

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen zur Bedeutung von Biomarkern des Knochen-
und
Knorpelstoffwechsels und der Angiogenese bei Patienten mit
Spondyloarthritiden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Louise Janßen

aus Darmstadt

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung.....	5
1.1 <i>Die axiale Spondyloarthritis.....</i>	5
1.1.1 Epidemiologie der SpA und der axialen SpA.....	6
1.1.2 Klinik der axialen SpA.....	6
1.1.3 Pathologische Prozesse der axialen SpA auf histologischer Ebene	7
1.1.4 Pathogenese der axialen SpA	7
1.1.5 Diagnostik der axialen SpA.....	8
1.1.6 Therapie der axialen SpA	10
1.1.7 Tumor-Nekrose-Faktor- α	11
1.2 <i>Serum Biomarker</i>	12
1.2.1 Biomarker für Knochenaufbau	13
1.2.2 Biomarker für Kochen- und Knorpelabbau	14
1.2.3 Biomarker für Gefäßproliferation	15
1.3 <i>Fragestellung.....</i>	16
2 Patienten und Methoden	17
2.1 <i>Patienten</i>	17
2.1.1 TNF α -Blocker naive AS Patienten.....	17
2.1.2 Axiale SpA Patienten unter TNF α -Blocker-Therapie.....	17
2.2 <i>Methoden</i>	18
2.2.1 Verwendete Materialien und Geräte	18
2.2.2 Klinische und laborchemische Parameter	19
2.2.3 Serumproben	19
2.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assays	19
2.2.5 Statistik	26
3 Ergebnisse.....	28
3.1 <i>TNFα-Blocker naive AS Patienten</i>	28
3.1.1 Klinische und laborchemische Parameter	28
3.1.2 Serumbiomarker im Verlauf von 2 Jahren	28
3.1.3 Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen untereinander und mit CRP, BSG, BASDAI, und Patientenalter.....	32
3.1.4 Unterschiede der Biomarkerkonzentrationen von HLA-B27 positiven und negativen AS Patienten.....	33
3.2 <i>TNFα-Blocker behandelte axiale SpA Patienten</i>	34
3.2.1 Klinische und laborchemische Parameter im Verlauf unter TNF α -Blocker-Therapie.....	34
3.2.2 Serumbiomarker im Verlauf unter TNF α -Blocker-Therapie.....	35
3.2.3 Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen untereinander und mit klinischen und laborchemischen Parametern.....	39
3.2.4 Unterschiede zwischen HLA-B27 positiven und negativen axialen SpA Patienten unter TNF α -Blocker-Therapie	41
3.2.5 Vergleich der Biomarkerkonzentrationen in den Untergruppen AS und nr-axSpA	42
4 Diskussion.....	43
4.1 <i>VEGF als Biomarker für Krankheitsaktivität bei axialen SpA-Patienten</i>	43
4.2 <i>Katabole und anabole Knochen- und Knorpelstoffwechselfparameter unter TNFα-Blocker-Therapie</i>	45

Inhaltsverzeichnis

4.3	<i>Unterschiede zwischen Patienten mit AS und nr-axSpA unter TNFα-Blocker-Therapie.....</i>	46
4.4	<i>Vergleich zwischen Respondern und Non-Respondern der TNFα-Blocker-Therapie.....</i>	48
4.5	<i>Einfluss von HLA-B27 auf Knochen- und Knorpelstoffwechsel und Entzündungsaktivität.....</i>	48
4.6	<i>TNFα-Blocker naive Patienten.....</i>	49
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis.....	54

Abkürzungsverzeichnis

AS	Ankylosierende Spondylitis
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis international Society
axSpA	axiale Spondyloarthritis
BAP	knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
d_BAP	Differenz der BAP-Konzentrationen zwischen 0 und 36-52 Wochen
d_BASDAI	Differenz der BASDAI-Werte zwischen 0 und 36-52 Wochen
d_CRP	Differenz der CRP-Konzentrationen zwischen 0 und 36-52 Wochen
d_MMP-3	Differenz der MMP-3-Konzentrationen zwischen 0 und 36-52 Wochen
d_PVD	Differenz der PVD-Konzentrationen zwischen 0 und 36-52 Wochen
d_sICAM-1	Differenz der sICAM1-Konzentrationen zwischen 0 und 36-52 Wochen
d_VEGF	Differenz der VEGF-Konzentrationen zwischen 0 und 36-52 Wochen
DKK-1	Dickkopf-1
DMARD	disease-modifying anti-rheumatic drugs
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GESPIC	German Spondyloarthritis Inception Cohort
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HLA-B27	Human Leukocyte Antigen-B27
MHC	Major histocompatibility complex
MMP-3	Matrix-Metalloproteinase-3
MRT	Magnetresonanztomographie
NaOH	Natronlauge
nr-axSpA	nicht-röntgenologische axiale Spondyloarthritis
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika
OC	Osteocalcin
p	Wahrscheinlichkeit
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PVD	Pyridinolin Crosslink
RANK	Receptor Activator Nuclear Factor-κB
RANKL	Rezeptor Antagonist of NF-κB-Ligand
sICAM-1	soluble Intercellular Adhesion Molecule-1
SpA	Spondyloarthritis
TNF α	Tumor Nekrose Faktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless

1 Einleitung

1.1 Die axiale Spondyloarthritis

Die Spondyloarthritiden (SpA) sind eine große Gruppe von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen, welche gemeinsame klinische Symptome und genetische Merkmale aufweisen. Der klassische und häufigste Vertreter dieser Gruppe ist die Ankylosierende Spondylitis (AS) ¹. Neuerdings wird die AS als das spätere Stadium, der als Krankheitskonzept neu eingeführten, axialen SpA aufgefasst. Das vorausgehende frühe Stadium der axialen SpA ist die nicht-röntgenologische axiale Spondyloarthritis (nr-axSpA) ^{2,3,4}. Neben der axialen SpA zählen zu der Gruppe der Spondyloarthritiden die Psoriasis-Arthritis, die reaktive Arthritis und die enteropathischen Arthritiden assoziiert mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (s. Abbildung 1) ¹.

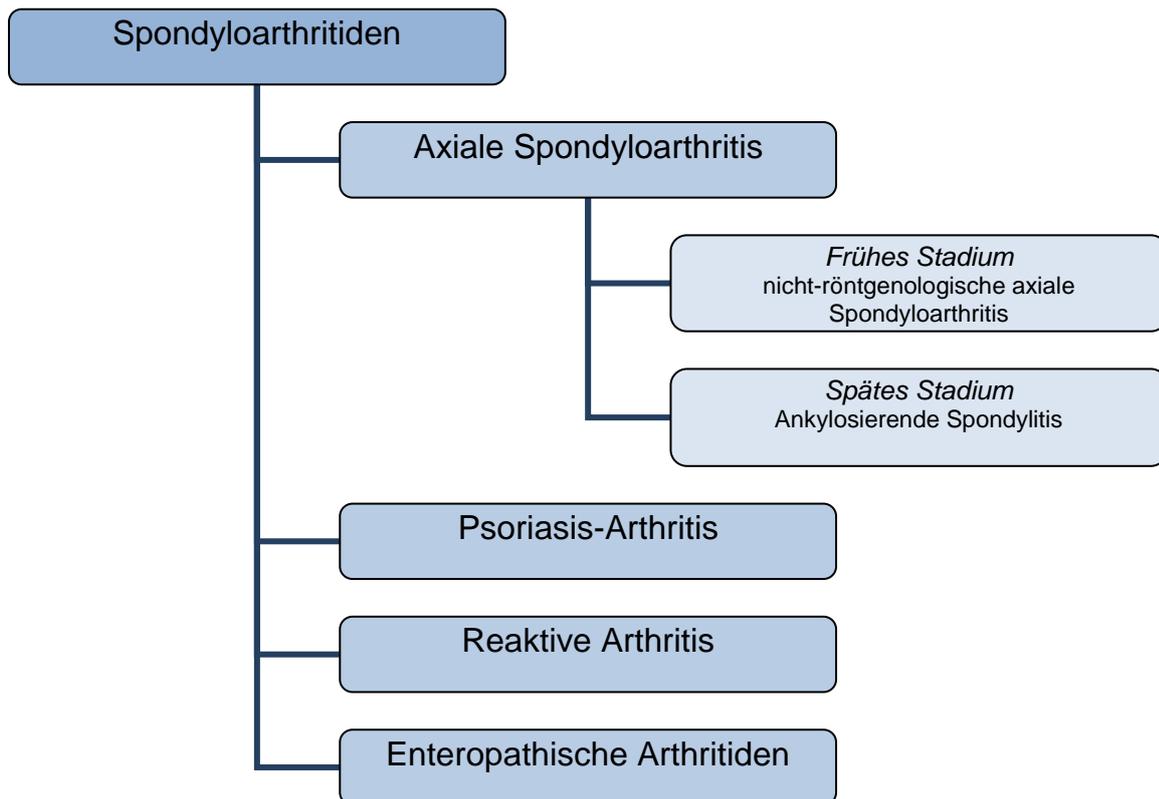


Abbildung 1 Die Familie der Spondyloarthritiden

Die wesentlichen klinischen Charakteristika der Spondyloarthritiden sind der entzündliche Rückenschmerz, asymmetrische periphere Oligoarthritis, Enthesitis sowie extraartikuläre Manifestationen (z.B. Uveitis anterior) ¹. Allen Spondyloarthritiden

gemeinsam ist eine genetische Disposition bei einer starken Assoziation mit Human Leukocyte Antigen-B27 (HLA-B27)^{5,6}.

1.1.1 Epidemiologie der SpA und der axialen SpA

In Europa variiert die Prävalenz der AS zwischen 0,24-1,4% und die der SpA insgesamt zwischen 0,30-1,6%^{7,8,9,10}. Männer sind mit einem Verhältnis von 2:1 häufiger von der AS betroffen als Frauen¹¹. Die ersten Symptome manifestieren sich durchschnittlich um das 26. und bei ca. 80% der Patienten vor dem 30. Lebensjahr¹¹. Da die nr-axSpA ein relativ neues Krankheitskonzept ist, liegen noch keine aussagekräftigen epidemiologischen Daten vor. Es ist jedoch von einer weitgehenden Übereinstimmung mit denen der AS auszugehen.

1.1.2 Klinik der axialen SpA

Die beiden vorherrschenden Prozesse der axialen SpA sind Entzündung und Knochenneubildung an den Sakroiliakal-, Intervertebral- und Facettengelenken der Wirbelsäule¹². Die Entzündung verursacht den charakteristischen entzündlichen Rückenschmerz. Dieser ist abzugrenzen von dem weitaus häufigeren mechanischen Rückenschmerz. Im Gegensatz zum mechanischen Rückenschmerz tritt der entzündliche Rückenschmerz bei Ruhe auf und bessert sich durch Bewegung. Dies führt zu nächtlichen bzw. morgendlichen schmerzhaften Beschwerden. Des Weiteren kommt es zu Morgensteifigkeit, welche 30 min oder länger nach dem Aufstehen anhalten kann. Die häufige Beteiligung der Sakroiliakalgelenke äußert sich als Gesäßschmerz¹. Im weiteren Verlauf der Krankheit kommt es lokal zur Knochenneubildung. Diese kann zu zunehmender Bewegungseinschränkung bis hin zur Ankylosierung führen, bei der die Wirbelkörper knöchern fusioniert sind und bei fortschreitendem Verlauf keine Bewegung in der Wirbelsäule mehr möglich ist¹. Folge ist die Ausbildung der charakteristischen Hyperkyphose¹³. Auf der anderen Seite ist häufig eine systemische Osteoporose zu beobachten¹⁴. Zusätzlich zu den Veränderungen am Achsenskelett kommt es häufig zu Enthesitiden und einer peripheren Mono- oder asymmetrischen Oligoarthritis, bevorzugt der unteren Extremitäten¹.

Der Beginn der Symptomatik ist meist schleichend. Sie kann schubweise oder chronisch persistierend verlaufen. Die Diagnose einer axialen SpA und die Abgrenzung zum mechanischen Rückenschmerz stellt immer noch eine Herausforderung dar. Aus

diesem Grund kommt es zu einer durchschnittlichen Diagnoseverzögerung von 5-7 Jahren¹².

1.1.3 Pathologische Prozesse der axialen SpA auf histologischer Ebene

Histomorphologisch kann die axiale SpA grob in zwei Stadien unterteilt werden. Das erste Stadium ist von einer akuten Entzündung geprägt, welche vermutlich im subchondralen Knochenmark beginnt¹⁵. Es kommt zu einem Knochenmarksödem, lymphozytären Infiltraten¹⁶, erhöhter Osteoklastendichte¹⁵ und steigender Gefäßdichte¹⁶. Dieser Prozess ist sowohl an der Knorpel-Knochen-Grenze als auch an den Enthesien zu beobachten. Im zweiten Stadium kommt es zu Reparaturvorgängen durch Ausbildung von fibrösem Bindegewebe und Neubildung von Knorpel. Es kommt zu einer partiellen Knorpelfusion über den Gelenkspalt hinweg¹⁷. Dabei wird vermutet, dass durch den Rückgang der Entzündung eine vermehrte Osteoblastenaktivität eintritt, die zur Verknöcherung z.T. durch enchondrale Ossifikation des entstandenen Reparaturgewebes führen kann¹⁷. Bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf ist der Gelenkspalt meist durch reifen Knochen vollständig überbrückt und nur einzelne Knorpelinseln weisen noch auf seine frühere Lokalisation hin¹⁸.

1.1.4 Pathogenese der axialen SpA

Der grundlegende Pathomechanismus der axialen SpA ist nach wie vor unzureichend erklärt. Der auslösende Faktor für Entzündung und Knochenneubildung sowie der Zusammenhang zwischen beiden Prozessen ist Thema der aktuellen Forschung. Es ist eine eindeutige genetische Prädisposition vorhanden. Das wichtigste bekannte Genprodukt in diesem Zusammenhang ist HLA-B27^{5,6}. Neben HLA-B27 spielen auch weitere MHC Moleküle wie HLA-B60¹⁹ und HLA-DR1²⁰ sowie Genprodukte außerhalb der MHC-Gruppe eine Rolle²¹.

1.1.4.1 Human Leukocyte Antigen-B27

HLA-B27 ist ein Allel des hoch polymorphen MHC Klasse I Moleküls. Das MHC Klasse I Molekül befindet sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen menschlichen Zellen. Es präsentiert zytotoxischen CD8+T-Zellen Antigene und sorgt so für eine T-Zellstimulation²². HLA-B27 ist bei ca. 90% der europäischen AS Patienten positiv^{5,11}. Bei der europäischen Normalbevölkerung variiert hingegen der Anteil der HLA-B27 positiven Personen zwischen 5,4% -9%^{7,23}.

Einleitung

Eine Hypothese zur Bedeutung von HLA-B27 bei der Entstehung der axialen SpA ist die arthritogene Peptid-Theorie. Hier wird vermutet, dass HLA-B27 eine höhere Affinität zu arthritogenen Peptiden besitzt als andere MHC Klasse I Moleküle. Dies können u.a. bakterielle Peptide sein, die eine Kreuzreaktivität mit z.B. Knorpelantigenen besitzen. Durch die Bindung der arthritogenen Peptide kommt es zu einer Stimulation von autoreaktiven zytotoxischen T-Zellen, die eine Entzündung des körpereigenen Gewebes induzieren²².

1.1.5 Diagnostik der axialen SpA

Die Diagnose der axialen SpA wird neuerdings auf der Grundlage der „Assessment of Spondyloarthritis International Society“ (ASAS)-Klassifikationskriterien gestellt^{2,3}.

ASAS-Klassifikationskriterien für axiale Spondyloarthritis

Für Patienten mit Rückenschmerzen ≥ 3 Monate und Alter bei Beginn < 45 Jahre

Sakroiliitis in der Bildgebung* plus ≥ 1 SpA-Parameter**	oder	HLA-B27 plus ≥ 2 SpA-Parameter**
--	------	--

* *Sakroiliitis in der Bildgebung*

- Aktive (akute) Entzündung in der MRT, gute vereinbar mit SpA-assoziierten Sakroiliitis
- oder
- Definitive röntgenologische Sakroiliitis (Strukturveränderungen) gemäß den modifizierten New-York-Kriterien²⁴

** *SpA-Parameter*

- Entzündlicher Rückenschmerz
- Arthritis
- Enthesitis (Ferse)
- Uveitis
- Daktylitis
- Psoriasis
- M. Crohn / Colitis ulcerosa
- Gutes Ansprechen auf NSAR
- Positive Familienanamnese für SpA
- HLA-B27
- Erhöhtes CRP

Abbildung 2 Die ASAS-Klassifikationskriterien für axiale Spondyloarthritis^{2,3,4}.

Die Diagnose der AS wird auf der Grundlage der modifizierten New York Kriterien von 1984 gestellt²⁴.

Die modifizierten New-York-Kriterien von 1984

Eine definitive AS wird bei Vorhandensein des radiologischen Kriteriums und eines klinischen Kriteriums diagnostiziert.

1. Klinische Kriterien

- Tiefsitzender Rückenschmerz und Steifigkeit für mehr als 3 Monate mit Besserung durch Bewegung, aber nicht in Ruhe
- Bewegungseinschränkung der Lendenwirbelsäule in sagittaler und in frontaler Ebene
- Einschränkung der Thoraxexkursion (alters- und geschlechtsabhängig)

2. Radiologisches Kriterium

- Sakroiliitis mindestens Grad 2 beidseits oder Grad 3-4 einseitig

Abbildung 3 Die modifizierten New-York-Kriterien²⁴

Anhand der ASAS-Klassifikationskriterien kann nicht zwischen der AS und der nr-axSpA unterschieden werden. Zur Gruppe der nr-axSpA zählen folglich alle Patienten, für welche die ASAS- Klassifikationskriterien, jedoch nicht die modifizierten New York Kriterien, zutreffen.

Zur Bestimmung der klinischen Krankheitsaktivität wurde der Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) entwickelt. Mit Hilfe einer Analogskala von 1-10 muss der Patient folgende Beschwerden quantifizieren:

- allgemeine Müdigkeit und Erschöpfung
- Schmerzstärke in Nacken, Rücken oder Hüfte
- Schmerzstärke oder Schwellungen in anderen Gelenken
- Berührungs- oder Druckempfindlichkeit
- Ausprägung der Morgensteifigkeit
- Dauer der Morgensteifigkeit

Aus diesen Angaben wird ein Punktwert zwischen 0 und 10 errechnet. Bei einem BASDAI ≥ 4 geht man von einer aktiven AS aus²⁵.

Einen weiteren Hinweis auf die Aktivität der Krankheit geben die laborchemischen Parameter Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-Reaktives-Protein (CRP). Erhöhte BSG bzw. CRP deuten auf inflammatorische Prozesse hin und sind häufig bei Patienten mit einer aktiven axialen SpA erhöht²⁶.

