

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und  
Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Zytokinkonzentrationen im Serum und in der  
bronchoalveolären Flüssigkeit als Marker der Pathogenese und  
Prognose bei systemischer Sklerose**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Schmidt

aus Arnstadt/Thüringen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Riemkasten

2. Prof. Dr. med. M. Worm

3. Prof. Dr. F. Herth

Datum der Promotion: 18.09.2009

**Der Beginn aller Wissenschaft ist das Erstaunen, dass die Dinge sind wie sie sind.**

Aristoteles

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1 Einleitung</b>   | <b>7</b>  |
| 1.1 Definition und Klassifikation   | 7         |
| 1.2 Epidemiologie   | 8         |
| 1.3 Ätiologie und Pathogenese   | 9         |
| 1.3.1 Gefäßschädigung und Endothelzellveränderungen   | 10        |
| 1.3.2 Veränderung der zellulären Immunantwort   | 12        |
| 1.3.3 Veränderungen der humoralen Immunantwort  | 14        |
| 1.3.4 Genetische Faktoren   | 15        |
| 1.3.5 Exogene Faktoren und Umwelteinflüsse  | 16        |
| 1.3.6 Mikrochimerismus  | 16        |
| 1.4 Diagnostik  | 16        |
| 1.5 Therapie  | 18        |
| 1.6 Prognose und Verlauf  | 19        |
| 1.7 Zielsetzung und Fragestellung   | 20        |
| <b>2 Material und Methoden</b>  | <b>21</b> |
| 2.1 Studienpopulation   | 21        |
| 2.2 Methoden  | 24        |
| 2.2.1 Gewinnung von Serum aus peripherem Blut   | 24        |
| 2.2.2 Bronchoskopische Gewinnung von BALF   | 25        |
| 2.2.3 Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA   | 26        |
| 2.2.3.1 Quantikine <sup>®</sup> Human TGF- $\beta$ 1  | 27        |
| 2.2.3.2 Bio-Plex <sup>™</sup> Human Cytokine Assay  | 28        |
| 2.2.4 Bestimmung von Anti-AT <sub>1</sub> -R-Antikörpern und<br>Anti-ET <sub>A</sub> -R-Antikörpern mittels Festplatten-ELISA | 30        |
| 2.2.5 Bestimmung des hCMV-Infektionsstatus  | 31        |
| 2.2.6 Erhebung der klinischen Parameter   | 31        |
| 2.2.6.1 Bestimmung der Erkrankungsdauer   | 31        |
| 2.2.6.2 Klassifikation der Hautveränderung  | 31        |
| 2.2.6.3 Lungenfunktionsdiagnostik   | 33        |
| 2.2.6.4 Nachweis einer pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH)  | 34        |
| 2.2.6.5 Nachweis einer Lungenfibrose mittels HR-CT und visueller Analyse  | 34        |
| 2.2.7 Statistische Auswertung   | 35        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3 Ergebnisse</b>   | <b>36</b> |
| 3.1 Zytokinmessungen im Serum   | 36        |
| 3.1.1 Serum-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter  | 37        |
| 3.1.2 Serum-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter im Zeitverlauf   | 39        |
| 3.1.3 Assoziation von Anti-AT <sub>1</sub> -R-Ak, Anti-ET <sub>A</sub> -R-Ak, Serum-Zytokinen und klinischen Parametern | 40        |
| 3.2 Zytokinmessungen in der BALF  | 43        |
| 3.2.1 spezifische Zytokinkonzentrationen in der BALF von SSc-Patienten  | 43        |
| 3.2.2 Zytokinspiegel in Abhängigkeit der BALF-Zelldifferenzierung   | 46        |
| 3.2.3 BALF-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter bei SSc-Patienten   | 50        |
| 3.2.4 BALF-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter im Zeitverlauf  | 51        |
| 3.2.5 hCMV-Infektionsstatus und Zytokinkonzentrationen in der BALF  | 55        |
| 3.3 Assoziation von Zytokinkonzentrationen in Serum und BALF  | 56        |
| <b>4 Diskussion</b>   | <b>57</b> |
| 4.1 MCP-1 als Marker einer Lungenfibrose  | 58        |
| 4.2 TGF- $\beta$ beeinflusst die Balance zwischen Synthese und Degradation von EZM                                      | 60        |
| 4.3 IL-8-BALF-Konzentrationen bei ILD   | 62        |
| 4.4 Bedeutung von Th17-Zellen bei Autoimmunerkrankungen   | 63        |
| 4.5 Anti-AT <sub>1</sub> -R-Ak und Anti-ET <sub>A</sub> -R-Ak als funktionelle Autoantikörper                           | 65        |
| 4.6 Stellenwert der BALF in der Diagnostik und Therapie der SSc   | 67        |
| <b>5 Zusammenfassung</b>  | <b>70</b> |
| <b>6 Literaturverzeichnis</b>   | <b>71</b> |
| <b>7 Danksagung</b>   | <b>82</b> |
| <b>8 Lebenslauf</b>   | <b>83</b> |

**Abkürzungsverzeichnis**

|              |   |
|--------------|---|
| ACR          | American College of Rheumatology                |
| ACA          | Anti-Centromer-Antikörper                       |
| ANA          | Antinukleäre Antikörper                         |
| BALF         | bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit             |
| DLCO         | CO-Diffusionskapazität                          |
| DNSS         | Deutsches Netzwerk für systemische Sklerodermie |
| dcSSc        | diffuse cutaneous systemic sclerosis            |
| dsDNA        | Doppelstrang-DNA                                |
| ELISA        | Enzym-linked-Immunsorbent-Assays                |
| EZM          | extrazelluläre Matrix                           |
| FVC          | forcierte Vitalkapazität                        |
| hCMV         | humanes Cytomegalie-Virus                       |
| HLA II       | Human Leukocyte Antigen II                      |
| IgG          | Immunglobulin G                                 |
| IgM          | Immunglobulin M                                 |
| IL           | Interleukin                                     |
| ILD          | interstitielle Lungenerkrankung                 |
| lcSSc        | limited cutaneous systemic sclerosis            |
| LAP          | Latency Associated Peptide                      |
| MCP-1        | Monocyte Chemotactic Protein-1                  |
| mRSS         | modified Rodnan Skin Score                      |
| PAH          | pulmonale arterielle Hypertonie                 |
| QALYs        | Quality adjusted life years                     |
| RAAS         | Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems            |
| SLS          | Scleroderma Lung Study                          |
| SSc          | systemische Sklerose                            |
| TGF- $\beta$ | Transforming Growth Factor- $\beta$             |
| TLC          | Totale Lungenkapazität                          |
| TNF $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$                   |

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Klassifikation

Die systemische Sklerose (SSc) oder auch systemische Sklerodermie ist eine seltene Multisystemerkrankung des gefäßführenden Bindegewebes, die der Gruppe der Kollagenosen zugeordnet wird. Pathognomonisch für die SSc ist eine verstärkte Synthese und Ablagerung von Bindegewebsproteinen als extrazelluläre Matrix (EZM) mit daraus folgender Fibrosierung der Haut und verschiedener innerer Organe, wie dem Gastrointestinaltrakt, dem Herz, der Lunge und der Niere [2]. Die Heterogenität dieser Autoimmunerkrankung findet sich nicht nur in ätiologischen Faktoren, Pathophysiologie, klinischer Ausprägung, Ausmaß und Schwere der Organbeteiligung und immunologischen Veränderungen, sondern auch im Krankheitsverlauf, der Prognose und der funktionellen Beeinträchtigungen [1].

Der Name Sklerodermie leitet sich aus den griechischen Begriffen für hart (skleros) und Haut (derma) ab. Schon in der Antike finden sich Berichte über Menschen mit besonders harter und fester, der Überlieferung nach nahezu unverwundbarer Haut, die in einigen Aspekten an eine lokalisierte Sklerodermie im Sinne einer Morphea denken lassen. Achilles, der Kriegsheld aus der griechischen, und Siegfried von Xanten, der Drachentöter aus der germanischen Sagenwelt, waren zwei herausragende Helden, die eine unverwundbare „Panzerhaut“ trugen. Bei der systemischen Sklerodermie, wie sie heute definiert ist, finden sich allerdings neben der Hautverdickung zusätzlich pathologische Veränderungen an einer Vielzahl innerer Organe.

Neben der fortschreitenden kutanen und visceralen Fibrose gehören strukturelle und funktionelle Gefäßveränderungen mit perivaskulären Infiltraten, bestehend aus mononukleären Entzündungszellen, Intimaproliferation mit Lumeneinengung von Arterien und Arteriolen sowie Veränderung der humoralen und zellulären Immunantwort mit Ausbildung von Autoantikörpern und eine perivaskuläre T-Zell-Infiltration zur typischen pathologischen Trias der Sklerodermie [3 - 5]. Diese Konstellation verschiedener, aber dennoch zusammen gehörender pathologischer Veränderungen unterscheidet die SSc von anderen Erkrankungen des Bindegewebes, wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis oder dem systemischen Lupus erythematodes, und vom fibrotischen Umbau einzelner Organe, wie zum Beispiel der idiopathischen Lungenfibrose [6].

Anhand der 1980 publizierten „preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis“ (Tab. 1) durch das „American College of Rheumatology“ (ACR) kann die systemische

Sklerodermie diagnostiziert werden [7]. Als Hauptkriterium gilt dabei eine Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke, also eine Sklerosierung der Haut proximal der Metacarpophalangeal- und/oder Metatarsophalangealgelenke sowie an Körperstamm, Nacken und Gesicht. Zu den Nebenkriterien zählen eine Sklerodaktylie, grubchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Fingerweichteile und das Auftreten einer bilateralen basalen Lungenfibrose. Sind das Hauptkriterium oder aber mindestens zwei Nebenkriterien erfüllt, kann die SSc mit einer Sensitivität von 97 % und einer Spezifität von 98 % diagnostiziert werden [7].

| ACR-Klassifikation der SSc [7]* |  |
|---------------------------------|--|
| Hauptkriterium                  | Sklerodermie proximal der Fingergrundgelenke   |
| Nebenkriterien                  | Sklerodaktylie<br>grubchenförmige Narben oder Substanzverlust der distalen Fingerweichteile<br>bilaterale basale Lungenfibrose |

Tab. 1: ACR-Klassifikation der systemischen Sklerose von 1980 \*. Zur Diagnosestellung muss das Hauptkriterium oder mindestens 2 Nebenkriterien erfüllt sein.

1988 führte LeRoy eine Unterteilung der SSc-Patienten nach klinischen Charakteristika und der individuellen Hautbeteiligung in zwei Untergruppen ein [8]. Bei der diffusen Form der SSc (dcSSc) sind die Hautveränderungen unregelmäßig über Körperstamm, distale und proximale Extremitäten sowie das Gesicht verteilt. Der fibrotische Umbau ist rasch progredient und betrifft neben der Haut auch die Lunge und andere innere Organe [9]. Im Gegensatz dazu finden sich bei der limitierten Form der SSc (lcSSc) Hautverdickungen nur im Gesicht und an den Extremitäten distal von Knien und Ellbogen [9]. Es dominiert die vaskuläre Manifestation, und sowohl die Hautveränderungen als auch die Organfibrose ist allgemein limitiert und schreitet nur langsam voran [6].

## 1.2 Epidemiologie

Die SSc gehört zu den seltenen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises. Die Prävalenz weist abhängig von der Bezugsquelle eine starke Streuung auf und wird mit 4 - 242 Krankheitsfällen/10<sup>6</sup> Einwohner angegeben [10-14]. Mit 469 Krankheitsfällen/10<sup>6</sup> Einwohner wird die höchste Prävalenz im Volk der nordamerikanischen Choctaw-Indianer beobachtet [15]. Die geschätzte Inzidenz variiert zwischen 0,6 und 19/10<sup>6</sup> Einwohner in Abhängigkeit von der

untersuchten Population, dem methodischen Vorgehen, den Klassifikationskriterien, der Befunderhebung, dem Untersuchungszeitraum und dem ethnischen Hintergrund der Studienpopulation [16]. Frauen erkranken häufiger an SSc als Männer. Das Verhältnis von Frauen zu Männern variiert in Abhängigkeit von der Sklerodermieform sowie von ethnischen und regionalen Faktoren zwischen 3:1 und 6:1. In einer erst kürzlich vom Deutschen Netzwerk für Systemische Sklerose (DNSS) publizierten Studie wird die Geschlechterquote in Deutschland mit 5:1 zugunsten der Frauen angegeben [16]. Die SSc manifestiert sich in der Regel zwischen dem 3. und 5. Lebensjahrzehnt mit einem Altersgipfel zwischen dem 40. und 55. Lebensjahr [17].

### **1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Trotz umfangreicher Bemühungen ist es bisher nicht gelungen, die, der systemischen Sklerose zugrunde liegenden, Krankheitsprozesse vollständig aufzuklären und in ein einheitliches ätiologisches Gesamtkonzept zu integrieren. Aktuell werden verschiedene ätiologische Konzepte diskutiert, die jedoch überwiegend nur einzelne Aspekte der vielschichtigen Veränderungen des Immunsystems, des Gefäßsystems und des Bindegewebes erklären können.

Einzelne sklerodermie-typische Pathologien finden sich in ähnlicher Weise auch bei anderen Erkrankungen. So sind beispielsweise immunologische Veränderungen, wie eine erhöhte Anzahl von CD4+ T-Zellen und eine verminderte Anzahl von CD8+ T-Zellen im peripheren Blut, auch bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, dem Diabetes mellitus Typ-1, dem systemischen Lupus erythematodes und dem Sjögren-Syndrom, nachweisbar [18]. Eine endotheliale Dysfunktion zeigen auch Graft-versus-Host-Reaktionen, das hämolytisch-urämische Syndrom und die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura [19]. Die Aktivierung von Fibroblasten mit erhöhter Expression membranständiger Adhäsionsmoleküle, gesteigerter Produktion der EZM und das Nichtansprechen auf Wachstumsfaktoren finden sich ähnlich auch bei chronischen Abstoßungsreaktionen und der Porphyrie [20].

Das Hauptmerkmal der SSc ist eine überschießende Produktion von EZM durch aktivierte Fibroblasten. Traditionelle pathogenetische Modelle sehen eine Fibrose als Folge von chronischen Entzündungsprozessen mit Gewebeerstörung, wiederholter Reparatur und nachfolgend exzessiver Narbenbildung [21]. Neuere Konzepte zur Fibrogenese stellen eine pathologische Wundheilung bzw. ein gestörtes Remodelling in den Fokus der Betrachtungen und berücksichtigen dabei insbesondere Entzündungen im mikroskopischen Bereich, eine gestörte Kommunikation zwischen Entzündungszellen und ortsständigen Zellen, Veränderungen in der

immunologischen Antwort und eine fokale Fibroblastenproliferation [3]. Es resultiert eine Aktivierung von Fibroblasten mit überschießender Ablagerung und reduziertem Abbau von Bestandteilen der EZM, wie Kollagen Typ I, Fibronectin und Glykosaminoglykanen [22]. Nach heutigem Erkenntnisstand sind Ätiologie und Pathogenese der SSc multifaktorielle Prozesse, die Veränderungen in Funktion und Interaktion von Endothelzellen, Fibroblasten und mononukleären Zellen beinhalten, und deren einzelne Aspekte im Folgenden umrissen werden.

### **1.3.1 Gefäßschädigung und Endothelzellveränderungen**

Vaskuläre Dysfunktionen und Endothelzellveränderungen sind frühe klinische Manifestationen der SSc, die lange vor der charakteristischen Fibrosierung nachweisbar sind und die nicht nur als frühe, sondern möglicherweise auch als primäre Ereignisse in der Pathogenese der Erkrankung bewertet werden [4, 6]. Die Bedeutung humoraler Faktoren für die Entwicklung mikrovaskulärer Schäden wurde von LeRoy bereits vor 30 Jahren anhand der Toxizität von SSc-Serum für kultivierte Endothelzellen experimentell nachgewiesen [23]. Seine Ergebnisse fasste er als vaskuläre Hypothese zur Pathogenese der SSc zusammen.

Zu den späteren klinischen Manifestationen der SSc-assoziierten Vaskulopathie zählen unter anderem kutane Teleangiektasien, Veränderungen von Nagelbettkapillaren, ein pulmonaler arterieller Hypertonus (PAH), Angiektasien im Magenantrum sowie die Ausbildung einer renalen Krise mit malignem Hypertonus [24]. Vaskuläre Komplikationen, wie digitale Ulzerationen, sind führend unter den klinischen Symptomen, die die Lebensqualität der betroffenen Patienten einschränken [25]. Als auslösende Faktoren der Endothelzellschädigung werden neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die von perivaskulär angereicherten mononukleären Zellen sezerniert werden, auch Granzyme, d. h. in intrazellulären Granula gespeicherte Serin-Proteasen, endothelzellspezifische Autoantikörper, Viren und reaktive Sauerstoffradikale diskutiert, die in Phasen der Ischämie und/oder der Reperfusion gebildet werden [24]. Durch Verletzungen des Endothels kommt es dann zu einer Thrombozytenaggregation an subendothelialen Strukturen und damit zur Bildung intravaskulärer Thromben mit lokaler Hypoxie der abwärts gelegenen Gefäßabschnitte.

Darüber hinaus findet sich in späteren Stadien der Erkrankung und mit zunehmendem fibrotischen Gewebeumbau ein erheblicher Mangel an kleinen und kleinsten Blutgefäßen in der betroffenen Haut und den inneren Organen, was ebenfalls zu Hypoxie in den abhängigen Gewebeabschnitten führt.

Als Reaktion auf die hypoxische Stoffwechsellage können profibrotische Gene vermehrt exprimiert, die Kollagen- und Transforming-Growth-Factor (TGF)- $\beta$ -Synthese aktiviert und so die Fibrose induziert werden [4, 26]. Es entsteht ein Teufelskreis aus vaskulärer Hypoxie und Endothelverletzung mit nachfolgender Überproduktion von Zytokinen durch aktivierte Entzündungszellen, was zu weiteren Endothelverletzungen und in Folge dessen zu progredienter Fibrosierung führt [26].

Im Rahmen der vaskulären Erkrankungshypothese wird die SSc als primäre Gefäßerkrankung mit unkontrollierter Reparaturphase und überschießender Narbenbildung begriffen. Zusätzlich zu den strukturellen vaskulären Veränderungen spielen auch funktionelle Gefäßveränderungen, insbesondere eine gestörte Regulation der Gefäßweite, eine Rolle, die zu einer Minderperfusion des Gewebes mit lokaler Hypoxie führen können [23]. Es findet sich eine Imbalance zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, die sich in einem relativen Mangel von Stickstoffmonoxid/NO und Prostazyklin und einem relativen Überschuss von Endothelin 1 und Angiotensin II manifestiert [4, 6, 27]. Diese These wird durch verschiedene Studien unterstützt, die im Serum von SSc-Patienten erhöhte Konzentrationen der potenten Vasokonstriktoren Endothelin 1 und Angiotensin II nachweisen konnten, deren Wirkung offensichtlich nicht ausreichend von Vasodilatoren ausgeglichen werden kann [26].

Endothelin 1, vermittelt über seine Typ-A- und -B-Rezeptoren, und Angiotensin II, vermittelt über seinen Typ-1-Rezeptor, sind potente Vasokonstriktoren, für die darüber hinaus auch ein direkter profibrotischer Effekt nachgewiesen werden konnte [6, 26]. So fördert Endothelin 1 die endotheliale Adhäsion von Leukozyten, die Proliferation von glatten Muskelzellen und die Aktivierung von Fibroblasten und darüber hinaus die Steigerung der Kollagen-Typ-I- und -III-Synthese bei gleichzeitiger Hemmung der Matrixmetalloproteinase (MMP)-1-Expression [6, 28, 29]. Angiotensin II induziert, zusätzlich zu seiner hypertensiven Wirkung als Element des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), die Produktion von Connective Tissue Growth Factor (CTGF), TGF- $\beta$ 1 und Kollagen Typ-I durch Fibroblasten [30, 31]. In Tierexperimenten konnte eine ausgeprägte vaskuläre Fibrosierung bei nur dezent er erhöhten Blutdrucks durch i. v. Applikation von Angiotensin II induziert werden [31].

Über seinen AT<sub>1</sub>-Rezeptor induziert Angiotensin II außerdem die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Aktivierung einer NADH/NADPH-Oxidase. Die entstehenden freien Radikale können Lipidstrukturen verändern und damit zu Strukturschäden und Funktionseinbußen von Zellmembranen führen. Neben der direkten Gewebeschädigung ist

oxidativer Stress ein Stimulus für die Produktion proinflammatorischer Zytokine [31]. Auch werden im Rahmen von Entzündungsprozessen inflammatorische Zellen durch Angiotensin II rekrutiert.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse stellen über  $AT_1$ - und  $ET_{A/B}$ -Rezeptoren vermittelte biologische Effekte ein potentiell Bindeglied dar zwischen Vaskulopathie, fibrotischem Gewebeumbau und Immunzellaktivierung und damit zwischen den drei Hauptpathologien der SSc. In Übereinstimmung damit wurde in SSc-betroffener Haut eine erhöhte Expression von Angiotensin II und  $AT_1$ -Rezeptoren bei dcSSc-Patienten beschrieben [30]. Neben den natürlichen Agonisten können auch funktionelle Autoantikörper an spezifische Oberflächenrezeptoren binden, Zellfunktionen modulieren und/oder stimulieren und somit biologische Effekt vermitteln. Als mögliche Kandidaten für derartige stimulierende funktionelle Autoantikörper gelten Anti- $AT_1$ -R-Ak und Anti- $ET_A$ -R-Ak, von denen neue Einblicke in die Pathogenese der SSc erhofft werden.

### **1.3.2 Veränderungen der zellulären Immunantwort**

Ein charakteristisches histologisches Kennzeichen der SSc ist das Auftreten von entzündlichen, hauptsächlich perivaskulären Infiltraten, insbesondere in der initialen Phase der Erkrankung, was mit einer erhöhten Kollagensynthese der umliegenden Fibroblasten assoziiert ist [2, 3, 32 - 34]. Ob entzündliche Infiltrationen ein initiales Ereignis oder als sekundäre Folge des Krankheitsprozesses zu werten sind, ist nicht abschließend geklärt [3]. T-Zellen sind wichtige Bestandteile des entzündlichen Infiltrates, und es konnte eine Reihe von qualitativen und quantitativen Veränderungen an T-Zellpopulationen nachgewiesen werden, die aus peripherem Blut oder aus betroffenem Gewebe von SSc-Patienten isoliert wurden [26].

Entzündungszellen sind potentielle Kandidaten für die Produktion verschiedener Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, denen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und/oder Unterhaltung des fibrotischen Umbaus, der Produktion und/oder Degradation von Kollagen, der Vermittlung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen sowie der Initiation der Endothel- und Gefäßveränderungen zugeschrieben wird [2, 4, 26, 34 - 38].

Durch T-Zellen und Makrophagen produzierte proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TGF- $\beta$  und CTGF, fördern die Entzündungsreaktion, die Fibroblastenaktivierung und verstärken die Einwanderung von Granulo- und Lymphozyten in das betroffene Gewebe [2 - 4, 6, 37, 39]. Einige dieser Zytokine, wie IL-1, IL-4, IL-6 und IL-8 finden

sich in erhöhten Konzentrationen im Serum und im betroffenen Gewebe von SSc-Patienten [3, 40 - 42]. Unter den Chemokinen gelten MCP-1 und MIP-1 $\beta$  als potentielle Kandidaten, an der Entstehung der SSc beteiligt zu sein. In Übereinstimmung damit konnte eine Überexpression dieser Chemokine bei SSc-assoziiierter interstitieller Lungenerkrankung (ILD) nachgewiesen werden [43, 44].

Aktivierete CD4+ T-Zellen und Makrophagen stellen die Hauptpopulationen des entzündlichen Infiltrates dar [2, 3, 34], jedoch finden sich auch CD8+ T-Zellen im betroffenen Gewebe [45 - 47]. Th2-polarisierte T-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13. Diese Zytokine konnten in erhöhten Konzentrationen bei SSc-Patienten nachgewiesen werden [6, 45, 48, 49]. Zusätzlich zeigt die Mehrheit der SSc-Patienten erhöhte Serumspiegel von CD30, das von aktivierten Th2-Zellen exprimiert wird [48]. Im Gegensatz dazu werden Th1-Zytokine wie INF $\gamma$  in verminderter Konzentration gefunden [45, 50]. Im Widerspruch damit stehen die Ergebnisse anderer Studien, die erhöhte Serumspiegel von TNF $\alpha$  und IL-12, potente Stimuli der Th1-Antwort, sowie eine erhöhte mRNA-Expression verschiedener Th1-Zytokine wie IL-2 nachweisen konnten [45, 51, 52]. Diese Beobachtungen unterstützten die Hypothese einer veränderten Th1/Th2-Balance mit Th2-Polarisation als Ursache für die Ausbildung einer SSc [6, 49, 53], wie sie auch für andere autoimmunologische und allergische Erkrankungen, zum Beispiel für Asthma bronchiale und Sarkoidose, nachgewiesen wurde [45, 54, 55]. Unterstützt wird die Hypothese der polarisierten Immunantwort auch durch Untersuchungen am Tiermodell. So konnte im Mausmodell eine Fibrose durch In-vivo-Transfer von Th2-Zellen induziert werden [6].

Neben Zytokinen und Chemokinen, die sowohl parakrine, also auf benachbarte Zellen zielende, als auch autokrine Wirkung entfalten können, kann die Aktivierung von Fibroblasten auch durch Zell-Zell-Kontakte und durch Zell-EZM-Interaktionen initiiert werden [56]. Es muss davon ausgegangen werden, dass der endgültige Effekt von Zytokinen und Chemokinen von ihrer lokalen Konzentration, dem perizellulären Milieu und dem Mischungsverhältnis mit anderen Zytokinen abhängt, die in ihrer Wirkung auf die Zielzellen oftmals gegensätzliche Effekte haben [4].

