

3 Patienten und Methoden

3.1 Klinische Studie zur „low-dose“ Therapie mit Glucocorticoiden am Beispiel von Methylprednisolon

Eine Patientengruppe mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen wurde als Stichprobe in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité untersucht. Eine Querschnittstudie sowie eine Langzeitstudie wurden in zwei aufeinanderfolgenden Jahren durchgeführt. Jeder Patient wurde seit mindestens einem Jahr mit Methylprednisolon behandelt. Die Auswahl nur eines Glucocorticoids erlaubte es auf die Umrechnung der „Äquivalenzdosen“ zu verzichten und damit die Daten präziser auszuwerten. Teilergebnisse dieser Studie wurden in der Doktorarbeit von Burkhard Bartholome veröffentlicht.⁹³

3.1.1 Methylprednisolon

Methylprednisolon (MP) ist ein Abkömmling des Prednisolons mit einer zusätzlichen Doppelbindung im Ring A sowie einer 6 α -Methylierung mit der chemischen Formel C₂₂H₃₀O₅ (Abb. 3-1). Durch die Doppelbindung verfünffacht sich die glucocorticoide Wirkung des Methylprednisolons. Die Methylierung mindert die mineralocorticoide Wirkung, so dass das Methylprednisolon mit einer relativen glucocorticoiden Potenz von 5 bis 7,5, einer relativen mineralocorticoiden Potenz von bis zu 0,5 und einer Halbwertszeit von 18 bis 40 Stunden ein mittellangwirkendes Glucocorticoid darstellt. Die „Cushing-Schwellendosis“ für Methylprednisolon liegt bei 6 mg/d.

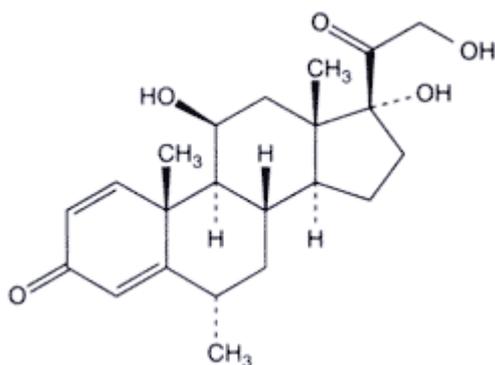


Abbildung 3-1 Struktur des Methylprednisolons

Das Anwendungsgebiet des MP ist breit und ähnelt dem anderer Glucocorticoide wie z.B. Prednisolon. Häufig kommt MP bei entzündlich-rheumatischen sowie respiratorischen Erkrankungen zum Einsatz.

3.1.2 Erfassung der Patientendaten

Die Erfassung der Patientendaten war in beiden aufeinanderfolgenden Jahren einheitlich. Es wurde die aktuelle Anamnese erhoben, eine klinische Untersuchung durchgeführt und die Knochendichte mittels Dual energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) an der Lendenwirbelsäule (LWS) und am linken Schenkelhals (SH) gemessen.

Folgende Daten wurden dokumentiert:

- Allgemein
 - persönliche Daten (vertraulich)
 - Diagnosen
 - Therapie
 - mit Methylprednisolon (Dosis im letzten Jahr, Dauer der Behandlung)
 - Begleittherapie der Grunderkrankung (darunter Goldsalze, D-Penicillamin, Azathiopirin, NSAR, Methotrexat, Sulfasalazin sowie auch Osteoporosetherapeutika)
 - Therapie der Begleiterkrankungen
 - Frakturen in den letzten 12 Monaten
 - Gewicht und Größe (Ab- und Zunahme)
 - Laborparameter (siehe 3.1.6)
- Nebenwirkungen unter MP
 - Knochendichteminderung
 - DEXA-Messung an der LWS und am Schenkelhals
 - Knochenabbau- und -aufbauparameter
 - Vitamin-D-Metabolite
 - Schmerzen
 - Klopf- und Bewegungsschmerzen an der Wirbelsäule (WS)
 - Osteoporoseschmerzen in Ruhe und Bewegung
 - Visuelle Analogskala (VAS) zu den Osteoporoseschmerzen
 - Hautveränderungen (Pergamenthaut, Unterblutungen, Striae)

- Cushingoider Habitus
- Glaukom
- Fragebogen zum Gesundheitszustand des Patienten
 - Medical Outcomes Study Short Form 36 (SF-36)
 - Health Assessment Questionnaire (HAQ)
 - Visuelle Analogskala (VAS)
 - VAS zur globalen Krankheitsaktivität (Patient-/Arztversion)
 - VAS zu den Gelenkschmerzen
 - VAS zur Müdigkeit
 - VAS zum allgemeinen Gesundheitszustand

Alle Daten wurden schriftlich erfasst und dann mittels MS Excel, SPSS und dem modifizierten SAS-Programm nach Brunner bearbeitet. Eine Ethikkommissionzustimmung lag vor.

3.1.3. Charakterisierung des Patientenkollektivs

In den folgenden Unterpunkten werden die Patientendaten für die Quer- und Längsschnittstudie dargestellt.

3.1.3.1 Querschnittstudie

An der Studie nahmen 70 Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen teil, die seit mindestens einem Jahr mit Methylprednisolon (MP) behandelt wurden. Die Daten von 42 nach gleichem Protokoll untersuchten Patienten wurden aus der Dissertation von Bartolome entnommen.⁹³ Es erfolgte eine statistische Gesamtauswertung.

In Abhängigkeit von der im letzten Jahr eingenommenen MP-Durchschnittsdosis wurden zwei Gruppen (Gruppe 1: < 6 mg/d, Gruppe 2: ≥ 6 mg/d) gebildet. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen bezüglich der Alters- und Geschlechtsverteilung. Die Verteilung von Alter, Geschlecht und rheumatischen Krankheitsbildern in den beiden Gruppen ist in der Tabelle 3-4 dargestellt.

Tabelle 3-4 Verteilung des Alters, Geschlechts sowie der Krankheitsbilder in den Dosisgruppen.

	Gruppe 1 Niedrige Dosishöhe (< 6 mg/d)	Gruppe 2 Mittlere Dosishöhe (≥ 6 mg/d)
Anzahl (n)	38	32
weiblich	34	26
männlich	4	6
Alter		
Minimum-Maximum	20-80 Jahre	24-89 Jahre
Mittelwert	53,2 ± 13,9	49,7 ± 16,17
Median	53	47
Diagnosen (n)		
	Kollagenosen ¹ : 15	Kollagenosen ¹ : 15
	Vaskulitiden ² : 7	Vaskulitiden ² : 7
	Rheumatoide Arthritis ³ : 12	Rheumatoide Arthritis ³ : 8
	Spondylarthropathien ⁴ : 2	Spondylarthropathien ⁴ : 1
	Andere ⁵ : 2	Andere ⁵ : 1
Ø MP-Dosis / letztes Jahr		
Minimum-Maximum	1,58 mg/d - 5,83 mg/d	6 mg/d – 20 mg/d
Mittelwert	3,9 ± 0,89 mg/d	9,2 ± 3,43 mg/d
Median	4,0 mg/d	8,0 mg/d

1 Systemischer und kutaner Lupus erythematoses, Polymyositis, CREST-Syndrom, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie, MCTD

2 M. Wegener, Polymyalgia rheumatica, Churg-Strauss-Vaskulitis, sonstige Vaskulitiden

3 Diagnose nach ACR-Kriterien

4 Spondylitis ankylosans und seronegative Spondylarthropathie

5 Polychondritis, Cogan-Syndrom, Still-Syndrom

Tabelle 3-5 beschreibt die zusätzlich zum Methylprednisolon eingenommenen Medikamente während des letzten Jahres, welche die Knochendichte positiv bzw. negativ beeinflusst haben könnten. Auch diesbezüglich ergaben sich keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede.

Tabelle 3-5 Im letzten Jahr eingenommene Medikamente mit möglichem Einfluss auf die Knochendichte (außer MP).

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gesamt
Methotrexat	8	7	15
Vitamin D / Calcium	22	23	45
Bisphosphonate	9	7	16
Östrogene	2	0	2

3.1.3.2 Längsschnittstudie

Von den initial 42 Patienten (im ersten Jahr der Studie) konnten bei 17 Patienten nach einem Jahr alle Parameter im Verlauf kontrolliert werden. Drei Patienten hatten die Dosisgruppe gewechselt, daher erfolgte die Verlaufskontrolle für 14 Patienten. In Tabelle 3-6 ist die Verteilung des Geschlechts, des Alters sowie der Diagnosen für diese 14 Patienten dargestellt. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

Tabelle 3-6 Alters-, Geschlechts- und Krankheitsverteilung in den Dosisgruppen.