1.1.5.1 Bildgebende Verfahren

Für die Diagnosestellung der axialen SpA kommt sowohl konventionelles Röntgen als auch Magnetresonanztomographie zum Einsatz. Chronische höhergradige Veränderungen im Röntgenbild der Sakroiliakalgelenke sind, wie oben aufgeführt, obligatorisch für die Diagnosestellung der AS²⁴. Dazu gehören Erosion oder Sklerosierung des gelenknahen Knochens und Verschmälerung des Gelenkspaltes bis zu dessen Aufhebung²⁴. Im Röntgenbild der Wirbelsäule lassen sich ebenfalls chronische, strukturelle Veränderungen feststellen. Es kommt lokal zu knöchernen Anbauten, die von einem Wirbelkörper in die Richtung des benachbarten Wirbelkörpers ausgerichtet sind. Diese so genannten Syndesmophyten sind für die AS spezifisch¹. Zur Diagnosestellung der nr-axSpA ist die MRT von besonderer Bedeutung. Der Nachweis von frühen Veränderungen im Sakroiliakalgelenk und insbesondere an der Wirbelsäule, ist mit der konventionellen Radiologie nicht möglich. Mit Hilfe der MRT lassen sich jedoch akute entzündliche Veränderungen mit Flüssigkeitsansammlungen, die in erster Linie einem Knochenmarksödem entsprechen, gut diagnostizieren¹².

1.1.6 Therapie der axialen SpA

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Therapie der axialen SpA im Wesentlichen auf Nicht-Steroidale Antirheumatika (NSAR) und Krankengymnastik beschränkt. Die NSAR stellen nach wie vor die häufigste Therapieform der axialen SpA dar. Bei 70-80% der Patienten kommt es bei einer ausreichend hoch dosierten NSAR-Therapie zu einer zufrieden stellenden Reduktion von Rückenschmerz und Morgensteifigkeit^{12,27}.

Seit einigen Jahren kommt mit den TNF α -Blockern eine neue Substanzklasse zum Einsatz, die vor allem den Patienten mit nicht ausreichendem Ansprechen auf NSAR großen Nutzen bringt. Die Voraussetzung für den Beginn einer Therapie mit TNF α -Blockern ist eine Krankheitsaktivität mit einem BASDAI ≥ 4 (Skala von 0-10, s.o.), ein fehlendes Ansprechen auf mindestens 2 unterschiedliche NSAR, die insgesamt mindestens 3 Monate eingenommen wurden und der Ausschluss von Kontraindikationen wie einer Tuberkulose¹. Unter Anti-TNF α -Therapie kommt es bei den Patienten meist zu einer schnell einsetzenden Symptombesserung¹. Auch langfristig über einen Zeitraum von 5 Jahren konnten gute Therapieerfolge mit wenig unerwünschten Arzneimittelwirkungen beschrieben werden²⁸. Zur Einschätzung des Therapieerfolges kann ebenfalls der BASDAI herangezogen werden. Bei einem relativen Rückgang von 50% oder einem absoluten Rückgang von 2 von insgesamt 10

Punkten nach 6-12 Wochen kann man von einem Ansprechen der Therapie ausgehen (BASDAI50-Response)¹. MRT Verlaufsbeobachtungen zeigten bei Patienten mit axialer SpA unter TNF α -Blocker-Therapie einen deutlichen Rückgang der entzündlichen Läsionen²⁹. Im Gegensatz dazu wird der Einfluss auf die strukturellen Veränderungen am Skelett, insbesondere auf die Ausbildung von Syndesmophyten, nach wie vor diskutiert. Auch unter TNF α -Blockern ist eine leichte Progression zu beobachten³⁰. Jedoch zeigen Beobachtungen über einen Zeitraum von vier Jahren ein geringeres Fortschreiten der strukturellen Veränderungen bei therapierten Patienten im Vergleich zu Patienten ohne TNF α -Blocker-Therapie³¹.

Die vier TNF α -Blocker Adalimumab, Golimumab, Infliximab und Etanercept zeigen keine wesentlichen Wirkungsunterschiede und sind für die Behandlung einer AS in Deutschland zugelassen^{32,33}. Der Wirkstoff Adalimumab, welcher in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, ist ein humaner monoklonaler Anti-TNF α -Antikörper, der alle zwei Wochen mit einer Dosis von 40mg subkutan appliziert wird.

1.1.7 Tumor-Nekrose-Faktor- α

Nicht zuletzt der Therapieerfolg mit TNF α -Blockern unterstreicht die Relevanz dieses Zytokins für die axiale SpA²⁸. Auch in histologischen Präparaten der Sakroiliakalgelenke von AS Patienten konnte vermehrt TNF α nachgewiesen werden³⁴, insbesondere bei Patienten in einem frühen Krankheitsstadium³⁵. TNF α , der Prototyp der TNF-Superfamilie, ist ein multifunktionales Zytokin, welches u.a. eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen und Apoptose spielt. TNF α wird von einer Vielzahl von Zellen synthetisiert und auf der Oberfläche als membrangebundene Form exprimiert. Das lösliche TNF α Molekül entsteht durch Abspaltung von der Oberfläche durch Matrix-Metalloproteinasen³⁶. Zu den TNF α produzierenden Zellen gehören unter anderem Makrophagen³⁷, B-Zellen³⁸, natürliche Killerzellen, CD4+, CD8+ T-Zellen und Zellen mesenchymaler Herkunft³⁹.

Wesentliche entzündungsfördernde Effekte von TNF α beruhen auf seiner Wirkung auf die Gefäße. Es kommt unter Einfluss von TNF α zu einer Zunahme der endothelialen Adhäsionsmoleküle wie z.B. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 und Endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM)-1. Dies führt zu einer vermehrten Einwanderung von Monozyten und Granulozyten aus dem Blut in den Ort der Entzündung⁴⁰. Des Weiteren konnte eine Steigerung der Gefäßpermeabilität unter TNF α -Einwirkung

beobachtet werden⁴⁰, die zu einem vermehrten transendothelialen Durchtritt von Flüssigkeit und Makromolekülen führt und damit zur Schwellung des Gewebes beiträgt. Darüber hinaus fördert $\text{TNF}\alpha$ die Angiogenese, unter anderem durch die Expressionssteigerung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)^{41,42}.

1.1.7.1 Der Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf den Knochen- und Knorpelstoffwechsel

Am Knochenstoffwechsel sind maßgeblich zwei Zellarten beteiligt. Die Knochenmatrix wird von den Osteoblasten synthetisiert und von den Osteoklasten resorbiert⁴³. Beide Zellarten werden von $\text{TNF}\alpha$ beeinflusst. Ein Schlüsselmolekül der osteoklastischen Knochenresorption ist Receptor Activator Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL), welches durch die Bindung an Receptor Activator Nuclear Factor- κ B (RANK) wirkt. RANK befindet sich einerseits auf der Oberfläche der Monozyten und ist dort verantwortlich für die vollständige Ausdifferenzierung zum Osteoklasten, andererseits sitzt er auf der Oberfläche von bereits ausgereiften Osteoklasten und bewirkt dort eine Aktivierung der Zelle⁴⁴. Es konnte nachgewiesen werden, dass es unter Einwirkung von $\text{TNF}\alpha$ zu einer Hochregulierung von RANKL kommt⁴⁵. Darüber hinaus führt $\text{TNF}\alpha$ auch über RANK-unabhängige Mechanismen zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten⁴⁶. Für den Knochenaufbau sind die Proteine der Wingless-(Wnt-)Familie von herausragender Bedeutung. Sie tragen wesentlich sowohl zur Differenzierung als auch zur Proliferation der Osteoblasten bei, verhindern deren Apoptose und fördern die Knochenmatrixmineralisierung⁴⁷. $\text{TNF}\alpha$ induziert Dickkopf-1 (DKK-1), einen sehr potenten Antagonisten der Wnt-Familie und hemmt somit den anabolen Knochenstoffwechsel⁴⁸.

Im Knorpelgewebe konnte $\text{TNF}\alpha$ ebenfalls eine katabole Wirkung nachgewiesen werden. Das Zytokin führt dort zum vermehrten Abbau der Knorpelmatrix⁴⁹ sowie zur Apoptose der Chondrozyten⁵⁰.

1.2 Serum Biomarker

Serum Biomarker sind im Serum nachweisbare Moleküle, die Hinweise auf den Ablauf physiologischer und pathologischer Prozesse geben. Im Rahmen der SpA-Forschung sind Biomarker in unterschiedlichen Bereichen einsetzbar. Von besonderer Relevanz für die vorliegende Arbeit sind Biomarker, welche Entzündungsaktivität und Vorgänge des Knorpel- und Knochenstoffwechsels widerspiegeln.

1.2.1 Biomarker für Knochenaufbau

1.2.1.1 Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP)

Die Alkalische Phosphatase ist ein in unterschiedlichen Geweben vorkommendes Enzym. Die Bone-specific Alkaline Phosphatase (BAP) ist das knochenspezifische Isoenzym. BAP ist ein früher Osteoblastenmarker, der bereits bei Präosteoblasten nachgewiesen werden kann und dessen Aktivität gegen Ende der Matrixmineralisation rückläufig ist⁵¹. BAP wird von Osteoblasten an der Oberfläche exprimiert und während der Knochenformation in die Knochenmatrix eingebaut⁵². BAP trägt allem Anschein nach zur Reifung der Knochenmatrix bei. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt⁵³.

Bisherige Untersuchungen der Serumkonzentrationen von BAP bei Gesunden und AS Patienten ergaben unterschiedliche Ergebnisse. Yilmaz et al. konnten bei der Untersuchung von 44 AS Patienten und 41 gesunden Kontrollen keinen signifikanten Unterschiede feststellen⁵⁴. Speden et al. verglichen 40 Frauen, die an einer AS litten mit 74 gesunden Kontrollen. Hier ergaben sich bei den erkrankten Frauen signifikant niedrigere BAP-Serumkonzentrationen⁵⁵. Mitra et al. stellten hingegen signifikant höhere BAP-Serumkonzentrationen bei 56 Patienten mit einer milden AS fest, verglichen mit 52 gesunden Kontrollen⁵⁶.

1.2.1.2 Osteocalcin (OC)

Osteocalcin ist ein peptidischer Bestandteil der Knochenmatrix mit einer hohen Affinität zu Hydroxyapatit und Calcium. Es wird von Osteoblasten synthetisiert und sezerniert. In der Phase der Knochenmineralisierung erreicht die Expression ihren Höhepunkt⁵⁷. Der größere Anteil des Osteocalcins wird in die Knochenmatrix eingebaut. Ein kleinerer Anteil wird freigesetzt und kann im Serum nachgewiesen werden. Delmas et al. konnten zeigen, dass die Serumkonzentration von Osteocalcin mit dem histologisch nachgewiesenen Knochenaufbau korreliert⁵⁸. Die genaue Funktion von Osteocalcin für den Knochenmetabolismus ist jedoch weiterhin unklar.

Beim Vergleich der OC-Serumkonzentration von AS Patienten und Gesunden gab es widersprüchliche Ergebnisse. Im Vergleich mit gesunden Kontrollen konnten Borman et al. eine signifikant erhöhte OC-Serumkonzentration bei 32 AS Patienten feststellen⁵⁹. Speden et al. verglichen 40 weibliche AS Patientinnen mit 74 gesunden Kontrollen. Hier ergaben sich bei den erkrankten Frauen signifikant niedrigere OC-Serumkonzentrationen⁵⁵. Im Gegensatz dazu konnte in anderen Arbeiten kein

signifikanter Unterschied zwischen AS Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden^{54,60}.

1.2.2 Biomarker für Knochen- und Knorpelabbau

1.2.2.1 Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3)

Matrix-Metalloproteinase-3 gehört zu einer großen Familie von Endopeptidasen, die Bestandteile der Extrazellulären Matrix spalten. Sie haben eine erhebliche Bedeutung bei der Proliferation, Wundheilung, Tumordinvasion sowie Gewebeum- und Gewebeabbau⁶¹. MMP-3 hat ein großes Spektrum an Substraten. Dazu gehören unter anderem Kollagen Typ III, IV, IX, X und das Proteoglykan Aggrecan, ein wichtiger Bestandteil der Knorpelmatrix⁶². Darüber hinaus wandelt MMP-3 zahlreiche Enzyme und Zytokine von ihrer Vorstufe in die aktive Form um, wie zum Beispiel proMMP-1 und proTNF α ⁶³. MMP-1 spaltet Kollagen Typ I und II. Durch die Aktivierung von MMP-1 ist MMP-3 folglich an der Spaltung der beiden Hauptbestandteile von Knorpel und Knochen beteiligt⁶⁴. van Meurs et al. zeigten, dass MMP-3-knockout-Mäuse verglichen mit den Wildtyp Mäusen nach Arthritisinduktion keine Knorpeldestruktion aufwiesen. Dies unterstreicht die Relevanz von MMP-3 für Knorpeldestruktion im Rahmen einer Arthritis⁶⁵.

Die Serumkonzentration von MMP-3 wurde bei AS Patienten in unterschiedlichen Arbeiten untersucht. Yang et al. analysierten das Serum von 41 AS Patienten und 28 gesunden Kontrollen. Es lag kein signifikanter Unterschied vor⁶⁶. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse von Chen et al. signifikant höhere MMP-3-Serumkonzentrationen bei 42 AS Patienten verglichen mit 20 gesunden Kontrollen⁶⁷.

1.2.2.2 Pyridinolin Crosslink (PYD)

Die Quervernetzung von Kollagenfasern ist essentiell für die Stabilität von Knochen- und Knorpelgewebe. Sie erfolgt durch die so genannten Crosslinks, die die einzelnen Kollagenfasern miteinander verbinden. Pyridinolin Crosslink ist ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe. Es vernetzt sowohl Kollagen Typ I als auch Kollagen Typ II miteinander und ist hauptsächlich im Knochen und Knorpel nachweisbar⁶⁸. Beim Abbau des kollagenhaltigen Bindegewebes wird Pyridinolin freigesetzt. Es ist sowohl im Serum, als auch später im Urin nachweisbar und somit ein weitgehend spezifischer Marker für den Knochen- und Knorpelabbau⁶⁹.

Die Konzentrationsbestimmung von PYD im Urin als Marker für Kollagenabbau ist gut etabliert. Jedoch gibt es widersprüchliche Ergebnisse beim Vergleich der PYD-

Urinkonzentration von Patienten mit Spondyloarthritis und gesunden Kontrollen. Yilmaz et al. haben 44 AS Patienten mit 41 gesunden Kontrollen verglichen und bei AS Patienten signifikant höhere Konzentrationen festgestellt⁵⁴. Toussirot et al. konnten keinen signifikanten Unterschied in den PYD-Urinkonzentrationen zwischen 32 AS Patienten und 25 gesunden Kontrollen ausmachen⁶⁰. Die Bestimmung von PYD im Urin ist abhängig von der Urin- bzw. der Kreatininkonzentration. Dies kann zur Verfälschung der Werte führen. Golmia et al. haben PYD erstmalig im Serum von 25 AS Patienten und 40 gesunden Kontrollen gemessen und signifikant niedrigere PYD-Serumkonzentrationen bei den Patienten beobachtet⁷⁰.

1.2.3 Biomarker für Gefäßproliferation

1.2.3.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF ist einer der wichtigsten Angiogenesefaktoren. Er induziert durch Proliferation und Migration von Endothelzellen die Bildung neuer Blutgefäße und ist in der Lage, die Permeabilität bereits existierender Gefäße zu steigern. VEGF spielt eine Schlüsselrolle bei Wundheilung, Embryonalentwicklung, Tumorwachstum und Entzündungsprozessen^{71,72}. Die Angiogenese kann auf unterschiedliche Weise zur Entstehung und Unterhaltung entzündlicher Prozesse beitragen. Bei einem Arthritismodell bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines VEGF-Antikörpers zum Rückgang der Entzündung führte⁷³. Auch bei der enchondralen Ossifikation ist VEGF elementar. Es konnte dargestellt werden, dass während der Ossifikation hypertrophierte Chondrozyten VEGF exprimieren, was zur Invasion von Gefäßen führte. Durch die Verabreichung eines VEGF-Antikörpers wurde die Ossifikation stark beeinträchtigt⁷⁴.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Normalbevölkerung bei SpA Patienten erhöhte VEGF-Konzentrationen vorliegen. Goldenberg et al. konnten erstmals 2002 signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von VEGF bei 16 AS Patienten im Vergleich mit 8 gesunden Kontrollen feststellen⁷⁵. Drouart et al. haben die Serumkonzentration von VEGF bei 105 Patienten mit SpA (72 AS) und 64 gesunden Kontrollen bestimmt. Auch dort ergab sich eine signifikant erhöhte VEGF-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe⁷⁶.

1.2.3.2 Soluble Intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1)

sICAM-1 ist die lösliche Form des membranständigen Adhäsionsmoleküls ICAM-1/CD54. Das membranständige ICAM-1 wird unter anderem an der Oberfläche von

Endothel- und Epithelzellen exprimiert und führt zu Adhäsion von Leukozyten. Durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. $\text{TNF}\alpha$ wird die Expression gesteigert⁴⁰. Dies führt bei einem lokalen Entzündungsprozess zu einer Adhäsion und Migration der Immunzellen an den Ort der Entzündung⁷⁷. Das lösliche sICAM-1 entsteht durch Spaltung aus dem membranständigen ICAM-1. Erhöhte Serumwerte findet man im Allgemeinen bei Entzündungen. Jedoch ist nicht geklärt, ob es als Blocker der ICAM-1-Liganden dient und somit die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel hemmt oder ob es selber die Entzündung unterstützt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sICAM-1 durch Stimulation von Endothelzellmigration Angiogenese fördert⁷⁸. Bei 25 Patienten mit SpA konnte im Serum eine leicht erhöhte Konzentration von sICAM-1 im Vergleich mit 20 gesunden Kontrollen festgestellt werden. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant⁷⁹.

1.3 Fragestellung

Es wurden bereits viele Anstrengungen unternommen, um Biomarker bei entzündlich-rheumatischen Krankheiten zu etablieren. Dies geschah einerseits mit der Absicht, Diagnosestellung, Prognoseeinschätzung sowie Therapiemonitoring zu verbessern und andererseits, um ein detaillierteres Verständnis der Pathogenese zu erlangen. Die vorliegende Arbeit wurde im Jahre 2006 mit dem Ziel unternommen, zur Beantwortung folgender Fragen beizutragen:

1. Wie hängen bei Patienten mit axialer SpA Entzündung, Knochen- und Knorpelabbau so wie Knochenneubildung zusammen und wie greift eine $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie in diese Prozesse ein?
2. Welche Biomarker zeigen einen Zusammenhang mit der entzündlichen Krankheitsaktivität der axialen SpA?
3. Welchen Einfluss hat die $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie auf die Biomarkerkonzentrationen?
4. Besteht ein Unterschied zwischen den Biomarkerkonzentrationen der Patienten mit AS und nr-axSpA?
5. Besteht ein Zusammenhang zwischen Biomarkerkonzentrationen und einem Ansprechen auf die $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie?
6. Besteht ein Zusammenhang zwischen dem HLA-B27-Status und Biomarkern?
7. Wie ändern sich die Biomarkerkonzentrationen im Krankheitsverlauf der axialen SpA?