Im Fokus aktueller Untersuchungen stehen deshalb verschiedene Schlüssel-moleküle, von denen ein Einfluss auf die Immunreaktion, die Fibrosierung und die Gefäßschädigung angenommen wird. Zu diesen gehören neben TGF- $\beta$  und CTGF auch eine Vielzahl von Chemokinen und Zytokinen, die als potentielle Therapieziele dienen könnten.

### 1.3.3 Veränderungen der humoralen Immunantwort

Eine gesteigerte B-Zell-Aktivität spiegelt sich in der Präsenz von Autoantikörpern, einer Hypergammaglobulinämie, der Überexpression des B-Zell-Transduktions-Moleküls CD19, der Vermehrung von naiven B-Zellen und dem Nachweis weniger, aber aktivierter Gedächtnis-Zellen wieder [3, 57]. Aktivierte B-Zellen können IL-6 und IL-10 produzieren, wodurch eine Th2-dominierte Immunantwort mit erhöhter Kollagensynthese ausgelöst wird [3]. Dass B-Zellen darüber hinaus auch direkt an der Entstehung einer Fibrose beteiligt sein können, legen Mausmodelle nahe, in denen die Elimination von B-Zellen zu einer Abnahme der fibrosierenden Entzündungsreaktion führte [58]. Da die Akkumulation von B-Zellen in betroffenen Geweben maßgeblich von der Interaktion mit T-Zellen abhängt, ist die T-Zell/B-Zell-Interaktion vermutlich für die Pathogenese der SSc essentiell [3].

Das Vorhandensein von spezifischen Autoantikörpern bei mehr als 95 % der Patienten mit SSc ist einer der wesentlichen Befunde und die bestbekannte immunologische Veränderung der SSc [59]. Dabei finden sich neben spezifischen antinukleären Antikörpern auch Autoantikörper, die gegen ubiquitär-intrazelluläre Antigene sowie gegen membranständige und lösliche, im Serum oder in der EZM zu findende, Antigene gerichtet sind [59]. Anti-Topoisomerase-I-Antikörper (Anti-Scl-70-Ak) finden sich dabei nahezu ausschließlich bei Patienten mit dcSSc. Allerdings sind sie nur bei 30 - 40 % dieser Patienten nachweisbar [3, 8, 16]. Anti-Centromer-Antikörper (ACA) lassen sich dagegen fast ausschließlich bei Patienten mit lcSSc nachweisen und sind unter diesen in 80 - 90 % der Fälle zu finden [3].

Der Nachweis einer direkten Beteiligung in der Pathogenese konnte für einige Autoantikörper, z. B. für antiendotheliale Antikörper als Apoptoseinduktoren, erbracht werden. Für andere, insbesondere antinukleäre Antikörper, fehlen bisher entsprechende Daten [60, 61]. Obwohl systematische Untersuchungen bislang fehlen, sprechen Einzelbeobachtungen in Hochrisikopopulationen dafür, dass sklerodermie-assoziierte Autoantikörper zeitlich vor dem Auftreten erster klinischer Symptome nachweisbar sein können [59]. Besonders bei Patienten mit Minimalsymptomen hat der Nachweis von sklerodermie-typischen Autoantikörpern diagnostische und prognostische Relevanz [59, 62]. Neuere Untersuchungen konnten für einige Autoantikörper relevante longitudinale Schwankungen nachweisen, die mit klinischen Symptomen korrelierten [63, 64].

Molekulares Mimikry ist ein mögliches Erklärungsmodell für die Bildung spezifischer Autoantikörper [65]. Dabei führen strukturelle Übereinstimmungen zwischen körpereigenen

Antigenen und Fremdproteinen, insbesondere viralen oder bakteriellen Ursprungs, zur Ausbildung spezifischer Autoantikörper. Zu den potentiellen Fremdan antigenen zählt das humane Cytomegalie-Virus (hCMV) [4, 66]. HCMV-spezifische Antikörper, zum Beispiel IgG-Anti-hCMV und IgA-Anti-hCMV-Antikörper, finden sich vermehrt bei SSc-Patienten [67, 68, 69]. Einige dieser Antikörper können in Endothelzellen die Apoptose induzieren und damit zur Rarefizierung kleiner Gefäße beitragen [26]. Weiterhin ist eine hCMV-Infektion mit einer erhöhten Produktion von CTGF verbunden, was seinerseits zur Fibroblastenaktivierung und pathologischen Fibrosierung beiträgt [70]. Zusätzlich konnten Fibroblasten in Zellkulturen durch Anti-hCMV-Antikörper aktiviert werden, so dass eine hCMV-Infektion bei der Entwicklung der SSc scheinbar eine direkte Rolle spielt [69].

#### **1.3.4 Genetische Faktoren**

Die SSc wird heute als komplexe polygene Erkrankung gesehen, wobei das Vererbungsmuster keinem einfachen Mendelschen Erbgang folgt [6, 71]. Mit Familien- und Zwillingsuntersuchungen wird nach Hinweisen auf genetische Krankheitsgrundlagen gesucht. Indizien für die Beteiligung genetischer Faktoren an der Entwicklung und Ausprägung einer SSc sind die weibliche Prädominanz, die familiäre Häufung der Erkrankung (1,6 % gegenüber 0,026 % in der Gesamtbevölkerung), der positive Autoantikörper-Nachweis bei Familienmitgliedern sowie eine oftmals positive Familienanamnese für andere Autoimmunerkrankungen [16, 71, 72].

Bei Zwillingen finden sich Konkordanzraten von < 5 %, wobei sich kein Unterschied zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen nachweisen lässt [73]. Auch die unterschiedliche Prävalenz und klinische Manifestation zwischen einzelnen ethnischen Gruppen wird als Hinweis auf die Beteiligung genetischer Komponenten am Krankheitsprozess gewertet. Als Beispiel dafür dient das hohe SSc-Risiko innerhalb der Gruppe der Choctaw-Indianer [26]. Nicht zuletzt ist eine SSc-positive Familienanamnese mit dem höchsten Lebenszeitrisiko für die Entwicklung einer SSc verbunden und mit einem früheren Krankheitsbeginn assoziiert [16, 72]. Dennoch ist das absolute Risiko für jedes Familienmitglied mit < 1 % insgesamt als gering anzusehen [72].

Mit Hilfe neuer Gentechnologien konnten bereits eine Vielzahl von SSc-assoziierten Veränderungen der genetischen Information nachgewiesen werden. So zum Beispiel eine Häufung bestimmter HLA- und MHC-Allele sowie Veränderungen der TNF-Promotorregion oder des TGF- $\beta$ 1-Gens [71, 74, 75].

### **1.3.5 Exogene Faktoren und Umwelteinflüsse**

Auch die Exposition gegenüber exogenen Faktoren kann zur Ausbildung sklerodermie-typischer Veränderungen führen. Zu den infrage kommenden exogenen Faktoren zählen Chemikalien, wie Vinylchlorid, Kunstharze, organische Lösungsmittel und Pestizide, Arzneimittel wie Bleomycin, Silikon und verunreinigte Speiseöle [76]. Exogene Faktoren scheinen jedoch in vielen Fällen nur in Kombination mit einem bestimmten HLA-Typ zur Auslösung einer Sklerodermie zu führen [77].

### **1.3.6 Mikrochimerismus**

Eine neuere Hypothese postuliert den bidirektionalen Transfer allogenetischer Zellen zwischen Mutter und Fetus über die Plazenta als möglichen Faktor in der Pathogenese der SSc. Diese, im Gewebe auf Grund der HLAII-(DRB1)-Kompatibilität persistierenden Zellen (Mikrochimerismus) könnten durch einen äußeren Trigger aktiviert werden und so eine Art chronische Graf-versus-Host-Reaktion auslösen [78, 79]. Für diese Hypothese spricht der Nachweis von Y-Chromosomsequenzen aus Hautbiopsien von SSc-Patientinnen mit männlichen Nachkommen [79]. Darüber hinaus konnten aus dem Blut von Neugeborenen Zellen maternalen Ursprungs isoliert werden, womit das Auftreten einer SSc bei Nulliparen erklären werden könnte [4, 78].

## **1.4 Diagnostik**

Anamnese, klinische Untersuchung und Röntgen-Thorax sind die traditionellen Instrumente, um eine Lungenbeteiligung zu diagnostizieren und zu verifizieren. Jedoch gibt keines der genannten Diagnoseverfahren Aufschluss darüber, wie hoch die Krankheitsaktivität ist und/oder ob in kurzer Zeit ein Krankheitsprogress droht. Das heißt, der Aussagewert für das therapeutische Handeln ist begrenzt und weiterführende Diagnostik notwendig. Die Suche nach prädiktiven Parametern für die Entwicklung einer Lungenfibrose wird dadurch erschwert, dass das Reaktionsspektrum der Lunge auf lokale Noxen oder systemische Krankheitsprozesse, unabhängig vom ursächlichen Reiz, sehr einheitlich ist. Meist handelt es sich um eine (oft sterile) Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Makrophagen und Leukozyten oder Flüssigkeitseinlagerung in das Stützgewebe. Persistiert dieser Prozess, kommt es im Verlauf zu fortschreitendem bindegewebigen Umbau.

Zur besseren Einschätzung aktueller Lungenveränderungen und der Notwendigkeit einer Therapie-Eskalation sind daher Lungenfunktionsdiagnostik, HR-CT-Untersuchungen,

Bronchoskopie und die Gewinnung von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) im klinischen Alltag etabliert. Dabei ist die Durchführung der Lungenfunktionsdiagnostik von der aktiven Mitarbeit des Patienten abhängig. Die bronchoskopische Gewinnung von BALF ist, ebenso wie die offene Gewinnung von Lungenbiopsien, ein invasives Diagnoseverfahren, auch wenn die BALF-Gewinnung im Vergleich weniger invasiv ist [80]. Daher ist die Indikation streng zu stellen, auch insbesondere im Hinblick auf den oft jahrelangen Krankheitsverlauf.

Im Gegensatz dazu sind HR-CT-Untersuchungen nicht-invasiv, von der Patientenmitarbeit unabhängig und anderen bildgebenden Untersuchungsverfahren, wie dem Röntgen-Thorax, in der Erkennung von frühen interstitiellen Lungenveränderungen überlegen. Zusätzlich erhöhen spezifische Bewertungsscores die inter- und intraindividuelle Vergleichbarkeit und damit die diagnostische Sicherheit [80, 81].

Eine aktive Alveolitis mit einer erhöhten BALF-Zellzahl gilt als Zeichen der Krankheitsaktivität bei SSc [82]. Die Bronchoskopie mit BALF-Gewinnung und Zelldifferenzierung wird zusammen mit Lungenfunktionsuntersuchungen zur Diagnostik einer aktiven Alveolitis empfohlen [83]. Dabei ist insbesondere eine Eosinophilie oder eine Neutrophilie mit dem Fortschreiten der Erkrankung und einem schlechteren Outcome assoziiert [83 - 85]. In Übereinstimmung damit wurde in einer erst kürzlich veröffentlichten multizentrischen Studie bei einer Gruppe von 141 SSc-Patienten eine Assoziation zwischen Neutrophilie der BALF und der Gesamtsterblichkeit gefunden. Überraschenderweise war diese Assoziation bei Berücksichtigung der Schwere der Erkrankung nicht mehr nachweisbar [85]. Einzelne Autoren schlussfolgern deshalb, dass BALF-Zellzahl und -Zelldifferenzierung nur begrenzte prognostische Informationen liefern können und stellen damit den Stellenwert der BALF als Therapiegrundlage in Frage [82, 85]. Dagegen konnte für HR-CT-Score und Lungenfunktionsdiagnostik ein prädiktiver Wert für die Einschätzung sklerodermie-assoziiertes Lungenveränderungen nachgewiesen werden. Eine Kombination der Ergebnisse beider Untersuchungsverfahren kann, einer aktuellen Studie zufolge, zur Unterscheidung von Lungenveränderungen mit extensivem bzw. mildem Verlauf herangezogen werden [16, 86].

Auch die Rolle löslicher BALF-Marker in der Progression der Lungenveränderungen wurde in einzelnen Studien untersucht [3]. Obwohl die Konzentrationen einzelner Zytokine und Chemokine, wie beispielsweise MCP-1, in der BALF von SSc-Patienten erhöht ist, konnte bisher kein sicherer Zusammenhang mit dem Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden.

## 1.5 Therapie

Für die SSc gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine kausale Therapie, mit deren Hilfe das Fortschreiten der Erkrankung aufgehalten oder langfristig verlangsamt werden kann. Ursache ist nicht allein die klinische Heterogenität, sondern auch die eingeschränkten Kenntnisse über die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Entstehungs- und Wirkmechanismen. Nicht zuletzt deshalb ist eine effektive antifibrotische Therapie aktuell nur eingeschränkt möglich. Dennoch hat sich der klinische Verlauf von SSc-Patienten auf Grund der besser beherrschbaren Komplikationen in den letzten Jahren deutlich verbessert.

Zu den wichtigsten Therapieoptionen zählen immunsupprimierende und -modulierende Medikamente, die in zunehmendem Maße symptomorientiert und organspezifisch Anwendung finden. Neben so genannten Basistherapeutika wie D-Penicillamin, Azathioprin, Methotrexat oder Cyclophosphamid wird eine direkte Beeinflussung von potentiellen Schlüsselmolekülen der Pathogenese angestrebt. Die Möglichkeit der Beeinflussung solcher Schlüsselmoleküle reicht von der Blockierung mit Antikörpern und ihren löslichen Rezeptoren bis hin zur Aktivierung endogener Inhibitoren und ist ein Hauptanliegen der gegenwärtigen Forschungsbemühungen. Zusätzlich kommen nichtsteroidale Antirheumatika bei Gelenkschmerzen, gefäßdilatierende Medikamente, wie ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Blocker bei Raynaud-Phänomen und Nierenfunktionseinschränkungen, und Prostazyklin-Agonisten wie Epoprostenol und Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, wie Bosentan, bei pulmonaler Hypertonie zum Einsatz.

Die verfügbaren Studienergebnisse zur klinischen Wirksamkeit der eingesetzten Medikamente sind jedoch bislang eingeschränkt und z. T. widersprüchlich. So konnten beispielsweise verschiedene Studien eine Wirksamkeit von Cyclophosphamid bei der Behandlung der SSc-assoziierten Lungenfunktionseinschränkungen zeigen [82, 87]. Weiterführende Untersuchungen ergaben jedoch, dass die Verbesserung der Lungenfunktion nur vorübergehend ist, und dass sich zusätzlich kein positiver Effekt auf das Gesamtüberleben der mit Cyclophosphamid behandelten SSc-Patienten zeigt, sondern vielmehr ein Verlust an quality adjusted life years (QALYs) zu verzeichnen ist [88, 89]. Die extrakorporale Photopherese bietet eine weitere Möglichkeit der Immunmodulation, die erfolgreich in der Behandlung von Hautindurationen eingesetzt wird [91]. Neben immunsupprimierenden und immunmodulierenden Medikamenten haben Physiotherapie, Ergotherapie und physikalische Maßnahmen, wie Wärmeanwendungen, Bindegewebsmassagen und Elektrotherapie, einen festen Stellenwert in der Therapie und helfen, eine frühe Bewegungsunfähigkeit zu vermeiden.

## 1.6 Prognose und Verlauf

Die Einschätzung der Prognose und des Krankheitsverlaufs stellt im klinischen Alltag ein grundlegendes Bedürfnis von Patient und Arzt dar, was aktuell jedoch nur eingeschränkt gelingt. Das charakteristische Fortschreiten der Fibrose auf dem Boden eines chronischen Entzündungsprozesses bestimmt den Verlauf der Erkrankung sowie das Ausmaß der Organbeteiligung und ist ausschlaggebend für die erhöhte Morbidität und Mortalität [81, 83, 85]. Die Lebenserwartung von Patienten mit SSc ist gegenüber der Normalbevölkerung deutlich reduziert und variiert in Abhängigkeit vom Sklerodermie-Subtyp, Alter bei Diagnosestellung, Geschlecht, Rasse sowie der Schwere der Organbeteiligung [16]. Das 10-Jahres-Gesamtüberleben wird für Patienten mit lcSSc mit 69 - 89 % und für Patienten mit dcSSc mit 53 - 62 % angegeben [1, 6, 13]. Damit ist die SSc diejenige Erkrankung des Bindegewebes mit der höchsten Sterblichkeit [13].

Als unabhängige Risikofaktoren sind bislang das Ausmaß der Hautbeteiligung, eine Blutsenkungsgeschwindigkeit  $\geq 15$  mm/h und ein Hb-Wert  $< 12,5$  g/dl belegt [39, 1]. Patienten mit ausgeprägter Hautsklerose haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer renalen Krise und die Ausbildung einer Lungen- und/oder Herzbeteiligung und damit eine herabgesetzte Lebenserwartung [39].

Die Entwicklung pulmonaler Komplikationen ist eine Hauptursache für die erhöhte Morbidität und die Haupttodesursache unter SSc-Patienten [81, 83]. Pulmonale Veränderungen in HR-CT-Untersuchungen mit Entzündung und Fibrose des Interstitiums, der Alveolen und des peribronchialen Gewebes wurden bei 60 - 90 % der SSc-Patienten beschrieben [81]. Autopsie-Studien erbrachten vergleichbare Zahlen. Hier konnten SSc-assoziierte Lungenveränderungen als entscheidende Ursache für Morbidität und Mortalität in 74 - 95 % der untersuchten SSc-Lungenpräparate bestätigt werden [81]. Eine pulmonale Beteiligung ist damit bei der SSc häufiger als bei anderen Erkrankungen des Bindegewebes [83].

Eine frühzeitige Diagnose ist die Grundlage für eine angemessene Therapie der fibrosierenden Alveolitis und könnte die Prognose für SSc-Patienten erheblich verbessern. Allerdings sind die klinischen Zeichen der interstitiellen Lungenmanifestation oftmals mild und die Lungengerüstveränderungen schleichend. Im Krankheitsverlauf hat ein Teil der Patienten auch in fortgeschrittenen Krankheitsstadien eine stabile Lungenfunktion, während bei anderen Patienten die Lungenfibrose eine rasche Progredienz erfährt [82]. Eine Lungenfibrose im Endstadium entwickeln nur etwa 15 % der SSc-Patienten [83].

Die schlechte Prognose, die mit einer SSc-assoziierten ILD einhergeht, das individuell unterschiedliche Ansprechen auf die medikamentöse Therapie und die Toxizität der Behandlung sind wichtige Gründe dafür, dass SSc-Patienten mit hohem Risiko für einen Krankheitsprogress frühzeitig und sicher identifiziert werden sollten.

### **1.7 Zielsetzung und Fragestellung**

Patienten mit SSc entwickeln im Krankheitsverlauf häufig pulmonale Komplikationen, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert sind [81, 83]. Ursächlich ist eine progrediente Fibrosierung mit überschießender Produktion der EZM, deren Entstehungs- und Aufrechterhaltungsmechanismen bislang nicht vollständig verstanden sind. Zytokine und Chemokine scheinen dabei eine Schlüsselrolle zu spielen und kommen somit auch als potentielle therapeutische Ziele in Betracht.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde die Konzentration einzelner Zytokine und Chemokine im Serum und in der BALF von Patienten mit SSc bestimmt. Im Hinblick auf potentielle Schlüsselzytokine in der Pathogenese der SSc, wurden die gewonnenen Ergebnisse zusätzlich mit Messwerten von Patienten mit anderen chronischen Lungenerkrankungen und mit Messwerten von Gesunden verglichen. Darüber hinaus wurde nach Korrelationen zwischen Zytokinkonzentrationen und Lungenveränderungen, insbesondere der Lungenfibrose, gesucht. Zusätzlich wurde anhand von Folgeuntersuchungen der prädiktive Wert von Zytokinkonzentrationen für die Lungenfunktion analysiert.

Mit der vorliegenden Untersuchung sollen folgende Problemstellungen geklärt werden:

- Findet sich ein sklerodermie-typisches Zytokinmuster im Serum und in der BALF und inwieweit bestehen Unterschiede zwischen diesen beiden Untersuchungsmaterialien?
- Kann eine Assoziation zwischen Zytokinkonzentrationen und klinischen Parametern, insbesondere der Lungenfibrose, nachgewiesen werden und haben Zytokinkonzentrationen einen prädiktiven Wert für die Lungenfunktion?
- Welchen Stellenwert hat die BALF in der Diagnostik und in der Therapie SSc-spezifischer Lungenveränderungen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienpopulation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Proben von 271 Spendern untersucht. Alle Spender wurden einer von drei möglichen Studiengruppen zugeordnet. In Gruppe 1 wurden Patienten mit SSc zusammengefasst (SSc-Patienten); in Gruppe 2 Patienten, die sich aus medizinischer Indikation einer Bronchoskopie unterziehen mussten und nicht an SSc erkrankt waren (Kontrollpatienten); und in Gruppe 3 gesunde Spender (Gesunde). Einen Überblick über Anzahl und Verteilung der Proben gibt Tabelle 2.

|              | Gruppe 1<br>SSc-Patienten |      | Gruppe 2<br>Kontrollpatienten |      | Gruppe 3<br>Gesunde |
|--------------|---------------------------|------|-------------------------------|------|---------------------|
|              | Serum                     | BALF | Serum                         | BALF | Serum               |
| Probenanzahl | 193                       | 38   | 11                            | 27   | 50                  |

Tab. 2: Probenanzahl innerhalb der 3 untersuchten Studienpopulationen

Die schriftliche Einwilligung für die Gewinnung und wissenschaftliche Verwendung der Serumproben und der BALF wurde von jedem Probanden vor Beginn der Blutentnahme und der bronchoskopischen Untersuchung eingeholt. Die Untersuchungen und die Probengewinnung innerhalb des DNSS wurden von der lokalen Ethik-Kommission (EA1/013/705) genehmigt.

#### Gruppe 1 – SSc-Patienten

Alle in die Untersuchungen eingeschlossenen 193 SSc-Patienten (57 Patienten mit dcSSc und 136 Patienten mit lcSSc) erfüllen die von der American Rheumatism Association definierten Klassifikationskriterien für SSc [7] und waren im Zeitraum Januar 2004 bis Dezember 2006 an der medizinische Klinik für Rheumatologie und Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin in ambulanter oder stationärer Behandlung.

Die Auswahl der Studienteilnehmer aus dem Gesamtkollektiv der an der Klinik behandelten SSc-Patienten erfolgte konsekutiv. Einziges Einschlusskriterium war die, auf Grundlage der international gültigen Empfehlungen, eindeutig gestellte Diagnose SSc. SSc-Patienten mit akuten bakteriellen und/oder viralen Infektionen wurden aus der vorliegenden Studie ausgeschlossen.

Der Altersmedian der 171 Frauen und 21 Männer betrug 58 Jahre mit einer Spannweite von 20 bis 84 Jahren. Bei 177 SSc-Patienten (92 %) konnten antinukleäre Antikörper (ANA) nachgewiesen werden; bei 75 Patienten fanden sich Anti-Centromer-Antikörper; bei 39 Patienten Anti-Scl-70-Antikörper. Die Spannweite der Erkrankungsdauer reichte von 0,5 bis 38 Jahre nach Diagnosestellung (Tab. 3).

| SSc-Patienten gesamt (n = 193)                     |              |
|--|--------------|
| <i>klinische und demographische Charakteristik</i> |              |
| männlich/weiblich                                  | 21/172       |
| Alter [a]  | 58 (20 - 84) |
| Erkrankungsdauer [a]                               | 4 (0,5 - 38) |
| mRSS   | 6 (0 - 45)   |
| <i>Sklerodermie-typische Antikörper</i>            |              |
| antinukleäre Antikörper                            | 177 (92 %)   |
| Anti-Scl-70-Antikörper                             | 39 (20 %)    |
| Anti-Centromer-Antikörper                          | 75 (39 %)    |

Tab. 3: klinische und demographische Charakteristik sowie Autoantikörper des Gesamtkollektivs der SSc-Patienten (Gruppe 1); Alter, Erkrankungsdauer, modified Rodnan Skin Score (mRSS) als Median (range)

### **Gruppe 1.1. – SSc-Patienten mit BALF-Befund**

Im Untersuchungszeitraum wurde bei 32 Patienten des Gesamtkollektivs (20 Patienten mit dcSSc und 12 Patienten mit lcSSc) eine Bronchoskopie durchgeführt und 38 Proben BALF gewonnen. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Untersuchungen betrug stets mehr als 5 Monate. Grundlage zur Durchführung der bronchoskopischen Untersuchung war, neben einer auffälligen Klinik, eine pathologisch veränderte Lungenfunktion und/oder der Nachweis einer ILD im CT. Innerhalb dieser Gruppe erhielten 19 Patienten (60 %) eine niedrig dosierte Prednisolon-Therapie (< 12,5 mg/d); 3 Patienten waren aktive Raucher; 9 weitere Ex-Raucher (zum Untersuchungszeitpunkt  $\geq$  1 Jahr Nichtraucher).

In 27 BALF-Proben wurde eine pathologisch erhöhte Zellzahl gefunden (Tab. 4).

| SSc-Patienten mit BALF-Befund (n = 32)                   |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <i>klinische und demographische Charakteristik</i>       |                                       |
| männlich/weiblich  | 8/24                                  |
| Alter [a]  | 58,5 (30 - 70)                        |
| Erkrankungsdauer [a]                                     | 3,5 (0,5 - 14)                        |
| mRSS   | 11 (0 - 31,0)                         |
| Raucher  | 3 (9,4 %)                             |
| Ex-Raucher   | 9 (28 %)                              |
| Nichtraucher   | 20 (62,6 %)                           |
| <i>BALF-Daten</i>  |                                       |
| pathologisch erhöhte Zellzahl                            | 27 (71 %)                             |
| eosinophile Alveolitis                                   | 6 (22,2 % aller pathologischen BALF)  |
| neutrophile Alveolitis                                   | 6 (22,2 % aller pathologischen BALF)  |
| gemischtzellige Alveolitis<br>(lymphozytär-granulozytär) | 15 (55,5 % aller pathologischen BALF) |

Tab. 4: klinische und demographische Charakteristik und BALF-Daten aller SSc-Patienten mit BALF-Befund (Patientengruppe 1.1); Alter, Erkrankungsdauer und mRSS als Median (range)

## Gruppe 2 - Kontrollpatienten

In Gruppe 2 konnten 26 Patienten (15 Frauen und 11 Männer) verschiedener Kliniken der Charité Universitätsmedizin Berlin aufgenommen werden. Als Einschlusskriterium galt die Durchführung einer medizinisch indizierten Bronchoskopie zum Nachweis/Ausschluss einer idiopathischen ILD, Infektion und/oder malignen Erkrankung. Die Untersuchungen erfolgten im Zeitraum Juni 2004 bis August 2005 an der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Unter den Kontrollpatienten mit anderen Lungenerkrankungen finden sich 12 Patienten mit Sarkoidose, 6 Patienten mit idiopathischer ILD, 7 Patienten mit unspezifischen entzündlichen Lungenerkrankungen, 1 Patient mit Alveolarproteinose.

