I (Gastroenterologie, Infektiologie u.  
Rheumatologie)  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Zeitz

**BESTIMMUNG UND DIAGNOSTISCHER STELLENWERT VON  
HYALURONSÄURE, PROKOLLAGEN-III-N-PEPTID UND  
KOLLAGEN-VI IN DER BRONCHOALVEOLÄREN  
LAVAGEFLÜSSIGKEIT BEI INTERSTITIELLEN  
LUNGENERKRANKUNGEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der  
medizinischen Doktorwürde  
Charité- Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Katja Maria Orzechowski, geb. Zewen  
aus Quierschied

Referent: Prof. Dr. med. Rajan Somasundaram

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Karsten Schulze

Gedruckt mit Genehmigung der Charité- Universitätsmedizin

Berlin

Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 09.10.2008

Meiner Familie gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1 Einleitung und Fragestellung</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1. Einteilung und Epidemiologie der interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) | 3         |
| 1.2. Klinik und Diagnostik der ILD   | 4         |
| 1.3. Therapie der ILD  | 6         |
| 1.4. Pathomechanismen der Lungenfibrose  | 7         |
| 1.5. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Lunge                      | 8         |
| 1.5.1. Kollagen Typ III  | 9         |
| 1.5.2. Kollagen Typ IV   | 10        |
| 1.5.3. Kollagen Typ VI   | 10        |
| 1.5.4. Hyaluronsäure   | 11        |
| 1.6. Fragestellung   | 12        |
| <b>2. Material und Methoden</b>  | <b>13</b> |
| 2.1. Reagenzien  | 13        |
| 2.2. Materialien und Geräte  | 15        |
| 2.3. Zusammensetzung des Patientenkollektivs                                   | 15        |
| 2.4. Gewinnung des Untersuchungsmaterials                                      | 16        |
| 2.5. Lagerung und Aufarbeitung der BALF  | 17        |
| 2.6. Etablierung und Evaluierung alternativer Methoden der BALF-Konzentrierung | 17        |
| 2.6.1. Konzentrierung durch Ultrafiltration (Membranfiltration)                | 17        |
| 2.6.2. Konzentrierung durch Proteinfällung mit Trichloressigsäure              | 18        |
| 2.6.3. Konzentrierung durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)                  | 18        |
| 2.7. Prinzipien und Durchführung der Immunoassays                              | 19        |
| 2.7.1. Immunoassay für Hyaluronsäure   | 19        |
| 2.7.2. Immunoassay für PIINP   | 19        |
| 2.7.3. Immunoassay für Kollagen Typ VI   | 20        |
| 2.8. Statistische Methoden und verwendete Programme                            | 21        |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>22</b> |
| 3.1. Klinische Basisdaten und BALF-Daten                                       | 22        |
| 3.2. Etablierung eines Alternativprotokolls der BALF-Konzentrierung            | 23        |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 3.3.       | Korrelation der EZM-Faktoren mit Lebensalter und Rauchen        | 24        |
| 3.4.       | Interkorrelation der EZM-Faktoren                               | 24        |
| 3.5.       | BALF-Konzentration von Hyaluronsäure                            | 24        |
| 3.6.       | BALF-Konzentration von PIIINP                                   | 26        |
| 3.7.       | BALF-Konzentration von Kollagen-VI                              | 27        |
| 3.8.       | Quotient aus PIIINP und Kollagen-VI                             | 28        |
| 3.9.       | Diagnostische Trennschärfe                                      | 29        |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion</b>   | <b>33</b> |
| 4.1.       | Evaluierung alternativer Methoden der BALF-Konzentrierung       | 33        |
| 4.2.       | BALF-Konzentrationen von Hyaluronsäure bei ILD                  | 34        |
| 4.3.       | BALF-Konzentrationen von PIIINP bei ILD                         | 36        |
| 4.4.       | BALF-Konzentrationen von Kollagen-VI bei ILD                    | 39        |
| 4.5.       | BALF-Ratio PIIINP/K-VI bei ILD                                  | 40        |
| 4.6.       | Prognostische Relevanz von EZM-Faktoren in BALF                 | 41        |
| 4.7.       | EZM-Faktoren in BALF bei nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten | 41        |
| <b>5.</b>  | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>43</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>                                     | <b>45</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Lebenslauf</b>   | <b>53</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Veröffentlichungen</b>                                       | <b>54</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Danksagung</b>   | <b>55</b> |
| <b>10.</b> | <b>Erklärung</b>  | <b>56</b> |

---

## Verzeichnis der Abkürzungen

|        |  |
|--------|--|
| BAL    | bronchoalveoläre Lavage  |
| BALF   | BAL-Flüssigkeit  |
| BSA    | bovines Serumalbumin   |
| COPD   | chronisch-obstruktive Bronchitis (engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i> )       |
| Da     | Dalton   |
| DPLD   | engl. <i>diffuse parenchymal lung diseases</i>   |
| EMT    | epithelial-mesenchymale Transformation   |
| ELISA  | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>   |
| EZM    | extrazelluläre Matrix  |
| HA     | Hyaluronsäure (engl. <i>hyaluronic acid</i> )  |
| HRCT   | hochauflösende Computertomographie (engl. <i>high resolution computer tomography</i> , HRCT) |
| K-VI   | Kollagen-VI  |
| kDa    | kiloDalton   |
| HA     | Hyaluronsäure (engl. <i>hyaluronic acid</i> )  |
| IIP    | idiopathische interstitielle Pneumonie   |
| ILD    | interstitielle Lungenerkrankung (engl. <i>interstitial lung disease</i> )                    |
| ILF    | idiopathische Lungenfibrose  |
| i.m.   | intramuskulär  |
| IPF    | idiopathische pulmonale Fibrose  |
| LC     | Lymphangiosis carcinomatosa  |
| PIIINP | Prokollagen-III-N-Peptid   |
| PAH    | pulmonal-arterielle Hypertonie   |
| PBS    | Phosphat-gepufferte (physiologische) Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )    |

|       |   |
|-------|---|
| RIA   | Radioimmunoassay  |
| $r_s$ | Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman               |
| RT    | Raumtemperatur  |
| SD    | Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i> )   |
| Upm   | Umdrehungen pro min                                     |
| TCA   | Trichloressigsäure (engl. <i>trichloroacetic acid</i> ) |
| UIP   | engl. <i>usual interstitial pneumonia</i>               |

## 1. Einleitung

### 1.1 Einteilung und Epidemiologie der interstitiellen Lungenerkrankungen

Die interstitiellen Lungenerkrankungen (engl. *interstitial lung diseases*, ILD; syn. engl. *diffuse parenchymal lung diseases*, DPLD) bilden eine ätiologisch heterogene Gruppe von insgesamt etwa 100 pulmonalen Erkrankungen, die histopathologisch durch eine interstitielle Entzündung und durch fibrotische Veränderungen der Alveolarwand und des Interstitiums gekennzeichnet sind (Riede UN und Costabel U, 2004). Für die ILD existiert keine international einheitliche Klassifizierung, vielmehr gibt es verschiedene Einteilungen der ILD nach histologischen, klinischen oder ätiologischen Kriterien.

Nach ihrer Ätiologie werden die ILD zunächst eingeteilt in Erkrankungen mit bekannter, durch inhalative Noxen hervorgerufener Ätiologie sowie in ILD mit unbekannter Ätiologie (Endres P, Müller-Quernheim J, 1994; Eschenbruch CM, 1995). ILD mit bekannter Ätiologie sind zunächst die exogen-allergischen Alveolitiden (syn. Hyper-sensitivitäts-Pneumonitis). Zu diesen gehört die durch Inhalation von Schimmelpilzen bzw. Bakterien verursachte Farmerlunge (engl. *Farmer's lung*, syn. Drescherlunge) und die Befeuchterlunge, die durch Antigene im Vogelkot hervorgerufene Vogelzüchter-lunge sowie die Holzarbeiterlunge. Bedeutsame ILD mit bekannter Ätiologie sind weiterhin die durch Inhalation anorganischer Stäube (Silikate, Kohlenstaub) oder Fasern (Asbest) ausgelösten Pneumokoniosen. Weitere ILD mit bekannter Ätiologie sind ILD, die als Folge einer Behandlung mit bestimmten Arzneimitteln (z. B. Bleomycin, Amiodaron, Methotrexat) sowie nach Bestrahlungen des Thorax entstehen.

Die mit einer Systemkrankheit assoziierten ILD bilden eine klinisch-ätiologisch definierte Subgruppe der ILD. Zu diesen gehören die mit Kollagenosen assoziierten ILD, z. B. ILD bei progressiver systemischer Sklerose, rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus erythematodes oder Dermatomyositis, sowie ILD als Folge einer neoplastischen Grunderkrankung, z. B. die Lymphangiosis carcinomatosa (LC). Die häufigste Form der granulomatösen ILD stellt die Sarkoidose (Morbus Boeck) dar.

Entsprechend einer Einteilung nach histopathologischen, radiologischen und klinischen Kriterien werden nach einer Empfehlung der US-amerikanischen und europäischen Fachgesellschaften die idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP) als eigene Untergruppe der ILD/DLPD neben den ILD/DLPD mit bekannter Ätiologie, den granulomatösen ILD/DPLD und sonstigen Formen und abgegrenzt (American Thoracic



Society/ European Respiratory Society, 2002). Die IIP werden wiederum eingeteilt in die idiopathische pulmonale Fibrose (IPF) und andere IIP, welche wiederum in sechs Formen differenziert werden (Gross TJ, Hunninghake GW, 2001; American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002; King TE Jr, 2005). Für IPF wird im englischen Sprachraum auch die Abkürzung UIP (*usual interstitial pneumonia*) verwendet. Patienten mit einer IPF/UIP haben eine sehr ungünstige Prognose, die kürzlich mit einer 5-Jahres-Mortalität von 50-80% bzw. einer 3-Jahres-Mortalität von 50% angegeben wurde (King TE Jr, 2005; Bourke SJ, 2005).

Zuverlässige epidemiologische Daten zur Häufigkeit der ILD in Deutschland oder in anderen europäischen Ländern liegen nicht vor. Nach im Zeitraum von 1988 bis 1990 aus einem populationsbasierten Register im US-amerikanischen Bundesstaat New Mexico erhobenen Daten wurden die Prävalenzen der ILD angegeben mit 80,9 pro 100.000 Männer bzw. 67,2 pro 100.000 Frauen. Als Inzidenzen wurden 31,5 pro 100.000 Männer pro Jahr sowie 26,1 pro 100.000 Frauen pro Jahr berechnet (Coultas DB, et al. 1994).

## 1.2 Klinik und Diagnostik der ILD

Das unspezifische Kardinalsymptom der ILD ist die zunehmende Dyspnoe. Bei der Auskultation der Lunge kann ein Knistern imponieren, der Befund kann jedoch auch vollkommen unauffällig sein. Von besonderer Bedeutung ist eine sehr sorgfältige Anamnese in Bezug auf eine mögliche Exposition gegenüber inhalativen exogenen Noxen, wie zum Beispiel mineralische oder organische Stäube oder bestimmte Arzneimittel, insbesondere Bleomycin, Amiodaron und Methotrexat (vgl. 1.1).

Die Diagnose einer ILD ist klinisch schwierig zu stellen und beruht neben der klinischen Untersuchung auf zumeist mehreren diagnostischen Tests. Diese umfassen Lungenfunktionsuntersuchungen, histologische Untersuchungen von chirurgisch entnommenen Lungenbiopsien, die Bronchoskopie mit Gewinnung von bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) und die hochauflösende Computertomographie (King TE Jr, 2005).

Der Nachweis einer restriktiven Ventilationsstörung und/oder der Nachweis eines gestörten Gasaustausches gilt als typischer Befund der Lungenfunktionstests bei ILD (Bourke SJ, 2006). Eine restriktive Ventilationsstörung ist jedoch nicht spezifisch für eine ILD, sondern wird zum Beispiel auch bei der viel häufigeren COPD mit Lungenemphysem oder bei pulmonal-vaskulären Erkrankungen diagnostiziert. Bei bestimmten

Formen, zum Beispiel bei der Sarkoidose oder der Hypersensitivitätspneumonitis, kann außerdem eine obstruktive Ventilationsstörung hinzukommen.

Die ILD-assoziierte Hypoxämie wurde zunächst als Ausdruck eines gestörten Gasaustausches als Folge einer erschwerten Diffusion durch die entzündlich und/oder fibrotisch verdickte Alveolarwand aufgefasst (Austrian R, et al., 1951). Es zeigte sich jedoch bald, dass ein Missverhältnis von ventilierten und perfundierten Lungenarealen eine wesentliche Ursache der Hypoxämie in Ruhe darstellt (Finley T, et al. 1962), während die Diffusionsstörung insbesondere bei körperlicher Anstrengung einschränkend wirksam wird (Wagner PD, et al., 1976). Obwohl Lungenfunktionstests unverzichtbar sind im Rahmen der Diagnostik der ILD, hat sich jedoch gezeigt, dass sie für die prognostische Einschätzung und das therapeutische Monitoring nur eingeschränkt aussagekräftig sind (King TE Jr, 2005).

Die offene Lungenbiopsie wurde in den 1960er Jahren in die Diagnostik der ILD eingeführt und zeichnet sich durch eine hohe diagnostische Treffsicherheit von ca. 92% aus (King TE Jr, 2005). Der Eingriff wird mit Videounterstützung in Allgemeinnarkose durchgeführt, wobei Komplikationsraten von 2,5% bis über 10% und die mit dem Eingriff assoziierte Mortalität mit 0,3% bzw. unter 1% angegeben wird (King TE Jr, 2005; Lettieri CJ, et al., 2005). Obwohl die chirurgische Gewebeentnahme mit nachfolgender histologischer Untersuchung als diagnostische Methode mit der höchsten Sensitivität bei ILD gilt (Hunninghake GW, et al., 2001), wird sie doch zurückhaltend eingesetzt, obwohl die Trefferrate einer ausschließlich klinisch orientierten Diagnostik selbst bei Experten auf diesem Gebiet auf maximal etwa 50% geschätzt wird (Flaherty KR, et al., 2004).

Die transbronchiale Lungenbiopsie mittels flexibler Bronchoskope ist, verglichen mit der transthorakalen Biopsie, zweifellos die weitaus schonendere Methode, die Sensitivität transbronchial entnommener Biopsien für die ILD-Diagnostik ist jedoch unzureichend und wird daher nicht empfohlen (American Thoracic Society, 2000; American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002).

Die mittels flexibler Bronchoskope durchgeführte bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist hingegen ein besonders schonendes diagnostisches Verfahren und zytologische, mikrobiologische und biochemische Untersuchungen der gewonnenen BALF können Hinweise geben auf pathologische Prozesse im bronchoalveolären System (Reynolds HY, 2000). So hat die Untersuchung der BALF für verschiedene Formen der ILD

typische Zytologien gezeigt. Bei der IPF dominieren Makrophagen und Neutrophile, während bei der exogen-allergischen Alveolitis, bei Kollagenose-assoziierten ILDs und bei der Sarkoidose Makrophagen und Lymphozyten und bei der Lymphangiosis carcinomatosa fast ausschließlich Lymphozyten in der BALF gefunden werden (Eschenbruch CM, 1995).

Während die Standardröntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen differentialdiagnostisch unverzichtbar ist und wertvolle Hinweise auf die Lokalisation des pulmonalen Befalls sowie bedeutsame begleitende Befunde wie Pleuraergüsse, Lymphknotenvergrößerungen oder eine kardiale Hypertrophie liefern kann, ist die Sensitivität und Spezifität der konventionellen Röntgenaufnahme gering (American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2002).

Die konventionelle Radiographie wurde seit den 1980er Jahren zunehmend ergänzt durch die hochauflösende Computertomographie (engl. *high resolution computer tomography*, HRCT). Die HRCT liefert feine Details pulmonaler Veränderungen, welche bei verschiedenen ILDs gut mit dem histopathologischen Befund korrelieren (Wittram, C, et al., 2003). So lassen sich mittels HRCT kleine Knötchen, verdickte Septen, retikuläre Verdichtungen, diskrete Verschattungen und honigwabenähnliche Veränderungen (engl. *honeycombing*) darstellen. Die Klassifikation der interstitiellen Pneumonien beruht daher nicht zuletzt auch auf den mittels HRCT erhobenen Befunden (vgl. 1.1). Trotz der unbestritten hohen technischen Qualität der HRCT-Bildgebung und ihrer Bedeutung hinsichtlich Beurteilung des pulmonalen Befalls (Herdlokalisation, Ausprägung), des Krankheitsverlaufs und für die Differentialdiagnostik ersetzt jedoch auch die HRCT nicht die Diagnosesicherung mittels histologischer Untersuchung von Gewebeproben (Aziz ZA, et al., 2004).