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 TNF α -Blocker naive AS Patienten

Aus der German Spondyloarthritis Inception Cohort (GESPIC) wurden 71 TNF α -Blocker naive AS Patienten ausgewählt. Die Patienten hatten ein Mindestalter von 18 Jahren und erfüllten die modifizierten New York Kriterien zur Diagnosestellung der AS²⁴. Bei den Patienten wurde zur Basisvisite, nach einem Jahr und nach 2 Jahren BASDAI, CRP und BSG bestimmt sowie Serum zur Biomarkerkonzentrationsmessung entnommen. Dies erfolgte in den Jahren 2000-2005. Die Mehrheit der Patienten erhielt NSAR jedoch keine DMARD (disease-modifying anti-rheumatic drugs) oder Glukokortikoide. Der Anteil der weiblichen Patienten betrug 38% und der männlichen 62%. 82% der Patienten waren HLA-B27 positiv und 18% HLA-B27 negativ. Das Alter betrug im Durchschnitt 37,75 \pm 10,67 Jahre und die mittlere Krankheitsdauer lag bei 5,28 \pm 2,66 Jahren. Die lokale Ethikkommission stimmte der Studie zu und die Patienten gaben vor Studienbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

2.1.2 Axiale SpA Patienten unter TNF α -Blocker-Therapie

Es wurden insgesamt 34 Patienten mit der Diagnose axiale SpA in die Untersuchung eingeschlossen. Davon litten 22 Patienten an einer AS und 12 Patienten an einer nr-axSpA. Die Diagnose nr-axSpA wurde im Einklang mit den ASAS-Klassifikationskriterien gestellt^{2,3} und unter Ausschluss der Patienten mit einer AS. Die Diagnose AS wurde gemäß der New York Kriterien²⁴ gestellt. Eingeschlossenen wurden Patienten, die ein Alter von mindestens 18 Jahren und eine NSAR-Therapie-refraktäre Krankheitsaktivität mit einem BASDAI \geq 4 hatten. Eine evtl. Antikörper-Therapie musste mindestens 12 Wochen vor Studienbeginn abgesetzt worden sein. Die Patienten wurden mittels Intrakutantest nach Mendel-Mantoux und einer Röntgenthoraxaufnahme auf Tuberkulose untersucht.

Den Patienten wurde alle zwei Wochen 40mg Adalimumab subkutan verabreicht. Vor Therapiebeginn, nach 12 und nach 36-52 Wochen wurden als klinische und laborchemische Outcome-Parameter BASDAI und CRP bestimmt und Serum zur Biomarkerbestimmung entnommen. Der Untersuchungszeitraum begann im Jahr 2003 und endete 2007. Das Patientenkollektiv bestand zu 50,0% aus männlichen und zu 50,0% weiblichen Patienten. Von ihnen waren 17,6% HLA-B27 negativ und 82,4% HLA-

B27 positiv. Das Alter lag im Durchschnitt bei $40,12 \pm 12,2$ Jahren und die mittlere Krankheitsdauer betrug $10,63 \pm 9,9$ Jahre. Die lokale Ethikkommission stimmte der Durchführung der Studie zu. Die Patienten gaben vor Studienbeginn eine schriftliche Einverständniserklärung ab.

2.2 Methoden

2.2.1 Verwendete Materialien und Geräte

Probengewinnung

Vacutainer Systems Blood Collection Set

BD Vacutainer SST II Advanced 8,5 ml

Megafuge 1OR, Haereus Sepatech

Pipette Reference 1000, Eppendorf

Pipettenspitzen 1000µl Sarstedt

Gefäße CryoPure 1,8 ml, Sarstedt, Nürnberg

ELISA

Pipette Eppendorf Reference 10

Pipette Eppendorf Reference 100

Pipette Eppendorf Reference 1000

Pipette Eppendorf Research 300

Pipettenspitzen ep TIPS Standard 0,5-20 µl, Eppendorf

Pipettenspitzen ep TIPS Standard 20-300 µl, Eppendorf

Pipettenspitzen 200 µl, Sarstedt

Pipettenspitzen 1000 µl, Sarstedt

Pipettierhilfe Sarpette Automatic, DESAGA Sarstedt-Gruppe

Pipetten FALCON Advantage 25 ml, BD

Pipetten Costar Stripette 20 ml, Coring

Centrifuge 5415C, Eppendorf

MS1 Minishaker, IKA

Schwenkplatte Assistent 348/1, Karl Hecht AG

Reagiergefäß Safe Seal 0,5 ml, Sarstedt

Gefäße CryoPure 1,8 ml, Sarstedt

Triflill Multi Channel Pipetter Reservoir, CAMLAB

InVitro Biotainer Bottles 250, 500 und 1000 ml, Nalgene

30K MWCO Spinfilter, Quidel

MRX Microplate Reader, DYNEX Technologies

2.2.2 Klinische und laborchemische Parameter

Zu jedem Visitenzeitpunkt wurde der BASDAI ermittelt. Die Konzentration des CRP wurde standardmäßig am jeweiligen Standort im Routinelabor bestimmt. Die BSG wurde standardmäßig am jeweiligen Standort bestimmt.

2.2.3 Serumproben

Den Patienten wurde mittels venöser Blutentnahme peripheres Blut entnommen. Die Proben wurden nach mindestens 30 Min. und eingetretener Gerinnung bei 2500/min für 10 Min. zentrifugiert. Das Serum wurde vom Blutkuchen abgenommen, aliquotiert und bei mindestens -20°C bis zur Messung aufbewahrt.

Auf Grund von geringen Probenmengen bei einzelnen Patienten konnten einige Serumproben nicht auf alle Biomarker untersucht werden. Bei der TNF α -Blocker naiven Kohorte wurden die Biomarker BAP und MMP-3 bei allen 71 Patienten untersucht. Der Biomarker PYD wurde bei 51, der Biomarker VEGF bei 50 und der Biomarker OC bei 33 Patienten bestimmt. Bei der TNF α -Blocker therapierten Kohorte wurden die Biomarker BAP, MMP-3 und VEGF zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 36-52 bei 34 Patienten und zum Zeitpunkt Woche 12 bei 33 Patienten bestimmt. Der Biomarker PYD wurde zum Zeitpunkten Woche 0 bei 34 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 bei 33 Patienten bestimmt. Der Biomarker sICAM-1 wurde zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 36-52 bei 33 Patienten und zum Zeitpunkt Woche 12 bei 32 Patienten bestimmt.

2.2.4 Enzyme-linked immunosorbent assays

Sämtliche für diese Arbeit durchgeführten Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) mussten im Labor der Rheumatologie – Charité Benjamin Franklin neu etabliert werden. Die Immunoassays wurden in Zweifachbestimmung durchgeführt. Als Qualitätskontrolle wurden bei jedem Assay Kontrollen mit bekannter Biomarkerkonzentration bestimmt. Bei allen Assays kamen die Anweisungen des Herstellers zur Anwendung. Die Auswertung der Messungen wurde mit Hilfe der Software Revelation Version G 3.2 durchgeführt.

Wenn nicht anders beschrieben, wurde bei der Durchführung der einzelnen Immunoassays wie folgt vorgegangen:

- die gefrorenen Sera wurden schonend auf Eis aufgetaut und anschließend

durchmischt

- vor Testbeginn wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht
- die Inkubation der Mikrotiterplatte erfolgte bei Raumtemperatur, ohne Lichteinwirkung auf der Schwenkplatte
- beim Waschvorgang wurde der Inhalt der Mikrotiterplatte verworfen und alle Vertiefungen 5 mal mit je 300 µl Waschpuffer gespült und kräftig ausgeklopft

2.2.4.1 ELISA für Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (BAP)

Zur Enzymaktivitätsmessung der Knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase wurde der kommerziell erhältlicher Enzym Immunosorbent Assay METRA® BAP von Quidel (McKellar Court, USA) verwendet.

2.2.4.1.1 Testprinzip

Die Mikrotiterstreifen sind mit Anti-BAP-Antikörpern beschichtet, die die in der Probe vorliegende BAP binden. Die Enzymaktivität der gebundenen BAP wird durch den Umsatz von p-Nitrophenylphosphat-Substrat und der daraus resultierenden Farbreaktion ermittelt.

2.2.4.1.2 Reagenzien:

- Mikrotiterstreifen; beschichtet mit gereinigtem monoklonalem Anti-BAP-IgG-Antikörper
- Standards (A=0, B=2, C=20, D=50, E=80, F=140 U/l BAP)
- Kontrollen
- Testpufferlösung
- Substrat (p-Nitrophenylphosphat)
- Stopplösung (0,5 N NaOH)
- Waschpuffer

2.2.4.1.3 Testdurchführung

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 125 µl Testpuffer und 20 µl Standard, Kontrolle oder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 3 Std. inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 150 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und je nach Farbentwicklung ca. 30 Min. inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung angehalten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei

405 nm und auf der Referenzwellenlänge 630 nm gemessen. Als Standardkurve wurde eine Regression 2. Ordnung verwendet.

2.2.4.2 ELISA für Osteocalcin (OC)

Zur Konzentrationsbestimmung der OC wurde der kommerziell erhältliche N-MID® Osteocalcin ELISA von nordicbioscience (Herlev, Dänemark) verwendet. Dieser Assay bestimmt sowohl das intakte OC als auch das N-terminale mid-Fragment.

2.2.4.2.1 Testprinzip

Dieser Test beruht auf dem Prinzip des Sandwich-Assays. Die Mikrotiterplatte ist Streptavidin beschichtet. Zu der Probe werden zwei an unterschiedliche Domänen des OC-Moleküls bindende Anti-OC-Antikörper gegeben. Ein Antikörper ist biotinyliert und bindet OC über Streptavidin an die Mikrotiterplatte. Der andere Antikörper ist Peroxidase-markiert. Die Peroxidase setzt das zugegebene Substrat Tetramethylbenzidin um. Die dabei entstehende Farbreaktion wird photometrisch quantifiziert.

2.2.4.2.2 Reagenzien:

- Mikrotiterstreifen (beschichtet mit Streptavidin)
- Standards (lyophilisiert S1=4,2; S2=7,6; S3=19,4; S4=35,4; S5=56,1 ng/ml OC)
- Kontrollen
- Peroxidase-markierte Antikörper (monoklonaler Maus-Anti-OC-Antikörper)
- Biotinylierter Antikörper (monoklonaler Maus-Anti-OC-Antikörper)
- Konjugatverdünnungslösung
- Substrat (Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung (0,18 mol/l H₂SO₄)
- Waschpuffer

2.2.4.2.3 Testdurchführung

Das Lyophilisat des OC-Standards und der Kontrolle wurden in 0,5 ml destilliertem Wasser gelöst. Der Peroxidase-markierte Antikörper und der biotinylierte Antikörper wurden mit einer Konjugatverdünnungslösung im Verhältnis 1:40 verdünnt und zu gleichen Teilen gemischt. Von der so entstehenden Antikörperlösung wurden 150 µl zusammen mit 20 µl Standard, Kontrolle oder Probe in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 2 Std. inkubiert und im Anschluss

gewaschen.

Dann wurden 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und je nach Farbentwicklung ca. 15 Min. inkubiert. Dann wurde mit 100 µl Stopplösung die Farbreaktion angehalten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm auf der Referenz-wellenlänge von 630 nm gemessen und mit Hilfe einer 4-Parameterstandardkurve ausgewertet.

2.2.4.3 ELISA für Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3)

Zur Konzentrationsbestimmung der MMP-3 wurde der kommerziell erhältliche Quantikine® Human MMP-3 (total) Immunoassay (R&D Systems, Germany) verwendet. Dieser Assay ist sowohl für die aktive MMP-3 als auch die proMMP-3 sensibel.

2.2.4.3.1 Testprinzip

Dieser Test beruht auf dem Prinzip des Sandwich-Assays. Die Mikrotiterstreifen sind mit einem Anti-MMP-3-Antikörper beschichtet, der die in der Probe vorliegende MMP-3 fixiert. Ein zweiter Antikörper bindet an ein weiteres Epitop von MMP-3. An diesen Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche bei Zugabe von Tetramethylbenzidin eine Farbreaktion hervorruft, die sich photometrisch quantifizieren lässt.

2.2.4.3.2 Reagenzien:

- Mikrotiterstreifen (beschichtet mit einem polyklonalem Anti-MMP-3-Antikörper)
- Standard (100 ng lyophilisiertes rekombinantes humanes pro-MMP-3)
- Calibrator Diluent RD5-10
- Assay Diluent RD1-52
- Konjugat (polyklonaler Anti-MMP-3-Antikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase)
- Color Reagenz A (stabilisiertes Wasserstoffperoxid)
- Color Reagenz B (stabilisiertes Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung (2N H₂SO₄)
- Waschpuffer

2.2.4.3.3 Testdurchführung

Das Lyophilisat des MMP-3-Standards wurde mit 1ml destilliertem Wasser aufgelöst, so dass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 ng/ml MMP-3 entstand. Aus

dieser Stocklösung und Calibrator Diluent wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt (S7=10; S6=5; S5=2,5; S4=1,25; S3=0,625; S2=0,312; S1=0,156 ng/ml MMP-3). Aus 4 µl Stocklösung und 396 µl Calibrator Diluent wurde eine Kontrolle von 1ng/ml angefertigt. Jede Serumprobe wurde im Verhältnis 1:10 mit Calibrator Diluent verdünnt.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100µl Assay Diluent und 100µl Standard, Kontrolle oder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 2 Std. inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 200 µl Substratlösung (Color Reagenz A + Color Reagenz B) in jede Vertiefung pipettiert und je nach Farbentwicklung ca. 30 Min. inkubiert. Dann wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung angehalten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm auf der Referenzwellenlänge 630 nm gemessen und mit einer 4-Parameterkurve als Standardkurve ausgewertet.

2.2.4.4 ELISA für Pyridinolin Crosslink (PYD)

Zur Konzentrationsbestimmung des PYD wurde der kommerziell erhältliche METRA® Serum PYD EIA Kit (Quidel, USA) verwendet.

2.2.4.4.1 Testprinzip

Dieser Test ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay. Das in der Probe vorliegende PYD konkurriert mit PYD, welches an die Mikrotiterplatte gebunden ist um einen polyklonalen Kaninchen-Anti-PYD-Antikörper. Der an die Mikrotiterplatte gebundene Antikörper wird durch einen alkalische Phosphatase-markierten Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper detektiert. Nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat wird die Farbintensität photometrisch quantifiziert.

2.2.4.4.2 Reagenzien:

- Mikrotiterstreifen (beschichtet mit aus Rinderknochen isoliertem PYD)
- Standard (120 nmol/l PYD)
- Assaypuffer
- Enzympuffer
- Antikörper (polyklonaler Kaninchen-Anti-PYD-Antikörper.)
- Konjugat (lyophilisierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper)
- Substrattabletten (p-Nitrophenylphosphat)
- Substratpuffer
- Kontrollen (PYD, isoliert aus humanem Urin)

- Stopplösung (0,5N NaOH)
- Waschpuffer

2.2.4.4.3 Testdurchführung

Alle Reagenzien bis auf den Pyridinolinantikörper wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Aus Standard und Assaypuffer wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt (S5=12; S4=6; S3=3; S2=1,5; S1=0,75 nmol/l PYD). Die Konzentrate der Kontrollen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Jede Serumprobe wurde einzeln in einen Spinfilter gegeben und 30 Min. bei 10000/min zentrifugiert. War das dabei entstandene Filtrat nicht farblos wurde dieser Vorgang wiederholt.

Im Anschluss wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 50 µl Enzympuffer, 75 µl Pyridinolinantikörper und 25 µl Standard, Kontrolle oder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 18-24 Std. bei 2-8°C und ohne Lichteinwirkung auf der Schwenkplatte inkubiert und anschließend gewaschen. Es wurden 150 µl Konjugatlösung in jede Vertiefung gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 1 Std. inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 150 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und je nach Farbentwicklung ca. 40 Min. inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100µl Stopplösung angehalten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei 405 nm auf der Referenzwellenlänge 630 nm gemessen und mit Hilfe einer 4-Parameter-Standardkurve die Konzentration der Proben bestimmt.

2.2.4.5 ELISA für Vascular Endothelial Growthfactor (VEGF)

Zur Konzentrationsbestimmung des VEGF wurde der kommerzielle Quantikine® Human VEGF Immunoassay (R&D Systems, USA) verwendet.

2.2.4.5.1 Testprinzip

Dieser Test beruht auf dem Prinzip des Sandwich-Assays. Die Mikrotiterstreifen sind mit einem Anti-VEGF-Antikörper beschichtet, der den in der Probe vorliegende VEGF fixiert. Ein zweiter Antikörper bindet an ein weiteres Epitop von VEGF. An diesen Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche bei Zugabe von Tetramethylbenzidin eine Farbreaktion hervorruft, deren Intensität sich photometrisch quantifizieren lässt.

2.2.4.5.2 Reagenzien:

- Mikrotiterstreifen (beschichtet mit einem monoklonalem Maus-Anti-VEGF-Antikörper)
- Standard (2000pg lyophilisierter rekombinanter humaner VEGF165)
- Calibrator Diluent RD6U
- Assay Diluent RDW1
- Konjugat (polyklonaler Anti-VEGF-Antikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase)
- Color Reagenz A (stabilisiertes Wasserstoffperoxid)
- Color Reagenz B (stabilisiertes Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung (2N H₂SO₄)
- Waschpuffer

2.2.4.5.3 Testdurchführung

Das Lyophilisat des VEGF-Standards wurde mit 1ml Calibrator Diluent aufgelöst, so dass eine Stocklösung mit einer Konzentration von 2000 pg/ml VEGF entstand. Aus dieser Stocklösung und Calibrator Diluent wurde eine Standardverdünnungsreihe hergestellt (S7=2000; S6=1000; S5=500; S4=250; S3=125; S2=62,5; S1=31,2 pg/ml VEGF). Aus 20 µl Stocklösung und 380 µl Calibrator Diluent wurde eine Kontrolle von 100 pg/ml VEGF angefertigt.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl Assay Diluent und 100 µl Standard, Kontrolle oder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 2 Std. inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 200 µl Konjugat in jede Vertiefung gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde abermals 2 Std. inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 200µl Substratlösung (Color Reagenz A + Color Reagenz B) in jede Vertiefung pipettiert und je nach Farbentwicklung ca. 25 Min. inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50µl Stopplösung angehalten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm auf der Referenzwellenlänge 630 nm gemessen und mit einer 4-Parameterkurve ausgewertet.

2.2.4.6 ELISA für soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1)

Zur Konzentrationsbestimmung der sICAM-1 wurde der kommerziell erhältliche Quantikine® Human soluble ICAM-1 /CD54 Immunoassay (R&D Systems, USA) verwendet.

