

Aus der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Calprotectin bei DMARD (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug)
-naiver früher rheumatoider Arthritis als Aktivitäts- und Verlaufsmarker unter Therapie

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité-Universitätsmedizin Berlin

Von Raisa Krasnitski

aus Leningrad (St. Petersburg)

Datum der Promotion: 05.03.2021

Meiner Mutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT.....	3
1. EINLEITUNG.....	5
1.1. Pathogenese der rheumatoiden Arthritis	5
1.2. Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis	7
1.3. Klinik der frühen rheumatoiden Arthritis.....	8
1.4. Diagnosestellung und Klassifikationskriterien zur rheumatoiden Arthritis.....	8
1.5. Prognose und Verlauf einer rheumatoiden Arthritis	11
1.6. Messinstrumente zur Bestimmung der Krankheitsaktivität	12
einer rheumatoiden Arthritis.....	12
1.6.1. DAS28 (Disease Activity Score 28 Gelenke).....	12
1.6.2. SDAI (Simplified Disease Activity Index) / CDAI (Clinical Disease Activity Index)	13
1.6.3. HAQ (Health Assessment Questionnaire)	14
1.6.4. ACR 20/50/70- Kriterien (American College of Rheumatology- Kriterien).....	14
1.7. Aktivitätsmarker bei rheumatoider Arthritis	15
1.8. Calprotectin als Aktivitäts- und Verlaufsmarker der frühen rheumatoiden Arthritis.....	16
1.8.1. Calprotectin - Aufbau, Funktion, Freisetzung	16
1.8.2. Bedeutung von Calprotectin bei der Entwicklung einer	22
rheumatoiden Arthritis	22
1.9. Antikörper gegen acetylierte Proteine (AAPA).....	24
1.10. Zielsetzung.....	26
2. MATERIAL UND METHODEN	28
2.1. Allgemeine Charakterisierung des Patientenkollektivs	29
2.2. Ein- und Ausschlusskriterien.....	30
2.3. Calprotectinbestimmung	31
2.3.1. Funktionsweise des ELISA zur Messung des Serum-Calprotectin	31
2.3.2. Assaydurchführung – Fließschema zur Durchführung eines Calprotectin-ELISA	33
2.4. ELISA zur Bestimmung von AAPA (Antikörper gegen acetyliertes Lysin).....	34
2.5. Ermittlung des Cut-off-Werts des Calprotectin.....	35
2.6. STATISTISCHE ANALYSE	36
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1. Ermittlung des Cut-off-Wertes von Calprotectin und Anwendung auf das Patientenkollektiv.....	38
3.2. Ausgangswerte	39

3.2.1. Überprüfung der Normalverteilung der Ausgangswerte	41
3.3. Verlaufsbeschreibung des Calprotectin	43
3.3.1. Verhalten des Calprotectin bei NSAR bzw. Prednisoloneinnahme	51
3.3.2. Calprotectinkonzentration bezüglich DAS28-Responder/ Non-Responder	53
3.3.3. Überprüfung der Calprotectinkonzentration nach Serologie.....	54
3.4. Korrelationen mit den unterschiedlichen Aktivitätsparametern bzw.	55
Aktivitätsscores.....	55
3.4.1. Korrelation Calprotectin mit BSG.....	55
3.4.2. Korrelation Calprotectin mit CRP	59
3.4.3. Korrelation Calprotectin mit DAS28	63
3.4.4. Korrelation Calprotectin mit TJC/SJC	67
3.4.5. Korrelation Calprotectin mit SDAI/CDAI	69
3.4.6. Korrelation mit HAQ-Index.....	72
3.4.7. Korrelation mit ACR20/50/70.....	77
3.4.8. Korrelation mit Kontrollgruppe (Acetyliertes Lysin, inverses Lysin, Ornithin)	82
4. DISKUSSION	88
4.1. Diskussion der Methodik.....	88
4.1.1. Kritische Beurteilung des Patientenkollektivs	88
4.1.2. Kritische Überprüfung des ELISA-Verfahrens	91
4.2. Ergebnisdiskussion	92
4.3. Bewertung der Limitation und methodischen Einschränkungen	102
4.3.1. in Hinblick auf das Patientenkollektiv	102
4.3.2. in Hinblick auf die Testmethodik.....	103
5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	104
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	106
EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	119
LEBENS LAUF	120
DANKSAGUNG	121

Tabellenverzeichnis

Tab.1 Vergleich von ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA.....	10
Tab. 2 EULAR Response Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens nach (Fransen and van Riel, 2009)	13
Tab.3 Geschlechter- und Altersverteilung der rekrutierten Patienten	39
Tab.4 Rauchverhalten des Patientenkollektivs	39
Tab.5 Serologische Verteilung innerhalb des Patientenkollektivs	40
Tab.6 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest.....	41
Tab.7 Deskriptive Statistik von DAS28 und HAQ zu Zeitpunkt 0	42
Tab.8 Levene-Test zur Prüfung der Unterschiede der Varianzen bei DAS28 und HAQ zum Zeitpunkt 0.	42
Tab.9 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede in beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich Calprotectinserumkonzentrationswerte, CRP und BSG zum Zeitpunkt 0	43
Tab. 10 Deskriptive Statistik der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48 (ADA+MTX= Adalimumab + Methotrexat; MTX = Methotrexat).....	43
Tab.11 Levene-Test zur Überprüfung der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie die Calprotectinserumkonzentrationmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48	45
Tab. 12 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48.	46
Tab.13 Anzahl der Patientenseren mit Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) im Serum zwischen 0 und 50 $\mu\text{g/ml}$	50
Tab.14 Anzahl der Patientenseren mit Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) unter 5,3 $\mu\text{g/ml}$	50
Tab.15 Calprotectinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 bei NSAR- und keiner NSAR-Einnahme.	51
Tab.16 Calprotectinkonzentration zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 bei Prednisolon - und keiner Prednisolon -Einnahme	52
Tab.17 Calprotectinkonzentration zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 unterteilt nach DAS28-Respondern und Non-Respondern	53
Tab.18 Calprotectinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) unterteilt nach Serologie	54
Tab.19 Spearman-Rho-Test zwischen Calprotectinserumkonzentration ($\mu\text{g/ml}$, Calprotectinkonz Δ Woche 0-24,24-48) und BSG- Werten(mm/h)	56
Tab.20 Deskriptive Statistik des BSG-Konzentration.....	57
Tab.21 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie des BSG zu Woche 0, 24 und 48	59

Tab.22 Spearman-Rho-Test auf relevante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und CRP- Konzentrationen (mg/dl) im Wochenintervall 0-24 und Woche 24-48	60
Tab.24 Deskriptive Statistik der CRP-Konzentration im Wochenintervall 0-24 und 24-48 unterteilt in Therapiegruppen (ADA+ MTX= Adalimumab+ MTX vs. MTX Monotherapie).....	61
Tab.25 Deskriptive Statistik der DAS28-Werte	64
Tab.26 Kolmogorov-Smirnov-Test des DAS28 zum Zeitpunkt Woche 0, Woche 24 und Woche 48 (ADA+MTX = Adalimumab + Methotrexat).	65
Tab.27 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) zu Woche 0,24 und 48 und DAS28-Index zu Woche 0,24 und 48.....	66
Tab.28 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie des DAS28 zu Woche 0,24 und 48.....	67
Tab.29 Deskriptive Statistik der druckschmerzhaften (tender joints) und geschwollenen Gelenke (swollen joints) zu Woche 0 und Woche 24	67
Tab.30 Spearman-Rho-Test auf relevante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den druckschmerzhaften (tender joints) und geschwollenen Gelenke (swollen joints) zu Woche 0, 24 und 48	68
Tab.31 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den Tender Joints und Swollen Joints	69
Tab.32 Deskriptive Statistik der SDAI- Werte zu Woche 0 und 24	69
Tab.33 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den SDAI- Werten zu Woche 0 und 24	70
Tab.34 Deskriptive Statistik der CDAI- Werte zu Woche 0 und 24	71
Tab.35 Spearman-Rho- Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den CDAI Werten zu Woche 0 und 24.....	71
Tab.36 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den CDAI Werten zu Woche 0 und 24	72
Tab.37 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den SDAI Werten zu Woche 0 und 24.....	72
Tab.38 Deskriptive Statistik der HAQ-Index zu Woche 0, 24 und 48 unterteilt in Therapiegruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX- Monotherapie)	73
Tab.39 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und den HAQ- Index zu Woche 0, 24 und 48.....	75

Tab.40 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und den HAQ Werten zu Woche 0, 24 und 40.	75
Tab.41 Kreuztabelle bzgl. ACR20-Response in den Therapiegruppen.	77
Tab.42 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR20-Kriterien von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)	77
Tab.43 Kreuztabelle bzgl. ACR50-Response in den Therapiegruppen.	78
Tab.44 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR50-Response (Adalimumab + MTX vs. MTX)	78
Tab.45 Kreuztabelle bzgl. ACR70-Response in den Therapiegruppen	79
Tab.46 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR70-Response von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)	79
Tab.47 Kreuztabelle bzgl. ACR20-Response in den Therapiegruppen zu Woche 48.	80
Tab.48 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR20-Response von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)	80
Tab.49 Kreuztabelle bzgl. ACR50- Response in den Therapiegruppen zu Woche 48.	81
Tab.50 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR50-Response von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)	81
Tab.51 Kreuztabelle bzgl. ACR70- Response in den Therapiegruppen zu Woche 48.	82
Tab.52 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR70-Response der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)	82
Tab.53 Deskriptive Statistik Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin) 0 und 24.....	83
Tab.54 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationenmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$, Calprotectinkonz M0/M24) und Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin) 0 und 24	85
Tab.55 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin) 0 und 24	85
Tab.56 Verteilung der AAPAs unterteilt nach Serologie	86

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Farbband-Diagramm eines S100A8 (grün) und S100A9 (gelb) Heterodimer	17
Abb. 2 Funktion des Calprotectin auf intrazellulärer Ebene und mögliche Einbeziehung in die Pathogenese der RA	19
Abb.3 Effekte des Calprotectin auf die Zellen, die an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind (Ometto et al., 2017).....	21
Abb.4 Studiendesign der HIT-Hard-Studie (Detert et al., 2013).....	29
Abb. 5 Sandwich- ELISA-Verfahren zur Detektierung des Calprotectin in Patientenseren.	32
Abb.6 ELISA-Fließschema	33
Abb.7 Indirektes ELISA-Verfahren AAPA modifiziert nach (Finkemeier and Schwarzer, 2013).	35
Abb.8 ROC (Receiver Operating Characteristic) der Calprotectinbestimmung im Serum ($\mu\text{g/ml}$).....	38
Abb. 9 Änderung der Serumkonzentration von Calprotectin bei RA-Patienten.....	47
Abb.10 Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) zusammengefasst bei beiden Behandlungsgruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX) im Verlauf bei Respondern.....	48
Abb. 11 Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) zusammengefasst bei beiden Behandlungsgruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX) im Verlauf bei Non-Respondern	48
Abb. 12 Serumkonzentrationen von Calprotectin bei RA-Patienten in zwei unterschiedlichen Therapiegruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX-Monotherapie).....	49
Abb. 13: Änderung des BSG-Werts (mm/h) bei RA-Patienten unterteilt in die beiden Therapiegruppen (Adalimumab/MTX vs. MTX).....	58
Abb. 14: Änderung in der Serumkonzentration von CRP in mg/dl bei RA-Patienten unterteilt in die beiden Therapiegruppen (Adalimumab/MTX vs. MTX)	62
Abb. 15: Zusammenfassende Darstellung der Verläufe verschiedener Parameter	63
Abb.16. Boxplot Verlauf von Calprotectin im Vergleich zu SDAI.....	70
Abb 17: HAQ- Index bei ausgewählten RA-Patienten der HIT-Hard-Studie.	74
Abb.18: Abbildung zum Verlauf der DAS28- und HAQ- Werte in beiden Therapiegruppen.	76
Abb.19 Titeränderung der untersuchten AAPA	84
Abb. 20 Calprotectinkonzentrationsänderung und Titeränderung der AAPA im Verlauf von 24 Wochen.	86

Abkürzungsverzeichnis

AAPA	Antikörpern gegen acetylierte Proteine
ACPA	engl. anti citrullinated protein antibodies
ACR	American Rheumatism Association
ADA	Adalimumab
Anti-MCV	Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CCP	zyklisch citrullinierte Peptide
CD11b/18	cluster of differentiation molecule 11B/18
CDAI	clinical Disease Activity Index
CRP	C-reaktive Protein
DAMPS	damage-associated molecular pattern molecules
DAS28	Disease Activity Score
DF	Anzahl der Freiheitsgrade
DMARD	Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent Assay
EULAR	European League Against Rheumatism
HAQ	Health Assessment Questionnaire,
HAQ-DI	HAQ Disability Index
HC50IgG	Ornithin
HC55IgG	Lysin,
HC55invers	inverses Lysin
HIT- Hard-Studie	High-Induction Therapy with anti-rheumatic drugs-Studie

HLA-DRB1-Allel	Human Leukocyte Antigen
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
IBM SPSS	Statistik- und Analysesoftware
MBDA-Score	multi-biomarker disease activity
MCP	Metacarpophalangealgelenke
MCV	Mutiertes Citrulliniertes Vimentin
MRT	Magnetresonanztomographie
MRP	Macrophage inhibitory factor Related Protein
MTX	Methotrexat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
PIP	proximalen Interphalangealgelenke
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	receptor for advanced glycosylation end products
RANKL	„Receptor Activator of NF-κB Ligand“
RF	Rheumafaktor
ROC-Analyse	Receiver Operating Characteristic- Analyse
SDAI	Simplified Disease Activity Index
SJC	swollen joint count
SJIA	systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis
STD	standard deviation
T	empirische Prüfgröße des T-Tests
TH1-Zellen	Subgruppe der T-Helfer-Zellen

TJC	Tender joint count
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFalpha	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	Toll-like-Rezeptoren
VAS	Visuelle Analogskala

Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis ist die häufigste chronisch-entzündlich verlaufende Gelenkerkrankung. In der Pathogenese wird von einer systemischen Autoimmunerkrankung ausgegangen, die das angeborene und lernfähige Immunsystem einbezieht. Zur besseren Beurteilung der Krankheitsaktivität werden spezifische Biomarker benötigt. Calprotectin wird bereits bei der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (Holzinger et al., 2012) sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (von Roon et al., 2007) als zuverlässiger Krankheitsaktivitätsmarker in der klinischen Routine verwendet.

Einige Studien haben das Potential von Calprotectin als einen vielversprechenden Krankheitsaktivitäts- und Verlaufsmarker bei etablierter rheumatoider Arthritis beschrieben (Madland et al., 2002a)(Hammer et al., 2007) (Torgutalp et al., 2018). Angeregt durch diese Studienergebnisse, war es das Ziel dieser Arbeit, die Wertigkeit von Calprotectin als Aktivitäts- und Verlaufsmarker bei Patienten mit früher rheumatoider Arthritis, die noch keine Behandlung mit einem Basismedikament erhalten hatten, unter Therapie zu bestimmen. Ergänzend dazu wurde der Titerverlauf von Antikörpern gegen acetylierte Proteine (AAPAs) unter Therapie untersucht. AAPAs wurden bereits in einer Studie die Eigenschaft zugesprochen, als serologische Ergänzung bei seronegativen Patienten dienen zu können (Studenic et al., 2018). Jedoch wurde dieser Marker noch nicht ausführlich im Verlauf unter Therapie beobachtet. Die Untersuchung ist auf Basis von Patientenseren einer Früharthritiskohorte aus der kontrollierten klinischen Studie „HIT HARD“ erfolgt (Detert et al., 2013).

Methodik: Es wurde bei insgesamt 63 Patienten über einen Zeitraum von 48 Wochen die Konzentration von Calprotectin in Verlaufspalten untersucht. Die Patienten wurden dabei zwei Behandlungsgruppen zugeordnet: Zum einen der Kombinationstherapie Adalimumab mit Methotrexat (MTX, n=32) zum anderen der Monotherapiegruppe mit MTX (n=31). Die Patientengruppe mit der Kombinationstherapie erhielt ab der 24. Woche ebenfalls eine Monotherapie mit MTX. Diese Ergebnisse wurden innerhalb der Behandlungsgruppen verglichen und mit den vorhandenen Aktivitätsscores sowie -parametern zu den Zeitpunkten Tag 0, Woche 24 und 48 auf relevante Korrelationen überprüft.

Ergebnis: In beiden Behandlungsgruppen war ein deutlicher Abfall der Calprotectinserumwerte in den ersten 24 Wochen eingetreten (Adalimumab + MTX Tag 0= 23,35µg/ml +/-26,09 STD; Adalimumab + MTX Woche 24= 16,35µg/ml +/- 9,96 STD; MTX-Monotherapie Tag 0= 27,31µg/ml +/-35,48 STD; MTX-Monotherapie Woche 24= 14,7µg/ml +/- 7,98 STD). Normwerte wurden nur in ein wenigen Einzelfällen erreicht. Ebenso war keine relevante Korrelation zwischen Calprotectin und anderen Entzündungsparametern sowie Aktivitätsscores (DAS28) vorhanden. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der Behandlungsart konnten nicht gefunden werden. Im weiteren Verlauf zu Woche 48 konnten keine ausgeprägten Veränderungen der Calprotectinwerte verzeichnet werden.

Abstract

Rheumatoid arthritis is the most common chronic inflammatory joint disease. The pathogenesis is based on a systemic autoimmune disease involving the innate and adaptive immune system. Specific biomarkers are needed to better assess disease activity. Calprotectin is already used in systemic juvenile idiopathic arthritis (Holzinger et al. 2012) and in chronic inflammatory bowel diseases (von Roon et al. 2007) as a reliable disease activity marker in clinical routine.

Some studies have described the potential of calprotectin as a promising disease activity and progression marker in established rheumatoid arthritis (Madland et al. 2002) (Hammer et al. 2007) (Torgutalp et al. 2018). Inspired by these study results, the aim of this work was to determine the significance of calprotectin as an activity and progression marker in patients with early rheumatoid arthritis who had not yet received treatment with a disease modifying anti-rheumatic drug. In addition, the titer of antibodies against acetylated proteins (AAPAs) was investigated under therapy. In one study, AAPAs have already been described as an useful serological marker in seronegative patients (Studenic et al. 2018). However, this marker has not been sufficiently investigated in follow-up studies under therapy. The study was based on patient sera of an early arthritis cohort from the controlled clinical study "HIT HARD" (Detert et al. 2013).

Methods: The concentration of calprotectin in follow-up samples was investigated in 63 patients over a period of 48 weeks. The patients were assigned to two treatment groups: On the one hand the combination therapy adalimumab with methotrexate (MTX, n=32) and on the other hand the monotherapy group with MTX (n=31). The patient group with the combination therapy also received monotherapy with MTX from the 24th week onwards. These results were compared within the treatment groups and checked for relevant correlations with the existing activity scores and parameters at day 0, week 24 and 48.

Result: In both treatment groups there was a significant decrease in calprotectin serum values in the first 24 weeks (Adalimumab + MTX day 0= 23.35µg/ml +/-26.09 STD; Adalimumab+ MTX week 24= 16.35µg/ml+/- 9.96 STD; MTX monotherapy day 0=

27.31 μ g/ml \pm 35.48 STD; MTX monotherapy week 24= 14.7 μ g/ml \pm 7.98 STD). Normal values were only achieved in few cases. Likewise, there was no relevant correlation between calprotectin and other inflammatory parameters and activity scores (DAS28). No significant difference was found between the treatment arms. No pronounced changes in calprotectin levels were observed during the rest of week 48.

1. Einleitung

In den letzten Jahren ist der Anteil an Patienten, bei denen eine frühe rheumatoide Arthritis (RA) diagnostiziert wurde, in der Bevölkerung gestiegen. Dies liegt unter anderem an der Bedeutung einer frühzeitigen Therapieeinleitung zur Verbesserung der Prognose. Dadurch können irreversible Gelenkveränderungen und die damit verbundenen funktionellen Einschränkungen verhindert werden (Quinn et al., 2001). Neben der körperlichen Untersuchung (Anzahl der schmerzhaften/geschwollenen Gelenke), der Krankheitseinschätzung durch den Patienten sowie des Arztes und der Bestimmung von Entzündungsparametern wie CRP/BSG fehlt es weiterhin an objektiven Aktivitäts- und Verlaufsmarkern. Vor dem Hintergrund, dass CRP-Werte nicht ausreichend eine Krankheitsaktivität widerspiegeln können, ist das Protein Calprotectin näher in den Fokus gerückt (Hurnakova et al., 2018). Unterschiedliche Studien haben bereits bei etablierter rheumatoider Arthritis Korrelationen zu DAS28-CRP/BSG, SDAI/CDAI, BSG, CRP sowie der Anzahl an geschwollenen und schmerzhaften Gelenken feststellen können (Torgutalp et al., 2018) (Hammer et al., 2007) (Madland et al., 2002a). Die bereits in der Literatur zur Verfügung stehenden Studien hinsichtlich des Calprotectinverhalten bei früher rheumatoider Arthritis als Aktivitäts- und Verlaufsmarker haben sich hauptsächlich mit dem Calprotectinverhalten unter konventioneller Basistherapie beschäftigt (Hammer et al., 2008) (Andrés Cerezo et al., 2011). Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit anhand eines gut charakterisierten Kollektivs untersucht werden, in wie weit Calprotectin als geeigneter Aktivitäts- und Verlaufsmarker bei früher rheumatoider Arthritis unter einer Kombinationstherapie (Adalimumab+ Methotrexat) gegenüber einer Monotherapie (Methotrexat) fungieren kann.

1.1. Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die Ursachen zur Entstehung einer rheumatoiden Arthritis sind noch nicht vollständig geklärt. Als Einflussfaktoren sind epigenetische Veränderungen sowie auch Umweltfaktoren (z.B. Rauchen (M.P. Vessey et al., 1987) und Parodontitis (Mercado et al., 2001)) bekannt.

Bezüglich der genetischen Veranlagung wird die Hypothese des „shared epitope“ diskutiert. Es handelt sich hierbei um das HLA-DRB1 Allele (HLA, Human Leukocyte

Antigen). Diese Hypothese geht davon aus, dass strukturelle Unterschiede zwischen Molekülen dieser sogenannten Klasse II, Wechselwirkungen auf der Ebene der Antigenpräsentation oder während der T-Zell-Differenzierung im Thymus beeinflussen können (Gregersen et al., 1987)

Bestimmte HLA-DRB1 Allele (HLA-DRB1*0401/0404) sind mit einer frühen Krankheitsmanifestation, Nachweis von Autoantikörpern, ausgeprägten Gelenkveränderungen und dem Vorhandensein von Rheumaknoten assoziiert (MacGregor et al., 1995).

Das Rauchen gehört zu einem weiteren wichtigen exogenen Risikofaktor der rheumatoiden Arthritis. Es führt in einem Modell zur Pathogenese zu einer Citrullinierung von Proteinen in der Lunge und trägt damit bei einer ACPA (engl. anti citrullinated protein antibodies)-positiven rheumatoiden Arthritis bei (Klareskog et al., 2006). Desweiteren werden auf bakteriellen Infektionen basierende immunonologische Kreuzreaktionen (molekulares mimikry)(Albani et al., 1995), parodontale Infektionen, sowie auch ein verändertes gastrointestinales Mikrobiom (Eerola et al., 1994) diskutiert.

Durch eine genetische Prädisposition, kann es zu einer Reaktion antigen-präsentierender Zellen, wie bspw. von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen auf ein exogenes oder autologes Antigen kommen(Smolen et al., 2007). Für wiederkehrende Krankheitsschübe im Rahmen einer RA werden ein Ungleichgewicht zwischen TH1-Zellen und regulatorischen T-Helferzellen, beides Subgruppen der T-(Lymphozyten)-Helferzellen, angenommen (Behrens et al., 2007).

Die aus den B-Lymphozyten reifenden Plasmazellen können bei der RA u.a. in der Synovialmembran nachgewiesen werden, wo sie Autoantikörper (u.a. ACPA (engl. anti citrullinated protein antibodies), RF (Rheumafaktor) und Immunkomplexe freisetzen (McInnes, 2011).

Hauptbeteiligte an der Entwicklung einer Synovitis sind die Makrophagen (Tak et al., 1997) mit ihren Eigenschaften, Zytokine wie TNFalpha (Tumornekrosefaktor alpha), Interleukin-6 (IL-6) zu sezernieren, sowie Antigene zu phagozytieren und zu präsentieren (McInnes, 2011). Die Makrophagen selbst werden mittels Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Akira et al., 2006) und NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-ähnlichen Rezeptoren aktiviert, die pathologische Muster beispielsweise von Bakterien erfassen (Kobayashi, 2005).

Neutrophile Zellen finden sich bei aktiver RA vorwiegend in der Synovialflüssigkeit und sezernieren unter anderem Chemokine und Zytokine (Cascão et al., 2010).

Bei einer Synovitis beginnen u.a. die fibroblastenähnlichen Synoviozyten, Matrixmetalloproteasen zu sezernieren. Diese Enzyme greifen wiederum die Knorpelmatrix an (Burger et al., 1998). Makrophagenstimulierungsfaktoren (Kodama et al., 1991) sowie RANKL („Receptor Activator of NF-κB Ligand“), freigesetzt durch Osteoblasten, führen zu einer Osteoklastendifferenzierung (Yamamoto et al., 2006) (Kong et al., 1999) und damit zum Knochenabbau (Chang et al., 1992).

Eine Studie hat Hinweise dazu gefunden, dass sich die frühe rheumatoide Arthritis, durch einen deutlich höheren Anteil an Zytokinen (insbesondere IL-2, IL-4, IL-13, IL-17, IL-1, IL-15, bFGF und EGF), auszeichnet im Vergleich zu anderen nicht-rheumatoiden frühen Arthritiden (Raza et al., 2005). Diese werden u.a. von T-Zellen, Makrophagen und Stromazellen freigesetzt.

1.2. Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis

Studien, die sich vorwiegend mit der Datenlage hinsichtlich der Epidemiologie der rheumatoiden Arthritis beschäftigt haben, sind zu dem Schluss gekommen, dass die Prävalenz einer rheumatoiden Arthritis bei Europäern von 0,33% bis 0,8% reicht (Carmona et al., 2002)(Riise et al., 2000)(Aho et al., 1998)(Cimmino et al., 1998)(Power et al., 1999)(Saraux et al., 1999) (Simonsson et al., 1999) . Die Kerndokumentation des Deutschen Rheuma Forschungszentrums untersucht die rheumatologische Versorgung von RA-Patienten. Sie ist zu folgenden Ergebnissen gekommen: 75% der behandelten Patienten sind Frauen mit einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von 12 Jahren. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei Frauen bei 47,5 Jahren und bei Männern bei 51,4 Jahren. Das Vorliegen von Autoantikörpern scheint ebenfalls den Erkrankungszeitpunkt zu beeinflussen: seronegative Patienten erkranken 4 Jahre später als seropositive Patienten. Insgesamt waren von den 8084 untersuchten Patienten 72% RF und/oder ACPA positiv. Als häufigste Komorbiditäten wurden Arthrose, Osteoporose und Schilddrüsenerkrankungen erfasst (Albrecht et al., 2017).

1.3. Klinik der frühen rheumatoiden Arthritis

Die Beschwerden im Rahmen einer frühen rheumatoiden Arthritis präsentieren sich oft zunächst schleichend. Das gängige Krankheitsmuster bei der Entwicklung der rheumatoiden Arthritis zeigt sich im symmetrischen Befall der proximalen Interphalangealgelenke (PIP) und der Metacarpophalangealgelenke (MCP). Interessanterweise kann es jedoch zu Abweichungen der Gelenkbeteiligung kommen. Sie kann sich initial auch als asymmetrische Oligoarthritis oder Monoarthritis der kleinen und großen Gelenke (Kiefergelenk, Knie-, Hüft – und Sprunggelenke, Schultergelenke) präsentieren (Puchner, 2012). Die ersten Symptome sind zunächst entzündlicher Gelenkschmerz, Schwellung der Gelenke und Morgensteifigkeit der Gelenke. Die Schübe können des Weiteren von Fieber und einem ausgeprägten Krankheitsgefühl begleitet sein (Puchner, 2012). Bei der körperlichen Untersuchung fallen der provozierte Druckschmerz sowie ein Gelenkerguss auf. Dauert eine Krankheitsaktivität an, so kommt es zu Gelenkverformungen, Subluxationen und Gelenkankylosierungen (Lee et al., 2001).

1.4. Diagnosestellung und Klassifikationskriterien zur rheumatoiden Arthritis

Das Diagnostizieren einer rheumatoiden Arthritis erfolgt vor allem klinisch. Es orientiert sich am gängigen symmetrischen Befall von Finger- und Handgelenken sowie der morgendlichen Steifigkeit der Gelenke, begleitet von erhöhten Entzündungswerten (BSG, CRP). Wichtige Voraussetzung zur Diagnosestellung einer rheumatoiden Arthritis ist das Vorliegen einer Synovitis. Diese darf nicht durch andere rheumatologische Erkrankungen zu erklären sein (Aletaha et al., 2010). Bevor es zu einer Diagnosestellung einer frühen rheumatoiden Arthritis kommt, ist eine ausführliche Anamnese sowie eine körperliche Untersuchung obligat. Anhand dieser können andere Ursachen für Gelenkschwellungen und Schmerzen wie bspw. Traumata, infektiöse Arthritiden, Osteoarthritis und Gicht ausgeschlossen werden (Machado et al., 2011).

Zur Klassifikation der RA dienten bis 2010 die ACR (American Rheumatism Association)-Klassifikationskriterien von 1987 (Arnett et al., 1988). Diese Kriterien wurden, vor allem für Studien, zur verbesserten Identifizierung von Patienten, die tatsächlich an einer rheumatoiden Arthritis erkrankt sind, entwickelt (Arnett et al., 1988). Die Kriterien orientieren sich an der Morgensteifigkeit (für mind. 1 Stunde), der Arthritis (mind. drei Gelenke, vor allem Finger- und Handgelenke mit symmetrischem Befallsmuster), den subkutanen Rheumaknoten, dem Nachweis von Rheumafaktoren

sowie radiologischen Veränderungen (s. Tab. 1). Diese Kriterien haben das Ziel mit einer Sensitivität von 91-94% und Spezifität von 89% zwischen Patienten, die tatsächlich an einer rheumatoiden Arthritis erkrankt sind, und Patienten, die zwar eine rheumatische Erkrankung haben, welche jedoch keine rheumatoide Arthritis ist, unterscheiden zu können (Arnett et al., 1988).

Mit Entwicklung von neuen ACR/EULAR (American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism) – Klassifikationskriterien soll ermöglicht werden, Patienten im Frühstadium der rheumatoiden Arthritis zu erfassen und damit eine zeitnahe Therapie einleiten zu können (Aletaha et al., 2010). Die ACR/EULAR - Klassifikationskriterien von 2010 umfassen die Gelenkbeteiligung (kleine, mittlere und große Gelenke), die Serologie (positiv/negativ für ACPA/RF), die akute Phase Parameter (Blutsenkungsgeschwindigkeit/ C-reaktive Protein) und die Dauer der Symptome (>/< 6 Wochen) (s. Tab. 2). Der Nachweis von Antikörpern gegen citrullinierte Antigene sowie von Rheumafaktoren trägt zur Diagnosestellung bei und nimmt ebenfalls im Rahmen der Klassifikationskriterien einen wichtigen Stellenwert ein (Aletaha et al., 2010). Die weiteren Besonderheiten der Antikörper bei rheumatoider Arthritis werden in einem folgenden Kapitel ausführlich erläutert.

Eine Studie hat beide Klassifikationskriterien von 1987 und von 2010 mit einander in ihrer Erfassung von frühen RA-Patienten verglichen und ist zu dem Schluss gekommen, dass die Klassifikationskriterien von 2010 deutlich mehr frühe RA-Patienten (79%) im Vergleich zu den Klassifikationskriterien von 1987 (71,4%) erfassen konnten. Begründet wurde dies damit, dass in den 2010 Kriterien zusätzlich druckschmerzhaft Gelenke, Entzündungsparameter und ACPA berücksichtigt werden (Fautrel et al., 2012)

Da eine röntgenologische Bildgebung zu Beginn der rheumatoiden Arthritis oft keine Auffälligkeiten zeigt, hat die EULAR 2013 die Durchführung einer MRT-Bildgebung zur verbesserten, frühzeitigen Aktivitätserfassung einer frühen rheumatoiden Arthritis empfohlen (Colebatch et al., 2013). Diese Empfehlung konnte jedoch in einem systematischen Review von 2017 nicht bestätigt werden (Hua et al., 2017). MRT-Untersuchungen, die Ödeme am Handgelenk und Metatarsophalangealgelenken oder eine Tenosynovitis darstellen, seien demzufolge nach einer Analyse diesbezüglicher Studien zwar zu 80% spezifisch, hätten aber ein geringes Maß an Sensitivität (35%) zur endgültigen Diagnosestellung der rheumatoiden Arthritis (Hua et al., 2017).

Gelenkulterschalluntersuchungen wurden ebenfalls in einer Studie, in der 107 Patienten

mit undifferenzierter Arthritis eingeschlossen wurden, als geeignetes Instrument zur Detektion einer frühen rheumatoiden Arthritis beschrieben (Sahbudin et al., 2015). Jedoch lagen hierzu keine Angaben zur Sensitivität und Spezifität vor.

Tab.1 Vergleich von ACR/EULAR-Klassifikationskriterien für die RA

ACR Kriterien von 1987 (Arnett et al., 1988)	ACR/EULAR-Kriterien für die Klassifikation der rheumatoiden Arthritis 2010 (Aletaha u. a. 2010)	
1. Morgensteifigkeit (in einem Gelenk während mindestens einer Stunde)	Gelenkbeteiligung (0-5 Punkte)	
	1 mittleres bzw großes Gelenk	0
2. Arthritis in drei oder mehr Gelenkregionen (objektiv beobachtete fluktuierende Kapselschwellung in mindestens drei von vierzehn Gelenkregionen: beidseits Metacarpophalangealgelenke (MCP), proximale Interphalangealgelenke (PIP), Hand-, Ellenbogen-, Knie-, Sprung- und Metatarsophalangealgelenke (MTP))	2-10 mittlere bzw große Gelenke	1
	1-3 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung von großen Gelenken)	2
	4-10 kleine Gelenke (mit oder ohne Beteiligung von großen Gelenken)	3
	>10 Gelenke (mit mind. Einem kleinen Gelenk)	5
3. Arthritis an Hand- oder Fingergelenken (Befall mindestens eines Hand-, Metacarpophalangeal- oder proximalen Interphalangealgelenkes)	Serologie (0-3 Punkte)	
	Negative RF und negative ACPA	0
4. Symmetrische Arthritis (gleichzeitig beidseitiger Befall der gleichen Gelenkregion)	Niedrig positiver Rf oder niedrig positive ACPA	2
	Hoch positiver RF oder hoch positive ACPA	3
5. Subkutane Rheumaknoten (objektiv beobachtete subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder gelenknahen Streckseiten)	Entzündungsparameter (0-1 Punkt)	
	Normales CRP und normales BSG	0
6. Rheumafaktornachweis (mit einer Methode, deren positiver Nachweis unter 5% einer normalen Kontrollgruppe liegt)	Abnormales CRP oder abnormales BSG	1
	Dauer der Symptome (0-1 Punkte)	
	< 6 Wochen	0
7. Radiologische Veränderungen der Gelenke (typische Veränderungen der dorsovolaren Handaufnahme mit gelenknaher Osteoporose und/oder Erosionen der betroffenen Gelenke)	>6 Wochen	1
	Chronische Polyarthritis: mindestens 4 von 7 Kriterien (wobei Kriterien 1 bis 4 während mindestens 6 Wochen bestehen müssen)	
Klassifikation für RA gesichert: ≥ 6 Punkten ACPA Antikörper gegen citrullinierte Peptide, RF Rheumafaktor, CRP C-reaktives Protein, BSG Blutsenkungsgeschwindigkeit		

1.5. Prognose und Verlauf einer rheumatoiden Arthritis

Die Prognose der frühen rheumatoiden Arthritis ist zu dem gegebenen Zeitpunkt anhand der aktuell vorhandenen Marker begrenzt einzuschätzen und benötigt in diesem Bereich weitere Untersuchungen. Es ist davon auszugehen, dass Patienten mit früher rheumatoider Arthritis, wenn sie keine geeignete Therapie erhalten, zu 40% in einem halben Jahr, zu 60% in einem Jahr und zu 80% in 2 Jahren deutliche Gelenkveränderungen entwickeln (Schett, 2008). Durch frühzeitiges Eingreifen mit Basismedikamenten heißt es, könne man diese Veränderungen verhindern.

In den EULAR-Empfehlungen zur RA von 2007 wurde eine hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit, ein hoher CRP-Wert sowie eine positive Serologie für Rheumafaktor und ACPA als ungünstiger Prognosemarker für zukünftige Gelenkdestruktionen beschrieben (Combe et al., 2006)

Es konnte vor allem anhand der Untersuchung mehrerer Studien gezeigt werden, dass vor allem ACPA an Wertigkeit bezüglich Diagnose und Prognose den Rheumafaktor übertrifft (Hua et al., 2017).

Zusätzlich zu den erosiven Veränderungen, die mit einer rheumatoiden Arthritis einhergehen können, sind auch die mit einer Diagnosestellung einer frühen rheumatoiden Arthritis verbundenen Komorbiditäten zu berücksichtigen. Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis haben unter anderem ein deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Mortalitäten (Turesson et al., 2004) (Maradit-Kremers et al., 2005). Zu den weiteren Risiken gehören beispielsweise Thrombosen (Seriolo et al., 1996), der insulinabhängige Diabetes mellitus (Somers et al., 2006), die autoimmune Thyreoiditis (Staykova et al., 2000) und Infektanfälligkeiten (Doran et al., 2002). Eine Studie hat 1055 Patienten an 54 Zentren über drei Jahre beobachtet und ist zu dem Schluss gekommen, dass die Funktionsfähigkeit, das Schmerzempfinden, die BSG und der DAS28 deutlich von Komorbiditäten beeinflusst werden können, trotz klinischer Verbesserung hinsichtlich der rheumatoiden Arthritis (Westhoff et al., 2006).