### **1.3 Therapie der ILD**

Mit Ausnahme der exogen-allergischen Alveolitiden, bei denen durch konsequente Vermeidung einer Allergenexposition die pulmonale Inflammation gestoppt und der Übergang in das fibrotische Stadium aufgehalten werden kann, sind für alle übrigen Formen der ILD keine kausal wirksamen Therapieansätze beschrieben. Die derzeit verfügbaren therapeutischen Optionen beschränken sich hauptsächlich auf die Gabe von Glukokortikoiden sowie zytostatisch wirkenden Immunsuppressiva wie Azathioprin oder Cyclophosphamid (American Thoracic Society, 2000; Seifart C und Vogelmeier C,

2007). Ein therapeutisches Ansprechen ist im Einzelfall kaum vorherzusagen und ein Aufhalten der Krankheitsprogression ist bereits als Therapieerfolg anzusehen. Aus diesem Grund besteht ein großer Bedarf an wirksameren und möglichst in kausale Pathomechanismen eingreifenden Therapien der ILF (Giri SN, 2003).

Unterschiedliche neue Therapieansätze wurden in den letzten Jahren bei Patienten mit Lungenfibrose versucht. Während in einer US-amerikanischen Studie mit Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) kein signifikanter Effekt beobachtet wurde, wurde in einer europäischen Studie nach zwei Jahren Behandlung ein Vorteil für die mit IFN- $\gamma$  behandelten Patienten beschrieben (Raghu G, et al., 2004; Antoniou KM, et al., 2006). Die Gabe des antifibrotischen Wirkstoffs Pirfenidon zeigte nach 9 Monaten Therapie einen günstigen Effekt auf Lungenfunktionsparameter (Azuma A, et al., 2005) und die Inhalation von hochdosiertem Acetylcystein zusätzlich zu Prednisolon und Azathioprin für ein Jahr verbesserte die Lungenfunktion bei ILF (Demedts M, et al., 2005). In der BUILD-1 Studie zeigte der zur Behandlung der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) zugelassene Endothelinantagonist Bosentan bei ILF eine nichtsignifikante Verbesserung der sekundären Endpunkte Tod bzw. Progression (King TE Jr, et al., 2008), während für den ebenfalls zur PAH-Therapie zugelassenen Phosphodiesterasehemmer Sildenafil in einer kleinen Studie eine Verbesserung der 6 min-Gehstrecke gezeigt wurde (Collard HR, et al., 2007).

#### 1.4. Pathomechanismen der Lungenfibrose

Die alveoläre Oberfläche besteht zu ca. 95% aus terminal differenzierten, flachen Epithelzellen, den Typ I-Pneumozyten, die der alveolären Basalamembran aufsitzen (Crouch E, 1990). Typ I Pneumozyten sind alveolären Noxen unmittelbar ausgesetzt, verfügen jedoch über kein nennenswertes regeneratives Potenzial. Die Population der Typ I-Pneumozyten wird nach Epithelschädigung aus den Typ II-Pneumozyten regeneriert, die im Unterschied zu den Typ I-Pneumozyten über die Fähigkeit zur Proliferation verfügen und auch Moleküle der extrazellulären Matrix synthetisieren und sezernieren können. Es war lange allgemein akzeptiert, dass der Lungenfibrose stets eine chronische interstitielle Inflammation vorausgeht (Crouch E, 1990; Ward PA, Hunninghake GW, 1998). Dieses Paradigma wurde in jüngerer Zeit jedoch durch experimentelle Untersuchungen und klinische Beobachtungen in Frage gestellt. So wurde bei transgenen Mäusen, die defizient für das Integrin  $\alpha_v\beta_6$  sind und deshalb das

profibrotische Zytokin TGF- $\beta$ 1 nicht aktivieren können, eine extrem starke inflammatorische Antwort des Lungengewebes auf Bleomycin bei einer gleichzeitig nur geringfügig ausgeprägten Fibrose beobachtet (Munger JS, et al., 1999). In Lungenbiopsien von Patienten mit ILF finden sich meist nur diskrete Anzeichen einer Inflammation und das Ansprechen dieser Patienten auf eine nur antientzündliche Therapie ist unbefriedigend (Willis BC, et al., 2006). In diesem Zusammenhang wurde die Hypothese der epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) als wichtiger pathophysiologischer Mechanismus der Lungenfibrose aufgestellt, wonach die bereits weiter oben angesprochene Plastizität der Typ II-Pneumozyten eine wesentliche Rolle spielen könnte, die nicht nur in Typ I-Pneumozyten im Rahmen von Reparaturprozessen differenzieren, sondern auch im Sinne eines Vernarbungsprozesses in Myofibroblasten mit der Fähigkeit zur Synthese und Sekretion von Molekülen der extrazellulären Matrix (EZM) transdifferenzieren können (Willis BC, et al., 2006).

Die Bedeutung des Zytokins TGF- $\beta$ 1 für die pulmonale Fibrose ist hingegen auch mit der Hypothese der EMT als wesentlichem Pathomechanismus vereinbar. Es wurde gezeigt, dass residente pulmonale Fibroblasten unter der Wirkung von TGF- $\beta$ 1 zu Myofibroblasten transdifferenzieren können (Hu B, et al., 2003). Weiterhin wurde beschrieben, dass in Alveolarepithelzellen unter der Wirkung von TGF- $\beta$ 1 und vermittelt durch den Transkriptionsfaktor Smad3 die Expression eines „EMT-Proteoms“ induziert und durch Aktivierung der Rho-Kinase für Myofibroblasten typische Zytoskelettveränderungen ausgelöst wurden (Zavadil J, Böttinger EP, 2005; Masszi A, et al., 2003).

### **1.5. Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Lunge**

Das Bindegewebe der gesunden Lunge des Erwachsenen besteht zu mindestens 60% aus Kollagen, welches ca. 15% der Trockenmasse der normalen Lunge bildet (Croach E, 1990). Kollagene sind Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) und strukturell charakterisiert durch das Vorhandensein von mindestens einer stäbchenförmigen tripelhelikalen Struktur, die sich aus drei distinkten Polypeptiden zusammensetzt, deren Primärstruktur wiederum durch einen Glyzinrest an jeder dritten Position sowie variable Mengen von Hydroxyprolin sowie Hydroxylysin gekennzeichnet sind (Schuppan D, 1990). Grundsätzlich unterscheiden sich die Kollagene im Umfang post-translationaler Modifikationen (Hydroxylierung und Glykosylierung), in ihren physikochemischen

Eigenschaften, in Zahl sowie Anordnung tripelhelikaler und nicht-helikaler Protein-domänen sowie ihrer Bindungsaffinität zu anderen EZM-Proteinen (Parry DA, 1988; Schuppan D, 1990).

Die Regulation der Kollagensynthese erfolgt hauptsächlich auf den Ebenen der mRNA-Synthese, der Translation in die Kollagenpolypeptide sowie der intrazellulären Proteolyse (Adams SL, 1989). Weiterhin unterliegt die Menge des extrazellulären Kollagens einer regulatorischen Kontrolle durch Proteolyse, Aggregation, Quervernetzung und schließlich Abbau durch Kollagenasen aus der Familie der Matrix-metalloproteasen, deren Aktivität wiederum regulatorisch kontrolliert wird (Laurent GJ, 1987).

### 1.5.1 Kollagen Typ III

Von den mindestens acht in der gesunden Lunge vorhandenen Kollagenen sind die ubiquitär vorhandenen Kollagene Typ I und Typ III quantitativ am bedeutendsten. Die Kollagene Typ I und Typ III werden durch Proteolyse terminaler Peptide aus den jeweiligen Prokollagenen gebildet (Crouch E, 1990). Während Kollagen-I aus zwei  $\alpha 1$  (I)-Ketten und einer  $\alpha 2$  (I)-Kette besteht, setzt sich Kollagen-III aus drei identischen  $\alpha 1$  (III)-Ketten zusammen. Kollagen-I und Kollagen-III bilden ungefähr in einem Verhältnis 2:1 die großen interstitiellen Fibrillen. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde die stärkste Anfärbung für Kollagen-III im alvolären pulmonalen Interstitium gezeigt (Konomi H, et al., 1981). Das N-terminale Propeptid des Prokollagen-III (Prokollagen-III-N-Peptid; PIIINP) hat ein Molekulargewicht von ca. 45 kDa und ist mithilfe immunologischer Methoden im Serum nachweisbar (Kühn K, et al., 1982; Rohde H., et al., 1983). Da PIIINP in äquimolarem Verhältnis zu Kollagen-III gebildet wird, korreliert die Konzentration von PIIINP eng mit der posttranslationalen Synthese von Kollagen-III und eignet sich daher als Biomarker der Kollagensynthese bei fibrosierenden Krankheiten.

Für verschiedene Rattenmodelle der chemisch-toxisch induzierten bzw. biliär induzierten Leberfibrose konnten verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen, dass die Serumkonzentrationen von PIIINP eng mit dem fibrotischen Umbau des Lebergewebes korrelieren (Schuppan D, et al., 1986. Hiyasaka, A., et al. Savolainen ER, et al., 1988; Gerling B, et al., 1996). Für ätiologisch unterschiedliche chronische Lebererkrankungen des Menschen mit Übergang in eine

Leberfibrose wurden erhöhte Serumkonzentrationen von PIIINP gefunden (Colombo M, et al. 1985; Torres-Salinas, M., et al. 1986). Eine Persistenz erhöhter PIIINP-Serumkonzentrationen wurde für den chronisch aktiven Verlauf der Virushepatitis gezeigt (Annoni, G., et al., 1986; Bentsen, KD, et al., 1987) und es konnte für chronische Lebererkrankungen demonstriert werden, dass die PIIINP-Serumkonzentration mit der fibrotischen Aktivität korreliert (Schuppan D, 1991). Im Zusammenhang mit ILD erstmals beschrieben wurden erhöhte Konzentrationen von PIIINP in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von Patienten mit ILF (Low RB, et al., 1983) und Sarkoidose (Bjermer L, et al., 1986).

### 1.5.2 Kollagen Typ IV

Kollagen-IV ist allgemein das Hauptkollagen der Basalmembran und somit auch der Basalmembranen des Alveolarepithelials und des Kapillarendothels (Crouch E, 1990). Kollagen-IV besteht ähnlich dem Kollagen I aus zwei  $\alpha 1$  (IV)-Ketten und einer  $\alpha 2$  (IV)-Kette. Kollagen-IV findet sich in interstitiellen Fibrillen, perizellulär sowie in der vaskulären Intima und setzt sich entweder aus drei  $\alpha 1$  (V)-Ketten, zwei  $\alpha 1$  (V)-Ketten und einer  $\alpha 2$  (V)-Kette oder aus je einer Kette  $\alpha 1$  (V),  $\alpha 2$  (V) und  $\alpha 3$  (V) zusammen (Tryggvason K, et al. 1990). Da Messungen von Kollagen-IV in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden, wird hier auf eine ausführlichere Darstellung von Kollagen-IV verzichtet.

### 1.5.3 Kollagen Typ VI

Kollagen Typ VI wird von Fibroblasten sezerniert, hat ein Molekulargewicht von 140 bis 260 kDa und besteht aus drei unterschiedlichen alpha-Ketten (Engvall E, et al., 1986). Kollagen-VI vernetzt Fibrillen aus Kollagen-I und Kollagen-III miteinander und bindet an Zelloberflächenrezeptoren (Bonaldo P, et al., 1990; Aumailley M, et al., 1991). Es wurde gezeigt, dass Kollagen-VI über die Bindung an zelluläre Rezeptoren das Proliferationsverhalten von Zellen beeinflussen kann (Atkinson JC, et al., 1996). Für die Messung der Konzentration von Kollagen-VI im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten stehen Immunoassays zur Verfügung (Schuppan D, et al., 1985; Oesterling C, 1992). Im CCl<sub>4</sub>-induzierten Leberfibrosemodell der Ratte wurde eine frühe Aktivierung der Expression von Kollagen-VI nachgewiesen (Takahara T, et al., 1995). Bei Patienten mit Leberfibrose wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von Kollagen-VI

gemessen (Shahin M, et al., 1992; Stickel F, et al., 2001). Bei Kindern mit zystischer Fibrose erwiesen sich die Serumkonzentrationen von Kollagen-VI als prädiktiv für die Entwicklung einer Leberfibrose (Gerling B, et al., 1997).

#### 1.5.4 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein langkettiges, unverzweigtes, polyanionisches und nicht-sulfatiertes Polysaccharid (Mukopolysaccharid, Glykosaminoglykan) bestehend aus dem Disaccharid Glukuronsäure-beta 1,3-N-Acetylglukosamin. HA hat ein Molekulargewicht von bis zu 2.000 kDa und wurde 1934 erstmals im Glaskörper des Auges entdeckt und später im Extrazellularraum nahezu aller untersuchten Gewebe nachgewiesen (Laurent TC, 1970). Neben dem Glaskörper weisen die Synovia und die Nabelschnur besonders hohe Konzentrationen auf (Laurent TC, et al., 1986). Ein Teil der HA erreicht das Blutgefäßsystem über die Lymphe und wird schnell über einen rezeptorabhängigen Mechanismus hauptsächlich in Endothelzellen der Leber aufgenommen und dort zu Essig- und Milchsäure abgebaut. HA lässt sich mittels Immunoassay im Blutplasma bzw. Serum nachweisen, wobei im Blut überwiegend niedermolekulare HA (<200 kDa) zirkuliert, da hochmolekulare HA präferentiell von Leberendothelzellen aufgenommen wird (Tengblad A, et al., 1986). Die bei jungen gesunden Erwachsenen gemessenen mittleren Konzentrationen wurden mit 25 ng/ml (Frauen) bzw. 36 ng/ml (Männer) angegeben bei einer Spannbreite von 9-61 ng/ml (Frauen) bzw. 8-147 ng/ml (Männer), wobei die im Blut gemessenen Konzentrationen mit dem Lebensalter ansteigen (Engström-Laurent A, et al., 1985). Niedermolekulare zirkulierende HA (4-12 kDa) wird teilweise renal eliminiert und die HA-Ausscheidung mit dem Urin wurde bei gesunden Probanden mit 356 µg/24h (Männer) bzw. 275 µg/24h (Frauen) angegeben.

HA als Bestandteil der Synovialflüssigkeit ist nicht nur für die Integrität des Gelenkknorpels von Bedeutung (Ghosh P, 1994), sondern übt vielfältige weitere biologische Funktionen aus. So spielt HA eine Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung (Ariyoshi W, et al., 2005), bei der hämatopoietischen Stammzellendifferenzierung (Haylock DN und Nilsson SK, 2006), bei der Wundheilung (Price RD, et al., 2005) und für die Leukozytenfunktion (Håkansson L und Venge P, 1987). Im Kontext fibrosierender Organerkrankungen wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von HA gefunden bei chronischer Hepatitis C (Ninomiya T, et al., 1998; Wong VS, et al., 1998) und es wurde



gezeigt, dass das Ansprechen auf eine Interferontherapie mit einem Abfall der erhöhten Serumspiegel korrelierte (Yamada M, et al., 1996). Bei Patienten mit einer Leberfibrose, die sich aus einer nichtalkoholischen Fettleber entwickelt hat, erwies sich die Serumkonzentration der HA als geeigneter Biomarker einer hepatischen Fibrose (Suzuki A, et al., 2005; Kaneda H, et al., 2006). Eine schwedische Arbeitsgruppe hat in bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten von Sarkoidosepatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte HA-Konzentrationen gemessen und damit erstmals erhöhte lokale Konzentrationen dieses Makromoleküls der EZM bei ILD beschrieben (Hällgren R, et al., 1985; Bjermer, L, et al., 1987).

## 1.6 Fragestellung

Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von chronischen interstitiellen Lungenkrankheiten (ILD) sind aufwändig und können im Einzelfall schwierig sein. Ein sensitiver und spezifischer quantitativer Assay zur Beurteilung der fibrotischen Aktivität könnte bei der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von großem klinischen Nutzen sein.