	Gruppe 1 niedrigere Dosis (< 6 mg/d)	Gruppe 2 mittlere Dosis (≥ 6 mg/d)
Anzahl (n)	9	5
weiblich	8	3
männlich	1	2
Alter*		
Minimum-Maximum	24-66 Jahre	32-60 Jahre
Mittelwert	52,8 ± 13,62	48,2 ± 12,42
Median	58	54
Diagnosen (n)		
	Kollagenosen ¹ : 4	Kollagenosen ¹ : 3
	Vaskulitiden ² : 1	Vaskulitiden ² : 1
	Rheumatoide Arthritis ³ : 1	Rheumatoide Arthritis ³ : 1
	Spondylarthropathien ⁴ : 1	
	Andere ⁵ : 2	

1 Systemischer und kutaner Lupus erythematoses, Polymyositis, CREST-Syndrom, Sjögren-Syndrom, Sklerodermie, MCTD

2 M. Wegener, Polymyalgia rheumatica, Churg-Strauss-Vaskulitis, sonstige Vaskulitiden

3 Diagnose nach ACR-Kriterien

4 Spondylitis ankylosans und seronegative Spondylarthropathie

5 Polychondritis, Cogan-Syndrom, Still-Syndrom

* im 1. Jahr

In der Tabelle 3-7 sind die eingenommene MP-Dosis und zusätzliche Medikamente, die die Knochendichte beeinflussen, dargestellt. Auch bezüglich dieser Angaben wurden keine auffälligen Unterschiede festgestellt.

Tabelle 3-7 MP-Dosis und eingenommene Medikamente, die einen möglichen Einfluss auf die Knochendichte hatten.

	Gruppe 1 niedrigere Dosis (< 6 mg/d)		Gruppe 2 mittlere Dosis (≥ 6 mg/d)	
	1. Jahr	2. Jahr	1. Jahr	2. Jahr
Ø MP-Dosis / letztes Jahr				
Minimum-Maximum	4-5,8 mg/d	6-13,8 mg/d	4-5 mg/d	6-8 mg/d
Mittelwert	4,3 ± 0,68 mg/d	4,1 ± 0,33 mg/d	8,8 ± 3,27 mg/d	7,2 ± 1,1 mg/d
Median	4,0 mg/d	4,0 mg/d	8,0 mg/d	8,0 mg/d
Methotrexat (n)	0	0	0	1
Calcium/Vitamin-D (n)	3	0	3	4
Bisphosphonate (n)	3	0	1	2
Östrogene (n)	1	2	0	0

3.1.4 Osteoporose als Nebenwirkung der GC-Therapie

Die Knochendichteminderung gehört bekanntlich zu den häufigsten Nebenwirkungen der GC-Langzeittherapie. In der Tabelle 3-1 ist die WHO-Definition der Osteoporose auf Basis der Knochendichte dargestellt.

Tabelle 3-1 Definition der Osteoporose auf Basis der Knochendichte (WHO, Technical Report Series 843, 1994).

Normal:

Ein Wert der Knochenmineraldichte (BMD = bone mineral density) oder des Knochenmineralgehalts (BMC = bone mineral content) innerhalb 1 Standardabweichung vom Mittelwert junger erwachsener Personen.

Osteopenie:

Ein BMD- oder BMC-Wert zwischen -1 und -2,5 Standardabweichungen unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen.

Osteoporose:

Ein BMD- oder BMC-Wert von 2,5 oder mehr unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen.

Schwere Osteoporose (manifeste Osteoporose):

Ein BMD- oder BMC-Wert von mehr als 2,5 unterhalb des Mittelwertes junger erwachsener Personen und zusätzlich das Vorhandensein von einer oder mehreren Frakturen.

Die Knochendichtemessung erfasst die Knochendichteveränderungen mit einer gewissen zeitlichen Latenz. Daher wurden zusätzlich Laborparameter und

Osteoporoseschmerzen quantifiziert, um ein umfassendes Bild der GC-Wirkung auf den Knochen zu erhalten.

3.1.4.1 Bestimmung der Knochendichte

Aus den zahlreichen Methoden für die Knochendichtemessung haben wir die Dual X-Ray Absorptiometry ausgewählt (DEXA). Das DPX Lunar® System wurde angewandt. Die DEXA ist ein Projektionsverfahren, daher muss die gemessene Knochendichte korrekterweise als Knochenflächendichte bezeichnet werden (g/cm^2). Der menschliche Körper kann als ein Zweikomponenten-System angesehen werden, der aus Knochenmaterial und Weichteilgewebe besteht. Dank spezieller Filter ist es möglich, Röntgenstrahlung mit zwei verschiedenen Energien zu erzeugen (38 und 70 keV). Strahlung mit niedriger Energie wird stärker absorbiert (besonders durch Knochengewebe), was die Unterscheidung zwischen beiden Komponenten erlaubt. Gemessen werden einzelne Regionen des Körpers, so genannte Regions Of Interest (ROI). Der Abbau der Knochenmasse beginnt ab etwa dem 40. Lebensjahr und beträgt jährlich ca. 0,5-1,5%. Definitionsgemäß handelt es sich bei der Osteoporose um eine systemische Skeletterkrankung, die charakterisiert ist durch niedrige Knochenmasse und eine Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes, wodurch die Brüchigkeit des Knochens und die Frakturanfälligkeit erhöht sind. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass gewisse Unterschiede in der Geschwindigkeit des Abbaus zwischen verschiedenen Körperregionen in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter des Patienten beobachtet werden. Bei Personen bis zum 65. Lebensjahr, besonders bei postmenopausalen Frauen, kommt es hauptsächlich zum Abbau des trabekulären Knochens. In diesem Falle ist die Messung an der LWS am aussagekräftigsten (Wirbel bestehen zu 50% aus trabekulärem und zu 50% aus kortikalem Knochen). Die Abbildung 3-2 zeigt ein Beispiel der Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule.

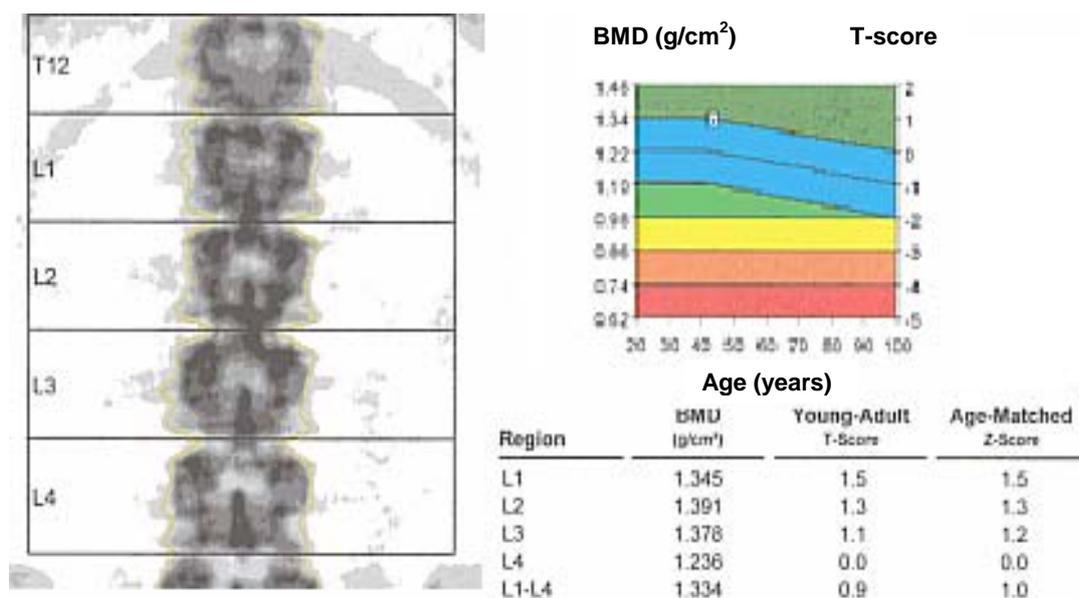


Abbildung 3-2 Knochendichtemessung an der Lendenwirbelsäule.

Im höheren Alter wird der kortikale Anteil zuerst angegriffen. Daher wird der proximale Femuranteil bevorzugt gemessen.⁹⁴ Als unsere ROI haben wir den linken Schenkelhals (SH) und die Lendenwirbelsäule (LWS) im anterior-posterioren Strahlengang (L2-L4 Vergleich) ausgewählt. Densitometrische Messungen in verschiedenen ROIs korrelieren zwar miteinander ($r = 0,4-0,9$), die wiederholte Messung in derselben Region ist jedoch weiterhin die beste Methode zur Einschätzung des Frakturrisikos.⁹⁴ Aus diesem Grund wurden im Jahresabstand die Messungen in denselben Regionen wiederholt. Die Messungen im Bereich des proximalen Anteils des Femurs erlauben die Beurteilung von drei Regionen: Schenkelhals („Neck“), Wards Region („Wards“) und Trochanter major („Troch“). Der schnellste Abbau wird in der Wards Region beobachtet. Wir haben uns jedoch auf die „Neck“ Region konzentriert, um den kortikalen Anteil des Knochens beurteilen zu können. Die Abbildung 3-3 zeigt ein Beispiel der Knochendichtemessung am Schenkelhals.