Es bedarf weiterer Biomarker, die eine konkrete Aussage über den Aktivitätszustand einer rheumatoiden Arthritis, vor allem der frühen rheumatoiden Arthritis geben können.

1.6. Messinstrumente zur Bestimmung der Krankheitsaktivität einer rheumatoiden Arthritis

1.6.1. DAS28 (Disease Activity Score 28 Gelenke)

Bei dem DAS28 handelt es sich um ein gut etabliertes Messinstrument, welches mittels vier unterschiedlicher Bestandteile die Krankheitsaktivität beschreiben kann. Zu den Komponenten gehören: die Anzahl an schmerzhaften und geschwollenen Gelenken aus 28 Gelenken, die Blutsenkungsgeschwindigkeit (mm/h), alternativ mittels CRP (mg/dl) sowie die Patientenbeurteilung der Krankheitsaktivität (visuelle Analogskala in 100 mm) (Prevoo et al., 1995).

Anhand einer Studie konnte festgelegt werden, dass ein $DAS28 < 2,6$ die ARA (American Rheumatism Association) - Remissionskriterien erfüllt (Fransen et al., 2004). Die ARA-Remissionskriterien legen fest, dass mindestens 5 oder mehr der folgenden Definitionen für mindestens 2 Monate erfüllt sein, damit eine Remission festgestellt werden kann: Morgensteifigkeit < 15 Minuten, keine Fatigue, keine Gelenkschmerzen in der Vergangenheit, keine Gelenkdruckempfindlichkeit oder Gelenkschmerzen bei Bewegung, keine Schwellung in den Gelenken oder Sehnenscheiden, $BSG < 30$ mm/h (w); < 20 mm/h (m) (Pinals et al., 1981). Jedoch wird hinsichtlich der Remissionskriterien kritisiert, dass eine Remission nach dem DAS28 kritisch hinterfragt werden sollte, da der DAS28 vor allem die Gelenke der oberen Extremitäten sowie die Knie berücksichtigt, jedoch Füße und Knöchel, die mittels des ursprünglichen DAS erfasst werden, vernachlässigt (Landewé et al., 2006).

Zudem ist es möglich, wie in der folgenden Tabelle beschrieben, anhand des DAS28 das Therapieansprechen der untersuchten Patienten zu beurteilen. Dazu wird zunächst der DAS28 Ausgangswert betrachtet und je nach entsprechender Verbesserung des DAS28 wird entschieden, ob ein gutes, moderates oder kein Ansprechen auf eine Behandlung stattgefunden hat (Fransen et al., 2005).

Tab. 2 EULAR Response Kriterien zur Beurteilung des Therapieansprechens nach (Fransen and van Riel, 2009)

DAS28 Ausgangswert	Verbesserung des DAS28		
	>1,2	>0,6 und <1,2	<0,6
<3,2	Gutes Ansprechen	Moderates Ansprechen	Kein Ansprechen
>3,2 und <5,1	Moderates Ansprechen	Moderates Ansprechen	Kein Ansprechen
>5,1	Moderates Ansprechen	Kein Ansprechen	Kein Ansprechen

1.6.2. SDAI (Simplified Disease Activity Index) / CDAI (Clinical Disease Activity Index)

Der SDAI wurde vor dem Hintergrund entwickelt, dass der DAS in Anbetracht einer schnellen Bestimmung im klinischen Alltag eine zu komplexe Formel hat, die mittels eines Kalkulators berechnet werden muss (Smolen et al., 2003). Der SDAI wird anhand der Summe von 5 Bestandteilen zusammengesetzt: Gelenkstatus (Anzahl 0-28 der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke), CRP (mg/dl), Beurteilung der Krankheitsaktivität durch den Patienten (visuelle Analogskala 0-10cm) und Beurteilung der Krankheitsaktivität durch den Arzt (visuelle Analogskala 0-10cm)(Smolen et al., 2003). Der Cut-off für eine Remission beträgt beim SDAI 3.3 (Aletaha et al., 2005b)

Der CDAI (Clinical Disease Activity Index) ist die verkürzte Version des SDAI ohne CRP. Eine Untersuchung zur Wertigkeit des CRP bei der Durchführung von DAS28 und SDAI ist zu dem Schluss gekommen, dass die CRP-Werte im geringeren Maße das Ergebnis des DAS28 bzw. des SDAI beeinflussen (15% bei DAS28, 5% bei SDAI). Des Weiteren konnte diese Studie zeigen, dass der CDAI in ähnlicher Weise wie der SDAI stark mit dem DAS28 korreliert (Aletaha u.a. 2005a). Damit bietet der CDAI eine schnelle Einschätzung der Krankheitsaktivität .

1.6.3. HAQ (Health Assessment Questionnaire)

Der Health Assessment Questionnaire, abgekürzt HAQ, wurde erstmals 1980 veröffentlicht (Fries et al., 1980). Es handelt sich hierbei um einen Fragebogen, welcher versucht, den Einfluss einer chronischen Erkrankung auf eine Person longitudinal zu erfassen. Der im klinischen Alltag üblicherweise als HAQ bezeichnete Fragebogen setzt sich aus dem HAQ-DI (HAQ Disability Index), der visuellen analogen Schmerzskala sowie der VAS (Visual Analogue Scale) für die allgemeine Gesundheitsskala aus der Sicht des Patienten zusammen (Bruce et al., 2003a). Der HAQ-DI befasst sich mit der Funktion zunächst der oberen Extremitäten, dann der unteren Extremitäten und zum Schluss beider zeitgleich. Dies wird anhand von acht Bereichen abgefragt, die das Maß an körperlicher Funktionen wiedergeben sollen: Anziehen, Aufstehen, Essen, Laufen, Hygiene, Reichweite, Griffbarkeit und übliche Aktivitäten. Die HAQ VAS Schmerzskala beschreibt das Bestehen oder das Fehlen von Schmerzen und sein Ausmaß im Rahmen einer Arthritis (Bruce et al., 2003a).

Zusammengefasst wird der HAQ-Index in die Grade 1 bis 3 unterteilt. 0-1 beschreibt eine milde geminderte Funktionsfähigkeit. 1-2 moderate bis schwere, und 2-3 eine schwere bis sehr schwere Funktionseinschränkung (Bruce et al., 2003a).

1.6.4. ACR 20/50/70- Kriterien (American College of Rheumatology- Kriterien)

Anhand der American College of Rheumatology- Kriterien (ACR-Kriterien) ist eine Beurteilung der Ansprechrate eines Patienten auf ein Medikament möglich. Die ACR-Kriterien umfassen die Anzahl an schmerzhaften und geschwollenen Gelenken, die Gesamtbeurteilung durch den Arzt, die Gesamtbeurteilung durch den Patienten, Beurteilung der Schmerzen (mittels der visuellen Analogskala), den HAQ-Behinderungsindex sowie den CRP- oder BSG-Wert (Felson, et al., 1993).

ACR20 wird folgendermaßen definiert: Um eine Therapie bzw. eine Verbesserung der Krankheitsaktivität positiv beurteilen zu können, bedarf es einer um eine mindestens 20%igen Verbesserung der druckschmerzhaften und geschwollenen Gelenke sowie einer mindestens um 20%igen Verbesserung bei 3 der fünf weiteren im ACR-Score erfassten Komponenten (Felson et al., 1995). Diese Definition lässt sich ebenfalls auf die Bezeichnungen ACR50 und ACR70 übertragen, nur mit jeweils um 50%- bzw. 70%iger Verbesserung der eben genannten Faktoren (Felson et al., 1998).

1.7. Aktivitätsmarker bei rheumatoider Arthritis

Die Bildung von Rheumafaktoren sowie Antikörper gegen citrullinierte Antigene (ACPA) weisen auf die Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis hin (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003).

Bei beiden besteht eine moderate Sensitivität zwischen 40-80% (abhängig von den Patientenpopulationen und Krankheitsdauer), wobei ACPA eine höhere Spezifität für die Diagnosestellung einer rheumatoiden Arthritis hat (Hua et al., 2017).

Interessanterweise wird in der Literatur beschrieben, dass IgA Rheumafaktoren und ACPA als Marker zur Vorhersage von progressiven radiologischen Gelenkveränderungen besonders hervorzuheben sind (Berglin, 2006).

Bei den Antikörpern gegen citrullinierte Antigene handelt es sich um Antikörper, die sich gegen posttranslational modifizierte Proteine richten (Tarcsa et al., 1996). Solche Proteine können unter anderem Fibrinogen (Masson-Bessiere et al., 2001), Vimentin (Bang et al., 2007) oder die alpha-Enolase (Lundberg et al., 2008) sein. Bei der Modifikation handelt es sich um eine Modifikation von Arginin zu Citrullin, die mittels eines Enzyms, der Peptidylarginindeiminase, vermittelt wird (Tarcsa et al., 1996). Zur Erfassung dieser Antikörper gegen citrullinierte Antigene wurde die ELISA-Untersuchung ersatzweise gegen zyklisch citrullinierte Peptide (CCP) entwickelt (Schellekens et al., 2000). Diese werden synthetisch hergestellt und haben eine Spezifität von 81-100% (Avouac et al., 2006).

Trotz der hohen Spezifität für die rheumatoide Arthritis konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der ACPA-Werte und der Krankheitsaktivität festgestellt werden (Aletaha et al., 2015).

Bei Antikörper gegen mutiertes citrulliniertes Vimentin (Anti-MCV) konnte jedoch eine Korrelation zur Krankheitsaktivität nachgewiesen werden (Bang et al., 2007).

In jüngster Zeit wurden weitere Marker hinsichtlich ihrer Wertigkeit als Aktivitätsmarker im Rahmen einer rheumatoiden Arthritis genauer untersucht. Als vielversprechend gilt der MBDA-Score (multi-biomarker disease activity). Dabei handelt es sich um einen Algorithmus, welcher insgesamt 12 Serumproteine Serum-Amyloid A, Interleukin 6, Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Typ I, vaskulärer Endothelwachstumsfaktor A, Matrix-Metalloproteinase 1 und 3, Knorpel-Glykoprotein 39, epidermaler Wachstumsfaktor, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1, Leptin, Resistin und C-

reaktives Protein (Centola et al., 2013). Anhand des Algorithmus kann die Krankheitsaktivität abgeschätzt werden.

1.8. Calprotectin als Aktivitäts- und Verlaufsmarker der frühen rheumatoiden Arthritis

Zum aktuellen Zeitpunkt besteht weiterhin Bedarf an Aktivitäts- und Verlaufsmarkern, die es ermöglichen, die Krankheitsaktivität sowohl unter Therapie als auch ohne Therapie besser einschätzen zu können.

Das Calprotectin-Protein kann ein solcher potentieller Marker für die frühe rheumatoide Arthritis sein. Im Vergleich zu CRP und BSG könnte der Vorteil darin liegen, dass er in Gelenknähe freigesetzt wird und damit Entzündungsprozesse an den Gelenken besser widerspiegeln kann. Aus diesem Grund wird in den weiteren Abschnitt näher auf den Aufbau, Funktion und Bedeutung des Calprotectin eingegangen.

1.8.1. Calprotectin - Aufbau, Funktion, Freisetzung

Das Protein Calprotectin besitzt viele unterschiedliche Namen, die alle die unterschiedlichen Eigenschaften des Calprotectin darstellen. Eines dieser Synonyme ist das MRP (Macrophage inhibitory factor Related Protein), welches sich in eine leichte MRP8- und eine schwere MRP14-Untereinheit unterteilt (Fagerhol, 1996)(Odink et al., 1987). Es wird vermutet, das MRP8 und MRP14 zeitlich während der Entwicklungsstadien von einem im Blut zirkulierenden Monozyten zur Reifung einer Makrophage exprimiert wird (Zwadlo et al., 1988). Synovialfibroblasten können ebenfalls Calprotectin freisetzen (Carrión et al., 2013).

Das eher geläufige Synonym S100A8/9 bezieht sich auf die vollkommene Auflösung (S= 100% soluble) in Ammoniumsulfat (Moore, 1965).

Calprotectin lässt sich vor allem am Knorpel-Pannus-Übergang der Synovialgewebes bei einer rheumatoiden Arthritis finden (Youssef et al., 1999). Die Konzentration in der Synovialflüssigkeit ist signifikant höher als im Serum (Kane et al., 2003) (Frosch et al., 2000).

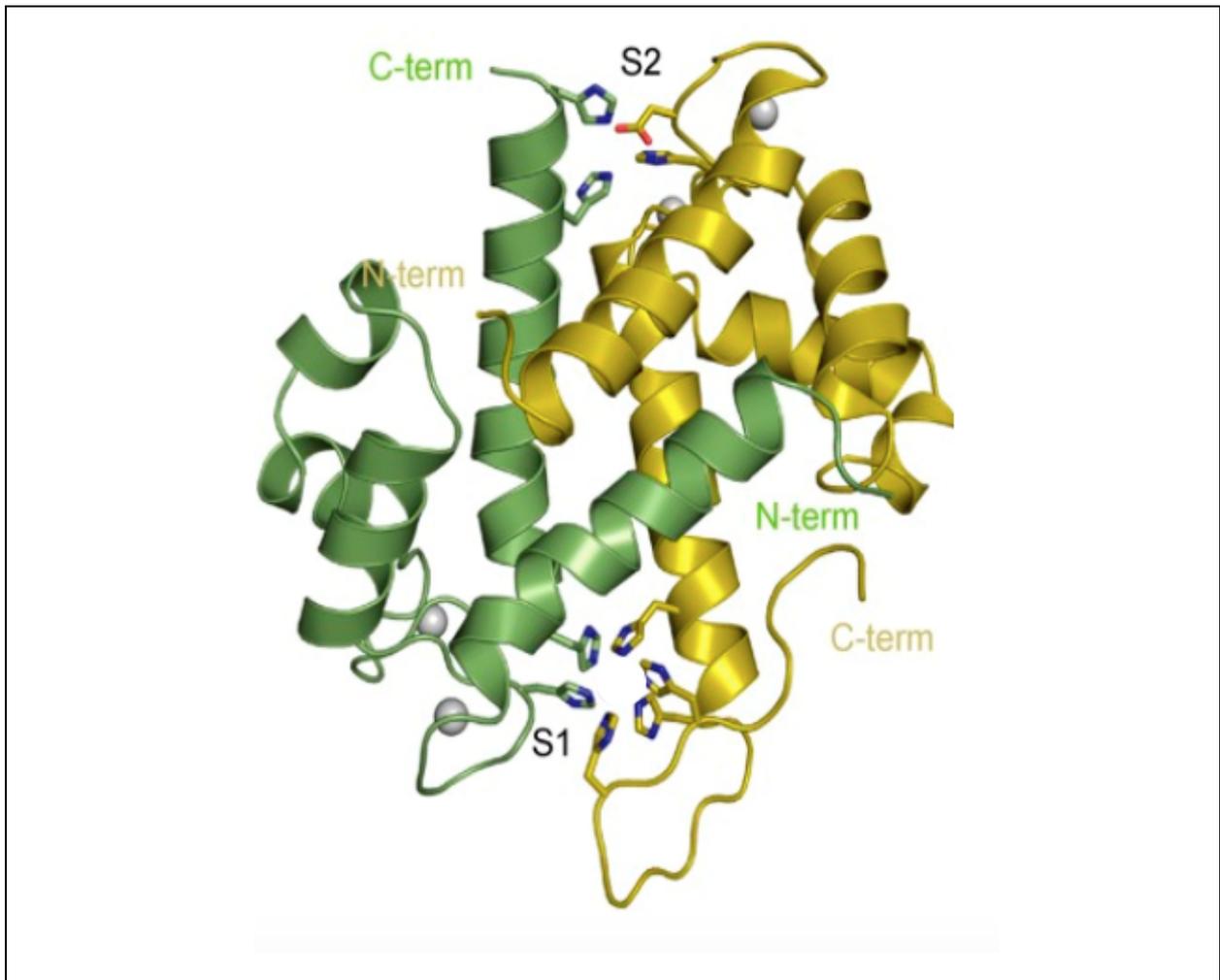


Abb. 1 Farbband-Diagramm eines S100A8 (grün) und S100A9 (gelb) Heterodimer

Es zeigt Calprotectin mit seinen Bindungsstellen für Zink (S2/S1). Die Ca-Ionen sind als graue Kugeln abgebildet. C-term, C-Terminal; N-Term, N-Terminal (Damo et al., 2013)

Die S100-Proteine gehören zu der großen Übergruppe der Alarmine, eine Subgruppe der DAMPS (damage-associated molecular pattern molecules) genannt (Foell et al., 2007a)(Bianchi, 2007).

Zu diesen Alarminen gehören unter anderem das HMGB1 (High-Mobility-Group-Protein B1) und Hitzeschockproteine (Bianchi, 2007).

Ursprünglich wurde Calprotectin als antimikrobielles Protein zu 30 % im Zytoplasma von Leukozyten nachgewiesen (DALE et al., 1983). Die Menge an S100A8/9 in Monozyten und Neutrophile spiegelt den Differenzierungsgrad (Roth u. a. 1993a). Das Calprotectin (S100A8/9) ist ein Heterodimer, welches durch seine Fähigkeit, Calcium zu binden, imstande ist, sich zu einem Tetradimer zu formen (Strupat et al., 2000). **Abb.1** zeigt Calprotectin als Heterodimer (S100A8/9).

Calprotectin ist darüber hinaus imstande, intrazelluläres Calcium zu binden. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Calprotectin aus dem Zytoplasma in Richtung Zytoskelett (Roth u. a. 1993a).

Die Freisetzung des Calprotectin erfolgt, anders als üblich, nicht über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat, sondern über ein funktionierendes Mikrotubulinetzwerk (Rammes et al., 1997). Vor allem die S100A9-Untereinheit registriert Ca- abhängige Signale (Bos et al., 1996). S100A9 (MRP14) ist im Bereich der Zellmembran und S100A8 (MRP8) eher am Zytoskelett nachzuweisen (Roth et al., 1993).

Ebenfalls wurde in der Literatur beschrieben, dass es durch ein Zusammenspiel eines mittels TNF (Tumornekrosefaktor), einem Zytokin, stimulierten Endothels und dadurch stimulierten Monozyten, zu einer Freisetzung des Calprotectin kommt. Ruhendes Endothel hemmt die durch Proteinkinase C induzierte Freisetzung des Calprotectin (Frosch et al., 2000).

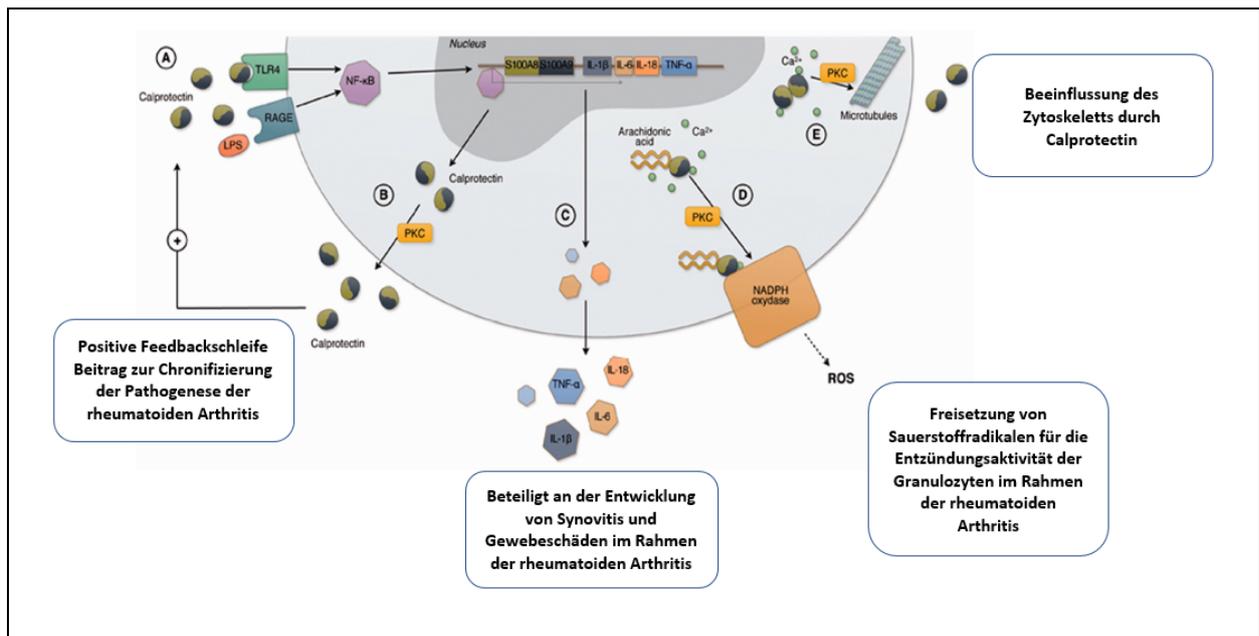


Abb. 2 Funktion des Calprotectin auf intrazellulärer Ebene und mögliche Einbeziehung in die Pathogenese der RA

Calprotectin bindet als DAMP an TLR4 oder RAGE-Rezeptor mit Induktion von NFκB (A) Calprotectin-Freisetzung erfolgt mit Hilfe der Proteinkinase C (B). Nach Bindung von Calprotectin werden u.a. TNFalpha, Il-6, Il-1beta freigesetzt (C) S100A9 transportiert im Beisein von Calcium Arachidonsäure zu NADPH und S100A8 bindet es an NADPH. Die NADPH Oxygenase setzt dann freie Sauerstoffradikale frei, welche die Granulozyten zur Aktivität im Rahmen einer Entzündung benötigen (D) Unter Beisein von Calcium formt sich Calprotectin (S100A8/9) zu einem Tetradimer. Das führt zu einer Stabilisierung von Tubulinfilamenten und Formung von Mikrotubuli (E) (Ometto u.a. 2017).

Nach seiner Freisetzung bindet Calprotectin u.a. an die Pattern Recognition Receptors (PRR) wie TLR4 (toll-like-receptor) und kann dadurch u.a. zur Freisetzung TNF alpha führen (Vogl et al., 2007). Zu den PRR gehören Rezeptoren wie TLR2 und TLR4 (Gay and Gangloff, 2007)(Akira et al., 2006) sowie RAGE (receptor for advanced glycosylation end products) (Lin, 2006). Calprotectin beeinflusst vorwiegend TLR4 (Vogl et al., 2007). Detaillierte Funktionen des Calprotectin werden in **Abb.2** näher beschrieben.

Die Auswirkungen des Calprotectin nach seiner Bindung äußern sich in unterschiedlicher Weise:

Bei neutrophilen Granulozyten führt vorwiegend MRP14 verstärkt zu einer Freilegung von CD11b/18 (cluster of differentiation molecule 11B/18), welches die Adhäsion an Endothelzellen fördert (Newton et al., 1998).

Calprotectin bindet an carboxylierte N-Glykane des Endothels (Srikrishna et al., 2001) und Heparansulfat (Robinson et al., 2002). Calprotectin ist desweiteren imstande bei Endothelzellen, eine Apoptose zu aktivieren (Viemann et al., 2007).

Durch die Bindung von Calprotectin an carboxylierte Glykane, freigesetzt durch entzündliches Endothel, wird eine transendotheliale Migration der Granulozyten ermöglicht (Srikrishna et al., 2001).

Desweiteren kann Calprotectin über seine Bindung an TLR4 zur einer Freisetzung von TNFalpha, Interleukin 1beta, Interleukin 6 und Interleukin 8 führen (Vogl et al., 2007)(Sunahori et al., 2006)

Bei CD8+-T-Zellen führt es zu einer vermehrten Il-17 Freisetzung (Loser et al., 2010). Durch seine Wirkung auf die Entwicklung von Osteoklasten kommt es zu einer vermehrten Knochenresorption (Grevers et al., 2011). Die Bindung des Calprotectin an TLR4 und RAGE führt zu einer vermehrten Produktion von NFkB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), welches Zellen zu einer erneuten Produktion von Calprotectin anregt und damit die Entzündung verstärkt (Vogl et al., 2007).

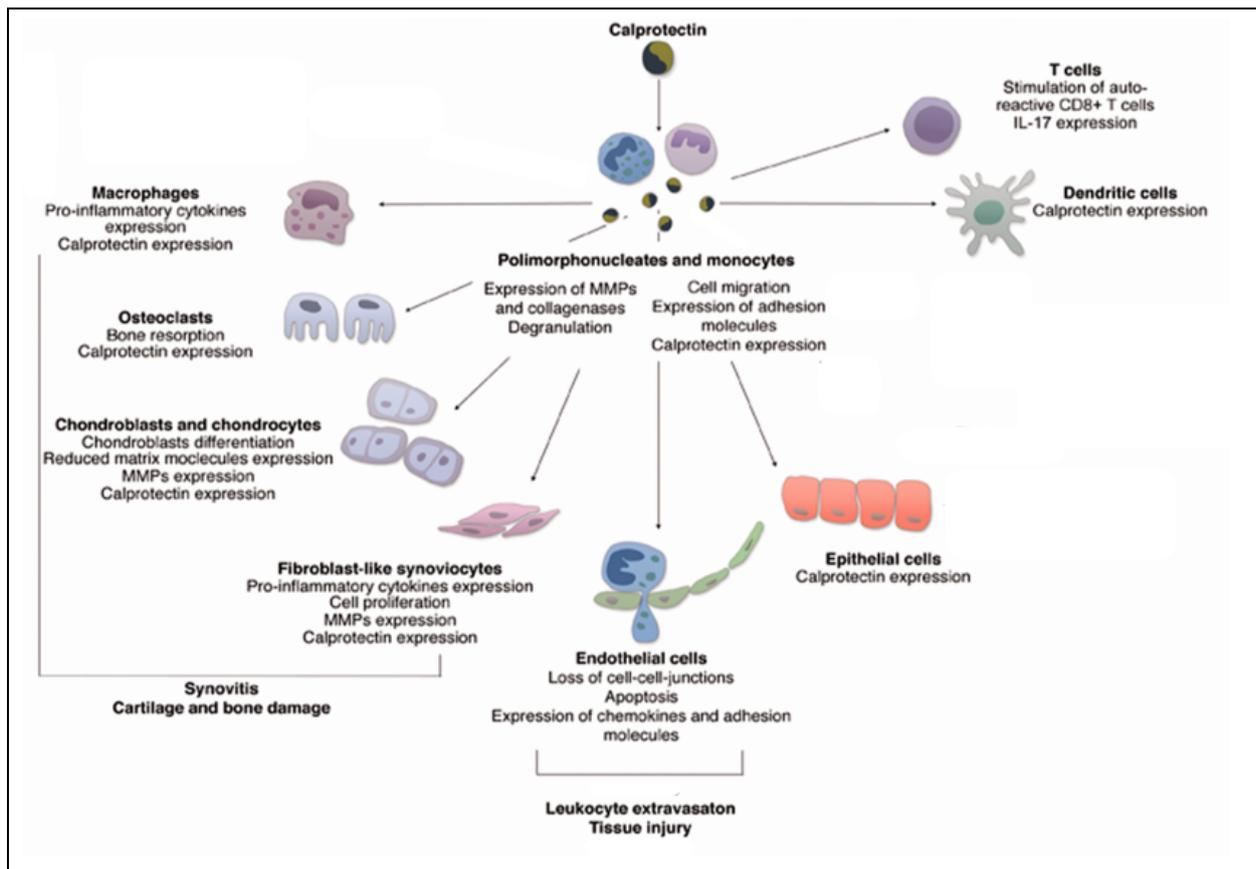


Abb.3 Effekte des Calprotectin auf die Zellen, die an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt sind (Ometto et al., 2017).

Die Funktion von Calprotectin (S100A8/9) kann durch andere Faktoren beeinflusst werden. Besteht eine ausgeprägte pathologische Aktivierung von dendritischen Zellen, so kann diese die hemmende Effekte von MRP8 auf Differenzierung von dendritischen Zellen aufheben (Loser et al., 2010). Damit besteht der Verdacht, dass die Funktion vor allem des MRP8 abhängig ist von dem zeitlichen Auftreten und der Dauer seiner Expressierung (Petersen et al., 2013).

Calprotectin (S100A8/9) ist nicht immer mit einer Pathologie verknüpft. So befindet es sich beispielsweise physiologisch im Urin zur Vorbeugung von Calciumoxalatsteinen (Pillay et al., 1998). Calprotectin (S100A8/9) wird nach einem Zelltod auch im Eiter oder einem Abszess vermehrt sezerniert (Stríz et al., 2004). Interessanterweise kann Calprotectin Zink binden (Murthy et al., 1993). Durch diese Eigenschaft ist es imstande, entweder durch Freisetzung von Zink Matrixmetalloproteinasen zu hemmen (Stríz et al., 2004). Durch die Bindung von Zink ist Calprotectin imstande, Mikrowachstum zu inhibieren (Clohessy et al., 1995).

Im Rahmen des systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (SJIA) wird Calprotectin bereits als Routinemarker verwendet, mit dessen Hilfe das Ansprechen auf eine Therapie sowie die Krankheitsaktivität beurteilt wird. Desweiteren ist es imstande, Krankheitsschübe im Rahmen einer SJIA vorherzusagen (Holzinger et al., 2012).

Bei der Identifizierung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wird Calprotectin im Stuhl als zuverlässiger Marker verwendet (von Roon et al., 2007).

1.8.2. Bedeutung von Calprotectin bei der Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis

Während der Entwicklung einer Arthritis kommt es unter anderem zu einer ausgeprägten Infiltration von Makrophagen in das Synovium mit vermehrter Expression von Calprotectin (S100A8/9) (Odink et al., 1987). Da Calprotectin von aktivierten Leukozyten im entzündeten Synovium freigesetzt wird, besteht die Vermutung, dass mit Hilfe einer Calprotectinmessung besser im Vergleich zu Akute Phase Proteinen differenziert werden kann, ob es sich um eine systemische oder am Gelenk lokalisierte Entzündung handelt (Hammer et al., 2010). Wie bereits oben beschrieben, produzieren Makrophagen, angeregt durch das S100A8/9, vermehrt TNFalpha (Sunahori et al., 2006) und TLR-4 abhängig regt es Synovialfibroblasten zu Aktivierung der Osteoklastogenese an, indem RANKL induziert wird und trägt damit zur Knorpelschädigungen bei (Lent et al., 2008)(Neumann et al., 2010). Des Weiteren aktiviert Calprotectin (S100A8/9), TLR-4 abhängig, Osteoklasten, die ebenfalls zur Knochendestruktion beitragen (Grevers et al., 2011).

Zu den Zusammenhängen zwischen Calprotectin und anderen Markern der rheumatoiden Arthritis bestehen widersprüchliche Daten. So beschreibt beispielsweise eine Studie zur frühen rheumatoiden Arthritis (Hammer et al., 2008), die 61 Patienten über ein Jahr untersucht hat, dass sich erhöhtes Calprotectin deutlich häufiger bei Anti-CCP, IgM-RF und IgA-RF positiven Patienten nachweisen lässt (Hammer et al., 2008). Eine breit angelegte Studie mit 160 Patienten konnte hingegen keine statistisch signifikanten Korrelationen von Calprotectin zu ACPA aufzeigen, obwohl bei RF positiven Patienten ein Trend zu erhöhten Calprotectinkonzentrationen vorlag (Hurnakova et al., 2017).

Calprotectin wurde als unabhängiger Marker für die Krankheitsaktivität bei rheumatoider Arthritis mit Korrelation zu Synovitiden im Ultraschall beschrieben (Hurnakova et al., 2015). Demzufolge gehen Gelenkentzündungen, die eine Dopplersignalverstärkung bei einer Ultraschalluntersuchung aufzeigen, häufig mit einem radiologischen Fortschreiten bei früher rheumatoider Arthritis einher (Brown et al., 2006)(Molenaar et al., 2004).

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Patienten, die keine Aktivität im Ultraschall aufweisen, niedrige Calprotectinwerte haben (Inciarte-Mundo et al., 2016). Calprotectin (S100A8/9) zeigte sich als vielversprechender Marker zur Identifizierung einer Gelenkentzündung unter Therapie (Inciarte-Mundo et al., 2016). Calprotectin erscheint als Aktivitätsmarker im Verlauf bei Patienten in klinischer Remission besonders interessant und bedarf weiterer Untersuchungen, um auch konkretere Aussage zum Ansprechen auf Medikamente machen zu können.

Es wird vermutet, dass Calprotectin ein Marker ist, der sich von gängigen Akute-Phase-Proteinen dadurch unterscheidet, dass er direkt die Menge an aktivierten Leukozyten an entzündeten Gelenken widerspiegeln kann. Desweiteren wird angenommen, dass Biologika die Konzentration der Akute-Phase-Proteine direkt beeinflussen können, während dies bei Calprotectin nicht der Fall ist (Hammer et al., 2010).

Darüber hinaus wurde Calprotectin unter seinem Synonym MRP8/14 als Biomarker mit der Fragestellung getestet, ob es sich hierbei um einen sensiblen Marker handelt, der bereits in den Anfängen einer Therapie Aussage über ein Ansprechen geben kann. Dazu wurde eine Kollektiv von 170 Patienten, die verschiedenen Therapien (Infliximab, Adalimumab, Rituximab) erhalten haben, in Responder und Non- Responder eingeteilt (Choi et al., 2015a) Diese beiden Gruppen wurden hinsichtlich ihrer Calprotectinkonzentration untersucht. Unter RTX (Rituximab)-Therapie, einem anti-CD20-Antikörper (Edwards et al., 2004), zeigte sich nach 4 Wochen ein deutliches Ansprechen, welches anhand der Veränderungen von MRP8/14 und DAS28 festgestellt werden konnte. Anhand dieser Untersuchungen wurde geschlussfolgert, dass MRP8/14 ein geeigneter Marker zur Feststellung der Wirksamkeit einer Therapieeinstellung bereits im frühen Stadium sein kann (Choi et al., 2015a). Zu ähnlichen Ergebnissen ist eine weitere Studie gekommen (Patro et al., 2016). Sie konnten feststellen, dass Therapie-Responder bei Baseline deutlich höhere MRP8/14 Werte aufzeigten als die Non-Responder. Als Ergebnis wertete man MRP8/14 als guten Vorhersagemarker für das Ansprechen einer Therapie bspw. mit Methotrexat. Dies jedoch mit der

Einschränkung, dass die Patienten eine Krankheitsdauer von nicht länger als einem Jahr aufweisen (Patro et al., 2016).

Eine weitere interessante Erkenntnis konnte bei der Untersuchung von Calprotectin bei 96 Personen einer gesunden Kontrollgruppe gewonnen werden. Es zeigten sich signifikant niedrigere Calprotectinwerte bei Frauen verglichen mit Männern, wohingegen RA-Patienten keinen geschlechtsspezifischen Unterschied bezüglich des Calprotectin aufwiesen (Nielsen et al., 2018).

1.9. Antikörper gegen acetylierte Proteine (AAPA)

Bereits 2011 konnte in Untersuchungen festgestellt werden, dass Antikörper gegen Antigene verschiedener post-translationaler Modifikationen (PTM) in Seren von RA-Patienten vorhanden sind und eine prognostische Aussagekraft haben können (Shi et al., 2011). Neben den Antikörpern gegen citrullinierte Peptide (ACPA) wurden Antikörpern gegen acetylierte Proteine (AAPA) hinsichtlich ihrer Bedeutung als Marker für die rheumatoide Arthritis untersucht.

Die Acetylierung von Proteinen ist eine gängige Modifikation. Sie erfolgt an Lysinresten der N-epsilon-Aminogruppe eines Proteins (Gershey et al., 1968). Die Acetylierung von Lysin kann unterschiedliche Funktionen erfüllen: Es dient bei Histonproteinen der Regulierung der nukleären Transkription (Allfrey et al., 1964) oder es kann Enzymfunktionen und metabolische Wege beeinflussen (Zhao et al., 2010). Die Acetylierung selbst ist reversibel (Juarez et al., 2016).

In einer Studie konnte eine hohe Prävalenz von AAPAs (39% positiv für Antikörper gegen acetyliertes Ornithin, 33% für Antikörper gegen acetyliertes Lysin, 48% für Antikörper gegen acetyliertes inverses Lysin) bei Patienten mit früher rheumatoider Arthritis feststellen (Studenic et al., 2018). Sie konnten abschließend feststellen, dass AAPAs dazu geeignet sind, bei Patienten mit zuvor als seronegativ diagnostizierter rheumatoider Arthritis die serologischen Diagnostikmöglichkeiten zu erweitern und damit ACPA und RF bei der Diagnosestellung einer rheumatoiden Arthritis zu ergänzen (Studenic et al., 2018).

Eine Studie hat untersucht, in wie weit sich die Titer von AAPAs bei RA-Patienten in stabiler Remission bei Dosisreduktion der DMARD-Therapie verändern und ob dies Auswirkungen auf die Entwicklung eines Krankheitsschubes hat. Sie ist zu dem Schluss

gekommen, dass die Veränderungen der AAPA-Titer das Risiko eines Krankheitsschubs bestimmen können (Figueiredo et al., 2016). Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es nicht ausreichend Untersuchungen, inwiefern sich die Titer von AAPAs im Verlauf einer Therapie verhalten. Im Rahmen eines gut charakterisierten Patientenkollektivs dieser Arbeit mit Verlaufsproben zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 werden diese Veränderungen unter Therapie geprüft.

1.10. Zielsetzung

Anhand der bereits in der Literatur zu findenden Auswertungen wird ersichtlich, dass es sich beim Calprotectin um ein Protein handelt, welches bei der rheumatoiden Arthritis vorwiegend im entzündeten Synovialgewebe nachgewiesen werden kann und damit eine Möglichkeit bietet, eine gelenknahe Krankheitsaktivität widerzuspiegeln (Odink et al., 1987) (Zwadlo et al., 1988). Es bestehen bereits einige Erfahrungen hinsichtlich des Stellenwerts des Calprotectins als Aktivitäts- und Verlaufsmarker bei etablierter rheumatoider Arthritis, jedoch ist gegenwärtig eine geringe Anzahl an Studien mit heterogenen Ergebnissen bekannt, die das Verhalten von Calprotectin bei früher rheumatoider Arthritis unter Therapie (DMARDs inklusive Biologika) untersucht und mit bekannten Aktivitätsmarkern wie CRP und BSG verglichen haben.