Untersucht werden sollten daher in dieser Arbeit die BALF-Konzentrationen von Komponenten der extrazellulären Matrix (Hyaluronsäure, PIIINP und Kollagen-VI) bei Patienten mit ILD und nicht interstitiellen Lungenerkrankungen unter der Hypothese, dass die BALF-Konzentrationen dieser Parameter bei ILD signifikant erhöht sind. Weiterhin sollte geprüft werden, welcher Parameter für einen hinreichend sensitiven und spezifischen diagnostischen Test auf das Vorliegen einer ILD eingesetzt werden kann. Schließlich sollte die Hypothese untersucht werden, dass der Quotient PIIINP/Kollagen-VI als Marker der Balance von Fibrogenese und Fibrolyse der alleinigen Bestimmung von PIIINP bei ILD diagnostisch überlegen ist.

Aufgrund der erwarteten sehr geringen Konzentrationen von PIIINP und Kollagen VI in BALF-Proben war eine Konzentrierung der BALF-Proben und in diesem Zusammenhang die Etablierung und Evaluierung verschiedener Protokolle der Konzentrierung erforderlich.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien

| <b>Reagenz und RIA-Kits</b>                             | <b>Hersteller</b>   |
|---|---|
| Bovines Serumalbumin (BSA)                              | Sigma, Deisenhofen  |
| Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat                      | Merck, Darmstadt  |
| Essigsäure (konzentriert)                               | Merck   |
| Ethanol 100%  | Merck   |
| <sup>125</sup> I-Hyaluronsäure-bindendes Protein (HABP) | Pharmacia, Freiburg   |
| Kaliumdihydrogenphosphat                                | Merck   |
| Kollagen VI aus humaner Plazenta                        | zur Verfügung gestellt von D. Schuppan (Schuppan D, et al., 1985) |
| Natriumbikarbonat                                       | Merck   |
| Natriumchlorid  | Merck   |
| ortho-Phenylendiamindihydrochlorid                      | Sigma   |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)             | Merck   |
| RIA-Kit Pharmacia HA Test 50                            | Pharmacia   |
| RIA-Kit RIA-gnost PIIP (coated tube)                    | Behringwerke, Marburg   |
| Trichloressigsäure (TCA)                                | Merck   |
| Wasserstoffperoxid (30%)                                | Merck   |
| <b>Antikörper und Konjugate</b>                         |   |
| Anti-K-VI-Antiserum 91/5 (Kaninchen)                    | zur Verfügung gestellt von D. Schuppan (Schuppan D, et al., 1985) |

**Antikörper und Konjugate**

Anti-Kaninchen-IgG, Biotin-konjugiert (Ziege)  
Extravidin-Peroxidase-Konjugat  
Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Komplex  
(Kaninchen)  
Anti-Biotin-Peroxidase Konjugat (Ziege)

**Hersteller**

Sigma  
Sigma  
Sigma  
Sigma

**Lösungen**

Blockierpuffer  
1% BSA in PBS  
Detektionsreagenz  
  
0,05% Essigsäure  
Kollagen VI-Stammlösung  
Kollagen VI-Beschichtungspuffer  
  
Phosphatpuffer (PBS)  
  
Substratpuffer  
  
20% TCA  
  
Waschpuffer

**Rezept**

1 mg BSA pro ml PBS  
100 mg BSA auf 10 ml PBS  
1 mg ortho-Phenylendiamin-  
dihydrochlorid pro ml  
Substratpuffer  
  
2,5 ml Eisessig auf 5 l aqua dest.  
1 mg/ ml 0,1 N Essigsäure  
20 mM Natriumbikarbonat, 0,5 M  
NaCl, pH 9,6  
  
5,45 g Kaliumdihydrogen-  
phosphat, 16,62 g Dinatrium-  
hydrogenphosphat-Dihydrat, 70,1  
g Natriumchlorid in 10 l aqua  
dest., pH 7,2  
  
0,1 M Zitronensäure in aqua  
dest., pH 4,4  
  
20 g TCA (100%) auf 100 ml  
aqua dest.  
  
0,05% Tween 20 in PBS

## 2.2 Materialien und Geräte

| Material  | Hersteller                                       |
|---|--|
| Dialyseschläuche (Zellulosemembran) D9777<br>(Porengröße 12 kDa)              | Sigma  |
| 96-Loch Mikrotiterplatten (96 KF-Form, erhöhter Rand)                         | Greiner, Frickenhausen                           |
| Mikrokonzentrat-Zentrifugenröhrchen<br>Centricon 10 (Ausschlussgrenze 10 kDa) | Millipore, Schwalbach                            |
| Teströhrchen 5 ml   | Greiner  |
| Ultrafiltrationsmembran Diaflo Ultrafilter YM 10<br>(Ausschlussgrenze 10 KDa) | Millipore  |
| Ultrafiltrationszelle Amicon Diaflo Ultrafilter                               | Millipore  |
| Zentrifugenröhrchen 50 ml, Falcon   | Becton Dickinson, Heidelberg                     |
| ELISA-Plattenlesegerät MRX  | Dynatech, Denkendorf                             |
| Gammazähler Modell BF 5300  | Berthold Technologies, Bad Wildbad               |
| Gefriertrocknungsanlage Beta 1-8 K  | Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode |
| Schüttler   | Heidolph Instruments, Schwabach                  |
| Tischzentrifuge Heraeus Minifuge  | Thermo Fisher Scientific, Dreieich               |
| Universalzentrifuge Heraeus Labofuge  | Thermo Fisher Scientific                         |

## 2.3 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Untersucht wurden bronchoalveoläre Lavageflüssigkeiten (BALF) von insgesamt 237 konsekutiv aufgenommenen Patienten, die sich zwischen 1990 und 1992 in der Lungenklinik Heckeshorn, Berlin-Zehlendorf, einer Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) unterzogen. Die Patienten gehörten jeweils einer der folgenden sieben Diagnosegruppen bzw. einer Kontrollgruppe an: Exogen-allergische Alveolitis (n=7), idiopathische pulmonale Fibrose (ILF; n=24), pulmonale Sarkoidose,

Stadium II (n=13), Lymphangiosis carcinomatosa (LC; n=11), Bronchialkarzinom (n=37), pulmonale Metastasen (n=7), bakterielle Pneumonie (n=24), Lungentuberkulose (n=32), chronisch-obstruktive Bronchitis (COPD; n=19), Kollagenose mit Lungenbeteiligung (n=5). Als Kontrollen wurden BALF von 58 Personen untersucht, die sich einer Bronchoskopie unterzogen wegen suspekter Thorax-Röntgenbefunde, wie zum Beispiel einer Stenose der Luftwege, einer Verbreiterung des Hilus oder des Mediastinums, oder wegen kurz zuvor aufgetretener Hämoptysen. Bei jeder dieser Kontrollpersonen wurde eine Lungenerkrankung ausgeschlossen. Die Diagnosen der ILF, Sarkoidose, LC und Bronchialkarzinom basierten auf histologischen und zytologischen Befunden von Proben, die per Bronchoskopie, Thorakoskopie oder operativer offener Lungenbiopsie gewonnen wurden. In den Fällen von Pneumonie und Lungentuberkulose lag der kulturelle Nachweis des Erregers vor. Keiner der Patienten erhielt Glukokortikoide oder Zytostatika zum Zeitpunkt der Untersuchung.

#### **2.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Die bronchoalveoläre Lavage wurde gemäß den Empfehlungen der European Respiratory Society durchgeführt. Die Patienten wurden 20 min vor der Bronchoskopie durch eine i.m. Injektion von 0,5 mg Atropin, 7,5 bis 15 mg Hydrocodon und 1,5 bis 3 mg Midazolam prämediziert. Die Bronchoskopie (mit Ausnahme des Bronchus, aus dem die BALF gewonnen wurde) erfolgte in Lokalanästhesie (1% Xylocain mit einem Fiberbronchoskop (FBF 5, Olympus Optical Co., Hamburg). Zur Gewinnung der BALF wurden insgesamt 160 ml einer 0,9% Kochsalzlösung in 20 ml-Schritten instilliert (Schaberg T, et al., 1992). In Fällen von Bronchialkarzinom oder Lungenmetastasen und bei den Kontrollen wurde die Bronchiallavage in einem makroskopisch unauffälligen Hauptbronchus des Mittellappens oder der Lingula auf der zum Röntgenbefund kontralateral liegenden Seite durchgeführt. Bei Patienten mit Tuberkulose oder Pneumonie wurde die betroffene Seite miteinbezogen. Bei den Patienten mit ILD (ILF, Sarkoidose, LC, exogen-allergische Alveolitis, Kollagenose) erfolgte die BAL in einem Bronchus der Lingula oder des Mittellappens. Alle BAL wurden vor der Biopsie durchgeführt, um Kontaminationen mit Blut zu vermeiden.

Die BALF-Proben lagen in anonymisierter Form vor mit Angaben zur klinischen Diagnose, Alter, Geschlecht und Raucheranamnese, jedoch ohne personenbezogene Daten zum Spender. Es handelte sich um Restmaterial, welches bezüglich Art und Menge im Rahmen klinisch indizierter Untersuchungen gewonnen und das für die

weitere Diagnostik nicht mehr benötigt wurde. Aus diesen Gründen war es nicht notwendig, die Zustimmung der Patienten zu den wissenschaftlichen Untersuchungen einzuholen.

## **2.5 Lagerung und Aufarbeitung der BALF**

Die gewonnene BALF wurde sogleich durch eine sterile Gaze gefiltert und bei 500xg und 4°C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Zellsediment, das für zytologische Untersuchungen verwendet wurde, abgenommen, sofort tiefgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurden die gefrorenen BALF-Überstände schonend aufgetaut. Dann wurde durch Zugabe von 1% BSA/PBS eine Konzentration von 5 mg BSA pro 100 ml BALF-Überstand eingestellt. Anschließend wurde bei 5.000 Upm und 4°C für 10 min zentrifugiert, um noch in der BALF enthaltene Partikel, die die Assay-Ergebnisse verfälschen könnten, zu entfernen. Es zeigte sich, daß der RIA für Hyaluronsäure (HA) sensitiv genug war, um HA ohne Aufkonzentrierung direkt aus dem filtrierten und zentrifugierten BALF-Überstand zu bestimmen. Zur Messung der Konzentration von PIINP und K-VI mussten die BALF-Überstände jedoch konzentriert werden, da diese Proteine in der vorliegenden hohen Verdünnung von den Assay-Systemen nicht erfasst werden konnten. Hierbei wurde eine ca. 50-fache Konzentrierung erreicht.

## **2.6 Etablierung und Evaluierung alternativer Methoden der BALF-Konzentrierung**

### **2.6.1 Konzentrierung durch Ultrafiltration (Membranfiltration)**

Die soweit vorbehandelten BALF-Überstände wurden zweifach ultrafiltriert. Die erste Volumenreduktion erfolgte in zylinderförmigen Ultrafiltrationszellen (Amicon Diaflo Ultrafilter). In der Zelle wurde durch Einleitung von Stickstoff ein Druck von 3 bis 4 bar hergestellt und der BALF-Überstand durch eine Filtrationsmembran gepresst, die nur für Stoffe mit einem Molekulargewicht von unter 10 kD durchlässig war (Amicon Diaflo Ultrafilter YM 10). BALF-Überstände von ca. 50 ml Ausgangsvolumen wurden so bis auf ca. 3 ml konzentriert. Die weitere Volumenreduktion bis auf ca. 1 ml wurde durch Einbringen in Zentrifugenröhrchen (Centricon 10, Amicon), die ebenfalls mit einem Filter von 10 kDa Porengröße ausgestattet waren und anschließender Zentrifugation bei 5000 Upm bei 4°C für 10 min erreicht. Das genaue Endvolumen wurde bestimmt und der Aufkonzentrierungsfaktor durch Division mit dem Ausgangsvolumen rechnerisch ermittelt. Diese Methode zur Volumenreduktion erwies sich jedoch als sehr aufwändig,

so dass im Rahmen dieser Arbeit zeiteffektivere Protokolle (2.6.2 bzw. 2.6.3) evaluiert wurden.

### **2.6.2 Konzentrierung durch Proteinfällung mit Trichloressigsäure**

22 BALF-Überstände wurden sowohl mittels Membranfiltration als auch durch Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) aufkonzentriert und die mittels RIA gemessenen Konzentrationen von K-VI und PIIINP anschließend direkt miteinander verglichen. Die mit BSA/PBS versetzten und zentrifugierten Proben wurden hierfür zunächst geteilt. Die eine Hälfte wurde mit 20 % TCA im Volumenverhältnis 1:1 versetzt, eine Stunde bei 4°C inkubiert und dann bei 5.000 Upm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in 98% Ethanol resuspendiert und auf Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Anschließend wurde bei 12.000 Upm und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Alkohol abgesaugt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um die TCA zu entfernen. Die Temperatur von 4°C wurde strikt eingehalten, um einen Proteinverlust durch partielles Lösen bei Raumtemperatur zu vermeiden. Das Präzipitat wurde anschließend getrocknet und Tween 20/PBS zugegeben, so dass eine 50-fache Konzentrierung in Bezug auf das Ausgangsvolumen resultierte. Dann wurde bei 4°C für ca. 48 h gerührt, bis sich das Präzipitat vollständig aufgelöst hatte. Die andere Hälfte der BALF-Überstände wurde wie in 2.6.1 beschrieben mittels Membranfiltrationsmethode aufkonzentriert.

### **2.6.3 Konzentrierung durch Gefriertrocknung (Lyophilisation)**

10 BALF-Überstände wurden jeweils mittels der Membranfiltration und der Gefriertrocknung konzentriert und dann beide Methoden im PIIINP-RIA miteinander verglichen. Die mit BSA/PBS versetzten und zentrifugierten BAL-Überstände wurden geteilt und jeweils die Hälfte einer Probe in Dialyseschläuche gefüllt, deren Porengröße so gewählt wurde, daß Moleküle ab einer Größe von 12 kD zurückgehalten wurden (Dialysemembranen Sigma D-9777). Die Schläuche wurden in Behälter mit 0,05% Essigsäure eingebracht und bei 4°C dialysiert, wobei das Medium 4-mal alle 8 Stunden gewechselt wurde. Die von Salzen gereinigte BALF wurde dann in kälte- und vakuumbeständige Glaskolben eingebracht und zunächst auf -20°C, dann auf -80°C abgekühlt und schließlich bei -50°C und 0,025 mbar Vakuum gefriergetrocknet. Das erhaltene Lyophilisat wurde anschließend in soviel PBS gelöst, daß eine 50-fache Konzentrierung in Bezug auf das Ausgangsvolumen resultierte. Die andere

Probenhälfte wurde wiederum mittels Membranfiltration konzentriert.

## **2.7 Prinzipien und Durchführung der Immunoassays**

### **2.7.1. Immunoassay für Hyaluronsäure**

Die in den BALF-Überständen enthaltene Hyaluronsäure (HA) wurde mittels des kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays Pharmacia HA Test 50 in der nicht konzentrierten BALF bestimmt. Als radiometrischer Assay funktioniert der Test nach dem nicht-kompetitiven System der Ligandenanalyse mit Bindungsreagenzüberschuss. Als Liganden fungieren hierbei spezifische, aus Rinderknorpel gewonnene Hyaluronsäure-bindende-Proteine (HABP). Die in der Probe (100 µl Standard bzw. BALF) enthaltene Hyaluronsäure wird an <sup>125</sup>J-HABP gebunden (Tracer), die im Überschuß (200 µl) zugegeben und mind. 60 min bei 4°C inkubiert wurde. Zur Quantifizierung des ungebundenen Traceranteils wurde HA-Sepharose (100 µl) zugegeben und 45 min bei 4°C inkubiert. Die HA-Sepharose bindet den überschüssigen Traceranteil. Nach Zentrifugation (10 min bei 1.500xg) wurde der Überstand abgesaugt, die restliche Flüssigkeit vorsichtig mit Filterpapier entfernt und die im Pellet verbliebene Radioaktivität im Gammazintillationszähler gemessen. Die gemessene Radioaktivität war umgekehrt proportional zu der in der Probe enthaltenen HA-Konzentration. Alle Proben wurden als Doppelansatz gemessen. Die Mittelwerte der im Gammazintillationszähler gemessenen Impulse pro Minute (B) von Standard bzw. Probe wurden als Prozentsatz vom Mittelwert des Null-Standards (Bo) ausgedrückt:  $B/Bo \times 100 = \% \text{ gebundene Aktivität}$ . Die HA-Konzentrationen der Proben wurden direkt von der Standardkurve abgelesen. Die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze des Assays lag bei 5 ng/ml.