Patienten, die an einer SSc erkrankt waren, wurden aus Gruppe 2 ausgeschlossen. Weitere Ausschlusskriterien wurden nicht definiert. Der Altersmedian lag bei 45 Jahren mit einer Streubreite von 20 bis 75 Jahren. 5 der Kontrollpatienten waren aktive Raucher, weitere 5 Kontrollpatienten Ex-Raucher (zum Untersuchungszeitpunkt  $\geq 1$  Jahr Nichtraucher) (Tab. 5).

| Kontrollpatienten (n = 27)                               |                                       |
|--|---------------------------------------|
| <i>klinische und demographische Charakteristik</i>       |                                       |
| männlich/weiblich  | 11/16                                 |
| Alter [a]  | 45 (20 - 75)                          |
| Raucher  | 5 (18,5 %)                            |
| Ex-Raucher   | 5 (18,5 %)                            |
| Nichtraucher   | 17 (63 %)                             |
| <i>BALF-Daten</i>  |                                       |
| pathologisch erhöhte Zellzahl                            | 20 (74 %)                             |
| lymphozytäre Alveolitis                                  | 10 (47,6 % aller pathologischen BALF) |
| granulozytäre Alveolitis                                 | 4 (19 % aller pathologischen BALF)    |
| gemischtzellige Alveolitis<br>(lymphozytär-granulozytär) | 7 (33,4 % aller pathologischen BALF)  |

Tab. 5: klinische und demographische Charakteristik und BALF-Daten aller Kontrollpatienten (Patientengruppe 2); Alter, Erkrankungsdauer und mRSS als Median (range)

### Gruppe 3 - Gesunde

Die Serumproben von gesunden Personen wurden von 50 freiwilligen Blutspendern (37 Männern und 13 Frauen) am Institut für Transfusionsmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin gewonnen. Der Altersmedian lag bei 40 Jahren mit einer Spannweite von 19 bis 72 Jahren.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewinnung von Serum aus peripherem Blut

Die Serumproben der SSc-Patienten wurden im Rahmen von Routine-Blutentnahmen während der ambulanten oder stationären Behandlung gewonnen; die Serumproben der Kontrollpatienten wurden in Vorbereitung der bronchoskopischen Untersuchung oder direkt im Rahmen dieser Untersuchung entnommen.

Die Entnahme erfolgte nach den Regeln der medizinischen Praxis aus einer peripheren Vene (Unterarm- oder Kubitalvene) in 2,5 ml Serumröhrchen. Im Zeitraum von 15 - 30 min wurde das geronnene Blut 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum separiert, aliquotiert, bei -20 °C gelagert und erst unmittelbar zu den Messungen aufgetaut. Das Sediment wurde verworfen.

### 2.2.2 Bronchoskopische Gewinnung von BALF

Alle bronchoskopischen Untersuchungen wurden an der Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Charité Mitte nach den Empfehlungen der deutschen Gesellschaft für Pneumologie und der American Thoracic Society über die Durchführung diagnostischer und therapeutischer bronchoalveolärer Lavage durchgeführt [90, 92, 93].

Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich nach medizinischer Indikationsstellung mit den flexiblen Fiberbronchoskopen BF-1T20 (Fa. Olympus, Hamburg, D) oder FB-18P (Fa. Pentax, Hamburg, D). Die Entnahme der BALF erfolgte standardisiert aus einem Subsegment des rechten Mittellappens oder alternativ aus der zum rechten Oberlappen gehörenden Lingula.

Für die Untersuchung wurden die Patienten in einer halb sitzenden Position gelagert und waren wach. Als Prämedikation wurden 0,5 mg Atropinsulfat i. v. zur Vagolyse, 5 - 10 mg Diazepam i. v. und zusätzlich 15 mg Hydrocodon s. c. zur Hustenstillung appliziert. Im Anschluss an eine ausführliche Lokalanästhesie mit 2 % Prilocainlösung wurde ein flexibles Fiberbronchoskop transnasal oder transoral unter Sicht über die Trachea und den rechten Hauptbronchus in das Bronchialsystem eingeführt und bis in die wedge-Position vorgeschoben. In dieser Position verschließt die Gerätespitze in Ruheatmung atraumatisch das Bronchiallumen, um das Aspirieren der eingebrachten Spüllösung zu ermöglichen.

Durch den Instrumentierkanal des Bronchoskopes wurden insgesamt 150 ml sterile, auf 37 °C vorgewärmte physiologische Kochsalzlösung instilliert und anschließend wieder aspiriert. Die Instillation erfolgte in Fraktionen zu je 20 ml. Nach Instillation jeder Einzelfraktion wurde umgehend mit geringem Unterdruck aspiriert. Das zurückerhaltene Volumen (Recovery) der Einzelfraktionen (50 - 70 %) wurde zu einer Pool-Fraktion zusammengefasst und durch sterile Gaze gefiltert, um grobe Verunreinigungen wie Schleimbeimengungen zu beseitigen. Die so gewonnene BALF ist ein Gemisch aus dem rückgewonnenen eingespülten Medium und dem epithelial lining fluid, einem dünnen Flüssigkeitsfilm, der den Epithelien aufliegt, die die peripheren Bronchien und Alveolen auskleiden. Sie enthält zu über 95 % alveoläre Bestandteile.

Zeitnah zur Bronchoskopie, meist unmittelbar nach Entnahme, wurden die zellulären Bestandteile der BALF durch Zentrifugation (10 min bei 1400 rpm) separiert. Die zellfreie BALF wurde bei -20 °C gelagert und erst unmittelbar für die Zytokinmessungen aufgetaut. Das nach der Dekantierung zurückgebliebene Zellpellet wurde zweimal mit PBS (Biochrom AG, Berlin, D) gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufgenommen. Je 100 µl der BALF-Zellsuspension

wurden mit Hilfe einer Zytocentrifuge auf einem Objektträger verteilt und nach Pappenheim gefärbt. Im Anschluss daran erfolgten sequenzielle Färbungen nach May-Grünwald und Giemsa (Merck, Darmstadt, D). Es wurden 600 Zellen lichtmikroskopisch bei 1000facher Vergrößerung differenziert.

Unter Berücksichtigung vorbeschriebener Normalwerte für die angewandte BALF-Prozedur [94], wurden folgende BALF-Zellzahlen als pathologisch bewertet: bei Nichtrauchern > 15 % Lymphozyten, > 3 % neutrophile Granulozyten und/oder > 0,5 % eosinophile Granulozyten; bei Rauchern > 7 % Lymphozyten, > 3 % neutrophile Granulozyten und/oder > 0,5 % eosinophile Granulozyten. Eine Alveolitis wurde definiert als eine Erhöhung des Verhältnisses von Entzündungszellen und/oder der absoluten Anzahl von Entzündungszellen in der BALF im Vergleich mit Zellzahlen bei gesunden Kontrollpersonen [95]. Anhand einer pathologisch erhöhten Zellzahl wurde die BALF eingeteilt in lymphozytäre Alveolitis, eosinophile Alveolitis, neutrophile Alveolitis sowie in eine gemischtzellige Alveolitis (lymphozytär-granulozytäre Form).

Die Bestimmung der CD4/CD8-Ratio erfolgte im Routinelabor mittels Durchflusszytometrie (BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, BD Biosciences Erembodegem, B).

### **2.2.3 Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA**

Enzym-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) sind etablierte Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen, Chemokinen und Proteinen im Mikro- und Picogrammbereich. Grundlage dieses Messverfahrens ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in Seren und BALF Sandwich-ELISA durchgeführt. Neben einem konventionellen Festplatten-ELISA kam auch ein Bead-gekoppelter ELISA zur Anwendung.

Das allgemeine Messprinzip ist eine Komplexbildung aus dem zu messenden Antigen (Zytokin) und einem spezifischen monoklonalen Primärantikörper (Captureantikörper). Dieser Komplex wird von einem polyklonalen enzymgekoppelten Sekundärantikörper (Detectionantikörper) gebunden. Das an den Detectionantikörper gekoppelte Enzym führt bei einem zugegebenen Substrat zu einer Extinktionsänderung, die photometrisch bestimmt werden kann. Die gesuchte Antigenkonzentration ist proportional der Ausprägung der Extinktionsänderung und kann an Hand einer Standardkurve errechnet werden.

### 2.2.3.1 Quantikine® Human TGF-β1

Zur Bestimmung der Konzentration des Zytokins TGF-β1 in Seren und BALF wurde das Kit Quantikine® Human TGF-β1 der Firma R&D Systems (Wiesbaden, D) verwendet.

Dieses Kit beinhaltet eine TGF-β1-Mikrotiterplatte mit Captureantikörpern beschichtet; den Detectionantikörper (mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt); einen lyophilisierten Standard; als Farbreagenz A stabilisiertes Wasserstoffperoxid; als Farbreagenz B stabilisiertes Tetramethylbenzidin; als Stopplösung verdünnte HCL-Lösung und weiterhin Assay Diluent (Verdünnungslösung) für Proben und Standard; den Waschpuffer als Konzentrat. Alle gelieferten Materialien wurden nach Herstellerangaben angesetzt, verwendet und aufbewahrt. Zusätzlich wurden folgende Lösungen hergestellt:

1. 1 N HCL: 91,67 ml Aqua dest. + 8,33 ml 12 N HCL (Merk, Darmstadt, D)
2. 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES: 75 ml Aqua dest. + 12 ml 10 N NaOH (Merk, Darmstadt, D) + 11,9 g HEPES (Sigma, Steinheim, D), auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt

Das Testkit ermöglicht den Nachweis von TGF-β1 in immunologisch aktiver Form. Zum Aktivieren der Proben (40 µl) wurden 20 µl 1 N HCL zugesetzt. Nach 10 min Inkubation wurde mit 20 µl 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES neutralisiert. Die vom Hersteller empfohlene 20fache Verdünnung der aktivierten Proben mit Assay Diluent ergab für einige Serumproben Werte oberhalb des Nachweismaximums des Photometers. Aus diesem Grund wurden die Serumproben mit dem entsprechenden Assay Diluent 40fach verdünnt und die Messwerte im Anschluss mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert. Für die BALF lagen bei 20facher Verdünnung alle Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze des Photometers, weshalb die Messungen mit 5facher Verdünnung wiederholt wurden.

Im Anschluss an die Vorbereitung der Proben wurde die Standardreihe hergestellt, mit Konzentrationen von 0 bis 2000 pg/ml. In die 96-Well-TGF-β1-Mikrotiterplatte wurden je Well 50 µl Assay Diluent vorgelegt und nachfolgend die Standards und Proben aufgetragen (50 µl/Well). Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Inhalt der Platte verworfen, die Mikrotiterplatte gewaschen (4 x 300 µl/Well) und der Detectionantikörper pipettiert (100 µl/Well). Im Anschluss an weitere 2 Stunden Inkubation wurde erneut der Inhalt der Mikrotiterplatte verworfen. Nach Wiederholung des Waschschrattes (4 x 300 µl/Well) wurden die Farbreagenzen A und B zu gleichen Teilen gemischt und innerhalb von 15 Minuten pipettiert (100 µl/Well). Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Durch Zugabe von Stopplösung (100 µl/Well) wurde die Chemilumineszenz-Reaktion unterbrochen, die

Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm im Mikrotiterplatten-Reader SLT-Spectra (SLT-Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim, D) bestimmt und mit Hilfe der Software Magellan® Version 2.5 (Tecan, Crailsheim, D) ausgewertet.

Als interne Qualitätskontrolle der Messreihe wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt.

### **2.2.3.2 Bio-Plex™ Human Cytokine Assay**

Im Gegensatz zu konventionellen ELISA, bei denen der Captureantikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert ist, sind bei diesem Messverfahren die Captureantikörper mit fluoreszierenden 5,5 µm Polystyrene-Beads konjugiert und bleiben in einer 96-Well-Mikropore-Filterplatte in Lösung. Durch Zusatz eines Detectionantikörpers entsteht nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion im Versuchsablauf eine Sandwich-Formation aus farbcodiertem Bead (konjugiert mit Captureantikörpern), Zielmolekülen (Zytokin) und biotynilierten Detectionantikörpern, welche nach Substratzusatz fluoreszieren. Die Messung erfolgt mit dem Bio-Plex™ Array Reader (Bio-Rad Laboratories, München, D), der im Durchflussverfahren die Fluoreszenzintensität pro farbcodiertem Bead in Echtzeit identifiziert und der Bio-Plex™ Manager-Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, München, D), mit deren Hilfe die ermittelte Fluoreszenzstärke quantifiziert wird. Der Einsatz dieser Technik ermöglicht die parallele Bestimmung unterschiedlicher Zytokine in einer Probe. Auf Grund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der zu messenden Zytokine bietet die Firma Bio-Rad Laboratories die benötigten Reagenzien in einzelnen Kits an, die entsprechend des Versuchsaufbaus kombiniert werden können. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen kamen folgende Produkte zum Einsatz:

1. Bio-Plex™ Cytokine Reagent Kit: beinhaltet neben dem Probenpuffer und dem Waschpuffer, die Verdünnungslösung für die Detectionantikörper, Streptavidin-Phycoerythrin (Streptavidin-PE) und sterile Mikropore-Filterplatten mit entsprechenden Abdeckfolien
2. Bio-Plex™ Human Serum Diluent Kit: besteht aus spezies-spezifischer Verdünnungslösung (Diluent) für Serumproben und Standards
3. Bio-Plex™ Human 17-Plex Panel: enthält als vorgefertigte Reagenzien die Beadlösung (Antikörper-konjugierten Beads), die Detectionantikörper und den lyophilisierten

Standard für die parallele Bestimmung von 17 Zytokinen. Der 17-Plex-Panel wurde für die 1. Versuchsreihe eingesetzt (Tab. 6).

4. Bio-Plex™ Human Cytokine Singleplex Assay: umfasst Beadlösung, Detectionantikörper und lyophilisierten Standard für die Bestimmung eines ausgewählten Zytokins. Für die 2. Versuchsreihe wurden 7 Singleplex Assays zu einem Testset kombiniert (Tab. 6).

Alle gelieferten Materialien wurden nach Herstellerangaben angesetzt, verwendet und aufbewahrt. Zum Waschen der Mikropore-Filterplatten mittels Vakuum wurde der Aurum™ Vacuum Mainfold der Firma Bio-Rad Laboratories (München, D) verwendet. Ein Waschschrift besteht aus 3-maligem Pipettieren von 100 µl Waschpuffer pro Well und anschließender Vakuumfiltration. Die Stärke des Vakuums wurde auf 1 - 2 mmHg eingestellt. Im ersten Arbeitsschritt wurden die Proben 1:3 mit dem spezie-spezifischen Diluent verdünnt und eine Standardreihe angefertigt mit Konzentrationen von 1,95 bis 32.000 pg/ml. Auf der Mikropore-Filterplatte wurden 150 µl Probenpuffer pro Well vorgelegt und nachfolgend vakuumfiltriert. Im Anschluss daran wurde die Bead-Arbeitslösung mit einem Vortex 15 - 20 s gründlich verwirbelt und sofort auf die vorbereitete Mikropore-Filterplatte aufgetragen (50 µl/Well). Nach einem Waschschrift (3 x 100 µl/Well) erfolgte das Pipettieren der Standards und Proben (50 µl/Well) mit anschließender Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur, durch Alufolie verdunkelt, auf einem Mikrotiter-Plate-Shaker bei 300 rpm. Nach der Inkubation wurde der Platteninhalt mittels Vakuum entfernt und die Platte erneut gewaschen (3 x 100µl/Well). Im Anschluss daran wurde der Detectionantikörper aufgetragen (25 µl/Well) und die Mikropore-Filterplatte für weitere 30 min inkubiert.

Dafür wurde die Platte erneut, mit Alufolie verdunkelt, auf einem Mikrotiter-Plate-Shaker bei 300 rpm gelagert. Nach Entfernung des Platteninhalts durch Vakuumfiltration und Wiederholen des Waschschriftes (3 x 100 µl/Well) wurde Strepavidin-PE-Lösung aufgetragen (50 µl/Well) und die Mikropore-Filterplatte nochmals für 10 min verdunkelt auf dem Mikrotiter-Plate-Shaker bei 300 rpm inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Bio-Plex™-Array-Reader mit den mitgelieferten Calibratoren geeicht. Es folgte ein letzter Waschschrift (3 x 100 µl/Well) mit nachfolgendem Resuspendieren (125 µl/Well) und anschließend das Auslesen der Platte.

Als interne Qualitätskontrolle der Messreihe wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Die ermittelten Zytokinkonzentrationen wurden entsprechend der Menge des BALF-Rückflusses korrigiert.

|                   | 1. Versuchsreihe  |        | 2. Versuchsreihe  |       |
|-------------------|---|--------|---|-------|
|                   | Serum   | BALF   | Serum   | BALF  |
| SSc-Patienten     | n = 58  | n = 33 | n = 135   | n = 5 |
| Kontrollpatienten | n = 11  | n = 24 |   | n = 3 |
| Gesunde           |   |        | n = 50  |       |
| Zytokine          | IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7,<br>IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17,<br>MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , G-CSF,<br>GM-CSF, INF $\gamma$ |        | IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF $\alpha$ ,<br>MIP-1 $\beta$ |       |

Tab. 6: Übersicht über Probenumfang und -verteilung sowie die mit Bio-Plex™ Human Cytokin Assay gemessenen Zytokine in der 1. und 2. Versuchsreihe

#### 2.2.4 Bestimmung von Anti-AT<sub>1</sub>-R-Antikörpern und Anti-ET<sub>A</sub>-R-Antikörpern mittels Festplatten-ELISA

Zur Bestimmung von Antikörpern gegen den Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor (Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak) sowie gegen den Endothelin-Typ-A-Rezeptor (Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak) wurde ein Festplatten-Sandwich-ELISA der Firma CellTrend GmbH (Luckenwalde, D) verwendet. Die Messungen wurden durch die Firma Celltrend GmbH mittels eines patentrechtlich geschützten Verfahrens durchgeführt [96, 97]. Dabei wurden humane rekombinante AT<sub>1</sub>-Rezeptoren und ET<sub>A</sub>-Rezeptoren als feste Phase verwendet, an die die, im zugegebenen und zu messenden Serum vorhandenen Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak bzw. Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak binden.

Als Detectionantikörper wurden peroxidase-markierte Anti-IgG-Ak verwendet (Jackson, USA). Da Antikörper gegen den Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor und gegen den ET<sub>A</sub>-Rezeptor bislang nicht kommerziell erworben werden können, diente die Serumprobe eines SSc-Patienten als Positiv-Kontrolle. Die, in der 1:800 verdünnten Serumprobe gemessenen Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- und Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Spiegel wurden als eine Konzentration von 20 units definiert. Probenwerten  $\geq 20$  units gelten als anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- bzw. anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-positiv. Die Spezifität des Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-ELISA sowie des Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-ELISA wurde experimentell unter Verwendung des korrespondierenden rekombinanten Rezeptors geprüft. Mit einer dosisabhängigen Abnahme der Antikörperbindung für das entsprechende Antigen konnte die Spezifität des verwendeten Testverfahrens bewiesen werden.

Die Serum- und BALF-Proben wurden in randomisierter Reihenfolge analysiert. Die Untersucher waren für alle weiteren Untersuchungen und Untersuchungsergebnisse verblindet. Als interne

Qualitätskontrolle wurden von allen Proben Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurde eine Inter-Assay-Variabilität von 7,3 % und eine Intra-Assay-Variabilität von 5,75 % erreicht.

### **2.2.5 Bestimmung des hCMV-Infektionsstatus**

Die Beurteilung des hCMV-Infektionsstatus der SSc-Patienten erfolgte sequenziell unter Verwendung direkter und indirekter Untersuchungsverfahren. In einem ersten Schritt wurden virus-spezifische IgG- und IgM-Antikörper direkt im Serum der SSc-Patienten mittels ELISA bestimmt. Diese serologische Untersuchungsmethode dient der Feststellung des Infektionsstatus. Eine Einschätzung der Aktivität der hCMV-Infektion ist damit jedoch nicht ausreichend möglich. Aus diesem Grund wurde im Anschluss zusätzlich die virale dsDNA in der BALF und im Serum mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen.

Die Messungen wurden im Institut für medizinische Virologie, Charité Campus Mitte durchgeführt. Nur SSc-Patienten mit positiver Serologie und zusätzlich positivem Nachweis von Virus-DNA im Serum und in der BALF wurden in der vorliegenden Arbeit als hCMV-positiv berücksichtigt.

### **2.2.6 Erhebung der klinischen Parameter**

#### **2.2.6.1 Bestimmung der Erkrankungsdauer**

Für SSc-Patienten wurde der Zeitpunkt der Erstdiagnose definiert als das erstmalige Auftreten sklerodermie-typischer Symptome nach Klassifikation der ACR [7] außer einem Raynaud-Phänomen. In der vorliegenden Arbeit entspricht die Krankheitsdauer der Zeitspanne zwischen der Erstdiagnose und dem Zeitpunkt der Probenentnahme.

#### **2.2.6.2 Klassifikation der Hautveränderung**

Die Einschätzung des Schweregrades der Hautveränderung erfolgte durch erfahrene Untersucher der Klinik für Immunologie und Rheumatologie der Charité Universitätsmedizin Berlin auf Grundlage des mRSS. Dieser in der Literatur vielfach beschriebene Score [98] klassifiziert die Ausprägung der Hautveränderungen semiquantitativ an Hand einer 4-Punkte-Skala.

Nach Palpation wurden Hautdicke und Hautfältelung wie folgt bewertet: 0 = normale, nicht verdickte Haut; 1 = schwache Hautdickung; 2 = mäßige Hautverdickung; 3 = schwerwiegende Hautverdickung. Die Bewertung erfolgte an 17 definierten Hautarealen. Das sind im Einzelnen: Gesicht, frontaler Thorax, Abdomen, Oberarme, Unterarme, Hände, Finger, Oberschenkel,

Unterschenkel und Füße. Innerhalb eines Hautareals bestimmt der Bereich mit der stärksten Ausprägung der Verhärtung den vergebenen Punktwert. Der mRSS ergibt sich durch Summation der Einzelpunktwerte in den 17 definierten Hautarealen (Tab. 7). Die Unterscheidung in lcSSc und dcSSc erfolgte an Hand der Kriterien von LeRoy [8], (Tab. 8).

| Schweregrad |                                  | mRSS    |
|-------------|----------------------------------|---------|
| 0           | Normalbefund                     | 0       |
| 1           | geringe Hautveränderungen        | 1 - 14  |
| 2           | mäßige Hautveränderungen         | 15 - 29 |
| 3           | schwerwiegende Hautveränderungen | 30 - 39 |
| 4           | Finalstadium                     | 40 +    |

Tab. 7: Beurteilung der Hautveränderung anhand des mRSS

| Symptome/Befunde    | diffuse Form (dcSSc)  | limitierte Form (lcSSc)  |
|---------------------|---|--|
| Hautbefall          | Stamm und Akren betroffen   | Sklerose, Ödem, Nekrose im Bereich von Händen, Füßen und Unterarmen oder Gesicht   |
| Raynaudphänomen     | Beginn meist erst nach Auftreten von Hautveränderungen (meist im Verlauf eines Jahres)  | seit Jahren bis Jahrzehnten  |
| Organbeteiligung    | frühes Auftreten: interstitielle Lungenerkrankung, oligurisches Nierenversagen, gastrointestinale Beteiligung, Myokardbeteiligung | spätes Auftreten vor allem von pulmonaler arterieller Hypertonie; ohne Lungengerüsterkrankung, Trigeminusneuralgie, Hautverkalkungen, Teleangiektasien, Ösophagusmotilitätsstörungen |
| Kapillarmikroskopie | dilatierte und destruierte Nagelfalzkapillaren  | dilatierte, selten destruierte Nagelfalzkapillaren   |
| Autoantikörper      | Anti-Topoisomerase (ca. 30 %), keine Anti-Centromer-Antikörper  | Anti-Centromer-Antikörper (bei 70-80 % der Patienten)  |

Tab. 8: Einteilungskriterien zur Unterscheidung der SSc in eine diffuse und eine limitierte Form (nach LeRoy)

### 2.2.6.3 Lungenfunktionsdiagnostik

Die Lungenfunktionsdiagnostik erfolgte im Rahmen der ambulanten oder stationären Behandlung im Pneumologischen Funktionsbereich der Charité Universitätsmedizin Berlin am Campus Charité Mitte. Zur Bestimmung der statischen und dynamischen Lungenvolumina, des Atemwegswiderstandes sowie der CO-Diffusionskapazität (DLCO) wurden in sitzender Position eine Spirometrie und eine Ganzkörperplethysmographie durchgeführt (Siregnost FD 40/FD 91, Fa. Siemens, Erlangen, D; MasterScreen Body, Fa. Jaeger, Würzburg, D). Lungengerüsterkrankungen, wie z. B. eine Lungenfibrose, gehen typischerweise mit einer restriktiven Ventilationsstörung einher. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis einer restriktiven Lungenfunktionsstörung die Totale Lungkapazität (TLC), die Forcierte Vitalkapazität (FVC) und die DLCO herangezogen. Die TLC beschreibt das nach maximaler Inspiration in den Lungen vorhandene Gasvolumen und entspricht damit der Summe aus Residualvolumen und Vitalkapazität. Die FVC entspricht dem Lungenvolumen, das nach maximaler Ausatmung maximal wieder eingeatmet werden kann. Ab einem Messergebnis von  $FVC < 85\%$  wurde die FVC als reduziert und als Zeichen einer Organbeteiligung bei SSc gewertet. Die Einteilung des Schweregrades erfolgte anhand einer 5-Punkte-Skala mit folgender Bedeutung: Restriktionsgrad 0:  $FVC > 85\%$  (normal); Restriktionsgrad 1:  $FVC = 70 - 84\%$  (leicht reduziert); Restriktionsgrad 2:  $FVC = 50 - 69\%$  (mäßig eingeschränkt); Restriktionsgrad 3:  $FVC = 35 - 50\%$  (stark reduziert); Restriktionsgrad 4:  $FVC < 35\%$  (massiv reduziert).