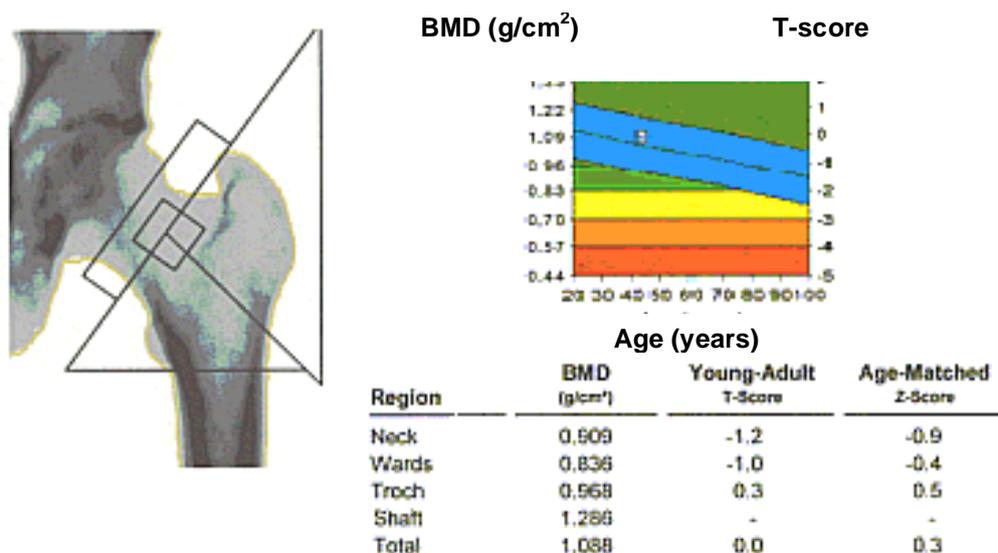


Abbildung 3-3 Knochendichtemessung am Schenkelhals.

Die Ergebnisse werden als Knochenmineraldichte (BMD) in g/cm^2 und Young Adult (%), Age Matched (%) bzw. T-Score und Z-Score angegeben. Bei der BMD werden sowohl Alter, Geschlecht, Körpergewicht als auch ethnische Herkunft berücksichtigt. Personen mit höherem Körpergewicht haben normalerweise auch eine höhere Knochendichte. Ein Unterschied von 1 kg verändert den BMD-Wert um ca. $0,0004 \text{ g/cm}^2$ (Werte für LWS und Schenkelhals). BMD ist der klinisch aussagekräftigste Parameter für den Zustand des Skelettsystems des Patienten. Mit sinkendem BMD-Wert steigt unabhängig vom Alter das Frakturrisiko. Die BMD-Werte werden mit Werten einer jüngeren knochengesunden Referenzpopulation (20 bis 40 Jahre alt) verglichen und als Young Adult Wert in % oder als Standardabweichung (SA, sogenannte T-Score) angegeben. Nach WHO-Definition (siehe auch 3.1.3) ist die Osteopenie durch einen T-Score von -1,0 bis -2,5 charakterisiert. Von einer Osteoporose wird bei T-Score Werten unter -2,5 gesprochen. Die Definition bezieht sich auf die Werte, die mittels der DEXA-Messung an der LWS und am Femur gemessen worden sind. Der Vergleich der BMD mit einer Gruppe von Probanden gleichen Alters und Geschlechts unter Berücksichtigung von Körpergewicht wird als Age-Matched (%) oder Z-Score angegeben. Unter Glucocorticoid-Therapie macht sich der Kalksalzverlust zuerst überwiegend im Bereich des spongiösen Knochens, insbesondere an der Wirbelsäule, bemerkbar. Schon bei einer Verminderung der BMD um 1 SA steigt das Frakturrisiko auf das Doppelte. Bei der Osteoporose ist das Risiko vierfach erhöht. Ist beim Schenkelhals die BMD um 1 SA erniedrigt, verdreifacht sich das Frakturrisiko. Unter Glucocorticoidmedikation steigt das Risiko

der Wirbelsäulenkompressionsfrakturen auf das 3-6 fache bei analogen BMD-Veränderungen.⁹⁵

3.1.4.2 Knochenstoffwechselfparameter

Als Knochenparameter sind von uns die Vitamin-D-Metabolite sowie verschiedene Knochenumbauparameter erhoben worden.

Seit langem ist bekannt, dass Calcitriol sowohl anabole als auch katabole Effekte auf den Knochenstoffwechsel ausübt. Dies passiert zugleich auf dem direkten sowie dem indirekten Weg (siehe unten). Um den Vitamin-D-Stoffwechsel möglichst korrekt abzubilden, wurden im Blut unseres Patientenkollektivs sowohl Calcidiol- als auch Calcitriolwerte gemessen.

Unter Knochenumbauparametern werden Knochenaufbau- und -abbauparameter verstanden. Zwar ermöglicht keiner dieser Marker allein, Osteoporose zu diagnostizieren, jedoch wird eine Kombination von verschiedenen Knochenumbauparametern als eine gute Ergänzung zu anderen diagnostischen Mitteln angesehen. Ihre Vorteile sind die niedrige Invasivität und die leichte Wiederholbarkeit der Untersuchung. Außerdem reagieren sie, im Gegensatz zu den Knochendichteveränderungen bei der DEXA-Messung, rasch, und signifikante Effekte werden schon nach einer Therapiedauer von 6 bis 8 Wochen beobachtet. Die Nachteile liegen in den zirkadianen Schwankungen der Messwerte, der eingeschränkten Lagerungsstabilität sowie der unzureichenden Sensitivität des Assays und der unzureichenden Präzision der Referenzbereiche, da die Werte von Alter, Körpergewicht und -größe abhängen. Zur Primärdiagnostik der erniedrigten Knochendichte und zur Beurteilung des Frakturrisikos ist weiterhin die Osteodensitometrie die anerkannte Methode. Die Knochenumbauparameter werden hauptsächlich zur Verlaufskontrolle und Therapiebeurteilung herangezogen. Die Tabelle 3-2 zeigt die Zusammenstellung der in unserer Studie erhobenen Knochenumbauparameter.

Tabelle 3-2 Die erhobenen Knochenumbauparameter.

Knochenaufbauparameter

knochenspezifische Alkalische Phosphatase
Osteocalcin

Knochenabbauparameter

Pyridinolin
Desoxypyridinolin
N-Telopeptid

Vitamin-D-Metabolite

Vitamin-D ist eher als ein calcitropes Steroidhormon als ein Vitamin anzusehen und ist für die Calcium- und Phosphathomöostase sowie für die Mineralisation des Knochens unabdingbar. Im deutschen sowie anglo-amerikanischen Sprachraum werden unter dem Begriff „Vitamin D“ sowohl Vitamin D₃ (Cholecalciferol) als auch das aktive Hormon 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ verstanden. Abkömmlinge von Cholecalciferol sind in der Leber hydroxyliertes 25(OH)-Cholecalciferol (Synonym: Calcidiol) sowie in der Niere hydroxyliertes 1,25(OH)₂-Cholecalciferol (Synonyme: Calcitriol, 1,25(OH)₂-Vitamin D₃, 1,25-Dihydroxycholecalciferol, Vitamin-D-Hormon). In der vorliegenden Arbeit wurden die Begriffe Calcidiol bzw. Calcitriol verwendet.

Die Synthese des Calcitriols erfolgt in verschiedenen Schritten. Zuerst wird Cholesterol in der Leber und in der Darmschleimhaut zu 7-Dehydroxycholesterol umgewandelt, aus welchem unter UV-Licht-Einfluss der Haut Cholecalciferol entsteht. Cholecalciferol wird zu *Calcidiol* in der Leber hydroxyliert. Die Calcidiolwerte entsprechen der Vitamin D-Zufuhr mit der Nahrung bzw. der Bildung aus dem Provitamin in der Haut durch UV-Licht. Diese sind u.a. bei Sonnenlichtmangel erniedrigt und bei Vitamin-D-Therapie erhöht. Da die Bildung des Calcidiols von der Sonnenexposition abhängig ist, ergeben sich saisonale Schwankungen. Darüber hinaus werden erniedrigte Calcidiolwerte bei fortschreitender Leberinsuffizienz und bei Malassimilations-/Malabsorptionssyndromen beobachtet.