### **2.7.2. Immunoassay für PIIINP**

Prokollagen-III-Peptid (PIIINP) wurde mittels des kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays RIA-gnost P III P (coated tube) aus den konzentrierten BAL-Überständen bestimmt. Wie beim zuvor beschriebenen Assay funktioniert auch dieser Test nach dem nicht kompetitiven System der Ligandenanalyse, wobei es sich hierbei um einen immunoradiometrischen Assay (IRMA) handelt. Als Liganden fungieren immunologisch gewonnene Bindungsreagenzien, in diesem Falle ein aus Mäusen gewonnener monoklonaler Antikörper gegen das humane N-terminale Propeptid Col 1-3, das in äquimolarem Verhältnis zu Kollagen Typ III gebildet wird und daher als Maß



für dessen Synthese verwendet werden kann. Nach dem Prinzip des 2-Schritt-Sandwich-Assays bildet sich im ersten Schritt zunächst ein Komplex aus dem Anti-PIIINP-Antikörper, der fest an der Wand des Teströhrchens haftet und PIIINP in der Probe als Antigen. Die Bindungsreaktion (je Reaktion 20 µl Standard bzw. aufkonzentrierte BALF-Probe mit 400 µl Assay-Puffer) wurde für 2 h unter Schütteln (horizontal bei 300 Upm) bei RT durchgeführt. Nach einem Waschschrift wurde der Überstand abgesaugt und <sup>125</sup>I- Anti-PIIINP-Antikörper als Tracer im Überschuß (400 µl) zugegeben und die zweite Bindungsreaktion wurde für 3 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und nicht gebundener Traceranteil mit dem Überstand sorgfältig abgesaugt. Die im Gammaszintillationszähler über 1 min gemessene Radioaktivität des Pellets war direkt proportional zum PIIINP-Gehalt der Probe, der ermittelt wurde anhand einer Standardkurve, die für jeden Assay aus den mitgelieferten Standards jeweils neu erstellt wurde. Alle Proben wurden als Doppelansatz gemessen und die Mittelwerte wurden ausgewertet. Die Nachweisgrenze des PIIINP-Assays war mit 1 ng/ml angegeben.

### 2.7.3 Immunoassay für Kollagen Typ VI

Kollagen-VI (K-VI) wurde in der konzentrierten BAL-Flüssigkeit mittels ELISA wie beschrieben bestimmt (Oesterling C, 1992). Der Assay funktioniert nach dem Prinzip des RIA, wobei K-VI in der zu untersuchenden Probe als zu bestimmendes Antigen zunächst mit dem polyklonalen Antiserum 91/5 (finale Verdünnung 1:10.000) bei 37°C für 16 h inkubiert wurde (Schuppan D, et al., 1985). Die Bindungsreaktion wurde dann in einem zweiten Schritt in 96-Loch Mikrotiterplatten gegeben, die zuvor mit 200 ng K-VI in 200 µl Beschichtungspuffer pro Loch über Nacht bei 8°C beschichtet wurden, und bei 8°C für 1 h inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche wurden nach der Beschichtung mit K-VI durch Inkubation mit Blockierpuffer bei 8°C für 1 h inhibiert. Das verwendete Antigen bestand aus einer zu 95% reinen K-VI-Präparation, die aus Pepsin-angedauter menschlicher Plazenta isoliert wurde (Schuppan D, et al., 1985). Nach einem Waschschrift wurden die Mikrotiterplatten mit Sekundärantikörper (Ziege Anti-Kaninchen) bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe des Extravidin-Peroxidase-Konjugates (1:2.000) und dann des PAP-Komplexes (1:1.000) jeweils bei 37°C für 1 h. Die Detektionsreaktion erfolgte durch Inkubation mit dem Substrat ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid bei 37°C für 20 min. Die Extinktion wurde bei 490 nm mittels ELISA-Reader bestimmt und ist umgekehrt

proportional zum K-VI-Gehalt der Probe, der mit Hilfe der Standardkurve aus einer stets mitgeführten Standardverdünnungsreihe berechnet wird. Alle Proben wurden als Doppelansatz gemessen. Für mit diesem Assay in Normalseren gemessene K-VI-Konzentrationen wurde ein Mittelwert von  $65,3 \pm 18,7$  ng/ml gefunden und der Referenzbereich wurde mit 18,5 bis 122,1 ng/ml angegeben (Oesterling C, 1992).

## **2.8 Statistische Methoden und verwendete Programme**

Für die Analyse möglicher Korrelationen zwischen den in den BALF-Proben gemessenen Konzentrationen von HA, PIIINP und K-VI mit dem Lebensalter bzw. der BALF-Parameter untereinander wurden die jeweiligen Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet.

Mögliche Unterschiede der Konzentrationen von HA, PIIINP und K-VI sowie der Ratio PIIINP/K-VI zwischen Männern und Frauen bzw. Rauchern und Nichtrauchern wurden mittels Mann-Whitney U-Test analysiert.

Der Vergleich der Mediane der Konzentrationen von HA, PIIINP und K-VI sowie der Ratio PIIINP/K-VI in den einzelnen Diagnosegruppen mit der Kontrollgruppe erfolgte mittels Kruskal-Wallis H-Test (korrigiert mittels des post-hoc Dunn's Tests für multiple Vergleiche).

Die Korrelationsanalysen nach Spearman und der Mann-Whitney U-Test wurden unter Verwendung von SPSS (Version 15.0 für Windows, SPSS, München) durchgeführt. Die Box-Plot-Graphiken wurden ebenfalls mit SPSS erstellt. Der Kruskal-Wallis H-Test und die Erstellung der Streudiagramme mit der Einzelwertdarstellung wurden mit Prism (Version 5, GraphPad Software, LaJolla, USA) ausgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Basisdaten und BALF-Daten

Es wurden BALF-Proben von insgesamt 237 Patienten untersucht, die zwischen 1990 und 1992 zur Abklärung einer pulmonalen Symptomatik bronchoskopisch untersucht wurden. Bei 213 Patienten konnten alle drei biochemischen Parameter in der BALF bestimmt werden und es waren neben der Diagnose auch Geschlechtszugehörigkeit und Raucherstatus bekannt. Die Zusammensetzung dieses Patientenkollektivs, differenziert nach den zugrundeliegenden Diagnosen mit den jeweiligen Anteilen von Frauen und Rauchern zeigt Tabelle 1.

| <b>Diagnose</b> | <b>Anzahl</b> | <b>Alter</b> | <b>Frauen (%)</b> | <b>Raucher(%)</b> |
|-----------------|---------------|--------------|-------------------|-------------------|
| Kontrolle       | 51            | 52±14        | 41                | 54                |
| Alveolitis      | 6             | 61±14        | 67                | 40                |
| ILF             | 21            | 61±14        | 52                | 37                |
| Kollagenose     | 4             | 65±10        | 75                | 0                 |
| Sarkoidose      | 13            | 43±14        | 15                | 42                |
| LC              | 10            | 53±11        | 70                | 40                |
| COPD            | 16            | 61±14        | 38                | 57                |
| Pneumonie       | 23            | 46±15        | 26                | 48                |
| Pulm. Metast.   | 7             | 55±11        | 29                | 50                |
| Tuberkulose     | 27            | 39±11        | 11                | 81                |
| Bronchial-Ca.   | 35            | 61±10        | 43                | 74                |

**Tabelle 1. Basisdaten der in die Studie eingeschlossenen Patienten.**

Angegeben sind das Altersmittel ( $\pm$ SD) und der relative Anteil (in %) der Frauen und Raucher in den einzelnen Diagnosegruppen. ILF: idiopathische Lungenfibrose; LC: Lymphangiosis carcinomatosa; COPD: chronisch-obstruktive Bronchitis.

Die BALF-Wiedergewinnungsfraction, die Gesamtzellularität der BALF und die Differenzierung nach Alveolarmakrophagen, Lymphozyten und polymorphkernigen Granulozyten in den einzelnen Diagnosegruppen sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

| Diagnose      | BALF-Wiedergewinnung (%) | Zellen pro ml BALF x 10 <sup>4</sup> | AM (%) | LYM (%) | PMN (%) |
|---------------|--------------------------|--------------------------------------|--------|---------|---------|
| Kontrolle     | 63±6                     | 14,9±1,2                             | 92±1   | 5±2     | 3±1     |
| ILF           | 62±20                    | 19,8±3,1                             | 80±3   | 9±3     | 11±2    |
| Sarkoidose    | 63±14                    | 14,2±2,1                             | 76±11  | 2±8     | 3±2     |
| LC            | 54±11                    | 15,2±4,7                             | 89±4   | 5±3     | 6 ±3    |
| COPD          | 49±21                    | 12,9±4,7                             | 91±6   | 2±1     | 7±3     |
| Pneumonie     | 54±17                    | 18,7±6,3                             | 72±8   | 3±2     | 25±11   |
| Tuberkulose   | 53±22                    | 13,3±2,7                             | 93±2   | 5±3     | 2±1     |
| Bronchial-Ca. | 57±15                    | 26,3±7,1                             | 94±1   | 3±1     | 3±1     |

**Tabelle 2. BALF-Zytologie.**

AM: Alveolarmakrophagen; LYM: Lymphozyten; PMN: polymorphkernige Leukozyten; ILF: idiopathische Lungenfibrose; LC: Lymphangiosis carcinomatosa; COPD: chronisch-obstruktive Bronchitis.

### 3.2. Etablierung und Evaluierung alternativer Protokolle der BALF-Konzentrierung

Während die HA-Konzentration direkt in den filtrierten und zentrifugierten BALF gemessen werden konnte, erforderte die Bestimmung von PIIINP sowie Kollagen VI eine 50-fache Konzentrierung der BALF. Das zunächst angewandte Standardprotokoll (vgl. 2.6.1) beinhaltete zwei Ultrafiltrationsschritte, wobei der erste Konzentrierungsschritt unter einem Druck von 3 bis 4 bar in einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt wurde. Dieses Protokoll erwies sich als sehr zeitaufwändig und es wurden deshalb zwei Alternativprotokolle evaluiert. Die Konzentrierung mittels Proteinfällung durch TCA (vgl. 2.6.2) erwies sich für die Messung von Kollagen VI als gleichwertig mit dem Standardprotokoll. Die Messungen von PIIINP ergaben jedoch dramatisch niedrigere Konzentrationen, so dass die TCA-Fällung nicht weiter angewandt wurde. Die BALF-Aufarbeitung nach dem zweiten Alternativprotokoll (vgl. 2.6.3), das eine Dialyse der Proben mit anschließender Gefriertrocknung beinhaltete, ergab sowohl für K-VI als auch PIIINP dem Standardprotokoll gleichwertige Ergebnisse. Es wurden daher die BALF-Proben durch kombinierte Dialyse und Lyophilisation aufkonzentriert.

### 3.3. Korrelation der EZM-Faktoren mit Lebensalter und Rauchen

In der Kontrollgruppe (n=51) wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen Lebensalter und in den BALF-Proben gemessenen Konzentrationen für HA, PIIINP und Kollagen VI (K-VI) sowie für die Ratio PIIINP/K-VI nachgewiesen. Ebenso wenig konnte für keinen der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen bzw. Rauchern und Nichtrauchern nachgewiesen werden.

Entsprechende statistische Analysen wurden für die ILD-Patienten durchgeführt. Um statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen, wurden die Diagnosegruppen ILF, Sarkoidose, Kollagenose und Alveolitis zusammengefasst (n=44). Wie bei den Kontrollen wurden auch bei den ILD-Patienten keine signifikanten Korrelationen zwischen Lebensalter und den in den BALF-Proben gemessenen Konzentrationen für HA, PIIINP und K-VI sowie für die Ratio PIIINP/K-VI nachgewiesen. Auch ließ sich für keinen der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen bzw. Rauchern und Nichtrauchern nachweisen.

### 3.4. Interkorrelation der EZM-Faktoren

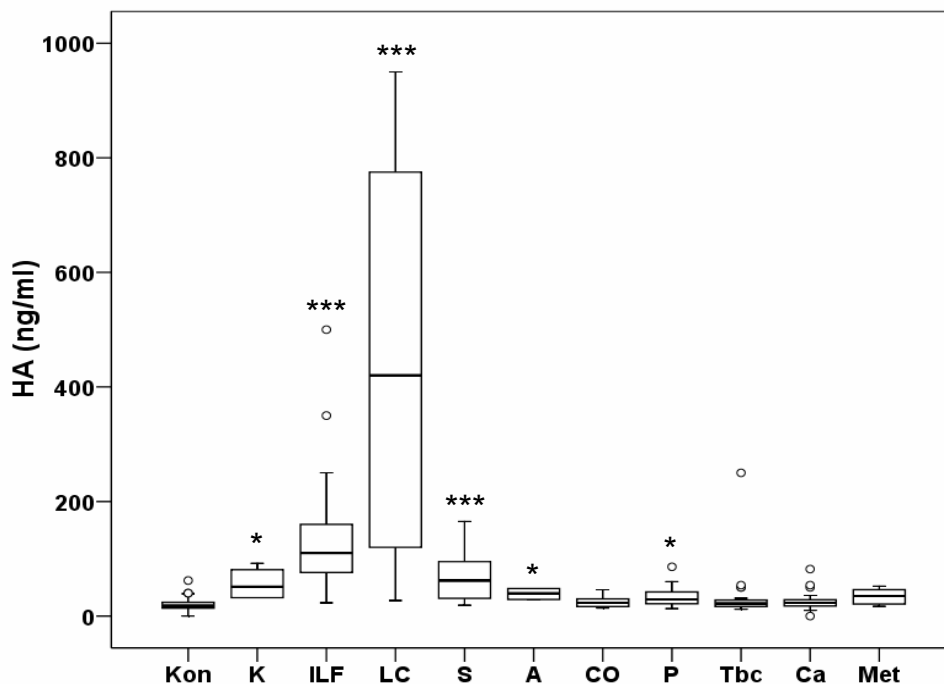
In der Kontrollgruppe (n=51) wurden keine signifikanten Korrelationen gefunden. Bei den Patienten mit fibrosierenden ILD (ILF, Sarkoidose, Kollagenose und Alveolitis; n=44) zeigte sich lediglich eine mäßige Korrelation zwischen den BALF-Konzentrationen von HA und PIIINP ( $r_s=0,45$ ,  $p<0,01$ ). Wurden ILD- mit LC-Patienten zusammengefasst (n=54), fand sich eine mäßige Korrelation zwischen HA und PIIINP ( $r_s=0,53$ ,  $p<0,01$ ) sowie schwache Korrelationen zwischen HA und K-VI ( $r_s=0,4$ ,  $p<0,01$ ) bzw. zwischen K-VI und PIIINP ( $r_s=0,34$ ,  $p<0,05$ ).

Eine Korrelationsanalyse der übrigen Diagnosegruppen (COPD, Pneumonie, Tbc, Bronchialkarzinom und Lungenmetastasen, n=108) zeigte lediglich schwache Korrelationen zwischen HA und K-VI ( $r_s=0,2$ ,  $p<0,05$ ) sowie zwischen HA und PIIINP ( $r_s=0,37$ ,  $p<0,05$ ).

### 3.5. BALF-Konzentration von Hyaluronsäure

Im Folgenden sind die in den BALF-Proben gemessenen HA-Konzentrationen jeweils als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Bei den lungengesunden Kontrollen wurden in der BALF relativ niedrige HA-Konzentrationen gemessen ( $20,2\pm 1,6$  ng/ml). Die HA-

Konzentrationen bei den Patienten mit COPD ( $24,1 \pm 2,2$  ng/ml), Tuberkulose ( $32,7 \pm 8,6$  ng/ml), Bronchialkarzinom ( $25,1 \pm 2,4$  ng/ml) und Lungenmetastasen ( $34,0 \pm 5,5$  ng/ml) unterschieden sich nicht signifikant von den Kontrollwerten. Geringfügig, aber signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhte HA-Konzentrationen wurden gemessen bei Patienten mit Pneumonie ( $34,0 \pm 3,6$  ng/ml) und Alveolitis ( $38,7 \pm 3,6$  ng/ml). Etwa 3-fach erhöht waren die HA-Konzentrationen bei ILD-Patienten mit den Diagnosen Kollagenose ( $56,5 \pm 14,8$  ng/ml) bzw. Sarkoidose ( $67,2 \pm 11,5$  ng/ml). Bei ILF-Patienten wurde ein im Mittel 7-fach erhöhter Wert gemessen ( $144,6 \pm 24,6$  ng/ml) und sehr stark erhöht war schließlich die mittlere HA-Konzentration bei LC-Patienten ( $453 \pm 102$  ng/ml). Eine graphische Darstellung der in den Diagnosegruppen jeweils gemessenen HA-Konzentrationen (Medianwerte und Streubereich) zeigt Abbildung 1.