2.2.4.6.1 Testprinzip

Dieser Test beruht auf dem Prinzip des Sandwich-Assays. Die Mikrotiterstreifen sind mit einem Anti-sICAM-1-Antikörper beschichtet, der das in der Probe vorliegende sICAM-1 fixiert. Ein zweiter Antikörper bindet an ein weiteres Epitop des sICAM-1-Moleküls. An diesen Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche bei Zugabe von Tetramethylbenzidin eine Farbreaktion hervorruft, die sich photometrisch quantifizieren lässt.

2.2.4.6.2 Reagenzien:

- Mikrotiterstreifen (beschichtet mit einem monoklonalem Maus-Anti-sICAM-1-Antikörper)
- Standards (Lyophilisat mit rekombinantem humanem sICAM-1 S5=45,26; S4=32,49; S3=17,61; S2=9,29; S1=2,23 ng/ml sICAM-1)
- Kontrolle (Lyophilisat von humanem Serum mit natürlichem und rekombinantem humanem sICAM-1)
- Sample Diluent
- Konjugat (Anti-sICAM-1-Antikörper gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase)
- Substrat (stabilisiertes Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung
- Waschpuffer

2.2.4.6.3 Testdurchführung

Die lyophilisierten sICAM-1-Standards wurden jeweils mit 1ml und die Kontrolle mit 500µl destilliertem Wasser aufgelöst. Jede Serumprobe und die Kontrolle wurden im Verhältnis 1:20 mit Sample Diluent verdünnt.

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl Konjugat und 100 µl Standard, Kontrolle oder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 1,5 Std. inkubiert und anschließend gewaschen. Dann wurden 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettiert und je nach Farbentwicklung ca. 30 Min. inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 µl Stopplösung angehalten. Unmittelbar im Anschluss wurde die Absorption bei 450 nm auf der Referenzwellenlänge 630 nm gemessen und mit einer 4-Parameterkurve die Konzentration bestimmt.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung der Diagramme erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 14.0 und 17.0 für Windows. Die Serumkonzentrationen

der Biomarker zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden mit dem Wilcoxon-Test auf signifikante Veränderungen untersucht. Die Korrelationsanalysen zwischen Biomarkern, klinischen und laborchemischen Parametern wurden mit dem Spearman-Test durchgeführt. Die Biomarker der HLA-B27 positiven und negativen Patienten wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Die Unterschiede der Biomarkerkonzentrationen zwischen AS/ nr-axSpA und Respondern/ Non-Respondern wurden ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Signifikanz überprüft. Um die zeitlichen Veränderungen der Biomarker, der klinischen und laborchemischen Parametern unter TNF α -Blocker-Therapie zu untersuchen, wurden Differenzen zwischen den Zeitpunkt Basis und Zeitpunkt 36-52 Wochen ermittelt (d_BAP, d_MMP-3, d_VEGF, d_sICAM-1, d_PVD, d_CRP und d_BASDAI). Diese so gebildeten Werte wurden mit dem Spearman-Test auf eine signifikante Korrelation geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 TNF α -Blocker naive AS Patienten

3.1.1 Klinische und laborchemische Parameter

3.1.1.1 BASDAI

Der BASDAI wurde zum Ausgangszeitpunkt und zum Zeitpunkt 2 Jahre bei 69 Patienten und zum Zeitpunkt 1 Jahr bei 70 Patienten bestimmt. Zum Ausgangszeitpunkt betrug der Median 3,95; zum Zeitpunkt 1 Jahr 3,16 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 3,38. Es bestand keine signifikante Änderung über den gesamten Untersuchungszeitraum.

3.1.1.2 CRP

Das CRP lag zum Ausgangszeitpunkt und zum Zeitpunkt 1 Jahr bei 46 Patienten und zum Zeitpunkt 2 Jahre bei 44 Patienten vor. Der Median zum Zeitpunkt Basis betrug 12,50; zum Zeitpunkt 1 Jahr 10,00 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 9,50mg/l. Die Spannweite der CRP Messwerte war sehr groß. Dies beruhte vor allem auf Ausreißern im oberen Bereich. Der Median lag zu allen Zeitpunkten über 5mg/l, der oberen Grenze des Normwerts für Gesunde. Es bestanden keine signifikanten Änderungen der CRP-Konzentrationen zwischen den einzelnen Zeitpunkten.

3.1.1.3 BSG

Die BSG wurde zum Ausgangszeitpunkt bei 70, nach einem Jahr bei 71 und nach zwei Jahren bei 67 Patienten bestimmt. Der Median zum Ausgangszeitpunkt betrug 20,00; nach einem Jahr 13,00 und nach 2 Jahren 14,00mm/h. Die BSG wies ebenfalls eine große Spannweite auf, die vor allem auf Werte im oberen Bereich zurück zu führen war. Die Werte fielen zwischen dem Zeitpunkt Basis und 2 Jahre signifikant ab ($p=0,032$).

3.1.2 Serumbiomarker im Verlauf von 2 Jahren

3.1.2.1 BAP

BAP wurde zu allen drei Zeitpunkten bei allen 71 Patienten bestimmt (s. Abbildung 4).

Ergebnisse

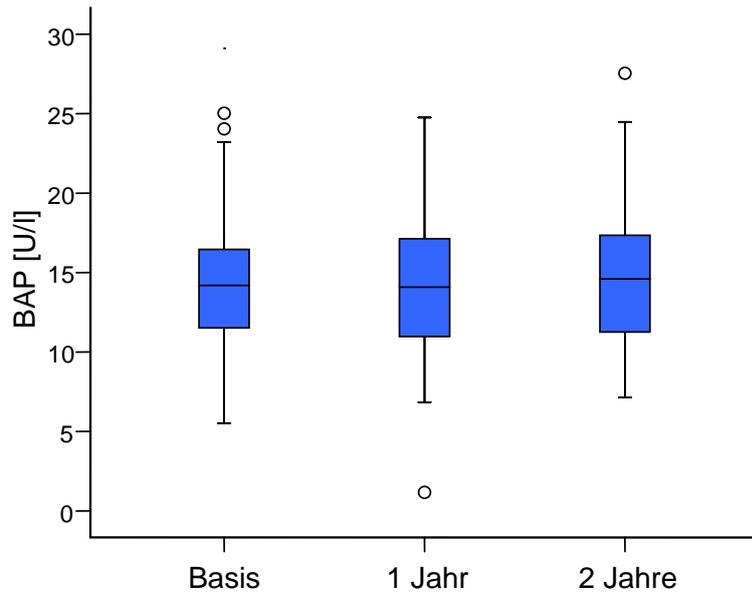


Abbildung 4 Boxplots der BAP-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. Der Median betrug zum Zeitpunkt Basis 14,19; zum Zeitpunkt 1 Jahr 14,08 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 14,60U/l. Es lagen keine signifikanten Änderungen vor.

Die BAP-Konzentrationen lagen zu allen drei Zeitpunkten im gleichen Bereich. Es gab keine signifikanten Änderungen innerhalb des Beobachtungszeitraums.

3.1.2.2 OC

Die OC-Konzentrationen wurden zu allen Zeitpunkten bei 33 Patienten untersucht (s. Abbildung 5).

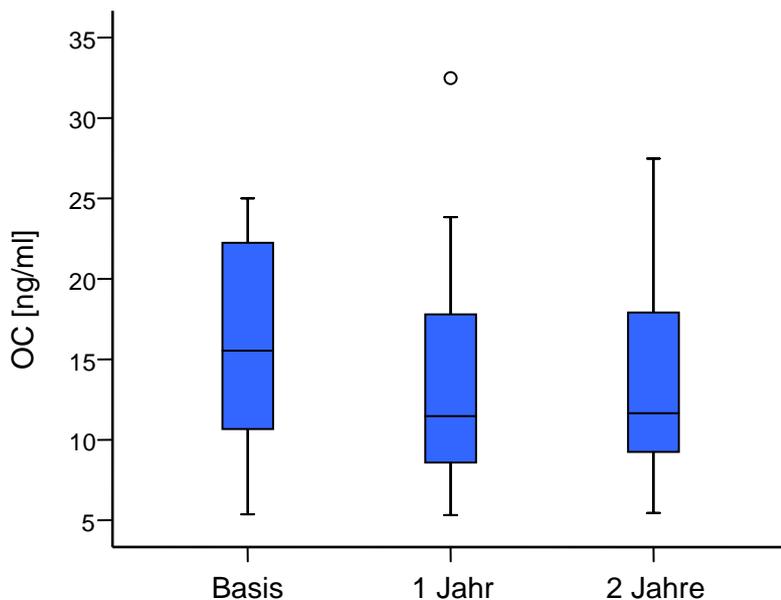


Abbildung 5 Boxplots der OC-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. Der Median betrug zum Zeitpunkt Basis 15,87; zum Zeitpunkt 1 Jahr 11,81 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 11,65ng/ml. Es lag ein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten Basis und 2 Jahre vor.

Ergebnisse

Die OC-Konzentrationen nahmen über den Zeitraum von 2 Jahren signifikant ab ($p=0,018$).

3.1.2.3 MMP-3

MMP-3 wurde zu allen Zeitpunkten bei allen 71 Patienten bestimmt (s. Abbildung 6).

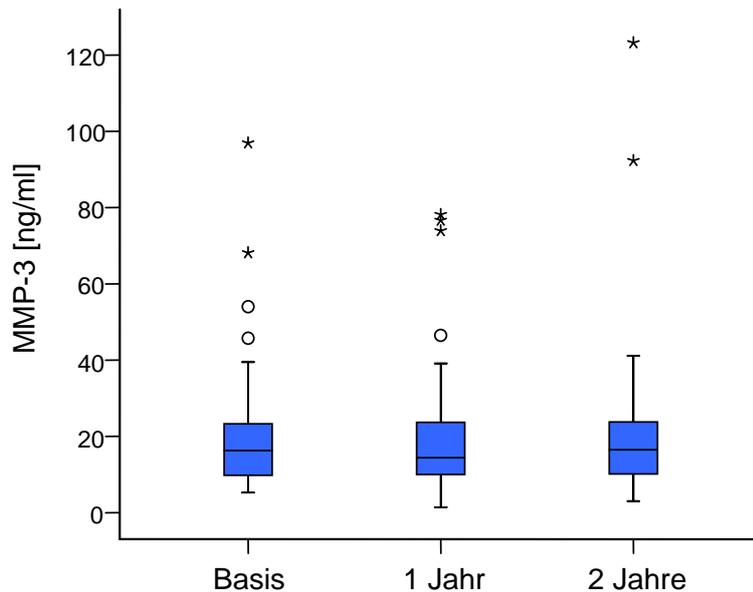


Abbildung 6 Boxplots der MMP-3-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. Der Median betrug zum Zeitpunkt Basis 16,26; zum Zeitpunkt 1 Jahr 14,42 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 16,50U/l. Es lagen keine signifikanten Änderungen vor.

Die MMP-3-Konzentrationen wiesen eine große Spannweite auf, die auf Ausreißer im oberen Bereich zurückzuführen war. Es gab keine signifikante Änderung der Konzentrationen über die drei Zeitpunkte.

3.1.2.4 PYD

PYD wurde zu allen Zeitpunkten bei 51 Patienten untersucht (s. Abbildung 7).

Ergebnisse

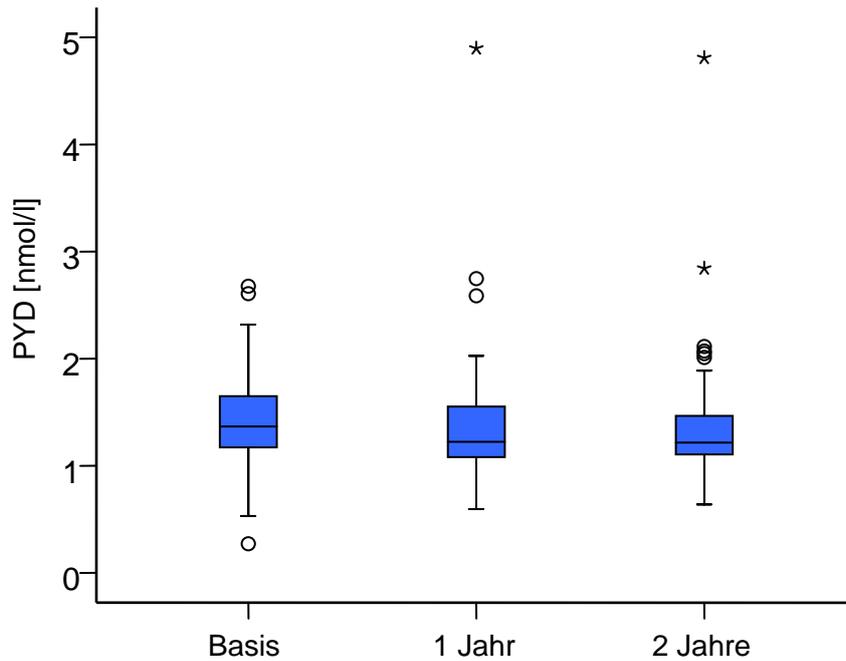


Abbildung 7 Boxplots der PYD-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. Der Median betrug zum Zeitpunkt Basis 1,36; zum Zeitpunkt 1 Jahr 1,22 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 1,21nmol/l. Es lagen keine signifikanten Änderungen vor.

Die Mediane der PYD-Konzentrationen lagen zu allen drei Zeitpunkten im gleichen Bereich. Es fanden keine signifikanten Änderungen statt.

3.1.2.5 VEGF

VEGF wurde zu allen Zeitpunkten bei 50 Patienten bestimmt (s. Abbildung 8).

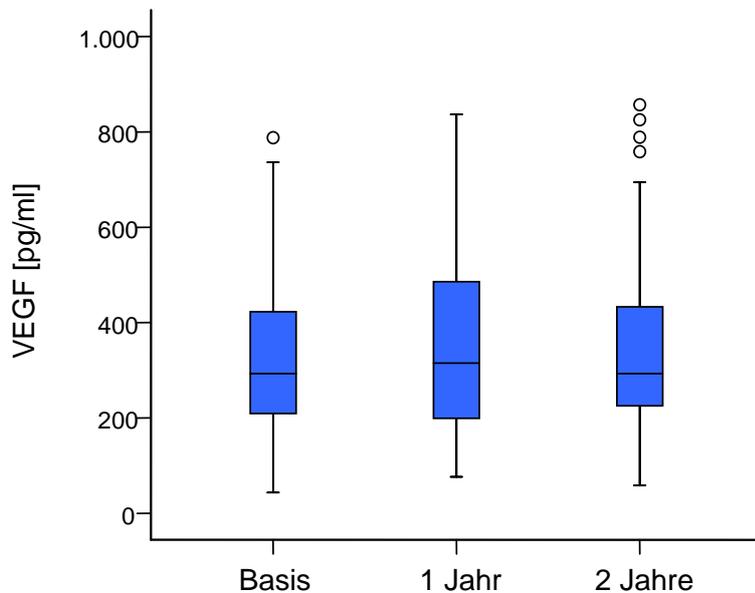


Abbildung 8 Boxplots der VEGF-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. Der Median betrug zum Zeitpunkt Basis 293,02; zum Zeitpunkt 1 Jahr 314,89 und zum Zeitpunkt 2 Jahre 292,84pg/ml. Es lagen keine signifikanten Änderungen vor.

Ergebnisse

Die VEGF-Konzentrationen hatten eine große Spannweite. Es kam zu keiner signifikanten Änderung innerhalb des Beobachtungszeitraums.

3.1.3 Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen untereinander und mit CRP, BSG, BASDAI, und Patientenalter

Die VEGF-Serumkonzentration korrelierte zu allen drei Zeitpunkten mit der CRP-Konzentration, dem BASDAI sowie der BSG. Die OC-Serumkonzentration korrelierte zu den Zeitpunkten 1 Jahr und 2 Jahre negativ mit dem BASDAI. Die PYD-Serumkonzentration korrelierte zu den Zeitpunkten Basis und 1 Jahr mit der CRP-Konzentration. Die übrigen Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen mit den klinischen und laborchemischen Parametern waren maximal zu einem der drei Zeitpunkte signifikant (s. Tabelle 1).

Die BAP-Konzentration korrelierte zu den Zeitpunkten Basis und 1 Jahr mit der OC-Konzentration. Die weiteren Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen untereinander waren maximal zu einem der drei Zeitpunkte signifikant (s. Tabelle 2).

Tabelle 1 Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen mit BASDAI, CRP, BSG, Patientenalter und Krankheitsdauer zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

		BASDAI	CRP [mg/l]	BSG [mm/h]	Krankheits- dauer [Jahre]
BAP [U/l]	Basis	0,069	0,333 **	0,176	-0,020
	1 Jahr	-0,261 *	-0,044	-0,041	0,014
	2 Jahre	-0,222	0,012	-0,082	-0,050
OC [ng/ml]	Basis	0,019	0,180	0,165	-0,050
	1 Jahr	-0,363 *	0,012	-0,196	-0,252
	2 Jahre	-0,416 *	-0,060	-0,287	-0,129
MMP-3 [U/l]	Basis	-0,039	0,291 *	0,011	-0,005
	1 Jahr	-0,076	0,028	0,055	0,060
	2 Jahre	-0,062	0,112	-0,139	0,038
PYD [nmol/l]	Basis	-0,173	0,329 *	0,366 **	0,078
	1 Jahr	-0,111	0,439 **	0,074	0,168
	2 Jahre	-0,092	0,035	0,212	0,007
VEGF [pg/ml]	Basis	0,340 *	0,307 *	0,370 **	0,241
	1 Jahr	0,452 *	0,431 *	0,491 *	0,152
	2 Jahre	0,496 **	0,361 *	0,372 *	0,275

Ergebnisse

Tabelle 2 Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen untereinander zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

		BAP [U/l]	OC [ng/ml]	MMP-3 [U/l]	PYD [nmol/l]	VEGF [pg/ml]
BAP [U/l]	Basis		0,483 **	0,233	0,177	-0,028
	1 Jahr		0,465 **	0,192	0,214	-0,110
	2 Jahre		0,346	0,252 *	0,110	-0,185
OC [ng/ml]	Basis	0,483 **		0,316	0,446 **	-0,191
	1 Jahr	0,465 **		0,430 *	0,043	-0,332
	2 Jahre	0,346		0,231	0,216	-0,393 *
MMP-3 [U/l]	Basis	0,233	0,316		0,293 *	0,105
	1 Jahr	0,192	0,430 *		0,202	0,055
	2 Jahre	0,252 *	0,231		0,089	0,052
PYD [nmol/l]	Basis	0,177	0,446 **	0,293 *		-0,102
	1 Jahr	0,214	0,043	0,202		-0,052
	2 Jahre	0,110	0,216	0,089		-0,125
VEGF [pg/ml]	Basis	-0,028	-0,191	0,105	-0,102	
	1 Jahr	-0,110	-0,332	0,055	-0,052	
	2 Jahre	-0,185	-0,393 *	0,052	-0,125	

3.1.4 Unterschiede der Biomarkerkonzentrationen von HLA-B27 positiven und negativen AS Patienten

In der Gruppe der HLA-B27 positiven Patienten betrug der Median der PYD-Konzentration zu den Zeitpunkten Basis 1,43; 1 Jahr 1,34 und 2 Jahre 1,22nmol/l. In der Gruppe der HLA-B27 negativen Patienten betrug der Median der PYD-Konzentration zu den Zeitpunkten Basis 1,04; 1 Jahr 0,95 und 2 Jahre 0,98nmol/l. Zu allen Zeitpunkten war die PYD-Konzentration bei den HLA-B27 positiven Patienten signifikant höher als bei den HLA-B27 negativen Patienten (s. Abbildung 9). In der Gruppe der HLA-B27 positiven Patienten betrug der Median der BAP-Konzentration zu den Zeitpunkten Basis 14,31; 1 Jahr 14,65 und 2 Jahre 14,75U/l. In der Gruppe der HLA-B27 negativen Patienten betrug der Median der BAP-Konzentration zu den Zeitpunkten Basis 11,62; 1 Jahr 10,42 und 2 Jahre 13,00U/l. Zu den Zeitpunkten Basis und 1 Jahr war die BAP-Konzentration bei den HLA-B27 positiven Patienten signifikant höher als bei den HLA-B27 negativen Patienten (s. Abbildung 10). Die übrigen Biomarker wiesen im Vergleich der HLA-B27 positiven und negativen Patienten keinen Unterschied auf.