Die Umwandlung des Calcidiols in *Calcitriol* erfolgt in den proximalen Tubuluszellen der Niere. Parathormon und Calcitriol erhöhen rasch die Calciumkonzentration im Plasma. Calcitriol verbessert unter anderen die transzelluläre Calciumabsorption im proximalen Dünndarm durch die Förderung der enterozytären Calbindinexpression,

Verbesserung der renalen Calciumresorption und einer Induktion der Knochenresorption.⁹⁶ Die Wirkung des Calcitriols ist jedoch vielseitig und reicht von der Stimulierung des Knochenumbaus (Stimulation der Differenzierung und Funktion von Osteoblasten sowie der Osteoklastendifferenzierung), über die Förderung der Calciumaufnahme im Dünndarm bis zur Hemmung der Calcium- und Phosphatsekretion in der Niere. Außerdem hemmt Calcitriol die Parathormonproduktion bzw. -sekretion aus der Nebenschilddrüse und beeinflusst den Calciumstoffwechsel im Skelettmuskel. Calcitriolwerte spiegeln die Hydroxylierung in der Niere wider und können bei fortschreitender Niereninsuffizienz erniedrigt sein. Ein Vitamin D-Mangel ist nicht immer anhand einer Messung von Calcitriol zu erkennen, so dass Calcidiol einen zuverlässigeren Parameter für die Mangelercheinungen darzustellen scheint. Referenzwerte des Calcitriols können je nach Labor und verwendetem Detektions-Assay etwas variieren. Erhöhte Blutfettwerte können zusätzlich die Werte stören.

Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (K-AP)

Die AP ist ein Zelloberflächenprotein mit einer kovalenten Bindung an Phosphatidyl-Inositol-Phospholipid-Komplexe in der Zellmembran. Es existieren vier bekannte Isoenzyme (Knochen-AP, intestinale AP, Plazenta-AP sowie plazenta-ähnliche AP). Unter ihrer Mitwirkung wird aus organischen und anorganischen Substraten freigesetztes Phosphat zusammen mit Calcium zum Hydroxyapatit umgebaut. Die K-AP ist ein osteoblasten-typisches Sekretionsprodukt und wird bei deren gesteigerter Aktivität in den Blutkreislauf abgegeben. Eine K-AP Bestimmung hat die größte Aussagekraft bei diskreten Veränderungen des Knochenstoffwechsels; bei gravierenden Knochenveränderungen ist sie stetig erhöht. Darüber hinaus gibt es starke Unterschiede in den K-AP Werten in Abhängigkeit vom angewandten Assay, Labor, Geschlecht (Männer etwas höher als Frauen) und Alter (Wachstumsphase, prä-/postmenopausal). Erhöhte Werte werden bei der sogenannten „high-turnover“ Osteoporose beobachtet und sind deutlich rückläufig unter einer effektiven antiresorptiven Therapie. In unserer Studie wurde die Gesamt-AP sowie die K-AP-Konzentration bestimmt.

Osteocalcin (OC)

Osteocalcin, auch „bone gamma-carboxylglutamic acid-containing protein“ genannt, wird durch Osteoblasten sowie Odontoblasten synthetisiert und stellt mit einem Anteil von ca. 3% das in der höchsten Konzentration vorkommende Nichtkollagenprotein des Knochens dar. Osteocalcin wird einerseits durch Osteoblasten produziert, andererseits unterliegt es dem direkten Einfluss von calciumregulierenden Hormonen wie Calcitonin, Parathormon (PTH) und Calcitriol. Der größte Anteil des synthetisierten Osteocalcins wird in die organische Knochenmatrix eingebaut. Ein kleiner Teil gelangt ins Blut und wird dort abgebaut. Zudem ist Osteocalcin ein Bestandteil der Megakaryozyten und Thrombozyten. Erwähnenswert ist, dass das OC nicht nur beim Knochenaufbau, sondern auch bei der gesteigerten Knochenresorption im Serum ansteigt. Dies bedeutet, dass erhöhte OC-Serumwerte sowohl für eine gesteigerte Knochenneubildung als auch für einen gesteigerten Knochenumbau sprechen könnten. Erhöhte sowie erniedrigte OC-Werte sind gleichermaßen als pathologisch zu werten. Eine Vielzahl von Faktoren können Einfluss auf die gemessenen OC-Werte haben. Das OC unterliegt einem deutlichen zirkadianen Rhythmus mit hohen Werten am Morgen und einem Tief am Nachmittag, so dass immer eine morgendliche Blutentnahme erfolgen sollte. Da die Osteocalcinfragmente renal ausgeschieden werden, können erhöhte Osteocalcinkonzentrationen durch eine eingeschränkte renale Clearance verursacht werden. Der obere Referenzbereich von Osteocalcin steigt mit dem Alter und ist bei Frauen höher als bei Männer. Nach der Menopause wird häufig ein zusätzlicher Anstieg der Werte beobachtet. Im Rahmen der rheumatoiden Arthritis wurden sowohl erhöhte als auch erniedrigte OC-Werte beobachtet, ohne dass der Mechanismus dieser Effekte näher erklärt ist. Bei Patienten mit Osteoporose werden meistens erhöhte Werte, im so genannten „high-turnover“ bei unveränderten oder erhöhten AP-Werten, gemessen. Erniedrigte Werte bei „low-turnover“ Patienten werden von unveränderten oder erniedrigten AP-Werten begleitet. Der Glucocorticoideffekt auf Osteocalcin erfolgt via Transkription durch Glucocorticoid-responsive Elemente (GRE) im Osteocalcin-Promotor. Unter GC-Therapie kann der Osteocalcinwert bei erhöhter Osteoblastenaktivität gesteigert oder bei Glucocorticoidosteopathie erniedrigt sein.

Knochenabbauparameter

Die von den Osteoblasten gebildete kollagene Knochenmatrix besteht vor allem aus Typ I-Kollagen (85-90%). Infolge des enzymatischen Abbaus des Kollagens I werden *Pyridinolin*, *Desoxypyridinolin* und *N-Telopeptid* freigesetzt. Sie sind Marker für die Knochenresorption und korrelieren mit den histomorphometrischen Variablen des Knochenabbaus.⁹⁷ Die im Urin gemessenen Werte werden jedoch durch eine Reihe von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So sind bei postmenopausalen Frauen die Werte deutlich erhöht. Für die frühmenopausale Frauen findet man eine über 31%-ige Erhöhung des Pyridinolins und eine 50%-ige des Desoxypyridinolins.⁹⁸ Bei spätmenopausalen Frauen ist sogar eine Steigerung um 33% für Pyridinolin und um 63% für Desoxypyridinolin beschrieben worden.⁹⁹ Zusätzlich werden die Werte durch Bettruhe beeinflusst (bis zu 28% Erhöhung). Die interindividuellen Unterschiede reichen von 24% für Pyridinolin bzw. bis zu 27% für Desoxypyridinolin und steigen postmenopausal weiter an. Die Erhöhung der Werte mit dem Alter ist bei Männern stetig und diskret linear, bei Frauen jedoch ausgeprägt diskontinuierlich.¹⁰⁰ Unter einer effektiven antiresorptiven Osteoporose-Therapie wird ein deutlicher Abfall der Werte beschrieben. Desoxypyridinolin ist ein relativ spezifischer Marker des Knochenabbaus, er wird nämlich außer im Knochen nur noch im Dentin gebildet. Pyridinolin wird aber auch im Knorpel und in geringen Mengen in Sehnen, Bändern und Gefäßen gefunden, so dass sein Anstieg ebenso bei entzündlichen und degenerativen Gelenkerkrankungen beobachtet wird.^{101, 102} Da das N-Telopeptid auch in der Haut, im Bindegewebe und im Knorpel nachweisbar ist, bleibt seine Spezifität umstritten.^{99, 103} Die Referenzwerte der Knochenabbauparameter sind von dem angewandten Assay, dem Alter sowie dem Geschlecht des Patienten abhängig.

3.1.4.3 Osteoporoseschmerzen

Schon seit langem wird der Zusammenhang zwischen Knochendichteminderung und Rückenschmerzen untersucht. In letzter Zeit wurde der Versuch unternommen, zwischen den osteoporotischen Rückenschmerzen und Rückenschmerzen anderer Genese zu unterscheiden. So fanden Leidig-Bruckner et al., dass die osteoporotischen Schmerzen stärker belastungsabhängig sind, und im Vergleich zu chronischen lumbalen Rückenschmerzen, im Liegen und Schlaf deutlich abklingen.¹⁰⁴ Die Rückenschmerzsymptomatik wurde in unserer Studie in zwei Kategorien erhoben: Einerseits als Wirbelsäulenschmerz, der als anamnestischer

Bewegungsschmerz der Wirbelsäule sowie als klinischer Klopfeschmerz erfragt wurde (ja/nein Fragen). Andererseits wurden Patienten nach den Osteoporoseschmerzen gefragt, die als während des Tages und unter Belastung stärker werdende, aber im Liegen und in der Nacht abklingende Rückenschmerzen definiert worden sind. Bezüglich osteoporotischer Schmerzen wurden von jedem Patienten drei Tests ausgefüllt: Eine numerische Skala in Bezug auf die Osteoporoseschmerzen in Ruhe sowie unter Belastung (Werte: 0-keine, 1-mäßige, 2-starke Rückenschmerzen) und eine Visuelle Analogskala (VAS) zur Stärke der osteoporotischen Schmerzen während der letzten Woche (eine 100 mm lange waagerechte Linie, wo der Anfang keine und das Ende maximal starke Schmerzen darstellt, siehe auch 3.1.6).