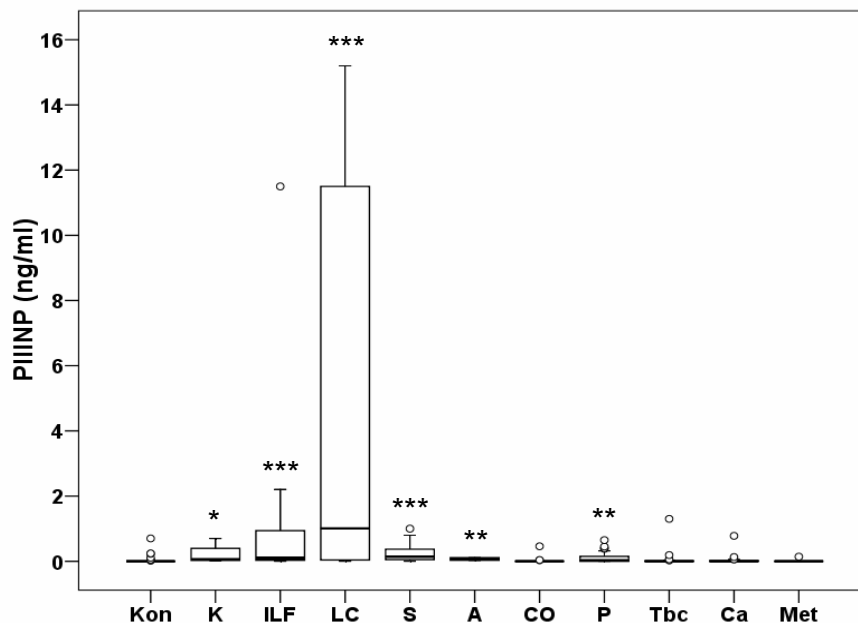


**Abb. 1. Konzentration von Hyaluronsäure (HA) in den BALF.**

Kon: Kontrollen, K: Kollagenose, ILF: idiopathische Lungenfibrose, LC: Lymphangiosis carcinomatosa, S: Sarkoidose, A: Alveolitis, CO: chronisch-obstruktive Bronchitis, P: Pneumonie, Tbc: Tuberkulose, Ca: Bronchialkarzinom, Met: Lungenmetastasen. Dargestellt sind jeweils Mediane, 25. und 75. Perzentile (Boxen) und Extremwerte (Kreise). Die Sterne bezeichnen das jeweilige Signifikanzniveau des Unterschieds zur Kontrollgruppe (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.6. BALF-Konzentration von PIIINP

Im Folgenden sind die in den BALF-Proben jeweils gemessenen PIIINP-Konzentrationen wiederum als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. In der Kontrollgruppe fand sich eine sehr niedrige mittlere PIIINP-Konzentration ( $0,03\pm 0,015$  ng/ml). Ähnlich niedrige Konzentrationen wurden bestimmt bei COPD ( $0,03\pm 0,03$  ng/ml), Tuberkulose ( $0,06\pm 0,05$  ng/ml), Bronchialkarzinom ( $0,03\pm 0,02$  ng/ml) und Lungenmetastasen ( $0,02\pm 0,02$  ng/ml). Bei den Diagnosen Alveolitis ( $0,07\pm 0,01$  ng/ml) und Pneumonie ( $0,12\pm 0,04$  ng/ml) wurden jeweils leicht, aber signifikant erhöhte Konzentrationen gemessen. Deutlicher erhöht waren die Konzentrationen hingegen bei ILD-Patienten mit den Diagnosen Kollagenose ( $0,21\pm 0,16$  ng/ml) und Sarkoidose ( $0,29\pm 0,09$  ng/ml) und stark erhöht war der mittlere PIIINP-Spiegel bei ILF-Patienten ( $0,92\pm 0,54$  ng/ml), während bei LC wiederum höchsten Konzentrationen gemessen wurden ( $4,6\pm 1,9$  ng/ml). Eine graphische Darstellung der in den einzelnen Diagnosegruppen jeweils gemessenen PIIINP-Konzentrationen (Medianwerte und Streubereich) zeigt Abbildung 2.

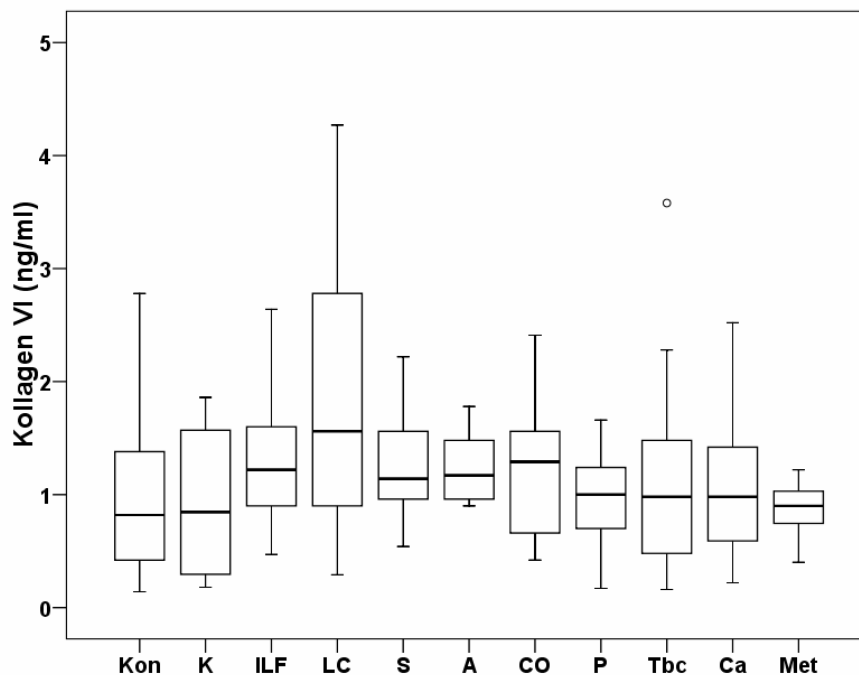


**Abb. 2. Konzentration von Prokollagen-III-N-Peptid (PIIINP) in BALF.**

Kon: Kontrollen, K: Kollagenose, ILF: idiopathische Lungenfibrose, LC: Lymphangiosis carcinomatosa, S: Sarkoidose, A: Alveolitis, CO: chronisch-obstruktive Bronchitis, P: Pneumonie, Tbc: Tuberkulose, Ca: Bronchialkarzinom, Met: Lungenmetastasen. Dargestellt sind die Mediane, 25. und 75. Perzentile (Boxen) und Extremwerte (Kreise). Die Sterne bezeichnen das jeweilige Signifikanzniveau des Unterschieds zur Kontrollgruppe (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.7. BALF-Konzentration von Kollagen VI

Im Folgenden sind die in den BALF-Proben gemessenen Konzentrationen von K-VI jeweils wiederum als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. In der Kontrollgruppe wurde eine Konzentration von  $0,91\pm 0,08$  ng/ml bestimmt. Ähnlich niedrig waren die bei Kollagenose ( $0,93\pm 0,39$  ng/ml), Alveolitis ( $1,24\pm 0,14$  ng/ml), Pneumonie ( $0,93\pm 0,09$  ng/ml), Bronchialkarzinom ( $1,05\pm 0,10$  ng/ml) und pulmonalen Metastasen ( $0,87\pm 0,10$  ng/ml) gemessenen Konzentrationen. Höher, aber nicht signifikant unterschiedlich waren die K-VI-Konzentrationen bei COPD ( $1,25\pm 0,15$  ng/ml), ILF ( $1,36\pm 0,13$  ng/ml), Sarkoidose ( $1,26\pm 0,14$  ng/ml) und LC ( $1,97\pm 0,44$  ng/ml). Eine graphische Darstellung der in den Diagnosegruppen jeweils gemessenen K-VI-Konzentrationen (Medianwerte und Streubereich) zeigt Abbildung 3.



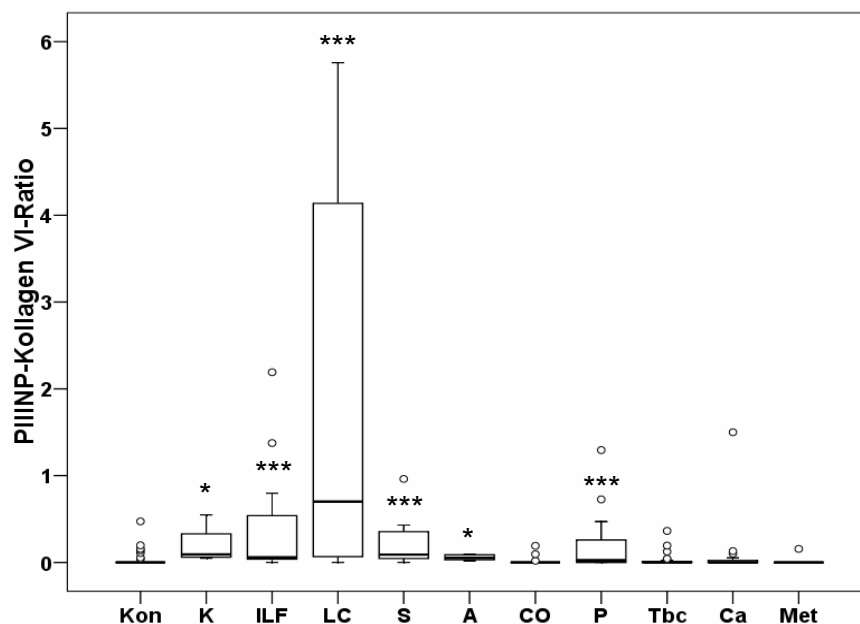
**Abb. 3. Konzentration von Kollagen VI in BALF.**

Kon: Kontrollen, K: Kollagenose, ILF: idiopathische Lungenfibrose, LC: Lymphangiosis carcinomatosa, S: Sarkoidose, A: Alveolitis, CO: chronisch-obstruktive Bronchitis, P: Pneumonie, Tbc: Tuberkulose, Ca: Bronchialkarzinom, Met: Lungenmetastasen. Dargestellt sind die Mediane, 25. und 75. Perzentile (Boxen) und Extremwerte (Kreise).



### 3.8. Quotient aus PIIINP und Kollagen-VI

Aus den in den BALF-Proben gemessenen Konzentrationen von PIIINP und Kollagen VI (K-VI) wurde die Ratio PIIINP/K-VI als Parameter des Verhältnisses aus Kollagensynthese (PIIINP) und Kollagenabbau (K-VI) berechnet. Im Folgenden sind die Quotienten jeweils als Mittelwert±Standardfehler angegeben. In der Kontrollgruppe wurde eine sehr niedrige Ratio von  $0,02\pm 0,01$  bestimmt, ähnlich niedrige Werte fanden sich bei COPD ( $0,02\pm 0,01$ ), Tuberkulose ( $0,03\pm 0,02$ ), Bronchialkarzinom ( $0,06\pm 0,04$ ) sowie Lungenmetastasen ( $0,02\pm 0,02$ ). Eine signifikant erhöhte Ratio wurde bei den Pneumonien als einziger Nicht-ILD bestimmt ( $0,19\pm 0,06$ ). Bei allen fibrosierenden ILD fanden sich im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Werte: bei Kollagenosen ( $0,19\pm 0,12$ ), ILF ( $1,03\pm 0,70$ ), Sarkoidose ( $0,22\pm 0,08$ ) und Alveolitis ( $0,06\pm 0,01$ ). Die höchsten Werte fanden sich wiederum bei LC ( $2,58\pm 1,33$ ). Die Mediane und Streubereiche der in den einzelnen Diagnosegruppen sowie bei den Kontrollen berechneten Quotienten PIIINP/K-VI sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

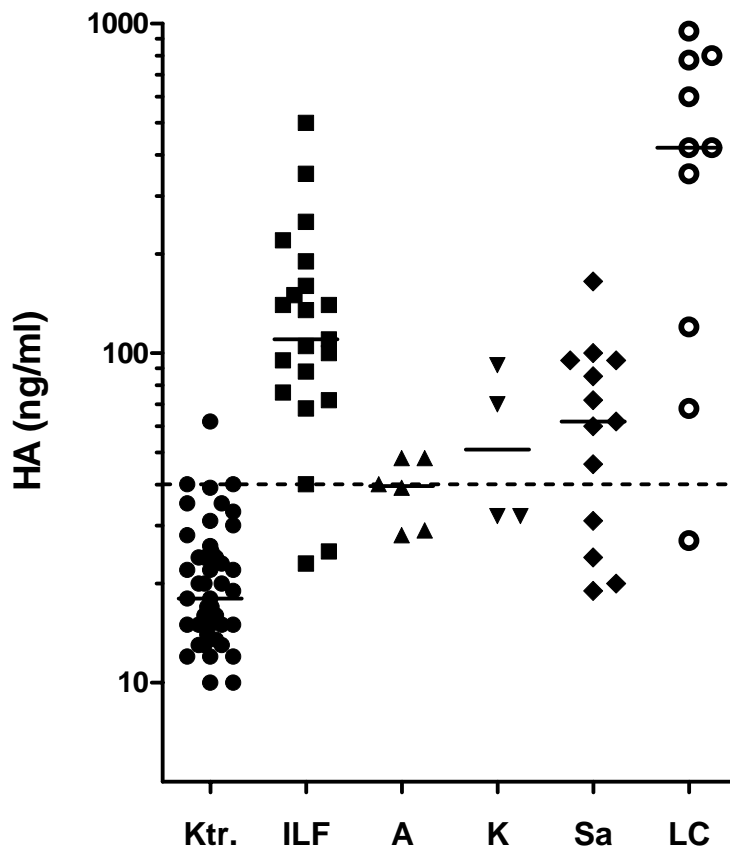


**Abb. 4. Ratio PIIINP-Kollagen VI in BALF.**

Kon: Kontrollen, K: Kollagenose, ILF: idiopathische Lungenfibrose, LC: Lymphangiosis carcinomatosa, S: Sarkoidose, A: Alveolitis, CO: chronisch-obstruktive Bronchitis, P: Pneumonie, Tbc: Tuberkulose, Ca: Bronchialkarzinom, Met: Lungenmetastasen. Dargestellt sind die Mediane, 25. und 75. Perzentile (Boxen) und Extremwerte (Kreise). Die Sterne bezeichnen das jeweilige Signifikanzniveau des Unterschieds zur Kontrollgruppe (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ).

### 3.9. Diagnostische Trennschärfe

Auf der Grundlage der in den BALF-Proben gemessenen Konzentrationen der EZM-Komponenten wurden diagnostische Tests konzipiert und die Sensitivitäten für die Diagnose der jeweiligen ILD bzw. die Spezifitäten für Kontrollen und Nicht-ILD berechnet. In den folgenden Abbildungen sind jeweils für Kontrollen und ILD Einzelwertdarstellungen der BALF-Konzentrationen von HA (Abb. 5), PIIINP (Abb. 6) und PIIINP/K-VI (Abb.7) mit den der Berechnung von Sensitivität und Spezifität jeweils zugrundeliegenden Schwellenkonzentrationen zu sehen. Als diagnostische Schwellenwerte wurden 40 ng/ml (HA), 0,02 ng/ml (PIIINP) und 0,03 (PIIINP/K-VI) festgelegt. Eine zusammenfassende Darstellung der errechneten Sensitivitäten und Spezifitäten der in den BALF-Proben untersuchten Parameter einschließlich zeigt Tabelle 5.