Ebenso sind aktuell wenige kommerzielle ELISA-Kits für die Bestimmung des Calprotectin im Serum verfügbar, deren Nutzen im klinischen Alltag bei der Diagnosestellung und Verlaufsbeobachtung bei früher rheumatoider Arthritis untersucht wurden.

Das Ziel dieser Arbeit ist nun folgende Fragestellungen bzw. Annahmen beantworten zu können:

Fragestellung:

1. Welcher Referenzwert der Calprotectinserumkonzentration lässt sich für einen nicht kommerziellen ELISA-Immunoassay anhand der Seren einer gesunden Kontrollgruppe und von Früh-RA-Patienten bestimmen?

2. Ist Calprotectin ein geeigneter Aktivitäts- und Verlaufsmarker bei früher unbehandelter rheumatoiden Arthritis (DMARD-naiv) unter Therapie?

Dazu sollen die Calprotectinserumkonzentrationen mit der subjektiven Wahrnehmung der Patienten hinsichtlich ihres Gesundheitszustandes, gängigen objektiven Parametern sowie Krankheitsaktivitätsscores im Verlauf unter Therapie verglichen

werden (HAQ, DAS28, SDAI/CDAI, ACR20/50/70 Ansprechen, Anzahl der geschwollenen und schmerzhaften Gelenke).

3. Verhält sich Calprotectin ähnlich wie CRP und BSG unter Therapie oder bietet es im Vergleich zum CRP und BSG Vorteile bei früher rheumatoider Arthritis?

Aufgrund der gelenknahen Freisetzung von Calprotectin besteht die Vermutung, dass Calprotectin unabhängig einer systemischen Entzündungshemmung im Rahmen einer Therapie in der Lage ist, weiterbestehende Gelenkentzündungen aufzeigen zu können.

4. Wie verändern sich die Titer von AAPAs (Antibodies against acetylated peptides) unter Therapie?

Wie anhand einer Studie bereits festgestellt werden konnte, sind AAPA ein häufiges aber noch wenig verstandenes Phänomen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Es wird dabei diskutiert, ob sie als Ergänzung zu RF und ACPA bei der Diagnosestellung dienen und diese erleichtern können (Studenic et al., 2018). Die AAPA-Titer unter Therapie sind dabei noch nicht ausreichend untersucht. Aus diesem Grund prüft diese Arbeit anhand von drei verschiedenen AAPA-Modifikationen (Antikörper gegen acetyliertes Lysin, gegen acetyliertes Ornithin und gegen acetyliertes inverse Lysin) die Titerveränderungen bei Patienten mit früher rheumatoider Arthritis unter Therapie (Adalimumab + MTX in Kombinationstherapie vs. MTX-Monotherapie).

Diese Fragestellungen werden anhand der Untersuchung von Patientenseren einer Früharthritiskohorte aus der kontrollierten klinischen Studie „HIT HARD“ untersucht.

Es handelt sich hierbei um ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv mit Verlaufsproben zu den Zeitpunkten Tag 0, Woche 24 und Woche 48.

2. Material und Methoden

Um die Fragestellung dieser Arbeit beantworten zu können, wurden Seren eines Patientenkollektivs untersucht, welche im Rahmen des HIT-HARD-Studie-Begleitprojekts erfasst wurden. Die Patientenserumproben wurden von Juni 2007 bis September 2010 multizentrisch gesammelt. Der primäre Endpunkt der HIT-Hard-Studie (High-Induction Therapy with anti-rheumatic drugs-Studie), welche unter der Leitung von Prof. Dr. Burmester, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt worden ist, befasste sich damit, ob eine kombinierte Therapie aus Adalimumab und MTX für 24 Wochen bei frühzeitigem Einsatz (Beschwerdedauer der RA <12 Monaten) und anschließender 24-wöchiger Fortsetzung mit einer Monotherapie (Methotrexat) im Vergleich zu einer durchgehenden MTX-Monotherapie zu einem signifikant besseren DAS28 (Disease Activity Score 28) zu Woche 48 führen kann (Detert et al., 2013). Als weiteres Ziel der Studie sollte untersucht werden, welcher Prozentsatz der Patienten zum einen eine Remission der Krankheitsaktivität und zum anderen welcher Prozentsatz an Patienten ACR20, ACR50 und ACR70 erreicht hat (Detert et al., 2013).

Von den insgesamt n= 172 für die HIT-Hard-Studie rekrutierten Patienten stimmten n=97 der Teilnahme im Biomarkerprojekt zu, von denen in n=63 Fällen Serumproben zu Baseline sowie zu Woche 24 und 48 verfügbar waren. Einverständniserklärungen der Patienten sowie ein Ethikvotum von der Ethikkommission der Charité (EK-Nr. 7 500/06) liegen vor.

Von den 63 verfügbaren Patientenserumproben, sind n=32 der Therapiegruppe 1 und n=31 der Therapiegruppe 2 im Rahmen der Hit-Hard-Studie zuzuordnen (Detert et al., 2013). Gruppe 1 erhielt für 24 Wochen eine Kombinationstherapie aus Adalimumab und Methotrexat. Nach 24 Wochen wurde die Kombinationstherapie beendet und mit Methotrexat fortgesetzt, während die Gruppe 2 zu Studienbeginn bereits eine Monotherapie mit Methotrexat erhalten hat, die bis Woche 48 fortgeführt worden ist (Detert et al., 2013).

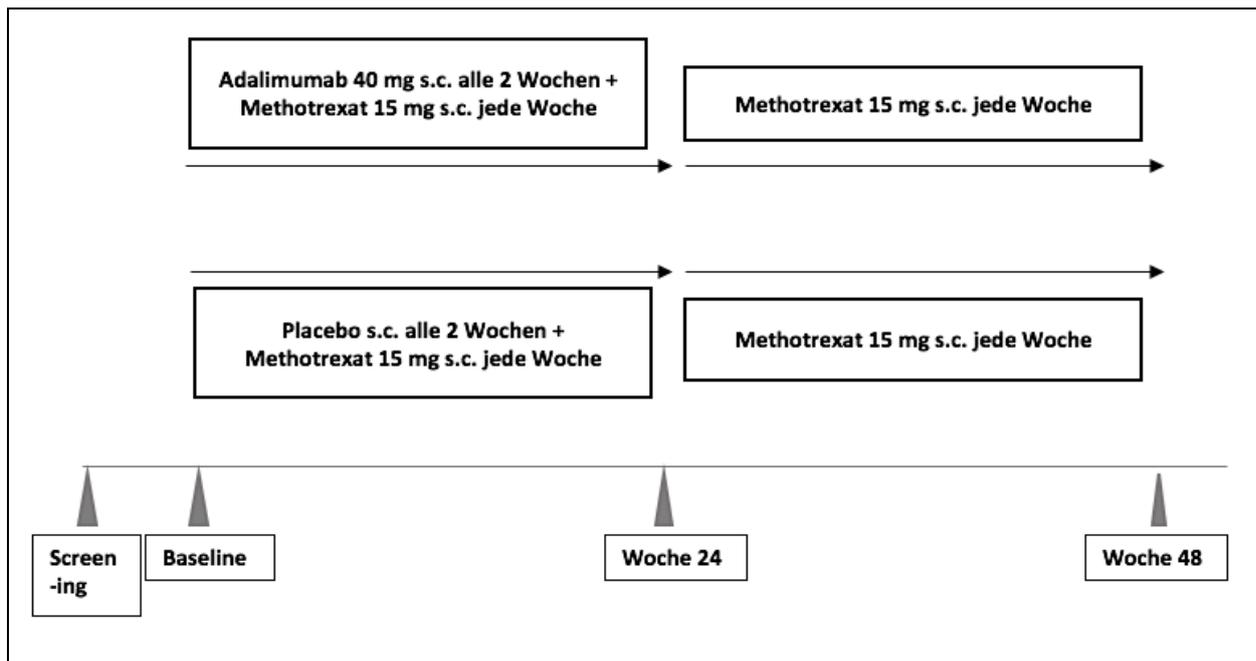


Abb.4 Studiendesign der HIT-Hard-Studie (Detert et al., 2013)

Zu den Visiten erfolgte eine venöse Blutentnahme sowie eine Evaluation der Krankheitsaktivität mittels Fragebögen und körperlicher Untersuchung. Die Laboruntersuchung umfasste Werte wie die BSG, den CRP und serologische Marker für das Biomarkerprojekt. Die Krankheitsaktivität wurde anhand des DAS28, HAQ und der ACR-Response-Kriterien ermittelt. Mittels einer körperlichen Untersuchung wurden druckschmerzhaft (Tender joint count = TJC) und geschwollene Gelenke (swollen joint count = SJC) bestimmt (Detert et al., 2013).

Die weiterführende serologische Bestimmung im Rahmen des Biomarkerprojekts umfasste die Bestimmung des Calprotectins sowie die Bestimmung von Antikörpern gegen anti-acetylierte Proteine (AAPA = Acetyliertes Lysin). Als Kontrolle der AAPA Spezifität wurde acetyliertes Ornithin und inverses Lysin als weitere Modifikationen des Vimentins gewählt.

2.1. Allgemeine Charakterisierung des Patientenkollektivs

Die 63 Patienten, deren Seren untersucht wurden, lassen sich folgendermaßen charakterisieren: Die Rekrutierung erfolgte multizentrisch in Deutschland. Die Patienten sind überwiegend weiblich (19 männlich, 44 weiblich). Bezüglich der Altersspanne in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen hat die Gruppe der Kombinationstherapie

ein durchschnittliches Alter für Männer von 51,1 (STD +/-13,8) und für Frauen von 42,68 (+STD 10,3). Die Monotherapiegruppe hat ein durchschnittliches Alter für Männer von 56,2 (+STD 13,1) Jahren und für Frauen 50,32 (+14,3) mit Minimum bzw. Maximum von 44 und 62 Jahren.

Die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug 63 Tage mit der niedrigsten bzw. höchsten Dauer von 1 bis 352 Tagen. Ferner konnte das Rauchverhalten erfasst werden: 29 Nichtraucher, 16 Raucher und 18 Ex-Raucher. Alle untersuchten Patienten waren zum Einschlusszeitpunkt sowohl DMARD als auch Biologika naiv. 44 Patienten nahmen bereits beim Einschlusszeitpunkt nichtsteroidale Antirheumatika, vorwiegend Diclofenac und Ibuprofen, 30 Patienten nahmen desweiteren Prednisolon (<10 mg) ein. Der DAS28 betrug im Durchschnitt zu Beginn der Studie 6,17 mit einer Standardabweichung von $\pm 0,87$ (Minimum 4,28, Maximum 8,07).

2.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Die randomisierten Patienten erfüllten die Klassifikationskriterien für eine rheumatoide Arthritis entsprechend der ACR-Kriterien (American College of Rheumatology) für die Klassifikation der rheumatoiden Arthritis von 1987. Die Dauer der Beschwerden zum Screeningzeitpunkt sollte nicht länger als ein Jahr betragen. Es mussten mindestens 6 geschwollene und 6 schmerzhafte Gelenke vorliegen. Eine Morgensteifigkeit von über 30 min, eine BSG von >28mm/h und ein CRP > 1mg/dl waren weitere Einschlusskriterien (Detert et al., 2013).

Patienten, die bereits eine Therapie mit konventionellen DMARDs (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs) oder Biologika erhalten haben, wurden ausgeschlossen. Vorbehandlungen mit nicht-steroidalen Antirheumatika und Prednisolon waren nur erlaubt, wenn sie bereits zwei Wochen vor Studienbeginn stabil beibehalten wurden. Bezüglich des Prednisolons durfte die Dosis nicht über 10 mg/Tag liegen (Detert et al., 2013). Eine latente Tuberkulose stellte kein Ausschlusskriterium dar und wurde prophylaktisch mittels Isoniazid für eine Behandlungsdauer von 9 Monaten therapiert. Ausgeschlossen wurden Patienten mit aktiven Infektionskrankheiten, Immundefizienz sowie anderen rheumatischen Erkrankungen. Eine Lebendimpfung innerhalb der vorangegangenen 4 Wochen vor Screening sowie intraartikuläre kortisonhaltige Injektionen führten ebenfalls zum Ausschluss (Detert et al., 2013).

2.3. Calprotectinbestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 63 Patientenseren mit Hilfe eines nicht-kommerziellen ELISA („Enzyme-linked-Immunsorbent Assay“) auf das Vorhandensein von Calprotectin (S100A8/9) untersucht.

2.3.1. Funktionsweise des ELISA zur Messung des Serum-Calprotectin

Die Untersuchung des Calprotectin im Serum erfolgte mittels eines nicht kommerziellen Calprotectin- ELISA-Kits der Firma Orgentec Diagnostika, Mainz, Germany. Das Funktionsprinzip dieser Untersuchung entspricht einem Sandwich- ELISA. Die Oberfläche der Reaktionskavitäten ist mit anti-Calprotectin-Antikörpern beschichtet. Die im Patientenserum nachzuweisenden Calprotectin-Antigene binden an diesen Antikörper. Es kommt zu einem Antigen-Antikörperkomplex. Nach einer Inkubationszeit von 30 min werden die Kavitäten mit 3x 300 µl Waschpuffer gewaschen. Damit sollen nicht-gebundene Moleküle entfernt werden. Im nächsten Schritt binden synthetisch hergestellte und mit Peroxidase markierte Antikörper gegen Calprotectin an den bereits gebildeten Antigen-Antikörper-Komplex. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird das ungebundene Enzymkonjugat mittels eines Waschvorgangs mit Waschpuffer (3x300µl) entfernt. Anschließend oxidiert die den Antigen-Antikörper-Komplex markierende Peroxidase das hinzugefügte Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin zu einem bläulichen Endprodukt (oxidiertes TMB). Durch das Hinzufügen einer gebrauchsfertigen, sauren Stopplösung (Schwefelsäure) kommt es zu der Bildung eines gelblichen Farbkomplexes. Die optische Dichte des gelblichen Farbkomplexes korreliert mit der Konzentration der Antigen-Antikörper-Komplexe und wird photometrisch bestimmt. Mittels der Kalibrierung von Standardlösungen mit aufsteigenden Konzentrationen konnte parallel eine Standardkurve generiert werden, die nach Bestimmung der optischen Dichten der einzelnen Kavitäten für die Konzentrationsbestimmung an Calprotectin genutzt wurde (ORGENTEC Diagnostika GmbH, 2018).

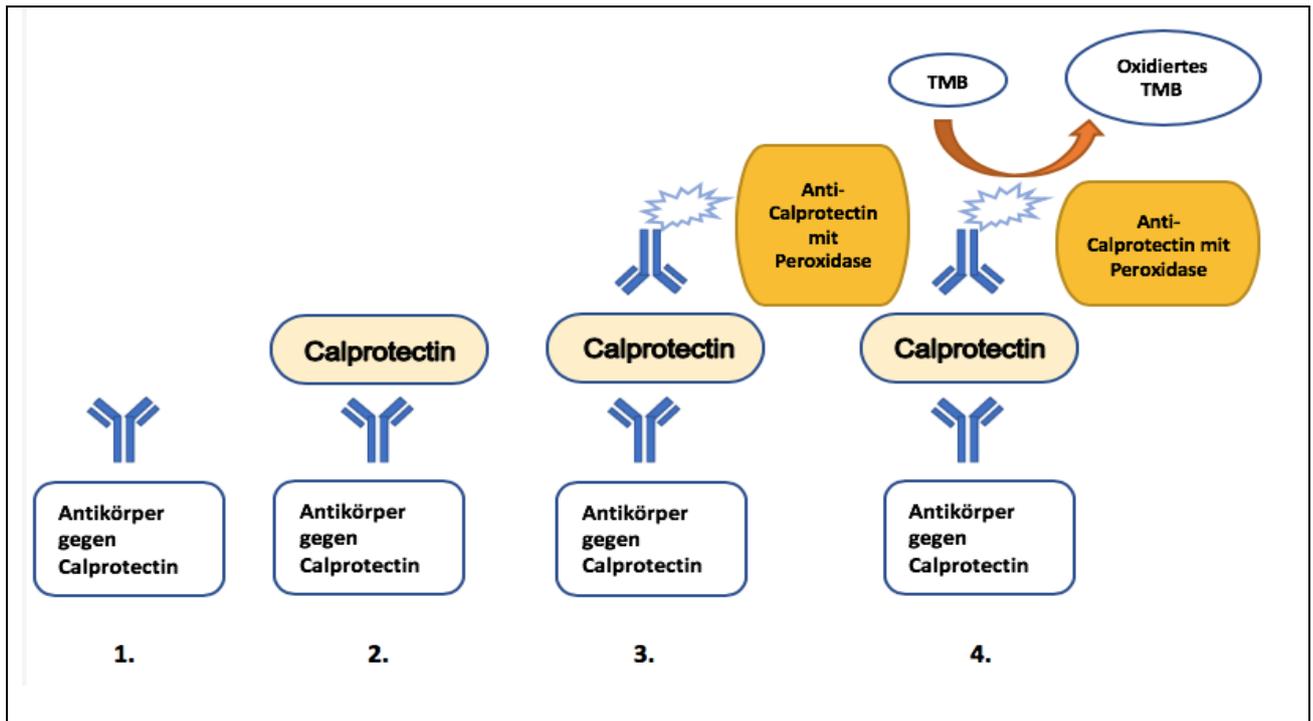


Abb. 5 Sandwich- ELISA-Verfahren zur Detektierung des Calprotectin in Patientenseren.

Diese Abbildung soll das ELISA-Verfahren, welches in den Kavitäten des Mikrotiterplatten erfolgt ist, beschreiben. Vorab sind am Boden der Kavitäten Antikörper gegen Calprotectin gebunden (1). Durch Zugabe des Patientenserums binden diese Antikörper enthaltenes Calprotectin (2). Bei dem darauffolgenden Waschvorgang wird die Kavität von ungebundenen Bestandteilen gereinigt und es wird ein Antikörper-Enzymkonjugat mit Peroxidase hinzugegeben (3). Durch die anschließende Zugabe der Substratlösung (3,3-5,5 Tetramethylbenzidin) verfärbt sich die Lösung bläulich aufgrund der Oxidation des TMB durch die Peroxidase.

2.3.2. Assaydurchführung – Fließschema zur Durchführung eines Calprotectin-ELISA

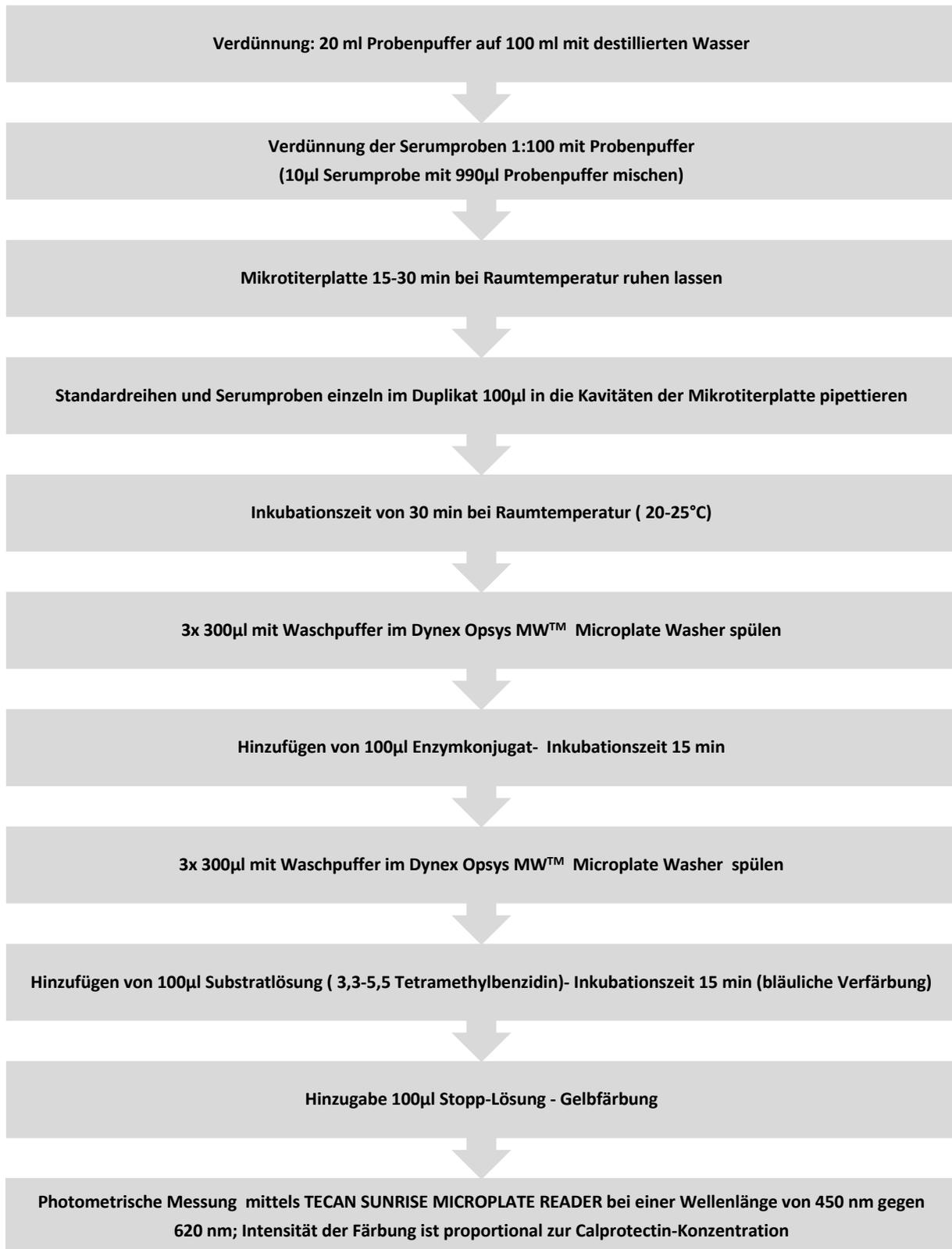


Abb.6 ELISA-Fließschema

2.4. ELISA zur Bestimmung von AAPA (Antikörper gegen acetyliertes Lysin)

Die Messung zur Bestimmung der AAPA wurde mittels eines ELISA-Kits der Firma Orgentec Diagnostika GmbH Germany durchgeführt. Die Daten wurden retrospektiv zur Verfügung gestellt und im Rahmen des Begleitprojektes der HIT-HARD-Studie liegen entsprechend Einverständniserklärungen für dieses Begleitprojekt sowie ein Ethikvotum der Ethikkommission (EK-Nr. 7 500/06.) vor (Detert et al., 2013).

Die ELISA-Kits wurden von der Firma ORGENTEC Diagnostika GmbH Germany zur Verfügung gestellt. Der Cut-Off-Wert bei der Bestimmung der AAPA beträgt 20 U/l (Studenic et al., 2018). Die Assaydurchführung entspricht dem Fließschema zur Durchführung des Calprotectin-ELISA, mit dem Unterschied, dass es sich hierbei um einen direkten ELISA handelt. Der ELISA verwendet als Antigen ein Peptid, eine 12 Aminosäuresequenz, welches von dem Vimentin eines MCV (Mutiertes Citrulliniertes Vimentin)-Assay abgeleitet wurde (Juarez et al., 2016)(Bang et al., 2007). An seiner Position 7 von insgesamt 12 Aminosäuren wird es so verändert, dass eine entsprechende Modifikation angefügt werden kann. In diesem Fall handelt es sich um acetyliertes Lysin (Juarez et al., 2016). Als Kontrolle und zur besseren Spezifizierung der Bestimmung von AAPAs wurde alternativ ein mit acetyliertem Ornithin modifiziertes Vimentin (ebenfalls angebunden an Position 7) sowie ein mit acetyliertem inversen Lysin Vimentin (modifiziert an Position 2) als Antigen verwendet (Studenic et al., 2018).

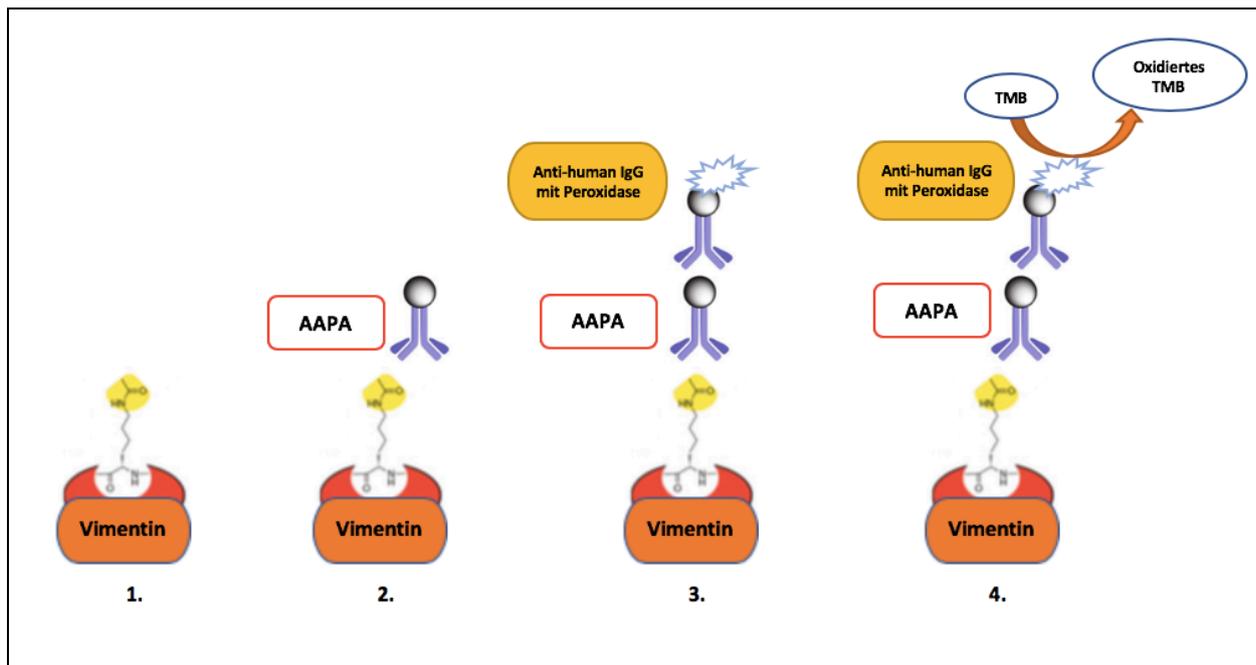


Abb.7 Direktes ELISA-Verfahren AAPA modifiziert nach (Finkemeier and Schwarzer, 2013).

Diese Abbildung beschreibt das direkte ELISA-Verfahren, welches in den Kavitäten der Mikrotiterplatten erfolgt. Vorab sind am Boden der Kavitäten ein mit acetyliertem Lysin modifiziertes Vimentin als Antigen gebunden(1). Durch Zugabe des Patientenserums binden die Antikörper gegen acetylierte Antigene sich an das modifizierte Antigen(2). Bei dem darauffolgenden Waschvorgang wird die Kavität von ungebundenen Bestandteilen gereinigt und es wird ein Anti-human IgG mit Peroxidase hinzugegeben, welches den Antigen-Antikörper-Komplex bindet (3). Durch die anschließende Zugabe der Substratlösung (3,3-5,5 Tetramethylbenzidin) verfärbt sich die Lösung bläulich aufgrund der Oxidation des TMB durch die Peroxidase.

2.5. Ermittlung des Cut-off-Werts des Calprotectin

Da es sich bei dem Anti-Calprotectin- ELISA-Kit der Firma Orgentec um kein kommerzielles Kit handelt, war die Rekrutierung von Seren gesunder Probanden notwendig. Diese Rekrutierung ist im Rahmen der Arthromark-Studie erfolgt, es liegen Einverständniserklärungen der Patienten sowie ein Ethikvotum der Ethikkommission (EK-Nr. 01EC1009A) vor. Es wurden insgesamt 67 weibliche und 33 männliche Normalspenderseren mit einem mittleren Alter von 32,1 gesammelt. Da sich bei der Bestimmung der Calprotectinkonzentration der Normalspender höhere Cut-off-Werte zeigten verglichen mit den 300 Normalspendern, die Orgentec zur Cut-off Bestimmung seiner noch nicht kommerziellen ELISA-Kits erhalten hat, wurde der cut-off-Wert wie im weiteren Verlauf beschrieben, mittels einer ROC-Analyse erneut bestimmt.

2.6. Statistische Analyse

Anhand der im Kapitel 2.3. durchgeführten Untersuchungen konnten Calprotectinkonzentrationswerte der beiden Behandlungsgruppen (Adalimumab+MTX vs. MTX-Monotherapie) zu den Zeitpunkten 0, Woche 24 und Woche 48 bestimmt werden. Der Cut-off-Wert der Calprotectinkonzentration im Serum wurde mittels einer ROC (Receiver Operating Characteristic) - Analyse bestimmt. Da bei der Bestimmung der Calprotectinkonzentration stets ein Duplikat zusätzlich hergestellt wurde, handelt es sich um die in dieser Arbeit verwendeten Calprotectinkonzentrationen um Mittelwerte dieser beiden Messungen. Desweiteren werden in einzelnen Abschnitten Calprotectinkonzentrationswerte in den beiden Wochenintervallen Woche 0 bis Woche 24 bzw. Woche 24 bis Woche 48 anstelle von einzelnen Calprotectinkonzentrationswerte zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 angegeben. Dies hat den Hintergrund, dass dadurch in den einzelnen Abschnitten die Wirkung einzelner Ausreißerwerte minimiert werden soll.

Um die Nullhypothese H_0 , die Calprotectinkonzentration im Serum zeigt keine Abhängigkeit zur Therapie (Adalimumab+ MTX vs. MTX-Monotherapie), zu überprüfen, wurde zunächst im Rahmen der statistischen Analyse bewiesen, dass zum Zeitpunkt 0 bei den zu untersuchenden Variablen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Therapiegruppen bestehen. Anschließend wurden die Veränderungen der Calprotectinserumwerte im zeitlichen Verlauf unter Therapie innerhalb der beiden Therapiegruppen untersucht (abhängige/verbundene Stichproben, Mann-Whitney-U-Test). In einem weiteren Schritt wurde dieses Verhalten mit anderen Variablen (CRP, BSG, DAS28, HAQ, TJC/SJC, ACR20/50/70, AAPA) verglichen. Als Signifikanzniveau (p -Niveau) wurden 5% ($p=0,05$) mit einem Konfidenzintervall von 95% verwendet.

Zunächst wurde mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests untersucht, ob es sich bei den untersuchten Variablen in ihrer Grundgesamtheit um Normalverteilungen handelt. Da bezüglich des DAS28 und des HAQ zum Zeitpunkt 0 eine Normalverteilung vermutet wurde, wurde hierzu zusätzlich der Levene-Test zur Überprüfung der Gleichheit der Varianzen und im Anschluss, da anhand des Levene-Tests die Normalverteilung bestätigt werden konnte, der t-Test zur Überprüfung signifikanter Unterschiede genutzt.

Da es sich bei den restlichen Variablen, wie anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests festgestellt, um keine Normalverteilungen handelt, wurde in diesem Fall zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede der Mann-Whitney- U-Test verwendet.

Bei den Korrelationsanalysen wurde die monotonen Zusammenhänge (mittels des Spearman-Rho-Tests) zwischen den Variablen auf relevante Zusammenhänge untersucht.

Im weiteren Verlauf wurde der Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest verwendet, um zu überprüfen, in wie weit die ACR-Response-Kriterien von den unterschiedlichen Therapiemaßnahmen beeinflusst werden.

Die statistische Analyse erfolgte mittels IBM SPSS Software Version 25.

3. Ergebnisse

3.1. Ermittlung des Cut-off-Wertes von Calprotectin und Anwendung auf das Patientenkollektiv

Anhand der Calprotectin-Konzentrationswerte von Normalspendern sowie von Patienten mit früher rheumatoider Arthritis konnte mittels einer ROC (Receiver Operating Characteristic)-Analyse der Cut-off-Wert bestimmt werden. Der Punkt mit dem kleinsten Abstand zur linken oberen Ecke befindet sich bei 5,3 µg/ml der Erstmessung der Calprotectinkonzentration. Bei der Bestimmung des Duplikats ergibt sich ein Wert von 5,7 µg/ml.

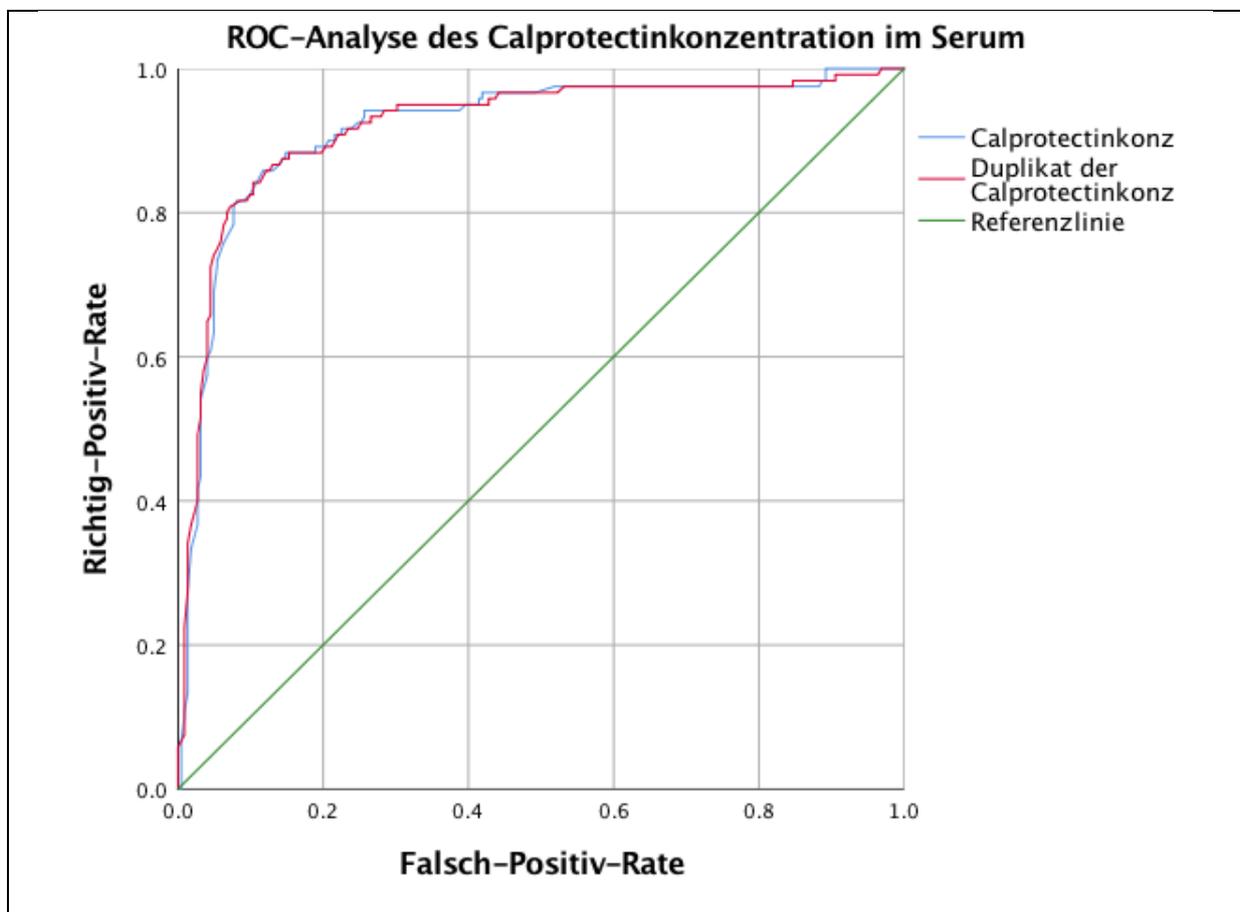


Abb.8 ROC (Receiver Operating Characteristic) der Calprotectinbestimmung im Serum (µg/ml)

3.2. Ausgangswerte

Tab.3 Geschlechter- und Altersverteilung der rekrutierten Patienten

Geschlechter- und Altersverteilung der rekrutierten Patienten mit früher rheumatoiden Arthritis
(Kombinationstherapie= Adalimumab + Methotrexat; Monotherapie =Methotrexat)

			Gruppe		Minimum Alter	Maximum Alter
			Kombinations- therapie Adalimumab + MTX	Mono- therapie MTX		
Geschlecht, Randomi- sierung	m	Anzahl	7	12		
	w	Anzahl	25	19		
Alter	Mittelwert m		51,1	56,2	35	75
	Standardab- weichung m		13,8	13,1		
	Mittelwert w		42,68	50,32	20	70
	Standardab- weichung w		10,3	14,3		

Tab.4 Rauchverhalten des Patientenkollektivs

Diese Tabelle zeigt, dass die Calprotectinkonzentration bei Rauchern deutlich höher ist als bei Nicht-Rauchern und Ex-Rauchern. Im weiteren Verlauf zu Woche 24 bzw. 48 gleichen sich die Calprotectinkonzentration in allen drei Gruppen an einander an.