3.1.5 Andere GC-Nebenwirkungen außer Osteoporose

Zu den zusätzlich erhobenen Nebenwirkungen der GC-Therapie neben Osteoporose gehörten: *Hautveränderungen* (Unterblutungen, Atrophie der Haut, Striae), *cushingoider Habitus* sowie *Glaukom*. Die Unterblutungen wurden anamnestisch erhoben. Die Ausbildung von Striae und das Dünnerwerden der Haut (Pergamenthaut) wurde, in Verbindung mit anamnestischen Angaben, klinisch erhoben. Der cushingoide Habitus wurde vom Patienten und vom Arzt auf der numerischen Skala von 0 bis 2 erhoben (0-keine, 1-mittlere und 2-starke Ausprägung). Darüber hinaus wurden die Patienten nach einer bekannten Erhöhung des Augeninnendrucks befragt, die vom Ophthalmologen diagnostiziert wurde. Diese Angaben wurden dann im positiven Fall von den behandelnden Ärzten telefonisch bestätigt.

3.1.6 Allgemeine Laborparameter

Bei den Blut- und Urinuntersuchungen wurden zusätzlich zu den oben erwähnten Parametern die Entzündungsparameter (CRP, BSG), ein kleines Blutbild, Elektrolyte (Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat), sowie Leber-, Nierenparameter (Bilirubin, ASAT, ALAT, γ -GT, Kreatinin, Harnstoff) und Blutfette (Triglyzeride und Cholesterol) erfasst.

3.1.7 Fragebogen zum Gesundheitszustand

Um beurteilen zu können, wie effektiv niedrige und mittlere MP-Dosen die Aktivität von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen kontrollieren können, haben wir neben den gemessenen Entzündungsparametern im Blut auch verschiedene Fragebögen zur Lebensqualität verwendet (siehe auch 3.1.2). Diese wurden dem Patienten am Ende der Untersuchung mit der Bitte ausgehändigt, sie möglichst vollständig und exakt auszufüllen.

Der *Medical Outcomes Study Short Form 36 (SF-36)* ist ein allgemeines Instrument, welches bei Gesunden und Patientenkollektiven für die Beurteilung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität validiert worden ist.¹⁰⁵ Dieser Fragebogen stellt die gekürzte Version eines in der *Medical Outcomes Study (MOS)* entwickelten, umfassenden Messinstrumentes dar, wobei die Auswahl der Fragen auf einer Reihe empirisch-rigoroser Tests beruht. Der SF-36 wurde erstmals 1997 in einer klinischen Prüfung von Minocyclin bei Patienten mit RA eingesetzt.¹⁰⁶ In zahlreichen Studien wurde die Relevanz des SF-36 untersucht^{107, 108}, unter anderem bei Patienten mit rheumatischen Krankheiten^{105, 106, 109, 110}. Die Relevanz des Tests wurde sowohl für interindividuelle Untersuchungen, als auch für Langzeitstudien nachgewiesen^{109, 111}. Der SF-36 korreliert mit bekannten Tests wie dem HAQ, MHAQ, VAS für Schmerzen, ACR und vielen anderen.^{106, 109, 111, 112} Der SF-36 ist insbesondere zur Erfassung von moderaten bzw. kleinen Veränderungen geeignet. Der in den Vereinigten Staaten zusammengestellte SF-36, hat sich in der letzten Zeit als Standardinstrumentarium zur Erfassung der subjektiven Gesundheit herauskristallisiert. Sein Gebrauch wird zunehmend durch internationale Zulassungsbehörden wie z.B. die Federal Drug Administration – zumindest informell – empfohlen. Für unsere Studie benutzten wir die durch die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. M. Bullinger übersetzte deutsche Form des SF-36.¹¹³ In der Tabelle 3-3 sind die Konzepte und deren Inhalte des SF-36 dargestellt. Jedes Konzept umfasst mehrere Unterpunkte. In unserer Studie wurde die Standardversion benutzt (d.h. die Fragen betrafen die letzten 4 Wochen).

Tabelle 3-3 Gesundheitskonzepte und Inhalt der acht SF-36 Skalen zur Veränderung des Gesundheitszustandes.

Konzepte	Inhalt
<u>Körperliche Funktionsfähigkeit</u>	Ausmaß, in dem der Gesundheitszustand körperliche Aktivitäten wie Selbstversorgung, Gehen, Treppensteigen, Bücken, Heben und mittelschwere oder anstrengende Tätigkeiten beeinträchtigt
<u>Körperliche Rollenfunktion</u>	Ausmaß, in dem der körperliche Gesundheitszustand die Arbeit oder andere tägliche Aktivitäten beeinträchtigt, z.B. weniger Schaffen als gewöhnlich, Einschränkungen in der Art der Aktivitäten oder Schwierigkeiten bestimmte Aktivitäten auszuführen
<u>Körperliche Schmerzen</u>	Ausmaß an Schmerzen und Einfluss der Schmerzen auf die normale Arbeit, sowohl im als auch außerhalb des Hauses
<u>Allgemeine Gesundheitswahrnehmung</u>	Persönliche Beurteilung der Gesundheit, einschließlich aktueller Gesundheitszustand, zukünftige Erwartungen und Widerstandsfähigkeit gegenüber Erkrankungen
<u>Vitalität</u>	Sich energiegeladener und voller Schwung fühlen versus müde und erschöpft
<u>Soziale Funktionsfähigkeit</u>	Ausmaß, in dem die körperliche Gesundheit oder emotionale Probleme normale soziale Aktivitäten beeinträchtigen
<u>Emotionale Rollenfunktion</u>	Ausmaß, in dem emotionale Probleme die Arbeit oder andere tägliche Aktivitäten beeinträchtigen; u.a. weniger Zeit aufbringen, weniger schaffen und nicht so sorgfältig wie üblich arbeiten
<u>Psychisches Wohlbefinden</u>	Allgemeine psychische Gesundheit, einschließlich Depression, Angst, emotionale und verhaltensbezogene Kontrolle, allgemeine positive Gemütsstimmung
<u>Veränderungen der Gesundheit</u>	Beurteilung des aktuellen Gesundheitszustandes im Vergleich zum vergangenen Jahr

Der *Health Assessment Questionnaire (HAQ)* ist ein etablierter Test, der für die Erfassung der Krankheitsaktivität entwickelt wurde.¹¹⁴ Er wird sowohl für interindividuelle als auch longitudinale Studien benutzt und dient auch als guter Prädiktor für die Morbidität.¹¹⁵ Seine Stärke hinsichtlich der Beurteilung der Krankheitsaktivität wird jedoch als nur mittelmäßig eingeschätzt.¹¹⁶ Die Patienten sollen mittels des HAQ Stellung zu Einschränkungen ihres täglichen Lebens (Ankleiden und Körperpflege, Essen, Gehen, Heben, Greifen und Öffnen) sowie bei Tätigkeiten wie Einkaufen und Hausarbeiten nehmen (Werte von 0 bis 3, wobei 3 einer höheren Einschränkung der physischen Aktivität entspricht). Als Endwert wird ein Mittelwert aus den Angaben zu den zwanzig Fragen gebildet.

Die *Visuelle Analogskala (VAS)* wird den Patienten als 100 mm lange waagerechte Linie dargestellt. Anfang und Ende der Linie stellen die beste und die schlechteste Situation dar. Die Patienten wurden gebeten, einen senkrechten Strich an dem Punkt der Linie zu machen, der am besten ihre Antwort auf die Frage wiedergibt. Alle gestellten Fragen bezogen sich auf die letzte Woche (siehe auch 3.1.2).

3.2 Experimente zum Nachweis von mGCR auf Immunzellen des peripheren Blutes und der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit M. Bechterew

Um das Vorhandensein der membranständigen GC-Bindungsstellen auf den Immunzellen des peripheren venösen Blutes sowie der Synovialflüssigkeit zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit durchflusszytometrische Experimente durchgeführt.

3.2.1 CCRF-CEM- (CCL 119-) Zelllinie

Die CCRF-CEM Zelllinie ist eine humane lymphoblastoide Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines an akuter lymphatischer T-Zell-Leukämie (T-ALL) erkrankten 4-jährigen Kindes kaukasischer Abstammung gewonnen wurde. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640 Puffermedium (siehe 3.2.10) mit 5 % BSA (Bovines Serum Albumin) bei 5,5 % CO₂ Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Die Kryokonservierung erlaubte eine Standardisierung der Versuchsbedingungen. Die mit DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) versetzten Zellen (Aliquots à 5 x 10⁶ Zellen) wurden bei -156° in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zelllinie wurde als Färbekontrolle für unsere Experimente mitgeführt. Wegen der Zyklusabhängigkeit der mGCR-Expression⁷⁵ wurden die Zellen zuerst 40 Stunden im Brutschrank inkubiert.