Die Bestimmung der DLCO dient der sensiblen Erkennung von Störungen der pulmonalen Diffusionsstrecke. Bei der hier zur Anwendung gekommenen Single-Breath-Methode atmet der Patient nach maximaler Ausatmung ein Gasmisch aus 0,25 % Kohlenmonoxid (CO), 9 % Helium (He) und Luft langsam über ein Mundstück maximal ein und nach 10 s Luftanhalten wieder vollständig aus. Die CO-Differenz zwischen ein- und ausgeatmeter Luft ist ein Maß für den alveolo-kapillären CO-Transfer, aus dem unter Berücksichtigung des Alveolarvolumens die Diffusionskapazität der Lunge berechnet werden kann. Eine  $DLCO < 85\%$  wurde als reduziert gewertet. Auch die Abnahme der DLCO wurde anhand einer 4-Punkte-Skala quantifiziert. Dabei bedeutet Diffusionsgrad 0:  $DLCO > 85\%$  (normal); Diffusionsgrad 1:  $DLCO = 70 - 84\%$  (leicht reduziert); Diffusionsgrad 2:  $DLCO = 50 - 69\%$  (mäßig reduziert); Diffusionsgrad 3:  $DLCO < 50\%$  (stark reduziert).

Alle Messwerte der Lungenfunktionsdiagnostik wurden anhand von Normwerten größen-, geschlechts- und alterskorrigiert.

#### **2.2.6.4 Nachweis einer pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH)**

Nach der European Society of Cardiology ist die PAH definiert als eine Steigerung des pulmonalen Mitteldrucks über 25 mmHg in Ruhe und über 30 mmHg bei Belastung (60W) [99]. Die Diagnose einer PAH wurde in der vorliegenden Arbeit indirekt mittels Echokardiographie gestellt. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Echokardiographie als nichtinvasive Untersuchungsmethode eine hohe Sensitivität und Spezifität besitzt, verglichen mit der Rechtsherz-Katheder-Untersuchung als Goldstandard der Diagnostik [100, 101]. Entsprechend dieser Definition und in Übereinstimmung mit den Kriterien des DNSS wurde eine PAH bei einem mittleren pulmonal-arteriellen Druck  $> 40$  mmHg diagnostiziert [16].

#### **2.2.6.5 Nachweis einer Lungenfibrose mittels HR-CT und visueller Analyse**

Bei klinischen Hinweisen auf eine Lungenbeteiligung bei SSc und Ausschluss anderer möglicher Ursachen für eine Lungenfibrose sowie bei Krankheitsprogress wurde eine HR-CT des Thorax in Rückenlage bei maximaler Inspiration erstellt. (Toshiba CT-Scanner: Aquilion16/Aquilion 64; GE-Arbeitsstation). Der maximale zeitliche Abstand zwischen CT-Aufnahmen und Bronchoskopie mit BALF-Gewinnung betrug 3 Monate. Verblindet für alle weiteren Untersuchungsergebnisse bewerteten zwei Radiologen unabhängig voneinander die Aufnahmen anhand eines von Warrick etablierten Scores, mit Hilfe dessen sowohl die Schwere der Lungengerüstveränderungen als auch deren Ausmaß bewertet werden können [80]. Dabei wurden in Abhängigkeit der computertomographischen Befunde folgende Punktwerte vergeben: 1 Punkt = Milchglaszeichnung, 2 Punkte = irreguläre Pleuragrenzen, 3 Punkte = septale/subpleurale Linien, 4 Punkte = Honigwabemuster, 5 Punkte = subpleurale Zysten. Bei einem maximalen Punktwert von 15 Punkten sind alle Auffälligkeiten nachweisbar.

Der zweite Teil des Scores reflektiert die Ausprägung der Erkrankung und deren Verteilung in den einzelnen Lungenabschnitten: 1 Punkt bei Beteiligung von 1 - 3 bronchopulmonalen Segmenten, 2 Punkte bei Beteiligung von 4 - 9 bronchopulmonalen Segmenten und 3 Punkte bei Beteiligung von  $> 9$  bronchopulmonalen Segmenten. Die Bilder wurden mit hochauflösendem Feldkern im Lungenfenster erstellt (Fensterlage -500 HU (Hounsfield units), Fensterbreite 1500 HU), Rekonstruktionsschichtdicke 0,5 mm Rekonstruktionsabstand 0,75 mm). Zur Abschätzung der intraindividuellen Reproduzierbarkeit, beurteilte einer der Radiologen alle CT-Aufnahmen zu drei verschiedenen Zeitpunkten mit einem Mindestabstand von 24 Stunden.

### 2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms GraphPad Prism<sup>®</sup> Version 3.02 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien) für Microsoft<sup>®</sup>, Windows. Zum Vergleich von unverbundenen Stichproben wurde ausschließlich der nicht-parametrische Mann Whitney Test verwendet, unter der Voraussetzung, dass die Messwerte nicht normal verteilt waren. Der Unterschied in der Ausprägung eines Merkmals wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ( $p < 0,05$ ). Lineare Korrelationen wurden mit dem Pearson Korrelationskoeffizienten geprüft.

Mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS<sup>®</sup> Version 15.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois) wurden folgende Parameter in einer logistischen Regressionsanalyse betrachtet: Patientenalter, Geschlecht, DLCO, FVC, HR-CT-Score, mRSS, neutrophile und eosinophile Alveolitis sowie BALF-Zytokinkonzentrationen. Für eine anschließende multivariate Analyse wurden Parameter der univariaten Analyse mit p-Werten  $< 0,1$  ausgewählt. In einer zweiten multivariaten Analyse wurden die BALF-Zytokinkonzentrationen getrennt betrachtet. Standen von einem Patienten mehrere Proben zur Verfügung, wurden die Messwerte vor dem Einschluss in die statistische Analyse gewichtet.

Auf Grund des Pilotcharakters der vorliegenden Studie von Patienten mit einer seltenen Erkrankung erfolgte keine Adjustierung der p-Werte nach multipler Testung.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen von Voruntersuchungen wurden in einer ersten Versuchsreihe die Serumkonzentrationen von 17 Zytokinen in 69 Proben bestimmt (SSc-Patienten  $n = 58$ , Kontrollpatienten  $n = 11$ ). Eine Zusammenstellung der analysierten Zytokine und Chemokine mit den entsprechenden Gruppengrößen der ersten und zweiten Versuchsreihe findet sich in Tabelle 6. Die statistische Auswertung der Zytokinkonzentrationen zeigte für SSc-Patienten, verglichen mit Kontrollpatienten mit anderen Lungenerkrankungen, erhöhte Konzentrationen für IL-7 (Median 2,09 pg/ml bzw. 0,0 pg/ml;  $p = 0,0035$ ), IL-8 (Median 1,93 pg/ml bzw. 0,0 pg/ml;  $p = 0,0026$ ) und IL-10 (Median 0,3 pg/ml bzw. 0,0 pg/ml;  $p = 0,0341$ ) sowie verminderte Konzentrationen für MIP-1 $\beta$  (Median 40,41 pg/ml bzw. 79,66 pg/ml;  $p = 0,0081$ ). Keine statistisch signifikanten Unterschiede der Serumkonzentrationen fanden sich bei der Analyse von G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-13, MCP-1 und TNF $\alpha$ . Die Messwerte von IL-5, IL-12, IL-17 und INF $\gamma$  waren sowohl in der Gruppe der SSc-Patienten als auch in der Gruppe der Kontrollpatienten unterhalb der Nachweisgrenze.

Für die zweite Versuchsreihe mit größerem Stichprobenumfang, wurde unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und der aktuellen Literatur, aus den 17 Zytokinen der ersten Versuchsreihe IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  ausgewählt. Zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft wurde die Gruppengröße der SSc-Patienten verdreifacht. Zusätzlich wurden 50 Proben von gesunden Spendern untersucht. Nachfolgend sind die Ergebnisse aus beiden Versuchsreihen zusammengefasst dargestellt.

Die statistische Auswertung aller untersuchten Proben erfolgte primär für Serum und BALF getrennt. Zusätzlich konnten für einige SSc-Patienten und Kontrollpatienten zeitnah gewonnene Serum-BALF-Paare gebildet und auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Serum- und BALF-Zytokinkonzentrationen analysiert werden.

#### 3.1 Zytokinmessungen im Serum

Es wurden insgesamt 254 Serumproben (SSc-Patienten  $n = 193$ , Kontrollpatienten  $n = 11$ , Gesunde  $n = 50$ ) analysiert, um sklerodermietypische Zytokinmuster zu identifizieren und mögliche Assoziationen zwischen Zytokinkonzentrationen und dem klinischen Erscheinungsbild zu verifizieren.

Zu Beginn wurden die Zytokinspiegel aller SSc-Patienten und gesunden Spender, ungeachtet möglicher klinischer Untergruppen, miteinander verglichen. Dabei fanden sich für SSc-Patienten erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-7, IL-8 und MCP-1. Im Gegensatz dazu sind die Konzentrationen von IL-10 und TNF $\alpha$  im Serum von SSc-Patienten verglichen mit Gesunden signifikant vermindert (Tab. 9). Sowohl bei SSc-Patienten als auch bei Gesunden ist TGF- $\beta$ 1 das Zytokin mit der höchsten Serumkonzentration, jedoch ohne signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen beiden Gruppen (Tab. 9).

| Zytokin       | SSc-Patienten<br>(n = 193) | Gesunde<br>(n = 50)   | p-Wert       |
|---------------|----------------------------|-----------------------|--------------|
| IL-6          | 1,69 (0 - 341)             | 0 (0 - 78,97)         | < 0,0001 *** |
| IL-7          | 2,3 (0 - 15,85)            | 1,825 (1,1 - 4,87)    | 0,0451 *     |
| IL-8          | 5,41 (0 - 2953)            | 2,83 (0 - 12,51)      | 0,001 ***    |
| IL-10         | 0,37 (0 - 25,26)           | 0,45 (0,37 - 4)       | 0,0039 **    |
| IL-12         | 0,84 (0 - 121,4)           | 0,0 (0 - 17,18)       | 0,0684       |
| MCP-1         | 91,02 (0 - 562)            | 66,62 (19,72 - 217,2) | 0,0368 *     |
| MIP-1 $\beta$ | 115,8 (0 - 747,4)          | 104,2 (46,5 - 183,3)  | 0,2551       |
| TNF $\alpha$  | 0,0 (0 - 76,57)            | 0,52 (0,1 - 1,8)      | < 0,0001 *** |
| TGF- $\beta$  | 280,4 (67,4 - 1000)        | 304,2 (63,57 - 716,6) | 0,9325       |

Tab. 9: Zytokinkonzentrationen [pg/ml] im Serum von SSc-Patienten und Gesunden. Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

### 3.1.1 Serum-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter

Von 183 SSc-Patienten waren die Ergebnisse von Lungenfunktionsuntersuchungen zum Zeitpunkt der Serumgewinnung verfügbar. Anhand des Diffusions- bzw. Restriktionsgrades erfolgte die Einteilung in Untergruppen und anschließend die statistische Auswertung bezüglich charakteristischer Serum-Interleukinkonzentrationen. Die Alters- und Geschlechtsverteilung sowie Erkrankungsdauer und mRSS sind in Tabelle 12 aufgelistet.

|                | männlich/weiblich | Alter [a]      | Erkrankungsdauer [a] | mRSS         |
|----------------|-------------------|----------------|----------------------|--------------|
| Diffusionsgrad |                   |                |                      |              |
| 0 (n = 60)     | 7/53              | 58 (23 - 78)   | 4 (0,5 - 32)         | 4 (0 - 36)   |
| 1 (n = 59)     | 4/55              | 56 (20 - 80)   | 4 (0,5 - 33)         | 6 (0 - 29)   |
| 2 (n = 44)     | 5/39              | 56 (28 - 82)   | 4 (0,5 - 38)         | 8 (0 - 44)   |
| 3 (n = 20)     | 4/16              | 59,5 (27 - 84) | 4 (0,5 - 24)         | 8,5 (4 - 24) |

| Restriktionsgrad |        |              |                |             |
|------------------|--------|--------------|----------------|-------------|
| 0 (n = 129)      | 12/117 | 59 (24 - 82) | 4 (0,5 - 38)   | 4 (0 - 25)  |
| 1 (n = 35)       | 6/29   | 56 (20 - 84) | 5 (0,5 - 17)   | 7 (0 - 36)  |
| 2 (n = 14)       | 1/13   | 45 (27 - 70) | 3,5 (0,5 - 22) | 14 (0 - 44) |
| 3 (n = 1)        | 0/1    | 59           | 4              | 6           |
| 4 (n = 1)        | 1/0    | 57           | 4              | 9           |

Tab. 12: demographische Charakteristik von SSc-Patienten an Hand von Diffusionsgrad und Restriktionsgrad, Angabe von Alter, Erkrankungsdauer und mRSS als Median (range)

SSc-Patienten mit Diffusionsgrad 0 zeigen, verglichen mit SSc-Patienten mit Diffusionsgrad  $\geq 1$ , keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen im Serum. Bei SSc-Patienten mit Diffusionsgrad  $\geq 2$  verglichen mit SSc-Patienten mit Diffusionsgrad 0 finden sich erhöhte Konzentrationen von IL-6 (Median 4,745 pg/ml bzw. 0,81 pg/ml) und IL-7 (Median 2,67 pg/ml bzw. 2,12 pg/ml) (Abb. 1).

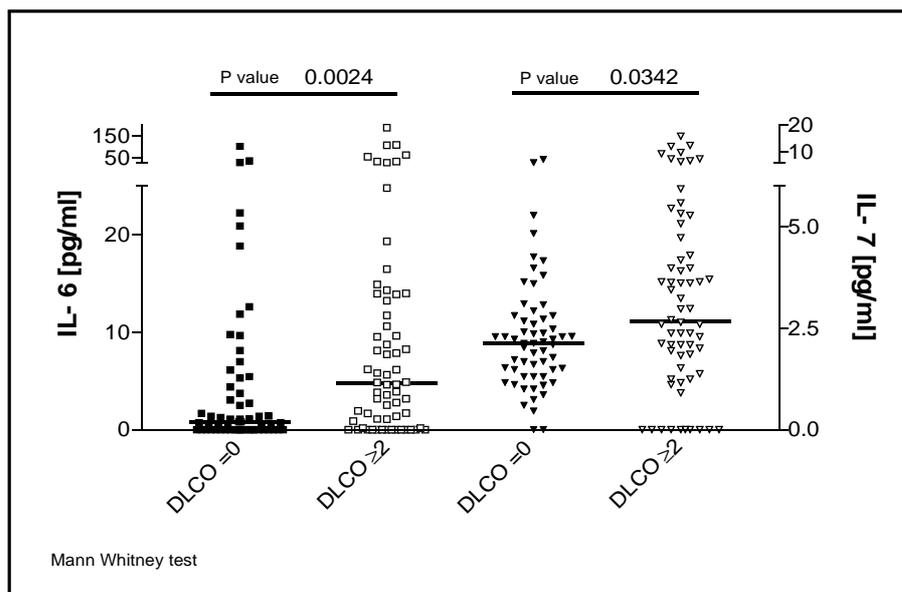


Abb 1: Interleukinkonzentrationen im Serum von SSc-Patienten mit uneingeschränkter Diffusionskapazität (DLCO = 0) und reduzierter Diffusionskapazität (DLCO  $\geq 2$ )

Erfolgt die Einteilung der SSc-Patienten anhand des Restriktionsgrades in 2 Untergruppen, finden sich im Serum von SSc-Patienten mit Restriktionsgrad  $\geq 1$  wiederum erhöhte IL-6-Konzentrationen verglichen mit SSc-Patienten mit Restriktionsgrad 0 (Median 3,72 pg/ml bzw. 1,08 pg/ml;  $p = 0,0105$ ). Darüber hinaus konnte eine negative Korrelation von DLCO-Einzelmesswerten mit IL-7- und IL-10-Serumkonzentrationen und zusätzlich eine negative

Korrelation von FVC-Einzelmesswerten mit IL-6- und TGF- $\beta$ -Serumkonzentrationen nachgewiesen werden (Tab. 13).

|          |           | IL-6      | IL-7      | IL-10    | TGF- $\beta$ |
|----------|-----------|-----------|-----------|----------|--------------|
| DLCO [%] | Pearson r |           | -0,1796   | -0,1524  |              |
|          | p-Wert    |           | 0,03224 * | 0,0411 * |              |
| FVC [%]  | Pearson r | -0,9173   |           |          | -0,1603      |
|          | p-Wert    | 0,0093 ** |           |          | 0,0340 *     |

Tab. 13: Korrelation von DLCO und FVC mit Zytokinkonzentrationen im Serum von SSc-Patienten, p-Werte nach Pearson Korrelation entsprechen \*p < 0,05, \*\*p < 0,01. Gezeigt werden nur die Zytokine mit signifikanter Korrelation zu Lungenfunktionsparametern.

SSc-Patienten mit HR-CT-gesicherter Lungenfibrose (n = 46) zeigen gegenüber SSc-Patienten ohne Lungenfibrose (n = 128) hoch signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 (Median 6,175 pg/ml bzw. 0,81 pg/ml; p < 0,0001) und TGF- $\beta$  (Median 372,5 pg/ml bzw. 258,7 pg/ml; p = 0,0023). Die übrigen im Serum bestimmten Zytokine zeigten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Abschließend wurden die Zytokinkonzentrationen im Serum von SSc-Patienten in Abhängigkeit vom Vorliegen einer echokardiographisch gesicherten PAH analysiert (n = 36). Dabei finden sich bei SSc-Patienten mit PAH erhöhte Serum-IL-6-Konzentrationen verglichen mit SSc-Patienten ohne PAH (p < 0,0001; Mean 26,47 pg/ml bzw. 5,599 pg/ml).

### 3.1.2 Serum-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter im Zeitverlauf

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Verschlechterung der Lungenfunktion mit spezifisch veränderten Interleukinkonzentrationen in Serum assoziiert ist. Im Rahmen dieser Analyse wurde eine Abnahme der FVC bzw. der DLCO von 10 % innerhalb eines Jahres als objektifizierbares Maß einer Verschlechterung der Lungenfunktion angesehen, sofern der Diffusions- bzw. Restriktionsgrad in der Folgeuntersuchung einem Wert  $\geq 1$  entsprach. Die Ergebnisse einer Folgeuntersuchung innerhalb eines Jahres nach Serumgewinnung standen für 141 SSc-Patienten zur Verfügung. Insgesamt musste bei 41 SSc-Patienten eine Verschlechterung der DLCO diagnostiziert werden, mit einer Spannweite von 11,9 - 61,1 %. Eine Abnahme der FVC um mindestens 10 % fand sich nur bei 3 der 141 SSc-Patienten, mit einer Spannweite von 10,1 - 36,5 %. Bei diesen 3 Patienten fand sich zusätzlich eine deutlich reduzierte DLCO (Diffusionsgrad 2 - 4).

Der statistische Vergleich der Zytokinkonzentrationen im Serum von SSc-Patienten mit stabiler DLCO zu Patienten mit Verschlechterung der DLCO ergab keinen signifikanten Unterschied in den Konzentrationen der gemessenen Zytokine. Einzig die Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Spiegel sind bei Patienten mit Verschlechterung der DLCO signifikant höher als bei Patienten mit unveränderter DLCO ( $p = 0,039$ ).

### **3.1.3 Assoziation von Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak, Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak, Serum-Zytokinen und klinischen Parametern**

Gemessen wurden die Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- und die Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Konzentrationen im Serum von 193 SSc-Patienten und 50 gesunden Spendern. Der Referenzbereich wurde mit  $\leq 20$  units festgelegt. Anhand dieses Referenzbereiches erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Unterscheidung in Antikörper-positive bzw. Antikörper-negative Proben.

Unter den SSc-Patienten zeigte sich eine große Übereinstimmung der Konzentrationen beider Antikörper. Im Einzelnen fanden sich bei 174 SSc-Patienten (90,2 %) gleichsinnige Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak- und Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Spiegel. Unter den restlichen 19 Proben konnte kein eindeutiger Trend nachgewiesen werden. 8 Proben waren anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-positiv aber anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-negativ und weitere 11 Proben waren anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-negativ und anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-positiv. Während das Verhältnis von Antikörper-positiven zu Antikörper-negativen SSc-Patienten nahezu 1:1 beträgt, sowohl für Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak als auch Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak, finden sich unter den gesunden Spendern lediglich 4 Personen (8 %) mit positivem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status. Anhand der hier vorgestellten Untersuchungen haben SSc-Patienten eine hochsignifikant erhöhte Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Konzentration verglichen mit gesunden Spendern (Median 20,05 units bzw. 11,2 units;  $p < 0,0001$ ).

Für SSc-Patienten sind die demographischen Daten unter Berücksichtigung der Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Konzentrationen in Tabelle 10 zusammengefasst. Da unter den gesunden Spendern nur 4 Personen positive Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Spiegel aufwiesen, wurde ein Vergleich der Antikörper-positiven bzw. Antikörper-negativen Untergruppe auf Grund der geringen Anzahl Antikörper-positiver Spender nicht durchgeführt. Bei SSc-Patienten zeigte die Analyse der Zytokinmessungen in Abhängigkeit vom Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- bzw. Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Status erhöhte IL-6-, IL-7- und IL-10-Serumkonzentrationen, sowie schwach signifikant verminderte MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen bei SSc-Patienten mit positivem Antikörperstatus (Tab. 10).

Auch hinsichtlich der klinischen und demographischen Parameter unterscheiden sich SSc-Patienten mit positivem bzw. negativem Antikörperstatus. So sind die Lungenfunktionsparameter DLCO und FVC bei Patienten mit positiven Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak bzw.

positiven Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak signifikant vermindert gegenüber SSc-Patienten mit den entsprechenden negativen Antikörpern. Darüber hinaus sind anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- bzw. anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-positiv SSc-Patienten jünger und erkranken früher an SSc als Antikörper-negative SSc-Patienten. Bei gesunden Spendern war eine solche Altersabhängigkeit des Antikörperstatus nicht nachweisbar. Zusätzlich sind bei anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-positiven SSc-Patienten die durchschnittliche Erkrankungsdauer sowie der mRSS signifikant erhöht (Tab. 10). Im Gegensatz dazu zeigen sich bei einer Unterteilung der SSc-Patienten anhand der Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak für die beiden letztgenannten Parameter keine statistischen Unterschiede.

| SSc-Patienten  |   |   |            |
|--|---|---|------------|
| Parameter  | anti-AT <sub>1</sub> -R-Ak-positiv<br>(≥ 20 units) (n = 99) | anti-AT <sub>1</sub> -R-Ak-negativ<br>(< 20 units) (n = 94) | p-Wert     |
| BALF-Zytokinkonzentration [pg/ml]                          |   |   |            |
| IL-6   | 2,93 (0 - 108,8)  | 0,5 (0 - 341,0)   | 0,0013 **  |
| IL-7   | 2,6 (0 - 15,85)   | 2,12 (0 - 7,23)   | 0,0008 *** |
| IL-8   | 5,72 (0 - 1720)   | 4,94 (0 - 2953)   | 0,3754     |
| IL-10  | 0,39 (0 - 25,3)   | 0,21 (0 - 12,4)   | 0,0473 *   |
| IL-12  | 0,0 (0 - 121)   | 0,84 (0 - 15,3)   | 0,5978     |
| MCP-1  | 86,7 (0 - 366)  | 91,9 (13,0 - 562)   | 0,6253     |
| MIP-1β   | 102 (0 - 747,4)   | 125,6 (12,94 - 484,6)                                       | 0,0134 *   |
| TNFα   | 0,0 (0 - 76,6)  | 0,0 (0 - 23,6)  | 0,7431     |
| TGF-β  | 302 (67,4 - 1000)   | 273,6 (91,5 - 1000)   | 0,1094     |
| klinische und demographische Charakteristik Median (range) |   |   |            |
| Alter [a]  | 56,0 (20 - 84)  | 59,0 (23 - 80)  | 0,0474 *   |
| Alter bei Diagnose [a]                                     | 48,5 (16 - 84)  | 54 (20 - 76)  | 0,0059 **  |
| Erkrankungsdauer [a]                                       | 4,0 (0,5 - 38,0)  | 3,0 (0,5 - 33,0)  | 0,0352 *   |
| weiblich/männlich  | 10/89   | 11/83   |            |
| mRSS   | 6 (0 - 45)  | 4 (0 - 22)  | 0,0032 **  |
| DLCO [%]   | 70,3 (19,6 - 112)   | 82,0 (10,6 - 11)  | 0,0008 *** |
| FVC [%]  | 85,5 (43,3 - 133)   | 98,9 (29,3 - 127)   | 0,0001 *** |
| Lungenfibrose  | 44 (44,4 %)   | 12 (12,8 %)   |            |

Tab. 10: Serum-Interleukinkonzentrationen und klinische und demographische Charakteristik von SSc-Patienten mit positivem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status im Vergleich mit SSc-Patienten mit negativem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status. Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

Zusätzlich zu den statistischen Unterschieden zwischen SSc-Patienten mit positiven bzw. negativen Antikörperspiegeln finden sich negative Korrelationen von Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Spiegeln und dem Alter der SSc-Patienten ( $p = 0,0028$ ; Pearson  $r = -0,2153$ ) sowie Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Spiegeln und dem Alter der SSc-Patienten bei Diagnosestellung ( $p = 0,0013$ ; Pearson  $r = -0,2323$ ). Im Unterschied dazu korreliert die Erkrankungsdauer weder mit den Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Konzentrationen ( $p = 0,0928$ ; Pearson  $r = 0,1229$ ) noch mit den Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Konzentrationen ( $p = 0,1575$ ; Pearson  $r = 0,1032$ ). Bei gesunden Spendern konnte keine Korrelation von Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Konzentrationen im Serum und dem Spenderalter nachgewiesen werden ( $p = 0,2155$ ; Pearson  $r = -0,1783$ ).