Rauchverhalten	Calprotectin- konzentration Tag 0	Calprotectin- konzentration Woche 24	Calprotectin- konzentration Woche 48
Nicht-Raucher (n=28)	22,86 µg/ml	15,97µg/ml	14,55 µg/ml
Raucher (n=17)	34,28 µg/ml	16,05 µg/ml	17,13 µg/ml
Ex-Raucher (n= 18)	20 µg/ml	13,92 µg/ml	16,23 µg/ml

Tab.5 Serologische Verteilung innerhalb des Patientenkollektivs

Serologie	Anzahl der Patienten (n)	Anteil der Patienten in %
ACPA-/RF-	n=14	22,58%
ACPA-/RF+	n=11	17,74%
ACPA +/RF-	n=1	1,61%
ACPA+/RF+	n=36	58,06%

Es wurden insgesamt 63 Patienten mit einer diagnostizierten frühen rheumatoiden Arthritis zu zwei Behandlungsgruppen randomisiert. Eine Behandlungsgruppe beinhaltet eine Kombinationstherapie aus Adalimumab und Methotrexat, die bis zu Woche 24 beibehalten wurde. Ab der Woche 24 wurde die Kombinationstherapie durch eine Monotherapie mit Methotrexat ersetzt. Die andere Gruppe erhielt 48 Wochen durchweg eine Monotherapie mit Methotrexat. 32 Patienten, davon 7 Männer und 25 Frauen, erhielten zu Beginn eine Kombinationstherapie (Adalimumab+ MTX), während 31, davon 12 Männer und 19 Frauen, 48 Wochen mit Methotrexat behandelt worden sind. Bezüglich der Altersspanne in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen hat die Gruppe der Kombinationstherapie ein durchschnittliches Alter für Männer von 51,1 (+STD 13,8) und für Frauen von 42,68 (+STD 10,3). Die Monotherapiegruppe hat ein durchschnittliches Alter für Männer von 56,2 (+STD 13,1) Jahren und für Frauen 50,32 (+14,3) mit Minimum bzw. Maximum von 44 und 62 Jahre .Insgesamt besteht in diesem Patientenkollektiv ein hoher Anteil an zweifach seropositiven rheumatoiden Arthritiden (ACPA+/RF+) (Tab.6). Den zweitgrößten Anteil dieses Patientenkollektivs bilden die seronegativen rheumatoiden Arthritiden (ACPA-/RF-).

Anhand Tab. 5 wird aufgezeigt, dass sich die höchste Calprotectinkonzentration zu Baseline bei den Rauchern aufzuweisen ist, gefolgt von den Nicht-Rauchern. Im Verlauf der Therapie gleichen sich jedoch die Werte aneinander an.

3.2.1. Überprüfung der Normalverteilung der Ausgangswerte

Zur richtigen Beurteilung der zu untersuchenden Verlaufsparemeter (Calprotectin, CRP, BSG, DAS28 und HAQ) und ihrer Korrelation zu einander, wurden diese Werte zum Ausgangszeitpunkt hinsichtlich ihrer Normalverteilung untersucht. Die Untersuchung auf die Frage nach Normalverteilung dient der Entscheidung, ob im weiteren Verlauf ein parametrischer (t-Test) oder ein nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney-U-Test) zur Feststellung signifikanter Unterschiede anzuwenden ist.

Tab.6 Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest

Anhand des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests werden die Variablen Calprotectin, CRP, BSG, DAS28 und HAQ auf Normalverteilungen in beiden Therapiegruppen untersucht. Die Nullhypothese lautet: Die Daten sind normalverteilt. Mit einer Signifikanz unter dem Signifikanzniveau wird die Nullhypothese abgelehnt. Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass Calprotectin, CRP und BSG nicht normalverteilt sind. DAS28 und HAQ sind normalverteilt.

		Calprotectin Tag 0	CRP Wert, Tag 0	BSG Wert, Tag 0	DAS28, Tag 0	HAQ Tag 0
N		63	62	63	63	63
Parameter der Normalverte ilung ^{a,b}	Mittelwert	25,30	2,54	38,63	6,17	1,33
	Std.- Abweichung	30,88	2,44	17,40	,85	,60
Asymptotische Signifikanz des Kolmogorov-Smirnov- Tests		,00 ^c	,00 ^c	,00 ^c	,20 ^{c,d}	,20 ^{c,d}

Anhand des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests wird ersichtlich, dass es sich bei den Werten des Calprotectin, des CRP und der BSG um keine Normalverteilungen handelt. Bezüglich des DAS28 und des HAQ wird zum Zeitpunkt 0 eine Normalverteilung nicht abgelehnt. Die Varianzgleichheit wurde daher mittels des Levene-Tests überprüft. Dieser zeigte erneut bei einem angenommenen Signifikanzniveau von $p=0,05$ für HAQ und den DAS28 keine signifikanten Varianzunterschiede in beiden Therapiegruppen. Dies ermöglicht die Verwendung des t-Tests zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede von DAS28 und HAQ innerhalb beider Therapiegruppen.

Tab.7 Deskriptive Statistik von DAS28 und HAQ zu Zeitpunkt 0

Anhand der Mittelwerte wird ersichtlich, dass sich der DAS28 und der HAQ zum Zeitpunkt 0 in beiden Therapiegruppen nicht wesentlich unterscheidet.

	Gruppe	N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Standard- fehler des Mittelwertes
DAS28, Screening	ADA +MTX	32	6,11	,84	,14
	MTX	31	6,24	,87	,15
HAQ, Screening	ADA+MTX	32	1,44	,63	,11
	MTX	31	1,23	,56	,10

Tab.8 Levene-Test zur Prüfung der Unterschiede der Varianzen bei DAS28 und HAQ zum Zeitpunkt 0

Anhand dieser Untersuchung konnte bestätigt werden, dass die Varianzen gleich sind. Aus diesem Grund konnte im weiteren Schritt der t-Test angewendet werden zur endgültigen Überprüfung auf signifikante Unterschiede. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des DAS28 und HAQ innerhalb beider Therapiegruppen zum Zeitpunkt 0 festgestellt werden.

t-Test (DF=Anzahl der Freiheitsgrade; T=empirische Prüfgröße des T-Tests)

Levene-Test		t-Test			
		Signifikanz	T	DF	Sig. (2seitig)
DAS28, Screening	Varianzen sind gleich	,98	-,62	61	,53
	Varianzen sind nicht gleich		-,62	60,71	,53
HAQ, Screening	Varianzen sind gleich	,48	1,38	61	,17
	Varianzen sind nicht gleich		1,38	60,61	,17

Da anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests festgestellt werden konnte, dass es sich bezüglich der Calprotectinserumkonzentration, dem CRP und der BSG zu Tag 0 um keine Normalverteilung handelt, kann in diesem Fall der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Tests zur Überprüfung signifikanter Unterschiede der Variablen zu Tag 0 in beiden Therapiegruppen angewandt werden. Der Mann-Whitney-U-Test konnte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Calprotectinserumkonzentration, dem CRP und der BSG zu Tag 0 in beiden Therapiegruppen finden.

Tab.9 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede in beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich Calprotectinserumkonzentrationswerte, CRP und BSG zum Zeitpunkt 0

	Calprotectin Tag 0	CRP Wert, Tag 0	BSG Wert, Tag 0
Asymptotische Signifikanz	,670	,683	,746

3.3. Verlaufsbeschreibung des Calprotectin

Tab. 10 Deskriptive Statistik der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48 (ADA+MTX= Adalimumab + Methotrexat; MTX = Methotrexat).

	Gruppe	N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
Calprotectinkonz. zu W0	ADA+MTX	32	23,35	26,09	4,61
	MTX	31	27,31	35,48	6,37
Calprotectinkonz. zu W24	ADA+MTX	32	16,35	9,96	1,76
	MTX	31	14,70	7,98	1,43
Calprotectinkonz. zu W48	ADA+MTX	32	15,81	9,70	1,71
	MTX	31	16,23	9,67	1,73
Calprotectinkonz. Δ Woche 0-24	ADA+MTX	32	-7,00	27,74	4,90
	MTX	31	-12,61	36,43	6,54
Calprotectinkonz. Δ Woche 24-48	ADA+MTX	32	-,53	9,41	1,66
	MTX	31	1,52	13,14	2,36

Werden die einzelnen Mittelwerte (Mittelwert aus Calprotectinserumkonzentration und seinem Duplikat) zu den drei unterschiedlichen Konzentrationszeitpunkten betrachtet, so ist ersichtlich, dass die Konzentrationen in beiden Gruppen, sowohl in der Kombinationstherapie (Adalimumab+ Methotrexat) als auch in der Monotherapiegruppe einen deutlichen Abfall der Calprotectin-Konzentration innerhalb der ersten 24 Wochen zeigen.

Im weiteren Verlauf zu Woche 48 kann jedoch keine ausgeprägte Reduktion der Calprotectinkonzentration im Serum in beiden Therapiegruppen verzeichnet werden. Ebenfalls bestehen nach Absetzen der Kombinationstherapie und anschließendem Übergang in die Monotherapie ähnliche Calprotectin-Werte wie bei der MTX-Monotherapiegruppe.

Bei der Betrachtung der Therapieintervalle von Woche 0-24 sowie Woche 24-48 hinsichtlich der beiden Gruppen in Bezug auf die Calprotectin-Konzentrationen, fällt auf, dass die Calprotectinwerte in der Kombinationstherapiegruppe interessanterweise im ersten Studienabschnitt Woche 0-24 einen geringeren Abfall aufweisen als in der Monotherapiegruppe mit MTX.

Hinsichtlich dieser Ergebnisse ist ersichtlich, dass es keine signifikanten Unterschiede der Calprotectinkonzentrationen bei Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie gibt.

Tab.11 Levene-Test zur Überprüfung der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie die Calprotectinserumkonzentrationmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48

Levene-Test			t-Test		
		Signifikanz	T	Df	Sig. (2-seitig)
Calprotectin-mittelwertkonz. zu Tag 0	Varianzen sind gleich	,207	-,506	61	,615
	Varianzen sind nicht gleich		-,504	55,054	,616
Calprotectin-mittelwertkonz. zu Woche 24	Varianzen sind gleich	,617	,722	61	,473
	Varianzen sind nicht gleich		,725	58,94	,471
Calprotectin-mittelwertkonz. zu Woche 48	Varianzen sind gleich	,965	-,171	61	,865
	Varianzen sind nicht gleich		-,171	60,94	,865
Calprotectin-konz. Δ Woche 0-24	Varianzen sind gleich	,252	,689	61	,493
	Varianzen sind nicht gleich		,686	56,05	,496
Calprotectin-konz. Δ Woche 24-48	Varianzen sind gleich	,047	-,718	61	,475
	Varianzen sind nicht gleich		-,714	54,27	,478

Der Levene-Test überprüft, in wie weit sich die Varianzen der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie die Calprotectinserumkonzentrationmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48 unterscheiden.; anhand dieser Untersuchung konnte bestätigt werden, dass die Varianzen gleich sind. Aus diesem Grund konnte im weiteren Schritt der t-Test angewendet werden zur endgültigen Überprüfung auf signifikante Unterschiede. Es

konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb beider Therapiegruppen zum Zeitpunkt 0 festgestellt werden. t-Test (DF=Anzahl der Freiheitsgrade; T=empirische Prüfgröße des T-Tests).

Da bereits im Vorfeld mittels des Kolmogorov-Smirnov- Anpassungstests bezüglich der Calprotectinwerte zu Tag 0 keine Normalverteilung festgestellt wurde, wird hinsichtlich der Prüfung auf signifikante Unterschiede innerhalb der Therapiegruppen der Mann-Whitney-U-Test zusätzlich angewandt. Dieser kann ebenfalls keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Therapiegruppen feststellen.

Tab. 12 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) im Intervall Woche 0-24 und Woche 24-48.

	Calprotectinkonz. zu W0	Calprotectinkonz. zu W24	Calprotectinkonz. zu W48	Calprotectinkonz_ Δ Woche 0-24	Calprotectinkonz_ Δ Woche 24-48
Asymptotische Signifikanz	,67	,57	,96	,82	,67

Anhand des Mann-Whitney-U-Tests lassen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Calprotectinkonzentration zwischen den beiden Behandlungsgruppen im Verlauf von 48 Wochen erkennen.

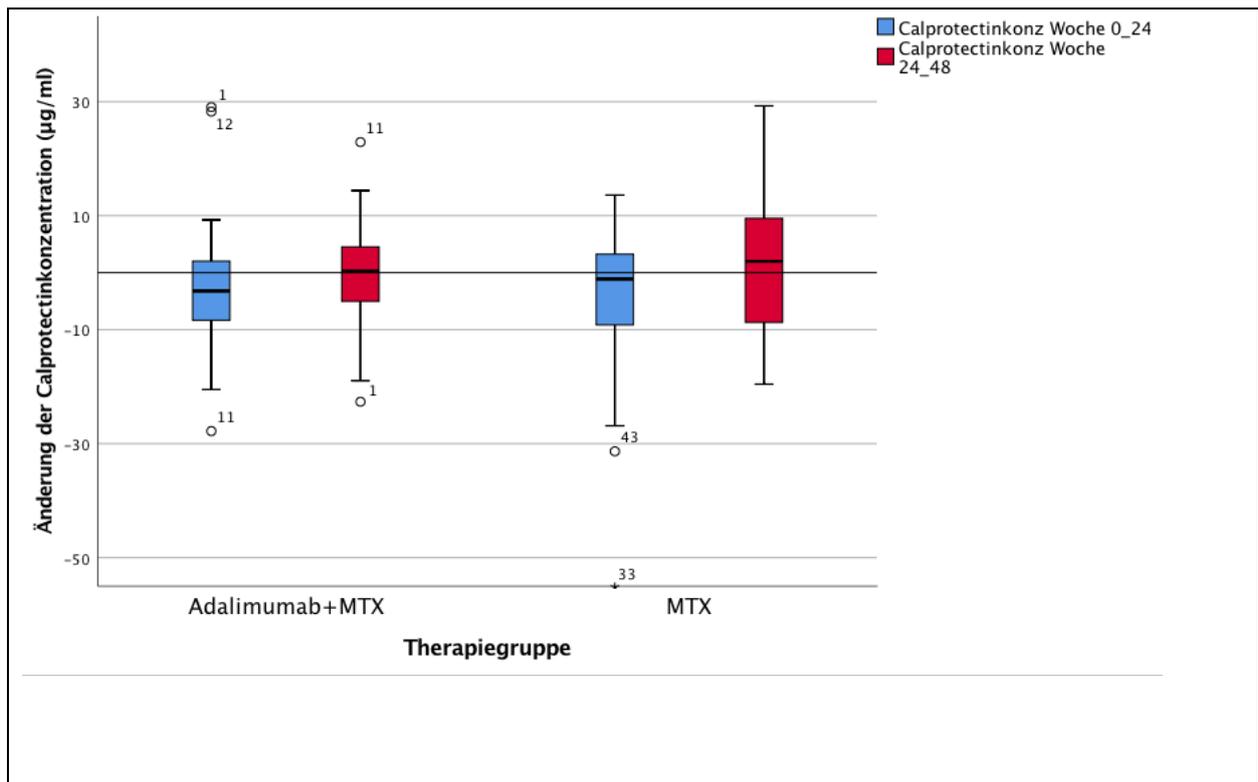


Abb. 9 Änderung der Serumkonzentration von Calprotectin bei RA-Patienten

Änderung der Serumkonzentration von Calprotectin bei RA-Patienten unterteilt nach zwei unterschiedlichen Therapiegruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX-Monotherapie). Die Boxplot zeigen den Median der Calprotectin-Serumkonzentrationen als horizontalen Balken. Das obere und untere Quartil und die Whisker zeigen das Ausmaß der Calprotectin-Serumkonzentrationen bei RA-Patienten an. Anhand dieser Abbildung ist ersichtlich, dass beide Therapiegruppen (Adalimumab + Methotrexat vs. Methotrexat- Monotherapie) in den ersten 24 Wochen eine deutliche Reduktion der Calprotectinserumkonzentration erfahren, die sich in den weiteren 24 Wochen nicht wesentlich verändert.

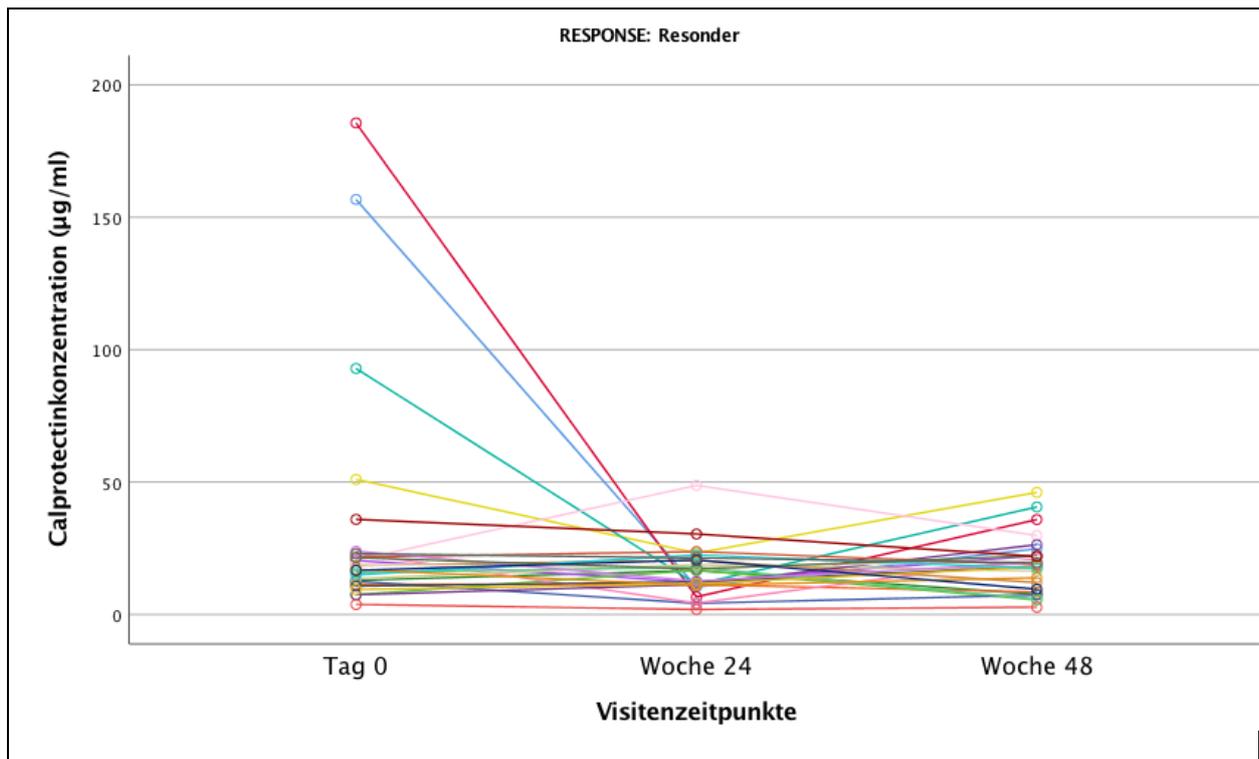


Abb.10 Calprotectinkonzentrationswerte (µg/ml) zusammengefasst bei beiden Behandlungsgruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX) im Verlauf bei Respondern

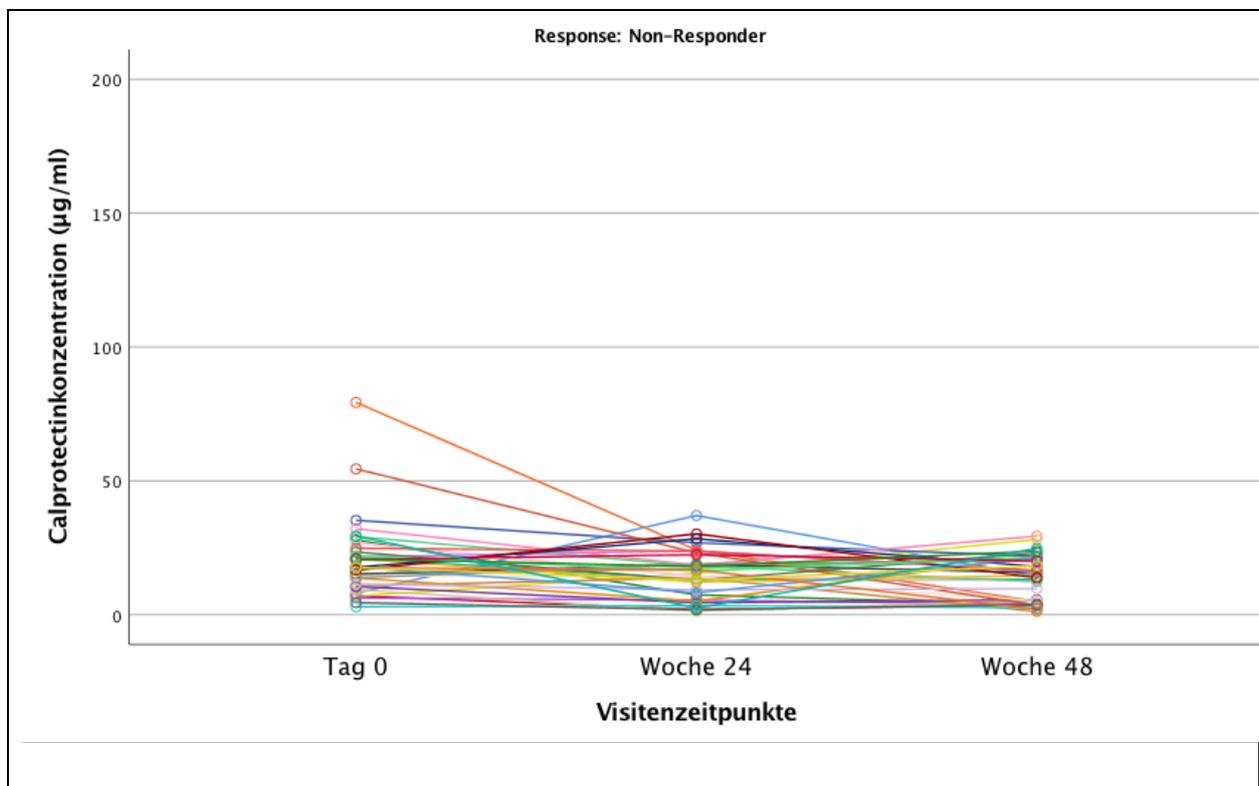


Abb. 11 Calprotectinkonzentrationswerte (µg/ml) zusammengefasst bei beiden Behandlungsgruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX) im Verlauf bei Non-Respondern

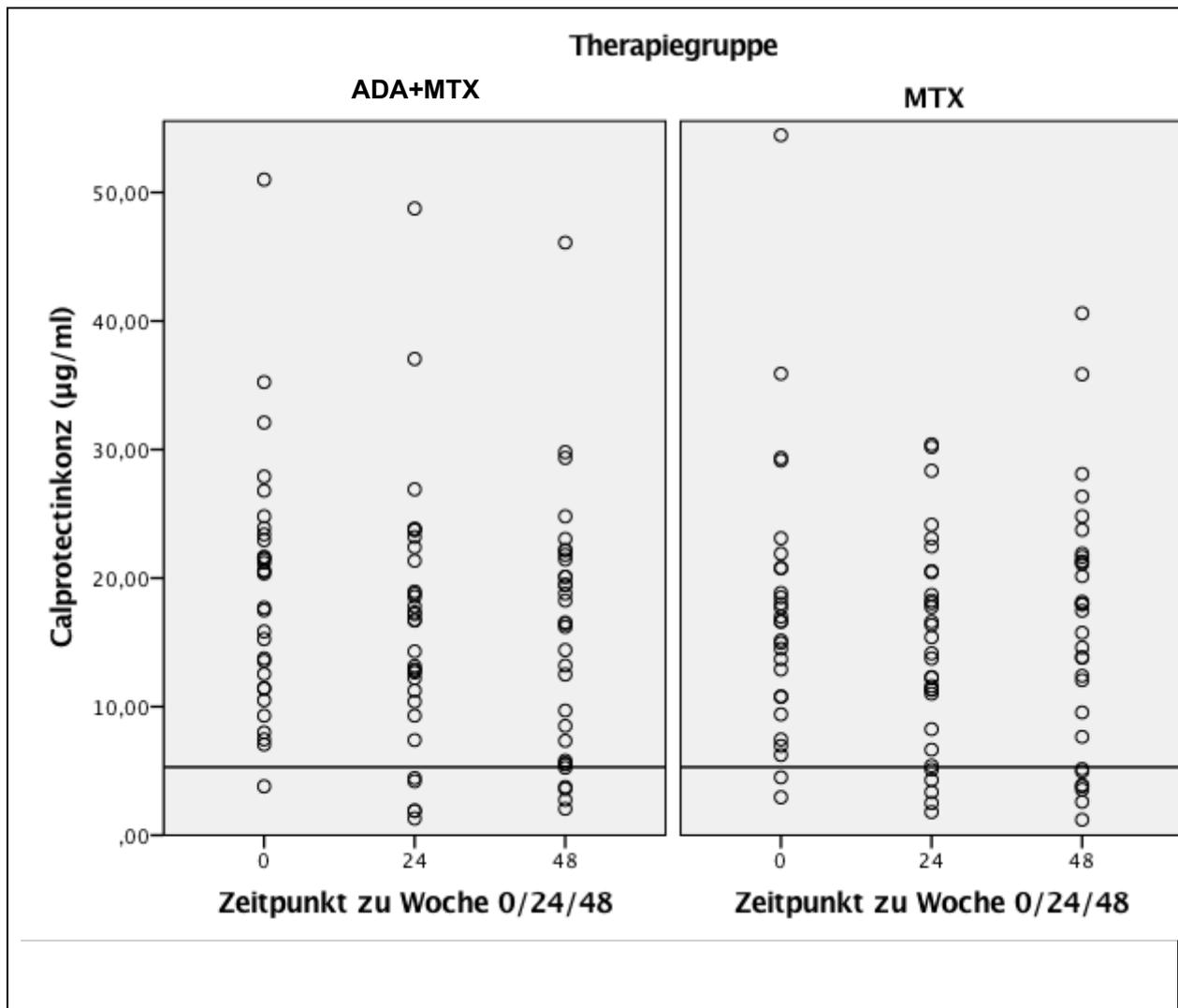


Abb. 12 Serumkonzentrationen von Calprotectin bei RA-Patienten in zwei unterschiedlichen Therapiegruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX-Monotherapie).

Das Streudiagramm zeigt die Serumkonzentrationen von Calprotectin unterteilt nach Therapiegruppen (Adalimumab/MTX vs. MTX). Der Cut-off-Wert befindet sich bei 5,3µg/ml. Die Serumkonzentration bei der Darstellung des Streudiagramms wurde auf 50µg/ml begrenzt zur besseren Darstellung. Die Anzahl an Werten über 50 µg/ml beträgt 6. Anhand dieser Darstellung wird ersichtlich, dass eine deutliche Mehrheit Calprotectinkonzentrationswerte über dem Normwert aufwies.

Tab.13 Anzahl der Patientenseren mit Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) im Serum zwischen 0 und 50 $\mu\text{g/ml}$.

Das Streudiagramm in Abb. 8 zeigt anhand der y-Achse die Calprotectinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) im Serum. Diese Achse reicht bis zu einem Wert von 50 $\mu\text{g/ml}$. Anhand dieser Tabelle soll aufgezeigt werden, dass insgesamt 6 Calprotectinwerte über den Wert von 50 $\mu\text{g/ml}$ gemessen wurden.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
	Werte zwischen 0 bis einschließlich 50	183	96,8	96,8	96,8
	Werte größer 50	6	3,2	3,2	100,0
	Gesamt	189	100,0	100,0	

Tab.14 Anzahl der Patientenseren mit Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) unter 5,3 $\mu\text{g/ml}$

Anzahl der Patientenseren deren Calprotectinkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) im Serum zwischen 0 und 5,3 $\mu\text{g/ml}$ liegen.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
	Werte bis einschließlich 5,3	10	10,4	10,4	10,4
	Werte größer 5,3	86	89,6	89,6	100,0
	Gesamt	96	100,0	100,0	

Insgesamt kann mittels des Streudiagrammes und **Tab. 13** gezeigt werden, dass 10 Patientenseren einen Calprotectinwert unter dem Cut-off -Wert von 5,3 $\mu\text{g/ml}$ aufgewiesen haben.

3.3.1. Verhalten des Calprotectin bei NSAR bzw. Prednisoloneinnahme

Tab.15 Calprotectinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 bei NSAR- und keiner NSAR-Einnahme.

		Keine NSAR -Einnahme			NSAR-Einnahme		
		N	Mittelwert	Std.-Abweichung	N	Mittelwert	Std.-Abweichung
Calprotectinkonz zu Tag 0	ADA+ MTX	7	25,3	14,3	25	22,8	28,8
Calprotectinkonz zu Tag 0	MTX	11	33,8	51,9	19	23,5	23,6
Calprotectinkonz zu Woche 24	ADA+ MTX	7	23,6	7,4	25	14,3	9,7
Calprotectinkonz zu Woche 24	MTX	11	15,1	8,7	19	15,1	7,4
Calprotectinkonz zu Woche 48	ADA+ MTX	7	23,2	10,5	25	13,8	8,6
Calprotectinkonz zu Woche 48	MTX	11	17,0	9,6	19	15,3	9,9

Anhand von **Tab.15** soll der Einfluss der NSAR-Einnahme auf die Höhe der Calprotectinkonzentration beschrieben werden. Zu Baseline ähneln sich sowohl in der Gruppe, die NSAR eingenommen hat als auch die kein NSAR eingenommen hat. Lediglich die Calprotectinkonzentration in der MTX-Behandlungsgruppe, die keine NSAR verwendet haben, zeigt sich zu Baseline eine deutlich erhöhte Calprotectinkonzentration. Da es sich hierbei um einen Mittelwert handelt, kann dieser vermutlich infolge eines Zahlenausreißer beeinflusst worden sein. Im weiteren Studienverlauf fällt auf, dass die Calprotectinkonzentrationswerte durch die NSAR-

Einnahme im Verlauf zu Woche 24 in beiden Behandlungsgruppen deutlich abfallen, während sie bei nicht NSAR-Einnahme in der MTX-Behandlungsgruppe abfallen, in der Kombinationstherapiegruppe jedoch kaum eine Reduktion erfahren. Zu Woche 48 zeichnen sich kaum Veränderungen im Vergleich zu Woche 48 ab.

Tab.16 Calprotectinkonzentration zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 bei Prednisolon - und keiner Prednisolon -Einnahme

		Keine Prednisolon-Einnahme			Prednisolon-Einnahme		
		N	Mittelwert	Std.-Abweichung	N	Mittelwert	Std.-Abweichung
Calprotectinkonz zu Tag 0	ADA + MTX	17	31,0	33,7	15	14,6	7,4
Calprotectinkonz zu Tag 0	MTX	15	27,9	24,7	15	26,6	45,7
Calprotectinkonz zu Woche 24	ADA + MTX	17	17,8	10,4	15	14,7	9,6
Calprotectinkonz zu Woche 24	MTX	15	17,5	6,6	15	12,7	8,4
Calprotectinkonz zu Woche 48	ADA + MTX	17	19,5	9,6	15	11,6	8,2

3.3.2. Calprotectinkonzentration bezüglich DAS28-Responder/ Non-Responder

Tab.17 Calprotectinkonzentration zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 unterteilt nach DAS28-Respondern und Non-Respondern

		Responder (n=27)		Non- Responder (n=36)	
		Mittelwert	Std.-Abw.	Mittelwert	Std.-Abw.
Calprotectinkonzentration zu Tag 0	ADA + MTX	28,8	38,4	19,1	8,3
	MTX	35,7	50,2	21,3	18,7
Calprotectinkonzentration zu Woche 24	ADA + MTX	17,2	11,2	15,7	9,2
	MTX	15,1	7,1	14,4	8,7
Calprotectinkonzentration zu Woche 48	ADA + MTX	17,8	11,6	14,3	7,9
	MTX	20,2	9,6	13,4	8,9

Anhand **Tab. 17** wird ersichtlich, dass die Calprotectinkonzentrationen zu Tag 0 in der Gruppe, die eine deutliche DAS28-Response erfahren hat, bei beiden Behandlungsgruppen (ADA+ MTX vs. MTX) deutlicher höher ist als bei den Patienten, die keine Response zeigen konnten. Im weiteren Verlauf zu Woche 24 ähneln sich die Calprotectinkonzentrationen sowohl bei Respondern als auch bei Non- Respondern. Zu Woche 48 zeigt sich in der Behandlungsgruppe mit MTX bei den Respondern erneut ein leichter Anstieg der Calprotectinkonzentration.

3.3.3. Überprüfung der Calprotectinkonzentration nach Serologie

Tab.18 Calprotectinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) unterteilt nach Serologie

		ACPA-/RF (n=7)		ACPA-/RF+ (n=2)		ACPA+/RF- (n=3)		ACPA+/RF+ (n=50)	
		Mittelwert	Std. Abw.	Mittelwert	Std. Abw.	Mittelwert	Std. Abw.	Mittelwert	Std. Abw.
Calprotectin-konz. zu Tag 0	ADA+ MTX	17,9	8,9	17,7	**	21,6	**	24,2	28,3
	MTX	23,0	21,7	20,8	**	19,8	1,3	28,9	40,5
Calprotectin-konz. zu Woche 24	ADA+ MTX	9,7	6,7	12,9	**	23,85	**	16,9	10,3
	MTX	12,9	9,7	18,0	**	15,0	3,9	15,4	8,1
Calprotectin-konz. zu Woche 48	ADA+ MTX	10,3	9,7	18,3	**	16,2	**	16,3	10,0
	MTX	11,01	8,84	23,8	**	17,4	3,9	16,3	10,3

**In diesen Fällen konnte keine Standardabweichung bestimmt werden, da in diesen Gruppen es bezüglich der Serologie nur 1 Probe vorhanden ist.

Zu Baseline liegt die höchste Konzentration an Calprotectin ($\mu\text{g/ml}$) bei den serologisch zweifach-positiven (ACPA+/RF+) Patientenseren, vor allem in der MTX-Monotherapie-Behandlungsgruppe. Wobei die Calprotectinkonzentration der MTX-Therapiegruppe bei den seronegativen Patienten bei $23\mu\text{g/ml}$ liegt und sich damit nicht wesentlich von der Calprotectinkonzentration der Kombinationsgruppe mit $24,2\mu\text{g/ml}$ unterscheidet. Bezüglich der übrigen Serologien zeigen sich keine ausgeprägten Unterschiede. Im weiteren Verlauf zu Woche 24 fällt die Calprotectinkonzentration in der Behandlungsgruppe mit Adalimumab/MTX und Seronegativität deutlich von $17,9\mu\text{g/ml}$ auf $9,7\mu\text{g/ml}$ ab. Eine Reduktion der Calprotectinkonzentration in diesem Ausmaß kann bezüglich anderer Serologien zu Woche 24 nicht verzeichnet werden. Zu Woche 48 verändern sich die Calprotectinkonzentrationswerte nicht wesentlich.

3.4. Korrelationen mit den unterschiedlichen Aktivitätsparametern bzw. Aktivitätsscores

3.4.1. Korrelation Calprotectin mit BSG

Bei der Korrelationsanalyse zwischen den beiden Variablen Calprotectin und BSG konnte anhand des Spearman-Rho-Tests keine relevante Korrelation in den Wochenintervallen 0_24 und 24_48 festgestellt werden. Die Berechnung eines Bestimmtheitsmaßes gibt Aufschluss darüber, wie hoch der prozentuelle Anteil einer vollkommenen Korrelation erreicht wurde und hilft dabei zu entscheiden, ob es sich um eine relevante Korrelation handelt oder nicht. Bei der Berechnung des Bestimmtheitsmaßes der Korrelation zwischen den beiden Variablen Calprotectin und BSG beispielsweise im dem ersten Wochenintervall 0-24 würde ein Bestimmtheitsmaß von 2,4% erreicht. Damit bleiben weiterhin 97,6% einer möglichen Korrelation unklar. Damit kann nur eine geringe Aussage über die Korrelation gegeben werden.

Bei der Berechnung des Bestimmtheitsmaßes der Korrelation Calprotectin im Wochenintervall 0-24 zu Calprotectin im Wochenintervall 24-48 werden nur 3,8% erreicht. Damit kann ebenfalls in diesem Fall nur eine geringe Aussage über die Korrelation erfolgen, da weiterhin 96,2% unklar sind.

Daher kann abschließend aus dem Abfall der Calprotectinwerte zu Beginn keine Aussage über weitere Abfälle der Calprotectinkonzentration im Verlauf gegeben werden.

Tab.19 Spearman-Rho-Test zwischen Calprotectinserumkonzentration ($\mu\text{g/ml}$, Calprotectinkonz Δ Woche 0-24,24-48) und BSG- Werten(mm/h)

Überprüfung auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$, Calprotectinkonz Δ Woche 0-24,24-48) und BSG- Werten (mm/h) im Wochenintervall 0-24 und Woche 24-48

			BSG Δ Woche 0-24	BSG Δ Woche 24-48
Spearman-Rho	Calprotectinkonz_ Δ Woche 0-24	Korrelationskoeffizient	,195	-,132
		N	63	61
	Calprotectinkonz_ Δ Woche 24-48	Korrelationskoeffizient	,106	,024
		N	63	61
**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).				

Des Weiteren wird im Folgenden nochmal anhand der Grafik sowie anhand der deskriptiven Statistik bezugnehmend auf den Verlaufsmarker BSG verdeutlicht, dass nach Absetzen der Kombinationstherapie (Adalimumab+ Methotrexat) mit Fortführung der Monotherapie mit Methotrexat der BSG Wert zwar fällt (BSG Δ Woche 0_24 Mittelwert 24,06; BSG Δ Woche 24-48 Mittelwert 3,04), jedoch erreicht dieser Wert nicht ein ähnliches Ausmaß wie bei Patienten, die eine durchgängige MTX-Monotherapie (BSG Δ Woche 0-24 Mittelwert 20,65 ; BSG Δ Woche 24-48 Mittelwert 1,24) erhalten haben.