3.2.2 Entnahme und Bearbeitung von PBMC und Synovialflüssigkeit

Für die Experimente wurde das venöse Blut von gesunden Probanden und von Patienten mit M. Bechterew in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie an der Charité nach vorherigem Einverständnis entnommen. Dazu wurden die Spritzen mit Heparin gefüllt, um das Gerinnen zu vermeiden. Um humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes zu analysieren, erfolgte zuerst die Abtrennung der Erythrozyten. Dafür wurde im

Verhältnis 1:3 (phosphatgepufferte Salzlösung mit Standardzusammensetzung, siehe 3.2.9) verdünntes Blut mit PBS auf 15 ml Ficoll (50 ml Falcon[®]-Röhrchen, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) geschichtet. Nach der Dichtezentrifugation (2000 U/min, 20 min, ohne Bremse; Haereus Megafuge 1.0, Kendro, Osterode, Deutschland) wurde die PBMC-Suspension vorsichtig abpipettiert, mit PBS/BSA/NaN₃ (PBA, 3.2.10) versetzt und zweimal bei 4°C gewaschen, um verbliebene Thrombozyten und Plasma zu entfernen. Die Zellzählung erfolgte in der Neubauer[®]-Zählkammer nach der Verdünnung des Zellaliquots (1:10 und danach 1:5). Mittels Trypanblau (0,04%) wurden tote Zellen markiert.

Entnahme und Bearbeitung der Synovialflüssigkeit erfolgte mit demselben Verfahren.

3.2.3 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine zellbiologische Methode, welche die Identifizierung und das Sortieren von Zellen aufgrund ihrer Größe, Struktur und ihrer spezifischer Antigene ermöglicht. Sie bedient sich der Möglichkeit, durch die Absorption von Licht, Elektronen auf ein höheres Energieniveau (äußere Schalen) zu heben. Bei deren Zurückfallen entsteht eine Emissionsstrahlung mit größerer Wellenlänge und kleinerem Energieniveau. Das Gemisch von markierten Zellen wird durch eine Düse gedrückt, und so entsteht ein feiner Flüssigkeitsstrahl in dem die einzelnen Zellen perlschnurartig angeordnet sind (so genannte „hydrodynamische Fokussierung“). Alle Tropfen passieren einen senkrecht gerichteten Laserstrahl (luftgekühlter Argonlaser, Wellenlänge 488 nm). Empfindliche Photodetektoren messen sowohl gestreutes als auch emittiertes Licht. Danach erfolgt eine lineare oder logarithmische Verstärkung des Signals. Gemessen werden Vorwärtsstreuung (FSC, in 2-20 Winkelgrad zur Laserachse), entspricht der Zellgröße (kleine Zellen streuen weniger) und Seitwärtsstreulicht (SSC, in 90 Winkelgrad zur Laserachse), entspricht der Zellstruktur (Parameter wie Zellgranularität; Granulozyten streuen mehr als Lymphozyten) (Abb. 3-4). Sind Farbstoffmoleküle an eine Zelle gebunden (wie in unserem Experiment), wird zusätzlich das Fluoreszenzlicht gemessen (FL, alle Brechungswinkel). Um Fluorochrome voneinander zu unterscheiden, werden spezielle Lichtfilter benötigt, die deren Emissionsmaxima berücksichtigen.

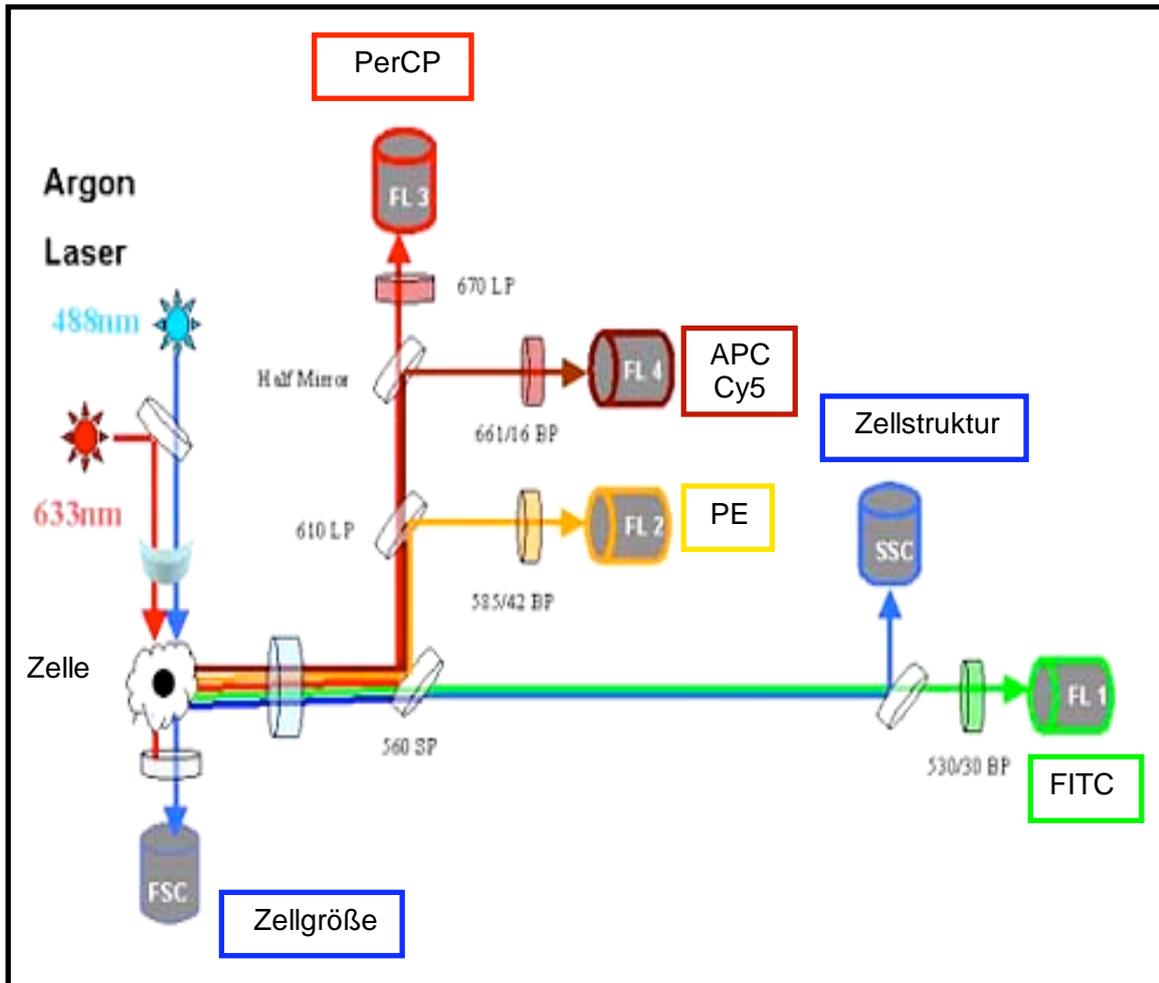


Abbildung 3-4 Prinzip der Durchflusszytometrie (Quelle: The Scripps Research Institute: <http://facs.scripps.edu/>).

In der Tabelle 3-8 sind die bei den Experimenten benutzten Farbstoffe mit deren Exzitations- (die Wellenlänge, bei der sie am besten angeregt werden) und Emissionsmaxima (die Wellenlänge, bei der das meiste Licht emittiert wird) zusammengestellt.

Tabelle 3-8 Exzitations- und Emissionsmaxima unterschiedlicher Fluorochrome

Farbstoff	Ex _{max} (nm)	Em _{max} (nm)
Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	490	530
Cy5	650	666
Phycoerythrin (PE)	480, 545, 565	575
Peridinchlorophyll-a (PerCP)	470	680
Allophycocyanin (APC)	650	660

Ex_{max}: Exzitationsmaximum, Em_{max}: Emissionsmaximum

Es ist möglich, mehrere Farbstoffe miteinander zu kombinieren (bis zu 5). Er sollte jedoch darauf geachtet werden, dass sich die Emissionsmaxima nicht

überschneiden. Nur dann gelingt die präzise Trennung von gefärbten Zellen. Mit der Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit die Identifizierung von membranständigen und intrazellulären GCR sowie einzelnen Subpopulationen der PBMC vorgenommen. Die Messung erfolgte mit dem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS Calibur™, Becton Dickinson; San Jose, USA). Zur Analyse wurde Cell Quest Software® benutzt. Die Ergebnisse wurden als Standard-Punktdiagramme abgebildet (dot plots), wobei jede Zelle als einzelner Punkt dargestellt ist. In der Tabelle 3-9 sind die in unseren Experimenten benutzten Farbstoffe, die zu identifizierenden Zellen und die FL-Scatter zusammengefasst.

Tabelle 3-9 Benutzte Farbstoffe zur Zelldifferenzierung und entsprechende FL-Scatter.