Die geringe Anzahl der gesunden Spender mit positiven Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Konzentrationen ( $n = 4$ ) lässt einen Vergleich mit Antikörper-positiven SSc-Patienten ( $n = 99$ ) nicht zu, jedoch wurden die gesunden Spender mit negativem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status ( $n = 46$ ) und die SSc-Patienten mit negativem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status ( $n = 94$ ) miteinander verglichen.

Dabei zeigten sich schwach signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-8, MCP-1 und MIP-1 $\beta$  im Serum von Antikörper-negativen SSc-Patienten. Zusätzlich fanden sich niedrigere Konzentrationen von IL-10 und TNF $\alpha$  bei SSc-Patienten im Vergleich zu Gesunden mit jeweils negativem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status (Tab. 11).

| SSc-Patienten und Gesunde mit negativen Anti-AT <sub>1</sub> -R-Antikörpern (< 20 units) |                           |                       |              |
|--|---------------------------|-----------------------|--------------|
| Zytokin  | SSc-Patienten<br>(n = 94) | Gesunde<br>(n = 46)   | p-Wert       |
| IL-6   | 0,5 (0 - 341,0)           | 0,0 (0 - 78,97)       | 0,0105 *     |
| IL-7   | 2,12 (0 - 7,23)           | 1,79 (1,07 - 4,87)    | 0,6320       |
| IL-8   | 4,94 (0 - 2953)           | 3,135 (0 - 12,51)     | 0,0324 *     |
| IL-10  | 0,21 (0 - 12,4)           | 0,45 (0,37 - 4,0)     | 0,0003 ***   |
| IL-12  | 0,84 (0 - 15,3)           | 0,0 (0 - 17,18)       | 0,0559       |
| MCP-1  | 91,9 (13,0 - 562)         | 62,11 (19,72 - 217,1) | 0,0287 *     |
| MIP-1 $\beta$  | 125,6 (12,94 - 484,6)     | 105,6 (46,5 - 183,3)  | 0,0254 *     |
| TNF $\alpha$   | 0,0 (0 - 23,6)            | 0,52 (0,09 - 1,8)     | < 0,0001 *** |
| TGF- $\beta$   | 273,6 (91,5 - 1000)       | 304,2 (63,57 - 716,6) | 0,2217       |

Tab. 11: Interleukinkonzentrationen im Serum von SSc-Patienten und Gesunden mit negativem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak-Status (< 20units). Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.2 Zytokinmessungen in der BALF

Zur Bestimmung sklerodermie-spezifischer Zytokinkonzentrationen in der BALF wurden insgesamt 65 Proben von 32 SSc-Patienten und 26 Kontrollpatienten untersucht. Zunächst wurden die Messwerte aller Patienten ungeachtet möglicher klinischer Untergruppen miteinander verglichen. Im Vergleich der Gesamtgruppen fanden sich bei SSc-Patienten signifikant niedrigere IL-6-Konzentrationen und signifikant höhere IL-7-Konzentrationen als bei Kontrollpatienten mit anderen Lungenerkrankungen (Tab. 14). Alle anderen gemessenen Zytokine zeigten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. MCP-1 war das Chemokin mit der höchsten Konzentration, sowohl in der BALF von SSc-Patienten als auch in der von Kontrollpatienten.

| Zytokin       | SSc-Patienten    | Kontrollpatienten  | p-Wert   |
|---------------|------------------|--------------------|----------|
| IL-1          | 1,02 (0 - 17,2)  | 0,735 (0 - 24,1)   | 0,6545   |
| IL-2          | 3,56 (0 - 50,3)  | 0,86 (0 - 9,3)     | 0,1047   |
| IL-4          | 2,42 (0 - 22,9)  | 0,38 (0 - 6,7)     | 0,1568   |
| IL-6          | 18,3 (1,7 - 177) | 25,5 (6,3 - 567)   | 0,0224 * |
| IL-7          | 4,2 (0 - 17,4)   | 1,95 (0 - 8,7)     | 0,0181 * |
| IL-8          | 85,7 (5,9 - 794) | 47,6 (0 - 375)     | 0,1147   |
| IL-10         | 2,15 (0 - 6,7)   | 2,06 (0 - 4,7)     | 0,1055   |
| MCP-1         | 51,6 (0 - 2000)  | 42,6 (14,4 - 1080) | 0,5099   |
| MIP-1 $\beta$ | 45,9 (4,2 - 350) | 51,7 (2,8 - 693)   | 0,8158   |
| TNF $\alpha$  | 1,19 (0 - 8,1)   | 0,65 (0 - 7,5)     | 0,4124   |
| G-CSF         | 30,2 (1,4 - 191) | 32,2 (0 - 157)     | 0,7259   |

Tab. 14: Zytokinkonzentrationen [pg/ml] in der BALF von SSc-Patienten und Kontrollpatienten. Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \*p < 0,05.

#### 3.2.1 spezifische Zytokinkonzentrationen in der BALF von SSc-Patienten

Um die Bedeutung lokaler Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Rahmen von Entzündungsprozessen einschätzen zu können, wurden die Interleukinmessungen unter Berücksichtigung der BALF-Zellzahl analysiert. Eine anhand der BALF-Zellzahl diagnostizierte Alveolitis wurde bei 27/38 Proben von SSc-Patienten (71 %) und bei 20/27 Proben von Kontrollpatienten (74 %) gesichert. Wie in Tabelle 15 aufgezeigt, finden sich bei

SSc-Patienten mit sklerodermieassoziiertes Alveolitis spezifische Interleukinveränderungen in der BALF. Der Vergleich der BALF-Zytokinkonzentrationen von SSc-Patienten mit und ohne Alveolitis zeigte signifikant erhöhte Werte für IL-2, IL-6, IL-7 und IL-8 sowie erhöhte Werte für MCP-1 bei Vorliegen einer Alveolitis (Tab. 15).

Im Gegensatz dazu ergab der Vergleich von Kontrollpatienten mit und ohne Alveolitis ein differentes Interleukinmuster. Hier fanden sich erhöhte Konzentrationen von G-CSF, MIP-1 $\beta$  sowie TNF $\alpha$  bei Vorliegen einer Alveolitis (Abb. 2a und b).

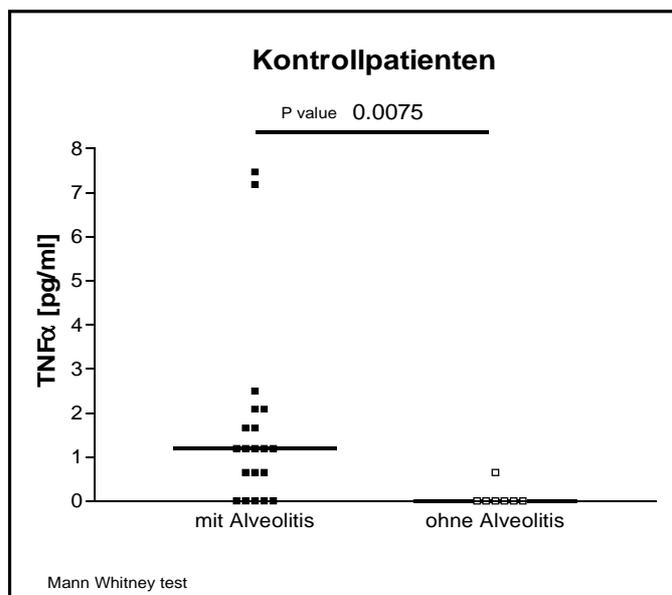
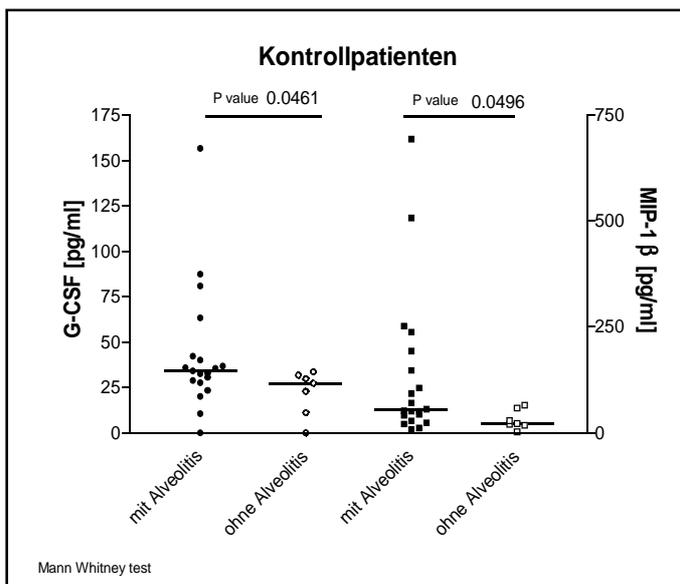


Abb. 2a und b: signifikante Konzentrationsunterschiede [pg/ml] von G-CSF, MIP-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in der BALF von Kontrollpatienten mit und ohne Alveolitis

Patienten mit einer Alveolitis auf Grund anderer Erkrankungen als einer SSc zeigen signifikant niedrigere IL-7-Werte als SSc-Patienten mit Alveolitis (Tab. 15). Im Gegensatz dazu finden sich, ähnlich wie im Vergleich der Gesamtgruppen, die IL-6-Werte bei Kontrollpatienten mit Alveolitis gegenüber SSc-Patienten mit Alveolitis erhöht, für diese Untergruppen jedoch nicht mehr mit einem signifikanten p-Wert (Median 25,5 pg/ml bzw. 20,9 pg/ml;  $p = 0,14$ ).

12 der Kontrollpatienten mit Alveolitis waren an Sarkoidose erkrankt. Der Altersmedian dieser Untergruppe lag bei 47 Jahren (range 30 - 67 Jahre), das Geschlechterverhältnis männlich/weiblich betrug 4/8. Drei der Sarkoidosepatienten waren aktive Raucher und 3 weitere Patienten Ex-Raucher. Bei allen Sarkoidosepatienten konnte eine krankheitstypische lymphozytäre Alveolitis bronchoskopisch gesichert werden. Die statistische Analyse ergab signifikant erhöhte Konzentrationen für IL-7, IL-8 und MCP-1 bei Patienten mit SSc und gesicherter Alveolitis gegenüber den Sarkoidosepatienten (Tab. 15).

Patienten der Kontrollgruppe mit Alveolitis bei ILD zeigen signifikant erhöhte MIP-1 $\beta$ -Konzentrationen gegenüber SSc-Patienten mit Alveolitis, sowie signifikant niedrigere IL-7- und IL-10-Konzentrationen (Tab. 15). Der Altersmedian dieser Untergruppe lag bei 67 Jahren (range 24 - 78 Jahre). Von den 6 Patienten waren 3 weiblich, 1 Patient war aktiver Raucher, 1 Patient Ex-Raucher.

Vergleicht man die BALF-Zytokinspiegel von SSc-Patienten mit denen von gesunden Spendern ohne Lungenerkrankung finden sich die Konzentrationen von IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  erhöht (Tab. 15). Erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentrationen finden sich auch bei sarkoidose-assoziiertes Alveolitis verglichen mit gesunden Spendern (Median 1,2 pg/ml bzw. 0 pg/ml;  $p = 0,01$ ). Analog verhalten sich die G-CSF-Konzentrationen (Median 33,5 pg/ml bzw. 25,2 pg/ml;  $p = 0,0278$ ).

| Zytokin [pg/ml]  | SSc-Patienten<br>Median (range) | Kontrollgruppe<br>Median (range) | p-Wert |
|--|---------------------------------|----------------------------------|--------|
| SSc-Patienten mit Alveolitis (n = 27) und SSc-Patienten ohne Alveolitis (n = 11) |                                 |                                  |        |
| IL-2   | 5,67 (0 - 50,3)                 | 0,86 (0 - 7,57)                  | 0,0349 |
| IL-6   | 20,9 (1,66 - 177)               | 13,5 (6,24 - 20)                 | 0,0481 |
| IL-7   | 4,88 (0,75 - 17,4)              | 1,95 (0 - 5,76)                  | 0,0496 |
| IL-8   | 105 (14,9 - 794)                | 47,1 (5,86 - 223)                | 0,0123 |
| MCP-1  | 92,2 (14,1 - 2001)              | 24,1 (0 - 97,5)                  | 0,0018 |

| Zytokin [pg/ml]   | SSc-Patienten<br>Median (range) | Kontrollgruppe<br>Median (range) | p-Wert |
|---|---------------------------------|----------------------------------|--------|
| SSc-Patienten mit Alveolitis (n = 27) und Kontrollpatienten mit Alveolitis (n = 20)     |                                 |                                  |        |
| IL-7  | 4,88 (0,75 - 17,4)              | 1,95 (0 - 8,65)                  | 0,0037 |
| SSc-Patienten mit Alveolitis (n = 27) und Kontrollpatienten mit Sarkoidose (n = 12)     |                                 |                                  |        |
| IL-7  | 4,88 (0,75 - 17,4)              | 1,95 (0 - 8,65)                  | 0,037  |
| IL-8  | 105 (14,9 - 794)                | 46,3 (13 - 192)                  | 0,0184 |
| MCP-1   | 92,2 (14,1 - 2001)              | 38,5 (18,2 - 152)                | 0,04   |
| SSc-Patienten mit Alveolitis (n = 27) und Kontrollpatienten mit ILD (n = 6)             |                                 |                                  |        |
| IL-7  | 4,88 (0,75 - 17,4)              | 2,0 (0 - 3,97)                   | 0,0423 |
| IL-10   | 2,23 (1,27 - 6,74)              | 1,74 (0 - 2,06)                  | 0,0297 |
| MIP-1 $\beta$   | 46,0 (24,6 - 350)               | 127 (56,2 - 693)                 | 0,0073 |
| SSc-Patienten mit Alveolitis (n = 27) und gesunde Spender ohne Lungenerkrankung (n = 6) |                                 |                                  |        |
| IL-8  | 105 (14,9 - 794)                | 31 (0 - 112)                     | 0,0143 |
| MCP-1   | 92,2 (14,1 - 2001)              | 31,6 (14,4 - 42,6)               | 0,0051 |
| MIP-1 $\beta$   | 46,0 (24,6 - 350)               | 21,6 (2,77 - 58,8)               | 0,0048 |
| TNF $\alpha$  | 1,19 (0 - 8,06)                 | 0,0 (0 - 0,6)                    | 0,010  |

Tab. 15: Zytokinkonzentrationen [pg/ml] in der BALF von SSc-Patienten mit Alveolitis und verschiedenen Kontrollgruppen. Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test. Gezeigt werden nur die Zytokine mit signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen.

### 3.2.2 Zytokinspiegel in Abhängigkeit der BALF-Zelldifferenzierung

Anhand vorbeschriebener Normalwerte über den Zellgehalt der BALF [94] wurde eine Unterteilung der BALF bei erhöhten Zellzahlen in eosinophile, neutrophile, lymphozytäre und gemischtzellige Alveolitis vorgenommen. Unter den SSc-Patienten mit auffälliger BALF wurden 6 BALF-Proben als eosinophil, 6 weitere als neutrophil und die übrigen 15 als gemischtzellig (granulozytär/lymphozytär) charakterisiert.

Unter den SSc-Patienten fand sich keine BALF-Probe mit lymphozytärer Alveolitis, im Gegensatz zu den Proben der Kontrollpatienten, von denen 13 als lymphozytär charakterisiert wurden. Mit 60,2 Jahren hatten die SSc-Patienten mit eosinophiler Alveolitis das höchste durchschnittliche Alter. Für SSc-Patienten mit neutrophiler oder gemischtzelliger Alveolitis bzw. mit unauffälliger BALF betrug das Durchschnittsalter 52,7; 51,9 bzw. 55,3 Jahre. SSc-Patienten mit eosinophiler Alveolitis waren ausschließlich Nichtraucher, während sich unter

den SSc-Patienten mit neutrophiler Alveolitis 4 Ex-Raucher und unter den SSc-Patienten mit gemischtzelliger Alveolitis 8 Ex-Raucher und 2 aktive Raucher fanden.

Bei Patienten mit SSc fanden sich erhöhte IL-8-Konzentrationen bei Vorliegen einer neutrophilen und gemischtzelligen Alveolitis (Median 154 pg/ml bzw. 105 pg/ml) verglichen mit SSc-Patienten mit unauffälliger BALF-Zelldifferenzierung (Median 47,1 pg/ml) (Abb. 3a). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch für MCP-1 (Median 133 pg/ml bzw. 117 pg/ml und 24,1 pg/ml) (Abb. 3b).

Zusätzlich fanden sich bei SSc-Patienten mit neutrophiler Alveolitis erhöhte IL-6-Konzentrationen im Vergleich mit SSc-Patienten ohne Alveolitis (Median 23,6 pg/ml bzw. 13,5 pg/ml;  $p = 0,0022$ ). SSc-Patienten mit gemischtzelliger BALF zeigten erhöhte IL-2-Konzentrationen im Vergleich mit SSc-Patienten ohne Alveolitis (Median 5,87 pg/ml bzw. 0,86 pg/ml;  $p = 0,0251$ ).

Um nachzuweisen, dass Zytokinkonzentrationen in der BALF nicht nur sekundäre Phänomene auf Grund verschiedener zellulärer Bestandteile sind, wurde sowohl die prozentuale als auch die absolute Zahl der verschiedenen zellulären Bestandteile mit den BALF-Zytokinkonzentrationen von SSc-Patienten sowie von Kontrollpatienten korreliert.

Es fanden sich signifikante Korrelationen verschiedener Zytokine mit der Häufigkeit sowie mit der absoluten Anzahl neutrophiler Granulozyten sowohl bei Patienten mit SSc als auch bei Kontrollpatienten (Tab. 16). Allerdings stimmen die, mit absoluter oder relativer Anzahl von Neutrophilen korrelierenden Zytokine von SSc-Patienten nicht vollständig mit denen der Kontrollpatienten überein. Zusätzlich zeigten die BALF-Zytokinkonzentrationen der SSc-Patienten im Gegensatz zu denen der Kontrollpatienten lediglich Korrelationen zur prozentualen und absoluten Anzahl neutrophiler Granulozyten, aber nicht zur Anzahl von eosinophilen Granulozyten oder Lymphozyten (Tab. 16).

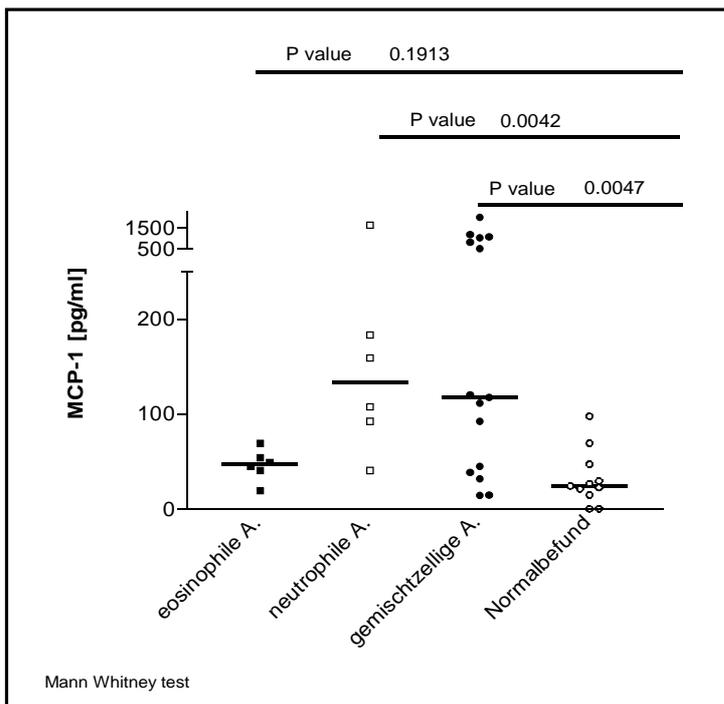
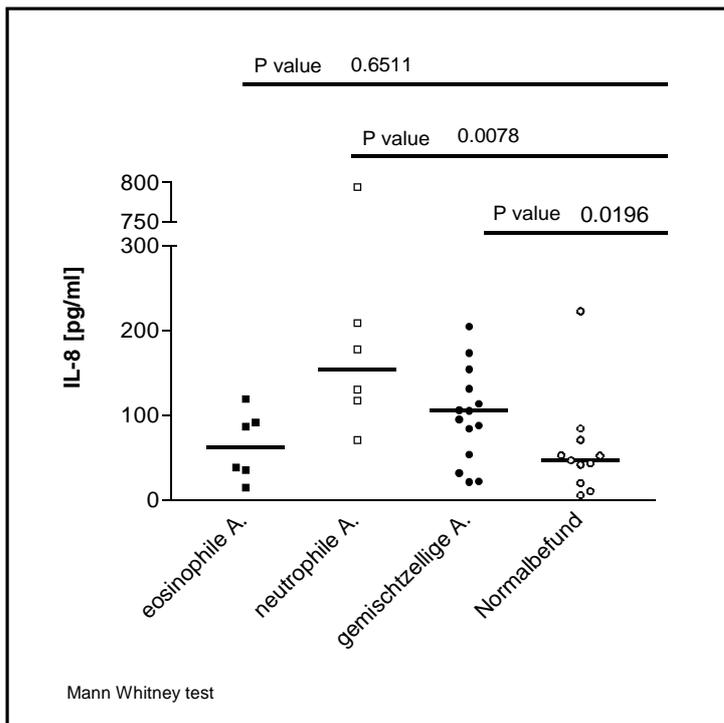


Abb. 3a und b): IL-8- und MCP-1-Konzentrationen bei SSc-Patienten in Abhängigkeit von der BALF-Zelldifferenzierung. Verglichen wurden die Zytokinkonzentrationen von SSc-Patienten mit eosinophiler, neutrophiler und gemischtzelliger (granulozytär/lymphozytär) Alveolitis mit denen von SSc-Patienten mit BALF-Normalbefund.

|  | GCSF     | IL1 $\beta$ | IL-2    | IL-4     | IL-6    | IL-8     | IL-10   | MCP-1    | MIP-1 $\beta$ | TNF $\alpha$ |
|--|----------|-------------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------------|--------------|
| SSc-Patienten (n = 38)                 |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| prozentuale Zellzahl                   |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| eosinophile Granulozyten               |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| Lymphozyten                            |          |             |         |          |         |          |         |          | 0,392*        |              |
| neutrophile Granulozyten               | 0,490**  | 0,369*      | 0,433*  | 0,544**  |         | 0,604*** |         | 0,628*** |               | 0,622***     |
| absolute Zellzahl [Zellen/ml Rückfluß] |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| eosinophile Granulozyten               |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| Lymphozyten                            |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| neutrophile Granulozyten               | 0,672*** | 0,489**     |         | 0,599*** |         |          |         |          |               | 0,549**      |
| Kontrollpatienten (n = 26)             |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| prozentuale Zellzahl                   |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| eosinophile Granulozyten               | 0,647*** | 0,412*      | 0,541** | 0,669*** | 0,575** | 0,586**  | 0,592** | 0,770*** | 0,526**       | 0,813***     |
| Lymphozyten                            |          |             |         |          |         |          |         |          | 0,594**       |              |
| neutrophile Granulozyten               |          | 0,490*      |         |          | 0,512** |          |         | 0,472*   |               | 0,453*       |
| absolute Zellzahl [Zellen/ml Rückfluß] |          |             |         |          |         |          |         |          |               |              |
| eosinophile Granulozyten               | 0,532**  | 0,924***    |         | 0,585**  |         | 0,608*** |         |          | 0,869***      |              |
| Lymphozyten                            |          | 0,627**     |         |          |         | 0,425*   | -0,396* |          | 0,772***      |              |
| neutrophile Granulozyten               |          | 0,912***    |         | 0,544**  |         | 0,718*** | 0,536** |          | 0,852***      | 0,647*       |

Tab. 16: Korrelation der prozentualen und absoluten Zellzahlen [BALF Zellen/ml Rückfluß] mit verschiedenen BALF-Zytokinen [pg/ml] von SSc-Patienten und Kontrollpatienten. Zellenwerte entsprechen den Korrelationskoeffizienten nach Pearson, p-Werte nach Pearson Korrelation entsprechen \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

### 3.2.3 BALF- Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter bei SSc-Patienten

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, sind in der BALF von SSc-Patienten mit Alveolitis verschiedene Zytokine gegenüber SSc-Patienten ohne Alveolitis erhöht. MCP-1 ist dabei das Zytokin mit der höchsten Konzentration im Vergleich sowohl zu SSc-Patienten ohne Alveolitis als auch zu gesunden Spendern ohne Lungenerkrankung. Eine geringere, aber trotzdem signifikante Konzentrationserhöhung bei SSc-Patienten mit Alveolitis fand sich für IL-4, IL-6, IL-7 und IL-8 gegenüber SSc-Patienten ohne Alveolitis (Tab. 15).

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine negative Korrelation zwischen der DLCO und der Konzentration von IL-2, IL-4 und MCP-1 in der BALF von SSc-Patienten. Auch für die FVC und die BALF-Konzentrationen von IL-4, IL-8 und MCP-1 fand sich eine negative Korrelation (Tab. 17). Eine schwach signifikante negative Korrelation ließ sich für die TLC und IL-4- und IL-8-Konzentrationen nachweisen. Die stärkste Korrelation der TLC fand sich mit MCP-1 (Tab. 17).

|             |           | IL-2   | IL-4   | IL-8   | MCP-1  |
|-------------|-----------|--------|--------|--------|--------|
| DLCO [%]    | Pearson r | -0,390 | -0,536 | -0,409 | -0,442 |
|             | p-Wert    | 0,025  | 0,0013 | 0,012  | 0,006  |
| FVC [%]     | Pearson r |        | -0,503 | -0,394 | -0,441 |
|             | p-Wert    |        | 0,0028 | 0,016  | 0,006  |
| TLC [%]     | Pearson r |        | -0,362 | -0,331 | -0,412 |
|             | p-Wert    |        | 0,040  | 0,04   | 0,01   |
| HR-CT-Score | Pearson r |        |        |        | 0,362  |
|             | p-Wert    |        |        |        | 0,030  |

Tab. 17: Korrelation von Zytokinkonzentrationen in der BALF und den Lungenfunktionsparametern DLCO, FVC, TLC sowie dem HR-CT-Score bei SSc-Patienten. Die Zellenwerte entsprechen den p-Werten nach Pearson Korrelation.