Tab.20 Deskriptive Statistik des BSG-Konzentration

	Gruppe		Statistik	Std.-Fehler
BSG Δ Woche 0-24	Adalimu -mab +MTX	Mittelwert	-24,06	3,04
		Median	-19,00	
		Std.-Abweichung	17,23	
	MTX	Mittelwert	-20,65	3,34
		Median	-20,00	
		Std.-Abweichung	17,99	
BSG Δ Woche 24-48	Adalimu -mab +MTX	Mittelwert	3,40	1,50
		Median	2,00	
		Std.-Abweichung	8,50	
	MTX	Mittelwert	-1,24	2,81
		Median	-1,00	
		Std.-Abweichung	15,13	

Deskriptive Statistik des BSG-Konzentration im Wochenintervall 0-24 und 24-48 unterteilt in Therapiegruppen (Adalimumab+ MTX vs. MTX Monotherapie)

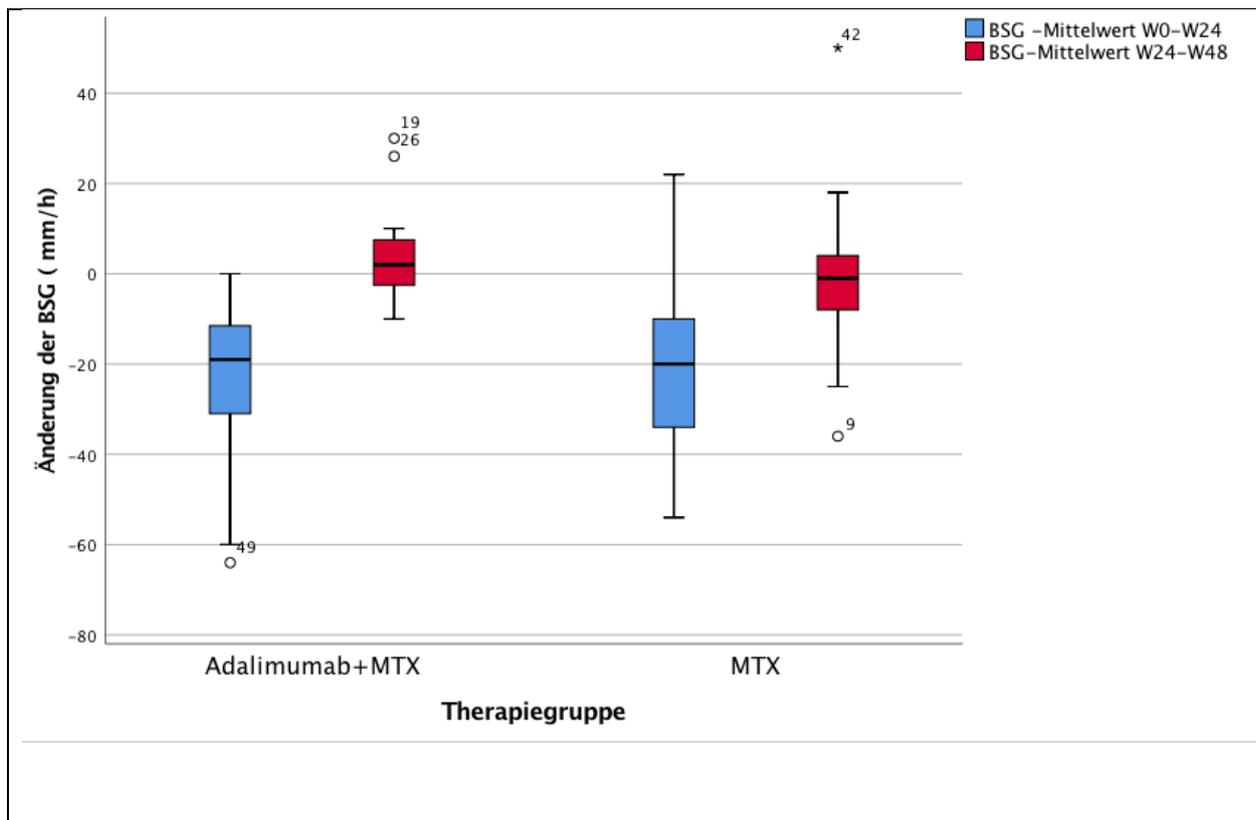


Abb. 13: Änderung des BSG-Werts (mm/h) bei RA-Patienten unterteilt in die beiden Therapiegruppen (Adalimumab/MTX vs. MTX)

Die Boxplots zeigen den Median als horizontalen Balken. Das obere und untere Quartil und die mit ◦ markierten Ausreißer zeigen die BSG-Werte (mm/h) bei RA-Patienten. Anhand der Abbildung wird ersichtlich, dass der BSG-Wert sowohl in der Gruppe mit der Kombinationstherapie als auch in der Gruppe mit der Monotherapie deutlich in den ersten 24 Wochen abfällt und im weiteren Verlauf keine ausgeprägten Veränderungen aufzeigt.

Anhand des Mann-Whitney-U-Tests soll erneut verdeutlicht werden, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich der BSG-Werte (mm/h) zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 in beiden Therapiegruppen bestehen.

Tab.21 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie des BSG zu Woche 0, 24 und 48

	Calprotectin M0	Calprotectin M24	Calprotectin M48	BSG Wert, Tag 0	BSG Wert, Woche 24	BSG Wert, Woche 48
Asymptotische Signifikanz	,670	,573	,962	,746	,382	,492

3.4.2. Korrelation Calprotectin mit CRP

Ähnlich wie bei der Korrelation zwischen den BSG-Werten und Calprotectin zeigen sich bei der Korrelationsanalyse der Calprotectin-Konzentrationen mit den CRP-Konzentrationen keine relevanten Korrelationen. So wird beispielsweise bei der Berechnung des Bestimmtheitsmaßes der Korrelation zwischen Calprotectin und CRP zum Wochenintervall 0-24 ein Wert von 0,12 % erreicht. Das bedeutet, dass weiterhin 99,88% unklar sind und damit nur eine geringe Aussage über die Korrelation erfolgen kann. Ähnlich verhält es sich bei der Korrelation zwischen Calprotectin und CRP im Wochenintervall 24-48. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,44%. Damit kann ebenfalls keine ausreichende Aussage über das restliche Korrelationsverhalten erfolgen.

Tab.22 Spearman-Rho-Test auf relevante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und CRP- Konzentrationen (mg/dl) im Wochenintervall 0-24 und Woche 24-48

	Gruppe			CRP Δ Woche 0-24	CRP Δ Woche 24-48
Spear- man-Rho	ADA+ MTX	Calprotectin- konz	Korrelationskoeffiz ient	,035	,067
		Δ Woche 0-24	N	31	32
		Calprotectin- konz	Korrelationskoeffiz ient	,031	-,047
		Δ Woche 24-48	N	31	32
	MTX	Calprotectin- konz	Korrelationskoeffiz ient	-,155	-,024
		Δ Woche 0-24	N	31	29
		Calprotectin- konz	Korrelationskoeffiz ient	,119	,258
		Δ Woche 24-48	N	31	29
**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).					
*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).					

Anhand der hier folgenden deskriptiven Statistik und Grafik hinsichtlich der CRP-Werte kann eine deutlich höhere Senkung des CRP- Werts bei der Kombinationstherapie-Gruppe in der ersten Hälfte der Studie (Woche 0-24 CRP-Mittelwert -2,37) beobachtet werden verglichen mit der Monotherapiegruppe (Woche 0-24 CRP-Mittelwert -1,61). Im weiteren Verlauf zeigt sich jedoch nach Umstellung der Kombinationstherapie auf eine Monotherapie, dass die CRP-Werte im der zweiten Studienhälfte im Mittelwert ansteigen (CRPΔ Woche 24-48 Mittelwert 0,337), während die Werte in der Gruppe mit der permanenten Monotherapie mit Methotrexat weiterhin niedrig verbleiben (CRP Δ Woche 24-48 Mittelwert -0,0459). Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich den CRP-Werten in beiden Therapiegruppen zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48 gefunden. Dies konnte anhand des Mann-Whitney-U-Tests festgestellt werden.

Tab.23 Mann-Whitney-U-Test

Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie des CRP zu Woche 0, 24 und 48.

	Calprotectin T0	Calprotectin W24	Calprotectin W48	CRP Wert, Tag 0	CRP Wert, Woche 24	CRP Wert, Woche 48
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,670	,573	,962	,683	,029	,216

Tab.24 Deskriptive Statistik der CRP-Konzentration im Wochenintervall 0-24 und 24-48 unterteilt in Therapiegruppen (ADA+ MTX= Adalimumab+ MTX vs. MTX Monotherapie)

	Gruppe		Statistik	Std.-Fehler
CRP Δ Woche 0-24	ADA+ MTX	Mittelwert	-2,37	,50732
		Median	-1,07	
		Std.-Abweichung	2,82	
	MTX	Mittelwert	-1,60	,41
		Median	-1,15	
		Std.-Abweichung	2,22	
CRP Δ Woche 24-48	ADA+ MTX	Mittelwert	,33	,18
		Median	,06	
		Std.-Abweichung	1,04	
	MTX	Mittelwert	-,0459	,279
		Median	-,02	
		Std.-Abweichung	1,50	

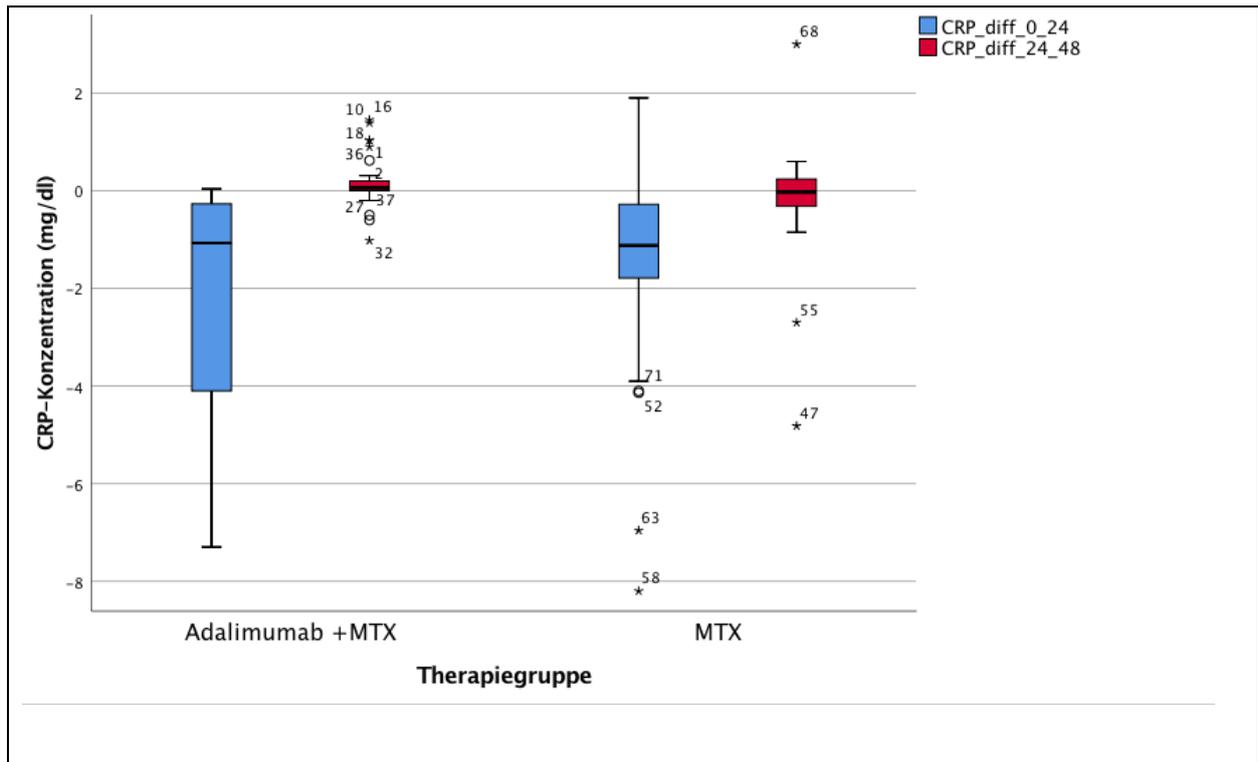


Abb. 14: Änderung in der Serumkonzentration von CRP in mg/dl bei RA-Patienten unterteilt in die beiden Therapiegruppen (Adalimumab/MTX vs. MTX)

Die Boxplots zeigen den Median als horizontalen Balken. Das obere und untere Quartil und die mit ◦ markierten Ausreißer markieren die CRP-Serumkonzentrationen (mg/dl) bei RA-Patienten. Anhand dieser Abbildung ist ersichtlich, dass es in beiden Therapiegruppen (Adalimumab + Methotrexat vs. Methotrexat-Monotherapie) zu einem deutlichen Abfall der CRP-Konzentration in den ersten 24 Wochen kommt, der sich jedoch im weiteren Verlauf nicht wesentlich verändert.

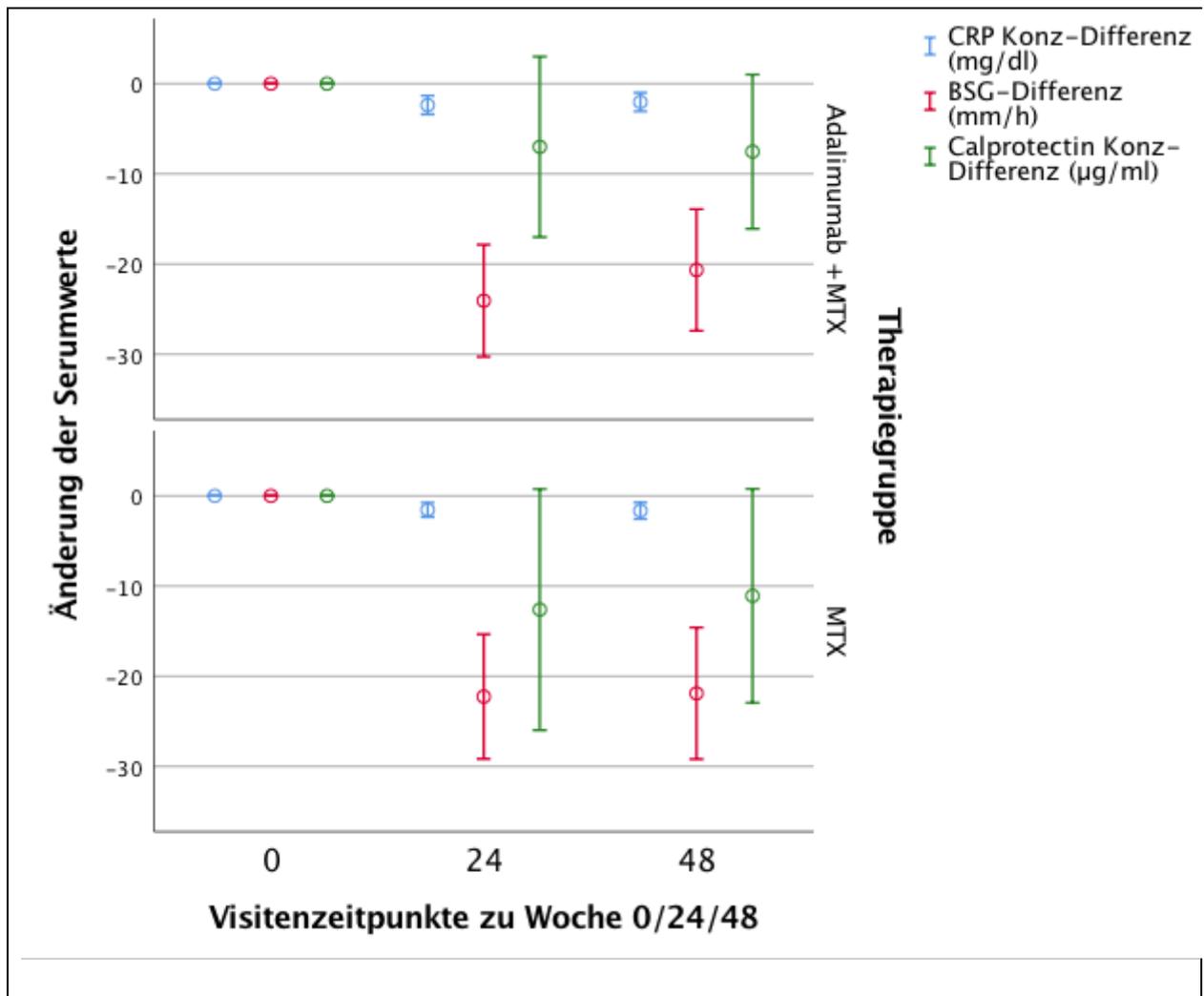


Abb. 15: Zusammenfassende Darstellung der Verläufe verschiedener Parameter

(CRP_Differenz_Woche 0-24, 24-48, BSG_Differenz-Woche 0-24; 24-48, Calprotectin_Differenz_Woche 0-24; 24-48). Die zusammenfassende Darstellung der drei Variablen CRP, BSG und Calprotectin soll verdeutlichen, dass alle drei Parameter zwar in den ersten 24 Wochen eine Reduktion in beiden Behandlungsgruppen erfahren haben, die sich jedoch im weiteren Verlauf bis Woche 48 nicht wesentlich verändert.

3.4.3. Korrelation Calprotectin mit DAS28

Im Rahmen der deskriptiven Statistik lässt sich bereits tendenziell das Verhalten des DAS28 in den zwei unterschiedlichen Therapiegruppen (Kombitherapie vs. Monotherapie) ablesen. Zum Screening zeigt sich zunächst kein gravierender Unterschied in beiden Therapiegruppen (ADA+ MTX DAS28-Mittelwert 6,11; MTX DAS28 Mittelwert 6,25). Zu Woche 24 sind in beiden Gruppen zwar die DAS28-Werte gesunken, jedoch unterscheiden sich diese DAS28-Werte in den Gruppen untereinander kaum (ADA+MTX Mittelwert 2,59; MTX Mittelwert 2,90).

Zu Woche 40 verbleiben die DAS28-Werte im ähnlichen Bereich wie zu Woche 24 (ADA+MTX Mittelwert 2,55; MTX Mittelwert 2,65). Dabei fällt auf, dass der DAS28-Wert noch weiter in der Monotherapie-Gruppe verglichen zu Woche 24 gesunken ist, während der DAS28-Wert der Kombinationstherapie-Gruppe verglichen zu Woche 24 gleich geblieben ist.

Tab.25 Deskriptive Statistik der DAS28-Werte

Deskriptive Statistik der DAS28-Werte zu Woche 0,24 und 48 unterteilt in Therapiegruppen (Adalimumab+ MTX vs. MTX Monotherapie)

	Gruppe			Std.-Fehler
DAS28, Tag 0	ADA +MTX	Mittelwert	6,11	,14
		Median	5,97	
		Std.-Abweichung	,84	
	MTX	Mittelwert	6,25	,15
		Median	6,04	
		Std.-Abweichung	,87	
DAS28, Woche 24	ADA +MTX	Mittelwert	2,59	,22
		Median	2,48	
		Std.-Abweichung	1,22	
	MTX	Mittelwert	2,91	,18805
		Median	3,03	
		Std.-Abweichung	1,03	
DAS28, Woche 40	ADA +MTX	Mittelwert	2,55	,22002
		Median	2,6	
		Std.-Abweichung	1,25	
	MTX	Mittelwert	2,65	,19138
		Median	2,63	
		Std.-Abweichung	1,05	

Tab.26 Kolmogorov-Smirnov-Test des DAS28 zum Zeitpunkt Woche 0, Woche 24 und Woche 48 (ADA+MTX = Adalimumab + Methotrexat).

Überprüfung auf Normalverteilung des DAS28 zum Zeitpunkt Woche 0, 24 und 48 (ADA+ MTX= Adalimumab + Methotrexat) Die Untersuchung auf die Frage nach Normalverteilung dient der Entscheidung, ob im weiteren Verlauf ein parametrischer (t-Test) oder ein nicht-parametrischer Test (Mann-Whitney-U-Test) zur Feststellung signifikanter Unterschiede anzuwenden ist. Anhand des Kolmogorov -Smirnov-Tests konnte eine Normalverteilung bezüglich des DAS28 zum Zeitpunkt Tag 0, Woche 24 und Woche 48 nicht abgelehnt werden.

	Gruppe	Kolmogorov-Smirnov	
		Statistik	Signifikanz
DAS28, Tag 0	ADA +MTX	,098	,200*
	MTX	,131	,188
DAS28, Woche 24	ADA +MTX	,083	,200*
	MTX	,107	,200*
DAS28, Woche 40	ADA +MTX	,133	,161
	MTX	,063	,200*

Tab.27 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationwerte ($\mu\text{g/ml}$) zu Woche 0,24 und 48 und DAS28-Index zu Woche 0,24 und 48

	Gruppe			DAS28_ Δ Woche 0_24	DAS28_ Δ Woche 24_40
Spearman- Rho	ABA+ MTX	Calprotectin- konz_	Korrelationskoeffi- zient	,062	-,058
		Δ Woche 0_24	N	29	29
		Calprotectin- konz_	Korrelationskoeffi- zient	,131	-,077
		Δ Woche 24_48	N	29	29
	MTX	Calprotectin- konz_	Korrelationskoeffi- zient	,045	,012
		Δ Woche 0_24	N	31	30
		Calprotectin- konz_	Korrelationskoeffi- zient	,212	-,007
		Δ Woche 24_48	N	31	30

Obwohl anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests bezüglich des DAS28 zu allen drei Zeitpunkten (Tag 0, Woche 24 und Woche 40) eine Normalverteilung nicht abgelehnt werden konnte, wurde anstelle des t-Tests der Mann-Whitney-U-Test zur besseren Vergleichbarkeit angewandt. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des DAS28-Werts in beiden Behandlungsgruppen festgestellt werden.

Tab.28 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) zum Zeitpunkt 0, 24 und 48 sowie des DAS28 zu Woche 0,24 und 48.

	Calprotectin Tag 0	Calprotectin Woche 24	Calprotectin Woche 48	DAS28, Tag 0	DAS28, Woche 24	DAS28, Woche 40
Asymptotische Signifikanz	,67	,57	,96	,65	,30	,67

3.4.4. Korrelation Calprotectin mit TJC/SJC

Es wurden des Weiteren Veränderungen der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke im Therapieverlauf untersucht. Dabei konnte in der Korrelationsanalyse von der Calprotectinkonzentration mit dem Gelenkstatus im Verlauf keine relevanten Korrelationen aufgezeigt werden. Jedoch ist anhand der deskriptiven Statistik eine Verbesserung der schmerzhaften und geschwollenen Gelenke unter Therapie festzustellen.

Tab.29 Deskriptive Statistik der druckschmerzhaften (tender joints) und geschwollenen Gelenke (swollen joints) zu Woche 0 und Woche 24

Tender Joints Woche 0	ADA+MTX	Mittelwert	11,2	1,1
		Median	8,0	
		Std.-Abweichung	5,8	
	MTX	Mittelwert	12,8	1,1
		Median	11,0	
		Std.-Abweichung	6,1	
Tender Joints Woche 24	ADA+MTX	Mittelwert	1,9	,8
		Median	1,0	
		Std.-Abweichung	4,2	
	MTX	Mittelwert	2,0	,5
		Median	1,0	
		Std.-Abweichung	2,8	

Swollen Joints Woche 0	ADA+MTX	Mittelwert	8,9	0,9
		Median	8,0	
		Std.-Abweichung	4,7	
	MTX	Mittelwert	11,2	1,0
		Median	9,0	
		Std.-Abweichung	5,8	
Swollen Joints Woche 24	ADA+MTX	Mittelwert	0,6	0,2
		Median	0,0	
		Std.-Abweichung	1,0	
	MTX	Mittelwert	1,9	0,4
		Median	1,0	
		Std.-Abweichung	2,5	

Tab.30 Spearman-Rho-Test auf relevante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$) und den druckschmerzhaften (tender joints) und geschwollenen Gelenke (swollen joints) zu Woche 0, 24 und 48

			Tender Joints zu Tag 0	Tender Joints zu Woche 24	Swollen Joints zu Tag 0	Swollen Joints zu Woche 24
Spearman-Rho	Calprotectin-konz zu Tag 0	Korrelationskoeffizient	-,082	,175	,010	,120
		N	62	60	62	60
	Calprotectin-konz. zu Woche 24	Korrelationskoeffizient	,132	,072	,050	,213
		N	62	60	62	60

Tab.31 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und den Tender Joints und Swollen Joints

	Calprotectin-konz M0	Calprotectin-konz M24	Tender joints W0	Tender joints W24	Swollen joints W0	Swollen joints W24
Mann-Whitney-U-Test	465,00	455,00	408,50	402,00	395,00	308,00

3.4.5. Korrelation Calprotectin mit SDAI/CDAI

Tab.32 Deskriptive Statistik der SDAI- Werte zu Woche 0 und 24

SDAI Woche 0	ADA+MTX	Mittelwert	29,9	1,8
		Median	28,2	
		Std.-Abweichung	10,0	
	MTX	Mittelwert	29,6	1,8
		Median	28,6	
		Std.-Abweichung	10,0	
SDAI Woche24	ADA+MTX	Mittelwert	13,6	1,3
		Median	11,1	
		Std.-Abweichung	7,3	
	MTX	Mittelwert	17,1	1,5
		Median	15,6	
		Std.-Abweichung	8,3	

Bei der Korrelationsanalyse konnte zu keinem der Zeitpunkte (SDAI Screening p -Wert=0,678; SDAI Woche 24 p -Wert=0,273) eine relevante Korrelation zwischen dem SDAI und den Calprotectin-Konzentrationen mit Hilfe des Spearman-Tests nachgewiesen werden.

Tab.33 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) und den SDAI- Werten zu Woche 0 und 24

			SDAI Screening	SDAI Woche 24
Spearman-Rho	Calprotectin-konz. zu Tag 0	Korrelationskoeffizient	-,176	,039
		N	62	62
	Calprotectin-konz. zu Woche 24	Korrelationskoeffizient	-,074	,000
		N	62	62

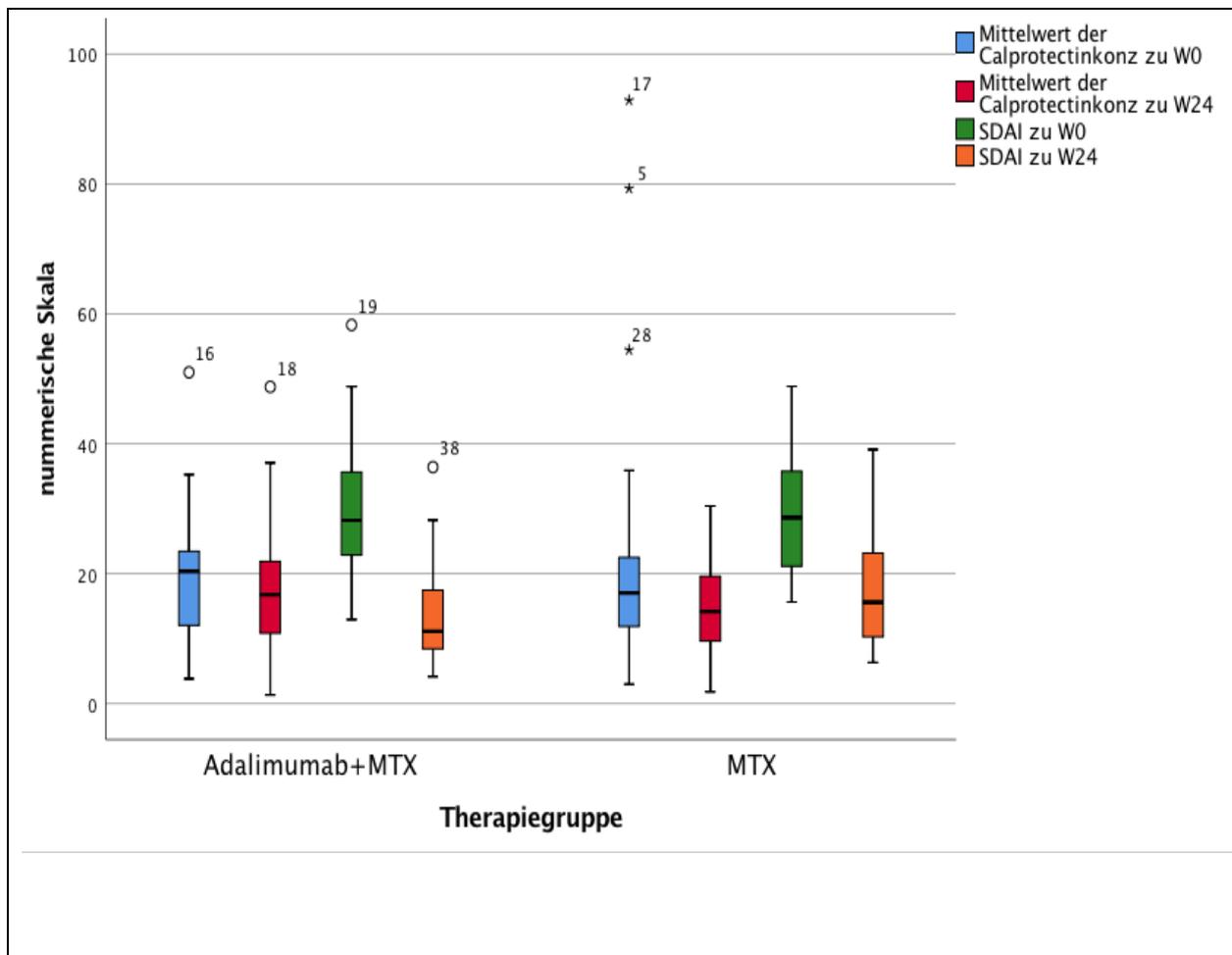


Abb.16. Boxplot Verlauf von Calprotectin im Vergleich zu SDAI

Die Abbildung zeigt das Verhalten der Calprotectin-Konzentration sowie des SDAI im Verlauf in beiden Therapiegruppen. Die Boxplots zeigen den Median als horizontalen Balken. Das obere und untere Quartil zeigt den SDAI-Wert bei RA-Patienten im Vergleich Kombinationstherapie (Adalimumab

+ MTX) vs. MTX-Monotherapie. Aus dieser Abbildung ist deutlich ersichtlich, dass es zu einem SDAI-Abfall bei beiden Therapiegruppen in den ersten 24 Wochen kommt.

Tab.34 Deskriptive Statistik der CDAI- Werte zu Woche 0 und 24

CDAI Woche 0	ADA+MTX	Mittelwert	26,9	1,8
		Median	24,2	
		Std.-Abweichung	10,1	
	MTX	Mittelwert	27,2	1,7
		Median	26,0	
		Std.-Abweichung	9,3	
CDAI Woche 24	ADA+MTX	Mittelwert	12,7	1,2
		Median	11,0	
		Std.-Abweichung	6,8	
	MTX	Mittelwert	16,3	1,5
		Median	14,6	
		Std.-Abweichung	8,2	

Bezüglich der Korrelationsanalyse zwischen der Calprotectinkonzentration und dem CDAI zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 24 sind keine relevanten Korrelationen sowohl anhand des Pearson als auch anhand des Spearman-Rho-Tests festzustellen.

Tab.35 Spearman-Rho- Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationwerte ($\mu\text{g/ml}$) und den CDAI Werten zu Woche 0 und 24

			CDAI Woche 0	CDAI Woche 24
Spearman- Rho	Calprotectin- konz Tag 0	Korrelationskoeffi- zient	-,126	,058
		N	62	62
	Calprotectin- konz Woche 24	Korrelationskoeffi- zient	,023	,020
		N	62	62

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der CDAI- als auch des SDAI- Werte in beiden Therapiegruppen anhand des Mann-Whitney-U-Tests festgestellt werden.

Tab.36 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und den CDAI Werten zu Woche 0 und 24

	Calprotectinkonz. Tag 0	Calprotectinkonz. Woche 24	CDAI Tag 0	CDAI Woche24
Asymptotische Signifikanz	,670	,573	,784	,051

Tab.37 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und den SDAI Werten zu Woche 0 und 24

	Calprotectinkonz. Tag 0	Calprotectinkonz. Woche 24	SDAI Tag 0	SDAI Woche24
Asymptotische Signifikanz	,670	,573	,894	,067

3.4.6. Korrelation mit HAQ-Index

Die folgende deskriptive Statistik beschreibt zunächst das Verhalten des HAQ-Index der beiden Therapiegruppen. Zum Screeningbeginn ist bereits anhand der Mittelwerte der beiden Gruppen eine leichte Differenz zu erkennen (ADA+MTX Mittelwert 1,441; MTX Mittelwert 1,232). Im weiteren Verlauf zu Woche 24 fallen die Werte des HAQ in beiden Gruppen ab (ADA+MTX Mittelwert 0,306; MTX Mittelwert 0,406), wobei der HAQ der Kombinationstherapiegruppe (Adalimumab+ MTX) deutlich stärker abfällt als die Monotherapiegruppe. Zu Woche 40 geben die Patienten in beiden Therapiegruppen ähnlich niedrige HAQ-Werte an (ADA+MTX Mittelwert 0,353; MTX Mittelwert 0,363). Wobei sich hierbei in der Kombinationstherapiegruppe eine leichte Steigerung der HAQ-Werte zeigt, während die Werte in der Monotherapiegruppe weiter sinken.

Tab.38 Deskriptive Statistik der HAQ-Index zu Woche 0, 24 und 48 unterteilt in Therapiegruppen (Adalimumab + MTX vs. MTX- Monotherapie)

	Gruppe		Statistik	Std.-Fehler
HAQ, Screening	ADA+ MTX	Mittelwert	1,44	,1114
		Median	1,40	
		Std.-Abweichung	,63	
	MTX	Mittelwert	1,23	,1012
		Median	1,10	
		Std.-Abweichung	,56	
HAQ, Woche 24	ADA+ MTX	Mittelwert	,31	,0738
		Median	,05	
		Std.-Abweichung	,42	
	MTX	Mittelwert	,41	,0726
		Median	,40	
		Std.-Abweichung	,40	
HAQ, Woche 40	ADA+ MTX	Mittelwert	,35	,0880
		Median	,05	
		Std.-Abweichung	,50	
	MTX	Mittelwert	,36	,069
		Median	,30	
		Std.-Abweichung	,38	

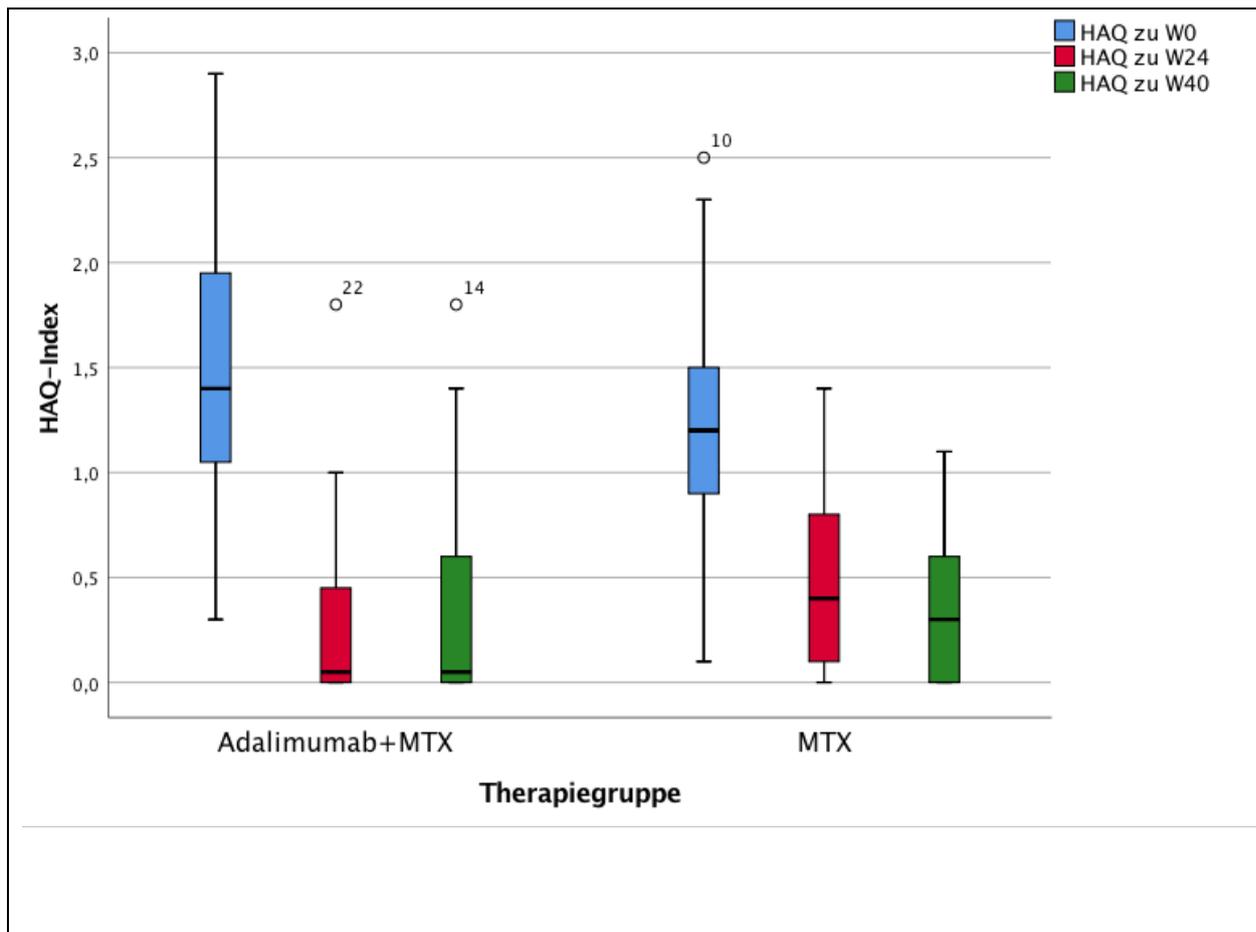


Abb 17: HAQ- Index bei ausgewählten RA-Patienten der HIT-Hard-Studie.

Die Boxplots zeigen den Median als horizontalen Balken. Das obere und untere Quartil zeigt die HAQ-Werte bei RA-Patienten im Vergleich Adalimumab+ MTX-Kombitherapie vs. MTX-Monotherapie. Anhand dieser Abbildung ist ersichtlich, dass es in den ersten 24 Wochen in beiden Therapiegruppen zu einem deutlichen Abfall des HAQ-Index gekommen ist. Während sich der HAQ-Index in der Gruppe mit der Kombinationstherapie (Adalimumab+ Methotrexat) bis zur 48. Woche nicht weiter verändert, zeigt der HAQ-Index in der Monotherapiegruppe eine weitere Reduktion im Median.