**Abb. 5. Einzelwertdarstellung der Hyaluronsäure (HA)-Konzentrationen in BALF.**

Der diagnostische Schwellenwert für den Test wurde auf 40 ng/ml (unterbrochene horizontale Linie) festgelegt. Ktr.: Kontrollen; ILF: idiopathische Lungenfibrose; A: Alveolitis; K: Kollagenose; Sa: Sarkoidose; LC: Lymphangiosis carcinomatosa. Der Medianwert wird jeweils durch den horizontalen Strich angegeben.





kleinen und deshalb nicht repräsentativen Gruppe von Patienten mit Alveolitiden eine hohe Sensitivität. In der Kontrollgruppe wurde eine Spezifität von 0,9 erreicht und bei den nicht interstitiellen Lungenkrankheiten zeigte sich eine Spannweite von 0,43 bis 0,86. Die Sensitivität des Tests auf Kollagen-VI (diagnostischer Schwellenwert 2 ng/ml) ergab für alle untersuchten ILD Werte von jeweils deutlich unter 0,5. Mit dem Quotienten PNIIP/K-VI wurde nur bei Kollagenosen und LC eine Sensitivität von mindestens 0,9 erzielt. Bei den übrigen ILD war die Sensitivität jedoch geringer. Die erzielte Spezifität lag im Bereich zwischen 0,52 und 0,88.

|             | n  | HA         |             | PIIINP     |             | K-VI    |             | PIIINP/K-VI |       |
|-------------|----|------------|-------------|------------|-------------|---------|-------------|-------------|-------|
|             |    | 40 ng/ml   |             | 0,02 ng/ml |             | 2 ng/ml |             | 0,03        |       |
| Diagnose    | n  | Sens.      | Spez.       | Sens.      | Spez.       | Sens.   | Spez.       | Sens.       | Spez. |
| Alveolitis  | 6  | 0,50       |             | <b>1</b>   |             | 0       |             | 0,83        |       |
| Kollagenose | 4  | 0,50       |             | 0,75       |             | 0       |             | <b>1</b>    |       |
| ILF         | 21 | <b>0,9</b> |             | 0,76       |             | 0,19    |             | 0,76        |       |
| Sarkoidose  | 13 | 0,69       |             | 0,77       |             | 0,08    |             | 0,85        |       |
| LC          | 10 | <b>0,9</b> |             | <b>0,9</b> |             | 0,4     |             | <b>0,9</b>  |       |
| Kontrollen  | 51 |            | <b>0,98</b> |            | <b>0,90</b> |         | <b>0,96</b> |             | 0,86  |
| COPD        | 16 |            | <b>0,94</b> |            | 0,81        |         | 0,88        |             | 0,88  |
| Ca.         | 35 |            | 0,83        |            | 0,77        |         | <b>0,94</b> |             | 0,77  |
| Met.        | 7  |            | 0,57        |            | 0,86        |         | <b>1</b>    |             | 0,86  |
| Pneumonie   | 23 |            | 0,57        |            | 0,43        |         | <b>1</b>    |             | 0,52  |
| Tbc         | 27 |            | 0,85        |            | 0,81        |         | <b>0,93</b> |             | 0,81  |

**Tabelle 5. Diagnostische Trennschärfe der in den BALF untersuchten biochemischen Parameter.**

Unterhalb der Parameter angegeben sind jeweils die diagnostischen Schwellenwerte. Fett hervorgehoben sind Sensitivitäten bzw. Spezifitäten  $\geq 0,9$ . ILF: idiopathische Lungenfibrose; LC: Lymphangiosis carcinomatosa; Ca.: Bronchialkarzinom; COPD: chronisch-obstruktive Bronchitis; Tbc: Tuberkulose. Sens.: Sensitivität; Spez.: Spezifität.

## 4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die diagnostische Wertigkeit der in BALF gemessenen Konzentrationen von Hyaluronsäure (HA), Prokollagen-III-N-terminalem Peptid (PIIINP) und Kollagen VI (K-VI) bei Patienten mit ILD im Vergleich mit lungengesunden Kontrollen sowie Patienten mit nichtinterstitiellen Lungenerkrankungen zu bestimmen. Dieses ist die erste Untersuchung, in der diese drei EZM-Komponenten simultan in BALF-Proben in einem größeren, das diagnostische Spektrum einer großen pulmonologischen Klinik repräsentierende Kollektiv von Patienten mit interstitiellen und nichtinterstitiellen Lungenerkrankungen gemessen wurden.

Verlässliche epidemiologische Daten zu ILD liegen für Deutschland oder andere europäische Länder nicht vor. Eine Hochrechnung der Zahlen aus dem Register des US-amerikanischen Bundesstaates New Mexico als der bislang einzigen publizierten epidemiologischen Erhebung zu ILD (Coultas DB, et al., 2004) auf die Bevölkerungszahl Deutschlands ergibt eine Prävalenz von ca. 50-60.000 Patienten.

Da die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an BALF-Proben von Patienten durchgeführt wurden, die im Zeitraum von 1990 bis 1992 bronchoskopisch untersucht wurden, konnte die Gruppe der Patienten mit der Diagnose ILF nicht weiter differenziert werden in IPF/UIP und andere IIP im Sinne der sehr viel später publizierten Kriterien der US-amerikanischen und europäischen Fachgesellschaften (vgl. 1.1; American Thoracic Society/ European Respiratory Society, 2002).

### 4.1 Evaluierung alternativer Protokolle der BALF-Konzentrierung

Während für die Bestimmung von HA filtrierte und zentrifugierte BALF unmittelbar in den Immunoassay eingesetzt werden konnten, mussten für die ebenfalls auf Immunoassays beruhenden Messungen von PIIINP und Kollagen VI die BALF-Proben zunächst stark eingeeengt werden. Hierfür wurde zunächst als Referenzprotokoll eine sehr aufwändige, zweistufige Membranultrafiltration eingesetzt, weshalb zwei alternative Protokolle etabliert und evaluiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentrierung durch TCA-Präzipitation, welches ein übliches Standardverfahren der Proteinfällung darstellt, für die Bestimmung von PIIINP nicht geeignet war. Mittels Dialyse und nachfolgender Gefriertrocknung im Vakuum wurde jedoch ein praktikables

und der Membranultrafiltration gleichwertiges Protokoll etabliert, das im weiteren Fortgang der Untersuchungen ausschließlich angewandt wurde.

#### **4.2 BALF-Konzentrationen von Hyaluronsäure bei ILD**

Die Empfindlichkeit der verwendeten HA-RIAs mit einer unteren Detektionsgrenze von 5 ng/ml ermöglichte es, HA in nicht weiter aufkonzentrierten BALF zu messen. Die in BALF von lungengesunden Kontrollen gemessenen Konzentrationen von im Mittel 20 ng/ml (<5 ng/ml bis 62 ng/ml) lag sehr dicht bei dem von Larsson et al. beschriebenen Mittelwert von 22 ng/ml (Larsson K, et al., 1992). Abweichend hiervon wurden in früheren Untersuchungen deutlich geringere Konzentrationen bei gesunden Kontrollen (Hällgren R, et al., 1985; Bjermer L, et al., 1987) und in einer späteren Untersuchung mit im Mittel 39 ng/ml wiederum eine höhere Konzentration angegeben (Milman N, et al., 1995). Die in der vorliegenden Arbeit und in der publizierten Literatur beschriebenen Messungen wurden nach demselben RIA-Prinzip durchgeführt. Die Unterschiede sind insofern möglicherweise auf Unterschiede in der Gewinnung und Aufarbeitung der BALF oder auf Unterschiede bei den biologischen Reagenzien des Kits (HA-bindendes Protein, Antikörper) zurückzuführen. Für letztere Annahme spricht, dass die Untersuchungen mit der größten Übereinstimmung bei den HA-Konzentrationen (Larsson K, et al., 1992) ungefähr im gleichen Zeitraum durchgeführt wurden wie die Messungen, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen. Da in dieser Arbeit Unterschiede zwischen lungengesunden Kontrollen und ILD-Patienten untersucht wurden, sind Abweichungen der absoluten Konzentrationswerte jedoch von sekundärer Bedeutung.

In dieser Arbeit wurden bei allen untersuchten ILD signifikant erhöhte BALF-Konzentrationen für HA gefunden, wobei diese Erhöhungen in den einzelnen Diagnosegruppen unterschiedlich stark ausgeprägt waren und bei ILF (7-fach erhöht) und LC (über 20-fach erhöht) die höchsten Werte bestimmt wurden. In der BALF von Sarkoidose-Patienten wurden in dieser Untersuchung mit im Mittel 67 ng/ml etwas über 3-fach erhöhte HA-Konzentrationen gemessen. Dieser relative Unterschied entspricht sehr genau den in der Literatur angegebenen Anstiegen der BALF-Konzentrationen für HA bei Sarkoidose (Hällgren R, et al., 1985; Bjermer L, et al., 1987).

Die bei ILF im Vergleich zu Kontrollen 7-fach höhere mittlere HA-Konzentration entspricht ungefähr der von Bjermer et al. in deren ILF-Stichprobe gefundenen 5-fachen Erhöhung (Bjermer L, et al., 1989), liegt aber deutlich höher als die in einer späteren

Arbeit beschriebene, lediglich etwa 2-fache Erhöhung in einer gemischten Stichprobe bestehend aus Patienten mit ILF und mit Kollagenosen (Milman N, et al., 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden in einer kleinen Gruppe von Patienten mit Kollagenose-assoziiierter Lungenfibrose (n=4) im Vergleich zu ILF-Patienten deutlich geringere HA-Konzentrationen gemessen.

In einer kleinen Gruppe von Alveolitis-Patienten wurde in dieser Arbeit eine etwa 2-fach erhöhte mittlere HA-Konzentrationen gemessen, während Larsson und Mitarbeiter mehr als 20-fach erhöhte Konzentrationen bestimmt haben (Larsson K, et al., 1992). Der Grund für diese Diskrepanz liegt möglicherweise darin, dass Larsson et al. Patienten in einem hoch akuten Krankheitsstadium mit schweren Allgemeinsymptomen (Fieber und Schüttelfrost) untersucht haben.

Die in dieser Arbeit gefundenen, teilweise exzessiv erhöhten HA-Konzentrationen in der BALF von LC-Patienten wurden in der publizierten Literatur bisher nicht beschrieben. Der maligne Charakter der Erkrankung *per se* scheint jedoch nicht ursächlich für die stark erhöhten HA-Konzentrationen zu sein, da bei Patienten mit Bronchialkarzinom keine und bei Patienten mit Lungenmetastasen lediglich geringfügig erhöhte Werte gefunden wurden. Da ein Teil der HA über das Lymphgefäßsystem aus dem Interstitium in das Blutgefäßsystem transportiert wird, bevor sie im vaskulären Endothel und in der Leber abgebaut wird (Antonias, KN, et al. 1973; Fraser JR, et al., 1981), ist anzunehmen, dass neben einer möglicherweise erhöhten HA-Synthese vor allem eine massive Lymphabflussbehinderung als Folge der LC ursächlich für die stark erhöhten HA-Konzentrationen in der BALF war.

Es wurde hier für einen diagnostischen Test ein BALF-Schwellenwert von 40 ng/ml HA festgelegt und damit Sensitivitäten von jeweils 90% für ILF und LC berechnet. Für die Entitäten Sarkoidose und Alveolitis lag die Sensitivität des Test jedoch deutlich unter 90%. Eine denkbare klinische Anwendung des Tests im Rahmen der Diagnostik von Lungenfibrosen wird weiter relativiert durch eine insgesamt unzureichende Spezifität (Tabelle 5). Insofern ist die HA-Konzentration in BALF nicht geeignet als biochemischer Marker für Lungenfibrosen im Allgemeinen. In der Praxis würden jedoch Lungen-erkrankungen wie Lobär- und Bronchopneumonie oder Tumorerkrankungen bereits aufgrund des klinischen Untersuchungsbefundes, der Laboruntersuchungen und des thorakalen Röntgenbildes diagnostiziert werden, so dass die geringe Spezifität des HA-Tests für diese Krankheiten in der Praxis keine Konsequenzen hätte. Aufgrund der Resultate dieser Arbeit und der Ergebnisse von Milman und Mitarbeitern (Milman N, et



al., 1995) und unter dem Aspekt der relativ unaufwändigen Durchführbarkeit des RIA ohne Notwendigkeit einer BALF-Konzentrierung könnte die Bestimmung der HA-Konzentrationen in BALF-Proben durchaus eine Rolle in der weiteren Differentialdiagnostik der ILF spielen. Eine weitere Evaluierung dieses Parameters mit größeren ILF-Fallzahlen ist jedoch bisher ausgeblieben. Von diagnostischer Bedeutung ist weiterhin die Beobachtung von Milman und Mitarbeitern, dass die mittlere BALF-Konzentration von HA bei ILF-Patienten um 140% über der Serumkonzentration lag, während dieser Unterschied bei den gesunden Kontrollen nur 20% betrug und sich die Serumkonzentrationen der Lungenfibrose-patienten nicht signifikant von denen der gesunden Kontrollen unterschieden (Milman N, et al., 1995). Dieses Ergebnis unterstreicht die größere Aussagekraft der Messung von EZM-Molekülen in BALF im Vergleich zu Serumproben bei Lungenfibrosen.

#### **4.3 BALF-Konzentrationen von PIIINP bei ILD**

Die niedrigen Konzentrationen von PIIINP in der BALF erforderten eine starke Konzentrierung, um mit dem hier verwendeten RIA überhaupt Messungen durchführen zu können. Die untere Detektionsschwelle des RIA liegt bei 1 ng/ml (entsprechend einer PIIINP-Konzentration von 0,02 ng/ml in der BALF vor Konzentrierung). In der BALF lungengesunder Kontrollen war die PIIINP-Konzentration sehr niedrig und lag in 45 von 51 Fällen unterhalb der Detektionsschwelle des Assays, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt (Low RB, et al., 1983; Bjermer L, et al., 1986). Statistisch signifikant erhöhte BALF-Konzentrationen von PIIINP wurden in allen ILD-Gruppen gefunden, wobei abhängig von der diagnostischen Zuordnung diese Anstiege unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Die bei den Patienten mit ILF in dieser Arbeit gemessene mittlere PIIINP-Konzentration von 0,9 ng/ml BALF lag deutlich unter dem Wert von 5 ng/ml, der in einer ungefähr zeitgleich durchgeführten Studie beschrieben wurde (Low RB, et al., 1992). Der Unterschied hat vermutlich technische Gründe, da Low und Mitarbeiter auch bei ihren Kontrollen mit 0,1 ng/ml BALF mindestens 5-fach höhere Werte gemessen haben als in dieser Arbeit bestimmt wurden. In beiden Untersuchungen wurde übereinstimmend eine bei ILF-Patienten im Vergleich zu lungengesunden Kontrollen 50-fach erhöhte PIIINP-Konzentration in BALF gemessen und damit ein deutlich größerer Unterschied gefunden als in den ersten Beschreibungen (Low RB, et al., 1983; Kirk JM, et al., 1984), was vermutlich auf unterschiedliche Assays zurückzuführen ist.

Von Bedeutung ist weiterhin die Beobachtung, dass bei ILF die in BALF-Proben gemessene mittlere PIIINP-Konzentration 24-fach höher war als in den korrespondierenden Serumproben, ein Ergebnis, das in ähnlicher Weise bereits für HA beschrieben wurde (vgl. 5.2) und eine stark erhöhte pulmonale Synthese von Kollagen-III anzeigt (Low RB, et al., 1992). Untersuchungen von humanen Lungenbiopsien mittels Immunhistochemie konnten zeigen, dass bei Lungenfibrose Kollagen-III vermehrt in den verdickten Alveolarsepten und im Lungeninterstitium nachweisbar war (Raghu G, et al., 1985). In einer später durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung wurde PIIINP in Biopsien von Patienten mit ILF/UIP insbesondere unterhalb metaplastischer Alveolarepithelien nachgewiesen (Kaarteenaho-Wiik R, et al., 2005).

Die in dieser Arbeit in BALF-Proben von Sarkoidosepatienten bestimmte PIIINP-Konzentration (im Mittel 0,29 ng/ml) war im Vergleich zu Kontrollen etwa 10-fach erhöht und lag somit unterhalb der in einem großen Sarkoidosekollektiv gemessenen Konzentration von 0,6 ng/ml (Bjermer L, et al., 1986). Die Autoren dieser Studie konnten in den mituntersuchten Serumproben PIIINP nicht messen, während Luisetti und Mitarbeiter auch in Serumproben PIIINP-Konzentrationen von 11 ng/ml bei Kontrollen und 19 ng/ml bei Sarkoidosepatienten gemessen haben (Luisetti M, et al., 1990). Die sehr hohen Werte bei den Kontrollen legen eine methodische Ursache der stark abweichenden PIIINP-Konzentrationen dieser Studie nahe. Lammi und Mitarbeiter haben PIIINP-Konzentrationen in BALF-Proben von Sarkoidosepatienten untersucht, wobei sie nach Grad der Erkrankung und Symptomatik differenzierten (Lammi L, et al., 1997). Sie konnten zeigen, dass Patienten im Stadium II-III etwa 2-fach höhere PIIINP-Konzentrationen aufwiesen als Patienten im Stadium 0-I. Noch größer war der relative Unterschied zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten. Im Stadium 0-I zeigten symptomatische Patienten 9-fach höhere Konzentrationen als asymptomatische, im Stadium II-III war der Unterschied 5-fach. Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Bjermer et al., Lammi et al. und den eigenen Ergebnissen steht die Untersuchung von Cantin et al., die bei Sarkoidose im Vergleich zu Kontrollen keine signifikant erhöhten PIIINP-Konzentrationen in BALF-Proben nachweisen konnten, was wiederum auch methodische Ursachen haben könnte, da in derselben Untersuchung auch in BALF-Proben von ILF-Patienten deutlich geringere Konzentrationen beschrieben wurden (Cantin AM, et al., 1988).