Für 36 SSc-Patienten liegt eine HR-CT zum Zeitpunkt der BALF-Gewinnung vor, an Hand derer das Ausmaß der Lungenveränderungen mittels eines Scores eingeschätzt wurde. In der Auswertung zeigte ausschließlich die BALF-Konzentration von MCP-1 eine schwach signifikante Korrelation mit dem HR-CT-Score (Tab. 17). Zusätzlich fanden sich bei SSc-Patienten mit einem HR-CT-Score  $\geq 20$  ( $n = 17$ ) erhöhte MCP-1-Konzentrationen in der BALF verglichen mit SSc-Patienten mit geringeren fibrotischen Lungenveränderungen ( $n = 19$ ) und einem HR-CT-Score  $\leq 15$  (Median 97,5 pg/ml bzw. 40,6 pg/ml;  $p = 0,0407$ ) (Abb. 4).

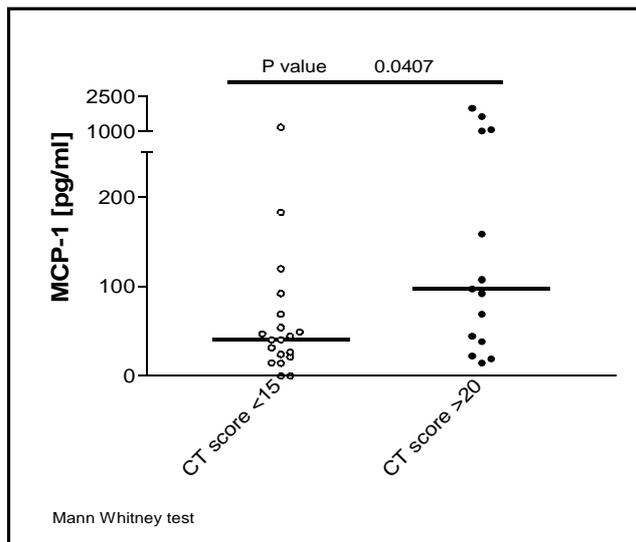


Abb. 4: MCP-1-Konzentration in der BALF bei SSc-Patienten mit milden (HR-CT-Score  $\leq 15$ ) und ausgeprägten (HR-CT-Score  $\geq 20$ ) fibrotischen Lungenveränderungen.

### 3.2.4 BALF-Zytokinkonzentrationen und Lungenparameter im Zeitverlauf

Der Zusammenhang von Zytokinkonzentrationen in der BALF und einer möglichen Progredienz der Lungenveränderungen wurde unter Verwendung von 35 Proben von 29 SSc-Patienten untersucht. Alle SSc-Patienten, von denen mehrere Proben berücksichtigt wurden, gehörten zur Gruppe der Patienten mit Lungenerkrankungen im Endstadium (endstage ILD). Die Messwerte dieser Mehrfachproben wurden für die statistischen Untersuchungen entsprechend gewichtet. Für die Auswertung standen 29 Verlaufsuntersuchungen in Form von HR-CT-Aufnahmen und 27 Lungenfunktionsuntersuchungen zur Verfügung. Das durchschnittliche Zeitintervall zwischen der Erst- und der Folgeuntersuchung betrug für die HR-CT-Untersuchung 58 Wochen und für die Lungenfunktionsuntersuchung 49 Wochen. Als Kriterium für eine signifikante Verschlechterung der Lungengerüsterkrankung galt die Zunahme des HR-CT-Scores  $\geq 3$  Punkte und/oder die Abnahme der TLC  $\geq 10\%$  in einem Zeitraum von 2,5 Jahren. Von den untersuchten SSc-Patienten erfüllten 10 Patienten die Kriterien für eine progressive ILD.

Um das Ausmaß der Verschlechterung der Lungenfunktion genauer zu spezifizieren, wurden aus der Patientengruppe mit progressiver ILD die SSc-Patienten mit einer endstage ILD gesondert betrachtet. Endstage ILD wurde definiert als das Angewiesensein auf zusätzliche Sauerstoffzufuhr oder als Tod des betroffenen Patienten innerhalb eines Zeitraums von 38 Monaten. 6 der 10 SSc-Patienten mit progressiver ILD erfüllten diese Kriterien.

Altersspektrum, Geschlechterverteilung, Erkrankungsdauer und Raucherstatus der einzelnen Untergruppen finden sich in Tabelle 18.

|  | Gesamtgruppe<br>der SSc-Patienten<br>n = 29 | SSc-Patienten<br>mit stabiler ILD<br>n = 19 | SSc-Patienten mit<br>progressiver ILD<br>n = 10 | SSc-Patienten mit<br>endstage ILD<br>n = 6 |
|--|---|---|---|--|
| klinische und demographische Charakteristik Median (range) |   |   |   |  |
| Alter [a]  | 59,0 (37 - 72)                              | 61 (37 - 72)                                | 53 (38 - 63)**                                  | 49 (41 - 59)**                             |
| Erkrankungs-<br>dauer [a]                                  | 3 (2 - 16)                                  | 3 (2 - 16)                                  | 3 (2 - 14)                                      | 3 (10 - 14)                                |
| Raucher/<br>Ex-Raucher/<br>Nichtraucher                    | 3/7/19<br>(10/24/66 %)                      | 1/3/15<br>(5/16/79 %)                       | 2/4/4<br>(20/40/40 %)                           | 1/4/1<br>(17/67/17 %)                      |
| weiblich/<br>männlich                                      | 22/7  | 15/4  | 7/3   | 4/2  |
| mRSS   | 103 (0 - 31)                                | 14 (0 - 31)                                 | 10,5 (0 - 24)                                   | 11,5 (0 - 24)                              |
| HR-CT-Score  | 13,5 (0 - 27)                               | 13,8 (0 - 27)                               | 13 (0 - 27)                                     | 17 (0,7 - 27)                              |
| TLC [%]  | 81,2 (47,2 - 124)                           | 82,1 (47,9 - 124)                           | 79,4 (47,2 - 104)                               | 65,4 (47,2 - 97,1)*                        |
| FVC [%]  | 75,7 (29,3 - 108)                           | 84,4 (41,5 - 108)                           | 68,8 (43,3 - 92,7)**                            | 62,2 (43,3 - 72,6)**                       |
| DLCO [%]   | 61,6<br>(20,4 - 108,3)                      | 66,7<br>(32,9 - 108,3)                      | 53,6<br>(20,4 - 68,4)**                         | 36,6<br>(20 - 68,4)**                      |
| Neutrophile<br>[%]   | 4,3 (0 - 49)                                | 2 (0 - 9)                                   | 14,5 (3 - 49)***                                | 16,5 (4 - 38)***                           |
| Makrophagen<br>[%]   | 82 (39 - 98)                                | 87,5 (39 - 98)                              | 73 (41 - 93)*                                   | 74 (49 - 91)**                             |
| Tod  | 4 (14 %)                                    | 1 (6 %)                                     | 3 (30 %)  | 3 (50 %)                                   |
| immunsuppressive Therapie zum Zeitpunkt der BALF-Gewinnung |   |   |   |  |
| MTX/MMF  | 10  | 1   | 9   | 7  |
| AZA/andere   | 12  | 8   | 4   | 1  |
| keine  | 12  | 7   | 5   | 3  |

Tab. 18: Serologische und klinische Charakteristik von SSc-Patienten mit stabiler ILD im Vergleich mit SSc-Patienten mit progressiver ILD oder einer Lungenerkrankung im Endstadium (endstage ILD). Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001. MTX = Methotrexat, MMF = Mycophenolatmofetil, AZA = Azathioprin

Bereits zum Zeitpunkt der BALF-Gewinnung ist neben der DLCO auch die FVC signifikant reduziert bei denjenigen SSc-Patienten, die einen Krankheitsprogress im Beobachtungszeitraum erleiden (Abb. 5). Jedoch ist diese Assoziation nicht so ausgeprägt wie für Zytokinkonzentrationen oder für das Auftreten einer neutrophilen Alveolitis.

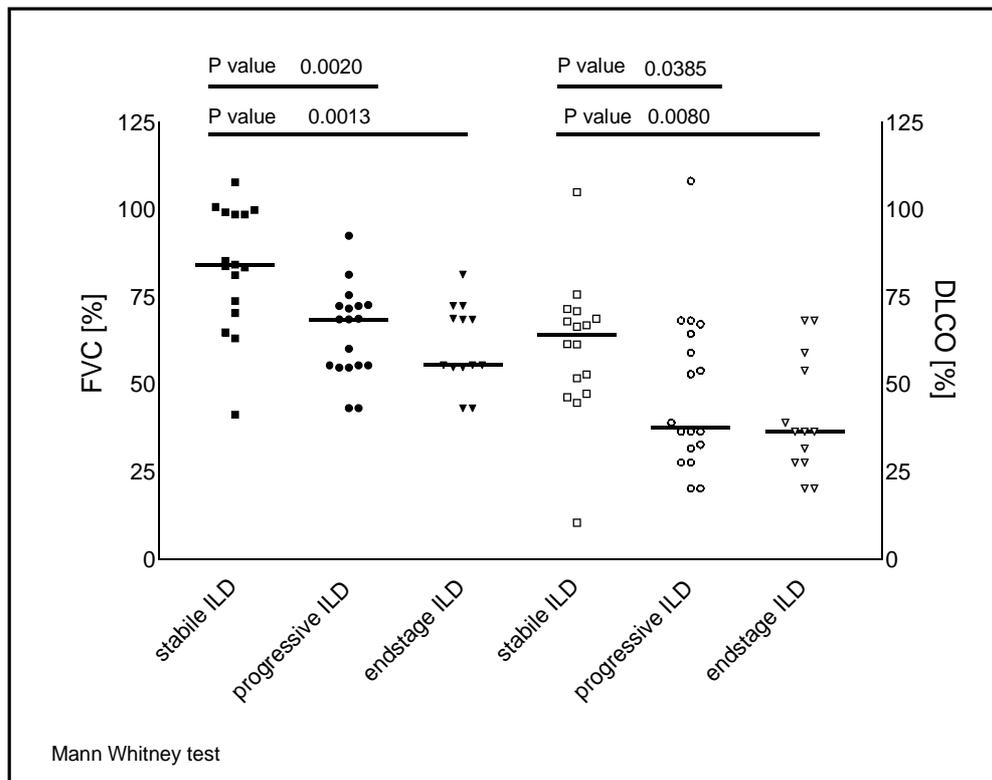


Abb. 5: FVC und DLCO [%] von SSc-Patienten mit stabiler, progressiver und endstage ILD innerhalb von 38 Monaten. Die Ergebnisse der Lungenfunktionsdiagnostik wurden zum Zeitpunkt der BALF-Gewinnung erhoben.

Der Vergleich der SSc-Patienten unter Beachtung der Entwicklung der Lungenfunktion ergab erhöhte BALF-Konzentrationen verschiedener Zytokine, wie IL-6, IL-8, MCP-1 und TNF $\alpha$  bei SSc-Patienten mit progressiver ILD bzw. ILD im Endstadium (Tab. 19). Weiterhin ist der Anteil von SSc-Patienten mit neutrophiler Alveolitis unter den SSc-Patienten mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion erhöht. Im Gegensatz dazu fand sich keine Assoziation zwischen dem HR-CT-Score oder dem mRSS mit einer Progression der Lungenerkrankung (Tab. 18).

| [pg/ml]       | alle BALF-Proben<br>(n = 35) | BALF-Proben bei stabilerILD<br>(n = 19) | BALF-Proben bei progressiverILD<br>(n = 16) | BALF-Proben bei endstageILD<br>(n = 12) |
|---------------|------------------------------|---|---|---|
| GCSF          | 28,2 (1,4 - 191)             | 23,9 (1,4 - 45)                         | 34,1 (20,2 - 191)*                          | 32,6 (20,2 - 50,6)*                     |
| IL-1          | 0,9 (0 - 17,2)               | 0,5 (0 - 2,8)                           | 1,3 (0,3 - 17,2)**                          | 1,3 (0,3 - 17,2)*                       |
| IL-2          | 3,6 (0 - 24,9)               | 0,9 (0 - 7,6)                           | 5,7 (0 - 24,9)*                             | 5,7 (2,8 - 24,9)**                      |
| IL-4          | 0,4 (0 - 22,9)               | 0 (0 - 4,6)                             | 3,5 (0 - 22,9)**                            | 5,2 (0 - 22,9)*                         |
| IL-6          | 15,8 (1,7 - 104,6)           | 13,1 (6,2 - 30,7)                       | 21,4 (1,7 - 104,6)**                        | 21,4 (1,7 - 104,6)**                    |
| IL-8          | 71,1 (5,9 - 794,5)           | 43,7 (5,9 - 209,3)                      | 105,5 (22,4 - 794,5)**                      | 124,2 (53,8 - 794,5)**                  |
| MCP-1         | 47,1 (0 - 1924,8)            | 44,6 (0 - 1924,8)                       | 92,2 (14,1 - 2000,5)**                      | 139,4 (26,7 - 2000,5)**                 |
| MIP-1 $\beta$ | 45,5 (4,2 - 119,9)           | 39,5 (4,2 - 111,3)                      | 53,9 (24,6 - 119,9)                         | 53,9 (35 - 107,1)                       |
| TNF $\alpha$  | 0,9 (0 - 8,1)                | 0,3 (0 - 3,6)                           | 1,7 (0 - 8,1)***                            | 1,9 (0 - 8,1)***                        |

Tab. 19 Zytokinkonzentrationen in BALF-Proben von SSc-Patienten mit stabilerILD, progressiverILD bzw. einer Lungenerkrankung im Endstadium (endstageILD). Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001.

Mit Hilfe einer univariaten logistischen Regressionsanalyse konnten junges Alter, niedrige DLCO-Werte, hohe IL-2- und TNF $\alpha$ -Konzentrationen sowie der Nachweis einer neutrophilen Alveolitis als Prädiktoren für eine progressiveILD mit p-Werten < 0,05 identifiziert werden. Mit p = 0,023 besitzt die neutrophile Alveolitis unter den genannten Parametern die höchste Vorhersagekraft für die Progression derILD. Analog dazu ergab die univariate Analyse niedrige DLCO- und FVC-Werte sowie hohe IL-2-Konzentrationen und den Nachweis einer neutrophilen Alveolitis als Prädiktoren für die Entwicklung einerILD im Endstadium mit p < 0,05. Die in der univariaten Analyse identifizierten potentiellen Prädiktoren für den Krankheitsprogress mit p-Werten < 0,1 wurden im Anschluss in einer multivariaten Regressionsanalyse getestet. Die Variablenselektion wurden mit dem Verfahren der schrittweisen „forward selection“ und „backward selection“ vorgenommen. Auf Grund des kleinen Stichprobenumfangs ergaben sich dabei verschiedene Kombinationen der einzelnen Indexparameter. Für die progressiveILD wurden das Alter und die neutrophile Alveolitis in beiden Verfahren selektiert, entweder in Kombination mit FVC oder mit IL-2 und IL-7. In der kleinen Gruppe der SSc-Patienten mit endstageILD ergab sich ein prädiktiver Wert für die neutrophile Alveolitis zusammen mit hohen IL-1-Konzentrationen und reduzierter FVC.

Zusätzlich wurden in einer weiteren Analyse die BALF-Zytokine separat analysiert. Dabei war IL-2 in Kombination mit IL-8 der beste Prädiktor für einen schweren Krankheitsverlauf.

### 3.2.5 hCMV-Infektionsstatus und Zytokinkonzentrationen in der BALF

Der mögliche Zusammenhang einer CMV-Infektion mit spezifischen Veränderungen der Zytokinkonzentrationen in der BALF konnte an 55 Proben untersucht werden (SSc-Patienten  $n = 30$ , Kontrollpatienten  $n = 25$ ). Bei 7/30 der SSc-Patienten (23,3 %) und 3/25 der Kontrollpatienten (12 %) wurde mit Hilfe des direkten serologischen Antikörpernachweises und zusätzlich mit Hilfe quantitativer PCR aus BALF-Zellen eine aktive hCMV-Infektion gesichert. Bei den hCMV-positiven SSc-Patienten fanden sich signifikant erhöhte MCP-1-Konzentrationen verglichen mit SSc-Patienten ohne hCMV-Reaktivierung (Median 529 pg/ml bzw. 47,1 pg/ml;  $p = 0,0199$ ).

Alle anderen gemessenen Zytokine zeigten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede. Darüber hinaus fand sich bei SSc-Patienten mit positivem hCMV-Infektionsstatus eine ausgeprägtere Lungenbeteiligung, die sich in einem erhöhten HR-CT-Score sowie in einer reduzierten TLC im Vergleich zu hCVM-negativen SSc-Patienten ausdrückt (Tab. 20).

| SSc-Patienten |                       |                       |           |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------|
| Parameter     | hCMV-positiv          | hCMV-negativ          | p-Wert    |
| HR-CT-Score   | 27,00 (19,67 - 27,00) | 12,00 (0 - 27,00)     | 0,0047 ** |
| TLC [%]       | 62,35 (47,90 - 83,0)  | 80,00 (50,90 - 115,0) | 0,0293 *  |
| FVC [%]       | 55,6 (55,0 - 91,5)    | 72,25 (29,3 - 108,0)  | 0,2628    |
| DLCO [%]      | 64,4 (20,4 - 117,0)   | 46,3 (36,6 - 80,0)    | 0,3136    |

Tab. 20: HR-CT-Score und Lungenfunktionsparameter von SSc-Patienten in Abhängigkeit vom hCMV-Infektionsstatus. Die Zellenwerte entsprechen Median (range), p-Werte nach Mann Whitney Test entsprechen \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

In der vergleichenden Betrachtung von hCMV-negativen SSc-Patienten und hCMV-negativen Kontrollpatienten mit anderen Lungenerkrankungen fanden sich bei SSc-Patienten niedrigere IL-6-Konzentrationen (Median 16,58 pg/ml bzw. 24,54 pg/ml;  $p = 0,0113$ ) und höhere IL-7-Konzentrationen (Median 3,555 pg/ml bzw. 1,950 pg/ml;  $p = 0,0253$ ). Im Vergleich der jeweils hCMV-positiven Untergruppen ergab sich für keines der gemessenen Zytokine ein signifikanter Konzentrationsunterschied.

### **3.3 Assoziation von Zytokinkonzentrationen in Serum und BALF**

Abschließend wurde untersucht, ob und in wie weit ein Zusammenhang zwischen Zytokinkonzentrationen im Serum und in der BALF bestehen. Zur Analyse wurden Paare gebildet aus zeitnah gewonnenen Serum- und BALF-Proben von SSc- und Kontrollpatienten. Der maximale Abstand zwischen der Gewinnung der Proben wurde auf 14 Tage begrenzt. Unter Berücksichtigung dieses Einschlusskriteriums konnten für 22 SSc-Patienten (7 Männer und 15 Frauen) und 11 Kontrollpatienten (4 Männer und 7 Frauen) mit anderen chronischen Lungenerkrankungen Serum-BALF-Paare gebildet werden. Der durchschnittliche zeitliche Abstand bei der Gewinnung der Proben betrug 1 Tag (maximal 12 Tage). Die Auswertung der Serum-BALF-Paare der SSc-Patienten ergab einzig für IL-8 eine positive Korrelation zwischen Serum-Konzentration und BALF-Konzentration ( $p = 0,0009$ ; Pearson  $r = 0,6581$ ). Die Auswertung der Serum-BALF-Paare der Kontrollpatienten ergab für keines der untersuchten Zytokine eine signifikante Korrelation zwischen Serum- und BALF-Konzentration.

## 4 Diskussion

Die SSc ist eine seltene Erkrankung, die durch eine vermehrte Ablagerung von EZM gekennzeichnet ist. Dabei führt ein Entzündungsprozess noch ungeklärter Ursache unter Beteiligung des Gefäßsystems zu einer Zerstörung und Atrophie von betroffenen Strukturen, zu fibrotischem Umbau und letztlich zum Verlust von Organfunktionen. Die Expression von EZM-Genen ist normalerweise streng reguliert durch para- und/oder autokrin-wirkende lösliche Mediatoren sowie durch Zell-Zell-Kontakte, lokale Hypoxie und Interaktion mit der umgebenden EZM [6]. Die intensiven Bemühungen der letzten Jahre haben das Verständnis für die Krankheitsprozesse, die der SSc zugrunde liegen, erweitert und erfassen im Wesentlichen Veränderungen des Gefäßsystems, des Bindegewebes und des Immunsystems. Die Überproduktion von EZM durch aktivierte Fibroblasten ist, nach dem gegenwärtigen Erkenntnisstand, das Resultat einer komplexen Interaktion verschiedener Zellarten, wie Endothelzellen, Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten, die durch eine Vielzahl von Mediatoren gesteuert werden [6].

Entzündungsmediatoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen. Veränderten Zytokin- und Chemokinkonzentrationen werden deshalb in der Ätiopathogenese der SSc eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Bereits in frühen Stadien der Erkrankung und noch vor der vermehrten Ablagerung von Bindegewebsproteinen im betroffenen Gewebe lassen sich entzündliche, hauptsächlich perivaskuläre Infiltrate mononukleärer Zellen nachweisen. Veränderte Zytokinkonzentrationen konnten bei SSc-Patienten vor allem im Serum und in betroffener Haut, aber auch in der BALF nachgewiesen werden. In der verfügbaren Literatur werden bei SSc-Patienten eine Vielzahl von Zytokinen beschrieben, für die signifikante Veränderungen der Konzentration in verschiedenen Medien nachgewiesen werden konnten. Jedoch stellen nur wenige Untersuchungen einen Bezug von veränderten Zytokinkonzentrationen und klinischen Parametern sowie zum Krankheitsverlauf her.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Serum und in der BALF von SSc-Patienten, Kontrollpatienten und gesunden Spendern gemessen, untereinander und mit klinischen Parametern verglichen und in Beziehung gesetzt. Ziel war es, diejenigen Zytokine zu identifizieren, die in der Ätiologie und Pathogenese der systemischen Sklerose eine

Schlüsselstellung inne haben und damit potentielle therapeutische Ziele für die Behandlung sklerodermie-assoziiertes Fibrose darstellen können. In den hier vorgestellten Untersuchungen zeigten SSc-Patienten mit Alveolitis im Vergleich zu Patienten mit Alveolitis anderer Genese und auch im Vergleich zu SSc-Patienten ohne Alveolitis typische Zytokinveränderungen in der BALF. Dazu gehören neben erhöhten IL-7- und IL-8- auch erhöhte MCP-1-Konzentrationen. Auch im Serum von SSc-Patienten fanden sich verglichen mit gesunden Spendern erhöhte Konzentrationen von IL-7, IL-8 und MCP-1 und zusätzlich erhöhte Konzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF $\alpha$ , was unter Berücksichtigung der wissenschaftlichen Literatur als Beleg für einen krankheitsspezifischen Pathomechanismus gewertet werden kann.

#### **4.1 MCP-1 als Marker einer Lungenfibrose**

Für MCP-1 konnte auch im Rahmen anderer Studien eine erhöhte Konzentration bei SSc-Patienten mit und ohne Alveolitis nachgewiesen werden, weshalb viele Autoren MCP-1 eine Schlüsselstellung in der Entwicklung einer SSc-assoziierten Lungenfibrose zuschreiben [36, 38, 102, 103]. MCP-1 gehört zur Superfamilie der C-C-Chemokine und ist ein potenter Chemoattractant für mononukleäre Zellen, hauptsächlich Monozyten und Makrophagen, aber auch für Endothelzellen [38, 104, 105]. MCP-1 wird bei Patienten mit kürzlich beginnender SSc in hohen Konzentrationen von mononukleären Zellen und dermalen Endothelzellen exprimiert, was die Vermutung nahe legt, dass MCP-1 bereits in die frühen Phasen der Krankheitsentwicklung involviert ist [38]. In-vivo-Studien wiesen zusätzlich eine Beteiligung von MCP-1 an der Entstehung und Aufrechterhaltung anderer Erkrankungen, darunter Arteriosklerose, Rheumatoide Arthritis, Asthma, ideopathische Lungenfibrose, Glomerulonephritis mit Halbmondbildung und interstitielle Nierenfibrose nach [36, 38, 106 - 108]. Bei Sarkoidose gehen erhöhte MCP-1-Serumspiegel einem klinischen Rückfall voraus [109].

Zusätzlich stützen im Tiermodell gewonnene Daten die Schlüsselrolle von MCP-1 bei der Entstehung einer SSc-assoziierten Lungenfibrose [36]. So konnte im Tiermodell die Hemmung der biologischen MCP-1-Wirkung mit Anti-MCP-1-Antikörpern die Entwicklung einer Bleomycin-induzierten Fibrose durch Reduktion der Kollagenproduktion verhindern. Der gleiche Effekt zeigte sich auch nach pharmakologischer Blockade der MCP-1-Wirkung [36, 110]. Weiterhin entwickelten Mäuse mit defektem CCR-2, dem wichtigsten MCP-1 Rezeptor, keine

bleomycininduzierte Lungenfibrose [111]. Nach bisherigem Erkenntnisstand wirkt MCP-1 direkt als proinflammatorisches Chemokin unter Bildung eines inflammatorischen Milieus, das die Fibroblastenfunktion und Kollagensynthese beeinflusst. Zusätzlich zeigt es eine indirekte Wirkung über Steigerung der Kollagen-I-Genexpression in Fibroblasten über eine Modulation von TGF- $\beta$  [36].