Bei der Korrelationsanalyse der Calprotectinwerte zusammen mit dem HAQ konnten keine relevanten Korrelationen zu keinem der Zeitpunkte (Woche 0, Woche 24, Woche 40) gezeigt werden.

Tab.39 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationsmittelwerte ($\mu\text{g/ml}$) und den HAQ- Index zu Woche 0, 24 und 40

			HAQ, Screening	HAQ, Woche 24	HAQ, Woche 40
Spearman- Rho	Calpro- tectinkonz Tag 0	Korrelationskoeffi- zient	-,115	-,023	,102
		N	63	63	62
	Calpro- tectinkonz Woche 24	Korrelationskoeffi- zient	-,225	-,114	-,030
		N	63	63	62
	Calpro- tectinkonz Woche 48	Korrelationskoeffi- zient	-,149	-,031	,062
		N	63	63	62

Tab.40 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Calprotectinserumkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) und den HAQ Werten zu Woche 0, 24 und 40.

	Calpro- tectinkonz Tag 0	Calpro- tectinkonz Woche 24	Calpro- tectinkonz Woche 48	HAQ, Woche 0	HAQ, Woche 24	HAQ, Woche 40
Asympto- tische Signifikanz	,670	,573	,962	,168	,101	,484

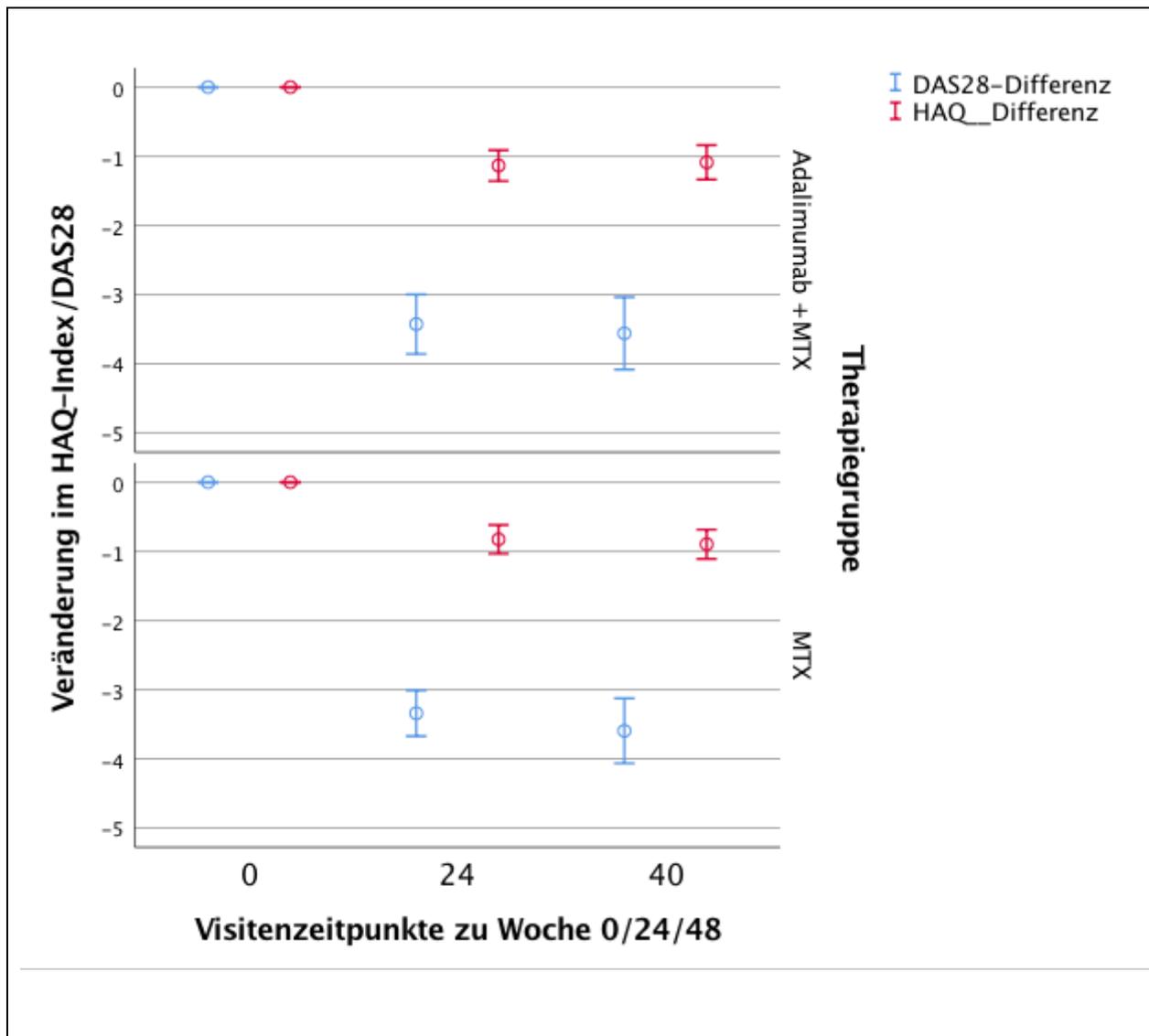


Abb.18: Abbildung zum Verlauf der DAS28- und HAQ- Werte in beiden Therapiegruppen.

Wie bereits oben beschrieben, weist der DAS28 eine deutliche Reduktion in beiden Therapiegruppen innerhalb der ersten 24 Studienwochen auf, wobei die Reduktion in der Kombinationstherapiegruppe deutlich ausgeprägter ist als in der Monotherapie. Im weiteren Verlauf stagniert das Reduktionsverhalten bezüglich dem DAS28 in der Kombinationstherapiegruppe, während er in der Monotherapiegruppe bis zu Woche 40 eine Tendenz der Reduktion aufweist. Ein ähnliches Verhalten ebenfalls der HAQ-Index auf.

3.4.7. Korrelation mit ACR20/50/70

Eine ACR20 Response ist deutlicher in der MTX Gruppe zu verzeichnen als in der Gruppe mit der Kombinationstherapie. Dieses Ergebnis zeigt jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (Kombinationstherapie vs. Monotherapie).

Tab.41 Kreuztabelle bzgl. ACR20-Response in den Therapiegruppen.

			Gruppe		Gesamt
			ADA+ MTX	MTX	
ACR 20% Response, Woche 24	Nicht- Ansprechen	Anzahl	4	2	6
		% innerhalb von Gruppe	12,9%	6,5%	9,7%
	Ansprechen	Anzahl	27	29	56
		% innerhalb von Gruppe	87,1%	93,5%	90,3%
Gesamt		Anzahl	31	31	62
		% innerhalb von Gruppe	100,0%	100,0%	100,0%

In diesem Fall erreichen 87,1% der Patienten in der Kombinationstherapie und 93,5% der Patienten in der Monotherapie einen ACR20-Response.

Tab.42 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR20-Kriterien von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)

	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,390

Der therapeutische ACR- Response von 20% ist sowohl in der MTX Gruppe als auch in der Gruppe mit der Kombinationstherapie ähnlich zu verzeichnen. Der Chi-Quadrat-

Test zeigt hinsichtlich der Responserate keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen (Kombinationstherapie vs. Monotherapie).

Tab.43 Kreuztabelle bzgl. ACR50-Response in den Therapiegruppen.

			Gruppe		Gesamt
			ADA+ MTX	MTX	
ACR 50% Response, Woche 24	Nicht- Ansprechen	Anzahl	6	6	12
		% innerhalb von Gruppe	19,4%	19,4%	19,4%
	Ansprechen	Anzahl	25	25	50
		% innerhalb von Gruppe	80,6%	80,6%	80,6%
Gesamt		Anzahl	31	31	62
		% innerhalb von Gruppe	100,0%	100,0%	100,0%

Es zeigen sich ebenfalls keine deutlichen Unterschiede der Therapiegruppen beim Erreichen einer ACR50- Response. Es erreichen 80,6% der Patienten sowohl in der Kombinationstherapie als auch in der Monotherapie eine ACR50- Response.

Tab.44 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR50-Response (Adalimumab + MTX vs. MTX)

	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	1,000

Der Chi-Quadrat-Test zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen (Kombinationstherapie vs. Monotherapie).

Tab.45 Kreuztabelle bzgl. ACR70-Response in den Therapiegruppen

			Gruppe		Gesamt
			ADA+ MTX	MTX	
ACR 70% Response, Woche 24	Nicht- Ansprechen	Anzahl	12	20	32
		% innerhalb von Gruppe	38,7%	64,5%	51,6%
	Ansprechen	Anzahl	19	11	30
		% innerhalb von Gruppe	61,3%	35,5%	48,4%
Gesamt		Anzahl	31	31	62
		% innerhalb von Gruppe	100,0%	100,0%	100,0%

Die ACR70 Response wird durch die Patienten in der Kombinationstherapiegruppe besser bewertet (61,3%) als in der Monotherapiegruppe (35,5%).

Tab.46 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR70-Response von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)

	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,042

Der Chi-Quadrat-Test zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen (Kombinationstherapie vs. Monotherapie)

Tab.47 Kreuztabelle bzgl. ACR20-Response in den Therapiegruppen zu Woche 48.

			Gruppe		Gesamt
			ADA+MTX	MTX	
ACR 20% Response, Woche 48	Nicht- Ansprechen	Anzahl	9	6	15
		% innerhalb von Gruppe	28,1%	19,4%	23,8%
	Ansprechen	Anzahl	23	25	48
		% innerhalb von Gruppe	71,9%	80,6%	76,2%
Gesamt		Anzahl	32	31	63
		% innerhalb von Gruppe	100,0%	100,0%	100,0%

Zu Woche 48 zeigen sich ebenfalls in beiden Therapiegruppen ähnliche Werte bezüglich der Verbesserung um 20% der ACR-Kriterien. Dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen bezüglich der Ansprechrate bestehen, lässt sich mittels des Chi-Quadrat-Tests bestätigen:

Tab.48 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR20-Response von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)

	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,414

ACR20 Response ist deutlicher in der MTX Gruppe nach 48 Wochen Therapie zu verzeichnen als in der Gruppe mit der Kombinationstherapie. Diese Bewertung zeigt jedoch ebenfalls anhand des Chi-Quadrat-Tests keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Ansprechraten in beiden Therapiegruppen.

Tab.49 Kreuztabelle bzgl. ACR50- Response in den Therapiegruppen zu Woche 48.

			Gruppe		Gesamt
			ADA+ MTX	MTX	
ACR 50% Response, Woche 48	Nicht- Ansprechen	Anzahl	14	9	23
		% innerhalb von Gruppe	43,8%	29,0%	36,5%
	Ansprechen	Anzahl	18	22	40
		% innerhalb von Gruppe	56,3%	71,0%	63,5%
Gesamt		Anzahl	32	31	63

Tab.50 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR50-Response von der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)

	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,225

Der therapeutische Erfolg von 70% zeigt sowohl in der MTX Gruppe als in der Gruppe mit Kombinationstherapie keinen Unterschied. Auch diese Werte zeigen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Ansprechraten zwischen beiden Therapiegruppen anhand des Chi-Quadrat-Tests.

Tab.51 Kreuztabelle bzgl. ACR70- Response in den Therapiegruppen zu Woche 48.

			Gruppe		Gesamt
			ADA + MTX	MTX	
ACR 70% Response, Woche 48	Nicht- Ansprechen	Anzahl	18	16	34
		% innerhalb von Gruppe	56,3%	51,6%	54,0%
	Ansprechen	Anzahl	14	15	29
		% innerhalb von Gruppe	43,8%	48,4%	46,0%
Gesamt		Anzahl	32	31	63

Tab.52 Chi-Quadrat-Unabhängigkeits-Test zur Überprüfung der ACR70-Response der Therapie (Adalimumab + MTX vs. MTX)

	Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	,712

3.4.8. Korrelation mit Kontrollgruppe (Acetyliertes Lysin, inverses Lysin, Ornithin)

Wie bereits in den Grundlagen beschrieben, wurden die Calprotectinwerte mit Titern von Antikörpern gegen acetylierte Peptide (AAPA) im Verlauf einer Therapie verglichen. HC50IgG entspricht den Antikörpern gegen acetyliertes Ornithin, HC55IgG entspricht Antikörpern gegen acetyliertes Lysin, HC55invers IgG entspricht Antikörpern gegen inverses Lysin. Wie der deskriptiven Statistik zu entnehmen ist, kommt es bei allen drei Antikörper zu einem Abfall unter Therapie verglichen zu Woche 24.

Tab.53 Deskriptive Statistik Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin) 0 und 24

HC50IgG	ABA+MTX	Mittelwert	5,6	0,4
		Median	4,9	
		Std.-Abweichung	2,5	
	MTX	Mittelwert	5,4	0,4
		Median	5,3	
		Std.-Abweichung	1,98	
HC50 zu Woche 24	ABA+MTX	Mittelwert	4,5	0,3
		Median	4,3	
		Std.-Abweichung	1,9	
	MTX	Mittelwert	4,1	0,2
		Median	3,9	
		Std.-Abweichung	1,3	
HC55IgG	ABA+MTX	Mittelwert	117,2	51,9
		Median	8,1	
		Std.-Abweichung	293,4	
	MTX	Mittelwert	60,2	35,6
		Median	7,2	
		Std.-Abweichung	195,0	
HC55 zu Woche 24	ABA+MTX	Mittelwert	68,5	35,5
		5% getrimmtes Mittel	30,1	
		Median	7,4	
		Std.-Abweichung	200,8	
	MTX	Mittelwert	71,8	33,3
		Median	7,4	
Std.-Abweichung		182,5		
HC55invers	ABA+MTX	Mittelwert	49,9	32,4
		Median	12,6	
		Std.-Abweichung	183,4	
	MTX	Mittelwert	28,3	8,0
		Median	15,1	
		Std.-Abweichung	43,8	
HC55invers zu Woche 24	ABA+MTX	Mittelwert	17,3	3,2
		Median	10,7	
		Std.-Abweichung	18,0	
	MTX	Mittelwert	23,5	4,9
		Median	15,3	
		Std.-Abweichung	26,8	

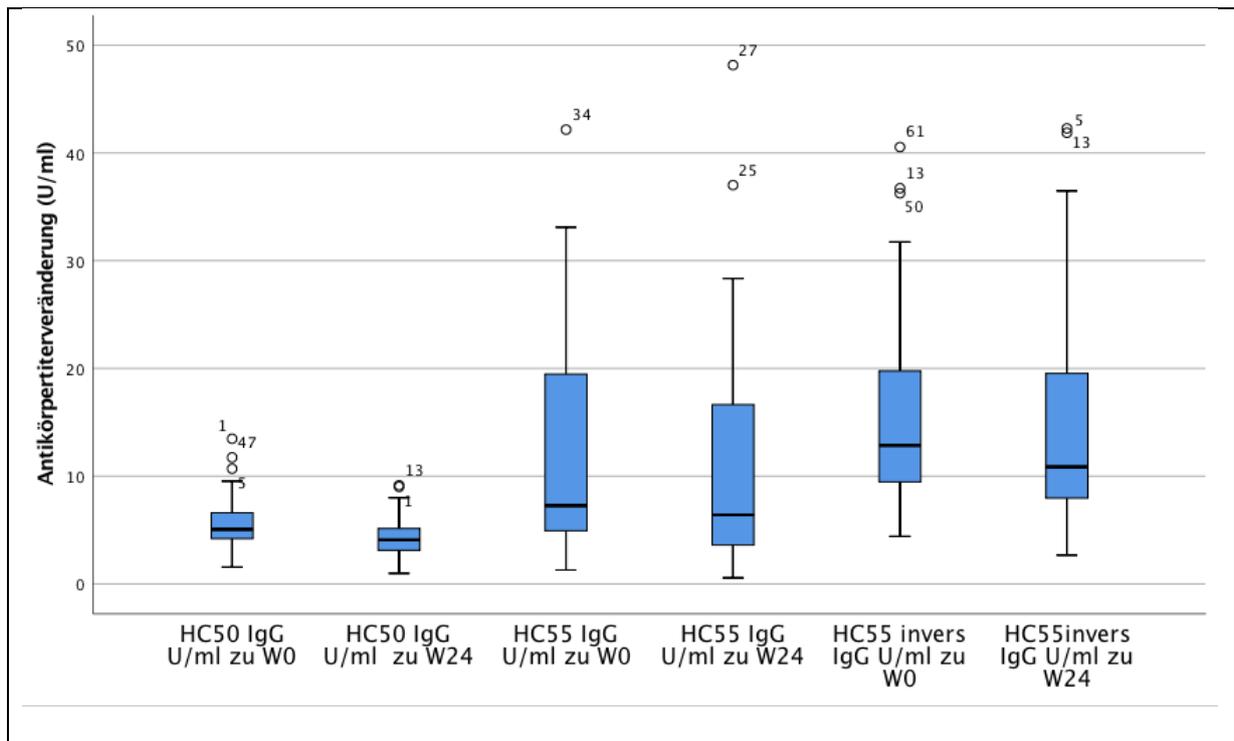


Abb.19 Titeränderung der untersuchten AAPA

Die Abbildung zeigt die Titerveränderungen der unterschiedlichen Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin)

Desweiteren konnten in der Korrelationsanalyse mit Hilfe des Spearman-Rho-Test keine signifikanten Korrelationen zwischen den Calprotectin-Werten und den drei unterschiedlichen AAPAs (Antikörper gegen acetyliertes Ornithin, Lysin und inverses Lysin) festgestellt werden. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests wird erneut belegt, dass keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der AAPA-Werte in beiden Behandlungsgruppen bestehen.

Tab.54 Spearman-Rho-Test auf signifikante Zusammenhänge zwischen Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml, Calprotectinkonz M0/M24) und Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin) 0 und 24

			HC50 IgG U/ml zu Tag 0	HC50 IgG U/ml zu Woche 24	HC55 IgG U/ml zu Tag 0	HC55 IgG U/ml zu Woche 24	HC55 invers IgG U/ml zu Tag 0	HC55 invers IgG U/ml zu Woche 24
Spearman-Rho	Calprotectin- konz zu Tag 0	Korrelations koeffizient	-,047	-,053	,240	,069	,208	,027
		N	62	62	59	61	61	62
	Calprotectin- konz zu Woche 24	Korrelations koeffizient	,037	,092	,320*	,273*	,089	,092
		N	62	62	59	61	61	62

Tab.55 Mann-Whitney-U-Test zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen beiden Therapiegruppen (ADA+MTX vs. MTX) hinsichtlich der Mittelwerte der Calprotectinserumkonzentrationen (µg/ml) und Antikörper gegen acetylierte Proteine (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin) 0 und 24

	Cal- pro- tectin zu Tag 0	Cal- pro- tectin zu Woche 24	HC50 IgG U/ml zu Tag 0	HC50 IgG U/ml zu Woche 24	HC55 IgG U/ml zu Tag 0	HC55 IgG U/ml zu Woche 24	HC55 invers IgG U/ml zu Tag 0	HC55i IgG U/ml zu Woche 24
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,670	,573	,746	,612	,649	,650	,081	,231

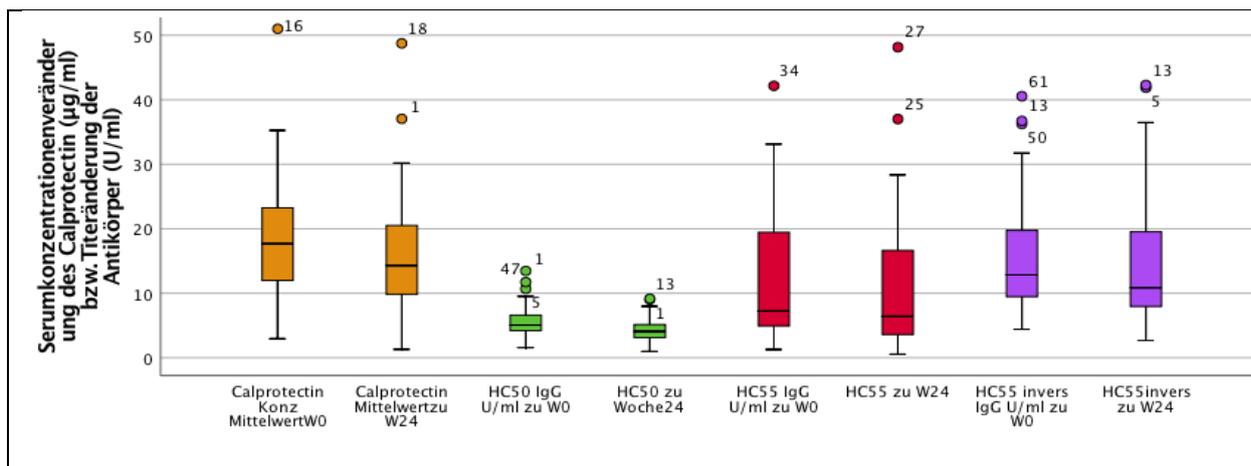


Abb. 20 Calprotectinkonzentrationsänderung und Titeränderung der AAPA im Verlauf von 24 Wochen

Die Abbildung zeigt die Verläufe der unterschiedlichen Marker unter Therapie. (KonzM = Calprotectinkonzentration, (HC50IgG= Ornithin; HC55IgG= Lysin, HC55invers= inverses Lysin). Anhand der Abbildung wird ersichtlich, dass im Verlauf von 24 Wochen sowohl die Calprotectinserumkonzentration als auch der Titer der Antikörper gegen acetylierte Proteine sinkt.

Tab.56 Verteilung der AAPAs unterteilt nach Serologie

	RF + /ACPA +	RF+ /ACPA-	RF- /ACPA+	RF- /ACPA-
HC50 +	0%	0%	0%	0%
HC50 -	100%	100%	100%	100%
HC55 +	38,89%	0%	0%	28,57%
HC55 -	61,11%	100%	100%	71,43%
HC55 i +	38,89%	18,20%	0%	21,43%
HC55 i -	61,11%	81,80%	100%	78,57%

Anhand dieser Tabelle wird ersichtlich, dass im Rahmen des untersuchten Patientenkollektivs keine Seropositivität besteht für Antikörper gegen acetyliertes Ornithin (HC50). Die Seropositivität für Antikörper gegen acetyliertes Lysin (HC55+) besteht vorwiegend bei zweifach seropositiven (RF+/ACPA+) und seronegativen (RF-/ACPA-) Patienten. Die Seropositivität gegen acetylierte inverse Lysin (HC55i) besteht bei zweifachpositiven (RF+/ACPA+), seronegativen (RF-/ACPA-) sowie nur RF-

positiven Patienten, wobei die Seropositivität bei den zweifach positiven Patienten am höchsten vertreten ist.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen neue Erkenntnisse verglichen mit der bestehenden Literatur und werden im Folgenden mit den sich daraus resultierenden Fragestellungen besprochen:

Welche Stellung hat Calprotectin als adäquater Biomarker bei der frühen rheumatoiden Arthritis und wie kann man die Ergebnisse in die bereits bestehende Literatur über Calprotectin bei früher und etablierter rheumatoiden Arthritis einordnen?

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Kritische Beurteilung des Patientenkollektivs

Das Patientenkollektiv von n=63 Patientenseren ist zurückzuführen auf die vorhandenen Einverständniserklärungen dieser Patienten für das Begleitprojekt der HIT-HARD-Studie (Detert et al., 2013). Bei diesen Patientenseren handelt es sich um ein gut charakterisiertes Kollektiv mit Verlaufsproben zu Tag 0, Woche 24 und 48. In den Studien von (Torgutalp et al., 2018) wurden n=80, bei Sakellariou u. a. 2018 n=156, bei Hammer u. a. 2007 n=145 Patienten mit etablierter rheumatoider Arthritis nur zu Baseline untersucht. Bei früher rheumatoider Arthritis wurden zwar kleinere Fallzahlen untersucht, jedoch im Abstand von 3, 6 und 12 Monaten (Hammer u. a. 2008 (n=61) oder nur einmalig im Verlauf nach 3 Monaten (Andrés Cerezo u. a. 2011(n=43) untersucht.

Die im Rahmen dieser Untersuchung erfassten Seren bei früher rheumatoider Arthritis stammen vorwiegend von weiblichen Patienten mit einem Anteil von 78,1% in der Kombinationstherapiegruppe und einem Anteil von 38,7% in der Monotherapiegruppe. Bezüglich der Auswirkungen des Geschlechts auf die Calprotectinkonzentration konnten in der Literatur bei Patienten mit rheumatoider Arthritis keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gesehen werden (Nielsen et al., 2018). Daraus folgt, dass Calprotectin unabhängig vom Geschlecht ist.

Bei den verwendeten Patientenseren wurden 29 Nichtraucher, 16 Raucher und 18 Exraucher erfasst. Die Calprotectinwerte bei den Rauchern (Calprotectinkonzentration Tag 0= 34,28 µg/ml) zeigten im Durchschnitt leicht höhere Werte als bei Nicht-Rauchern (Calprotectinkonzentration Tag 0=22,86 µg/ml) und Ex-Rauchern

(Calprotectinkonzentration Tag 0=20 µg/ml). Im weiteren Studienverlauf zu Woche 24 und Woche 48 gleichen sich die Werte an einander wieder an (siehe **Tab. 5**).

Damit besteht die Vermutung, dass das Rauchverhalten ein Faktor ist, der sich zu einer Erhöhung der Calprotectinwerte führen kann und damit bereits vorab dazu beitragen kann, dass die Calprotectinkonzentrationswerte nicht deutlich sinken können. Bezüglich des Rauchverhaltens und dem Einfluss auf Calprotectinkonzentrationen zeigen sich zum Teil kontroverse Ergebnisse in der Literatur. So ist eine Studie, die das Vorhandensein von Calprotectin in der gingivalen Fugenflüssigkeit bei Rauchern und Nicht-Rauchern mit aggressiver Parodontitis, chronischer Parodontitis und Gingivitis untersucht hat, zu dem Ergebnis gekommen, dass Nicht-Raucher höhere Calprotectinwerte in diesem Bereich aufweisen (Ertugrul et al., 2016). Als Ursache dafür wird eine durch das Rauchen hervorgerufene Blockierung der Calprotectinfreisetzung vermutet, der zu einer geringen Abwehr gegen Mikroorganismen führt (Ertugrul et al., 2016). Eine andere Studie konnte bei der Messung von Calprotectin im Serum deutlich erhöhte Calprotectin-Werte bei Rauchern als bei Nicht-Rauchern nachweisen (Cypers et al., 2016).

Bei der Rekrutierung der Patienten mit früher rheumatoider Arthritis wurde als Einschlusskriterium die Krankheitsdauer von unter 12 Monaten angegeben (Detert et al., 2013). Anhand der retrospektiven Analyse der vorhandenen Daten ist das Diagnosedatum und das Screeningdatum bekannt. Im Rahmen dieser Untersuchung betrug die Krankheitsdauer im Durchschnitt zwischen Diagnose- und Screeningdatum 63 Tage mit der niedrigsten bzw. höchsten Dauer von einem bis 352 Tage. Eine Studie, die sich mit dem Verhalten unter anderem von Thrombozyten, Leukozyten, Calprotectin und Immunglobulinen (IgG, IgM) bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nach einer Diät mit Fasten und daraufhin einjähriger glutenfreier veganer und lactovegetarischer Ernährung im Vergleich zur allesfressenden Kontrollgruppe befasst hat, konnte eine deutlich signifikante Reduktion des Calprotectinwerts bei Diät-Respondern nachweisen. Auffällig war, dass die Non-Responder, die keinen Calprotectin-Abfall erfahren haben, eine zweifach längere Krankheitsdauer (12 Monate, Ausmaß 1-38) als die Diät-Responder (6 Monate, Ausmaß 1-20) hatten (Kjeldsen-Kragh et al., 1995). Diese Beobachtung führt zu dem Umkehrschluss, dass die Dauer der Erkrankung ebenfalls zum Ausmaß der Calprotectinkonzentration im Serum beitragen und ihn auch hinsichtlich seines Outcomes unter Therapie beeinflussen kann. Im Rahmen dieser

Arbeit zeigten die Therapie-Responder eine Krankheitsdauer von 71 +/- 84,75 Tagen und die Non-Responder eine Krankheitsdauer von 57 +/- 56,85 Tagen. Da es sich hierbei um ein kleines Patientenkollektiv mit n=63 handelt, bedarf es weiterer Untersuchung hinsichtlich der Krankheitsdauer und der Response bei RA-Patienten.

Bei der Rekrutierung der Patienten der HIT-HARD-Studie wurden Patienten eingeschlossen, denen sowohl die Einnahme eines nicht-steroidalen Antirheumatikums (NSAR) als auch die Einnahme von bis zu 10 mg Prednisolon erlaubt war (Detert et al., 2013). Bei den untersuchten Patientenseren nahmen 44 Patienten NSAR sowie 30 Patienten Prednisolon ein. Den Zusammenhang zwischen Calprotectin und der regelmäßigen Einnahme von NSAR wurde ebenfalls bereits in der Literatur vor allem mit Blick auf die dadurch entstehende vermehrte Darmdurchlässigkeit untersucht. Es wird beschrieben, dass NSARs eine erhöhte Darmdurchlässigkeit mit einer anschließenden Infiltration von Leukozyten bewirken können (Bjarnason et al., 1984) (Bjarnason et al., 1987). Weiter wird angenommen, dass diese Leukozyten Calprotectin intestinal freisetzen und damit erhöhte Calprotectinwerten im Stuhl zeigen (Røseth et al., 1992). Bei der Einnahme von Prednisolon konnten bei der Untersuchung von 145 Patienten signifikant höhere Calprotectinwerte nachgewiesen werden im Vergleich zu Patienten, die kein Prednisolon eingenommen haben (Hammer et al., 2007). Damit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Einnahme von Begleitmedikamenten (bspw. NSAR) ebenfalls Einfluss auf die Höhe des Calprotectinwerts haben kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten hinsichtlich der Calprotectinkonzentrationswerte in beiden Gruppen sowohl bei denen, die NSAR als auch die kein NSAR eingenommen haben, zu Baseline keine wesentlichen Unterschiede gesehen werden (siehe **Tab. 52**). Lediglich die Calprotectinkonzentration in der MTX-Behandlungsgruppe, die kein NSAR verwendet haben, zeigt sich zu Baseline eine deutlich erhöhte Calprotectinkonzentration (33,8 µg/ml). Da es sich hierbei um einen Mittelwert handelt, kann dieser vermutlich infolge eines Zahlenausreißer beeinflusst worden sein. Im weiteren Studienverlauf zu Woche 24 fällt auf, dass die Calprotectinkonzentrationswerte durch die NSAR-Einnahme in beiden Behandlungsgruppen deutlich abfallen, während sie bei Nicht-NSAR-Einnahme zwar in der MTX-Behandlungsgruppe abfallen, in der Kombinationstherapiegruppe jedoch kaum eine Reduktion erfahren. Zu Woche 48 zeichnen sich kaum Veränderungen im Vergleich zu Woche 24 ab. Damit besteht der

Verdacht, dass die NSAR-Einnahme einen deutlichen Einfluss auf die Calprotectinkonzentration zeigt und daher in der Interpretation dieser Werte mitberücksichtigt werden muss. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen diesbezüglich.

4.1.2. Kritische Überprüfung des ELISA-Verfahrens

Die Untersuchung des Calprotectin im Serum erfolgte mittels eines nicht kommerziellen Calprotectin- ELISA-Kits, zur Verfügung gestellt durch die Firma Orgentec Diagnostika Mainz Germany, in einem gut charakterisierten Patientenkollektiv mit Verlaufsuntersuchungen zu Tag 0, Woche 24 und Woche 48. Der Cut-off-Wert dieses Kits bezüglich des Calprotectin konnte anhand einer ROC (Receiver Operating Characteristic)-Analyse der Calprotectin-Konzentrationswerte von Normalspendern und von an früher rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten bestimmt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine relevante Korrelation zwischen der Calprotectinkonzentration und anderen Variablen wie CRP, BSG, DAS28 und der Anzahl an schmerzhaften bzw. geschwollenen Gelenken bei der Untersuchung von Patienten, die an einer frühen rheumatoiden Arthritis erkrankt sind, aufgezeigt werden. In der Literatur werden vorwiegend signifikante Korrelationen zwischen den Calprotectinkonzentrationen und Werten wie CRP, BSG, DAS28 oder der Anzahl an schmerzhaften bzw. geschwollenen Gelenken angegeben. Dabei sollten zum einen die Unterscheidung zwischen einer etablierten rheumatoiden Arthritis und einer frühen rheumatoiden Arthritis beachtet werden und zum anderen das Medium, in dem das Calprotectin gewonnen worden ist. Auch der verwendete ELISA-Kit ist zu berücksichtigen. Es stehen Studien zur Verfügung, die zwar eine starke Korrelation zwischen Calprotectin und CRP, BSG, DAS28, CDAI/SDAI aufweisen, aber keine genauen Angaben zur ELISA-Durchführung machen (Torgutalp et al., 2018), (Sakellariou et al., 2018). Andere Studien, die ebenfalls starke Korrelationen festgestellt haben, führten ELISA-Untersuchungen mit EDTA-Blut durch (Hammer et al., 2007)(Hammer et al., 2008). Wiederum andere verwendeten Plasma zur anschließenden Bestimmung des Calprotectin mittels ELISA (Madland et al., 2002a). In den meisten Fällen wurden kommerzielle ELISA-Kits verwendet (Madland et al., 2002a)(Inciarte-Mundo et al., 2016)(Andrés Cerezo et al., 2011).

Anhand der Literatur wird ersichtlich, dass zwar relevante Korrelationen festgestellt wurden, jedoch dazu keine einheitlichen Maßnahmen bezüglich der Gewinnung des Calprotectin als auch eine einheitliche Durchführung von ELISA-Kits zur Verfügung stehen.

Da im Rahmen dieser Arbeit ein nicht kommerzielles ELISA-Kit der Firma Orgentec Diagnostika Mainz Germany verwendet wurde, kann eine Beeinflussung der Ergebnisse diesbezüglich nicht ausgeschlossen werden. Einflussfaktoren wie die Verwendung von den zur Verfügung gestellten Substanzen (Verdünnung, Enzymkonjugatlösung und Substratlösung) sowie die Testdurchführung (Verdünnung, Inkubationszeit und Waschvorgänge) erfordern ebenfalls eine Berücksichtigung bei der Beurteilung der Ergebnisse.

4.2. Ergebnisdiskussion

Die Rolle des Calprotectin wurde bereits hinsichtlich seines Stellenwerts für unterschiedliche rheumatologische Erkrankungen untersucht. Für die systemische idiopathische Arthritis konnte sich Calprotectin als ausgesprochen zuverlässiger Diagnostik-, Aktivitäts- und prognostischer Marker behaupten (Bojko, 2017) (Holzinger et al., 2012). Bei Spondylarthritiden (u.a. Psoriasisarthritis) konnte Calprotectin, in den wenigen durchgeführten Studien, sich ebenfalls als guter Aktivitätsmarker verglichen mit CRP bzw. BASDAI zeigen (Sakellariou et al., 2018)(Romand et al., 2018). Bei der etablierten rheumatoiden Arthritis konnte Calprotectin signifikante Korrelationen zu den gängigen Aktivitätsmarkern (CRP, BSG, DAS28) aufweisen(Torgutalp et al., 2018) (Hammer et al., 2007) (Madland et al., 2002a). Es zeigen sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse als prognostischer Marker bei der etablierten rheumatoiden Arthritis in der Literatur (Torgutalp et al., 2018)(Madland et al., 2002a). Informationen zum Verhalten des Calprotectin bei Patienten, die an früher rheumatoide Arthritis erkrankt sind, sind zum aktuellen Wissenszeitpunkt spärlich vorhanden und haben aus diesem Grund Anlass zu dieser Arbeit gegeben. Im weiteren Verlauf soll Calprotectin als zuverlässiger Biomarker für die frühe rheumatoide Arthritis bewertet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte Calprotectin im Verlauf von 48 Wochen in beiden Therapiegruppen (Kombinationstherapie vs. Monotherapie) einen deutlichen Abfall, der sich vorwiegend auf die ersten 24 Wochen beschränkt und danach kaum

Veränderungen zeigt. Anhand des Mann-Whitney-U-Tests konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass nur 10 Calprotectinwerte einen Normalwert unter dem cut-off-Wert von 5,3 µg/ml erreicht haben.

Um zunächst der Frage nachzugehen, warum der Calprotectinwert im Verlauf zwar eine Abfalltendenz unter Therapie, jedoch keinen deutlichen Rückgang unter den mittels der ROC-Analyse bestimmten Cut-off-Wert von 5,3µg/ml aufzeigt, wird dies zunächst anhand der Werte des DAS28 analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit fällt auf, dass die Calprotectinkonzentrationen zu Tag 0 in der Gruppe, die eine deutliche DAS28-Response erfahren hat, bei beiden Behandlungsgruppen (ADA+ MTX vs. MTX) deutlich höher sind als bei den Patienten, die keine Response zeigen konnten (**Tab 54**). Im weiteren Verlauf zu Woche 24 gleichen sich die Calprotectinkonzentrationen sowohl bei Respondern als auch bei Non-Respondern einander an. Zu Woche 48 zeigt sich in der Behandlungsgruppe mit MTX bei den Respondern erneut ein leichter Anstieg der Calprotectinkonzentration. Ein Abfall der Calprotectinkonzentrationswerte unter den Cut-off-Wert von 5,3 µg/ml wurde sowohl bei den DAS28-Respondern als auch bei den Respondern nicht erreicht. Eine Studie konnte eine Reduktion des Calprotectins bis in den Normalbereich nur bei guten Respondern bzw. bei guter DAS28-Response sehen (Drynda et al., 2004).