Ergebnisse

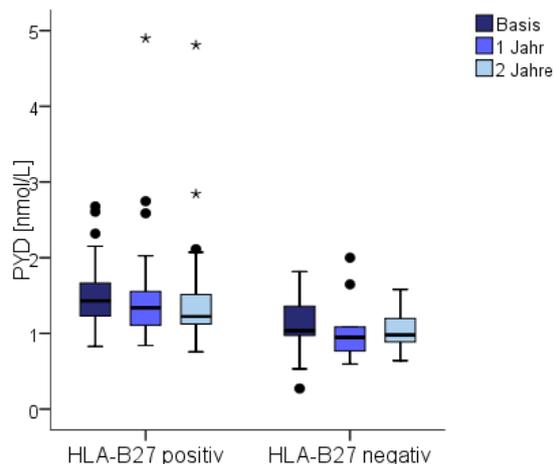


Abbildung 9 Boxplots der PYD-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre der HLA-B27 positiven und negativen Patienten im Vergleich. Es lagen zu allen Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor (Basis: $p=0,014$; 1 Jahr: $p=0,008$ und 2 Jahre: $p=0,011$).

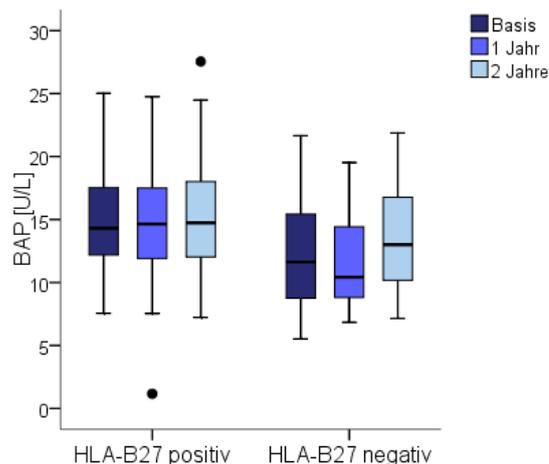


Abbildung 10 Boxplots der BAP-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Basis, 1 Jahr und 2 Jahre der HLA-B27 positiven und negativen Patienten im Vergleich. Es lagen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu den Zeitpunkten Basis ($p=0,048$) und 1 Jahr ($p=0,024$) vor.

3.2 TNF α -Blocker behandelte axiale SpA Patienten

3.2.1 Klinische und laborchemische Parameter im Verlauf unter TNF α -Blocker-Therapie

3.2.1.1 BASDAI

Der BASDAI wurde bei allen Patienten zu allen Zeitpunkten bestimmt. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0 betrug 6,39; zum Zeitpunkt Woche 12 3,60 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 2,13. Die BASDAI Werte fielen sowohl zwischen Woche 0 und Woche 12 ($p<0,001$), als auch zwischen Woche 12 und Woche 36-52 ($p=0,001$) signifikant ab. Auch in den beiden Untergruppen war ein signifikanter Abfall zwischen den drei Zeitpunkten gegeben. In der Untergruppe AS fiel der Median von 6,70 zum Zeitpunkt Woche 0 auf 3,16 zum Zeitpunkt 36-52 Wochen ab. In der Untergruppe nr-axSpA fiel der Median von 5,90 zum Zeitpunkt Woche 0 auf 1,40 zum Zeitpunkt Woche 36-52 ab. Die Patienten, die einen relativen BASDAI Rückgang von 50% oder einen absoluten Rückgang von 2 Punkten erreichten, wurden als Responder eingestuft. Nach Woche 12 waren 18 der 34 Patienten Responder. Nach 36-52 Wochen stieg die Anzahl der Responder auf 30 von 34 Patienten.

3.2.1.2 CRP

Das CRP lag zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 12 bei allen 34 Patienten und zum Zeitpunkt Woche 36-52 bei 33 Patienten vor. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0

Ergebnisse

betrug 8,04; zum Zeitpunkt Woche 12 2,90 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 1,90mg/l. Das CRP fiel zwischen den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 12 signifikant ab ($p < 0,001$) und blieb dann bis Woche 36-52 etwa auf dem gleichen Niveau. Diese Entwicklung war in beiden Untergruppen zu beobachten. Bei getrennter Betrachtung zeigte sich keine statistische Signifikanz.

3.2.2 Serumbiomarker im Verlauf unter $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie

3.2.2.1 BAP

Die BAP-Serumkonzentration wurde zum Zeitpunkt Woche 0 bei 34 Patienten, zum Zeitpunkt Woche 12 bei 33 Patienten und zum Zeitpunkt Woche 36-52 bei 34 Patienten bestimmt (s. Abbildung 11).

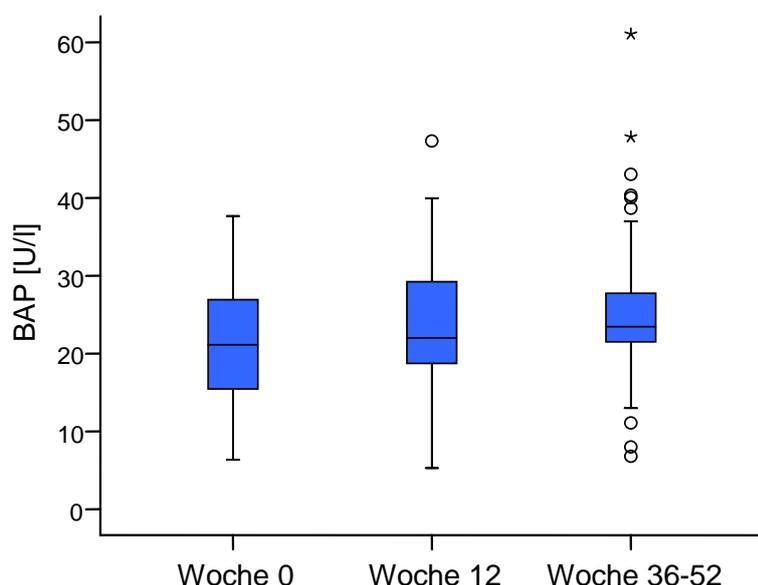


Abbildung 11 Boxplots der BAP-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 12 und Woche 36-52. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0 betrug 21,02; zum Zeitpunkt Woche 12 22,00 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 23,44U/l. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Woche 0 und 36-52 ($p < 0,001$).

Man konnte einen Anstieg der Mediane zu beiden Zeitpunkten erkennen, welcher jedoch lediglich zwischen Woche 0 und 36-52 signifikant war. Die Mediane der Untergruppe AS stiegen ebenfalls kontinuierlich an. Dieser Anstieg war ebenso zwischen Woche 0 und 36-52 signifikant ($p = 0,001$). Bei der Untergruppe nr-axSpA konnte keine klare Tendenz ausgemacht werden.

3.2.2.2 MMP-3

Die MMP-3-Serumkonzentration wurde zum Zeitpunkt Woche 0 bei 34 Patienten, Woche 12 bei 33 Patienten und Woche 36-52 bei 34 Patienten bestimmt (s. Abbildung 12).

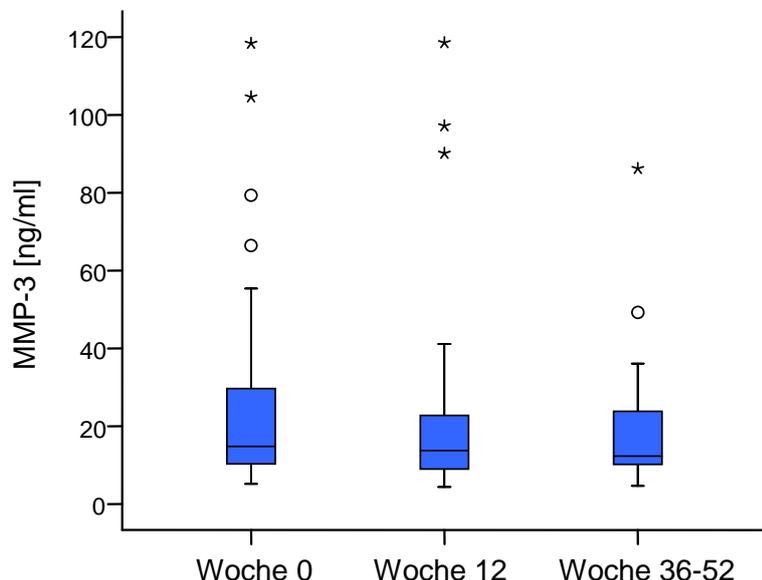


Abbildung 12 Boxplots der MMP-3-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 12 und Woche 36-52. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0 betrug 14,50; zum Zeitpunkt Woche 12 13,75 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 12,15ng/ml. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Woche 0 und 12 ($p=0,036$) und Woche 0 und 36-52 ($p=0,022$).

Die Spannweite der MMP-3-Konzentrationen war auf Grund von extremen Ausreißern im oberen Bereich groß. Insgesamt war ein signifikanter Abfall von MMP-3 zu beobachten. In der Untergruppe AS gab es eine ähnliche Entwicklung der Mediane, die signifikant zwischen Woche 0 und 36-52 war ($p=0,022$). In der Untergruppe nr-axSpA bestand keine eindeutige Entwicklung.

MMP-3 ist der einzige in dieser Arbeit untersuchte Biomarker, der einen signifikanten Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern aufwies. Patienten, die zum Zeitpunkt 36-52 Wochen zu den Non-Respondern gehörten, wiesen retrospektiv zum Ausgangszeitpunkt eine signifikant niedrigere MMP-3-Serumkonzentration ($p=0,015$) auf. Ebenfalls zum Zeitpunkt 36-52 Wochen war die MMP-3-Serumkonzentration bei diesen Patienten signifikant niedriger ($p=0,004$).

3.2.2.3 PYD

Der Serumkonzentration von PYD wurde nur zu zwei Zeitpunkten gemessen. Zum Zeitpunkt Woche 0 wurde sie bei 34 Patienten und zum Zeitpunkt Woche 36-52 bei 33 Patienten bestimmt (s. Abbildung 13).

Ergebnisse

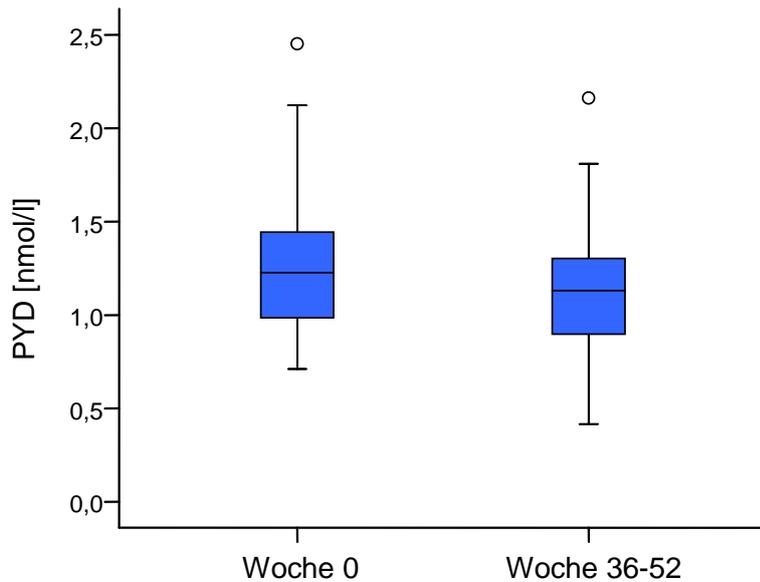


Abbildung 13 Boxplots der PYD-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 36-52. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0 betrug 1,24 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 1,13nmol/l. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Woche 0 und Woche 36-52($p=0,014$).

Die PYD-Konzentration nahm von Woche 0 auf Woche 36-52 signifikant ab. Diese Veränderung zeigte sich auch bei der Untergruppe der AS Patienten ($p=0,007$). Bei der Untergruppe der Patienten mit nr-axSpA zeigte sich diese Entwicklung nicht.

3.2.2.4 VEGF

Die VEGF-Serumkonzentration wurde zum Zeitpunkt Woche 0 bei 34 Patienten, Woche 12 bei 33 Patienten und Woche 36-52 bei 34 Patienten bestimmt (s. Abbildung 14).

Ergebnisse

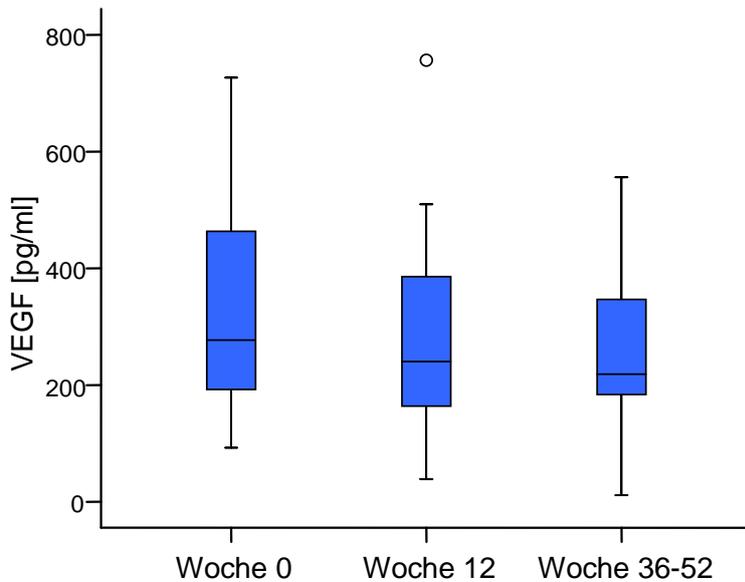


Abbildung 14 Boxplots der VEGF-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 12 und Woche 36-52. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0 betrug 267,59; zum Zeitpunkt Woche 12 240,29 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 217,43pg/ml. Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen Woche 0 und 12 ($p < 0,001$) und Woche 0 und 36-52 ($p < 0,001$).

Die Spannweite der VEGF-Konzentration war zu allen Zeitpunkten sehr groß. Verglichen mit der Woche 0 war der Abfall der VEGF-Konzentration zu beiden Zeitpunkten signifikant. Auch in der Untergruppe AS kam es zu beiden Zeitpunkten zu einem signifikantem Abfall der Mediane der VEGF-Konzentrationen ($p = 0,003$ und $p < 0,001$). In der Untergruppe nr-axSpA lagen die Mediane zu beiden Folgezeitpunkten ebenfalls unter dem Ausgangswert. Der Unterschied war jedoch nur nach Woche 12 signifikant ($p = 0,023$).

3.2.2.5 sICAM-1

Die sICAM-1-Serumkonzentration wurde zum Zeitpunkt Woche 0 bei 33 Patienten, Woche 12 bei 32 Patienten und Woche 36-52 bei 33 Patienten bestimmt (s. Abbildung 15).

Ergebnisse

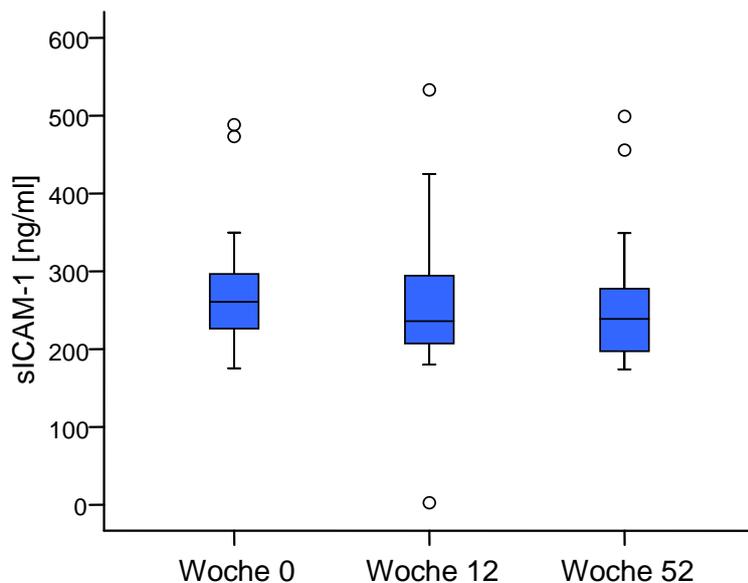


Abbildung 15 Boxplots der sICAM-1-Konzentrationen zu den Zeitpunkten Woche 0, Woche 12 und Woche 36-52. Der Median zum Zeitpunkt Woche 0 betrug 260,71; zum Zeitpunkt Woche 12 235,84 und zum Zeitpunkt Woche 36-52 246,59ng/ml. Es bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Woche 0 und 12 ($p=0,008$).

Die sICAM-1-Konzentration fiel zwischen Woche 0 und Woche 12 signifikant ab und blieb dann bis zur Woche 36-52 auf etwa dem gleichen Niveau. Die Untergruppe mit der Diagnose AS zeigte eine ähnliche Entwicklung der Mediane, die sowohl signifikant war zwischen Woche 0 und 12 ($p=0,012$) als auch zwischen Woche 0 und 36-52 ($p=0,046$). Die Untergruppe nr-axSpA zeigte keine signifikante Entwicklung.

3.2.3 Korrelationen der Biomarkerkonzentrationen untereinander und mit klinischen und laborchemischen Parametern

Zu den einzelnen Zeitpunkten bestand eine signifikante Korrelation der Serumkonzentration von BAP mit der MMP-3- und PYD-Serumkonzentration. Zu den Zeitpunkten Woche 0 und Woche 12 korreliert die BAP-Konzentration mit der MMP-3-Serumkonzentration ($r=0,36$ $p=0,038$ und $r=0,42$ $p=0,014$). Zu den Zeitpunkten Woche 0 und 36-52 korrelierte die BAP-Konzentration mit der PYD-Serumkonzentration ($r=0,41$ $p=0,016$ und $r=0,40$ $p=0,023$). Weitere Korrelationen zu den einzelnen Zeitpunkten zwischen den Biomarkern bestanden maximal zu einem Zeitpunkt und werden hier nicht aufgeführt.