Es konnte nachgewiesen werden, dass dermale Fibroblasten keine funktionellen MCP-1-Rezeptoren exprimieren und dass MCP-1 damit keinen direkten Einfluss auf dermale Fibroblasten ausüben kann. Statt dessen beeinflusst MCP-1 die T-Zell-Polarisierung und induziert die Differenzierung in IL-4-produzierende Th2-Zellen. IL-4 wiederum steigert signifikant die Produktion von Kollagenen und anderen EZM-Bestandteilen über die Bindung an seine IL-4-Rezeptoren auf Fibroblasten. Glykosaminoglykane, die im Rahmen des fibrotischen Gewebeumbaus in SSc-betroffener Haut akkumulieren, binden MCP-1 über Ionenbindungen und dienen so als lokales Reservoir, das den profibrotischen Effekt von MCP-1 zusätzlich verstärkt [112].

Die in der hier vorgestellten Untersuchung gefundene negative Korrelation von IL-4-Konzentrationen in der BALF und der eingeschränkten Lungenfunktion mit reduzierter FVC, TLC sowie DLCO unterstützen diese Ergebnisse. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Patienten die eine SSc-assoziierte progressive ILD bzw. ILD im Endstadium im Beobachtungszeitraum entwickelten, erhöhte IL-4-Spiegel in der BALF aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit fand sich darüber hinaus ein Zusammenhang zwischen erhöhten MCP-1-Spiegeln und einer anhand von HR-CT-Score und Lungenfunktionsparametern diagnostizierten Lungenfibrose. Damit scheint die Blockade der MCP-1-Bioaktivität im Rahmen einer „targeted therapy“ bei SSc vielversprechend. Da die Ansammlung von mononukleären Zellen durch komplette Blockade von MCP-1 jedoch nicht vollständig hemmbar ist, scheinen zusätzlich andere Zytokine an der Migration von mononukleären Zellen beteiligt zu sein.

Darüber hinaus beschreiben bisherige Studien eine direkte Beeinflussung der Kollagen-I-Genexpression durch MCP-1 über die Modulation von TGF- $\beta$  [36]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von MCP-1 zu reduzierten TGF- $\beta$ -Spiegeln und in der Folge zu einer reduzierten Prokollagensynthese und Nierenfibrose führte [113].

#### **4.2 TGF- $\beta$ beeinflusst die Balance zwischen Synthese und Degradation von EZM**

TGF- $\beta$  ist sowohl an der Regulation physiologischer Fibrosierungsprozesse, insbesondere an Wundheilung und Gewebereparatur, als auch an pathologischer Fibrosierung, wie überschießender Narbenbildung beteiligt [6]. TGF- $\beta$  verändert die Balance zwischen Synthese und Degradation der EZM [3]. Es induziert einen Anstieg der Synthese von Matrixkomponenten bei gleichzeitiger Hemmung der matrix-proteolytischen Aktivität [3, 114, 115]. Zusätzlich spielt es eine essentielle Rolle bei der Angiogenese, der Immunregulation, der Zellproliferation, der axialen Entwicklung der Skelettmuskulatur und der Zelldifferenzierung [4, 6, 116]. So kann die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten durch TGF- $\beta$  induziert werden [6]. Myofibroblasten sind spezialisierte Fibroblasten, die kontraktile Eigenschaften von glatten Muskelzellen aufweisen und Kollagene und andere EZM-Bestandteile produzieren [117].

Im Rahmen der physiologischen Wundheilung können Myofibroblasten vorübergehend im Granulationsgewebe nachgewiesen werden. Nach Abschluss der Wundheilung werden überzählige Myofibroblasten durch Induktion von Apoptose eliminiert [118]. Persistieren die Myofibroblasten dagegen, entsteht in der Folge eine pathologische Fibrosierung mit verfestigter und kontrahierter EZM, wie sie für die SSc charakteristisch ist [118]. Eine Persistenz von Myofibroblasten konnte in Fibroblastenkulturen nachgewiesen werden, die aus SSc-betroffener Haut gewonnen wurden [53]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen gelang eine Reduktion der Myofibroblastenformation in betroffener Haut durch die Behandlung mit Anti-TGF- $\beta$ -Antikörpern [119]. Auch im Tiermodell konnte durch die Blockade der TGF- $\beta$ -Bioaktivität mittels Anti-TGF- $\beta$ -Antikörper und Applikation von löslichen TGF- $\beta$ -Rezeptoren die Fibroseentwicklung gehemmt werden [53, 120].

Um das profibrotische Profil von BALF und von Serum bei SSc-Patienten abschätzen zu können, wurden in der hier vorgestellten Arbeit TGF- $\beta$ -Spiegel bestimmt. TGF- $\beta$  wird als Proteinkomplex sezerniert, bestehend aus dem aktiven TGF- $\beta$ -Homodimer und zwei Prosegmenten, dem so genannten Latency Associated Peptide (LAP) [121]. Diese Komplexbildung dient dem Schutz des aktiven TGF- $\beta$  vor schnellem proteolytischen Abbau, da die Halbwertszeit von TGF- $\beta$  im Plasma nur wenige Minuten beträgt. In vivo wird TGF- $\beta$  durch proteolytische Spaltung des LAP mittels Proteasen wie Plasmin, Kathepsin D, Proteinase 3 oder Elastase, aktiviert. In vitro wird die Aktivierung durch Zugabe von Säure und anschließendem Neutralisieren erreicht. Mittels kommerzieller Enzymimmunoassays folgt im Anschluss an die Aktivierung die quantitative

Bestimmung der TGF- $\beta$ -Konzentration. Im Unterschied zu anderen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit die BALF nicht vorbehandelt, das heißt, sie wurde nicht durch Ultrafiltration konzentriert, da angenommen wurde, dass eine Vorbehandlung die Stabilität und Integrität der Inhaltsstoffe beeinflussen und verändern kann. Bedauerlicherweise waren die TGF- $\beta$ -Spiegel der BALF-Proben mit Hilfe des verwendeten ELISA von R&D Systems allesamt unterhalb der Nachweisgrenze und somit nicht detektierbar. Zum gleichen Ergebnis kommt eine andere Studie, bei der die TGF- $\beta$ -Konzentration in der BALF ebenfalls mit oben genanntem ELISA bestimmt wurde und bei der ebenfalls alle TGF- $\beta$ -Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, obwohl die BALF durch Ultrafiltration 4 - 10fach konzentriert wurde [83]. Im Gegensatz dazu war eine Bestimmung von TGF- $\beta$  im Serum mit Hilfe des verwendeten ELISA problemlos möglich. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die geschilderten Probleme der TGF- $\beta$ -Bestimmungen nicht im Messverfahren sondern im Untersuchungsmaterial begründet sind. Als ursächlich kommen dabei sowohl eine erhöhte Konzentration proteolytischer Enzyme in entzündlich veränderter BALF als auch ein veränderter pH-Wert in Betracht, wodurch die molekulare Integrität der TGF- $\beta$ -Isoformen beeinflusst werden könnte. Latentes TGF- $\beta$  könnte so aktiviert und in der Folge auf Grund der kurzen Halbwertszeit abgebaut werden.

Letztlich kann mit Hilfe der hier präsentierten Ergebnisse die Rolle von TGF- $\beta$  in der BALF, wie sie durch andere Studien nahe gelegt wird, nicht beurteilt werden. Weiterführende Untersuchungen sollten dementsprechend zumindest den BALF-pH-Wert berücksichtigen und evtl. auch auf andere Untersuchungsverfahren zurückgreifen. Beispielsweise gelang einer Forschungsgruppe die Bestimmung der TGF- $\beta$ -Konzentrationen auch in der BALF, mit Hilfe eines CCL-64-Bioassays [122].

Im Serum von SSc-Patienten fanden sich überwiegend hohe TGF- $\beta$ -Spiegel. Insgesamt war es das Zytokin mit der höchsten mittleren Serumkonzentration. Die negative Korrelation von TGF- $\beta$ -Serumkonzentrationen und FVC sowie die hoch signifikant erhöhte TGF- $\beta$ -Konzentration bei SSc-Patienten mit HR-CT-gesicherter Lungenfibrose gegenüber SSc-Patienten ohne Lungenfibrose unterstreichen die Annahme vorausgegangener Arbeiten, die TGF- $\beta$  eine wesentliche Rolle in der Ätiopathogenese der SSc zuweisen. Insgesamt gilt es jedoch bei der Interpretation der TGF- $\beta$ -Messergebnisse zu beachten, dass TGF- $\beta$  auch in vivo nur zu einem kleinen und nicht genau bestimmbar Anteil in biologisch aktiver Form vorliegt und dass sich seine Wirkung in der Krankheitsentstehung und im Krankheitsverlauf evtl. auch aus dem

Verhältnis von aktiver zu latenter Form ableitet. Um diese Fragen zu beantworten, sind weiterführende Studien notwendig, in denen TGF- $\beta$ -Konzentrationen in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand analysiert werden sollten.

#### **4.3 IL-8-BALF-Konzentrationen bei ILD**

Auch andere Zytokine, wie beispielsweise IL-6 und IL-8, wurden bereits in vorangegangenen Studien als mögliche Bausteine in der Pathogenese der SSc diskutiert.

IL-8 ist ein Mitglied der CXC-Chemokin-Familie und kann von einer Vielzahl von inflammatorischen und nicht-inflammatorischen Zellen gebildet werden [84, 123]. IL-8 wirkt auf neutrophile Granulozyten stark chemotaktisch und aktivierend, woraus eine vermehrte Degranulation und eine gesteigerte Adhärenz an Endothelzellen und Matrixproteinen resultiert [83, 84, 124]. Bei fibrosierenden Lungenerkrankungen sind Alveolar-Makrophagen die Hauptproduzenten von IL-8 [84, 123]. In Epithelzellkulturen korreliert die IL-8-Konzentration mit der Anzahl der neutrophilen Granulozyten [84]. Analog dazu konnte auch in der hier vorgestellten Arbeit eine starke Korrelation von IL-8-BALF-Konzentrationen und der Anzahl der neutrophilen Granulozyten sowohl bei SSc-Patienten als auch bei Kontrollpatienten mit anderen pulmonalen Erkrankungen nachgewiesen werden. IL-8-Konzentrationen werden vor allem im Zusammenhang mit ILD, wie der idiopathischen Lungenfibrose, der Sarkoidose und der hypertensiven Pneumonie beschrieben [83]. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer SSc scheint mit einem Polymorphismus des IL-8-Gens assoziiert zu sein [125]. Erhöhte IL-8-Konzentrationen im Serum und in der BALF von SSc-Patienten wurden auch in anderen Studien bestätigt ebenso eine verstärkte Expression von IL-8 durch SSc-betroffene Fibroblasten und Alveolar-Makrophagen [102, 124, 126, 127].

In der vorliegenden Arbeit fanden sich deutlich höhere IL-8-BALF-Konzentrationen bei SSc-assoziiierter Alveolitis als bei Sarkoidose-assoziiierter Alveolitis. Weiterhin konnte eine negative Korrelation von IL-8-BALF-Konzentrationen und eingeschränkter FVC bzw. TLC bei SSc-Patienten nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind konform zu den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls eine Korrelation von erhöhten IL-8-Konzentrationen und eingeschränkter Lungenfunktion nachweisen konnten und die IL-8 deshalb eine Schlüsselrolle in der Pathogenese von ILD zuweisen [127]. Dafür spricht auch die an den vorliegenden Daten vorgenommene

multivariate Analyse der BALF-Zytokine, in der hohe IL-2-Spiegel in Kombination mit hohen IL-8-Spiegeln prädiktiv für eine schlechte Prognose der Lungenveränderungen sind.

#### **4.4 Bedeutung von Th17-Zellen bei Autoimmunerkrankungen**

In den letzten Jahren wurde eine neue Subpopulation von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen identifiziert, die selektiv IL-17 produzieren und aus diesem Grund Th17-Zellen genannt werden [128, 129]. Von diesen Th17-Zellen werden sich neue Einsichten in die Immunregulation und Immunabwehr sowie in die Pathogenese von Autoimmunität und inflammatorischen Erkrankungen erhofft [129, 130]. Im Mausmodell findet, in Gegenwart von TGF- $\beta$  und IL-6 als entscheidende Co-Faktoren, eine Differenzierung von naiven Th-Zellen in Th17-Zellen statt. Im Gegensatz dazu ist die Bedeutung von TGF- $\beta$  für die Entwicklung humaner Th17-Zellen bislang strittig [129]. Hier scheint neben IL-6 eher IL-1 $\beta$  und IL-23 für die Differenzierung in Th17-Zellen essentiell [129, 130]. Erste Studien unterstützen die Bedeutung von Th17-Zellen bei autoimmunologischen bzw. chronisch-inflammatorischen Erkrankungen. So wurde, im Vergleich zur Anzahl im peripheren Blut, eine erhöhte Anzahl von IL-17-mRNA-exprimierenden Zellen im Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose gefunden [129]. Weiterhin konnten verschiedene Studien hohe IL-17-Serumkonzentrationen beim systemischen Lupus erythematodes, dem Morbus Crohn, der Psoriasis und der SSc nachweisen [129].

IL-17 stimuliert die Produktion von IL-1 und TNF $\alpha$  durch Makrophagen und über diesen Weg die Kollagenproduktion in Fibroblasten. Weiterhin wird die Produktion von IL-1, IL-6 und Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen stimuliert, was zur Aktivierung und zur Chemotaxis von Neutrophilen beiträgt [3]. Insgesamt sind jedoch die bisher zur Verfügung stehenden Erkenntnisse noch keinesfalls ausreichend, um die Rolle von Th17-Zellen in der Pathogenese humaner Autoimmunerkrankungen beurteilen zu können.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurden die zu bestimmenden Zytokine nicht unter Berücksichtigung der neu entdeckten Th17-Zellen ausgewählt. Im Rahmen der Voruntersuchungen wurden aber dennoch IL-17-Konzentrationen im Serum von 58 SSc-Patienten und 11 Kontrollpatienten und in der BALF von 32 SSc-Patienten und 24 Kontrollpatienten bestimmt. Sowohl bei SSc-Patienten als auch bei Kontrollpatienten lagen alle Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze, so dass auf eine Bestimmung von IL-17 in der 2. Versuchsreihe verzichtet wurde. Mögliche lokale Effekte von IL-17 im Sinne einer parakrinen

Wirkung können jedoch nicht ausgeschlossen werden und sind mit Hilfe der vorliegenden Untersuchung nicht beurteilbar.

Andere Zytokine, wie beispielsweise IL-23, die im Konzept der Th17-Zellen aktuell diskutiert werden, wurden in beiden Versuchsreihen nicht gemessen. Dennoch könnte die hoch signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 und TNF $\alpha$  im Serum von SSc-Patienten verglichen mit gesunden Spendern sowie in der BALF von SSc-Patienten mit Alveolitis verglichen mit SSc-Patienten ohne Alveolitis bzw. mit gesunden Spendern ohne Lungenerkrankung auf einen IL-17- bzw. Th17-Effekt hinweisen. Die Induktion der IgM-, IgG- und IgA-Produktion durch Th17-Zellen spricht zusätzlich für eine Beteiligung von Th17-Zellen an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und bietet damit ein interessantes Ziel für weiterführende Untersuchungen. Insgesamt stellen Th17-Zellen einen vielversprechenden neuen Ansatz in der Pathogenese der SSc dar.

Zusammenfassend konnten in einer großen Anzahl von Studien für eine Vielzahl von Zytokinen spezifische Veränderungen nachgewiesen werden. Dass dabei zum Teil unterschiedliche Zytokine als relevant ermittelt wurden, kann von der Variabilität des Patientenkollektivs hinsichtlich Alter, Geschlecht, Erkrankungsdauer, bisherige und/oder aktuelle immunsuppressive Medikation, Raucherstatus, Rasse und Präsenz spezifischer Autoantikörper abhängig sein. Zusätzlich könnten auch Unterschiede in der Zytokinmessung, hinsichtlich Untersuchungsmaterial, Untersuchungsmethode und Stabilität der einzelnen Faktoren eine Rolle spielen. Die unterschiedliche Halbwertszeit verschiedener Zytokine kann zu einer Unter- bzw. Überbestimmung führen, ebenso wie verschiedene Aktivitätszustände, Unterschiede im pH-Wert oder Veränderungen der Konzentration im Zeitverlauf. Zusätzlich müssen bei der Betrachtung der komplexen biologischen Auswirkungen von Zytokinen und Chemokinen auf Zielzellen und Zielgewebe die Nettoeffekte verschiedener Zytokine und deren Inhibitoren in der perizellulären Umgebung, d. h. die relativen Konzentrationen zueinander berücksichtigt werden. Aus diesem Grund sollten in weiterführenden Untersuchungen neben der Betrachtung einzelner Zytokine auch Zytokinmuster bei SSc Patienten bestimmt werden.

#### **4.5 Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak und Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak als funktionelle Autoantikörper**

Neben Veränderungen der Immunantwort und einer gesteigerten EZM-Produktion stellt die Imbalance zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese der SSc dar, die sich unter anderem in erhöhten Konzentrationen der potenten Vasokonstriktoren Angiotensin II und Endothelin 1 widerspiegeln [26, 30]. Sowohl für Angiotensin II als auch Endothelin 1 wurde neben dem vasokonstriktiven ein profibrotischer Effekt nachgewiesen [6, 29 - 31]. In Tierexperimenten konnte eine vaskuläre Fibrosierung durch i. v. Applikation von Angiotensin II induziert sowie durch Blockade des RAAS die Entwicklung einer Herz- und Nierenfibrose verhindert werden [31, 131, 132]. Diese Beobachtungen haben bereits klinische Relevanz in der Behandlung von SSc-Patienten. So werden ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Blocker in der Therapie von SSc-bedingten Nierenfunktionsstörungen und der Raynaud-Symptomatik, sowie ET<sub>A/B</sub>-Rezeptor-Blocker bei pulmonaler arterieller Hypertonie erfolgreich eingesetzt [133, 134].

Darüber hinaus kann Angiotensin II die Bildung von Sauerstoffradikalen durch Aktivierung einer NADH/NADPH-Oxidase induzieren [31]. Dem entsprechend wurde ein erhöhtes Maß an Lipidperoxidation bei SSc-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern gefunden [135]. Neben der direkten Gewebeschädigung ist oxidativer Stress ein Stimulus für die Produktion proinflammatorischer Zytokine [31, 136]. Zusätzlich konnte in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie nachgewiesen werden, dass humane T-Zellen mit allen funktionellen Elementen des RAAS ausgestattet sind und AT<sub>1</sub>-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [136].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Autoantikörper im Serum von SSc-Patienten und gesunden Spendern gemessen, die gegen den AT<sub>1</sub>- bzw. den ET<sub>A</sub>-Rezeptor gerichtet sind. Die Ergebnisse sind Bestandteil einer großen, noch nicht veröffentlichten Studie an der medizinischen Klinik für Rheumatologie und Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, die die agonistische Rezeptoraktivierung durch diese Antikörper im Sinne einer funktionellen Autoimmunität, ihren lokalen und systemischen Effekt sowie die Möglichkeiten der therapeutischen Blockade untersucht.

So genannte funktionelle stimulatorische Autoantikörper sind für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel der Autoimmunthyreoiditis vom Typ Hashimoto, verantwortlich und werden zunehmend auch im Rahmen der SSc als neues Erklärungsmodell der pathologisch veränderten Immunantwort diskutiert [137]. Bisher konnten bei SSc-Patienten

agonistische Autoantikörper gegen Platelet-Derived-Growth-Faktor(PDGF)-Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Autoren dieser Untersuchung schlussfolgerten, dass die rezeptoraktivierenden Autoantikörper über eine verstärkte Induktion von Sauerstoffradikalen an der Aktivierung von Fibroblasten beteiligt sind [138].

Agonistisch wirkende Autoantikörper am Angiotensin-II-Typ-I-Rezeptor wurden bei anderen Erkrankungen wie der Präeklampsie gefunden [139]. Im Gegensatz dazu wurden Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak beim Menschen bislang noch nicht nachgewiesen. In der hier untersuchten Gruppe der SSc-Patienten fand sich eine hohe Übereinstimmung von Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak und Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Konzentrationen. Als mögliche Ursache für dieses Phänomen kommen beispielsweise eine Kreuzreaktivität oder aber eine krankheitsspezifische Heterodimerbildung der beiden Antikörper in Betracht. Zum besseren Verständnis der Rezeptorkonfiguration sowie der Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- bzw. Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Rezeptor-Bindungsstellen sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um daraus eine gezielte Modulation und potentielle therapeutische Ziele zu entwickeln.

Insgesamt fanden sich bei SSc-Patienten mit hohen Antikörperkonzentrationen eine ausgeprägtere Hautbeteiligung mit hohem mRSS sowie eine stärkere Ausprägung der Lungenfunktionsstörung mit reduzierter DLCO und FVC. Analog zu den erhöhten Antikörperkonzentrationen waren bei den hier untersuchten SSc-Patienten auch erhöhte Serumkonzentrationen der Th2-Zytokine IL-6 und IL-10 nachweisbar, was ein Indiz für eine humorale Immunantwort ist und mit hohen Antikörperkonzentrationen im Einklang steht. Es ist naheliegend, dass das Ausmaß der Immunantwort und die Ausprägung der profibrotischen AT<sub>1</sub>- bzw. ET<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelten Wirkung erstens von der Konzentration der frei zirkulierenden funktionellen Autoantikörper, zweitens vom lokalen, entzündlichen Milieu und drittens von der Rezeptorkonzentration im Zielgewebe abhängig ist. Hohe Antikörpertiter sind deshalb mit einem schwereren klinischen Verlauf und mit einem rascheren Krankheitsprogress assoziiert.

Im Gegensatz zu anderen SSc-spezifischen Autoantikörpern, wie Anti-Scl-70-Ak oder ACA, für die bislang kein SSc-spezifischer Wirkungsmechanismus nachgewiesen werden konnte, und die deshalb als krankheitsspezifisches Epiphänomen gewertet werden, könnten Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak und Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak eine aktive Rolle im Krankheitsgeschehen spielen und damit künftig zur Identifikation von Patienten mit hohem Risiko für schwere Komplikationen bzw. schlechter Prognose beitragen. Unter der Voraussetzung, dass sich auch in größeren Studien signifikante Unterschiede zwischen SSc-Patienten mit positivem/negativem Antikörperstatus bezüglich des

Schweregrades der Erkrankung sowie des Ausmaßes der Organbeteiligung finden, wäre eine Integration des Autoantikörperstatus in das traditionelle Klassifikationssystem der SSc zu diskutieren. Ein solches Klassifikationssystem, das über die reine Diagnosefindung hinaus auch prognostische Aussagen ermöglicht, wäre ein wichtiger Schritt zu einer phasengerechten und frühzeitigen Therapie.

#### **4.6 Stellenwert der BALF in der Diagnostik und Therapie der SSc**

Sehr eindrucksvoll und bisher nicht beschrieben bei SSc-Patienten, ist die Assoziation von erhöhten Zytokinspiegeln in der BALF, dem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- bzw. Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Status und der Verschlechterung einerILD sowie der EntwicklungILD im Endstadium innerhalb eines Zeitraumes von 38 Monaten.

In der hier vorgestellten Arbeit zeigten spezifisch veränderte Zytokinkonzentrationen in der BALF, wie zum Beispiel erhöhte MCP-1-Konzentrationen, eine stärkere Assoziation mit der Entwicklung einer SSc-assoziiertenILD als der HR-CT-Score und/oder die Ergebnisse der Lungenfunktionsdiagnostik, was in Kenntnis anderer Publikationen überrascht, die für HR-CT-Befunde und Lungenfunktionsparameter einen prädiktiven Wert für die Entwicklung der Lungenfunktion ermitteln konnten, nicht jedoch für BALF-Ergebnisse [16, 81, 86]. Allerdings wurden in diesen Untersuchungen vorrangig der BALF-Zellgehalt und die BALF-Zelldifferenzierung, nicht jedoch spezifische Zytokinkonzentrationen ausgewertet, so in der kürzlich veröffentlichten Scleroderma Lung Study (SLS). Hier konnte eine Assoziation von pathologisch erhöhter BALF-Zellzahl und eingeschränkter Lungenfunktion, jedoch kein prädiktiver Wert der BALF-Ergebnisse, für die Entwicklung der Lungenfunktion nachgewiesen werden [16, 80, 81]. In der univariaten Regressionsanalyse wurde auch in der hier vorgestellten Arbeit ein prädiktiver Wert der neutrophilen Alveolitis für die Progression der SSc-assoziierten Lungenerkrankung gefunden. Darüber hinaus konnte durch den Vergleich mit Kontrollpatienten gezeigt werden, dass die veränderten Zytokinkonzentrationen nicht einfach nur das Verhältnis der BALF-Zellzahlen widerspiegeln. Weiterführende Untersuchungen der SLS-Daten zeigten lediglich eine schwache Korrelation von HR-CT-Befunden, wie der Milchglaszeichnung, und pathologischen BALF-Veränderungen [81].

Auch in der vorliegenden Arbeit fanden sich bei einigen Patienten mit neutrophiler Alveolitis und/oder erhöhten Zytokinkonzentrationen Normwerte in der Lungenfunktion und im HR-CT-

Score. Inwieweit HR-CT-Befunde akute ILD widerspiegeln und damit dieselbe Pathologie wie die BALF abbilden, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend beurteilen. Bei Betrachtung dieser Fragestellung muss berücksichtigt werden, dass BALF-Proben nur die Veränderungen innerhalb eines begrenzten Lungenabschnitts, in der Regel des rechten Lungenmittellappens, repräsentieren, welcher typischerweise heterogenen Krankheitseinflüssen ausgesetzt ist, während mit einer HR-CT-Untersuchung das gesamte Lungenvolumen bewertet wird. Diese Tatsache kann für die, in den genannten Studien schwache Korrelation von Bildgebung und BALF-Resultaten verantwortlich sein [81, 26].

Einige Studien belegen, dass die interlobulären Unterschiede der BALF-Zellzahl und -Zelldifferenzierung bei der Mehrheit der Individuen gering sind [140], während andere Untersuchungen sowohl bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose als auch bei SSc-Patienten die höchste BALF-Konzentration von Eosinophilen und Granulozyten in denjenigen Lungenabschnitten nachweisen konnten, die auch im HR-CT spezifische Pathologien zeigten [141, 142]. Die Autoren der SLS zweifeln an der Beziehung von HR-CT-Befunden und aktiver Alveolitis und stellten, in Anbetracht der von ihnen ermittelten Überlegenheit von HR-CT-Befunden gegenüber BALF-Ergebnissen, den Stellenwert der BALF als invasive Routinemethode zur Einschätzung von Krankheitsaktivität und Krankheitsverlauf in der Behandlung von SSc-Patienten in Frage [81, 82].

Die vorliegende Arbeit belegt jedoch eindrucksvoll das Potential der BALF, nicht nur zur Verifizierung einer aktiven Alveolitis sondern auch als Grundlage therapeutischen Handelns und zur Abschätzung der Prognose der SSc-assoziierten ILD. Dafür sprechen der prädiktive Wert von neutrophiler Alveolitis in Verbindung mit IL-2- und IL-7-Konzentrationen und, bei separater Betrachtung der BALF-Zytokine, der prädiktive Wert von IL-2- und IL-8-Konzentrationen in der multivariaten logistischen Regressionsanalyse. Der geringe Stichprobenumfang schränkt die Aussagekraft der Regressionsanalysen jedoch deutlich ein, weshalb die Ergebnisse in einer umfassenderen Untersuchung verifiziert werden sollten. Darüber hinaus ist die BALF das einzige Verfahren zum Ausschluss von erregerbedingten Infektionen bzw. Kolonisationen. Denn auch wenn klinisch keine oder nur milde Infektionszeichen vorliegen, ist die Anzahl der mikrobiologisch positiv getesteten BALF-Proben bei SSc-Patienten mit 23,8 % hoch [143]. Eine zusätzliche erregerbedingte Infektion oder chronische Besiedlung hat Einfluss auf das

Ansprechen therapeutischer Interventionen, die Krankheitsaktivität und auch auf die Krankheitsprognose.

Verlaufsbeobachtungen einer aktuellen Studie belegen, dass SSc-Patienten mit mikrobiologisch positiven BALF-Kulturen ein erhöhtes Risiko für eine schnellere Verschlechterung der Lungenfunktion haben [81]. Im Einklang damit stehen die Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchung, die bei hCMV-positiven im Vergleich zu hCMV-negativen SSc-Patienten neben erhöhten MCP-1-Konzentrationen auch einen erhöhten HR-CT-Score und reduzierte TLC-Werte ergaben. Zusätzlich gilt das hCMV nach der Hypothese des molekularen Mimikry als potentiell Fremdanigen, das die Bildung spezifischer Autoantikörper induzieren und damit wesentlich an der Pathogenese der SSc beteiligt sein könnte [4, 66]. Ob der positive Infektionsnachweis ursächlich für die eingeschränkte Lungenfunktion ist, oder ob sich die Infektion bei SSc-Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf häufiger manifestiert, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht beurteilen. Darüber hinaus wurden andere potentielle Infektionen/Kolonisationen des unteren Respirationstraktes, beispielsweise mit *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Haemophilus* oder *Neisseria* spp., nicht ausgeschlossen und sollten in weiterführenden Untersuchungen berücksichtigt werden.

Zusätzlich muss in der Diskussion über den Stellenwert der BALF auch der oftmals jahrelange Krankheitsverlauf einer SSc berücksichtigt werden. Zum einen kann mittels BALF eine pulmonale Beteiligung in (sehr) frühen Krankheitsstadien erkannt werden, die noch kein bildmorphologisches Korrelat zeigt. Zum anderen entsprechen die in späteren Krankheitsstadien auftretenden spezifischen HR-CT-Befunde, wie beispielsweise die Honigwabenstruktur, irreversiblen und damit persistierenden Lungengerüstveränderungen mit Zerstörung der physiologischen Lungenarchitektur [81]. Zur Festlegung der Dauer oder zur Einschätzung des Erfolges einer immunsuppressiven Therapie müssen also Kriterien definiert werden, die unabhängig von der Bildgebung sind. Dafür scheinen BALF-Ergebnisse und insbesondere die Bestimmung von Zytokinkonzentrationen ein geeignetes Instrument. Letztlich gilt es, eine Alveolitis sensitiv und spezifisch zu diagnostizieren, denn eine unbehandelte Alveolitis ist mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion und mit einer erhöhten Mortalität verbunden [143]. Voraussetzung für aussagekräftige und damit auch für therapierelevante BALF-Untersuchungen ist, unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Ergebnisse, neben der histologischen und mikrobiologischen Analyse auch die Bestimmung von Zytokin- und Chemokinkonzentrationen.

## 5 Zusammenfassung

Die SSc gehört zu den seltenen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, bei der sich typischerweise eine gesteigerte Produktion von EZM, eine endotheliale Dysfunktion sowie eine veränderte Immunantwort nachweisen lässt. Die SSc wird als eine Multisystemerkrankung des Bindegewebes mit autoimmunologischem Hintergrund verstanden, deren Ätiologie bislang unklar ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zytokin- und Chemokinkonzentrationen im Serum und in der BALF von SSc-Patienten, Kontrollpatienten und gesunden Spendern gemessen und untereinander sowie mit klinischen Parametern in Beziehung gesetzt, mit dem Ziel, Zytokine zu identifizieren, die eine Schlüsselstellung in der Ätiologie und in der Pathogenese der SSc innehaben. Weiterhin wurde nach Korrelationen zwischen Zytokinkonzentrationen und SSc-assoziierten Lungenveränderungen geforscht. Mit Verlaufsuntersuchungen sollte zusätzlich eine Aussage über den prädiktiven Wert von Zytokinkonzentrationen für die Entwicklung der Lungenfunktion getroffen werden.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit konnten spezifische Veränderungen im Zytokinnetzwerk sowohl in der BALF als auch im Serum von SSc-Patienten nachgewiesen werden. Es wurden Schlüsselzytokine wie MCP-1 und IL-8 identifiziert, die mit einer Lungenfibrose assoziiert sind und mit deren Hilfe eine Verschlechterung der SSc-assoziierten ILD vorausgesagt werden kann. Es wurde eine Assoziation von Zytokinen und Lungenfunktionsparametern deutlich. Eindrucksvoll und bislang nicht beschrieben ist die Assoziation von erhöhten Zytokinspiegeln in der BALF und dem Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak- bzw. Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak-Status bei SSc-Patienten mit der Verschlechterung einer ILD bzw. die Entwicklung einer Lungenerkrankung im Endstadium. Damit erlangen einerseits BALF-Zytokinkonzentrationen einen prognostischen Stellenwert und andererseits die BALF als Untersuchungsverfahren eine klinische Bedeutung, die über die Diagnostik spezifischer Lungenveränderungen hinausreicht.

In Zusammenschau der hier vorgestellten Ergebnisse sind MCP-1 und IL-8 sowie Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak bzw. Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak viel versprechende Kandidaten für eine kausale „targeted therapy“ in der Behandlung der SSc. Diese Zytokine könnten perspektivisch als Krankheitsmarker sowohl für die Diagnose als auch als Verlaufsparameter oder als Prognosefaktoren etabliert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Meyer O. Prognostic markers for systemic sclerosis. *Joint Bone Spine*. 2006;73:490-4.
2. Kawaguchi Y, McCarthy SA, Watkins SC, Wright TM. Autocrine activation by interleukin 1alpha induces the fibrogenic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts. *J Rheumatol*. 2004;31:1946-54.
3. Zuber JP, Spertini F. Immunological basis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006;45:iii23-5.
4. Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev*. 2003;2:181-91.
5. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PLoS Med*. 2006;3:e2.
6. Varga J, Abraham D. Systemic Sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557-67
7. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum*. 1980;23:581-90.
8. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets, and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15:202-5.
9. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28:1573-6.
10. Medsger TA Jr, Masi AT. Epidemiology of systemic sclerosis. *Ann Intern Med*. 1971;74:714-12.
11. Maricq HR, Weinrich MC, Keil JE, et al. Prevalence of scleroderma spectrum disorders in the general population of South Carolina. *Arthritis Rheum*. 1998;32:998-1006.
12. Mayes MD. Scleroderma epidemiology. *Rheum Dis Clin North Am*. 2003;29:239-54.
13. Mayes MD, Lacey JV Jr, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2246-55.
14. Steen VD, Oddis CV, Conte CG, Janoski J, Casterline GZ, Medsger TA JR. Incidence of systemic sclerosis in Allegheny County, Pennsylvania. A twenty-year study of hospital-diagnosed cases, 1963-1982. *Arthritis Rheum*. 1997;40:441-5.

15. Arnett FC, Howard RF, Tan FK, Moulds JM, Bias WB, Durban E. Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma: association with an Amerindian HLA haplotype. *Arthritis Rheum.* 1996;39:1362-70.
16. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, et al. The registry of the German network for systemic scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford).* 2008;47:1185-92.
17. Herold G. *Innere Medizin.* Köln: Eigenverlag; 2006.
18. White B. Immunopathogenesis of systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996;22:695-708.
19. LeRoy EC. Systemic sclerosis: a vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am.* 1996;22:675-94.
20. Trojanowska M, LeRoy EC, Eckes B, Krieg T. Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *J Mol Med.* 1998;76:266-74.
21. Selman M, King TE, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med.* 2001;134:136-51.
22. Kissin EY, Korn JH. Fibrosis in scleroderma. *Rheum Dis Clin North Am.* 2003;29:351-69.
23. Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med.* 1979;149:1326-35.
24. Kahllaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16:718-22.
25. Malcarne VL, Hansdottir I, McKinney A, et al. Medical signs and symptoms associated with disability, pain, and psychosocial adjustment in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2007;34:359-67.
26. Krieg T, Hunzelmann N. Aktuelle pathophysiologische Aspekte der systemischen Sklerose. *Z Rheumatol.* 2006;65:275-78.
27. Kuryliszyn-Moskal A, Klimiuk PA, Sierakowski S. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1, sE-selectin), vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelin-1 in patients with systemic sclerosis: relationship to organ systemic involvement. *Clin Rheumatol.* 2005;24:111-6.
28. Kawaguchi Y, Suzuki K, Hara M, et al. Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 1994;53:506-10.

29. Garnarczyk A, Jurzak M, Gojniczek K. Characteristic of the endogenous peptides-endothelins and their role in the connective tissue fibrosis. *Wiad Lek.* 2008;61:126-34.
30. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, et al. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum.* 2004;50:216-26.
31. Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation.* 2003;108:1499-505.
32. Fagundus DM, Leroy EC. Cytokines and systemic sclerosis. *Clin Dermatol.* 1994;12:407-17.
33. Postlethwaite AE. Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 1995;7:535-40.
34. Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA Jr, Rodnan GP. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum.* 1984;27:645-53.
35. Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, Lu S, Jimenez SA, Platsoucas CD. Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Immunol.* 2002;168:3649-59.
36. Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and its Receptor, CCR-2, in the Pathogenesis of Bleomycin-Induced Scleroderma. *J Invest Dermatol.* 2003;121:510-516.
37. Scala E, Pallotta S, Frezzolini A, et al. Cytokine and chemokine levels in systemic sclerosis: relationship with cutaneous and internal organ involvement. *Clin Exp Immunol.* 2004;138:540-6.
38. Hasegawa M, Sato S, Takehara K. augmented production of chemokines (monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) and MIP-1 $\beta$ ) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP1 $\alpha$  may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol.* 1999;117:159-165.
39. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci.* 2001;27:140-6.
40. Sakkas LI, Platsoucas CD. Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheum.* 2004;50:1721-33.
41. Mattuzzi S, Barbi S, Carletto A, et al. Association of polymorphisms in the IL1B and IL2 genes with susceptibility and severity of systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2007;34:997-1004.

42. Granel B, Chevillard C, Allanore Y, et al. Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics*. 2006;58:693-9.
43. Smith RE, Strieter RM, Zhang K, et al. A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol*. 1995;57:782-7.
44. Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis. *Arthritis Rheum*. 2001;44:2665-78.
45. Fujii H, Hasegawa M, Takehara K, Mukaida N, Sato S. abnormal expression of intracellular cytokines and chemokine receptors in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*. 2002;130:548-56.
46. Gruschwitz M, Sepp N, Kofler H, Wick G. Expression of class II-MHC antigens in the dermis of patients with progressive systemic sclerosis. *Immunobiology*. 1991;182:234-55.
47. Gruschwitz MS, Vieth G. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor alpha in the early disease stage. *Arthritis Rheum*. 1997;40:540-50.
48. Mavalua C, Scaletti C, Romagnani P, et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol*. 1997;151:1751-8.
49. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:583-94.
50. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 1997;24:328-32.
51. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum tumor necrosis factor-alpha levels in patients with systemic sclerosis: association with pulmonary fibrosis. *J Rheumatol*. 1997;24:663-5.
52. Sato S, Hanakawa H, Hasegawa M, et al. Levels of interleukin 12, a cytokine of type 1 helper T cells, are elevated in sera from patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2000;27:2838-42.
53. Yamamoto T. The bleomycin-induced scleroderma model: what have we learned for scleroderma pathogenesis? *Arch Dermatol Res*. 2006;297:333-44.
54. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;85:9-18.

55. Nakazawa M, Sugi N, Kawaguchi H, Ishii N, Nakajima H, Minami M. Predominance of type 2 cytokine-producing CD4+ and CD8+ cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;99:673-82.
56. Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol.* 1995;12:187-99.
57. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol.* 2004;41:1123-33.
58. Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, et al. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest.* 2005;115:3072-82.
59. Mierau R, Genth E. Sklerodermie-assoziierte Autoantikörper - klinische und diagnostische Relevanz. *Z Rheumatol.* 2006;65:279-84.
60. Worda M, Sgonc R, Dietrich H, et al. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2605-14.
61. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2550-62.
62. Weiner ES, Hildebrandt S, Senécal JL, et al. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum.* 1991;34:68-77.
63. Hu PQ, Fertig N, Medsger TA Jr, Wright TM. Correlation of serum anti-DNA topoisomerase I antibody levels with disease severity and activity in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1363-73.
64. Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Kawakami Y, Tojo T. Longitudinal analysis of autoantibody response to topoisomerase I in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:1074-84.
65. Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:778-84.
66. Pandey JP, LeRoy EC. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:10-5.
67. Namboodiri AM, Rocca KM, Pandey JP. IgG antibodies to human cytomegalovirus late protein UL94 in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity.* 2004;37:241-4.

68. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *PloS Med.* 2006;3:e2.
69. Lunardi C, Bason C, Navone R, et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med.* 2000;6:1183-6.
70. Inkinen K, Soots A, Krogerus L, Loginov R, Bruggeman C, Lautenschlager I. Cytomegalovirus enhance expression of growth factors during the development of chronic allograft nephropathy in rats. *Transpl Int.* 2005;18:743-9.
71. Johnson RW, Tew MB, Arnett FC. The genetics of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 2002;4:99-107.
72. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1359-62.
73. Feghali-Bostwick C, Medsger TA Jr, Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;48:1956-63.
74. Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, et al. The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum.* 2004;50:558-64.
75. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:678-81.
76. Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12:520-6.
77. Cárđaba B, del Pozo V, Gallardo S, Palomino P, Posada M, Lahoz C. Genetic approaches in the understanding of Toxic Oil Syndrome. *Toxicol Lett.* 2006;161:83-8.
78. Maloney S, Smith A, Furst DE, et al. Microchimerism of maternal origin persists into adult life. *J Clin Invest.* 1999;104:41-7.
79. Artlett CM, Smith JB, Jimenez SA. Identification of fetal DNA and cells in skin lesions from women with systemic sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338:1186-91.
80. Warrick JH, Bhalla M, Schabel SI, Silver RM. High resolution computed tomography in early scleroderma lung disease. *J Rheumatol.* 1991;18:1520-8.
81. Goldin JG, Lynch Da, Strollo DC, et al. High-resolution CT scan findings in patients with symptomatic scleroderma-related interstitial lung disease. *Chest.* 2008;134:358-67.

82. Strange C, Bolster MB, Roth MD, et al. Bronchoalveolar lavage and response to cyclophosphamide in scleroderma interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:91-8.
83. Meloni F, Caporali R, Marone Bianco A, et al. BAL cytokine profile in different interstitial lung diseases: a focus on systemic sclerosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2004;12:111-8.
84. Pantelidis P, Southcott AM, Black CM, Du Bois RM. Up-regulation of IL-8 secretion by alveolar macrophages from patients with fibrosing alveolitis: a Subpopulation analysis. *Clin Exp Immunol.* 1997;108:95-104.
85. Goh NS, Veeraraghavan S, Desai SR, et al. Bronchoalveolar Lavage cellular profiles in patients with systemic sclerosis-associated interstitial lung disease are not predictive of disease progression. *Arthritis Rheum.* 2007;56:2005-12.
86. Goh NS, Desai SR, Veeraraghavan S, et al. Interstitial lung disease in systemic sclerosis: a simple staging system. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1248-54.
87. Clements PJ, Roth MD, Elashoff R, et al. Scleroderma lung study (SLS): differences in the presentation and course of patients with limited versus diffuse systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2007;66:1641-7.
88. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, et al. Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:952-3.
89. Khanna D, Furst DE, Clements PJ, Tashkin DP, Eckman MH. Oral Cyclophosphamide for Active Scleroderma Lung Disease: A Decision Analysis. *Med Decis Making.* 2008;28:926-37.
90. Costabel U. German Society of Pneumology. Recommendations for diagnostic bronchoalveolar lavage. *Pneumologie.* 1993;47:607-19.
91. Rook AH, Freundlich B, Jegasothy BV, et al. Treatment of systemic sclerosis with extracorporeal photochemotherapy: results of a multicenter trial. *Arch Dermatol.* 1992;128:337-46.
92. Häussinger K, Ballin A, Becker HD, et al. Recommendations for quality standards in bronchoscopy. *Pneumologie.* 2004;58:344-56.
93. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142:481-6.
94. Krause A, Hohberg B, Heine F, John M, Burmester GR, Witt C. Cytokines derived from alveolar macrophages induce fever after bronchoscopy and bronchoalveolar lavage. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;155:1793-7.

95. Robinson BW, Rose AH, James A, Whitaker D, Musk AW. Alveolitis of pulmonary asbestosis. Bronchoalveolar lavage studies in crocidolite- and chrysotile-exposed individuals. *Chest*. 1986;90:396-402.
96. EP-Patent 06 01 6296.3. Method for diagnosis of a disease involving an anti-AT1-receptor antibody.
97. EP-Patent 06 01 6297. Method for diagnosis of a disease involving an anti-endothelin-receptor antibody.
98. Brennan P, Silman A, Black C, et al. Reliability of skin involvement measures in scleroderma. The UK Scleroderma Study Group. *Br J Rheumatol*. 1992;31:457-60.
99. Galie N, Torbicki A, Barst R, et al. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2004;25:2243-78.
100. Olschewski H, Hoeper MM, Borst MM, et al. Diagnosis and therapy of chronic pulmonary hypertension. *Pneumologie*. 2006;60:749-71.
101. Denton CP, Cailles JB, Phillips GD, Wells AU, Black CM, Bois RM. Comparison of Doppler echocardiography and right heart catheterization to assess pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Br J Rheumatol*. 1997;36:239-43.
102. Meloni F, Caporali R, Marone Bianco A, et al. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage in systemic sclerosis with interstitial lung disease: comparison with usual interstitial pneumonia. *Ann Rheum Dis*. 2004;63:892-4.
103. Yamamoto T. potential roles of CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 in the pathogenesis of cutaneous sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21:369-75.
104. Yoshimura T, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Adv Exp Med Biol*. 1991;305:47-56.
105. Ferreira AM, Takagawa S, Fresco R, Xiaofeng Z, Varga J, DiPietra LA. Diminished Induction of skin Fibrosis in mice with MCP-1 Deficiency. *J Clin Invest*. 2007;117:557-67.
106. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, et al. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1999;90:772-9.
107. Antoniades HN, Neville-Golden J, Galanopoulos T, Kradin RL, Valente AJ, Graves DT. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:5371-5.
108. Stahl RA, Thaiss F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schlöndorff D. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1993;44:1036-47.

109. Salmeri FM, Sofo V, Andò FG, et al. Imbalance of serum cytokine network in sarcoid patients: index of sarcoidosis relapse? *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2003;20:53-61.
110. Kimura M, Kawahito Y, Hamaguchi M, et al. SKL-2841, a dual antagonist of MCP-1 and MIP-1 beta, prevents bleomycin-induced skin sclerosis in mice. *Biomed Pharmacother.* 2007;61:222-8.
111. Moore BB, Paine R 3rd, Christensen PJ, et al. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol.* 2001;167:4368-77.
112. Distler JH, Jünger A, Caretto D, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells. *Arthritis Rheum.* 2006;54:214-25.
113. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med.* 1997;185:1371-80.
114. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol.* 1999;276:L814-L824.
115. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol.* 2006;33:275-84.
116. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1350-8.
117. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, Krieg T. New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma. *Curr Rheumatol Rep.* 2007;9:136-43.
118. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005;13:7-12.
119. Yamamoto T, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. V: Increased expression of alpha-smooth muscle actin in fibroblastic cells in bleomycin-induced scleroderma. *Clin Immunol.* 2002;102:77-83.
120. Wang Q, Wang Y, Hyde DM, et al. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters. *Thorax.* 1999;54:805-12.
121. Kolb M, Schmidt M. The role of cytokines and growth factors in fibroproliferative lung disease. *Pneumologie.* 2003;57:91-7.

- 122.Khalil N, Parekh TV, O'Connor R, et al. Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax*. 2001;56:907-15.
- 123.Southcott AM, Jones KP, Li D, et al. Interleukin-8. Differential expression in lone fibrosing alveolitis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1604-12.
- 124.Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T, Fujimoto M, Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. *Dermatology*. 2003;207:141-7.
- 125.Lee EB, Zhao J, Kim JY, Xiong M, Song YW. Evidence of potential interaction of chemokine genes in susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2443-8.
- 126.Renzoni E, Lympny P, Sestini P, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:1633-40.
- 127.Furuse S, Fujii H, Kaburagi Y, et al. Serum concentrations of the CXC chemokines interleukin 8 and growth-regulated oncogene-alpha are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2003;30:1524-8.
- 128.Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201:233-40.
- 129.Romagnani S. Human Th17 cells. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:206.
- 130.Chen Z, Tato CM, Muul L, Laurence A, O'Shea JJ. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum*. 2007;56:2936-46.
- 131.Taniyama Y, Morishita R, Nakagami H, et al. Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamsters. *Circulation*. 2000;102:246-52.
- 132.Junaid A, Rosenberg ME, Hostetter TH. Interaction of angiotensin II and TGF-beta 1 in the rat remnant kidney. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1732-8.
- 133.Klings ES, Farber HW. IV epoprostenol for systemic sclerosis. *Chest*. 2000;118:881-2.
- 134.Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, et al. Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2002;346:896-903.
- 135.Stein CM, Tanner SB, Awad JA, Roberts LJ 2nd, Morrow JD. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis Rheum*. 1996;39:1146-50.

136. Jurewicz M, McDermott DH, Sechler JM, et al. Human T and natural killer cells possess a functional renin-angiotensin system: further mechanisms of angiotensin II-induced inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18:1093-102.
137. Gleicher N, Barad D, Weghofer A. Functional autoantibodies, a new paradigm in autoimmunity? *Autoimmun Rev.* 2007;7:42-5.
138. Rustin MH, Almond NE, Beacham JA, et al. The effect of captopril on cutaneous blood flow in patients with primary Raynaud's phenomenon. *Br J Dermatol.* 1987;117:751-8.
139. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med.* 2008;14:855-62.
140. Miller KS, Smith EA, Kinsella M, Schabel SI, Silver RM. Lung disease associated with progressive systemic sclerosis. Assessment of interlobar variation by bronchoalveolar lavage and comparison with noninvasive evaluation of disease activity. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141:301-6.
141. Agusti C, Xaubet A, Luburich P, Ayuso MC, Roca J, Rodriguez-Roisin R. Computed tomography-guided bronchoalveolar lavage in idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax.* 1996;51:841-5.
142. Clements PJ, Goldin JG, Kleerup EC, et al. Regional differences in bronchoalveolar lavage and thoracic high-resolution computed tomography results in dyspneic patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2004;50:1909-17.
143. De Santis M, Bosello S, La Torre G, et al. Functional, radiological and biological markers of alveolitis and infections of the lower respiratory tract in patients with systemic sclerosis. *Respir Res.* 2005;6:96.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ein besonderer Dank gilt:

- **PD Dr. med. G. Riemekasten** für die Überlassung des Themas, die Betreuung, Einarbeitung und Zusammenarbeit in dieser Zeit
- **Dr. Dr. K. Egerer** und den Mitarbeitern des Routinelabors der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie für die Bestimmung der ACA, ANA und Anti-Scl-70-Ak
- **Prof. Dr. med. C. Witt** und seinen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie für die Durchführung der Lungenfunktion und der BALF
- **Dr. med. S. Meier** aus dem Institut für Radiologie für die Befundung der HR-CT-Lungenaufnahmen
- **Dr. med. L. Hanitsch, Dr. med. U. Schneider** und **C. Brückner** für die Erhebung der klinischen Daten und die Organisation der bronchoskopischen Untersuchungen
- **Dr. med. C. Meisel** aus dem Institut für medizinische Immunologie für die Differenzierung der BALF
- **L. Martinez-Gamboa** für die Einarbeitung in die Grundlagen der Laborarbeit und die nötigen Arbeitstechniken
- **D. Huscher** aus dem German Rheumatology Research Center für die Beratung und Unterstützung bei der statistischen Auswertung
- der **Firma CellTrend Luckenwalde** für die Bestimmung der Anti-AT<sub>1</sub>-R-Ak und der Anti-ET<sub>A</sub>-R-Ak

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und allen Freunden, die mich motiviert und unterstützt und so zur Fertigstellung dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

## **8 Lebenslauf**

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

## Erklärung

„Ich, Katrin Schmidt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Zytokinkonzentrationen im Serum und in der bronchoalveolären Flüssigkeit als Marker der Pathogenese und Prognose bei systemischer Sklerose** 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