Auffällig ist, dass sich die ACR20/50/70 Responsewerte zu Woche 24 außergewöhnlich hoch im Vergleich zu der Anzahl an den vorliegenden DAS28-Non-Respondern (n=36) zeigten (ACR20: 87,1% bei Kombinationstherapie/ 93,5% bei Monotherapie; ACR50: 80,6% beide Behandlungsgruppen; ACR70: 61,3% bei der Kombinationstherapie/ 35,5% bei der Monotherapie). Diese Werte weichen im Vergleich zur ursprünglichen HIT- HARD- Studie (ACR20: 79 % bei Kombinationstherapie/ 67,6 % bei Monotherapie; ACR50: 63,8% Kombinationstherapie/48,7% bei Monotherapie; ACR70: 48% bei der Kombinationstherapie/ 26,8% bei der Monotherapie) bis auf die ACR70-Response ab (Detert et al., 2013). Es liegt die Vermutung nahe, dass diese hohen ACR20/50-Werte darauf beruhen, dass mit der Selektion von n=63 von der ursprünglichen HIT-HARD-Gruppe n=172 es sich hierbei um eine Verzerrung auf Grundlage einer deutlich kleinen selektierten Gruppe eingetreten ist. Die Selektion erfolgte auf der Grundlage der Einverständniserklärung dieser Patienten für das Begleitprojekt.

Es wird zudem ein Einfluss von anderen Autoantikörpern auf die Höhe des Calprotectin Studien vermutet. Eine Untersuchung von 160 Patienten konnte zeigen, dass Rheumafaktor positive Patienten höhere, jedoch nicht signifikant höhere Calprotectin-Werte aufwiesen als Rheumafaktor negative Patienten. Ein Unterschied zwischen ACPA Positiven und Negativen konnte nicht gesehen werden (Hurnakova et al., 2017). Eine andere Studie konnte sowohl bei ACPA positiven und negativen als auch bei RF positiven und negativen zwar hohe Calprotectinkonzentrationwerte aufweisen, jedoch zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Serologie (Hammer u. a. 2008).

Die Serologie der in dieser Arbeit verwendeten Patientenserum (n=63) unterteilt sich in n=7 ACPA-/RF-, n=2 ACPA-/RF+, n= 3 ACPA+/RF- und n=50 ACPA+/RF+.

Zu Baseline lag die höchste Konzentration an Calprotectin ($\mu\text{g/ml}$) bei den serologisch zweifach-positiven (ACPA+/RF+) Patientenserum, vor allem in der MTX-Monotherapie-Behandlungsgruppe. Wobei die Calprotectinkonzentration der MTX-Therapiegruppe bei den seronegativen Patienten mit $23 \mu\text{g/ml}$ sich nicht wesentlich von der Calprotectinkonzentration der serologisch zweifachpositiven Kombinationsgruppe mit $24,2 \mu\text{g/ml}$ unterschied. Bezüglich der übrigen Serologien zeigten sich keine ausgeprägten Unterschiede zu Baseline. Im weiteren Verlauf zu Woche 24 ist die Calprotectinkonzentration in der Behandlungsgruppe mit Adalimumab/MTX und Seronegativität deutlich von $17,9 \mu\text{g/ml}$ auf $9,7 \mu\text{g/ml}$ abgefallen. Eine Reduktion der Calprotectinkonzentration in diesem Ausmaß konnte bezüglich anderer Serologien zu Woche 24 nicht verzeichnet werden. Zu Woche 48 veränderten sich die Calprotectinkonzentrationswerte nicht wesentlich. Da nur eine geringe Anzahl an seronegativen (ACPA-/RF-) bzw. einfach positiven (ACPA-/RF+; ACPA+/RF-) im Vergleich zu n=50 zweifach seropositiven Patientenserum ist eine endgültige zuverlässige Aussage über das Verhalten der Calprotectinkonzentrationswerte in Abhängigkeit der Serologie anhand dieser Arbeit nicht zu treffen und bedarf weiterer Untersuchungen.

Ein Zusammenhang zwischen dem Stellenwert der Darmschleimhaut und dem Auftreten erhöhter Calprotectinwerte darf bei der Beurteilung dieser Ergebnisse nicht unbeachtet bleiben. Eine Studie, die sich mit Darmbiopsien von Spondylarthritis-Patienten befasst hat, stellte fest, dass Patienten mit mikroskopischer Darmentzündungen deutlich erhöhte Serumcalprotectinwerte aufwiesen als Patienten mit unauffälligen histologischen Befunden (Cypers et al., 2016).

In retrospektiver Begutachtung der zur Verfügung gestellten Daten ist eine Erkrankung des Darmes bei den untersuchten Patientenseren aufgrund fehlender Informationen diesbezüglich nicht eruierbar und kann damit nicht ausgeschlossen werden. Dies muss daher ebenfalls als Einflussfaktor bei der Beurteilung der hohen Calprotectinergebnisse mitberücksichtigt werden.

Der geringe Abfall des Calprotectinwerts in den ersten 24 Wochen sowohl in der Behandlungsgruppe mit Kombinationstherapie (Adalimumab + Methotrexat) als auch Monotherapie (Methotrexat) konnte in anderen Studien, die die Calprotectinkonzentrationswerte unter Therapie untersucht haben, beobachtet werden. Eine Studie, die den Verlauf des Calprotectinspiegels unter MTX-Therapie beobachtet hat, konnte feststellen, dass die Serumcalprotectin besser eine MTX-Response widerspiegeln konnte als CRP (Nielsen et al., 2018). Andere Studien, die sich besonders mit dem Verlauf des Calprotectinspiegels unter Biologikatherapie mit Adalimumab befasst haben, kamen zu dem Schluss, dass es vor allem in den ersten 4 Wochen zu einer deutlichen Reduktion des Calprotectin unter Adalimumab kommt (Choi et al., 2015b) (H. Hammer et al., 2011). Im weiteren Verlauf der Therapie sei zu Monat 3 und 6 ein moderater Abfall und zu Monat 12 ein kleiner Abfall zu verzeichnen (H. B. Hammer et al., 2011). Wie im Rahmen dieser Untersuchung gezeigt werden konnte, wurden anhand des Mann-Whitney-U-Tests keine signifikanten Unterschiede in beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich der Calprotectinkonzentrationen im Verlauf von 48 Wochen festgestellt. Zunächst bestand die Vermutung, dass keine signifikanten Unterschiede bestehen, da Adalimumab nach Woche 24 abgesetzt wurde. Jedoch ist vor diesem Hintergrund zu überdenken, in wie weit Calprotectin ein zuverlässiger Marker ist, um den Vorteil einer Kombinationstherapie gegenüber einer Monotherapie über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Bei Non-Respondern wurden bereits zu Woche 4 keine Veränderungen des Calprotectin festgestellt (Choi et al., 2015a). Da Calprotectin bei den Respondern ausgeprägte Veränderungen frühzeitig zeigt, wird Calprotectin als Marker für frühe Veränderungen nach Biologikagabe diskutiert. Im Umkehrschluss kann eine ausbleibende Veränderung als Hinweis für ein Nichtansprechen gewertet werden und ein frühes Absetzen der Biologikatherapie rechtfertigen (Choi et al., 2015a). Ähnliche Beobachtungen konnten in dieser Arbeit festgestellt werden: Die Calprotectinkonzentration bei den Non-Respondern hat keine wesentlichen Veränderungen erfahren, während die Calprotectinkonzentration bei den

Respondern im Verlauf der ersten 24 Wochen einen deutlichen Abfall aufzeigen konnten (siehe **Tab. 54**).

Um Calprotectin besser als Aktivitätsmarker bewerten zu können, wurden Korrelationen von Calprotectin mit anderen bereits etablierten Aktivitätsparametern wie CRP, BSG, DAS28, HAQ, SDAI/CDAI als auch hinsichtlich des Gelenkstatus (SJC/TJC) untersucht.

Zur angemessenen Bewertung dieser Aktivitätsparameter wurden hierzu einige der Werte bei der statistischen Analyse in den Wochenintervallen 0-24 und 24-48 untersucht, um mögliche Ausreißer, die den Mittelwert beeinflussen können, vorzubeugen. Sowohl die CRP- als auch die BSG-Werte zeigten im Rahmen dieser Untersuchung in beiden Behandlungsgruppen eine deutliche Minderung in den ersten 24 Wochen (Adalimumab+ MTX: BSG_diff_0_24 Mittelwert -24,06 +/- 3,04; MTX-Monotherapie BSG_diff_0_24 Mittelwert -20,65 +/- 3,34; Adalimumab+ MTX: CRP_diff_0_24 Mittelwert -2,37 +/- 0,51; MTX-Monotherapie CRP_diff_0_24 Mittelwert -1,6 +/- 0,41). Dies entspricht in ähnlicher Weise den in der HIT- HARD-Studie erhobenen Werten. Zu Baseline wurde für die Behandlungsgruppe mit der Kombinationstherapie ein BSG-Medianwert von 33 mm/h angegeben, der auf einen Mittelwert von 16,1 +/- 13,3 mm/h abfiel, und für die Monotherapiegruppe ein BSG-Medianwert von 36 mm/h mit einem Abfall auf einen Mittelwert von 18,7 +/- 14,2 mm/h (Detert et al., 2013). Dieser drastische Abfall in den ersten 24 Wochen wird in den anschließenden 24 Wochen nicht fortgeführt. Die BSG-Werte verzeichnen in der Kombinationstherapiegruppe eine Tendenz zu einer leichten Erhöhung der Werte (Adalimumab+ MTX: BSG_diff_24_48 Mittelwert +3,4 +/- 1,5), während die Monotherapiegruppe die Tendenz einer weiteren leichten Senkung der Werte (MTX-Monotherapie BSG_diff_24_48 Mittelwert -1,24 +/- 2,81) aufweist. Ähnlich verhält sich der CRP-Wert (Adalimumab+ MTX: CRP_diff_24_48 Mittelwert +0,33 +/- 0,18; MTX-Monotherapie CRP_diff_24_48 Mittelwert -0,05 +/- 0,28). Eventuell kann die leichte Erhöhung der Werte als Reboundeffekt mit dem Absetzen von Adalimumab nach Woche 24 erklärt werden. Jedoch ist diese Aussage vor dem Hintergrund, dass die Fortführung der Monotherapie eher zu einer weiteren leichten Senkung führt, kritisch zu hinterfragen. Nichtsdestotrotz konnten anhand des Mann-Whitney-U-Tests keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Werte in beiden Gruppen gezeigt werden. Mittels des Spearman-Rho-Tests konnten in dieser Arbeit keine relevanten Korrelationen zwischen Calprotectin sowie dem CRP und BSG- Wert gezeigt werden.

In Hinblick auf den DAS28 zeigt sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der Werte in den ersten 24 Wochen (Kombinationstherapiegruppe DAS28 Tag0 6,11+/- 0,14; Kombinationstherapiegruppe DAS28 Woche24 2,59+/- 0,22; Monotherapie DAS28 Tag0 6,24 +/- 0,22; Monotherapie DAS28 Woche24 2,9 +/- 0,19). Während im Vergleich zu der HIT-HARD-Studie sich die Veränderungen der Kombinationstherapiegruppe ähneln, weichen die Werte hinsichtlich der Monotherapiegruppe in den ersten 24 Wochen deutlich ab. Die HIT HARD-Studie konnte in der Monotherapiegruppe eine DAS28-Response um 29,5 % verzeichnen, während es im Rahmen dieser Studie zu einer DAS28-Response um 46,7% gekommen ist (Detert et al., 2013). Obwohl eine gleiche Verteilung der Patienten in dieser Arbeit besteht (Kombinationstherapie: 32 /Monotherapie: 31), liegt die Vermutung nahe, dass diese Diskrepanz auf Grundlage der kleinen selektierten Gruppe besteht, die durch die zur Verfügung stehenden Einverständniserklärungen zustande gekommen ist.

Ähnlich zeigt sich der Verlauf des DAS28 in Woche 40. Während die Werte bei der HIT-HARD-Studie mit einer DAS28-Response um 42,4% in der Kombinationstherapiegruppe und um 36,8% in der Monotherapie angegeben werden, weist diese Arbeit eine DAS28-Response in der Kombinationstherapiegruppe um 41,6% und in der Monotherapiegruppe um 42,7% auf (Detert et al., 2013). Anhand des DAS28 in dieser Arbeit wird eine Tendenz zur Verschlechterung der Krankheitsaktivität in der Monotherapiegruppe zu Woche 40 gezeigt, während es in der HIT-HARD-Studie in der Monotherapiegruppe zu einer weiteren Verbesserung der Krankheitsaktivität kommt (Detert et al., 2013). Wie bereits erwähnt, kann dies vermutlich durch das selektierte kleine Patientenkollektiv erklärt werden. Eine relevante Korrelation zwischen Calprotectin und dem DAS28 konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich des SDAI bzw. CDAI konnte ähnlich wie beim DAS28 in den ersten 24 Wochen eine deutliche Reduktion gesehen werden. Diese Werte können nicht mit der HIT-HARD-Studie verglichen werden, da diese Werte nicht berechnet worden sind. Jedoch bestärkt der SDAI bzw. der CDAI die Aussage des DAS28 darin, dass es zu einer deutlichen Reduktion in den ersten 24 Wochen kommt. Eine relevante Korrelation zwischen Calprotectin und SDAI bzw. CDAI konnte anhand des Spearman-Rho-Tests nicht nachgewiesen werden.

Der HAQ- Index dieser Arbeit ähnelt zu Beginn den Werten der HIT-HARD-Studie. In beiden Behandlungsgruppen kommt es zu einer deutlichen Reduktion des HAQ-Index.

Im Verlauf jedoch zeigt sich in dieser Untersuchung eine stärkere Reduktion des HAQ-Index in der Monotherapiegruppe (HAQ-Index Woche 24 $0,41 \pm 0,07$) verglichen mit der HIT-HARD-Studie (HAQ-Index Woche 24 $0,72 \pm 0,6$). Im weiteren Verlauf ähneln sich der Verlauf des HAQ-Index sowohl in dieser Untersuchung als auch in der HIT-HARD-Studie. Während er in der Kombinationstherapiegruppe die Tendenz zum Anstieg abzeichnet, senkt er sich leicht in der Monotherapiegruppe (HIT-HARD-Studie Kombinationstherapie HAQ-Index Woche 48 $0,61 \pm 0,6$; Monotherapie HAQ-Index Woche 48 $0,66 \pm 0,6$; in dieser Studie die Kombinationstherapie HAQ-Index Woche 40 $0,35 \pm 0,08$; Monotherapie HAQ-Index Woche 40 $0,36 \pm 0,069$ (Detert et al., 2013). Eine Korrelationsanalyse zwischen dem HAQ-Index konnte keine relevante Korrelation feststellen.

Bei der Betrachtung von Studien zur rheumatoiden Arthritis, die bereits die Korrelation zwischen Calprotectin und anderen Aktivitätsparametern untersucht haben, müssen die Ergebnisse für die frühe rheumatoide Arthritis und die etablierte rheumatoide Arthritis getrennt betrachtet werden.

Zu der Wertigkeit des Calprotectin als Aktivitätsmarker bei der frühen rheumatoiden Arthritis gibt es bei dem aktuellen Wissensstand eine geringe Anzahl an Untersuchungen. Diese Studien sind zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich der Korrelation mit anderen Krankheitsaktivitätsparametern gekommen. So konnte eine Studie zu Baseline eine ausgeprägte Korrelation zwischen Calprotectin und BSG bzw. CRP feststellen, die jedoch im weiteren Verlauf von 12 Monaten eine schwache bis moderate Korrelation aufweisen konnte. Aus diesem Grund ist die Studie zu dem Schluss gekommen, Calprotectin als Marker für eine akute Entzündung, aber nicht als Verlaufsmarker zu verwenden, der in unterschiedlichen Phasen einer rheumatoiden Arthritis bzw. auch in Remission einen Krankheitsschub anzeigen kann (Jonsson et al., 2017). Eine andere Studie konnte hingegen in einem Zeitraum von 12 Monaten durchweg eine moderate bis starke Korrelation zu CRP und BSG feststellen, während die Korrelation zu DAS28 nur schwach bis moderat gesehen wurde (Hammer et al., 2008). Wiederum konnte eine weitere Studie eine deutliche Korrelation zwischen Calprotectin und CRP/DAS28 sowie der Anzahl an geschwollenen Gelenken im Verlauf von 3 Monaten aufweisen (Andrés Cerezo et al., 2011). Anhand dieser kontroversen Studienergebnisse wird ersichtlich, dass die Rolle des Calprotectin als Aktivitätsmarker

bei der frühen rheumatoiden Arthritis noch nicht endgültig eindeutig festgelegt werden kann.

Ähnlich widersprüchliche Aussagen finden sich hinsichtlich der etablierten rheumatoiden Arthritis.

So konnte eine mit 80 Patienten angelegte Studie eine deutlich signifikante Korrelation von Calprotectin zum DAS28-BSG, DAS28-CRP, SDAI, CDAI, BSG, CRP und Ultraschall (US7)-Parameter finden. In dieser Studie wurden die Untersuchungen nur zur Baseline durchgeführt, um zu testen, ob Calprotectin als Marker eine Entzündung anzeigen kann (Torgutalp et al., 2018). Diese Ergebnisse wurden auch, ergänzt durch eine positiv signifikante Korrelation von Calprotectin mit dem HAQ-Index, durch weitere Studien bestätigt (Hammer et al., 2007)(Madland et al., 2002a). Eine andere, größer angelegte Studie (n=156) konnte zwar eine deutliche Korrelation zwischen Calprotectin und dem CRP erfassen, hinsichtlich des Grey-Scale-Scores und des Power-Doppler-Scores in der Gelenk-ultraschalluntersuchung konnte jedoch kein relevanter Zusammenhang zum Calprotectin festgestellt werden (Sakellariou et al., 2018). Dem widerspricht eine andere Studie, die Calprotectin die Funktion als Vorhersagewert für den CDAI-Score und für Synovitiden im Gelenk-ultraschall zugesprochen hat (Hurnakova et al., 2017).

Hinsichtlich der Veränderungen des Calprotectin und der Anzahl von schmerzhaften und geschwollenen Gelenke unter Therapie konnte eine Studie bestätigen, dass eine Assoziation zwischen der Höhe des Calprotectinwerts und den Veränderungen von schmerzhaften bzw. geschwollenen Gelenken über einen Zeitraum von 52-56 Wochen bestehen (Nielsen et al., 2018)(Andrés Cerezo u. a. 2011).

Es wurde ferner im Rahmen dieser Arbeit der Antikörpertiter gegen Peptide, die vom modifizierten Vimentin stammen, im Verlauf einer Therapie untersucht und mit Calprotectin verglichen. Insgesamt waren 26,98% der Patientenseren positiv für Antikörper gegen acetyliertes Lysin und 25,4% positiv für Antikörper gegen acetyliertes inverses Lysin. Für die Antikörper gegen acetyliertes Ornithin konnten keine Werte über 20 U/ml gemessen werden. Eine Studie, die sich ebenfalls mit AAPAs bei früher rheumatoider Arthritis befasst hat, konnte deutlich höhere Werte für Antikörper gegen gegen acetyliertes inverses Lysin feststellen (39% positive für Antikörper gegen acetyliertes Ornithin, 33% positiv für Antikörper gegen acetyliertes Lysin, 48% positiv für Antikörper gegen acetyliertes inverses Lysin) (Studenic et al., 2018). Im Verlauf von 24

Wochen sinken diese Werte nur mäßig in beiden Therapiegruppen ab (**Tab.48**) und zeigen anhand des Spearman-Rho-Tests keine relevante Korrelation zum Calprotectin. Anhand dieser begleitenden Untersuchung sollte ergänzend der Wert der AAPA als Aktivitätsmarker bewertet werden. Da anhand des Mann-Whitney-U-Tests kein Unterschied hinsichtlich der Werte in beiden Therapiegruppen festgestellt werden konnte und die Titer sich nur schwach im Verlauf einer Therapie verändert haben, zeigen sich die AAPA-Werte im Rahmen dieser Arbeit als ungeeignet zur Bestimmung einer Entzündungsaktivität im Verlauf. Eine andere Studie hingegen hat die Titer von AAPAs bei RA-Patienten, die sich bereits in anhaltender Remission befanden, untersucht. Bei der Reduktion ihrer Basistherapie wurden die Antikörpertiter beobachtet und festgestellt, dass es dabei zu einem Anstieg der Werte kommt. Schlussendlich wurde die Vermutung aufgestellt, dass AAPAs bei Patienten in Remission imstande sein können, einen Krankheitsschub anzukündigen (Figueiredo et al., 2016).

Es wurde außerdem die Verteilung der Seropositivität für AAPAs entsprechend der Seropositivität für ACPA und RF untersucht. Anhand **Tab. 51** wird ersichtlich, dass im Rahmen des untersuchten Patientenkollektivs keine Seropositivität besteht für Antikörper gegen acetyliertes Ornithin (HC50). Die Seropositivität für Antikörper gegen acetyliertes Lysin (HC55+) besteht vermehrt bei zweifach seropositiven (RF+/ACPA+) und etwas geringer bei seronegativen (RF-/ACPA-) Patienten. Die Seropositivität gegen acetyliertes inverses Lysin (HC55i) besteht bei zweifachpositiven (RF+/ACPA+), seronegativen (RF-/ACPA-) sowie nur RF-positiven Patienten, wobei die Seropositivität bei den zweifach positiven Patienten am höchsten vertreten ist. Anhand dieser Daten zeigt sich, dass AAPA bei seronegativen Patienten vorzufinden sind, und damit als Ergänzung dienen können. Zu der ähnlichen Schlussfolgerung, dass AAPAs vorwiegend als Ergänzung zu ACPA und RF bei der Diagnostik einer rheumatoiden Arthritis dienen können, ist eine andere Studie ebenfalls gekommen (Studenic et al., 2018). Für eine eindeutige endgültige Beurteilung diesbezüglich bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen mit einem größeren Patientenkollektiv.

Zusammengefasst wird bei Betrachtung der Ergebnisse in der Literatur in Bezug auf Calprotectin und seine Korrelationen zu anderen Parametern der Krankheitsaktivität klar, dass es weitere Untersuchungen hinsichtlich seiner Stellung bei der frühen rheumatoiden Arthritis benötigt. Und es lässt die Vermutung zu, dass bei Betrachtung

dieses Wertes die Art der entzündlichen Erkrankung bzw. das Stadium der Erkrankung mitberücksichtigt werden muss.

Dies zeigt sich deutlich an dem Krankheitsbild der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (SJIA). Drei unterschiedliche Studien bestärken Calprotectin als vielversprechenden Marker für die Krankheitsaktivität einer SJIA. Es wurde festgestellt, dass Calprotectin (MRP8/14) deutlich höher bei einer SJIA verglichen mit anderen rheumatischen Erkrankungen ist (SJIA 14920 ng/ml; RA 640 ng/ml; SpA 1010 ng/ml; PsA 910ng/ml) (Frosch u. a. 2009). Die Spezifität für die SJIA wurde mit RF-negativen polyartikulären und oligoartikulären juvenilen idiopathischen Arthritiden verglichen. Mittels dieser Gegenüberstellung konnte damit die hohe Spezifität für die SJIA bestätigt werden (Bojko, 2017).

Eine andere Studie hat die positive Korrelation von Calprotectin mit dem Gelenkstatus, dem CRP, der BSG, dem HAQ und JADAS (Juvenile Arthritis Disease Activity Score) nachgewiesen. Sie konnte zeigen, dass Calprotectin (MRP8/14) als wertvoller Aktivitätsmarker der SJIA gesehen werden muss, da er über die Fähigkeit verfügt, Schübe bereits 6 Monate davor vorherzusagen, unabhängig davon, ob die Patienten eine Therapie oder eine on/off Therapie erhalten (Holzinger et al., 2012). Darüber hinaus konnte diese Studie unter Anakinra, einem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, eine deutliche Remission des Calprotectin (MRP8/14) bereits nach einem Monat zeigen, wohingegen Enbrel, ein TNF-alpha-Blocker, eine Remission des Calprotectin nach 3 Monaten vorweisen konnte (Holzinger et al., 2012). Eine andere Studie konnte ebenfalls bestätigen, dass eine Il-1-Blockade zur Reduktion von MRP8/14 und damit mit einer Besserung der Krankheitsaktivität einhergeht (Frosch et al., 2009). Eine deutliche Reduktion der Calprotectinwerte bei der SJIA unter MTX- Therapie dauerte bis zum 6. Monat an (Holzinger et al., 2012). Vor dem Hintergrund, dass eine deutliche Reduktion bzw. Remission des Calprotectin zügiger durch eine Il-1-Blockade erfolgt, kann dies ebenfalls in die Wertung als Einflussfaktor eingehen und erklärt möglicherweise, warum es im Rahmen dieser Untersuchung es nicht zu einer zügigen und deutlichen Senkung des Calprotectin unter Adalimumab bzw. MTX gekommen ist.

Ein weiteres Medikament, welches aufgrund seines Wirkmechanismus Potential hat, auf das Calprotectin Einfluss nehmen zu können, ist Colchizin. Calprotectin benötigt zu seiner Freisetzung funktionsfähige Mikrotubuli und Colchizin ist als Gift der Herbstzeitlosen fähig, Tubuli zu hemmen (Margolis et al., 1977).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass Calprotectin zwar ein vielversprechender Marker für die Krankheitsaktivität sein kann, jedoch erfordert er in seiner Interpretation eine genauere Einordnung der möglichen Einflussfaktoren, um ihn damit zuverlässiger für den täglichen klinischen Gebrauch zu machen.

4.3. Bewertung der Limitation und methodischen Einschränkungen

Einzelne Einschränkungen dieser Arbeit wurden bereits in den jeweiligen Abschnitten erwähnt. Es soll hier nochmal im Allgemeinen auf die Limitationen dieser Arbeit eingegangen werden.

4.3.1. in Hinblick auf das Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Arbeit ist mit $n=63$ im Vergleich zu den bereits in der Literatur durchgeführten Untersuchungen des Calprotectin bei frühen rheumatoiden Arthritiden in den Bereich mit kleiner Kohorte einzuordnen. Die Patientenkollektivgröße reicht von $n=215$ (Jonsson et al., 2017), über $n=61$ (Hammer et al., 2008) zu $n=43$ (Andrés Cerezo et al., 2011). Das kleine Patientenkollektiv von $n=63$ ist aufgrund der zur Verfügung stehenden Einverständniserklärungen zum Begleitprojekt der HIT-HARD-Studie zu Stande gekommen.

Trotz der gleichen Verteilung auf beide Behandlungsgruppen (Adalimumab+Methotrexat vs. Methotrexat) ist nicht auszuschließen, dass es aufgrund der Limitierung von $n=172$ der HIT HARD-Studie auf $n=63$ zu Verzerrungen wie am Beispiel der Bestimmung der ACR-Response-Kriterien gekommen sein kann (Detert et al., 2013). Ein größeres Kollektiv wäre aussagekräftiger.

Außerdem konnte ausschließlich retrospektiv auf bereits vorhandene Daten der untersuchten Patientenseren zurückgegriffen werden. Es konnten Alter, Geschlecht, Raucherstatus, Diagnosedatum, Screeningdatum, Autoantikörper (RF, ACPA), CRP, BSG, DAS28, HAQ, ACR20/50/70, TJC/SJC, NSAR-Einnahme und die Prednisoloneinnahme erfasst werden. Weitere Daten wie Komorbiditäten (u.a. chronisch entzündliche Darmerkrankungen) oder BMI (Body-Mass-Index) wurden in der ursprünglichen HIT-HARD-Studie nicht abgefragt und standen somit nicht zur Verfügung. Eine systematische Überprüfung von Studien, die sich mit Calprotectin als Biomarker für die rheumatoide Arthritis befasst haben, konnte zeigen, dass

Einflussfaktoren wie Komorbiditäten (kardiovaskuläre Erkrankungen, Fettleibigkeit) in der bereits vorhandenen Literatur bei der Bestimmung des Calprotectin bei rheumatoiden Arthritiden bei der Interpretation der Werte nicht ausreichend berücksichtigt werden, obwohl bereits Zusammenhänge zwischen Calprotectin und kardiovaskulären Erkrankungen (Cotoi et al., 2014) sowie Fettleibigkeit festgestellt wurden (Mortensen et al., 2009).

Daten dieser Art wären hinsichtlich ihres Einflusses auf Calprotectin ebenfalls zur besseren Einschätzung als Aktivitätsmarker von großer Bedeutung.

Die Tatsache, dass die DAS28- und HAQ- Werte zu Woche 40 und nicht wie der Rest der Variablen zu Woche 48 vorhanden sind, kann nicht als problematisch gesehen werden, da anhand der übrigen Werte ersichtlich ist, dass ausgeprägte Veränderungen vorwiegend in den ersten 24 Wochen stattgefunden haben. Eine maßgebende Veränderung der DAS28- und der HAQ-Werte in den letzten 8 Wochen ist daher nicht zu erwarten.

4.3.2. in Hinblick auf die Testmethodik

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde ein nicht kommerzielles Calprotectin-ELISA-Kit der Firma Orgentec Diagnostika Mainz verwendet. Die damit zur Verfügung gestellten Standardproben wurden zwar vorab anhand einer Standardkurve überprüft, jedoch ist hinsichtlich des Puffers, der Konjugatlösungen und der Substratlösungen keine ausreichend validierte Aussage ohne weitere Testreihen möglich. Des Weiteren kann es zu Titerabweichungen gekommen sein, die zurückzuführen sind auf temperaturabhängige Lagerungen der Patientenseren, der Testsubstanzen und den Inkubationszeiten. Aber auch die Art der Probengewinnung, das Pipettierverhalten sowie die maschinelle Konzentrationsbestimmungen können einen Einfluss auf die Calprotectinergebnisse haben.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Vor dem Hintergrund der bereits vorhandenen Ergebnisse in der Literatur kann zusammengefasst gesagt werden, dass Calprotectin ein vielversprechender Marker für die Feststellung einer Krankheitsaktivität bei etablierten rheumatoiden Arthritiden, auch in Remission (Jonsson et al., 2017), durch seine signifikanten Korrelationen zu unter anderem CRP, HAQ, der Anzahl an schmerzhaften und geschwollenen Gelenken (Madland et al., 2002a)(Nielsen et al., 2018), radiologischen Gelenkveränderungen sowie den Autoantikörpern ACPA und Rheumafaktor (Hammer et al., 2010)(Hammer et al., 2008) zu sein scheint. In Ergänzung zu einer Gelenkulterschalluntersuchung kann Calprotectin ermöglichen, eindeutig eine Krankheitsaktivität im Rahmen der rheumatoiden Arthritis zu detektieren (Torgutalp et al., 2018). Desweiteren wird beschrieben, dass es geeignet sei, im klinischen Alltag, frühzeitig Responder von Non-Respondern zu unterscheiden. Damit bestünde die Möglichkeit, frühzeitig eine Therapie zu beenden (Choi et al., 2014)(Drynda et al., 2004). Das wäre auch hinsichtlich eines wirtschaftlichen Aspekts von ausgesprochener Bedeutung, da Medikamente wie Biologika aktuell kostspielig sind.

Die wenigen Studien, die Calprotectin bei frühen rheumatoiden Arthritiden als Aktivitätsmarker untersucht haben, konnten zwar ebenfalls Korrelationen zwischen Calprotectin und dem DAS28 feststellen, jedoch war die Korrelation deutlich schwächer ausgeprägt (Hammer et al., 2008).

Ein Abfall der Calprotectinwerte und der Entzündungsparameter konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, jedoch konnten diesbezüglich weder Unterschiede in Bezug auf die Behandlungsart noch relevante Korrelationen zwischen Calprotectin und den Entzündungsparametern bzw. Gelenkstatus gefunden werden, so dass eine Aussage über Calprotectin als Aktivitätsmarker unter Therapie im Rahmen einer frühen rheumatoiden Arthritis in diesem Fall nicht eindeutig bestätigt werden kann. Die Ergebnisse können jedoch zum gegebenen Zeitpunkt noch keine eindeutige Aussage bieten. Obwohl es sich um ein gut charakterisiertes Patientenkollektiv mit Verlaufsproben handelt, besteht eine Einschränkung durch das relativ kleine Patientenkollektiv und die Benutzung eines nicht kommerziellen ELISA-Kits. Zum

aktuellen Zeitpunkt liegen keine ausreichenden Vergleichsmöglichkeiten zu anderen Früh-Arthritis-Studien mit Calprotectin unter Therapie vor.

Wichtig ist jedoch weiterhin bei der Beurteilung des Calprotectinwerts im Kontext einer rheumatoiden Arthritis, dass trotz überwiegend positiver Korrelationen von Calprotectin mit anderen Krankheitsaktivitätsparametern der bereits bekannte Einfluss von Komorbiditäten wie Fettleibigkeit (Mortensen et al., 2009) oder kardiovaskulären Erkrankung (Cotoi et al., 2014) auf Calprotectin noch nicht ausreichend berücksichtigt worden ist. Um ein zuverlässiges Profil dieses Markers bei früher rheumatoider Arthritis gewinnen zu können, bedarf es aus diesem Grund weiterer Studien, die mit einem großen Patientenkollektiv arbeiten, eine längere Beobachtungszeit haben und die Auswirkungen von Komorbiditäten auf Calprotectin miterfassen, um die Reliabilität des Calprotectinspiegels als Aktivitäts- und Verlaufsmarker bei der frühen rheumatoiden Arthritis besser einschätzen zu können.

Hinsichtlich der Wertung der AAPA-Werte als Aktivitätsmarker konnten keine eindeutigen Veränderungen im Verlauf unter Therapie festgestellt werden. Der Nutzen der AAPA-Bestimmung kann vielmehr in der Frühdiagnostik bei sonst seronegativer rheumatoider Arthritis gesehen werden (Studenic et al., 2018), was zu einer früheren Einleitung einer Therapie führen kann.

6. Literaturverzeichnis

- Aho, K., Kaipiainen-Seppänen, O., Heliövaara, M., Klaukka, T., 1998. Epidemiology of rheumatoid arthritis in Finland. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 27, 325–334. [https://doi.org/10.1016/S0049-0172\(98\)80053-X](https://doi.org/10.1016/S0049-0172(98)80053-X)
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Albani, S., Keystone, E.C., Nelson, J.L., Ollier, W.E., La Cava, A., Montemayor, A.C., Weber, D.A., Montecucco, C., Martini, A., Carson, D.A., 1995. Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 1, 448–452. <https://doi.org/10.1038/nm0595-448>
- Albrecht, K., Huscher, D., Eidner, T., Kleinert, S., Späthling-Mestekemper, S., Bischoff, S., Zink, A., 2017. Versorgung der rheumatoiden Arthritis 2014. *Z Rheumatol* 76, 50–57. <https://doi.org/10.1007/s00393-016-0156-5>
- Aletaha, D., Alasti, F., Smolen, J.S., 2015. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther* 17, 229. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0736-9>
- Aletaha, D., Nell, V.P., Stamm, T., Uffmann, M., Pflugbeil, S., Machold, K., Smolen, J.S., April 7, 2005a. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Research & Therapy* 7, R796. <https://doi.org/10.1186/ar1740>
- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., Combe, B., Costenbader, K.H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J.M.W., Hobbs, K., Huizinga, T.W.J., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T.K., Laing, T., Mease, P., Ménard, H.A., Moreland, L.W., Naden, R.L., Pincus, T., Smolen, J.S., Stanislawska-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P.P., Upchurch, K.S., Vencovský, J., Wolfe, F., Hawker, G., 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 62, 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>
- Aletaha, D., Ward, M.M., Machold, K.P., Nell, V.P.K., Stamm, T., Smolen, J.S., 2005b. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: Defining criteria for disease activity states. *Arthritis & Rheumatism* 52, 2625–2636. <https://doi.org/10.1002/art.21235>
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., Mirsky, A.E., 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *PNAS* 51, 786–794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Andrés Cerezo, L., Mann, H., Pecha, O., Pleštilová, L., Pavelka, K., Vencovský, J., Šenolt, L., 2011. Decreases in serum levels of S100A8/9 (calprotectin) correlate with improvements in total swollen joint count in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 13, R122. <https://doi.org/10.1186/ar3426>
- Arnett, F.C., Edworthy, S.M., Bloch, D.A., Mcshane, D.J., Fries, J.F., Cooper, N.S., Healey, L.A., Kaplan, S.R., Liang, M.H., Luthra, H.S., Medsger, T.A., Mitchell, D.M., Neustadt, D.H., Pinals, R.S., Schaller, J.G., Sharp, J.T., Wilder, R.L., Hunder, G.G., 1988. The american rheumatism association 1987 revised criteria

- for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 31, 315–324. <https://doi.org/10.1002/art.1780310302>
- Avouac, J., Gossec, L., Dougados, M., 2006. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 845–851. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.051391>
- Bang, H., Egerer, K., Gauliard, A., Lütke, K., Rudolph, P.E., Fredenhagen, G., Berg, W., Feist, E., Burmester, G.-R., 2007. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56, 2503–2511. <https://doi.org/10.1002/art.22817>
- Behrens, F., Himsel, A., Rehart, S., Stanczyk, J., Beutel, B., Zimmermann, S.Y., Koehl, U., Möller, B., Gay, S., Kaltwasser, J.P., Pfeilschifter, J.M., Radeke, H.H., 2007. Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 1151–1156. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.068320>
- Berglin, E., 2006. Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65, 453–458. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.041376>
- Bianchi, M.E., 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 1–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306164>
- Bjarnason, I., So, A., Levi, A.J., Peters, Timothy J., Williams, P., Zanelli, Giuseppe D., Gumpel, J.M., Ansell, B., 1984. INTESTINAL PERMEABILITY AND INFLAMMATION IN RHEUMATOID ARTHRITIS: EFFECTS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS. *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 8413 324, 1171–1174. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)92739-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)92739-9)
- Bjarnason, I., Zanelli, G., Smith, T., Prouse, P., Williams, P., Smethurst, P., Delacey, G., Gumpel, M.J., Levi, A.J., 1987. Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* 93, 480–489. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90909-7](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90909-7)
- Bojko, J., 2017. Measurement of blood calprotectin (MRP-8/MRP-14) levels in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Reumatologia* 55, 10–14. <https://doi.org/10.5114/reum.2017.66682>
- Bos, C. van den, Roth, J., Koch, H.G., Hartmann, M., Sorg, C., 1996. Phosphorylation of MRP14, an S100 protein expressed during monocytic differentiation, modulates Ca(2+)-dependent translocation from cytoplasm to membranes and cytoskeleton. *The Journal of Immunology* 156, 1247–1254.
- Brown, A.K., Quinn, M.A., Karim, Z., Conaghan, P.G., Peterfy, C.G., Hensor, E., Wakefield, R.J., O'Connor, P.J., Emery, P., 2006. Presence of significant synovitis in rheumatoid arthritis patients with disease-modifying antirheumatic drug-induced clinical remission: Evidence from an imaging study may explain structural progression. *Arthritis & Rheumatism* 54, 3761–3773. <https://doi.org/10.1002/art.22190>
- Bruce, B., Fries, J.F., June 9, 2003a. The Stanford Health Assessment Questionnaire: Dimensions and Practical Applications. *Health and Quality of Life Outcomes* 1, 20. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-1-20>
- Burger, D., Rezzonico, R., Li, J.-M., Modoux, C., Pierce, R.A., Welgus, H.G., Dayer, J.-M., 1998. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with

- stimulated T lymphocytes: Involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis & Rheumatism* 41, 1748–1759. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199810\)41:10<1748::AID-ART7>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199810)41:10<1748::AID-ART7>3.0.CO;2-3)
- Carmona, L., Villaverde, V., Hernández-García, C., Ballina, J., Gabriel, R., Laffon, A., 2002. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatology (Oxford)* 41, 88–95. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/41.1.88>
- Carrión, M., Juarranz, Y., Martínez, C., González-Álvaro, I., Pablos, J.L., Gutiérrez-Cañas, I., Gomariz, R.P., 2013. IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 52, 2177–2186. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket315>
- Cascão, R., Rosário, H.S., Souto-Carneiro, M.M., Fonseca, J.E., 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews* 9, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.12.013>
- Centola, M., Cavet, G., Shen, Y., Ramanujan, S., Knowlton, N., Swan, K.A., Turner, M., Sutton, C., Smith, D.R., Haney, D.J., Chernoff, D., Hesterberg, L.K., Carulli, J.P., Taylor, P.C., Shadick, N.A., Weinblatt, M.E., Curtis, J.R., 2013. Development of a Multi-Biomarker Disease Activity Test for Rheumatoid Arthritis. *PLOS ONE* 8, e60635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060635>
- Chang, J.S., Quinn, J.M., Demaziere, A., Bulstrode, C.J., Francis, M.J., Duthie, R.B., Athanasou, N.A., 1992. Bone resorption by cells isolated from rheumatoid synovium. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51, 1223–1229. <https://doi.org/10.1136/ard.51.11.1223>
- Choi, I.Y., Gerlag, D.M., Herenius, M.J., Thurlings, R.M., Wijbrandts, C.A., Foell, D., Vogl, T., Roth, J., Tak, P.P., Holzinger, D., 2015a. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 74, 499–505. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203923>
- Choi, I.Y., Gerlag, D.M., Herenius, M.J., Thurlings, R.M., Wijbrandts, C.A., Foell, D., Vogl, T., Roth, J., Tak, P.P., Holzinger, D., 2015b. MRP8/14 serum levels as a strong predictor of response to biological treatments in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 74, 499–505. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203923>
- Choi, I.Y., Gerlag, D.M., Holzinger, D., Roth, J., Tak, P.P., 2014. From Synovial Tissue to Peripheral Blood: Myeloid Related Protein 8/14 Is a Sensitive Biomarker for Effective Treatment in Early Drug Development in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLOS ONE* 9, e106253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106253>
- Cimmino, M.A., Parisi, M., Moggiana, G., Mela, G.S., Accardo, S., 1998. Prevalence of rheumatoid arthritis in Italy: the Chiavari study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 57, 315–318. <https://doi.org/10.1136/ard.57.5.315>
- Clohessy, P.A., Golden, B.E., 1995. Calprotectin-mediated zinc chelation as a biostatic mechanism in host defence. *Scand. J. Immunol.* 42, 551–556.
- Colebatch, A.N., Edwards, C.J., Østergaard, M., van der Heijde, D., Balint, P.V., D’Agostino, M.-A., Forslind, K., Grassi, W., Haavardsholm, E.A., Haugeberg, G., Jurik, A.-G., Landewé, R.B., Naredo, E., O’Connor, P.J., Ostendorf, B., Potočki, K., Schmidt, W.A., Smolen, J.S., Sokolovic, S., Watt, I., Conaghan, P.G., 2013. EULAR recommendations for the use of imaging of the joints in the clinical management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 72, 804–814. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-203158>
- Combe, B., Landewe, R., Lukas, C., Bolosiu, H.D., Breedveld, F., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J.M.W., Klareskog, L., Machold, K., Martin-

- Mola, E., Nielsen, H., Silman, A., Smolen, J., Yazici, H., 2006. EULAR recommendations for the management of early arthritis: report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 34–45. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.044354>
- Cotoi, O.S., Dunér, P., Ko, N., Hedblad, B., Nilsson, J., Björkbacka, H., Schiopu, A., 2014. Plasma S100A8/A9 correlates with blood neutrophil counts, traditional risk factors, and cardiovascular disease in middle-aged healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 202–210. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302432>
- Cypers, H., Varkas, G., Beeckman, S., Debusschere, K., Vogl, T., Roth, J., Drennan, M.B., Lavric, M., Foell, D., Cuvelier, C.A., Vos, M.D., Delanghe, J., Bosch, F.V., den, Elewaut, D., 2016. Elevated calprotectin levels reveal bowel inflammation in spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 75, 1357–1362. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208025>
- DALE, I., FAGERHOL, M.K., NAESGAARD, I., 1983. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leukocyte protein, the L1 antigen. *European Journal of Biochemistry* 134, 1–6.
- Damo, S.M., Kehl-Fie, T.E., Sugitani, N., Holt, M.E., Rathi, S., Murphy, W.J., Zhang, Y., Betz, C., Hench, L., Fritz, G., Skaar, E.P., Chazin, W.J., 2013. Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens. *PNAS* 201220341. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220341110>
- Detert, J., Bastian, H., Listing, J., Weiß, A., Wassenberg, S., Liebhaber, A., Rockwitz, K., Alten, R., Krüger, K., Rau, R., Simon, C., Gremmelsbacher, E., Braun, T., Marsmann, B., Höhne-Zimmer, V., Egerer, K., Buttgereit, F., Burmester, G.-R., 2013. Induction therapy with adalimumab plus methotrexate for 24 weeks followed by methotrexate monotherapy up to week 48 versus methotrexate therapy alone for DMARD-naïve patients with early rheumatoid arthritis: HIT HARD, an investigator-initiated study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 72, 844–850. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201612>
- Doran, M.F., Crowson, C.S., Pond, G.R., O'Fallon, W.M., Gabriel, S.E., 2002. Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls: A population-based study. *Arthritis & Rheumatism* 46, 2287–2293. <https://doi.org/10.1002/art.10524>
- Drynda, S., Ringel, B., Kekow, M., Kühne, C., Drynda, A., Glocker, M.O., Thiesen, H.-J., Kekow, J., 2004. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNF α therapy. *Pathology - Research and Practice, Proteomics in Pathology, Research and Practice* 200, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2004.02.011>
- Edwards, J.C.W., Szechinski, J., Emery, P., Shaw, T., 2004. Efficacy of B-Cell-Targeted Therapy with Rituximab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 10.
- Eerola, E., Möttönen, T., Hannonen, P., Luukkainen, R., Kantola, I., Vuori, K., Tuominen, J., Toivanen, P., 1994. INTESTINAL FLORA IN EARLY RHEUMATOID ARTHRITIS. *Rheumatology* 33, 1030–1038. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/33.11.1030>

- Ertugrul, A.S., Sahin, H., Ertugrul, A.S., Sahin, H., 2016. The effect of smoking on myeloid-related protein-8 and myeloid-related protein-14. *Brazilian Oral Research* 30. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0051>
- Fagerhol, M.K., 1996. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? *Clin Mol Pathol* 49, M74–M79.
- Fautrel, B., Combe, B., Rincheval, N., Dougados, M., 2012. Level of agreement of the 1987 ACR and 2010 ACR/EULAR rheumatoid arthritis classification criteria: an analysis based on ESPOIR cohort data. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71, 386–389. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200259>
- Felson, D., Anderson JJ, J., Boers, M., Bombardier, C., Che, 1993. American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis & Rheumatism*; Official Journal of the American College of Rheumatology.
- Felson, D.T., Anderson, J.J., Boers, M., Bombardier, C., Furst, D., Goldsmith, C., Katz, L.M., Lightfoot, R., Paulus, H., Strand, V., Tugwell, P., Weinblatt, M., Williams, H.J., Wolfe, F., Kieszak, S., 1995. American college of rheumatology preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 38, 727–735. <https://doi.org/10.1002/art.1780380602>
- Felson, D.T., Anderson, J.J., Lange, M.L.M., Wells, G., LaValley, M.P., 1998. Should improvement in rheumatoid arthritis clinical trials be defined as fifty percent or seventy percent improvement in core set measures, rather than twenty percent? *Arthritis & Rheumatism* 41, 1564–1570. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199809\)41:9<1564::AID-ART6>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199809)41:9<1564::AID-ART6>3.0.CO;2-M)
- Figueiredo, C., Bang, H., Cobra, J.F., Englbrecht, M., Hueber, A.J., Haschka, J., Manger, B., Kleyer, A., Reiser, M., Finzel, S., Tony, H.-P., Kleinert, S., Wendler, J., Schuch, F., Ronneberger, M., Feuchtenberger, M., Fleck, M., Manger, K., Ochs, W., Schmitt-Haendle, M., Lorenz, H.-M., Nuesslein, H., Alten, R., Henes, J.C., Krueger, K., Rech, J., Schett, G., 2016. AB0189 Anti-Modified Protein Antibody Response Pattern Influences The Risk for Disease Relapse in Rheumatoid Arthritis Patients Tapering Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs. *Annals of the Rheumatic Diseases* 75, 961–962. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-eular.2387>
- Finkemeier, I., Schwarzer, D., 2013. Lysin-Acetylierung: eine altbekannte Proteinmodifikation in neuem Licht. *BIOspektrum* 19, 810–812. <https://doi.org/10.1007/s12268-013-0392-z>
- Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T., Roth, J., 2007a. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *Journal of Leukocyte Biology* 81, 28–37. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306170>
- Fransen, J., Creemers, M.C.W., Van Riel, P.L.C.M., 2004. Remission in rheumatoid arthritis: agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology (Oxford)* 43, 1252–1255. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh297>
- Fransen, J., van Riel, P.L.C.M., 2009. The Disease Activity Score and the EULAR Response Criteria. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 35, 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2009.10.001>
- Fries, J.F., Spitz, P., Kraines, R.G., Holman, H.R., 1980. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 23, 137–145. <https://doi.org/10.1002/art.1780230202>
- Frosch, M., Ahlmann, M., Vogl, T., Wittkowski, H., Wulffraat, N., Foell, D., Roth, J., 2009. The myeloid-related proteins 8 and 14 complex, a novel ligand of toll-like

- receptor 4, and interleukin-1 β form a positive feedback mechanism in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 60, 883–891. <https://doi.org/10.1002/art.24349>
- Frosch, M., Strey, A., Vogl, T., Wulffraat, N.M., Kuis, W., Sunderkötter, C., Harms, E., Sorg, C., Roth, J., 2000. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 43, 628–637. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200003\)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200003)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X)
- Gay, N.J., Gangloff, M., 2007. Structure and Function of Toll Receptors and Their Ligands. *Annual Review of Biochemistry* 76, 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.151318>
- Gershey, E.L., Vidali, G., Allfrey, V.G., 1968. Chemical Studies of Histone Acetylation THE OCCURRENCE OF ϵ -N-ACETYLLYSINE IN THE f2a1 HISTONE. *J. Biol. Chem.* 243, 5018–5022.
- Gregersen, P.K., Silver, J., Winchester, R.J., 1987. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 30, 1205–1213. <https://doi.org/10.1002/art.1780301102>
- Grevers, L.C., Vries, T.J. de, Vogl, T., Abdollahi-Roodsaz, S., Sloetjes, A.W., Leenen, P.J.M., Roth, J., Everts, V., Berg, W.B. van den, Lent, P.L.E.M. van, 2011. S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: Implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 63, 1365–1375. <https://doi.org/10.1002/art.30290>
- Hammer, H., Fagerhol, M.K., Wien, T., Kvien, T.K., 2011. The soluble biomarker calprotectin (a S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Research & Therapy* 13, R178. <https://doi.org/10.1186/ar3503>
- Hammer, H.B., Fagerhol, M.K., Wien, T.N., Kvien, T.K., 2011. The soluble biomarker calprotectin (an S100 protein) is associated to ultrasonographic synovitis scores and is sensitive to change in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Arthritis Res. Ther.* 13, R178. <https://doi.org/10.1186/ar3503>
- Hammer, H.B., Haavardsholm, E.A., Kvien, T.K., 2008. Calprotectin (a major leucocyte protein) is associated with the levels of anti-CCP and rheumatoid factor in a longitudinal study of patients with very early rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 37, 179–182. <https://doi.org/10.1080/03009740701874451>
- Hammer, H.B., Ødegård, S., Fagerhol, M.K., Landewé, R., Heijde, D. van der, Uhlig, T., Mowinckel, P., Kvien, T.K., 2007. Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 66, 1093–1097. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.064741>
- Hammer, H.B., Ødegård, S., Syversen, S.W., Landewé, R., Heijde, D. van der, Uhlig, T., Mowinckel, P., Kvien, T.K., 2010. Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, 150–154. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.103739>
- Holzinger, D., Frosch, M., Kastrup, A., Prince, F.H.M., Otten, M.H., Suijlekom-Smit, L.W.A.V., Cate, R. ten, Hoppenreijns, E.P.A.H., Hansmann, S., Moncrieffe, H.,

- Ursu, S., Wedderburn, L.R., Roth, J., Foell, D., Wittkowski, H., 2012. The Toll-like receptor 4 agonist MRP8/14 protein complex is a sensitive indicator for disease activity and predicts relapses in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 71, 974–980.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200598>
- Hua, C., Daien, C.I., Combe, B., Landewe, R., 2017. Diagnosis, prognosis and classification of early arthritis: results of a systematic review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *RMD Open* 3, e000406. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2016-000406>
- Hurnakova, J., Hulejova, H., Zavada, J., Hanova, P., Komarc, M., Mann, H., Klein, M., Sleglova, O., Olejarova, M., Forejtova, S., Ruzickova, O., Vencovsky, J., Pavelka, K., Senolt, L., 2017. Relationship between serum calprotectin (S100A8/9) and clinical, laboratory and ultrasound parameters of disease activity in rheumatoid arthritis: A large cohort study. *PLoS ONE* 12, e0183420.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183420>
- Hurnakova, J., Hulejova, H., Zavada, J., Komarc, M., Cerezo, L.A., Mann, H., Vencovsky, J., Pavelka, K., Senolt, L., 2018. Serum calprotectin may reflect inflammatory activity in patients with active rheumatoid arthritis despite normal to low C-reactive protein. *Clin Rheumatol* 37, 2055–2062.
<https://doi.org/10.1007/s10067-018-4091-5>
- Hurnakova, J., Zavada, J., Hanova, P., Hulejova, H., Klein, M., Mann, H., Sleglova, O., Olejarova, M., Forejtova, S., Ruzickova, O., Komarc, M., Vencovsky, J., Pavelka, K., Senolt, L., 2015. Serum calprotectin (S100A8/9): an independent predictor of ultrasound synovitis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 17, 252. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0764-5>
- Inciarte-Mundo, J., Ramirez, J., Hernández, M.V., Ruiz-Esquide, V., Cuervo, A., Cabrera-Villalba, S.R., Pascal, M., Yagüe, J., Cañete, J.D., Sanmarti, R., 2016. Calprotectin and TNF trough serum levels identify power Doppler ultrasound synovitis in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis patients in remission or with low disease activity. *Arthritis Research & Therapy* 18, 160.
<https://doi.org/10.1186/s13075-016-1032-z>
- Jonsson, M.K., Sundlisæter, N.P., Nordal, H.H., Hammer, H.B., Aga, A.-B., Olsen, I.C., Brokstad, K.A., van der Heijde, D., Kvien, T.K., Fevang, B.-T.S., Lillegraven, S., Haavardsholm, E.A., 2017. Calprotectin as a marker of inflammation in patients with early rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 76, 2031–2037.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211695>
- Juarez, M., Bang, H., Hammar, F., Reimer, U., Dyke, B., Sahbudin, I., Buckley, C.D., Fisher, B., Filer, A., Raza, K., 2016. Identification of novel antiacetylated vimentin antibodies in patients with early inflammatory arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 1099–1107. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206785>
- Kane, D., Roth, J., Frosch, M., Vogl, T., Bresnihan, B., FitzGerald, O., 2003. Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 1676–1685.
<https://doi.org/10.1002/art.10988>
- Kjeldsen-Kragh, J., Mellbye, O.J., Haugen, M., Mollnes, T.E., Hammer, H.B., Sioud, M., Førre, Ø., 1995. Changes in Laboratory Variables in Rheumatoid Arthritis Patients During a Trial of Fasting and One-year Vegetarian Diet. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 24, 85–93.
<https://doi.org/10.3109/03009749509099290>

- Klareskog, L., Stolt, P., Lundberg, K., Källberg, H., Bengtsson, C., Grunewald, J., Rönnelid, J., Harris, H.E., Ulfgren, A.-K., Rantapää-Dahlqvist, S., Eklund, A., Padyukov, L., Alfredsson, L., 2006. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis & Rheumatism* 54, 38–46. <https://doi.org/10.1002/art.21575>
- Kobayashi, K.S., 2005. Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. *Science* 307, 731–734. <https://doi.org/10.1126/science.1104911>
- Kodama, H., 1991. Essential role of macrophage colony-stimulating factor in the osteoclast differentiation supported by stromal cells. *Journal of Experimental Medicine* 173, 1291–1294. <https://doi.org/10.1084/jem.173.5.1291>
- Kong, Y.-Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.-L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J., Penninger, J.M., 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 397, 315–323. <https://doi.org/10.1038/16852>
- Landewé, R., van der Heijde, D., van der Linden, S., Boers, M., 2006. Twenty-eight-joint counts invalidate the DAS28 remission definition owing to the omission of the lower extremity joints: a comparison with the original DAS remission. *Ann. Rheum. Dis.* 65, 637–641. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.039859>
- Lee, D.M., Weinblatt, M.E., 2001. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 358, 903–911. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06075-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06075-5)
- Lent, P.L.E.M. van, Grevers, L., Blom, A.B., Sloetjes, A., Mort, J.S., Vogl, T., Nacken, W., Berg, W.B. van den, Roth, J., 2008. Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67, 1750–1758. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.077800>
- Lin, L., 2006. RAGE on the Toll Road? *Cellular & molecular immunology* 3, 351–358.
- Loser, K., Vogl, T., Voskort, M., Lueken, A., Kupas, V., Nacken, W., Klenner, L., Kuhn, A., Foell, D., Sorokin, L., Luger, T.A., Roth, J., Beissert, S., 2010. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8⁺ T cells. *Nature Medicine* 16, 713–717. <https://doi.org/10.1038/nm.2150>
- Lundberg, K., Kinloch, A., Fisher, B.A., Wegner, N., Wait, R., Charles, P., Mikuls, T.R., Venables, P.J., 2008. Antibodies to citrullinated α -enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis & Rheumatism* 58, 3009–3019. <https://doi.org/10.1002/art.23936>
- MacGregor, A., Ollier, W., Thomson, W., Jawaheer, D., Silman, A., 1995. HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset, and disease severity. *J Rheumatol* 22, 1032–1036.
- Machado, P., Castrejon, I., Katchamart, W., Koevoets, R., Kuriya, B., Schoels, M., Silva-Fernández, L., Thevissen, K., Vercoutere, W., Villeneuve, E., Aletaha, D., Carmona, L., Landewé, R., van der Heijde, D., Bijlsma, J.W.J., Bykerk, V., Canhão, H., Catrina, A.I., Durez, P., Edwards, C.J., Mjaavatten, M.D., Leeb, B.F., Losada, B., Martín-Mola, E.M., Martínez-Osuna, P., Montecucco, C., Müller-Ladner, U., Østergaard, M., Sheane, B., Xavier, R.M., Zochling, J., Bombardier, C., 2011. Multinational evidence-based recommendations on how to investigate and follow-up undifferentiated peripheral inflammatory arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad

- international panel of rheumatologists in the 3E Initiative. *Ann. Rheum. Dis.* 70, 15–24. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.130625>
- Madland, T.M., Hordvik, M., Haga, H.-J., Jonsson, R., Brun, J.G., 2002a. Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 31, 351–354. <https://doi.org/10.1080/030097402320817077>
- Madland, T.M., Hordvik, M., Haga, H.-J., Jonsson, R., Brun, J.G., 2002b. Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 31, 351–354. <https://doi.org/10.1080/030097402320817077>
- Maradit-Kremers, H., Nicola, P.J., Crowson, C.S., Ballman, K.V., Gabriel, S.E., 2005. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: A population-based study. *Arthritis & Rheumatism* 52, 722–732. <https://doi.org/10.1002/art.20878>
- Margareta Simonsson, B.S., Stefan Bergman, Lennart Jacobsson, Ingemar Petersson, 1999. The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 28, 340–343. <https://doi.org/10.1080/03009749950155319>
- Margolis, R.L., Wilson, L., 1977. Addition of colchicine-tubulin complex to microtubule ends: The mechanism of substoichiometric colchicine poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 3466–3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3466>
- Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., Nogueira, L., Vincent, C., Senshu, T., Serre, G., 2001. The Major Synovial Targets of the Rheumatoid Arthritis-Specific Antifilaggrin Autoantibodies Are Deiminated Forms of the α - and β -Chains of Fibrin. *The Journal of Immunology* 166, 4177–4184. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4177>
- McInnes, I.B., 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 15.
- Mercado, F.B., Marshall, R.I., Klestov, A.C., Bartold, P.M., 2001. Relationship Between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Journal of Periodontology* 72, 779–787. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.6.779>
- Molenaar, E.T.H., Voskuyl, A.E., Dinant, H.J., Bezemer, P.D., Boers, M., Dijkmans, B.A.C., 2004. Progression of radiologic damage in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. *Arthritis Rheum.* 50, 36–42. <https://doi.org/10.1002/art.11481>
- Moore, B.W., 1965. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and biophysical research communications* 19, 739–744.
- Mortensen, O.H., Nielsen, A.R., Erikstrup, C., Plomgaard, P., Fischer, C.P., Krogh-Madsen, R., Lindegaard, B., Petersen, A.M., Taudorf, S., Pedersen, B.K., 2009. Calprotectin — A Novel Marker of Obesity. *PLOS ONE* 4, e7419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007419>
- M.P. Vessey, L. Villard-Mackintosh, D. Yeates, 1987. CONTRACEPTION ORAL CONTRACEPTIVES, CIGARETTE SMOKING AND OTHER FACTORS IN RELATION TO ARTHRITIS.
- Murthy, A.R., Lehrer, R.I., Harwig, S.S., Miyasaki, K.T., 1993. In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. ; 151:6291-6301 12.
- Neumann, E., Lefèvre, S., Zimmermann, B., Gay, S., Müller-Ladner, U., 2010. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends in Molecular Medicine* 16, 458–468. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.004>
- Newton, R.A., Hogg, N., 1998. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. *J. Immunol.* 160, 1427–1435.

- Nielsen, U.B., Bruhn, L.V., Ellingsen, T., Stengaard-Pedersen, K., Hornung, N., 2018. Calprotectin in patients with chronic rheumatoid arthritis correlates with disease activity and responsiveness to methotrexate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 78, 62–67. <https://doi.org/10.1080/00365513.2017.1413591>
- Odink, K., Cerletti, N., Brügggen, J., Clerc, R.G., Tarcsay, L., Zwadlo, G., Gerhards, G., Schlegel, R., Sorg, C., 1987. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 330, 80–82. <https://doi.org/10.1038/330080a0>
- Ometto, F., Friso, L., Astorri, D., Botsios, C., Raffener, B., Punzi, L., Doria, A., 2017. Calprotectin in rheumatic diseases. *Experimental Biology and Medicine* 242, 859–873. <https://doi.org/10.1177/1535370216681551>
- ORGENTEC Diagnostika GmbH, 2018. ORG 580_IFU_DE_QM140864_2018-01-02_3.pdf [WWW Document]. URL https://products.orgentec.com/pdfs/ifu/ORG%20580_IFU_DE_QM140864_2018-01-02_3.pdf (accessed 1.1.19).
- Patro, P.S., Singh, A., Misra, R., Aggarwal, A., 2016. Myeloid-related Protein 8/14 Levels in Rheumatoid Arthritis: Marker of Disease Activity and Response to Methotrexate. *J. Rheumatol.* 43, 731–737. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150998>
- Petersen, B., Wolf, M., Austermann, J., van Lent, P., Foell, D., Ahlmann, M., Kupas, V., Loser, K., Sorg, C., Roth, J., Vogl, T., 2013. The alarmin Mrp8/14 as regulator of the adaptive immune response during allergic contact dermatitis. *EMBO J.* 32, 100–111. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.309>
- Pillay, S.N., Asplin, J.R., Coe, F.L., 1998. Evidence that calgranulin is produced by kidney cells and is an inhibitor of calcium oxalate crystallization. *Am. J. Physiol.* 275, F255-261.
- Pinals, R.S., Masi, A.T., Larsen, R.A., 1981. Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 24, 1308–1315. <https://doi.org/10.1002/art.1780241012>
- Power, D., Codd, M., Ivers, L., Sant, S., Barry, M., 1999. Prevalence of rheumatoid arthritis in Dublin, Ireland: A population based survey. *Ir. J. Med. Sc.* 168, 197–200. <https://doi.org/10.1007/BF02945853>
- Prevoo, M.L.L., Hof, M.A.V., Kuper, H.H., Leeuwen, M.A.V., Putte, L.B.A.V.D., Riel, P.L.C.M.V., 1995. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 38, 44–48. <https://doi.org/10.1002/art.1780380107>
- Puchner, R., 2012. Die rheumatoide Arthritis, in: Puchner, R. (Ed.), *Rheumatologie aus der Praxis: Ein Kurzlehrbuch der entzündlichen Gelenkerkrankungen mit Fallbeispielen*. Springer Vienna, Vienna, pp. 25–57. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1044-7_2
- Quinn, M.A., Conaghan, P.G., Emery, P., 2001. The therapeutic approach of early intervention for rheumatoid arthritis: what is the evidence? *Rheumatology (Oxford)* 40, 1211–1220. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.11.1211>
- Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M., Sorg, C., 1997. Myeloid-related Protein (MRP) 8 and MRP14, Calcium-binding Proteins of the S100 Family, Are Secreted by Activated Monocytes via a Novel, Tubulin-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 9496–9502. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9496>
- Rantapää-Dahlqvist, S., Jong, B.A.W. de, Berglin, E., Hallmans, G., Wadell, G., Stenlund, H., Sundin, U., Venrooij, W.J. van, 2003. Antibodies against cyclic

- citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 2741–2749. <https://doi.org/10.1002/art.11223>
- Raza, K., Falciani, F., Curnow, S.J., Ross, E.J., Lee, C.-Y., Akbar, A.N., Lord, J.M., Gordon, C., Buckley, C.D., Salmon, M., 2005. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Research & Therapy* 7, R784. <https://doi.org/10.1186/ar1733>
- Riise, T., Jacobsen, B.K., Gran, J.T., 2000. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of Troms, northern Norway. *J Rheumatol* 27, 1386–1389.
- Robinson, M.J., Tessier, P., Poulsom, R., Hogg, N., 2002. The S100 Family Heterodimer, MRP-8/14, Binds with High Affinity to Heparin and Heparan Sulfate Glycosaminoglycans on Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 3658–3665. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102950200>
- Romand, X., Paclet, M.H., Courtier, A., Nguyen, M.-V.-C., Berenbaum, F., Wendling, D., Gaudin, P., Baillet, A., 2018. THU0278 Serum calprotectin is correlated with disease activity in early axial spondyloarthritis but does not predict radiographic progression at 2 years: results from the desir cohort. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 357–358. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.4879>
- RØseth, A.G., Fagerhol, M.K., Aadland, E., Schjønsby, H., 1992. Assessment of the Neutrophil Dominating Protein Calprotectin in Feces: A Methodologic Study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 27, 793–798. <https://doi.org/10.3109/00365529209011186>
- Roth, J., Burwinkel, F., Bos, C. van den, Goebeler, M., Vollmer, E., Sorg, C., 1993. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* 82, 1875–1883.
- Roth, J., Burwinkel, F., Bos, C. van den, Goebeler, M., Vollmer, E., Sorg, C., 1993a/09/15 a. MRP8 and MRP14, S-100-like proteins associated with myeloid differentiation, are translocated to plasma membrane and intermediate filaments in a calcium-dependent manner. *Blood* 82, 1875–1883.
- Sahbudin, Pickup, Cader, 2015. OP0015 Ultrasound-Defined Tenosynovitis is a Strong Predictor of Early Rheumatoid Arthritis | *Annals of the Rheumatic Diseases* [WWW Document]. URL http://ard.bmj.com/content/74/Suppl_2/69.3 (accessed 2.10.18).
- Sakellariou, G., Lombardi, G., Vitolo, B., Gomarasca, M., Faraldi, M., Caporali, R., Banfi, G., Montecucco, C., 2018. THU0308 Calprotectin as a marker of disease activity in patients with new onset psoriatic and rheumatoid arthritis: correlation with ultrasonographic synovitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 372–372. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.6347>
- Saroux, A., Guedes, C., Allain, J., Devauchelle, V., Valls, I., Lamour, A., Guillemin, F., Youinou, P., Le, P.G., 1999. Prevalence of rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy in Brittany, France. *Société de Rhumatologie de l'Ouest. J Rheumatol* 26, 2622–2627.
- Schellekens, G.A., Visser, H., Jong, B.A.W.D., Hoogen, F.H.J.V.D., Hazes, J.M.W., Breedveld, F.C., Venrooij, W.J.V., 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis & Rheumatism* 43, 155–163. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3)

- Schett, G., 2008. Frühe rheumatoide Arthritis. *Internist* 49, 263–270.
<https://doi.org/10.1007/s00108-007-2013-8>
- Seriolo, B., Accardo, S., Fasciolo, D., Bertolini, S., Cutolo, M., 1996. Lipoproteins, anticardiolipin antibodies and thrombotic events in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 14, 593–599.
- Shi, J., Knevel, R., Suwannalai, P., Linden, M.P. van der, Janssen, G.M.C., Veelen, P.A. van, Levarht, N.E.W., Mil, A.H.M. van der H., Cerami, A., Huizinga, T.W.J., Toes, R.E.M., Trouw, L.A., 2011. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *PNAS* 201114465. <https://doi.org/10.1073/pnas.1114465108>
- Simonsson, M., Bergman, S., Jacobsson, L.T., Petersson, I.F., Svensson, B., 1999. The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden. *Scand. J. Rheumatol.* 28, 340–343. <https://doi.org/10.1080/03009749950155319>
- Smolen, J.S., Aletaha, D., Koeller, M., Weisman, M.H., Emery, P., 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet* 370, 1861–1874.
- Smolen, J.S., Breedveld, F.C., Schiff, M.H., Kalden, J.R., Emery, P., Eberl, G., van Riel, P.L., Tugwell, P., 2003. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology (Oxford)* 42, 244–257.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg072>
- Somers, E.C., Thomas, S.L., Smeeth, L., Hall, A.J., 2006. Autoimmune Diseases Co-Occurring within Individuals and within Families: A Systematic Review. *Epidemiology* 17, 202–217.
- Srikrishna, G., Panneerselvam, K., Westphal, V., Abraham, V., Varki, A., Freeze, H.H., 2001. Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. *J. Immunol.* 166, 4678–4688.
- Staykova, N.D., Geneva-Popova, M.G., Troev, D.D., Kuzmanova, S.I., Alimanska, S.A., Murdzheva, M.A., 2000. Immune profile and thyroid function in patients with rheumatoid arthritis. *Folia Med (Plovdiv)* 42, 30–33.
- Stríz, I., Trebichavský, I., 2004. Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiol Res* 53, 245–253.
- Strupat, K., Rogniaux, H., Dorsselaer, A., Roth, J., Vogl, T., 2000. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 11, 780–788.
[https://doi.org/10.1016/S1044-0305\(00\)00150-1](https://doi.org/10.1016/S1044-0305(00)00150-1)
- Studenic, P., Bang, H., Alunno, A., Sieghart, D., Aletaha, D., Blüml, S., Haslacher, H., Smolen, J.S., Steiner, G., 2018. FRI0585 Prevalence of anti-acetylated protein antibodies in inflammatory arthritis, osteoarthritis, connective tissue diseases and its discriminative capacity as diagnostic marker for early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 816–817.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.3945>
- Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Yamamoto, H., Chazin, W.J., Nakatani, Y., Yui, S., Makino, H., 2006. The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 8, R69.
<https://doi.org/10.1186/ar1939>
- Tak, P.P., Smeets, T.J., Daha, M.R., Kluin, P.M., Meijers, K.A., Brand, R., Meinders, A.E., Breedveld, F.C., 1997. Analysis of the synovial cell infiltrate in early

- rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum.* 40, 217–225.
- Tarcsa, E., Marekov, L.N., Mei, G., Melino, G., Lee, S.C., Steinert, P.M., 1996. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J. Biol. Chem.* 271, 30709–30716. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30709>
- Torgutalp, M., Dincer, A.B.K., Yayla, E.M., Yurteri, E.U., Okatan, E.I., Guloksuz, G.E.A., Serdar, S., Ebru, U., Kinikli, G., Turgay, M.T., Ates, A., 2018. SAT0085 Relationship between serum calprotectin, disease activity parameters and the 7-joint ultrasound score in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 77, 905–905. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-eular.4898>
- Turesson, C., Jarenros, A., Jacobsson, L., 2004. Increased incidence of cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from a community based study. *Annals of the Rheumatic Diseases* 63, 952–955. <https://doi.org/10.1136/ard.2003.018101>
- Viemann, D., Barczyk, K., Vogl, T., Fischer, U., Sunderkötter, C., Schulze-Osthoff, K., Roth, J., 2007. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. *Blood* 109, 2453–2460. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040444>
- Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., van Zoelen, M.A.D., Nacken, W., Foell, D., van der Poll, T., Sorg, C., Roth, J., 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature Medicine* 13, 1042–1049. <https://doi.org/10.1038/nm1638>
- von Roon, A.C., Karamountzos, L., Purkayastha, S., Reese, G.E., Darzi, A.W., Teare, J.P., Paraskeva, P., Tekkis, P.P., 2007. Diagnostic Precision of Fecal Calprotectin for Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Malignancy. *Am J Gastroenterology* 102, 803–813. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01126.x>
- Westhoff, G., Weber, C., Zink, A., 2006. Komorbidität bei früher rheumatoider Arthritis. *Z. Rheumatol.* 65, 487–496. <https://doi.org/10.1007/s00393-006-0102-z>
- Yamamoto, Y., Udagawa, N., Matsuura, S., Nakamichi, Y., Horiuchi, H., Hosoya, A., Nakamura, M., Ozawa, H., Takaoka, K., Penninger, J.M., Noguchi, T., Takahashi, N., 2006. Osteoblasts Provide a Suitable Microenvironment for the Action of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand. *Endocrinology* 147, 3366–3374. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0216>
- Youssef, P., Roth, J., Frosch, M., Costello, P., Fitzgerald, O., Sorg, C., Bresnihan, B., 1999. Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane. *J Rheumatol* 26, 2523–2528.
- Zhao, S., Xu, W., Jiang, W., Yu, W., Lin, Y., Zhang, T., Yao, J., Zhou, L., Zeng, Y., Li, H., Li, Y., Shi, J., An, W., Hancock, S.M., He, F., Qin, L., Chin, J., Yang, P., Chen, X., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., 2010. Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science* 327, 1000–1004. <https://doi.org/10.1126/science.1179689>
- Zwadlo, G., Brügggen, J., Gerhards, G., Schlegel, R., Sorg, C., 1988. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol* 72, 510–515.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Raisa Krasnitski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Calprotectin bei DMARD (Disease Modifying Anti-Rheumatic Drug)-naiver früher rheumatoider Arthritis als Aktivitäts- und Verlaufsmarker unter Therapie

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. G.-R. Burmester: Ich danke Prof. Dr. Burmester als Klinikdirektor der Medizinischen Klinik m.S. Rheumatologie und Klinische Immunologie der Charité Berlin für die Ermöglichung und Unterstützung dieses Projektes.

AG Feist: Mein herzlicher Dank gilt Dr. Khetam Ghannam für die liebenswerte Aufnahme, Einarbeitung und die technische Unterstützung.

Dr. Dörte Huscher: Ein großer Dank für die Unterstützung in statistischen Fragen.

Orgentec Diagnostika GmbH Mainz: Weiterhin möchte ich Dr. Holger Bang, Forschungsleiter der Orgentec Diagnostika GmbH, für die zur Verfügung gestellten technischen Mittel danken.

Familie und Freunde: Diese Arbeit ist meiner Mutter gewidmet für ihre bedingungslose Unterstützung. Aber ohne die tatkräftige und mentale Unterstützung der folgenden Personen wäre ein Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ein großer Dank gilt: Paul Bovelet, Anne-Karin Busold, Moritz Scholz, Felix Reisbeck und Paul Tangermann.

Prof. Dr. Eugen Feist: Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Feist, der mich während dieses Projektes betreute. Seine stets verfügbare Unterstützung hat maßgeblich zur Vollendung der Promotionsarbeit beigetragen. Für die Förderung meiner Entwicklung betrachte ich ihn mit höchstem Respekt und bin sehr dankbar.