Die Gewebelokalisation von PIIINP wurde auch in Lungenbiopsien von Sarkoidosepatienten immunhistochemisch untersucht und es zeigte sich die stärkste Anfärbung in Form extrazellulärer Fasern, die um die Granulome herum angeordnet waren (Kaarteenaho-Wiik R, et al., 2005). In einer weiteren Untersuchung derselben Arbeitsgruppe wurde die Expression von PIIINP wiederum mittels Immunhistochemie vergleichend bei Sarkoidose, Tuberkulose und atypischen Mykobakteriosen untersucht und eine signifikant stärkere Anfärbung in Lungenbiopsien von Sarkoidosepatienten beschrieben, wobei PIIINP auch in Biopsien von Patienten mit Tuberkulose und atypischer Mykobakteriose detektiert wurde (Kaarteenaho-Wiik R, et al., 2007). In dieser Arbeit wurde in BALF-Proben von Tuberkulosepatienten jedoch keine im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöhte PIIINP-Konzentration gemessen.

In unserem sehr kleinen Alveolitiskollektiv lag die mittlere PIIINP-Konzentration mit 0,07 ng/ml gut 3-fach oberhalb der Detektionsschwelle. Teschler und Mitarbeiter haben bei Patienten in einem frühen Stadium der Alveolitis mit 5 ng/ml BALF weitaus höhere PIIINP-Konzentrationen gefunden (Teschler H, et al., 1993). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine besonders hohe fibrogenetische Aktivität in der akuten Phase einer Alveolitis gefunden wird und lässt vermuten, dass die in dieser Arbeit untersuchten Patienten ein Krankheitsstadium mit deutlich geringerer fibrogenetischer Aktivität repräsentierten. Lammi und Mitarbeiter haben bei Patienten mit fibrosierender Alveolitis in BALF-Proben mit im Mittel 1,9 ng/ml ebenfalls deutlich höhere PIIINP-Konzentrationen gemessen und damit eine 20-fach höhere Konzentration als bei Kontrollen mit 0,01 ng/ml (Lammi L, et al., 1999). Die Autoren dieser Studie haben durch ein Follow-up der Patienten zeigen können, dass höhere PIIINP-Konzentrationen mit einer schlechteren Prognose der Alveolitispatienten assoziiert waren und damit die prognostische Bedeutung dieses Parameters belegt.

Im experimentellen Modell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose der Ratte wurde eine vermehrte extrazelluläre Ablagerung von Kollagen-III beschrieben (Last JA, Reiser KM, 1989; Shahzeidi S, et al., 1993). Kausal scheint die vermehrte Bildung von Kollagen-III durch das Zytokin TGF $\beta$ -1 bedingt zu sein, da durch Überexpression von TGF $\beta$ -1 bei der Maus eine Lungenfibrose mit einer verstärkten Ablagerung von Kollagen-III induziert werden konnte (Kenyon NJ, et al., 2003).

Mit dem hier verwendeten Assay war PIIINP in der BALF der Kontrollen in den meisten Fällen nicht quantifizierbar. Wir haben daher die untere Detektionsschwelle von 0,02 ng/ml als Testkriterium festgelegt und eine Spezifität von 0,90 in der Kontrollgruppe

erhalten. Bei den größeren Patientengruppen wurden mit diesem Test Sensitivitäten von 0,76 bzw. 0,77 (ILF, Sarkoidose) und damit eine nur mäßige Empfindlichkeit des PIIINP-Tests erzielt. Demgegenüber stehen Spezifitäten bei nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten von 0,43 bis 0,86. In Bezug auf die Sensitivität bietet die Bestimmung von PIIINP keine Vorteile bei ILD im Vergleich mit dem HA-Test. Insbesondere bei der ILF ist die Bestimmung von HA überlegen. Im Vergleich mit dem HA-Test zeigt die Bestimmung von PIIINP auch keine bessere Spezifität bei den nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten. Nachteilig für eine klinische Anwendung ist die Notwendigkeit der BALF-Konzentrierung. Insgesamt ist der mögliche diagnostische Stellenwert der PIIINP-Bestimmung aus den hier erarbeiteten Daten nicht sicher abzuleiten.

#### **4.4 BALF-Konzentrationen von Kollagen-VI bei ILD**

Die BALF-Konzentration von Kollagen-VI zeigte nur geringe Unterschiede zwischen den in BALF-Proben der Kontrollen (im Mittel 0,9 ng/ml) und den in den einzelnen Diagnosegruppen gemessenen Konzentrationen. Höhere Konzentrationen wurden nur bei Patienten mit ILF, LC und COPD gemessen, wobei BALF-Proben bei LC wiederum die höchsten Konzentrationen aufwiesen (im Mittel 2 ng/ml). Statistisch signifikant wurden die Unterschiede jedoch nicht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen der Konzentration von Kollagen-VI in der BALF unter der Annahme durchgeführt, dass der Nachweis von Kollagen-VI in der BALF den Grad des EZM-Abbaus widerspiegelt, während die Messungen von PIIINP als Parameter für die jeweilige Aktivität der Matrixneusynthese durchgeführt wurden. Die Hypothese, dass die Konzentration von Kollagen-VI eher die Degradation der EZM reflektiert, wurde durch Messungen in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Beobachtungen aus einer Therapiestudie bei Leberfibrose entwickelt (Schuppan D, et al., 1985; Schuppan D, et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass die mit dem hier verwendeten Assay gemessenen erhöhten Konzentrationen von Kollagen-VI in Serumproben zu etwa 80% auf niedermolekularem Kollagen-VI (d. h. Abbauprodukten) beruhten (Oesterling C, 1992). Unter der Annahme der Hypothese, dass Kollagen-VI den EZM-Abbau widerspiegelt, würde man die nur moderat und nicht signifikant erhöhten Werte bei ILD als Ausdruck einer geringfügig gesteigerten Degradation der EZM interpretieren, die aber durch die ebenfalls gesteigerte Fibrogenese überkompensiert wird. Würde für die BALF-Konzentration von Kollagen-VI ein diagnostischer Schwellenwert von 2 ng/ml

(Mittelwert Kontrollgruppe plus 2 SD) festgelegt, erwies sich der Test jedoch als praktisch wertlos für die weitere Differenzialdiagnose der Lungenfibrosen (vgl. Tabelle 5).

#### 4.5. BALF-Ratio PIIINP/K-VI bei ILD

Unter der Annahme, dass die BALF-Konzentrationen von PIIINP als Maß der Fibrogenese und von Kollagen-VI als Parameter der Kollagen Degradation (vgl. 5.4) aufgefasst werden können, wurde jeweils der Quotient aus den in den BALF-Proben bestimmten Konzentrationen von PIIINP und Kollagen-VI als Ausdruck für das Gleichgewicht von Fibrogenese und -lyse berechnet. Die deskriptive statistische Analyse ergab für die Ratio PIIINP/K-VI ein der Analyse von PIIINP sehr ähnliches Ergebnis.

Bei einem diagnostischen Schwellenwert von 0,03 zeigte der PIIINP/K-VI-Test etwas höhere Sensitivitäten bei Sarkoidose, LC und bei Kollagenose-assoziierten Lungenfibrosen (bei letzteren mit Einschränkung aufgrund der geringen Fallzahl). Die Sensitivität des PIIINP/K-VI-Tests war bei ILF hingegen gleichwertig und bei Alveolitis scheinbar (wegen der kleinen Fallzahl) geringer als der PIIINP-Test. Bei den Spezifitäten war der PIIINP/K-VI-Test bei zwei nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten Diagnosegruppen (COPD, Pneumonie) leicht überlegen und bei den Kontrollen geringfügig unterlegen. Insgesamt könnte somit die simultane Bestimmung von PIIINP und Kollagen-VI mit nachfolgender Berechnung des Quotienten aus diesen Parametern einer einfachen PIIINP-Bestimmung geringfügig überlegen sein.

Bezüglich Sensitivität bei den fibrotischen interstitiellen Lungenkrankheiten scheint der PIIINP/K-VI-Test dem HA-Test in etwa gleichwertig zu sein. Der höheren Sensitivität des HA-Tests bei ILF steht eine bessere diagnostische Aussagekraft des PIIINP/K-VI-Tests bei Sarkoidose gegenüber. Während die Spezifität aller drei Tests bei lungen-gesunden Kontrollen zwischen 0,86 und 0,9 lag, erfordert die zum Teil ungenügende Spezifität bei unterschiedlichen nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten zusätzliche diagnostische Verfahren zu deren Ausschluss (vgl. Tabelle 5).

#### **4.6. Prognostische Relevanz von EZM-Faktoren in BALF**

Die klinisch bedeutsame Frage, ob die in den BALF-Proben bestimmten Konzentrationen von HA, PIIINP oder K-VI eine prognostische Aussagekraft für den weiteren Verlauf einer Lungenfibrose besitzen, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Auch in der publizierten Literatur wurden nur zwei Untersuchungen identifiziert, die sich mit dieser Fragestellung befasst haben, jedoch zu widersprüchlichen Schlussfolgerungen gelangt sind. Lalancette und Mitarbeiter konnten bei 33 Patienten mit exogen-allergischer Alveolitis (i.e. Farmerlunge) für keinen der in BALF-Proben untersuchten Fibrosefaktoren (HA, Prokollagen III, Fibronektin, Fibroblastenwachstumsfaktoren) eine Korrelation mit der Prognose der Erkrankten nachweisen (Lalancette M, et al., 1993). Im Unterschied dazu konnten Lammi und Mitarbeiter durch Untersuchungen an 18 Patienten mit fibrosierender Alveolitis über einen Follow-up Zeitraum von 6 Jahren einen Zusammenhang zwischen PIIINP-Konzentrationen in BALF-Proben und letalem Ausgang der Erkrankung aufzeigen (Lammi L, et al., 1999). Weitere Studien sind erforderlich, um den möglichen prädiktiven Wert von Matrixkomponenten in der BALF bei Patienten mit Lungenfibrose zu überprüfen.

#### **4.7 EZM-Faktoren in BALF bei nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten**

Neben BALF-Proben von lungengesunden Kontrollen wurden in dieser Arbeit auch Proben von Patienten mit nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten als weitere Kontrollen untersucht. Es wurden in BALF-Proben von Patienten mit bakterieller Pneumonie moderat, aber signifikant erhöhte Spiegel von HA und PIIINP gemessen. Dieses Ergebnis wurde in einer späteren Studie von Nordenbaek und Mitarbeitern bestätigt, die im Serum von Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie erhöhte Konzentrationen von PIIINP und HA gemessen haben, welche sich nach erfolgreicher antibiotischer Therapie wieder normalisierten (Nordenbaek C, et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtungen ist eine gestörte Barrierefunktion im Rahmen des infektiösen Geschehens mit Übertritt von HA und PIIINP in den Alveolarraum. Weiterhin ist vorstellbar, dass es auch bei der Pneumonie zu einer transienten Aktivierung der Synthese von HA und Kollagen III kommt.

Die (gering) erhöhte mittlere BALF-Konzentration von Kollagen-VI bei COPD-Patienten könnte unter der Hypothese, dass Kollagen-VI die Degradation der pulmonalen EZM widerspiegelt (vgl. 5.4), als biochemischer Marker der langsam progredienten

Zerstörung des normalen Lungengerüsts bei dieser chronischen Lungenerkrankung interpretiert werden.

## 5. Zusammenfassung

Die therapeutischen Optionen bei chronischen interstitiellen Lungenkrankheiten (ILD) sind begrenzt und die Prognose ist bei bestimmten Formen sehr ungünstig. Hinzu kommt, dass Diagnostik und prognostische Beurteilung im Einzelfall schwierig sein können, weshalb die Verfügbarkeit von sensitiven und spezifischen diagnostischen Tests von großem klinischen Nutzen wäre.

In dieser Arbeit wurde deshalb der diagnostische Stellenwert der Quantifizierung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix (EZM) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) bei verschiedenen ILD untersucht.

Es wurden die von insgesamt 237 konsekutiv im Zeitraum von 1990 bis 1992 in der Lungenklinik Heckeshorn-Zehlendorf bronchoskopisch untersuchten Patienten gewonnenen BALF aufgearbeitet. Die Daten von 213 Patienten konnten ausgewertet werden. Von diesen hatten 44 eine Form von fibrosierender ILD: 21 litten an idiopathischer Lungefibrose (ILF), 13 an Sarkoidose, 4 an einer Kollagenose, 6 an einer Alveolitis. 10 Patienten hatten eine Lymphangiosis carcinomatosa (LC). 51 Patienten, bei denen eine pulmonale Erkrankung ausgeschlossen wurde, dienten als Kontrollen. Bei weiteren 108 Patienten wurde eine nicht-interstitielle Lungenerkrankung diagnostiziert.

Bestimmt wurde in den BALF-Proben mittels Immunoassays die Konzentrationen der EZM-Faktoren Hyaluronsäure (HA), aminoterminales Prokollagen-III-Propeptid (PIIINP) und Kollagen VI (K-VI). Für die Bestimmungen von PIIINP und K-VI mussten die BALF-Proben stark konzentriert werden. Hierzu wurden als mögliche Alternativen zu dem aufwändigen Standardprotokoll zwei weitere Konzentrierungsprotokolle etabliert, optimiert und evaluiert, von denen eines sich dem Standardprotokoll als gleichwertig erwies.

Eine mäßige Korrelation wurde gefunden zwischen HA und PIIINP bei ILD. Lebensalter, Geschlecht und Raucherstatus hatten keinen erkennbaren Einfluss. Signifikant erhöhte Konzentrationen wurden für HA und PIIINP bei allen ILD gefunden, wobei die höchsten Werte mit ILF und LC assoziiert waren. K-VI zeigte nur moderate Änderungen. Bei den ILD mit mind. 10 Patienten wurde die höchste diagnostische Sensitivität ( $\geq 0,9$ ) erzielt mit dem HA-Test bei ILF und LC und mit dem Quotienten PIIINP/K-VI bei LC. Die Spezifitäten der Tests für HA, PIIINP und K-VI waren jeweils  $\geq 0,9$  bei den Kontrollen, wobei der Test auf K-VI aufgrund ungenügender Sensitivität diagnostisch ungeeignet



ist. Der Quotient PIIINP/K-VI scheint dem PIIINP-Test geringfügig überlegen zu sein, ist aber bei ILF deutlich schlechter als der HA-Test, der zudem einen Vorteil hinsichtlich Probenvorbereitung bietet. Mit Ausnahme des K-VI-Tests, der aufgrund zu geringer Sensitivität disqualifiziert wurde, zeigen alle Tests Schwächen bei der Spezifität bei nichtinterstitiellen Lungenkrankheiten. Ein möglicher Stellenwert der Bestimmung von HA und PIIINP in der BALF bei der Differentialdiagnostik von ILD kann nach den hier vorgelegten Daten nicht sicher abgeleitet werden. Weiterführende Untersuchungen dieser Parameter in umfangreicheren Patientengruppen erscheinen jedoch begründet.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Adams SL. Collagen gene expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:161-8.
2. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:646-64.
3. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:277-304.
4. Annoni G, Cargnel A, Colombo M, et al. Persistent elevation of the aminoterminal peptide of procollagen type III in serum of patients with acute viral hepatitis distinguishes chronic active hepatitis from resolving or chronic persistent hepatitis. *J Hepatol* 1986;2:379-88.
5. Antonas KN, Fraser JR, Muirden KD. Distribution of biologically labelled radioactive hyaluronic acid injected into joints. *Ann Rheum Dis* 1973;32:103-11.
6. Antoniou KM, Nicholson AG, Dimadi M, et al. Long-term clinical effects of interferon gamma-1b and colchicine in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2006;28:496-504.
7. Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, et al. Mechanisms involved in enhancement of osteoclast formation and function by low molecular weight hyaluronic acid. *J Biol Chem* 2005;280:18967-72.
8. Atkinson JC, Rühl M, Becker J, et al. Collagen VI regulates normal and transformed mesenchymal cell proliferation in vitro. *Exp Cell Res* 1996;228:283-91.
9. Aumailley M, Specks U, Timpl R. Cell adhesion to type-VI collagen. *Biochem Soc Trans* 1991;19:843-7.
10. Austrian R, McClement JH, Renzetti AD Jr, et al. Clinical and physiologic features of some types of pulmonary diseases with impairment of alveolar-capillary diffusion; the syndrome of "alveolar-capillary block". *Am J Med* 1951;11:667-85.
11. Aziz ZA, Wells AU, Hansell DM, et al. HRCT diagnosis of diffuse parenchymal lung disease: inter-observer variation. *Thorax* 2004;59:506-11.
12. Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, et al. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1040-7.