	Zellen	Farbstoff	FL
CD 14	Monocyten	PE	FL 2
CD 3	T-Zellen	PerCP	FL 3
CD 19	B-Zellen	APC	FL 4
iGCR	PBMC	FITC	FL 1
mGCR	PBMC	Cy5	FL 4

Um die toten Zellen ausschließen zu können, wurde 1µg/ml Propidiumjodid (PJ) kurz vor der Messung dazu gegeben. PJ hat die Eigenschaft, durch die Zellmembran abgestorbener Zellen zu wandern und sich an die DNA zu binden. PJ-positive Zellen können daher als tot identifiziert und ausgeschlossen werden.

3.2.4 Konjugation der Antikörper

Der monoklonale IgG1-Antikörper 5E4 ist gegen eine konservierte Sequenz (Aminosäuren 150-176) des regulatorischen Teils des humanen GCR gerichtet und wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. Berki vom Institut für Immunologie und Biotechnologie der Medizinischen Hochschule von Pécs, Ungarn, zur Verfügung gestellt. Nach der Reinigung des AK von NaN₃ (PD10-Säule mit Boratpuffer, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) erfolgte die Konjugation mit Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaprinsäure-N-succinimidester (Dig-SE, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland). Dazu wurde Dig-SE in DMSO gelöst (5 mg/ml) und mit in PBS verdünntem AK (1 mg/ml) eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Erfahrungsgemäß sind 1:10 bis 1:50 die besten Molverhältnisse. Bei niedriger eingestellten antiGCR-Dig-Konjugaten ist das Signal zu schwach, bei höheren Verhältnissen sind die unspezifischen Interaktionen sehr

hoch. Nach der Gelfiltration (Entfernung von freien Haptenen) folgte eine Extinktionsmessung (280 nm).

3.2.5 Färbesystem zur Detektion von membranständigen Glucocorticoid-rezeptoren und methodische Vorgehensweise

Zur Detektion von membranständigen GCR wurde ein spezielles Färbesystem benutzt (Abb. 3-5).

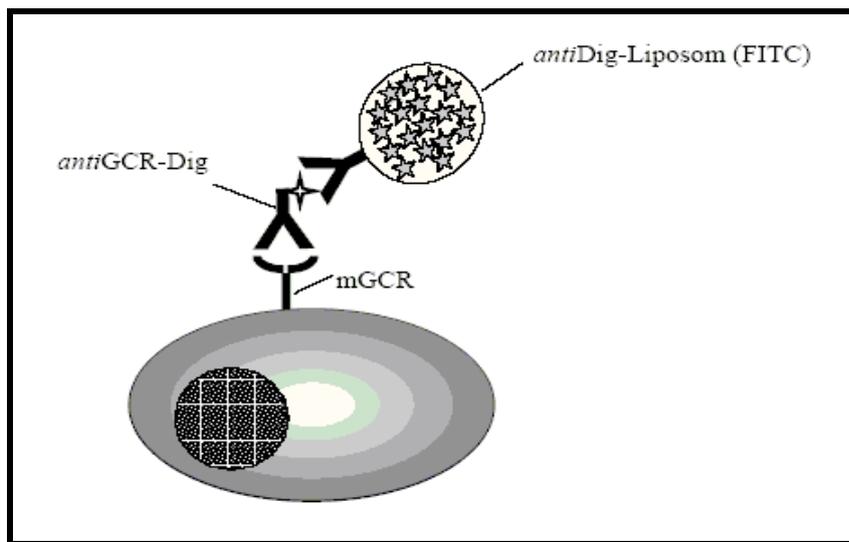


Abbildung 3-5 Färbesystem zum Nachweis von mGCR auf PBMC.

Um das Signal zu verstärken wurden magnetofluoreszente antiDig-Liposomen verwendet, die von der Arbeitsgruppe Dr. Scheffold aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum zur Verfügung gestellt wurden. Die Liposomen sind 200-300 nm groß und enthalten mehrere tausend Fluoreszenzmoleküle (in unserem Falle: Fluoresceinisothycianat). Sie verstärken die Signalintensität um das 100- bis 1000-fache, was zur Detektion von mGCR notwendig ist. Bei konventionellen Färbungen wurden keine mGCR nachgewiesen, was auf eine nur niedrige Anzahl von mGCR pro Zelle hinweist.⁸² Die PBMC wurden in drei Ansätze aufgeteilt (Tab. 3-10).

Tabelle 3-10 Reihenfolge der Zugabe der Antikörper in den drei Ansätzen.

Kontrollansatz	Färbeansatz	Blockansatz
1. polyklonale IgG	1. polyklonale IgG	1. polyklonale IgG
		2. unmarkierter antiGCR-AK im Überschuss
2. antiDig-Liposomen (FITC) / antiDig-Cy5	2. antiGCR-Dig-AK 3. antiDig-Liposomen (FITC) / antiDig-Cy5	3. antiGCR-Dig-AK 4. antiDig-Liposomen (FITC) / antiDig-Cy5

Um mögliche unspezifische Bindungen zu reduzieren, wurde polyklonale IgG (5 mg/ml) (Octagam®, Octapharma, Langenfeld, Deutschland) verwendet. Zur Differenzierung von PBMC-Subpopulationen wurden konventionell erhältliche, fluoreszenzgekoppelte AK gegen CD3 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD14 (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) und CD 19 (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) verwendet (Tab. 3-11).

Tabelle 3-11 Angewandte fluoreszenzgekoppelte AK zur Differenzierung von PBMC-Subpopulationen.

Antikörper	Konjugiertes Fluorochrom	Detektion von
<i>anti</i> CD3	PerCP	T-Lymphozyten
<i>anti</i> CD14	PE	Monozyten
<i>anti</i> CD19	APC	B-Lymphozyten

Der Kontrollansatz diente zur Bestimmung der Hintergrundfärbung. Der Färbeansatz stellte die eigentliche Färbung dar. Bei dem Blockansatz wurden zuerst mit dem Überschuss von unmarkierten antiGCR-AK die mGCR blockiert und danach folgte die Färbung. Auf diese Weise wurden die unspezifischen Bindungen der antiGCR-Dig-AK ermittelt. Zu allen Ansätzen wurden antiDig-Liposomen (FITC) zugegeben, und es wurden die Zellen dann für 30 min auf Eis in der Dunkelheit geschüttelt. Die Konzentration der verwendeten Liposomen wurde vorher auf Mauszellen austitriert (Verhältnisse 1:100 bis 1:400). Nach dreimaliger Waschung erfolgte die Messung. Die toten Zellen wurden durch Zusatz von PJ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) identifiziert. Die extrazelluläre Färbung wurde strikt auf Eis durchgeführt (Abbildung 3-6).

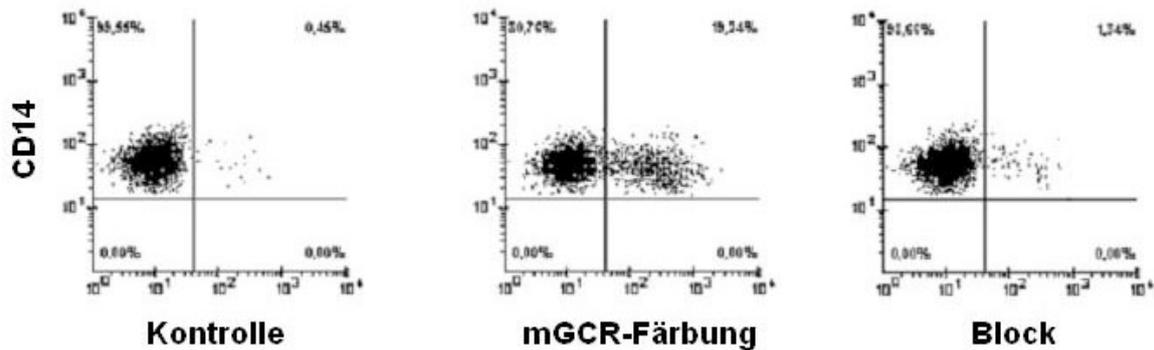


Abbildung 3-6 Beispiel einer mGCR-Färbung ohne Primärantikörper (Kontrolle), mit mGCR-Ak (mGCR Färbung) und unter Zugabe eines konkurrierenden nicht-markiertem mGCR-Ak (Block) (dot plots).

3.2.6 Färbung von intrazellulären Glucocorticoidrezeptoren

Für die intrazelluläre Färbung ist eine Zellmembranpermeabilisierung notwendig. Dazu wurden die PBMC mit 2% Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt (20 min Inkubation, Raumtemperatur) und danach 20 min mit 0,5%-igem Saponin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) behandelt. Die Färbung wurde wie bei der Detektion von mGCR durchgeführt. Statt PBA wurde jedoch 0,5%-iger Saponin-Puffer verwendet, um die Permeabilisation der Zellen zu bewirken. Alle Inkubations- und Waschschriffe fanden bei Zimmertemperatur statt. Die Liposomen wurden durch antiDig-Cy5-AK ersetzt. Liposomen können nicht ins Zellinnere gelangen und werden durch Saponin zerstört.

3.2.7 Optimierung der Färbung

Sowohl die antiDig-AK als auch die Liposomen wurden jedes Mal auf PBMC von gesunden Probanden austitriert. Auf diese Weise gelang es, das Färbesystem so einzustellen, dass der Hintergrund niedrig, die Blockierung noch möglich und die Färbung ausreichend intensiv war. Um die Anzahl der unspezifischen Bindungen zu minimieren, wurden polyklonale IgG zugesetzt. Die extrazelluläre Färbung wurde zusätzlich strikt eisgekühlt durchgeführt.

3.2.8 Morbus Bechterew: Erkrankungsbild und Krankheitsaktivität

Die ankylosierende Spondylitis (AS) ist eine häufige entzündlich-rheumatische Erkrankung mit dem so genannten entzündlichen Rückenschmerz als Leitsymptom, der durch eine Entzündung der Sakroiliakgelenke hervorgerufen wird. Im Verlauf der Erkrankung können alle Abschnitte der Wirbelsäule betroffen sein, es kommt ggf.

zu einer progredienten Ankylosierung, d.h. zu einem knöchernen Durchbau betroffener Gelenke. Ein Teil der Patienten leidet zusätzlich an einer peripheren Gelenkbeteiligung. In der Regel handelt es sich hierbei um eine Oligoarthritis der großen Gelenke der unteren Extremität. Bei etwa 90% der betroffenen Individuen findet sich eine Positivität für das Merkmal HLA-B27. Bzgl. der Diagnosestellung haben sich mittlerweile die „modifizierten New-York-Kriterien“ durchgesetzt, für deren Erfüllung eine Kombination aus klinischen und radiologischen Befunden gefordert wird.¹¹⁷

Die Standardtherapie der Erkrankung bestand bis vor kurzem aus Krankengymnastik/Physiotherapie und der Gabe nichtsteroidaler Antirheumatika. Für therapierefraktäre Krankheitsverläufe hat sich mittlerweile die Gabe von TNF-Antagonisten als therapeutische Option bewährt. Die systemische Gabe von Glucocorticoiden spielt in der Therapie der AS eine untergeordnete Rolle, da sie nach allgemeiner klinischer Erfahrung wenig effektiv ist. Eine selten angewendete Ausnahme stellt die intravenöse Pulstherapie zur Behandlung entzündlicher Krankheitsschübe dar.^{118, 119} Darüber hinaus kommen Glucocorticoide zur intraartikulären Injektionstherapie der Sakroiliakalgelenke^{120, 121} sowie peripherer Gelenke zum Einsatz.

Wie von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, korreliert die Frequenz mGCR-positiver Monozyten bei RA-Patienten mit der Krankheitsaktivität.⁸² Um eine möglich ähnliche Korrelation bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit M. Bechterew einschätzen zu können, sollte auch deren Krankheitsaktivität ermittelt werden. Da bei M. Bechterew eine Erhöhung der systemischen Entzündungsparameter oder eine zur klinischen Verlaufsbeurteilung geeignete Arthritis nicht regelhaft vorliegen, wird die Krankheitsaktivität nach derzeitigem Konsensus mit einem rein patientenabhängigen Instrument, dem Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) beurteilt.¹²²

Der BASDAI-Fragebogen exploriert Müdigkeit, peripheren Gelenkschmerz, Rückenschmerz, Enthesitis, sowie die qualitative und quantitative Morgensteifigkeit mittels visueller Analogskalen von 0-10, wobei 10 jeweils dem Beschwerdemaximum entspricht. Die Fragen beziehen sich auf den Zeitraum der letzten Woche. Zur

Berechnung des Ergebnisses wird zunächst der Mittelwert aus den beiden Fragen zur Morgensteifigkeit berechnet, aus diesem und den vier übrigen Werten wird erneut ein Mittelwert gebildet. Ein BASDAI > 4 beschreibt eine aktive bzw. schwere Erkrankung.¹²³ Zusätzlich zum BASDAI werden in der Klinik in letzter Zeit häufig BASDAI-Fragebögen für die letzten 2 bis 8 Wochen erhoben.

Bei unserem Patientenkollektiv erfragten wir den BASDAI und die insgesamt stattgehabten Schmerzen mittels einer Skala von 0-10 (NRS), sowie den BASDAI und Gesamtschmerz bezogen auf einen Zeitraum von sechs Wochen vor der Untersuchung (BASDAI 6, NRS 6). Darüber hinaus wurden im Blut die Entzündungsparameter (CRP, BSG) gemessen.

3.2.9 Charakterisierung der M. Bechterew Patienten und gesunder Probanden

Für diese Studie wurden Patienten mit einer nach den „modifizierten New York Kriterien“¹¹⁷ gesicherten Ankylosierenden Spondylitis (M. Bechterew) ausgewählt, die seit mindestens zwei Wochen keine Glucocorticoid-Therapie erhalten hatten und in den letzten vier Wochen an keinem erinnerlichen Infekt erkrankt waren. Die Patientenpopulation bestand aus 21 Patienten, bei denen 26 Messungen des peripheren Blutes bzw. 2 Messungen der Gelenkflüssigkeit erfolgten. Die Erkrankungsdauer betrug im Durchschnitt $10,7 \pm 7,0$ Jahre (0,5 bis 26,0, Median 11 Jahre). Drei Patienten litten unter peripherer Gelenkbeteiligung. Siebzehn Patienten erhielten NSAIDs/Coxibes, vier Methotrexat oder Sulfasalazin und elf anti-TNF Therapie. Zusätzlich zur Durchflusszytometriemessung wurden Laborparameter wie CRP und BSG sowie die Indices BASDAI, BASDAI 6, NRS und NRS 6 erhoben, um die Aktivität der Erkrankung einzuschätzen. Als gesunde Probanden wurden freiwillige Personen genommen, die in den letzten vier Wochen keinen erinnerlichen Infekt hatten und in den letzten Monaten nicht geimpft wurden. Keiner der gesunden Probanden litt unter einer chronischen Erkrankung. In der Tabelle 3-12 sind die wichtigsten Parameter der Patienten und der gesunden Probanden dargestellt. Die Zustimmung der Ethikkommission lag vor.

Tabelle 3-12 Charakterisierung der Probanden

	M. Bechterew Patienten	Gesunde Probanden
Anzahl (n)	21	11
weiblich	6	3
männlich	15	8
Alter*		
Minimum-Maximum	22-62 Jahre	23-44 Jahre
Mittelwert	37,4 ± 9,2	30 ± 7,4

3.2.10 Pufferlösungen und Zellkulturmedien

PBS: Aqua destillata mit NaCl 136,89 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄×2H₂O 8,05 mM, (Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,2

PBA: PBS mit 0,5% (g/v) Bovinem Serum Albumin (BSA) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) und 0,02% Natriumazid (v/v) (NaN₃) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

RPMI-1640 Puffermedium: mit 2 mM L-Glutamin (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), 100 Einheiten/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), 50 µM 2-Mercaptoethanol (GIBCO Brl, Paisley, Schottland), 10% (v/v) hitzeinaktiviertem fetalem bovinem Serum (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

Boratpuffer: 1000 ml H₂O mit 6,18 g Borsäure, 5,03 Na₂-Tetraborat, 4,38 g (alle Merck, Darmstadt, Deutschland), pH 8,5

3.3 Statistik

Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant interpretiert. P-Werte zwischen 0,05 und 0,1 wurden als Tendenz bewertet. Die Mittelwerte wurden immer mit der Standardabweichung angegeben. Die Mittelwerte und Medianwerte wurden auf eine Stelle und die Standardabweichung bis zwei Stellen nach dem Komma abgerundet.

Studie

Die Patienten wurden in zwei Dosisgruppen aufgeteilt (Mittelwert, Gruppe 1: < 6 mg/d MP im letzten Jahr, Gruppe 2: ≥ 6 mg/d MP im letzten Jahr). Unterschiede zwischen den einzelnen ordinalen und nominalen Parametern wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests nach Pearson analysiert. Für die metrischen Parameter wurde

der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Verlaufsdaten wurden mit dem nach Brunner modifizierten Statistikprogramm SAS beurteilt.

Die Statistik für das gesamte Studienkollektiv wurde bei metrischen Daten mit dem nichtparametrischen Test nach Spearman durchgeführt. Unterschiede zwischen den ordinalen bzw. nominalen Parametern in Bezug auf metrische Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test bzw. dem Kruskal-Wallis-U-Test gemessen. Zusätzlich wurde zur Ermittlung der Unterschiede zwischen den ordinalen bzw. nominalen Parametern in Bezug auf andere nominale bzw. ordinale Daten der Chi-Quadrat-Test nach Pearson angewandt.

Experimente

Die Korrelation zwischen den Krankheitsaktivitätsparametern und der Frequenz der mGCR-positiven Monozyten und B-Zellen wurde mit dem nichtparametrischen Test nach Spearman analysiert. Der Mann-Whitney-U-Test wurde bei dem Vergleich von Patientengruppen angewendet (Aufteilung nach BASDAI bzw. Therapie mit TNF-Antagonisten).