Als nächstes wurden die Veränderungen der Biomarkerkonzentrationen sowie der klinischen und laborchemischen Parameter unter TNF α -Blocker-Therapie untersucht. Dazu wurden die Differenzen zwischen den Ausgangs- und Endwerten des jeweiligen Parameters gebildet (d_BAP, d_MMP-3, d_VEGF, d_sICAM-1, d_PYD, d_CRP und

Ergebnisse

d_BASDAI) und diese untereinander und mit der Krankheitsdauer korreliert. Die Krankheitsdauer wies eine negative Korrelation mit d_BAP auf. Das bedeutet je länger die Krankheitsdauer der Patienten war, desto stärker stiegen die BAP-Konzentrationen unter Anti-TNF α -Therapie an (s. Abbildung 16).

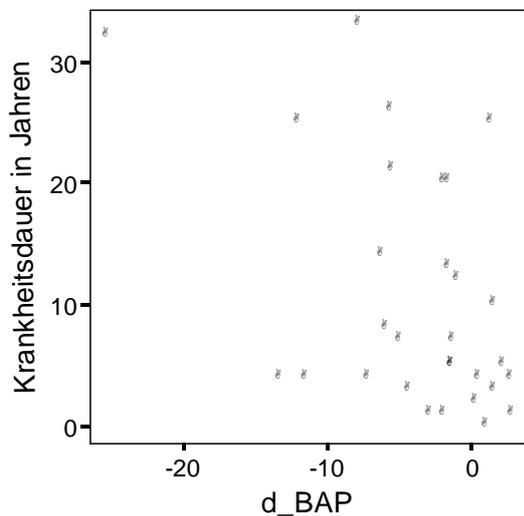


Abbildung 16 Dotplot der Krankheitsdauer und der Differenzen zwischen Ausgangs- und Endwerten von BAP ($r=-0,390$; $p=0,033$).

d_CRP korrelierte mit d_MMP-3 und d_VEGF. Das bedeutet je stärker die CRP-Konzentration unter Anti-TNF α -Therapie abfiel, desto größer war auch der Abfall der MMP-3- und VEGF-Konzentrationen (s. Abbildung 17 und Abbildung 18).

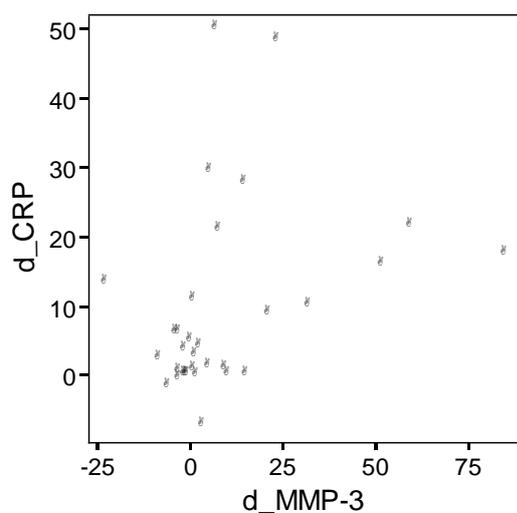


Abbildung 17 Dotplot der Differenzen zwischen Ausgangs- und Endwerten von CRP und MMP-3 ($r=0,454$; $p=0,009$).

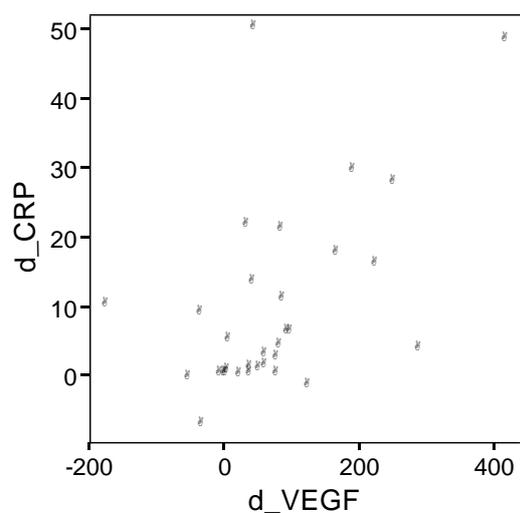


Abbildung 18 Dotplot der Differenzen zwischen Ausgangs- und Endwerten von CRP und VEGF ($r=0,498$; $p=0,004$).

Ergebnisse

Es bestand kein Zusammenhang mit der Entwicklung der übrigen Biomarker und der Krankheitsdauer, d_CRP oder d_BASDAI.

Beim Vergleich der Differenzen der Biomarkerkonzentrationen untereinander ergaben sich ebenfalls signifikante Korrelationen. d_MMP-3 korrelierte negativ mit d_BAP und d_VEGF korrelierte positiv mit d_sICAM-1 (s. Abbildung 19 und Abbildung 20).

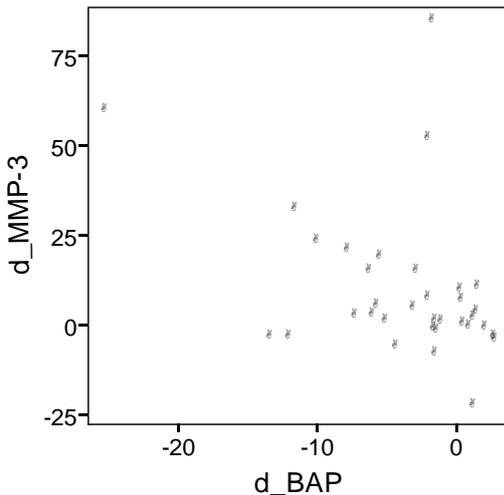


Abbildung 19 Dotplot der Differenzen zwischen Ausgangs- und Endwerten von MMP-3 und BAP ($r=-0,398$; $p=0,02$).

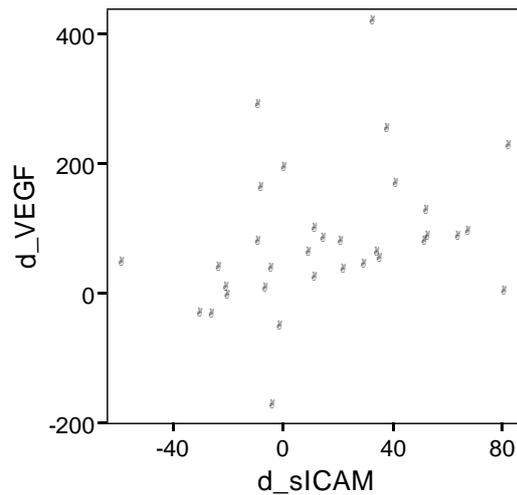


Abbildung 20 Dotplot der Differenzen zwischen Ausgangs- und Endwerten von VEGF und sICAM-1 ($r=0,445$; $p=0,009$).

Die Differenzen der übrigen Biomarker wiesen keinen statistisch signifikanten Zusammenhang auf.

3.2.4 Unterschiede zwischen HLA-B27 positiven und negativen axialen SpA Patienten unter $TNF\alpha$ -Blocker-Therapie

Beim Vergleich der Patienten anhand ihres HLA-B27-Status (HLA-B27 positiv $n=28$; HLA-B27 negativ $n=6$) fielen Unterschiede bei den CRP-Konzentration und den Konzentration von MMP-3 auf. Die CRP-Konzentration der HLA-B27 positiven verglichen mit der der HLA-B27 negativen Patienten war zu den Zeitpunkten Woche 0 (Median: 10,55 vs. 1,56 mg/l; $p=0,001$) und Woche 12 (3,1 vs. 0,72 mg/l; $p=0,015$) signifikant erhöht. Nach 36-52 Wochen $TNF\alpha$ -Blocker-Therapie bestand kein signifikanter Unterschied mehr. Die MMP-3-Konzentration der HLA-B27 positiven Patienten war zum Zeitpunkt Woche 0 signifikant höher als die der HLA-B27 negativen Patienten (Median: 18,85 vs. 9,57 ng/l; $p=0,001$). Dieser signifikante Unterschied verschwand nach Beginn der Therapie(s. Abbildung 21).

Ergebnisse

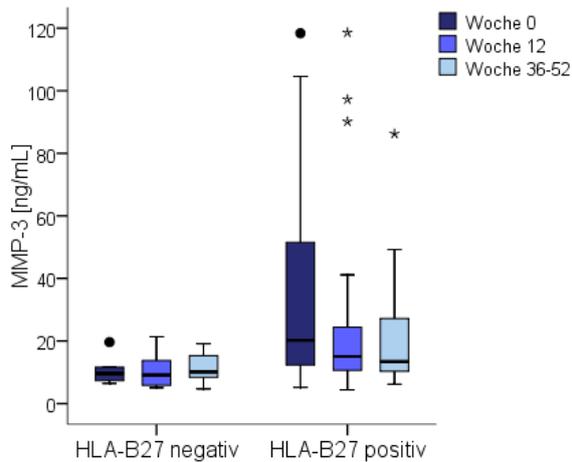


Abbildung 21 Boxplots der MMP-3-Konzentrationen der HLA-B27 positiven und negativen Patienten zu den Zeitpunkten Woche 0, 12 und 36-52. Es lag ein signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt Woche 0 vor ($p=0,020$).

3.2.5 Vergleich der Biomarkerkonzentrationen in den Untergruppen AS und nr-axSpA

Im Abschnitt 3.2.2 wurden bereits beide Untergruppen getrennt betrachtet und auf deren Biomarkerkonzentrationen im Verlauf der TNF α -Blocker-Therapie eingegangen. Im direkten Vergleich der beiden Untergruppen zeigte sich zu den einzelnen Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied in den Biomarkerkonzentrationen zwischen AS und nr-axSpA Patienten. Vergleicht man jedoch die Entwicklung der Biomarker unter TNF α -Blocker-Therapie, konnte man einen Unterschied zwischen den beiden Untergruppen bei zwei Biomarkern feststellen.

Die Differenz der BAP-Konzentrationen zwischen dem Zeitpunkt Woche 0 und Woche 36-52 war bei der Untergruppe AS signifikant größer als in der Untergruppe nr-axSpA ($p=0,044$). Das heißt, unter Anti-TNF α -Therapie ist der Anstieg der BAP-Konzentration bei den AS Patienten wesentlich höher, als bei den nr-axSpA Patienten.

Die Differenz der PYD-Konzentrationen ist ebenfalls bei den AS Patienten signifikant höher als bei den nr-axSpA Patienten ($p=0,040$). Hier kommt es zu einem stärkeren Abfall der PYD-Konzentration bei AS Patienten unter Anti-TNF α -Therapie im Vergleich zu nr-axSpA Patienten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Serumkonzentrationen von Biomarkern des Knochenaufbaus, des Knochen- und Knorpelabbaus und der Angiogenese bei Patienten mit axialer SpA untersucht. Die erste Patientenkohorte bestand aus 71 TNF α -Blocker naiven AS Patienten, die über einen Zeitraum von 2 Jahren beobachtet wurden. Es erfolgte die Bestimmung der Biomarker BAP, OC, MMP-3, PYD, COMP und VEGF. Die zweite Kohorte setzte sich aus 34 AS und nr-axSpA Patienten zusammen, welche für ein Jahr eine TNF α -Blocker-Therapie erhielten. In dieser Zeit wurden die Biomarker BAP, MMP-3, PYD, VEGF und sICAM-1 bestimmt.

4.1 VEGF als Biomarker für Krankheitsaktivität bei axialen SpA-Patienten

Insbesondere die Bestimmung des Biomarker VEGF führte zu interessanten Ergebnissen. Es zeigte sich ein starker Zusammenhang mit klinischen und laborchemischen Parametern. Bei den TNF α -Blocker naiven Patienten wies der Biomarker VEGF zu allen drei Folgezeitpunkten signifikante Korrelationen mit CRP, BSG und BASDAI auf. Drouart et al. konnten zwar ähnliche Korrelationen bei 105 SpA Patienten zeigen⁷⁶ und Visvanathan et al. beschrieben eine Korrelation mit dem CRP⁸⁰, jedoch handelte es sich hier um punktuelle Querschnittsuntersuchungen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich diese Korrelationen über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren nicht verändern. Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen somit die Annahme, dass die VEGF-Serumkonzentration ein Marker für die Krankheitsaktivität und Entzündung bei AS Patienten ist und zeigen darüber hinaus, dass dies sich über einen längeren Zeitraum stabil verhält.

Die Ergebnisse der VEGF-Serumkonzentration bei der mit Adalimumab behandelten Kohorte unterstrichen zusätzlich die Bedeutung von VEGF als Aktivitätsparameter bei axialen SpA Patienten. Insgesamt kam es unter Therapie zu einer signifikanten Abnahme der VEGF-Serumkonzentration. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit anderen Publikationen^{80, 81, 82, 83}. Folglich stellte sich die Frage, ob dies im Zusammenhang mit Veränderungen von klinischen und laborchemischen Parametern stand. In der Tat konnte gezeigt werden, dass der Rückgang von VEGF von einem Rückgang der CRP-Konzentration begleitet wurde und mit diesem signifikant korrelierte. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in anderen Arbeiten veröffentlicht^{80,82}. Unsere Daten bestätigen folglich, dass die VEGF-Serumkonzentration ein potentieller Marker

für den Rückgang der entzündlichen Aktivität unter $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie ist. Dem entsprechend könnte VEGF zur Überwachung der Entzündungsaktivität unter $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie in Zukunft eingesetzt werden. Die oben genannten Arbeiten konnten ferner eine Korrelation zwischen den Veränderungen von VEGF und BASDAI zeigen^{80,82}. Dies konnte die vorliegende Untersuchung nicht bestätigen. Jedoch zeigte sich ein Zusammenhang mit sICAM-1, einem weiteren Biomarker für Entzündung und Gefäßproliferation. Die sICAM-1-Konzentration war ebenfalls rückläufig, wie bereits von Wagner et al. beschrieben⁸³, und korrelierte signifikant mit dem Rückgang der VEGF-Konzentration. Nichts desto trotz scheint VEGF der überlegene Biomarker in diesem Zusammenhang zu sein, da keine Korrelation von sICAM-1 mit weiteren Parametern zu erkennen war.

Abgesehen vom Einsatz von VEGF als Biomarker für Diagnostik und Therapiemonitoring, lassen der starke Zusammenhang mit Entzündung und Krankheitsaktivität bei axialen SpA Patienten weiter Überlegungen zur Pathogenese und darüber hinaus zu eventuellen Therapieoptionen zu. VEGF ist ein Marker für Angiogenese und Entzündung, welches zwei voneinander abhängige Prozesse sind. Einerseits fördern proinflammatorische Zytokine die VEGF-Produktion und damit die Angiogenese⁸⁴. Andererseits sind die VEGF-Produktion und die dadurch entstehende Angiogenese essentiell für die Unterhaltung der Entzündung. Bottomley et al. zeigten, dass $\text{TNF}\alpha$ in vitro zu einer direkten VEGF-Expressionssteigerung führen kann und dessen Blockierung per Antikörper zu einer direkten Hemmung dieses Stimulus führt⁴². Somit wäre denkbar, dass die $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie die VEGF-Produktion direkt vermindert und dadurch eindämmend auf die Entzündung wirkt. Dies könnte bedeuten, dass der Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ auf VEGF ein entscheidender Schritt für den Erfolg der $\text{TNF}\alpha$ -Blocker-Therapie bei axialen SpA Patienten darstellt und somit die direkte Blockierung von VEGF mit Anti-VEGF-Antikörpern eine potentielle neue Therapieoption eröffnet. In Arbeiten zur rheumatoiden Arthritis wurde VEGF bereits als wichtiger Faktor zur Initiierung und Unterhaltung der Entzündungsprozesse diskutiert und Untersuchungen zur Anti-VEGF-Therapie begonnen. Im Tiermodell der rheumatoiden Arthritis konnte für Anti-VEGF-Antikörper ein anti-arthritischer Effekt nachgewiesen werden⁷³. Entsprechende Studien zu SpA Patienten liegen zurzeit nicht vor. Die aktuelle Ergebnislage gibt jedoch durchaus Anlass, ähnliche Versuche für die SpA anzustreben.

4.2 Katabole und anabole Knochen- und Knorpelstoffwechselfparameter unter $TNF\alpha$ -Blocker-Therapie

Der Verlauf der Serumbiomarkerkonzentrationen des Knochen- und Knorpelstoffwechsels unter Anti- $TNF\alpha$ -Therapie stellte eine Kernfrage dieser Arbeit dar. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer einheitlichen Verschiebung der Stoffwechsellage kam. Die katabolen Biomarker MMP-3 und PYD zeigten einen signifikanten Rückgang, wobei der anabole Biomarker BAP sich dazu gegenläufig entwickelte.

Der Konzentrationsabfall des Biomarkers für Knorpel- und Knochenabbau MMP-3 ging zusätzlich mit dem Rückgang der Entzündungsaktivität einher. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen den Konzentrationsänderungen von MMP-3 und CRP. Diese Ergebnisse bestätigen zahlreiche frühere Arbeiten mit Untersuchungszeiträumen von bis zu 46 Wochen bei bis zu 60 Patienten^{81,82,85,86,87}.

Erstmalig wurde in der vorliegenden Arbeit die PYD-Serumkonzentration als Biomarker für Knorpel- und Knochenabbau bei SpA Patienten unter $TNF\alpha$ -Blocker-Therapie eingesetzt. Hierbei stellten wir, wie bereits erwähnt, korrespondierend mit MMP-3 einen signifikanten Abfall nach 36-52 Wochen Adalimumab-Therapie fest. Somit konnte mit einem weiteren Biomarker der Rückgang von Knorpel- und Knochenabbau unter Anti- $TNF\alpha$ -Therapie bestätigt werden. Es bestand jedoch im Gegensatz zu MMP-3 kein Zusammenhang zur Entwicklung von andern klinischen Parametern.

Im Einzelnen resultieren daraus folgende Überlegungen zur Beteiligung und Beeinträchtigung des katabolen Knochen- und Knorpelstoffwechsels. Bekannt ist, dass $TNF\alpha$ durch RANK-abhängigen und RANK-unabhängigen Mechanismen zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten beiträgt^{45,46}. Über dies hinaus ruft $TNF\alpha$ im Knorpelgewebe einen vermehrten Abbau der Knorpelmatrix hervor⁴⁹. Diese Prozesse führen vermutlich zu einer erhöhten Aktivierung bzw. Freisetzung von MMP-3 und PYD. Es lässt sich folglich annehmen, dass unter $TNF\alpha$ -Blocker-Therapie es zu einer Abnahme der Knochen- und Knorpelresorption kommt, welches eine Abnahme der Serumkonzentrationen von MMP-3 und PYD erklärt.

Wie eingehend beschrieben, stieg der Biomarker für Knochenaufbau BAP im Gegensatz zu MMP-3 und PYD nach 36-52 Wochen Adalimumab-Therapie signifikant an. Ähnliche Beobachtungen konnten in anderen Arbeiten gemacht werden^{87,88}. Zwar konnten Centrella et al. dem Zytokin $TNF\alpha$ eine direkte hemmende Wirkung auf BAP

nachweisen⁸⁹. Jedoch, lässt der in dieser Arbeit gezeigte signifikante Zusammenhang zwischen der Zunahme der BAP- und der Abnahme der MMP-3-Serumkonzentration vermuten, dass die BAP-Serumkonzentrationsänderung nicht allein auf der Hemmung dieses spezifischen Enzyms beruht, sondern in einem größeren Kontext zu sehen ist. Es scheint unter TNF α -Blocker-Therapie zu einer Verlagerung des Stoffwechsels zu kommen, bei der die Zunahme des Knochenaufbaus eng mit dem Rückgang des Knochenabbaus verbunden ist. Abgesehen von den bereits diskutierten katabolen Prozessen, kommt es allem Anschein nach zur Beeinflussung von anabolen Mechanismen. TNF α konnte eine induzierende Wirkung auf den Wnt-Antagonisten DDK-1 nachgewiesen werden⁴⁸. Vermutlich kommt es durch die Blockierung von TNF α zu einer verminderten Expression von DDK-1 und somit zu einer geringeren Antagonisierung von Wnts. Die Proteine der Wnt-Familie tragen wesentlich zum Knochenaufbau bei. Die resultierende Aktivitätssteigerung von Wnts würde dementsprechend zur Förderung des anabolen Knochenstoffwechsels führen⁴⁷ und somit zu einem Anstieg der BAP-Serumkonzentration.

Publikationen, die eine systemische Zunahme der Knochendichte bei TNF α -Blocker behandelten Patienten zeigten⁹⁰, lassen darüber hinaus vermuten, dass sich der Einfluss auf die anabolen und katabolen Prozesse nicht nur auf das Reparaturgewebe der entzündlichen Läsionen beschränken. Vielmehr lässt sich annehmen, dass die Abnahme der katabolen und die Zunahme der anabolen Biomarker eine positive Beeinflussung des systemischen Knochenstoffwechsels insgesamt widerspiegeln.

Frühere Untersuchungen anderer Biomarker unter TNF α -Blocker-Therapie dokumentierten ebenfalls eine Verschiebung von einer katabolen zu einer anabolen Stoffwechsellage. Briot et al. zeigten zum Beispiel, dass während der Behandlung von AS Patienten mit Etanercept die Serumkonzentration der Biomarker für Knorpeldegeneration (Typ II Kollagenfragmente Helix-II und C2C) signifikant abfiel, wobei die Serumkonzentration des Biomarkers für Knorpelbildung (C-terminale Kollagen Typ II Propeptid) signifikant anstieg⁹¹.

4.3 Unterschiede zwischen Patienten mit AS und nr-axSpA unter TNF α -Blocker-Therapie

Neuerdings wird die nr-axSpA als frühes Stadium und die AS als spätes Stadium der axialen SpA definiert². Die hier untersuchte TNF α -Blocker behandelte Kohorte beinhaltete Patienten beider Stadien. Es sollte festgestellt werden, ob Unterschiede in

Diskussion

Biomarkerkonzentrationen zwischen diesen beiden Untergruppen bestanden. Interessanterweise fielen, bei der getrennten Betrachtung der beiden Untergruppen, zwei unterschiedliche Tendenzen im Verlauf der TNF α -Blocker Therapie auf. Auf der einen Seite zeigte sich nur bei den Patienten mit einer manifesten AS eindeutig, die im vorhergehenden Absatz erwähnte Verschiebung von katabolen zu anabolen Biomarkern des Knochen- und Knorpelstoffwechsels. Bei der Untergruppe der nr-axSpA, ließ sich diese Beobachtung nicht machen. Auf der anderen Seite verhielten sich die Parameter für Entzündung und Angiogenese CRP und VEGF in beiden Untergruppen einheitlich.

Die BAP-Serumkonzentration zeigte in der Untergruppe der AS Patienten einen signifikanten Anstieg. Bei den Patienten mit nr-axSpA konnten wir hingegen keine offensichtliche Bewegung ausmachen. Statistisch unterschieden sich die Änderungen der BAP-Serumkonzentration nach 36-52 Wochen signifikant zwischen den beiden Untergruppen. Bei den beiden Biomarkern für Knochen- und Knorpelabbau PYD und MMP-3 zeigte sich korrespondierend dazu nur für die Untergruppe der manifesten AS und nicht bei den Patienten mit nr-axSpA ein signifikanter Abfall. Die Konzentrationsänderung des Biomarkers PYD nach 36-52 Wochen Therapie zeigte zusätzlich einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Untergruppen. Auf der anderen Seite sprachen der Entzündungsparameter CRP und der Biomarker VEGF bei beiden Untergruppen ähnlich gut auf die TNF α -Blocker-Therapie an. Folglich bestand im Hinblick auf die Entzündung und deren Ansprechen auf die Therapie kein hier feststellbarer Unterschied. Aufgrund der begrenzten Anzahl an Patienten in den Untergruppen, erscheint es sinnvoll die Untersuchung mit einer größeren Gruppengröße zu wiederholen, um diese Ergebnisse eindeutig zu bestätigen.

Es ist bekannt, dass es bei Patienten mit fortschreitender Krankheit zu einem zunehmenden systemischen Verlust der Knochendichte kommt¹⁴. Es kann folglich angenommen werden, dass Patienten im frühen Stadium der axialen SpA (nr-axSpA) unter einer weniger starken Beeinträchtigung des Knochen- und Knorpelstoffwechsels leiden, als Patienten im späteren Stadium (AS). Interpretiert man unsere Beobachtungen der Biomarkerkonzentrationen vor diesem Hintergrund, so lässt sich vermuten, dass entzündliche Prozesse eine wesentliche Rolle sowohl im frühen, als auch im späten Stadium der axialen SpA spielen. Die Veränderungen des Knochen- und Knorpelstoffwechsels scheinen jedoch vorwiegend im späteren Stadium (AS) von Bedeutung zu sein. Diese Überlegung unterstreicht die Relevanz der frühzeitigen

Therapie der Entzündung vor Eintreten von Knochen- und Knorpelveränderungen, wie sie bereits von anderen Autoren diskutiert wurde⁹². Maksymowych mutmaßte darüber hinaus, dass eventuell nur in diesem frühen Stadium, langfristig mit einem Therapieerfolg gerechnet werden kann. Seiner Vermutung nach könne die TNF α -Blocker-Therapie der pathologischen lokalen Knochenneubildung keinen Einhalt mehr gebieten, wenn einmal die durch die exzessive Entzündung eingeleitete Kaskade in Gang gesetzt wurde⁹³. Somit könnte eventuell die Konstellation der Biomarker des Knochen- und Knorpelstoffwechsels und der Entzündung Aufschluss über das Fortschreiten der pathologischen Prozesse und über einen langfristigen Therapieerfolg geben.

4.4 Vergleich zwischen Respondern und Non-Respondern der TNF α -Blocker-Therapie

Im Anschluss wurde die klinisch relevante Frage gestellt, ob ein Unterschied zwischen den Patienten bestand, die einen Therapieerfolg aufwiesen und denjenigen, die diesen verfehlten. Tatsächlich zeigten die Responder und Non-Responder einen auffallenden Unterschied der MMP-3-Ausgangskonzentration. Retrospektiv lag die MMP-3-Serumkonzentration der Non-Responder zum Ausgangszeitpunkt deutlich niedriger als die der Responder. Pedersen et al. konnten eine ähnliches Phänomen beobachten⁸¹, wobei Romero-Sánchez et al. in ihrer Arbeit keinen derartigen Unterschied feststellen konnten⁹⁴. Folglich könnte MMP-3 eventuell als prädiktiver Marker des Therapieerfolges vor Therapiebeginn eingesetzt werden. Somit könnte die Bestimmung der MMP-3-Serumkonzentration vor Therapiebeginn eventuell helfen, Risiko und Nutzen der Therapie für den einzelnen Patienten besser abschätzen zu können. Weitere Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen zu dieser Fragestellung wären wünschenswert.

4.5 Einfluss von HLA-B27 auf Knochen- und Knorpelstoffwechsel und Entzündungsaktivität

Bekanntlich besteht eine starke Assoziation zwischen der Prävalenz von HLA-B27 und SpA^{5,11}. Aus diesem Grund stellten wir uns die Frage, ob der HLA-B27-Status einen Einfluss auf die untersuchten Parameter und Biomarker aufwies. Es zeigte sich, dass sowohl in der Kohorte der TNF α -Blocker naiven als auch in der Kohorte der therapierten Patienten signifikante Unterschiede zwischen HLA-B27-postiven und negativen vorlagen.

In der TNF α -Blocker behandelten Kohorte zeigten HLA-B27-positive Patienten eine signifikant höhere CRP-Konzentration vor Therapiebeginn. Analog zu diesen Beobachtungen stellten Marzo-Ortega et al. bei Patienten mit entzündlichem Rückenschmerz einen Zusammenhang zwischen positivem HLA-B27-Status und schwerer, persistierender Entzündung im MRT fest⁹⁵. Es bestehen somit sowohl laborchemische als auch radiologische Hinweise, dass der positive HLA-B27-Status mit einer verstärkten Entzündungsreaktion vergesellschaftet ist.

Im Hinblick auf die Biomarker zeigten die HLA-B27-positiven Patienten der unbehandelten Kohorte signifikant höhere Serumkonzentrationen der Biomarker PYD und BAP im Vergleich zu HLA-B27-negativen Patienten. In der TNF α -Blocker behandelten Kohorte konnten ebenfalls vor Therapiebeginn bei HLA-B27-positiven Patienten signifikant höhere MMP-3-Serumkonzentration beobachtet werden. Unter Adalimumab-Therapie fiel diese stark ab, wohingegen bei den HLA-B27-negativen Patienten ein leichter Anstieg zu verzeichnen war. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der HLA-B27-Status einen Einfluss auf den Knochen- und Knorpelabbau bei SpA Patienten besitzt.

4.6 TNF α -Blocker naive Patienten

Wenden wir uns nun den TNF α -Blocker naiven Patienten ausführlicher zu. Die erste interessante Frage war, ob sich die Serumkonzentrationen der Biomarker bei dieser Patientenkohorte über den Zeitraum von 2 Jahren veränderten. Es wurde festgestellt, dass OC als einziger Biomarker eine signifikante Abnahme seiner Serumkonzentration im Untersuchungszeitraum zeigte. Dies ist die erste Beschreibung einer longitudinalen Entwicklung der OC-Serumkonzentration bei TNF α -Blocker naiven AS Patienten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass bei der untersuchten Kohorte der anabole Knochenstoffwechsel im Verlauf nachlässt. Wie bereits erwähnt, ist bekannt, dass Patienten im Laufe der Krankheit zu einem systemischen Knochendichteverlust neigen¹⁴. Allerdings korrelierte die OC-Serumkonzentration nicht mit der Krankheitsdauer.

Alle weiteren untersuchten Biomarker blieben in ihrer Serumkonzentration verglichen mit der Ausgangskonzentration unverändert. Für MMP-3 und VEGF liegen bereits ähnliche Daten zu kürzeren Zeiträumen von 16 bzw. 24 Wochen vor. Es ergaben sich in diesen Zeiträumen übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Konzentrationsänderungen^{80,96}.

Diskussion

Die zweite wesentliche Frage in Bezug auf die TNF α -Blocker naiven AS Patienten war, ob Korrelationen der Biomarker zu klinischen und laborchemischen Parametern bestanden. Eingehend wurde bereits die Bedeutung des Biomarkers für Angiogenese und Entzündung VEGF in diesem Zusammenhang diskutiert. Im Folgenden wird auf die Biomarker des Knochen- und Knorpelstoffwechsels eingegangen. Der Biomarker für Knochenaufbau OC zeigte eine negative Korrelation mit dem BASDAI zu zwei der drei Zeitpunkte. In anderen Arbeiten konnte kein Zusammenhang zwischen der OC-Serumkonzentration und dem BASDAI oder anderen klinischen Parametern beobachtet werden^{59,97}. Mitra et al. zeigten eine Korrelation zwischen OC- und CRP-Konzentration, die wir hier nicht bestätigen konnten⁵⁶. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit lässt vermuten, dass sich OC als Marker für die Krankheitsaktivität einsetzen lässt. Eine niedrige OC-Konzentration spräche hiernach für eine höhere Krankheitsaktivität. Jedoch müsste dies von weiteren Studien mit großen Patientenzahlen bestätigt werden. Pathophysiologisch spiegelt das umgekehrte Verhältnis zwischen der OC-Serumkonzentration und dem Krankheitsaktivitätsindex vermutlich einen verminderten Knochenaufbau bei aktiver Entzündung wider, was zu dem bekannten systemischen Knochendichteverlusts bei AS Patienten beiträgt¹⁴.

Außerdem konnte eine positive Korrelation der Serumkonzentration des Knochen- und Knorpelabbaumarkers PYD mit der CRP-Konzentration zu zwei der drei Zeitpunkte festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass es zusätzlich zum verminderten Knochenaufbau zu einem vermehrten Knochen- und Knorpelabbau bei erhöhter entzündlicher Aktivität kommt. Zurzeit liegen keine weiteren Arbeiten zum Verhältnis der Serumkonzentration von PYD zu anderen Parametern bei AS Patienten vor. Bisher wurde lediglich mit der Urinkonzentration von PYD gearbeitet, was zu unterschiedlichen Ergebnissen führte. Yilmaz et al. konnten keine Korrelation mit der CRP-Konzentration oder anderen klinischen Parametern erkennen⁹⁸. Andere Arbeiten hingegen stellten eine signifikant positive Korrelation der PYD-Urinkonzentration mit CRP bei AS Patienten fest^{56,99}. Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit bringt PYD als möglichen neuen Serumbiomarker für Entzündungsaktivität bei AS Patienten ins Spiel. Im Gegensatz zur Bestimmung dessen Konzentration im Urin ist sie unabhängig von Kreatinin und erfordert abgesehen von der meist routinemäßigen Serumuntersuchung keine zusätzliche Probengewinnung.

Der Knochenaufbaumarker BAP zeigte hingegen in der vorliegenden Arbeit keine klaren Korrelationen mit den klinischen Parametern. Dies bestätigt die Ergebnisse der

Diskussion

überwiegenden Anzahl früherer Publikationen^{56,59,97}. Des Weiteren konnten die in anderen Arbeiten berichteten signifikanten Korrelationen der MMP-3-Serumkonzentration mit CRP-Konzentration^{86,87,96}, BSG und BASDAI^{66,67} durch die vorliegende Arbeit nicht nachvollzogen werden.

5 Zusammenfassung

Serumbiomarker finden zunehmend Verwendung, um Krankheitsaktivität, Pathophysiologie und Prognose unterschiedlicher Arthritisformen inklusive der SpA besser zu verstehen. Wesentliche Prozesse des Krankheitsbilds der SpA sind Entzündung, Knochen- und Knorpeluntergang und Knochenneubildung. Mit der Einführung der TNF α -Blocker wurde die Therapie der SpA revolutioniert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei axialen SpA-Patienten mit Hilfe von Biomarkern Entzündung, Knochen- und Knorpeluntergang und Knochenneubildung und die Beeinflussung dieser Prozesse durch die TNF α -Blocker-Therapie zu untersuchen.

Dazu erfolgte die Untersuchung von einer TNF α -Blocker naiven und einer TNF α -Blocker therapierten Kohorte axialer SpA Patienten. Die Kohorte der TNF α -Blocker naiven Patienten wurde zum Ausgangszeitpunkt, nach einem Jahr und nach 2 Jahren klinisch untersucht und es erfolgte eine Blutentnahme. Es wurden der BASDAI, CRP, BSG und die Konzentration der Biomarker BAP (n=71), OC (n=33), MMP-3 (n=71), PYD (n=51), und VEGF (n=50) bestimmt. Die zweite Kohorte setzte sich aus 34 axialen SpA Patienten (22 AS und 12 nr-axSpA) zusammen. Die Patienten dieser Kohorte erhielten alle zwei Wochen 40mg Adalimumab subkutan. Zum Ausgangszeitpunkt, nach 12 und 36-52 Wochen wurden der BASDAI, CRP und die Konzentration der Biomarker BAP, MMP-3, PYD, VEGF und sICAM-1 bestimmt.

Bei den TNF α -Blocker naiven Patienten konnte lediglich eine signifikante Abnahme der OC-Serumkonzentration nach einem Jahr beobachtet werden (p=0,007). Die weiteren Biomarker wiesen keine Veränderung im Untersuchungszeitraum auf. VEGF zeigte zu allen Zeitpunkten Korrelationen mit BASDAI, CRP und BSG. Die TNF α -Blocker behandelten Patienten zeigten eine signifikante Abnahme von MMP-3 (p=0,004), PYD (p=0,014), VEGF (p<0,001) und sICAM-1 (p=0,046) und eine signifikante Zunahme der BAP-Serumkonzentrationen (p<0,001). Die Abnahme von MMP-3 und VEGF korrelierten mit der Abnahme von CRP (MMP-3: r=0,454 p=0,009 und VEGF: r=0,498 p=0,004). Die Konzentrationsänderungen der Biomarker MMP-3 und BAP korrelierten negativ (r=-0,398 p=0,020) und die VEGF und sICAM-1 positiv (r=0,445 p=0,009) miteinander. Bei der getrennten Betrachtung der beiden Untergruppen AS und nr-axSpA zeigte sich unter TNF α -Blocker Therapie unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die Biomarker des Knochen- und Knorpelstoffwechsels, jedoch nicht bei den

Zusammenfassung

Parametern für Entzündung und Angiogenese. Non-Responder der TNF α -Blocker-Therapie wiesen zum Ausgangszeitpunkt signifikant niedrigere MMP-3-Serumkonzentration auf ($p=0,004$).

Es lässt sich somit zusammenfassen, dass es unter TNF α -Blocker-Therapie zu einem deutlichen Rückgang der Biomarker für Entzündung kam, sowohl bei Patienten mit einer AS als auch bei Patienten mit einer nr-axSpA. Darüber hinaus konnte eine Verlagerung des Knochen- und Knorpelstoffwechsels von katabolen zu anabolen Prozessen dokumentiert werden, welcher überwiegend von den Patienten mit einer manifesten AS getragen wurde. Bei den Patienten mit nr-axSpA war diese Verschiebung nicht eindeutig nachzuvollziehen, was eventuell auf einen noch weitgehend intakten Knochen- und Knorpelstoffwechsel vor Therapiebeginn zurück zu führen ist. Die Korrelation zwischen dem Rückgang des Abbauparameters MMP-3 und der Zunahme des Knochenaufbauparameters BAP unter TNF α -Blocker-Therapie deutet die Prozesse des Knochen- und Knorpelabbaus sowie des Knochenaufbaus eng miteinander verbunden sind. VEGF und MMP-3 scheinen viel versprechend als Biomarker für den Entzündungsrückgang unter TNF α -Blocker-Therapie zu sein. Zusätzlich könnte MMP-3 möglicherweise als prädiktiver Marker des Therapieerfolges vor Therapiebeginn dienen. Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in einem Manuskript in „Arthritis Research and Therapy“ publiziert¹⁰⁰.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007;369:1379-1390.
- ² Rudwaleit M, Landewé R, van der Heijde D, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Ann Rheum Dis* 2009;68:770-776.
- ³ Rudwaleit M, Landewé R, van der Heijde D, et al. The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Ann Rheum Dis* 2009;68:777-783.
- ⁴ Rudwaleit M, Braun J, Sieper J. ASAS-Klassifikationskriterien für axiale Spondyloarthritis. *Z Rheumatol* 2009;68:591-593.
- ⁵ Brewerton DA, Hart FD, Nicjolls A, et al. Ankylosing spondylitis and HL-A 27. *The Lancet* 1973;301:904-907.
- ⁶ Rubin LA, Amos CI, Wade JA, et al. Investigating the genetic basis for ankylosing spondylitis. Linkage studies with the major histocompatibility complex region. *Arthritis Rheum* 1994;37:1212-20.
- ⁷ Andrianakos A, Trontzas P, Christoyannis F, et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Greece: A Cross-Sectional Population Based Epidemiological Study. The ESORDIG Study. *J Rheumatol* 2003;30:1589-1601.
- ⁸ Gran JT, Husby G, Hordvik M. Prevalence of ankylosing spondylitis in males and females in a young middle-aged population of Tromsø, northern Norway. *Ann Rheum Dis* 1985;44:359-367.
- ⁹ Saraux A, Guillemin F, Guggenbuhl P, et al. Prevalence of spondyloarthropathies in France: 2001. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1431-1435.
- ¹⁰ Bruges-Armas J, Lima C, Peixto MJ, et al. Prevalence of spondylarthritis in Terceira, Acores: a population based study. *Ann Rheum Dis* 2002;61:551-553.
- ¹¹ Feldtkeller E, Khan MA, van der Heijde D, et al. Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis. *Rheumatol Int* 2003;23:61-66.
- ¹² Rudwaleit M, Sieper J. Diagnostik und Therapie der ankylosierenden Spondylitis (Morbus Bechterew). *Dtsch Med Wochenschr* 2005;130:1882-1886.

- ¹³ Vosse D, van der Heijde D, Landwé R, et al. Determinants of hyperkyphosis in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:770-774.
- ¹⁴ Lee YSL, Schlotzhauer T, Ott SM, et al: Skeletal Status of men with early and late ankylosing spondylitis. *Am J Med* 1997;103:233-241.
- ¹⁵ Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, et al. Immunohistochemical analysis of hip arthritis in ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum* 2006;54:1805-1813.
- ¹⁶ Appel H, Kuhne M, Spiekermann S, et al. Immunohistologic analysis of Zygapophseal Joints in patients with ankylosing sponylitis. *Arthritis and Rheum* 2006;54:2845-2851.
- ¹⁷ François RJ, Gardner DL, Degrave EJ, Bywaters EGL. Histopathologic evidence that sacroiliitis in ankylosing spondylitis is not merely enthesitis. *Arthritis and Rheum* 2000;43:2011-2024.
- ¹⁸ Cruickshank B. Histopathology of diarthrodial joints in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1951;10:393-404.
- ¹⁹ Wie JCC, Tsai WC, Lin HS, Tsai CY, Chou CT. HLA-60 and B61 are strongly associated with ankylosing spondylitis in HLA-B27-negative Taiwan Chinese patients. *Rheumatology* 2004;43:839-842.
- ²⁰ Brown MA, Kennedy LG, Darke C, et al. The effect of HLA-DR gens on susceptibility to and severity of ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum* 1998;41:460-465.
- ²¹ Brionez TF, Reveille JD. The contribution of genes outside the major histocompatibility complex to susceptibility to ankylosing spondylitis. *Curr Opin Rheumatol* 2008;20:384-391.
- ²² Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 und ankylosing spondylitis. *Immunol Today* 1990;11:137-142.
- ²³ Braun J, Bollow M, Remlinger G, et al. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis and Rheum* 1998;41:58-67.
- ²⁴ Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum* 1984;27:361-368.
- ²⁵ Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisord P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286-2291.
- ²⁶ Spoorenberg A, van der Heijde D, de Klerk E, et al. Relative value of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in assessment of disease activity in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1999;26:980-984.

- ²⁷ Calabro JJ. Efficacy of diclofenac in ankylosing spondylitis. *Am J Med* 1986;80:58-63.
- ²⁸ Braun J, Baraliakos X, Listing J, et al. Persistent clinical efficacy and safety of anti-tumor necrosis factor α therapy with infliximab in patients with ankylosing spondylitis over 5 years: evidence for different types of response. *Ann Rheum Dis* 2008;67:340-345.
- ²⁹ Baraliakos X, Brandt J, Listing J, et al. Outcome of Patients with active ankylosing spondylitis after two years of therapy with etanercept: clinical and magnetic resonance imaging data. *Arthritis and Rheum* 2005;53:856-863.
- ³⁰ Van der Heijde D, Landewé R, Einstein S, et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis Rheum* 2008;58:1324-1331.
- ³¹ Baraliakos X, Listing J, Brandt J, et al. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 4 yrs of treatment with the anti-TNF- α antibody infliximab. *Rheumatology* 2007;46:1450-1453.
- ³² McLeod C, Bagust A, Boland A, et al. Adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of ankylosing spondylitis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2007;11:1-158.
- ³³ Inman RD, Davis JC Jr, Heijde D, et al. Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Arthritis Rheum* 2008;58:3402-3412.
- ³⁴ Braun J, Bollow M, Neure L, et al. Use of immunohistologic and in situ hybridization techniques in the examination of sacroiliac joint biopsy specimens from patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum* 1995;38:499-505.
- ³⁵ François RJ; Neure L, Sieper J, Braun J. Immunohistological examination of open sacroiliac biopsies of patients with ankylosing spondylitis: detection of tumor necrosis factor α in two patients with early disease and transforming growth factor β in three more advanced cases. *Ann Rheum Dis* 2006;65:713-720.
- ³⁶ Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, et al. A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- α from cells. *Nature* 1997;385:729-733
- ³⁷ Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages. *J Immunol* 1998;160:3513-3521.

-
- ³⁸ Corcione A, Ottonello L, Tottolina G, et al. Recombinant Tumor necrosis factor enhances the locomotion of memory and naive B lymphocytes from human tonsils through the selective engagement of the type II Receptor. *Blood* 1997;90:4493-4501.
- ³⁹ Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP, Weinmann R, Perussia B, Trinchieri G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *L Exp Med* 1987;165:1581-1594.
- ⁴⁰ Munro JM, Pober JS, Cotran RS. Tumor necrosis factor and interferon- γ induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol* 1989;135:121-133.
- ⁴¹ Ohba T, Haro H, Ando T, et al. TNF- α -induced NF- κ B signaling Reverses age-related declines in VEGF induction and angiogenetic activity in intervertebral disc tissues. *J Orthop Res* 2009;27:229-235.
- ⁴² Bottomley MJ, Webb NJA, Watson CJ, Holt PHL, Freemont AJ, Brenchley PEC. Peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis spontaneously secrete vascular endothelial growth factor (VEGF): specific up-regulation by tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in synovial fluid. *Exp Immunol* 1999;117:171-176.
- ⁴³ B Clarke. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:131–139.
- ⁴⁴ Jimi E, Ghosh S. Role of nuclear factor- κ B in the immune system and bone. *Immunol Rev* 2005;208:80-87.
- ⁴⁵ Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *Biol Chem* 2001;276:20659-72.
- ⁴⁶ Boyce BF, Li P, Yao Z, et al. TNF α and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005;54:127-131.
- ⁴⁷ Krishan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006;116:1202-1209.
- ⁴⁸ Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodelling. *Nat Med* 2007; 13:156-163.
- ⁴⁹ Saklatala J. Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986;322:547-549.

-
- ⁵⁰ Aizawa T, Kon T, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Induction of apoptosis in chondrocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Orthop Res* 2001;19:785-796.
- ⁵¹ Aubin J. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2:81-94.
- ⁵² Bord S, Horner A, Hembry RM, Reynolds JJ, Compston JE. Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat* 1997;191:39-48.
- ⁵³ Clarke B. Normal bone anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:131-139.
- ⁵⁴ Yilmaz N, Özasian J. Biochemical bone turnover markers in patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2000;19:92-98.
- ⁵⁵ Speden DJ, Callin AI, Ring FJ, Bhalla AK. Bone mineral density, calcaneal ultrasound, and bone turnover markers in women with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2002;29:516-521.
- ⁵⁶ Mitra D, Elvins DM, Collins AJ. Biochemical markers of bone metabolism in mild ankylosing spondylitis and their relationship with bone mineral density and vertebral fractures. *J Rheumatol* 1999;26:2201-2204.
- ⁵⁷ Lian JB, Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ. Osteocalcin gene promoter unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem* 1998;30/31:62-72.
- ⁵⁸ Delmas PD, Malaval L, Arlot ME, Meunier PJ. Serum bone Gla-protein compared to bone histomorphometry in endocrine diseases. *Bone* 1985;6:339-341.
- ⁵⁹ Borman P, Bodur H, Bingöl N, Bingöl S, Bostan EE. Bone mineral density and bone turnover markers in a group of male ankylosing spondylitis patients: relationship to disease activity. *J Clin Rheumatol* 2001;7:315-321.
- ⁶⁰ Toussirot E, Ricard-Blum S, Dumoulin G, Cedoz JP, Wendling D. Relationship between urinary pyridinium cross-links, disease activity and disease subset of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 1999;38:21-27.
- ⁶¹ Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
- ⁶² Bonsassar LJ, Frank EH, Murray JC, et al. Changes in cartilage composition and physical properties due to stromelysin degradation. *Arthritis and Rheum* 1995;38:173-183.

- ⁶³ Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, et al. Matrix metalloproteinase in arthritic disease. *Arthritis Rev* 2002;4:39-49.S
- ⁶⁴ Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP. Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991;266:23477-23482.
- ⁶⁵ van Meurs J, van Lent P, Holthuysen A, et al. Active matrix metalloproteinases are present in cartilage during immune complex-mediated arthritis: a pivotal role for Stromolysin-1 in cartilage destruction. *J Immunol* 1999;163:5633-5639.
- ⁶⁶ Yang C, Gu J, Rihl M, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase 3 and macrophage colony-stimulating factor 1 correlate with disease activity in ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheum* 2004;51:691-699.
- ⁶⁷ Chen CH, Lin KC, Yu DTY, et al. Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity. *Rheumatology* 2006;45:414-420.
- ⁶⁸ Fujimoto D, Moriguchi T. Pyridinoline, a non-reducible crosslink of collagen. Quantitative determination, distribution, and isolation of a crosslinked peptide. *J Biochem* 1978;83:863-867.
- ⁶⁹ Hein G, Franke S, Muller A, Bräunig E, Eidner T, Stein G. The determination of pyridinium crosslinks in urine and serum as a possible marker of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 1997;16:167-172.
- ⁷⁰ Golmia RP, Sousa BDB, Scheinberg MA. Increased osteoprotegerin and decreased pyridinoline levels in patients with ankylosing spondylitis: comment on the article by Gratacos et al. *Arthritis Rheum* 2002;46:3390-3391.
- ⁷¹ Senger DR, Gallo SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
- ⁷² Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases hydraulic conductivity of isolated perfused microvessels. *Am J Physiol* 1996;271:H2520-H2528.
- ⁷³ Yoo SA, Bae DG, Ryoo JW, et al. Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor (Anti-VEGF) hexapeptide inhibits collagen-induced arthritis and VEGF-stimulated productions of TNF- α and IL-6 by human monocytes. *J Immunol* 2005;174:5846-5855.
- ⁷⁴ Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Med* 1999;5:623-628.

- ⁷⁵ Goldberger C, Duftner C, Weidinger F, Falkenbach A, Schirmer M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in ankylosing spondylitis – a pilot study. *Wien Med Wschr* 2002;152:223-225.
- ⁷⁶ Drouart M, Saas P, Billot M, et al. High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies. *Clin Exp Immunol* 2003;132:158-162.
- ⁷⁷ Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur.Cytokine Netw* 2004;15:91-98.
- ⁷⁸ Gho YS, Kleinman HK, Sosne G. Angiogenic activity of human soluble intercellular adhesion molecule-1. *Cancer Res* 1999;59:5128-5132.
- ⁷⁹ Wendling D, Racadot E, Augé B, Toussirot E. Soluble intercellular adhesion molecule 1 in spondylarthropathies. *Clin Rheumatol* 1998;17:202-204.
- ⁸⁰ Visvanathan S, Wagner C, Marini JC, et al. Inflammatory biomarkers, disease activity and spinal disease measures in patients with ankylosing spondylitis after treatment with infliximab. *Ann Rheum Dis* 2008;67:511-517.
- ⁸¹ Pedersen SJ, Hetland ML, Sorensen IJ, Ostergaard M, Nielsen HJ, Johansen JS. Circulating levels of interleukin-6, vascular endothelial growth factor, YKL-40, matrix metalloproteinase-3, and total aggrecan in spondyloarthritis patients during 3 years of treatment with TNF α inhibitors. *Clin Rheumatol* 2010;29:1301-1309.
- ⁸² Pedersen SJ, Sorensen IJ, Garnero P, et al. ASDAS, BASDAI and different treatment responses and their relationship to biomarkers of inflammation cartilage and bone turnover in patients with axial spondyloarthritis treated with TNF α inhibitors. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1375-1381.
- ⁸³ Wagner C, Visvanathan S, Braun J, et al. Serum markers associated with clinical improvement in patients with ankylosing spondylitis treated with golimumab. *Ann Rheum Dis* 2012;71:674-680.
- ⁸⁴ Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 2003;9:669-676.
- ⁸⁵ Vandooren B, Kruithof E, Yu DTY, et al. Involvement of matrix metalloproteinases and their inhibitors in peripheral synovitis and down-regulation by tumor necrosis factor α blockade in spondylarthropathy. *Arthritis and Rheum* 2004;50:2942-2953.

- ⁸⁶ Maksymowych WP, Rahman P, Shojania K, et al. Beneficial effects of adalimumab on biomarkers reflecting structural damage in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2008;35:2030-2037.
- ⁸⁷ Woo JH, Lee HJ, Sung ICH, Kim TH. Changes of clinical response and bone biochemical markers in Patients with ankylosing spondylitis taking etanercept. *J Rheumatol* 2007;34:1753-1759.
- ⁸⁸ Arends S, Spoorenberg A, Houtman PM, et al. The effect of three years of TNF alpha blocking therapy on markers of bone turnover and their predictive value for treatment discontinuation in patients with ankylosing spondylitis: a prospective longitudinal observational cohort study. *Arthritis Res Ther* 2012; 14:R98.
- ⁸⁹ Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity independently of its effect on deoxyribonucleic acid synthesis in osteoblast-enriched bone cell cultures. *Endocrinology* 1988;123:1442-1448.
- ⁹⁰ Allali F, Breban M, Porcher R, Maillefert JF, Dougados M, Roux C. Increase in bone mineral density of patients with spondyloarthropathy treated with anti-tumor necrosis factor α . *Ann Rheum Dis* 2003;62:347-349.
- ⁹¹ Briot K, Roux C, Grosse L, et al. Effects of etanercept on serum biochemical markers of cartilage metabolism in patients with spondyloarthropathy. *J Rheumatol* 2008;35:310-314.
- ⁹² Rudwaleit M, Listing J, Brandt J, Sieper J. Prediction of a major clinical response (BASDAI50) to tumor necrosis factor alpha blockers in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:655-670.
- ⁹³ Maksymowych WP. What do biomarker tell us about the pathogenesis of ankylosing spondylitis? *Arthritis Res Ther* 2009;11:101.
- ⁹⁴ Romero-Sánchez C, Robinson WH, Tomooka BH, et al. Identification of acute phase reactants and cytokines useful for monitoring infliximab therapy in ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2008;27:1429-1435.
- ⁹⁵ Marzo-Ortega H, McGonagle D, O'Conner P, et al. Baseline and 1-year magnetic resonance imaging of the sacroiliac joint and lumbar spine in very early inflammatory back pain. Relationship between symptoms, HLA-B27 and disease extent and persistence. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1721-1727.

- ⁹⁶ Maksymowych WP, Poole AR, Hiebert L, et al. Etanercept exerts beneficial effects on articular cartilage biomarkers of degradation and turnover in patients with ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 2005;32:1911-1917.
- ⁹⁷ Park MC, Chung SJ, Park YB, Lee SK. Bone and cartilage turnover markers, bone mineral density and radiographic damage in men with ankylosing spondylitis. *Yonsei Med J* 2008;49:288-294.
- ⁹⁸ Yilmaz N, Özaslan J. Biochemical bone turnover markers in Patients with ankylosing spondylitis. *Clin Rheumatol* 2000;19:92-98.
- ⁹⁹ Müller A, Bölzner C, Smolenski UC, Hein GE. Factors modifying collagen catabolism in patients with ankylosing spondylitis. *Eur J Med Res* 2007;12:568-572.
- ¹⁰⁰ Appel H, Janssen L, Listing J, Heydrich R, Rudwaleit M, Sieper J. Serum levels of biomarkers of bone and cartilage destruction and new bone formation in different cohorts of patients with axial spondyloarthritis with and without tumor necrosis factor-alpha blocker treatment. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R125.

Lebenslauf

Lebenslauf

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

Publiaktionsliste

Appel H, Janssen L, Listing J, Heydrich R, Rudwaleit M, Sieper J. Serum levels of biomarkers of bone and cartilage destruction and new bone formation in different cohorts of patients with axial spondyloarthritis with and without tumor necrosis factor-alpha blocker treatment. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R125.

Eigenständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Louise Janßen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung von Biomarkern des Knochen- und Knorpelstoffwechsels und der Angiogenese bei Patienten mit Spondyloarthritiden“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Heiner Appel, für seine Motivation, Ermutigungen und Geduld.

Für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Laborarbeit und für die freundliche Aufnahme danke ich den Mitarbeitern des Labors der Rheumatologie – Charité Benjamin Franklin. Insbesondere möchte ich meinen Dank den Medizinisch-technischen-Assistentinnen und -Assistenten und René Maier, Rebecca Noster und Peihua Wu aussprechen.

Ich bedanke mich bei dem Team der Arbeitsgruppe der Rheumatologie – Charité Benjamin Franklin für ihre Hilfe und die Überlassung der Studienrohdaten und Serumproben. Mein besonderer Dank geht hier an Prof. Dr. Martin Rudwaleit, Dr. Hiltrun Haibel, Lothar Goldschmidt und Beate Buß. Für die Unterstützung bei statistischen Fragen danke ich Joachim Listing. Meine Dankbarkeit gilt des Weiteren den Patienten, die sich bereit erklärt haben an der Untersuchung teilzunehmen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und ihren Zuspruch.