13. Bentsen KD, Hørslev-Petersen K, Junker P, Juhl E, Lorenzen I. Serum aminoterminal procollagen type III peptide in acute viral hepatitis. A long-term follow-up study. *Liver* 1987;7:96-105.
14. Bjermer L, Thunell M, Hällgren R. Procollagen III peptide in bronchoalveolar lavage fluid. A potential marker of altered collagen synthesis reflecting pulmonary disease in sarcoidosis. *Lab Invest* 1986;55:654-6.
15. Bjermer L, Engström-Laurent A, Thunell M, et al. Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis: relationship to lavage mast cells. *Thorax* 1987;42:933-8.
16. Bjermer L, Lundgren R, Hällgren R. Hyaluronan and type III procollagen peptide concentrations in bronchoalveolar lavage fluid in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* 1989;44:126-31.
17. Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F, et al. Structural and functional features of the alpha 3 chain indicate a bridging role for chicken collagen VI in connective tissues. *Biochemistry* 1990;29:1245-54.
18. Bourke SJ. Interstitial lung disease: progress and problems. *Postgrad Med J* 2006;82:494-9.
19. Cantin AM, Boileau R, Bégin R. Increased procollagen III aminoterminal peptide-related antigens and fibroblast growth signals in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:572-8.
20. Collard HR, Anstrom KJ, Schwarz MI, et al. Sildenafil improves walk distance in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2007;131:897-9.
21. Colombo M, Annoni G, Donato MF, et al., Serum type III procollagen peptide in alcoholic liver disease and idiopathic hemochromatosis: its relationship to hepatic fibrosis, activity of the disease and iron overload. *Hepatology* 1985;5:475-9.
22. Coultas DB, Zumwalt RE, Black WC, et al. The epidemiology of interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:967-72.
23. Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 1990;259:L159-84.
24. Demedts M, Behr J, Buhl R, et al. High-dose acetylcysteine in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2005;353:2229-42.
25. Endres P, Müller-Quernheim J. Alveolitiden und Granulomatosen. In: Ferlinz R (Hrsg.). *Pneumologie in Klinik und Praxis*, Thieme, 1994:487-540.
26. Engström-Laurent A, Laurent UB, Lilja K, et al. Concentration of sodium hyaluronate in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:497-504.
27. Engvall E, Hessle H, Klier G. Molecular assembly, secretion, and matrix deposition of type VI collagen. *J Cell Biol* 1986;102:703-10.

28. Eschenbruch CM. Interstitielle Lungenerkrankungen. In: Fabel H (Hrsg.). Pneumologie, Urban u. Fischer, 2. Aufl., 1995:
29. Finley TN, Swenson EW, Comroe JH Jr. The cause of arterial hypoxemia at rest in patients with "alveolarcapillary block syndrome". *J Clin Invest* 1962;41:618-22.
30. Flaherty KR, King TE Jr, Raghu G, et al. Idiopathic interstitial pneumonia: what is the effect of a multidisciplinary approach to diagnosis? *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:904-10.
31. Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem J* 1981;200:415-24.
32. Gerling B, Becker M, Waldschmidt J, et al. Elevated serum aminoterminal procollagen type-III-peptide parallels collagen accumulation in rats with secondary biliary fibrosis. *J Hepatol* 1996;25:79-84.
33. Gerling B, Becker M, Staab D, et al. Prediction of liver fibrosis according to serum collagen VI level in children with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997;336:1611-2.
34. Ghosh P. The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:75-82.
35. Giri SN. Novel pharmacological approaches to manage interstitial lung fibrosis in the twenty-first century. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:73-95.
36. Gross TJ, Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2001;345:517-25.
37. Håkansson L, Venge P. The molecular basis of the hyaluronic acid-mediated stimulation of granulocyte function. *J Immunol* 1987;138:4347-52.
38. Haylock DN, Nilsson SK. The role of hyaluronic acid in hemopoietic stem cell biology. *Regen Med* 2006;1:437-45.
39. Hällgren R, Eklund A, Engström-Laurent A, et al. Hyaluronate in bronchoalveolar lavage fluid: a new marker in sarcoidosis reflecting pulmonary disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985;290:1778-81.
40. Hu B, Wu Z, Phan SH. Smad3 mediates transforming growth factor-beta-induced alpha-smooth muscle actin expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:397-404.
41. Hunninghake GW, Zimmerman MB, Schwartz DA, et al. Utility of a lung biopsy for the diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164: 193-6.
42. Kaarteenaho-Wiik R, Lammi L, Lakari E, et al. Localization of precursor proteins and mRNA of type I and III collagens in usual interstitial pneumonia and sarcoidosis. *J Mol Histol* 2005;36:437-46.

43. Kaarteenaho-Wiik R, Sademies O, Pääkkö P, et al. Extracellular matrix proteins and myofibroblasts in granulomas of sarcoidosis, atypical mycobacteriosis, and tuberculosis of the lung. *Hum Pathol* 2007;38:147-53.
44. Kaneda H, Hashimoto E, Yatsuji S, et al. Hyaluronic acid levels can predict severe fibrosis and platelet counts can predict cirrhosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:1459-65.
45. Kelly MM, Leigh R, Gilpin SE, et al. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:557-65.
46. Kenyon NJ, Ward RW, McGrew G, et al. TGF-beta1 causes airway fibrosis and increased collagen I and III mRNA in mice. *Thorax* 2003;58:772-7.
47. King TE Jr. Clinical advances in the diagnosis and therapy of the interstitial lung diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:268-79.
48. King TE Jr, Behr J, Brown KK, et al. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:75-81.
49. Kirk JM, Bateman ED, Haslam PL, et al. Serum type III procollagen peptide concentration in cryptogenic fibrosing alveolitis and its clinical relevance. *Thorax* 1984;39:726-32.
50. Konomi H, Hori H, Sano J, et al., Immunohistochemical localization of type I, II, III, and IV collagens in the lung. *Acta Pathol Jpn* 1981;31:601-10.
51. Kühn K, Wiestner M, Krieg T, et al. Structure and function of the amino terminal propeptide of type I and III collagen. *Connect Tissue Res* 1982;10:43-50.
52. Lammi L, Kinnula V, Lähde S, et al. Propeptide levels of type III and type I procollagen in the serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 1997;10:2725-30.
53. Lammi L, Ryhänen L, Lakari E, et al. Type III and type I procollagen markers in fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:818-23.
54. Lalancette M, Carrier G, Laviolette M, et al. Farmer's lung. Long-term outcome and lack of predictive value of bronchoalveolar lavage fibrosing factors. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:216-21.
55. Larsson K, Eklund A, Malmberg P, et al. Hyaluronic acid (hyaluronan) in BAL fluid distinguishes farmers with allergic alveolitis from farmers with asymptomatic alveolitis. *Chest* 1992;101:109-14.
56. Last JA, Reiser KM. Biosynthesis of collagen crosslinks. III. In vivo labeling and stability of lung collagen in rats with bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:111-7
57. Laurent TC. In: *Chemistry and Molecular Biology of Intracellular Matrix*, Academic Press N.Y., 1970, 703-732.

58. Laurent TC, Dahl IM, Dahl LB, et al. The catabolic fate of hyaluronic acid. *Connect Tissue Res* 1986;15:33-41.
59. Laurent GJ. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol* 1987;252:C1-9.
60. Lettieri CJ, Veerappan GR, Helman DL, et al. Outcomes and safety of surgical lung biopsy for interstitial lung disease. *Chest* 2005;127:1600-5.
61. Low RB, Cutroneo KR, Davis GS, Giancola MS. Lavage type III procollagen N-terminal peptides in human pulmonary fibrosis and sarcoidosis. *Lab Invest* 1983;48:755-9.
62. Low RB, Giancola MS, King TE Jr, Chaptis J, Vacek P, Davis GS. Serum and bronchoalveolar lavage of N-terminal type III procollagen peptides in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:701-6.
63. Luisetti M, Bulgheroni A, Bacchella L, et al. Elevated serum procollagen III aminopeptide levels in sarcoidosis. *Chest* 1990;98:1414-20.
64. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmány G, et al. Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F911-24.
65. Milman N, Kristensen MS, Bentsen K. Hyaluronan and procollagen type III aminoterminal peptide in serum and bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary fibrosis. *APMIS* 1995;103:749-54.
66. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999;96:319-28.
67. Ninomiya T, Yoon S, Hayashi Y, et al. Clinical significance of serum hyaluronic acid as a fibrosis marker in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha: histological evaluation by a modified histological activity index scoring system. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:68-74.
68. Nordenbaek C, Teisner B, Junker P. Connective tissue responses in acute community-acquired pneumonia. *Respir Med* 2003;97:660-6.
69. Oesterling C. Entwicklung und Validierung eines sensitiven ELISA zur Bestimmung von Kollagen Typ VI in Körperflüssigkeiten bei Patienten mit fibrosierenden Lungenerkrankungen. Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin, Freie Universität, Berlin, 1992.
70. Parry DA. The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem* 1988;29:195-209.

71. Price RD, Myers S, Leigh IM, et al. The role of hyaluronic acid in wound healing: assessment of clinical evidence. *Am J Clin Dermatol* 2005;6:393-402.
72. Raghu G, Striker LJ, Hudson LD, et al. Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs. *Am Rev Respir Dis* 1985;131:281-9.
73. Raghu G, Brown KK, Bradford WZ, et al. A placebo-controlled trial of interferon gamma-1b in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2004;350:125-33.
74. Reynolds HY. Use of bronchoalveolar lavage in humans - past necessity and future imperative. *Lung* 2000;178:271-93.
75. Riede UN, Costabel U. Respiratorisches System. In: Riede UN, Schäfer HE, Werner M (Hrsg.). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme, Stuttgart, 5. Aufl., 2004:611-635.
76. Rohde H, Bruckner P, Timpl R. Immunochemical properties of the aminopropeptide of procollagen type III. *Eur J Biochem* 1983;135:197-202.
77. Savolainen ER, Brocks D, Ala-Kokko L, et al. Serum concentrations of the N-terminal propeptide of type III procollagen and two type IV collagen fragments and gene expression of the respective collagen types in liver in rats with dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. *Biochem J* 1988;249:753-7.
78. Schaberg T, Lauer C, Lode H, et al. Increased number of alveolar macrophages expressing adhesion molecules of the leukocyte adhesion molecule family in smoking subjects. Association with cell-binding ability and superoxide anion production. *Am Rev Respir Di* 1992;146:1287-93.
79. Schuppan D, Rühlmann T, Hahn EG. Radioimmunoassay for human type VI collagen and its application to tissue and body fluids. *Anal Biochem* 1985;149:238-47.
80. Schuppan D, Dumont JM, Kim KY, Hennings G, Hahn EG. Serum concentration of the aminoterminal procollagen type III peptide in the rat reflects early formation of connective tissue in experimental liver cirrhosis. *J Hepatol* 1986;3:27-37.
81. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Sem Liver Dis* 1990;10:1-10.
82. Schuppan D. Connective tissue polypeptides in serum as parameters to monitor antifibrotic treatment in hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1991;13 (Suppl. 3):17-25.
83. Seifart C, Vogelmeier C. Interstitielle Lungenerkrankungen. In: Schölmerich J (Hrsg.). *Medizinische Therapie 2007/2008*. Springer Berlin Heidelberg, 3. Aufl.:1111-27.

84. Shahin M, Schuppan D, Waldherr R, et al. Serum procollagen peptides and collagen type VI for the assessment of activity and degree of hepatic fibrosis in schistosomiasis and alcoholic liver disease. *Hepatology* 1992;15:637-44.
85. Shahzeidi S, Mulier B, de Crombrughe B, et al. Enhanced type III collagen gene expression during bleomycin induced lung fibrosis. *Thorax* 1993;48:622-8.
86. Stickel F, Urbaschek R, Schuppan D, et al. Serum collagen type VI and XIV and hyaluronic acid as early indicators for altered connective tissue turnover in alcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:2025-32.
87. Suzuki A, Angulo P, Lymp J, et al. Hyaluronic acid, an accurate serum marker for severe hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int* 2005;25:779-86.
88. Takahara T, Sollberg S, Muona P, et al. Type VI collagen gene expression in experimental liver fibrosis: quantitation and spatial distribution of mRNAs, and immunodetection of the protein. *Liver* 1995;15:78-86.
89. Tengblad A, Laurent UB, Lilja K, et al. Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood. *Biochem J* 1986;236:521-5.
90. Teschler H, Thompson AB, Pohl WR, et al. Bronchoalveolar lavage procollagen-III-peptide in recent onset hypersensitivity pneumonitis: correlation with extracellular matrix components. *Eur Respir J* 1993;6:709-14.
91. Torres-Salinas M, Parés A, Caballería J, Jiménez W, Heredia D, Bruguera M, Rodés J. Serum procollagen type III peptide as a marker of hepatic fibrogenesis in alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1986;90:1241-6.
92. Tryggvason K, Soininen R, Hostikka SL, et al. Structure of the human type IV collagen genes. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;580:97-111.
93. Wagner PD, Dantzker DR, Dueck R, et al. Distribution of ventilation-perfusion ratios in patients with interstitial lung disease. *Chest* 1976;69:256-7.
94. Ward PA, Hunninghake GW. Lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:S123-9.
95. Willis BC, duBois RM, Borok Z. Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:377-82.
96. Wittram C, Mark EJ, McLoud TC. CT-histologic correlation of the ATS/ERS 2002 classification of idiopathic interstitial pneumonias. *Radiographics* 2003;23:1057-71.
97. Wong VS, Hughes V, Trull A, et al. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1998;5:187-92.
98. Yamada M, Fukuda Y, Koyama Y, et al. Serum hyaluronic acid reflects the effect of interferon treatment on hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:646-51.



- 
99. Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-74.
  100. Ziesche R, Hofbauer E, Wittmann K, et al. A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999;341:1264-9.

## **7. Lebenslauf**

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

## **8. Teile der vorliegenden Dissertation fanden Eingang in folgende Publikationen**

Schaberg T, Orzechowski K, Oesterling C, et al. Simultaneous measurement of collagen type-VI-related antigen and procollagen type-III-N-propeptide levels in bronchoalveolar lavage. Eur Respir J 1994;7:1221-1226.

Orzechowski K, Oesterling C, Schaberg T, et al. Hyaluronsäure, Prokollagen-III-N-Peptid und Kollagen Typ VI als diagnostische Parameter des Bindegewebsstoffwechsels in der broncholaveolären Lavage. Atemwegs- und Lungenerkrankungen 1993;19:408-409.

## 9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Rajan Somasundaram, unter dessen Betreuung ich diese Dissertation anfertigen konnte.

Herrn Professor Dr. med. Tom Schaberg danke ich für die Betreuung des klinischen Teils und die Überlassung der BALF-Proben.

Herrn Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Detlev Schuppan danke ich dafür, dass ich die biochemischen Arbeiten in seinem Labor und unter seiner wissenschaftlichen Anleitung durchführen konnte.

Frau Dr. med. Christine Oesterling danke ich sehr für die Unterstützung bei der Erlernung der Durchführung des ELISA für Kollagen VI.

Herrn Dr. rer. nat. Martin Rühl danke ich für die kritische Durchsicht und die Unterstützung bei der Formatierung.

Den damaligen technischen Assistentinnen des Labors Schuppan, Frau Renate Ackermann und Frau Monika Schmidt, gilt mein Dank für die Fürsorge und Nachsicht, die sie uns Doktoranden entgegenbrachten.

Allen damaligen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranden des Labors danke ich für die gute Zusammenarbeit und große Hilfsbereitschaft, insbesondere meinem mir damals noch unbekanntem Ehemann für das gelegentliche Auswechseln der Pufferlösungen.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und die Geduld mit mir.

Meinen Eltern verdanke ich alles, nicht nur meine Ausbildung.

## 10. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katja Maria Orzechowski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Bestimmung und diagnostischer Stellenwert von Hyaluronsäure, Prokollagen III-N-Peptid und Kollagen-VI in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bei interstitiellen Lungenerkrankungen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift