

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Neue Normwerte von ACE, sIL-2R, Lysozym und IL-8 in der  
Sarkoidose-Diagnostik**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christian Sieber  
aus Aschaffenburg**

**Würzburg, April 2005**

**Referent: Prof. Dr. M. Schmidt**

**Koreferent: Prof. Dr. G. Ertl**

**Dekan: Prof. Dr. G. Ertl**

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2005**

Der Promovend ist Zahnarzt

## **0. Inhaltsverzeichnis:**

<b>1. Einleitung</b>	Seite 1
<b>1.1 Erläuterung der untersuchten Krankheiten</b>	Seite 1
<b>1.1.1 Sarkoidose</b>	Seite 2
1.1.1.1 Definition	Seite 2
1.1.1.2 Epidemiologie	Seite 2
1.1.1.3 Ätiologie	Seite 3
1.1.1.4 Pathogenese	Seite 4
1.1.1.5 Klinik und Diagnose	Seite 4
1.1.1.6 Therapie und Prognose	Seite 6
<b>1.1.2 Idiopathische Lungenfibrose</b>	Seite 6
1.1.2.1 Definition	Seite 6
1.1.2.2 Epidemiologie	Seite 7
1.1.2.3 Pathogenese und Histologie	Seite 7
1.1.2.4 Klinik und Diagnose	Seite 8
1.1.2.5 Therapie und Prognose	Seite 8
<b>1.2 Erläuterung der verwendeten Serummarker</b>	Seite 9
<b>1.2.1 ACE</b>	Seite 9
1.2.1.1 Allgemeines	Seite 9
1.2.1.2 Struktur und Synthese	Seite 10

1.2.1.3 Funktion und klinische Bedeutung	Seite 11
<b>1.2.2 sIL-2R – Rezeptor</b>	Seite 12
1.2.2.1 Allgemeines	Seite 12
1.2.2.2 Struktur, Synthese	Seite 12
1.2.2.3 Funktion und klinische Bedeutung	Seite 13
<b>1.2.3 IL-8</b>	Seite 14
1.2.3.1 Allgemeines	Seite 14
1.2.3.2 Struktur und Synthese	Seite 14
1.2.3.3 Rezeptoren	Seite 15
1.2.3.4 Funktion und klinische Bedeutung	Seite 15
<b>1.2.4 Lysozym</b>	Seite 16
1.2.4.1 Allgemeines	Seite 16
1.2.4.2 Struktur und Synthese	Seite 17
1.2.4.3 Funktion und klinische Bedeutung	Seite 17
<b>2. Fragestellung</b>	Seite 19
<b>3. Methoden</b>	Seite 20
<b>3.1 Einteilung der Diagnosegruppen</b>	Seite 20
<b>3.1.1 Sarkoidose</b>	Seite 20

<b>3.1.2 Fibrosierende interstitielle Lungenkrankheit</b>	Seite 21
<b>3.1.3 Kontrollpersonen</b>	Seite 21
<b>3.2 Material und Methoden</b>	Seite 22
<b>3.2.1 Probengewinnung und Vorbereitung</b>	Seite 22
<b>3.2.2 Messung der Serummarker</b>	Seite 22
3.2.2.1 <i>ACE</i>	Seite 23
3.2.2.1.1 Material und Methoden	Seite 23
3.2.2.1.2 Durchführung	Seite 23
3.2.2.1.3 Auswertung	Seite 24
3.2.2.2 <i>sIL-2R</i>	Seite 24
3.2.2.2.1 Material	Seite 24
3.2.2.2.2 Methode	Seite 25
3.2.2.2.3 Durchführung	Seite 25
3.2.2.2.4 Auswertung	Seite 26
3.2.2.3 <i>IL-8</i>	Seite 26
3.2.2.3.1 Material	Seite 26
3.2.2.3.2 Methode	Seite 27
3.2.2.3.3 Durchführung	Seite 27
3.2.2.3.4 Auswertung	Seite 28
3.2.2.4 <i>Lysozym</i>	Seite 28
3.2.2.4.1 Material	Seite 28

3.2.2.4.2 Methode	Seite 29
3.2.2.4.3 Durchführung	Seite 30
3.2.2.4.4 Auswertung	Seite 31
<b>3.2.3 Lungenfunktionsanalyse</b>	Seite 31
<b>3.2.4 Statistik</b>	Seite 31
<b>4. Ergebnisse</b>	Seite 33
<b>4.1 Diagnosen</b>	Seite 33
<b>4.2 Diagnosen und Demographisches</b>	Seite 35
<b>4.3 Serummarker</b>	Seite 36
<b>4.3.1 Diagnose und Serummarker</b>	Seite 43
<b>4.3.2 Geschlecht und Alter und Serummarker</b>	Seite 58
<b>4.4 Blutbild und Serumchemie</b>	Seite 68
<b>4.4.1 Diagnose und Blutbild</b>	Seite 68
<b>4.4.2 Demographie und Blutbild</b>	Seite 69
<b>4.4.3 Serummarker und Blutbild</b>	Seite 71

<b>5. Diskussion</b>	Seite 75
<b>5.1 Diagnosen</b>	Seite 75
<b>5.2 Diagnosen und Demographie</b>	Seite 75
<b>5.3 Serummarker</b>	Seite 76
<b>5.3.1 Diagnosen und Serummarker</b>	Seite 79
<b>5.3.2 Geschlecht und Alter und Serummarker</b>	Seite 82
<b>5.4 Blutbild und Serumchemie</b>	Seite 83
<b>5.4.1 Diagnosen und Blutbild</b>	Seite 83
<b>5.4.2 Demographie und Blutbild</b>	Seite 83
<b>5.4.3 Serummarker und Blutbild</b>	Seite 84
<b>6. Zusammenfassung</b>	Seite 85
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	Seite 89

# **1. Einleitung**

Obwohl das Krankheitsbild der Sarkoidose das erste Mal bereits vor über Hundert Jahren beschrieben wurde [7,8,9], besteht immer noch keine Klarheit über die auslösende Ursache. Exogene Einflüsse wie Viren [21], Bakterien [11,25] oder auch anorganische Stäube [16] stehen ebenso zur Diskussion, wie ein endogener Auslöser im Sinne einer genetischen Prädisposition [12]. Im Kapitel 4 wird hierauf näher eingegangen.

Die Sarkoidose gehört zu den granulomatös-entzündlichen Krankheiten, in deren Verlauf es zu verschiedenen Immunreaktionen kommt. Diese bedeuten für die betroffenen Patienten häufig einen langen Leidensweg, nicht selten aufgrund später, weil schwer stellbarer Diagnose.

Obschon nahezu jedes Organ erkrankt sein kann, sind es vor allem der Befall der Lunge und die Hauteffloreszenzen worunter die Patienten besonders leiden. Da die Lunge - ebenso wie die den ganzen Körper umhüllende Haut - mit Noxen jedweder Art als erste in direkten Kontakt tritt, nimmt sie in der Sarkoidoseforschung eine exponierte Stellung ein. Zudem stellt eine Lungenbeteiligung in den meisten Fällen eine beträchtliche Einschränkung der Lebensqualität dar.

## **1.1 Erläuterung der untersuchten Krankheiten**

Im Folgenden werden die untersuchten Krankheitsbilder vorgestellt und einer genaueren Betrachtung unterzogen.

## **1.1.1 Sarkoidose**

### **1.1.1.1 Definition**

Bei der Sarkoidose handelt es sich um eine granulomatös-entzündliche Systemerkrankung unbekannter Ätiologie, die sich histologisch durch nicht verkäsende Granulome und durch die Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen auszeichnet.

Obgleich nahezu jedes Organ befallen sein kann, nimmt die Lunge eine exponierte Stellung ein. Weiterhin können sich Granulome in Haut, Knochen, Augen oder dem ZNS befinden [6]. Erstmals beschrieben Jonathan Hutchinson (1828-1913) und Caesar Boeck (1845-1917) fast zeitgleich 1898/1899 sarkoide Hautveränderungen, die rückblickend mit einer Hautsarkoidose übereinstimmen [7,8,9]. Man nannte die Erkrankung damals auch „Boeck´s Sarcoid“ [6].

### **1.1.1.2 Epidemiologie**

Sarkoidose ist die am häufigsten anzutreffende interstitielle Lungenkrankheit unbekannter Ätiologie in Europa. Während in Schweden 64 Patienten innerhalb einer Population von 100.000 Personen vorkommen, liegt die Zahl in Italien bei 9 Patienten von 100.000 Personen. Dazwischen befinden sich Dänemark, Deutschland, Irland, Norwegen, die Niederlande, Großbritannien, die Schweiz und Frankreich.

Die Prävalenz innerhalb der weißen Bevölkerung der USA liegt bei 3 Patienten pro 100.000 Bewohner, in der afroamerikanischen Bevölkerung bei 47 pro 100.000 und ist damit deutlich erhöht [10]. Allerdings muss man bedenken, dass die asymptomatischen

und die unspezifisch symptomatisch verlaufenden Krankheitsbilder, möglicherweise nicht erfasst werden.

Die ernstere chronisch-fibrosierende Verlaufsform kommt vermehrt in der schwarzen Bevölkerung vor, wohingegen die weiße Bevölkerung eher von der schweren akuten Form mit guter Prognose betroffen scheint. Grundsätzlich wird keine ethnische Bevölkerungsgruppe von der Sarkoidose verschont, wobei eine leichte Mehrheit auf Seiten der Frauen festzustellen ist [6].

Zwar kommen alle Altersgruppen vor, doch manifestiert sich die Krankheit besonders häufig zwischen dem 20. und dem 45. Lebensjahr [11].

### **1.1.1.3 Ätiologie**

Obwohl sich die Untersuchungstechniken seit der Erstbeschreibung der Sarkoidose durch Boeck und Hutchinson von der Thorax-Röntgenaufnahme bis zur HR-Computertomographie wesentlich weiterentwickelt haben und wir inzwischen über enorme Kenntnis der Immunologie und der Biochemie verfügen, bleibt das Hauptmysterium der Sarkoidose ungelöst: Die Ursache ihrer Entstehung.

Im Fokus der Forschung befinden sich zwei grundlegende Ansätze, nämlich der genetische Aspekt auf der einen und ein exogener Auslöser auf der anderen Seite [12].

Während zahlreiche Berichte familiärer Sarkoidosefälle und klinischer Auffälligkeiten in unterschiedlichen Rassen darauf hinweisen, dass ein genetischer Hintergrund für die Sarkoidose existiert, blieb die Forschung bis jetzt einen Beweis schuldig [13,14,15]. Zwar wurde für die Berylliose, eine Krankheit, deren Klinik nicht von der der Sarkoidose zu unterscheiden ist, ein Zusammenhang zwischen der Krankheit und einem Glutaminrest auf einem HLA-Molekül festgestellt [16]. Jedoch konnte dieser bei der Sarkoidose nur bedingt festgestellt werden. Offensichtlich muss außer der Heterogenität der Störung noch ein polygenetischer Auslöser vorhanden sein [11].

Auch der Insertions-/Deletions-Polymorphismus auf dem ACE-Gen wurde für die Erkrankung verantwortlich gemacht [17,18,19], was sich allerdings widerlegen ließ [20].

Schon C. Boeck vermutete, dass es sich möglicherweise um eine infektiöse Erkrankung handeln könnte, identisch mit der Tuberkulose oder zumindest verwandt mit ihr. Bis heute wird die Diskussion darüber fortgeführt [11].

Inzwischen wurden hohe Titer von Antikörpern gegen das Epstein-Barr-Virus (EBV), das humane Herpes-Virus (HHV), Parainfluenza, Röteln und Mykobakteriophagen in Patienten mit Sarkoidose gefunden. Trotz des Nachweises von HHV-8 DNA-Sequenzen in signifikant höherer Menge im Lungengewebe von Sarkoidosepatienten gegenüber gesundem Lungengewebe [21], kann zur Zeit eine virale Ursache als Auslöser der Sarkoidose nicht endgültig bewiesen werden [11]. Ferner wurde festgestellt, dass das *Mycobacterium tuberculosis* oder andere Mykobakterien keinen Einfluss auf den Ausbruch der Sarkoidose haben [22,23,24]. Allerdings wurden rRNA-Sequenzen eines bisher unbekanntes Mykobakteriums in sarkoiden Gewebeproben gefunden, deren Wichtigkeit untersucht werden muss [25,11].

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die hohen Titer von Antikörpern gegen alle möglichen Erreger, wie Chlamydien [26] oder Borrelien [27,28] höchstwahrscheinlich daher rühren, dass bei der Sarkoidose eine generelle B-Zell-Aktivierung vorliegt [11].

Sowohl organische als auch anorganische Stäube können Krankheiten auslösen, deren klinische Eigenschaften mit denen der Sarkoidose identisch sind, wie zum Beispiel die Berylliose [16]. Aus diesem Grunde sollte der Gedanke weiterverfolgt werden, dass der Faktor Umwelt eine nicht unbedeutende Rolle spielt [11].

#### **1.1.1.4 Pathogenese**

Ähnlich wie die Ätiologie, liegt auch die Pathogenese noch teilweise im Unklaren.

Aufgrund ungewisser Faktoren kommt es zu einer lymphozytären Alveolitis, wobei durch aktivierte Alveolarmakrophagen und T-Lymphozyten verschiedene Zytokine

sezerniert werden. Dichte Zellaggregate im Entzündungsbereich führen zur Bildung von Granulomen, die im weiteren Verlauf fibrosieren können. Dies kann zu einer interstitiellen granulomatösen Fibrose führen.

Im akuten Stadium überwiegt die Zahl der T-Helferzellen (CD4+), während bei Nachlassen der Entzündungsaktivität die T-Supressorzellen überwiegen (CD8+). Neutrophile Granulozyten sind kaum anzutreffen [6].

### **1.1.1.5 Klinik und Diagnose**

Bei über 90% der Sarkoidose-Patienten liegt eine Lungenbeteiligung vor, die auf dem Röntgenbild erkennbar ist [29].

Allerdings kann nahezu jedes Organ befallen werden, auch ohne klinische Symptomatik. Am Häufigsten sind die Lymphknoten betroffen, gefolgt von Lunge, Leber, Milz, Herz, Knochenmark, Augen und Haut.

Man unterscheidet eine pulmonale von einer extrapulmonalen Sarkoidose. Während etwa die Hälfte der Patienten hauptsächlich an Symptomen wie Reizhusten, Atemnot oder Brustschmerzen leidet, ebenso an verschiedenen systemischen Beschwerden, wie Fieber oder Gewichtsverlust, bleiben die übrigen Patienten weitgehend asymptomatisch. Ferner bezeichnet man die akute Verlaufsform mit Hiluslymphknotenvergrößerung, Arthralgie und Erythema nodosum als Löfgren-Syndrom. Trotz deutlicher radiologischer Anzeichen ist der auskultatorische Befund oft unauffällig.

Anhand von Röntgenbildern kann man die Lungensarkoidose in vier Typen einteilen:

Röntgentyp I:	bihiläre Adenopathie
Röntgentyp II:	Lungeninfiltrate und bihiläre Adenopathie
Röntgentyp III:	beidseitige Lungeninfiltrate ohne Adenopathie
Röntgentyp IV:	Zeichen der Lungenfibrosierung

Ein weiterer Parameter zur Diagnosestellung ist die Lungenfunktionsanalyse. Im Gegensatz zum Typ I lassen sich bei Typ III bis IV in der Lungenfunktionsprüfung eine restriktive Ventilationsstörung mit Erniedrigung von VK und TK feststellen. Ferner kann auch die Diffusionskapazität DLCO erniedrigt sein.

Mithilfe der Bronchoskopie und insbesondere der bronchoalveolären Lavage (BAL) lassen sich bei Sarkoidosepatienten unter Umständen folgende Veränderungen feststellen: Anstieg des Lymphozytenanteils auf 40-60%, Erhöhung des Verhältnisses von T-Helfer- zu T-Supressorzellen, d.h., des Quotienten CD4/CD8 über 1,7 [6].

Außerdem existieren einige Serummarker - wie weiter oben besprochen - mit deren Hilfe die Diagnosestellung unterstützt wird: Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE), der lösliche Interleukin2-Rezeptor (sIL-2R) und das Lysozym. Auch Neopterin, ein kleiner Metabolit des Guanosintriphosphat-Kreislaufs findet noch als Serummarker Verwendung. Allerdings misst man mit ihm eher die Aktivität der Zellen der Monozyten/Makrophagenlinie im Verlauf einer Sarkoidose [33].

Während ACE und Lysozym von Epithelzellen sezerniert werden und ihre Serumwerte die Granulomlast darstellen [30], wird sIL-2R von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet [31].

Sowohl Sensitivität, als auch Spezifität von ACE und Lysozym sind niedrig [32], allerdings könnte die Entdeckung des Insertions-/Deletions-Polymorphismus des ACE-Gens helfen, die Prognostik voranzutreiben [17,18,19,20]. In einer Studie von Ziegenhagen et al. wurde festgestellt, dass nur der Vorhersagewert von sIL-2R im Vergleich zu ACE und Neopterin im Serum von signifikantem prognostischen Wert war [32].

#### **1.1.1.6 Therapie und Prognose**

Die als Löfgren-Syndrom bekannte akute Verlaufsform endet in ca. 90% der Fälle in einer Spontanremission ohne Therapie. Im allgemeinen genügt hier die Anwendung von

Analgetika und Antiphlogistika. Für die anderen Formen sind Kortikosteroide das Mittel der Wahl.

Während es bei Patienten mit einer Lungensarkoidose vom Typ I in ca. 70% der Fälle unbehandelt zu einer spontanen Heilung kommt, bei Typ II und III in nur 50%, erleiden ca. 20-25% eine persistierende Einschränkung der Lungenfunktion. 5-10% der Sarkoidose-Fälle verlaufen letal [6].

### **1.1.2 Idiopathische Lungenfibrose**

Da innerhalb der zweiten, als fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen zusammengefassten Gruppe, das Gros der Patienten an einer idiopathischen Lungenfibrose leidet, soll diese hier kurz vorgestellt werden.

#### **1.1.2.1 Definition**

Mit der idiopathischen Lungenfibrose existiert eine Lungenkrankheit, deren Ätiologie ebenfalls unbekannt ist.

Kennzeichnend ist die akute oder chronische Entzündung im Bereich der tieferen Lungenanteile in der Art einer Neutrophilen-Makrophagen-Alveolitis. Im weiteren Verlauf kommt es zu schwerwiegender Zerstörung von Alveolarmembranen mit bindegewebigem Umbau und dadurch fortschreitender Restriktion. Auch der Gasaustausch ist gestört.

Die Diagnose der idiopathischen Lungenfibrose wird nach dem Ausschlussverfahren festgestellt [6].

### **1.1.2.2 Epidemiologie**

Zwar erkranken in seltenen Fällen auch Kinder an der idiopathischen Lungenfibrose, das bevorzugte Alter liegt jedoch zwischen 40 und 60 Jahren.

Nicht nur eine genetische, sondern auch eine erworbene Disposition werden diskutiert, da eine familiäre pulmonale Fibrose existiert. Ebenso wenig wird eine virale Ursache ausgeschlossen.

Die idiopathische Lungenfibrose kommt in 3-5 Fällen pro 100000 vor [6].

### **1.1.2.3 Pathogenese und Histologie**

Im Frühstadium lässt sich histologisch eine neutrophile und eosinophile Alveolitis erkennen, später eine interstitielle Entzündung die in eine Fibrose übergeht. Teilweise können zystische Erweiterungen im Lungenparenchym entstehen.

Ein unbekannter Auslösemechanismus, z.B. durch virale Antigene führt zur Bildung von Immunkomplexen, die sich im interstitiellen Lungengewebe ablagern und mit dem Komplementsystem interagieren. Dies setzt eine perpetuierende Entzündungsreaktion in Gang, die nicht mehr kontrollierbar ist. Schließlich produzieren stimulierte Fibroblasten Kollagen II und III, die zu Fibrosierung führen [6].

#### **1.1.2.4 Klinik und Diagnose**

Husten und Belastungsdyspnoe sind die ersten Symptome, die den Patienten selbst auffallen. Damit einhergehen häufig Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust oder Arthralgien, selten Fieber. Anfangs kann der Auskultationsbefund normal sein, später hört man Knisterrasseln. Weiterhin klagen 50% der Patienten über Tachypnoe in Ruhe und Atemnot. Bei 70% findet man Uhrglasnägel. Darüber hinaus können eine pulmonale Hypertonie und eine Rechtsherzinsuffizienz sich anschließen.

Auf der Röntgenthoraxaufnahme kann man besonders in den unteren Lungensegmenten eine bilaterale, diffuse, retikuläre Zeichnungsvermehrung feststellen. Auch ein Ground-glass-Phänomen ist möglich [6].

Die Lungenfunktionsanalyse bringt eine restriktive Ventilationsstörung mit Erniedrigung von Vitalkapazität, funktioneller Residualkapazität und Residualvolumen hervor. DLCO und  $pO_2$  sind ebenfalls erniedrigt.

Neben der Bronchoskopie mit transbronchialer Biopsie kann eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt werden. Bei 90-95% der Patienten sind entweder Neutrophile, Eosinophile oder Lymphozyten erhöht, der CD4/CD8-Quotient ist normal oder leicht erniedrigt [6]. Die sichere Diagnose wird durch eine chirurgische Lungenbiopsie erreicht.

#### **1.1.2.5 Therapie und Prognose**

Die Mittel der ersten Wahl sollten Kortikosteroide in Kombination mit Cyclophosphamid oder Azathioprin sein. Wenn sich hier keine Besserung einstellt, muss eine immunsuppressive Therapie in Betracht gezogen werden. Zusätzlich sollte an eine Sauerstofftherapie gedacht werden.

Abhängig vom histologischen Bild [34] sind junges Alter, kurzer Krankheitsverlauf und gutes Ansprechen auf die Therapie als prognostisch gut anzusehen. Eine Spontanremissionsrate von 20% kommt im Stadium der Alveolitis vor. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 3,4-5,6 Jahre[6].

## **1.2 Erläuterung der Serummarker**

Eine Erklärung der untersuchten Serummarker ACE, sIL-2R, Lysozym und IL-8 soll eine hinreichende Übersicht vermitteln.

### **1.2.1 ACE**

#### **1.2.1.1 Allgemeines**

Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) ist eine hinlänglich untersuchte Zink-Metalloproteinase, die Angiotensin I in Angiotensin II spalten kann und in der Lage ist, Bradykinin zu inaktivieren. In erster Linie wurde es als eine Dipeptidyl-Carboxypeptidase beschrieben. Das Enzym spielt eine wichtige Rolle im vasoaktiven Peptid-Kreislauf, da Angiotensin II ein starker Vasokonstriktor und Bradykinin ein ebenso wirksamer Vasodilatator ist. Weiterhin hat ACE seine physiologische Bedeutung im neuronalen Kreislauf, der Hämatopoese, der Verdauung und der Fortpflanzung.

Im Laufe der Jahre wurden Verfahren entwickelt, die es erlaubten, die ACE-Aktivität in Körperflüssigkeiten zu messen. Dies konnte zur diagnostischen Unterstützung, z.B. bei der Sarkoidose verwendet werden, wie Liebermann erstmals 1975 herausfand [97]. In

Kapitel 6 wird hierauf näher eingegangen. Ferner fand man in ACE-Hemmern, wie z.B. Captopril ein wirksames Antihypertensivum.

Innerhalb der letzten zwanzig Jahre konnten zwei Isoenzyme isoliert werden: Ein sogenanntes somatisches ACE und ein testikuläres ACE [35]. Die somatische Isoform wird hauptsächlich von Endothelzellen, absorbierenden Epithelien, neuroepithelialen Zellen und Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems exprimiert [36,37,38].

Nachdem man herausfand, dass die Enzymaktivität beim Gesunden interindividuell stark schwankt, intraindividuell allerdings relativ konstant bleibt [98], konnte die Arbeitsgruppe um Rigat 1990 einen Deletions-/Insertions-(D/I-) Polymorphismus nachweisen [39]. Hieraus schloss man, dass zwischen der Aktivität des Enzyms und dem Genotyp ein deutlicher Zusammenhang besteht [40].

#### **1.2.1.2 Struktur und Synthese**

Das Hormon ACE existiert vornehmlich als Glykoprotein der sogenannten Klasse-I-Membranproteine, welches auf der Zelloberfläche lokalisiert und in der Zellmembran verankert ist. Es verfügt über ein N-terminales, katalytisches Ende auf der extrazellulären Seite, insbesondere auf der lumenwärtigen Oberfläche von Gefäß-Endothelzellen [41]. Da ACE auch ein C-terminales Tripeptid von des-Arg<sub>9</sub> Bradykinin spalten kann, ist es keine reine Dipeptidyl-Carboxypeptidase, sondern ebenfalls eine Peptidyl-Tripeptidase.

Als Metalloproteinase hat ACE ein Zink-Atom in seinem aktiven Zentrum. Aus diesem Grunde ist es durch Metall-Chelatbildner inaktivierbar. Unerlässlich für die Aktivität von ACE sind Chlorid-Ionen, was ebenfalls seine Zugehörigkeit zur Familie der Metalloproteinasen unterstreicht [35].

Das endotheliale ACE-Molekül besteht aus zwei homologen Domänen. Jede dieser Domänen besitzt eine mutmaßlich aktive Seite, da sich in ihrer Mitte eine bestimmte Aminosäureabfolge befindet, die mit dem aktiven Ende von Zink-Metalloproteinasen übereinstimmt [45,46,47]. Wie chemische Untersuchungen eindeutig belegten, trägt das

somatische ACE-Molekül zwei Zinkatome [48]. Dagegen ist das testikuläre ACE-Molekül zwar mit dem carboxyterminalen Ende des somatischen ACE-Moleküls identisch, jedoch besitzt es ein anderes N-terminales Ende und nur ein Zink-Atom. Daher besitzt es nur ein aktives Ende [35].

Während das endotheliale ACE, das aus zwei Polypeptidketten besteht, 1277 Aminosäuren lang ist und eine molare Masse von 146 kDa hat, enthält das testikuläre ACE-Molekül nur 711 Aminosäuren und eine molare Masse von lediglich 80 kDa [49]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte die Tertiärstruktur noch nicht dargestellt werden [35].

Wahrscheinlich stammt das lösliche Plasma-ACE von dem Enzym, welches in der endothelialen Zellmembran verankert ist und hier durch einen proteolytischen Vorgang abgespalten wird [35]. Offensichtlich sind sämtliche Endothelzellen von Säugern in der Lage ACE in einer löslichen Form zu exprimieren, obwohl es einige Unterschiede zwischen den Organen gibt [42]. So sind z.B. Lunge und Gehirn besonders reich an ACE [42,43,44].

### **1.2.1.3 Funktion und klinische Bedeutung**

Das Angiotensin-konvertierende Enzym ist bekannt für seine wichtige Rolle, die es im Renin-Angiotensin-System spielt. Seine physiologische Aufgabe liegt darin, Angiotensin I in Angiotensin II, einen potenten Vasokonstriktor zu spalten. Dieser veranlasst ebenso die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, um für die Retention von Natriumionen zu sorgen. Darüber hinaus ist ACE in der Lage, das carboxyterminale Dipeptid des Vasodilatators Bradykinin abzuspalten, wodurch dieses inaktiviert wird. Deswegen nannte man es auch Kininase II [50].

Die klinische Bedeutung von ACE umfasst zwei Hauptbereiche: Zum einen die Behandlung der essentiellen Hypertonie und zum anderen die Unterstützung der Sarkoidose-Diagnostik.

Aufgrund seiner wichtigen Stellung im Zusammenhang mit dem Gleichgewicht des Blutdrucks wurde ACE zum Ziel vieler Therapieansätze bezüglich der Hypertonie und durchblutungsstörungsbedingter Herzerkrankungen. Der erste klinisch wirksame ACE-Hemmer war Captopril [51], danach wurden viele weitere Hemmstoffe entwickelt, deren Wirkung auf ähnlichen Mechanismen beruhten [35].

Besonders bei pathogenen Prozessen, die durch eine Stimulation des Monozyten-Makrophagen-Systems hervorgerufen werden, in erster Linie entzündlich-granulomatöse Erkrankungen, wurde eine Erhöhung des Serum-ACE-Spiegels beobachtet. Die am besten untersuchte Erkrankung dieser Art ist die Sarkoidose. Der Grund der Erhöhung der ACE-Aktivität bei dieser Erkrankung liegt vermutlich in einer verstärkten Produktion durch Epitheloidzellen in den Granulomen und durch Alveolarmakrophagen [114,115]. Daher spiegelt die ACE Aktivität die Granulomlast des Körpers wieder [30].

Allerdings kann der Serum-ACE-Spiegel auch bei ähnlichen Krankheiten erhöht sein, so z.B. bei der Silikose und der Asbestose oder bei Morbus Gaucher, Lepra und auch bei der Hyperthyroidose [52]. Hingegen kann erniedrigtes ACE auf eine vaskuläre Erkrankung hinweisen, z.B. eine tiefe Venenthrombose [53], eine Lungenerkrankung [52,54] und eine endotheliale Dysfunktion, verbunden mit einer Chemo- oder Strahlentherapie [52]. Daneben unterliegt der ACE-Spiegel auch bei Gesunden erheblichen Schwankungen, die durch den weiter oben erwähnten Deletions-/Insertions-(D/I) Genpolymorphismus des ACE erklärt werden könnten [98].

## **1.2.2 sIL-2R**

### **1.2.2.1 Allgemeines**

Bereits im Jahre 1976 fand die Forschergruppe um Morgan eine das T-Zellenwachstum anregende Aktivität innerhalb überschüssiger Kulturen von aktivierten T-Zellen. Aus diesem Grunde nannte man sie T-cell growth factor (TCGF) [91].

Dieser Faktor wurde in der folgenden Zeit näher untersucht, wobei sich herausstellte, dass TCGF ein Glykoprotein mit einem molaren Gewicht von 15.500 Da war [92]. Inzwischen gab man dem Protein mit Interleukin-2 (IL-2) einen neuen Namen und zählte es zur Gruppe der Zytokine [94].

IL-2 stellt einen Bestandteil der Lymphokinkaskade dar, die bei einer Immunantwort ausgelöst wird. Die Regelung der Stärke und Dauer dieser Immunantwort wird von IL-2 und seinem Rezeptor (IL-2R) entscheidend beeinflusst. IL-2 und sein Rezeptor sind für das Wachstum von T-Zellen, NK-Zellen und B-Zellen verantwortlich [68].

### **1.2.2.2 Synthese und Struktur**

Das Polypeptid IL-2 wird nicht von ruhenden T-Zellen, sondern nur von aktivierten T-Lymphozyten produziert. Infolge der Anwesenheit eines Antigens und des Zytokins Interleukin-1 wird IL-2 dann rasch synthetisiert und ausgeschüttet. Ebenso wird die Expression seines Rezeptors (IL-2R) dadurch begünstigt [93].

Der Interleukin-2-Rezeptor befindet sich auf der Membran von T-Lymphozyten [84], manchen B-Zellen [85] und auf Monozyten [86]. Er spielt in der Biologie derselben eine wichtige Rolle [87].

Gebildet wird dieser Rezeptor von mindestens drei miteinander in Verbindung stehenden Polypeptidketten. Die erste, auch  $\alpha$ -Kette, Tac (T activation antigen) oder CD25 [87] genannt, mit einem Molekulargewicht von 75kDa bindet IL-2 mit niedriger Affinität, die kleinere, sogenannte  $\beta$ -Kette mit einem Molekulargewicht von 55kDa bindet ebenfalls IL-2 [88]. Einzeln verfügen beide Ketten nur über eine geringe Neigung IL-2 zu binden. Jedoch kann eine hohe Affinität entstehen, wenn beide Ketten gleichzeitig exprimiert werden [89]. Später wurde eine dritte  $\gamma$  genannte Kette entdeckt [90].

Bei dem Tac genannten Protein handelt es sich um ein Typ I-Transmembranglykoprotein, bestehend aus 251 Aminosäuren. Die zytoplasmatische Domäne stellt ein 13 Aminosäuren langes COOH-Ende dar. Von der Membran aktivierter Zellen abgespalten, kann eine lösliche Form des Rezeptormoleküls, der soluble Tac oder lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) in Gewebe und Serum gefunden werden. Er enthält 192 Aminosäuren und beinhaltet die gleichen Eigenschaften wie das „elterliche“ Molekül.

Seine native Struktur ist noch nicht vollständig geklärt - vermutet wird eine monomere, dimere eventuell sogar tetramere Form [87]. Durch einen Enzymgebundenen Test (ELISA) kann sIL-2R im Serum quantitativ bestimmt werden.

### **1.2.2.3 Funktion und klinische Bedeutung**

Wie weiter oben erwähnt, kommt das Tac-Molekül in ruhenden T-Zellen normalerweise nicht vor. Allerdings wird es in großen Mengen von aktivierten Lymphozyten produziert um mit den übrigen  $\beta$ -und  $\gamma$ -Ketten den hochaffinen Rezeptor zu bilden.

Hierbei wird die lösliche Form von Tac, der sIL-2R vom membranständigen Rezeptor abgespalten. Dieser kann nun im Serum mit der in Kapitel 6 erläuterten Methode nachgewiesen werden. Seine Menge steht in direktem Verhältnis zur Expression des Rezeptors und somit zur T-Zellaktivierung [87]. Auch im Urin ist sIL-2R nachweisbar und zwar direkt proportional zu der Menge im Serum [95].

Verschiedene Krankheiten weisen erhöhte sIL-2R-Serumwerte auf, was seine Bedeutung als Serummarker unterstreicht. Zu diesen Krankheiten gehören verschiedene hämatologische Neoplasien, wie das Hodgkin- und das Non-Hodgkin-Lymphom, aber auch virale Infektionen, wie z.B. Hepatitis A und B. Ebenso kann man erhöhte Serumwerte von sIL-2R bei Patienten, die mit dem HI-Virus infiziert sind feststellen [95]. Weiterhin dient sIL-2R als Marker bei der Diagnose der acute graft-versus-host-disease infolge von Organ-Transplantationen [96]. Neben Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE), weisen auch granulomatöse Entzündungskrankheiten, wie die Sarkoidose erhöhte Serumwerte auf [95].

### **1.2.3 IL-8**

#### **1.2.3.1 Allgemeines**

Eines der wichtigsten Ereignisse im Anfangsstadium einer Entzündungsreaktion besteht in der Kumulation von neutrophilen Granulozyten am Entzündungsort. Blutgefäße, Blut und Gewebestandteile bilden eine Abwehrlinie, die bei einer Verletzung oder Infektion aktiv wird und die neutrophilen Granulozyten zum Einsatzort lenkt. Chemotaktische Stimuli sorgen für die Migration der Neutrophilen aus den Gefäßen.

Dazu zählen die Zytokine, insbesondere das Interleukin-8 (IL-8) [55]. Anfangs wurde es mit unterschiedlichen Namen, wie z.B. Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) [58], Neutrophile-aktivierendes Protein 1 (NAP-1), granulozytenchemotaktisches Protein (GCP) oder chemotaktischer Faktor für T-Zellen (TCF) bezeichnet [68].

Sezerniert von Phagozyten und einer großen Anzahl anderer Zellen, gilt Interleukin-8 als eines der Hauptzytokine für die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten [55]. Außerdem wirkt seine chemotaktische Eigenschaft auch auf T-Lymphozyten [66].

### 1.2.3.2 Struktur und Synthese

Während das Vorläufermolekül von Interleukin-8 aus 99 Aminosäuren besteht, handelt es sich nach Spaltung einer Signalsequenz von 27 Resten um ein nichtglykosyliertes Protein von 72 Aminosäuren und einer Molmasse von 8 kDa, wenn es sezerniert wird [56,68]. Man betrachtet es als einen Prototypen der C-X-C-Chemokin-Familie [65].

Nach verschiedenen N-terminalen extrazellulären Processing-Phasen entstehen mehrere biologisch aktive Varianten. Das primäre Protein enthält vier Cysteinreste, die zwei Disulfid-Brücken erzeugen. Obwohl IL-8 gegenüber Proteasen, Hitze, extremen pH-Werten und anderen denaturierenden Einflüssen resistent ist, kann es leicht inaktiviert werden, indem man seine Disulfidbrücken reduziert [56].

Verschiedene bildgebende Verfahren haben gezeigt, dass das Protein in dimerer Form vorliegt [57]. Das Monomer verfügt über eine kurze, flexible N-terminale Domäne, welche durch die Disulfidbrücken in der inneren Struktur, bestehend aus drei antiparallelen  $\beta$ -Strängen und einer terminalen  $\alpha$ -Helix [55] stabilisiert wird.

Viele verschiedene Zellen sind in der Lage, IL-8 zu sezernieren: Unter anderen Endothelzellen, Fibroblasten aus unterschiedlichen Geweben, Keratinozyten, Epithelzellen, sowie Makrophagen, Monozyten oder auch Tumorzellen [56,59]. Auch neutrophile Granulozyten selbst können IL-8 ausschütten und so ihre eigene Rekrutierung verstärken [60].

Zwei bedeutende Faktoren, die die Expression und Sekretion von IL-8 fördern sind Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor (TNF) [69]. Ferner wirken sich Endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) und andere Substanzen, wie z.B. Phorbol ester oder Lektine stimulierend aus [62]. Ebenso stellen opsonierte Partikel ein Signal für die Produktion von

IL-8 durch die neutrophilen Granulozyten dar [60].

### **1.2.3.3 Rezeptoren**

Man hat herausgefunden, dass zwei Rezeptortypen existieren, an die IL-8 binden kann, die allerdings nicht für IL-8 spezifisch sind. So können auch andere dem IL-8 ähnliche Substanzen, wie das Neutrophile-aktivierende-Protein-2 (NAP-2) an den Rezeptor andocken.

Während der eine Rezeptortyp eine gleich hohe Affinität für sämtliche Liganden besitzt, bevorzugt der andere das IL-8 [63].

Die Rezeptoren gehören zu den Transmembran-Rezeptoren mit Sieben-Helix-Struktur [64]. Diese sind mit G-Proteinen assoziiert und wenn ein Chemokin an sie bindet, wird eine Kalziummobilisierung ausgelöst und die Phospholipase C wird aktiviert [68].

Auf neutrophilen Granulozyten befinden sich  $64.500 \pm 14.000$  Rezeptoren für IL-8 [63].

### **1.2.3.4 Funktion und klinische Bedeutung**

Die wichtigste Funktion von IL-8 besteht ohne Zweifel in seiner Fähigkeit, neutrophile Granulozyten anzuziehen und zu aktivieren [56]. Dies geschieht über eine kurzweilige Erhöhung der Kalziumkonzentration im Zytosol und die Sekretion von primären und sekundären Granula. Zudem werden vermehrt Sauerstoffradikale frei [68]. Ebenso ist IL-8 in der Lage, T-Lymphozyten anzuziehen [66].

Sowohl in tuberkulösen Lungenläsionen [67], als auch bei Pleuraergüssen findet man erhöhte IL-8- Spiegel [66]. Eine Studie von Park et al. zeigte, dass durch die Vermittlung von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und LPS die Makrophagen und Mesothelzellen der Lunge bei tuberkulöser Pleuritis angeregt werden IL-8 freizusetzen [65]. Außerdem fanden Ziegenhagen et al. heraus, dass das Maß der neutrophilen Alveolitis bei der idiopathischen Lungenfibrose mit einem Anstieg von IL-8 im Serum korreliert [61]. Weiterhin finden sich hohe Konzentrationen an IL-8 in Psoriasissschuppen und in der

Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Hier führt der stetige Ansturm von neutrophilen Granulozyten in das Gelenk zu einem Anstieg des lokalen Entzündungspotenzials [68].

## **1.2.4 Lysozym**

### **1.2.4.1 Allgemeines**

Als der Londoner Bakteriologe Alexander Fleming im Jahre 1922 an einer Erkältung litt, ließ er einige Tropfen seines Nasensekrets auf eine Bakterienkulturplatte fallen. Nach einiger Zeit bemerkte er überrascht, dass sich die Bakterien in der Nähe des Schleims aufgelöst hatten.

Die von Fleming entdeckte antimikrobielle Substanz nannte er Lysozym, nachdem er herausgefunden hatte, dass es sich um ein Enzym handelte, welches in der Lage war, Bakterien zu lysieren. Ein anderer ebenfalls geläufiger Name war Muramidase [78].

Weiterhin entdeckte Fleming eine Bakterienart, die besonders sensibel auf die Wirkung von Lysozym reagierte. Er nannte sie *Micrococcus lysodeicticus*, da sie als Indikator für Lysozym nützlich war. Auch konnte er nachweisen, dass Lysozym sich in großen Mengen in der Tränenflüssigkeit fand.

Sieben Jahre später machte Fleming eine der wichtigsten Entdeckungen des Zwanzigsten Jahrhunderts: Er fand das Penicillin [70].

#### **1.2.4.2 Struktur und Synthese**

Das Lysozym stellt ein eher kleines Enzym von 14,6 kDa dar, das aus einer einzelnen Polypeptidkette von 129 Aminosäuren besteht. Man kann es leicht in großen Mengen aus Hühnereiweiß gewinnen.

Das sehr stabile Protein, dessen dreidimensionale Struktur David Phillips und seine Mitarbeiter 1965 darstellten, ist durch vier Disulfidbrücken quervernetzt und verfügt über eine komplexe Faltung [70]. Die Polypeptidkette liegt in mehreren Abschnitten in einer gestreckten  $\beta$ -Faltblatt-Konformation und vier  $\alpha$ -Helices vor, wobei das  $\beta$ -Faltblatt eine Domäne darstellt und die  $\alpha$ -Helices eine andere [71].

Lysozym ist eine kleine Glukosidase [70], die ebenso im Gewebe, wie auch in fast jeder Körperflüssigkeit vorkommt, verstärkt jedoch im Speichel [72]. Produziert wird diese Glukosidase von einer Vielzahl von exokrinen Drüsenepithelzellen, die sie schließlich in die Körperflüssigkeiten sezernieren [73,74]. Sowohl Monozyten und Makrophagen als auch Epitheloidzellen und Riesenzellen der Granulome bei granulomatös entzündlichen Erkrankungen können ebenfalls Lysozym produzieren [75,76,77].

#### **1.2.4.3 Funktion und klinische Bedeutung**

Die bakteriolytische Wirkung des Lysozyms besteht darin, den Polysaccharidanteil der bakteriellen Zellwand aufzubrechen. Umgeben von der Zellwand ist das Bakterium davor geschützt, aufgrund des hohen osmotischen Druckes im Zellinneren zu zerplatzen. Das Lysozym greift nun am Kohlenhydratanteil der Zellwand an.

Zwei Sorten von Zuckern bilden das Polysaccharid, nämlich: N-Acetylglucosamin (GlcNAc, bzw. NAG) und N-Acetylmuraminsäure (MNAc, bzw. NAM). Diese sind Derivate von Glucosamin, in denen die Aminogruppe acetyliert ist. Das Zellwandpolysaccharid stellt ein alternierendes Polymer aus MNAc- und GlcNAc-Resten dar, welche  $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidisch verbunden sind. Lysozym nun ist eine

Glykosidase, die eben diese glykosidische Bindung zwischen dem C-1 von MNAc und dem C-4 von GlcNAc hydrolysiert [70].

Lysozym wird durch die Nierenglomeruli gefiltert und in den proximalen Tubuli reabsorbiert und verstoffwechselt. Weil ein Anstieg der glomerulären Filtration zu einem Anstieg des Serumspiegels führt und eine gestörte tubuläre Funktion zu einer erhöhten Urinausschüttung, ist es wichtig, die Nierenfunktion vor der Lysozymmessung zu überprüfen.

Erhöhte Serumlevel von Lysozym erleichtern die Diagnose von monozytärer und myelomonozytärer Leukämie [79,83]. Ebenso kann Lysozym als Parameter bei der Beurteilung der aktiven Sarkoidose dienen [80,81,82]. Hier wurde Lysozym hauptsächlich in Makrophagen und Epitheloidzellen von frischen Granulomen nachgewiesen, allerdings nicht in alten Läsionen [83].

## 2. Fragestellung

Neben der immer noch diskutierten Ätiologie der Sarkoidose, besteht eine weitere Schwierigkeit darin, sie in möglichst kurzer Zeit eindeutig zu diagnostizieren. Zwar existieren anerkannte Methoden und Parameter anhand derer man die Diagnose erhärten kann. Jedoch ist oft nur die Summe der Ergebnisse genügend aussagekräftig.

Der wohl bisher wichtigste und bekannteste Parameter ist ACE - das Angiotensin-konvertierende Enzym, welches bei Sarkoidosepatienten im Serum erhöht und messbar ist. Allerdings mangelt es an einer Trennschärfe, die eindeutig belegen kann, dass ein Patient mit einem bestimmten ACE-Wert sicher an einer Sarkoidose erkrankt ist. Zudem lassen sich auch bei an Sarkoidose erkrankten Personen normale Werte messen. Darüber hinaus werden erhöhte ACE-Serumwerte nicht exklusiv bei der Sarkoidose festgestellt [52]. Außerdem bestätigen mehrere Studien die Wichtigkeit der Berücksichtigung des seit 1990 bekannten Genpolymorphismus des ACE-Gens. Letztlich bestehen verschiedene Messverfahren, die unterschiedliche Normwerte liefern [98,109].

Neben dem Serum-ACE-Wert werden noch andere Parameter gemessen, namentlich der lösliche Interleukin-2-Rezeptor (sIL-2R) und das Lysozym, beides Proteine, die ebenfalls nicht ausschließlich bei der Sarkoidose erhöht sind.

Infolge der angeführten Problematik stellt sich nun die Frage nach aktuellen Normwerten von ACE. Dieser Arbeit liegt die Aufgabe zu Grunde diese zu bestimmen. Nachdem bei Patienten, die an Sarkoidose leiden auch die Werte des Lysozyms und des löslichen Interleukin-2-Rezeptors im Serum bestimmt werden, sollen diese ebenfalls überarbeitet werden. Daneben sollen Normwerte für das Zytokin Interleukin-8, welches ein Parameter bei der Diagnostik fibröser interstitieller Lungenerkrankungen ist, festgelegt werden.

## **3. Methoden**

Für den experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit fanden verschiedene Verfahren Anwendung, deren Funktion und Arbeitsweise im Folgenden erläutert werden.

### **3.1 Einteilung der Diagnosegruppen**

Das gesamte Patientenkollektiv umfasste 112 Patienten. Davon waren 66 an Sarkoidose erkrankt. Die Vergleichsgruppe wurde als fibrosierende interstitielle Lungenkrankheiten zusammengefasst. Sie bestand aus 46 Patienten.

Diesen Diagnosegruppen standen 49 Gesunde als Kontrollgruppe gegenüber.

#### **3.1.1 Sarkoidose**

Die Gruppe der Sarkoidosepatienten stellte mit 66 Individuen die größte Fraktion dar. Der Altersmittelwert lag bei 48,7 Jahren, wobei der älteste Patient 81 und der jüngste Patient 21 Jahre alt war. Die üblichen klinischen, radiologischen und histologischen Parameter wurden zur Diagnosestellung herangezogen. Zur Erhärtung der Diagnose wurde eine Bronchoskopie durchgeführt.

### **3.1.2 Fibrosierende interstitielle Lungenkrankheiten**

Die Vergleichsgruppe bestand aus 46 Patienten, welche unter dem Namen fibrosierende interstitielle Lungenkrankheiten zusammengefasst wurden. Innerhalb dieser Gruppe stellten die Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose mit 24 Personen den größten Anteil.

Der nächst größere Anteil setzte sich wie folgt zusammen: 5 Patienten mit exogener allergischer Alveolitis, 5 Patienten mit idiopathischer interstitieller Lungenkrankheit; den Rest bildeten je eine Strahlenpneumonitis, eine fibrosierende Alveolitis, eine Alveolarproteinose, eine floride interstitielle Lungenkrankheit, eine Gewebsverdichtung des rechten Oberlappens der Lunge, eine Miliartuberkulose, ein Z. n. chronischer eosinophiler Pneumonie, eine pulmonale Lipoidproteinose, eine Dermatomyositis mit Sklerodermie (Overlap-Syndrom), eine Dermatomyositis mit Lungenfibrose, eine Dermatomyositis mit Lungenbeteiligung und eine idiopathische Alveolitis.

Das mittlere Alter dieser Patienten lag bei 56,8 Jahren. Der älteste Patient war 77 und der jüngste 27 Jahre alt.

### **3.1.3 Kontrollpersonen**

Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von 49 Gesunden des kaukasischen Typs. Dieses setzte sich aus Freunden und Bekannten des Verfassers, sowie aus Klinikpersonal des Universitätsklinikums Würzburg zusammen. Um eventuell vorhandene Infektionen oder Entzündungen, die die Auswertung beeinträchtigen könnten auszuschließen, wurde von jeder Person der Kontrollgruppe ein kleines Blutbild erstellt. Dieses war in dieser Hinsicht ohne Ausnahme unauffällig. Das Alter der Personen in der Kontrollgruppe lag zwischen 22 und 53 Jahren, wobei der Mittelwert bei 32,1 Jahren lag.

## **3.2 Material und Methoden**

### **3.2.1 Probengewinnung und Vorbereitung**

Die Blutproben der Kontrollgruppe (Gesunde) wurden im Zeitraum vom 12.09.2001 bis 20.03.2002 abgenommen. Die Blutproben der Patienten wurden zwischen dem 25.07.2000 und dem 20.03.2002 entnommen.

Nachdem das Blut abgenommen worden war, ließ man die Monovette ca. 10 bis 15 Minuten stehen, um der Gerinnung entgegenzuwirken.

Darauf wurden die Monovetten 10 Minuten lang bei 4000 U/min und bei Raumtemperatur zentrifugiert. Schließlich wurde das Serum in Mikrovetten pipettiert und für ACE, sIL-2R und Lysozym bei  $-24^{\circ}\text{C}$  und für IL-8 bei  $-74^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### **3.2.2 Messung der Serummarker**

Um die Serummarker in den aufbereiteten Blutproben nachzuweisen und zu messen, wurden je nach Bedarf verschiedene Methoden angewandt.

### 3.2.2.1 ACE

#### 3.2.2.1.1 *Material und Methode*

Das Angiotensin - konvertierende Enzym katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II. Außerdem spaltet ACE ein synthetisches Substrat in ein Aminosäurederivat und ein Dipeptid. Die bei dieser Spaltungsreaktion entstehende Kinetik kann durch das Absinken der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden. Der folgende Test nutzt diese Erkenntnis, der sowohl von Hurst und Lovell-Smith [1], als auch von Neels [2] als standardisierte Methode beschrieben wurde.

Sämtliche erforderlichen Materialien waren im Testkit: Angiotensin Converting Enzyme/ACE kinetic der Bühlmann Laboratories AG [3] enthalten.

#### 3.2.2.1.2 *Durchführung*

Nachdem das Substrat und die Serumproben auf Raumtemperatur erwärmt wurden, konnten die Microcuvetten vorbereitet werden. Zunächst pipettierte man je 25µl des Kalibrators, der Kontrollseren (low/high) und des Patientenserums in die Kuvetten. Danach fügte man jeweils 250µl des Substrates hinzu und die Proben wurden gevortext. Im Anschluss folgte eine Inkubation für 5 Minuten in 37°C warmem Wasserbad.

Nach Abgleichen des Photometers mit destilliertem Wasser auf Null, wurde die Absorption der Proben zweimal innerhalb eines exakt zehnminütigen Zeitintervalls gemessen. Die Normwerte gab der Hersteller mit 18-55 ACE Units an, wobei 1 Unit ACE als die Menge ACE definiert ist, die benötigt wird um 1µmol Hippurylsäure pro Minute und pro Liter Serum bei 37°C freizusetzen. Insofern kann man die Einheit auch 1ACE Unit/l nennen.

### 3.2.2.1.3 Auswertung

Um die Enzymaktivität zu berechnen wurde folgende Formel benutzt:

$$E_x = \frac{\Delta A_x}{\Delta A_c} * E_c$$

Dabei bezeichnet  $E_x$  die Enzymaktivität der Probe,  $\Delta A_x$  die Absorptionsdifferenz der Proben,  $\Delta A_c$  den Mittelwert der Absorptionsdifferenzen des Kalibrators und schließlich  $E_c$  die Enzymaktivität des Kalibrators.

Bei 3 Units/l war die untere Nachweisgrenze für ACE erreicht [3].

### 3.2.2.2 sIL-2R

#### 3.2.2.2.1 Material

Zur Bestimmung von löslichem Interleukin-2 Rezeptor (sIL-2R) im Serum fand der Milenia sIL-2R-Test der Firma Milenia Biotec Verwendung. Dieser stellt einen Enzymimmunoassay im Mikrotiterplattenformat mit einer Flüssigphasen-Inkubation zur quantitativen Bestimmung von sIL-2R dar. Die Festphase war mit einem universellen Liganden beschichtet [4]. Das Testkit enthielt alle benötigten Komponenten.

#### *3.2.2.2.2 Methode*

Die Patientenproben, Kontrollen und Standards wurden zusammen mit einem monoklonalen, Ligand-gekoppelten IL-2R Antikörper und einem zweiten monoklonalen, mit Meerrettichperoxidase markierten Antikörper in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Diese waren Ligand-beschichtet. In der 60-minütigen Inkubationsphase reagierte der Rezeptor mit den Antikörpern. Ein sogenannter Sandwich-Komplex aus sIL-2R und den beiden Antikörpern hatte sich gebildet.

Nachdem ein multivalenter Anti-Ligand zugegeben wurde, band sich in der zweiten 60-minütigen Inkubation der Sandwich-Komplex an die Oberfläche der Ligand-markierten Vertiefungen. Durch einen Waschvorgang wurden nicht-gebundene Komponenten entfernt.

Danach zugegebenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) wurde vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Nach 30 Minuten beendete man die Enzymreaktion durch eine Stopplösung (Salzsäure). Eine Veränderung der Farbe von Blau nach Gelb machte dies sichtbar.

Bei einer Wellenlänge von 450nm konnte die optische Dichte der Lösung gemessen werden. Diese entsprach der Konzentration von sIL-2R in den Proben [4].

#### *3.2.2.2.3 Durchführung*

Zunächst wurden sämtliche Komponenten des Testkits und die Proben auf Raumtemperatur erwärmt. Danach musste eine Verdünnungsreihe angesetzt werden. Im nächsten Schritt wurden je 25µl Standards, Kontrollen und Patientenproben entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettiert.

Daraufhin pipettierte man zuerst 100µl Ligand-markierter sIL-2R Antikörper, danach 100µl Enzym-markierter sIL-2R Antikörper in jede Vertiefung. Anschließend wurde die Platte mit Klebefolie verschlossen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Hierauf wurden in jede Vertiefung 25 µl sIL-2R Anti-Ligand pipettiert und die Platte verschlossen wiederum für 60 Minuten inkubiert.

Die Platte wurde nun dekantiert und 4 Mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen.

Jetzt wurden in jede Vertiefung 200 µl TMB-Substratlösung pipettiert und die Platte für 30 Minuten im Dunkeln zum Inkubieren gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in jede Vertiefung 50 µl Stopplösung gegeben [4].

#### *3.2.2.2.4 Auswertung*

Mithilfe eines Photometers konnte innerhalb von 15 Minuten die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Der Normbereich der Kontrollen wurde dabei vom Hersteller mit 85 bis 961 U/ml (631 U/ml für die niedrige und 3012 U/ml für die hohe Kontrolle) angegeben. Die untere Nachweisgrenze lag bei 48 U/ml [4]

### **3.2.2.3 IL-8**

#### *3.2.2.3.1 Material*

Für den Nachweis von Interleukin-8 im Serum wurde der Human IL-8 Immunoassay Quantikine<sup>R</sup> der Firma R&D Systems verwendet [5]. Alle benötigten Materialien waren Bestandteile des Testkits.

#### 3.2.2.3.2 Methode

Der Test funktionierte auf der Grundlage eines ELISA (enzyme-linked-immunoabsorbent-assay), ähnlich dem in Kapitel 6.2.2 dargestellten zur Bestimmung von sIL-2R.

In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurde eine Matrix aus monoklonalen Antikörpern, die für IL-8 spezifisch sind aufgebracht. In diese Vertiefungen wurden nun die Standards, die Proben und das Konjugat (polyklonale, Meerrettichperoxidase-gebundene Antikörper gegen IL-8) pipettiert. Zwischen dem immobilisierten Antikörper, dem IL-8 und dem enzymgebundenen polyklonalen Antikörper entstand nun ein Sandwich-Komplex. Nach einem Waschvorgang, bei dem alle ungebundenen Substanzen entfernt wurden, wurde ein Substrat (TMB) hinzugefügt.

Die sich hieraus ergebende Farbentwicklung war proportional zur vorhandenen Menge an IL-8. Eine Stopplösung (Schwefelsäure) beendete die Reaktion und die Farbintensität konnte gemessen werden [5].

#### 3.2.2.3.3 Durchführung

Nachdem alle Komponenten und die Proben auf Raumtemperatur gebracht wurden, erfolgte die Herstellung der Pufferlösung. Hierfür wurden 20 ml des Waschpuffer-Konzentrates mit destilliertem Wasser verdünnt, bis 500 ml Pufferlösung entstanden.

Bevor die Verdünnungsreihe angesetzt wurde, wurde der Originalstandard vorsichtig und gründlich gemischt. Die Konzentration dieser Stocklösung betrug 2000 pg/ml.

In jedes Reagenzglas wurden nun 500µl der Verdünnungslösung pipettiert. Mithilfe der Stocklösung erstellte man dann eine Verdünnungsreihe, wobei der Standard mit 2000 pg/ml als höchste Konzentration diente und die Verdünnungslösung als niedrigste Konzentration. Die Konzentrationen dieser Standardverdünnungsreihe betragen: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2 und 0 pg/ml.

Indem man die Farblösungen A und B im selben Verhältnis zueinander mischte, entstand die Substratlösung [5].

In jede Vertiefung wurden nun 100µl der Testlösung RD1-8 pipettiert. Im nächsten Arbeitsschritt pipettierte man 50µl Standard bzw. Serumproben hinzu. Nach der Zugabe von 100µl Konjugats wurde die Mikrotiterplatte abgedeckt und sollte für drei Stunden inkubieren.

Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte eine sechsfache Waschung mit der Pufferlösung. In der Folge wurden in jede Vertiefung 200µl des Substrats pipettiert und die Platte inkubiert für weitere 30 Minuten, diesmal lichtgeschützt. 50µl der Stopplösung beendeten die Reaktion.

#### *3.2.2.3.4 Auswertung*

Innerhalb der nächsten 30 Minuten erfolgte die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm und die programmierte automatische Ausgabe der IL-8-Konzentrationen mit Hilfe des Photometers Dynatech MR5000 der Firma Dynatech Laboratories. Die minimal nachweisbare Menge an IL-8 betrug weniger als 10 pg/ml [5].

### **3.2.2.4 Lysozym**

#### *3.2.2.4.1 Material*

Bei dem Test kamen Produkte der Firma Sigma zur Verwendung.

### *Phosphatpuffer (76mMol/l; PH 6,3)*

Zunächst musste ein Fläschchen Phosphatpufferextrakt (Sigma P8165) 34 mmol/l, PH 6,6 für 3,8l in etwas weniger als 1700 ml destillierten Wassers gelöst werden. Mit 1N HCL<sup>-</sup> wurde der PH auf 6,3 eingestellt und die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1700ml aufgefüllt.

### *Bakterienlösung*

Zur Herstellung der Bakterienlösung wurden 20mg eines Micrococcus lysodeicticus Lyophilisats (Sigma M 3770) in 100 ml Pufferlösung gemischt. Da man je Probe 3 ml brauchte, war es notwendig, bei entsprechender Probenanzahl mehr Lösung anzusetzen. Damit die Suspension gleichmäßig blieb, ließ man sie beim Aufziehen rühren.

### *Standard*

Um eine Standardverdünnungsreihe anzusetzen, wurden 20mg Lyozym (Sigma L 7651) in 100 ml isotoner Kochsalzlösung gelöst. Bei einer Substanzausgangskonzentration von 70000 Units/mg des Lyophilisats und 73000 Units/mg Protein, betrug die Konzentration der Lyozymlösung nun 14000 Units/ml.

#### 3.2.2.4.2 Methode

Das Prinzip des Tests bestand in einer photometrischen Trübungsmessung, wobei der Lysozymgehalt der Proben indirekt durch die Reduzierung eines lysozymsensiblen Bakterienstammes *Micrococcus Lysodeicticus* gemessen werden konnte.

Hierbei ließ eine hellere Probenlösung auf eine höhere Lysozymaktivität schließen und vice versa. Durch eine photometrische Messung und den Lysozymstandard war die Trübung objektivierbar. Die Einheit für die Lysozymmenge in den Proben wurde in U/ml angegeben.

#### 3.2.2.4.3 Durchführung

Um sicherzugehen, dass eine ausreichende Qualität erreicht wurde, mussten zwei Standardverdünnungsreihen SVR 1 und SVR 2(je Standard 1-10) angesetzt werden.

<b>Standard</b>	<b>Konzentration des Standards in U/ml</b>	<b>Volumen der Lysozymlösung in ml</b>	<b>Volumen der isotonen NaCl-Lösung In ml</b>
	7000	2000	2000
S1	4200	3000	2000
S2	3500	2500	500
S3	2800	200	500
S4	2100	1500	500
S5	1500	500	200
S6	1200	400	100
S7	900	300	100
S8	600	200	100
S9	300	100	100
S10	150	100	100

Nachdem die Bakterienlösung im Wasserbad auf exakt 25°C temperiert wurde, wurde das Photometer eingeschaltet und das Thermostat ebenfalls auf 25°C eingestellt. Im Folgenden kamen Makroküvetten mit einer Schichtdicke von 10mm zum Einsatz. Die Wellenlänge bei der Messung betrug 546nm. Pro Küvette wurden 3 ml der Bakterienlösung pipettiert.

Nach der Zugabe von 50µl Standard - oder Probenlösung, erfolgte zeitgleich die Aktivierung der Stoppuhr und das Abdecken und gleichmäßige Schütteln der Küvette. 30 Sekunden später konnte die erste Extinktion  $E_1$  abgelesen werden, weitere 120 Sekunden darauf die zweite Extinktion  $E_2$ . Dazu diente das Photometer Ultraspec 3000 der Firma Amersham Pharmacia Biotech Ltd. UK Ltd., Little Chalfont, Buckinghamshire.

#### *3.2.2.4.4 Auswertung*

Mithilfe der Extinktionsdifferenzen der Standards ( $\Delta E = E_1 - E_2$ ) konnte die Standard-Eichkurve erstellt werden. Für die graphische Darstellung der Standard- Eichkurve wurden die errechneten Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen  $\Delta E$  von den beiden Standardsverdünnungsreihen SVR 1 und SVR 2 herangezogen. Mit den berechneten Extinktionsdifferenzen der Proben wurde die entsprechende Lysozymaktivität mittels der Standard-Eichkurve in U/ml erstellt. Ebenso wie bei den Standards erfolgte eine Doppelbestimmung und die Nutzung der Differenzen der Mittelwerte. Bei 150 U/ml lag die untere Nachweisgrenze von Lysozym.

### 3.2.3 Lungenfunktion

Die Lungenfunktionsanalyse erfolgte mithilfe eines Bodyplethysmographen der Firma ViaSys (Höchberg). Verwendet wurden die Prozentwerte der Parameter (Prozent des Sollwerts).

### 3.2.4 Statistik

Zur Beschreibung der Ergebnisse dieser prospektiven, deskriptiven Studie werden folgende Tests verwendet:

- Die **Probit-Darstellung** einer Messserie gegen die Gaußsche Umkehrfunktion der Ränge mit dem Vertrauensbereich für Gaußverteilte Werte nach Lillefors.
- Der **Chi-Quadrat-Test** beschreibt die Abhängigkeiten zwischen zwei klassifizierten Variablen. Der Chi-Quadrat-Test wird nach der Maximum-Likelihood-Methode berechnet.
- Mit dem **U-Test nach Mann und Whitney** vergleicht man einen Messwert, zwischen zwei Gruppen wenn keine Gaußsche Normalverteilung der Messwerte angenommen werden kann.
- Die einfaktorielle **Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis** ersetzt den U-Test, wenn zwischen drei oder mehr Gruppen zu vergleichen ist.
- Die **Rangkorrelation nach Spearman** beschreibt die Abhängigkeit von zwei Messwerten. Die Kendallsche Korrelation setzt keine Gaußsche Normalverteilung voraus. Der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient wird mit rho oder  $\rho$  bezeichnet.

- Die **Rangkorrelation nach Kendall** ersetzt die Spearmansche Rangkorrelation, wenn die zu testenden Werte Rangbindungen aufweisen, d.h. viele gleiche Werte. Wegen der Unempfindlichkeit gegenüber Rangbindungen kann man diese Korrelation auch für Schweregrad-Einteilungen, verwenden. Der Kendallsche Rangkorrelationskoeffizient wird mit tau oder  $\tau$  bezeichnet.
- Der **Vergleich von Regressionsgeraden** nach Draper und Smith. Dieses Verfahren ist nur für Gaußverteilte Werte zuverlässig. Für zwei oder mehr Gruppen von Probanden werden Regressionsgeraden berechnet und die Steigungen werden auf Gleichheit getestet.
- Die **Receiver-Operating-Characteristic (ROC)** berechnet zu einer bivariaten Klassifikation für alle Unterteilungen einer Messreihe Sensitivität und Spezifität. Dies dient zur Festlegung einer optimalen Einteilung der Messreihe.

Um die Testergebnisse quantitativ vergleichen zu können, werden p-Werte berechnet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wird als signifikant bezeichnet und das Ergebnis wird als wesentlich interpretiert. Die p-Werte werden wie gewohnt mit Stern-Symbolen gekennzeichnet:

$p < 0,05$  mit \*,  $p < 0,01$  mit \*\* und  $p < 0,001$  mit \*\*\* .

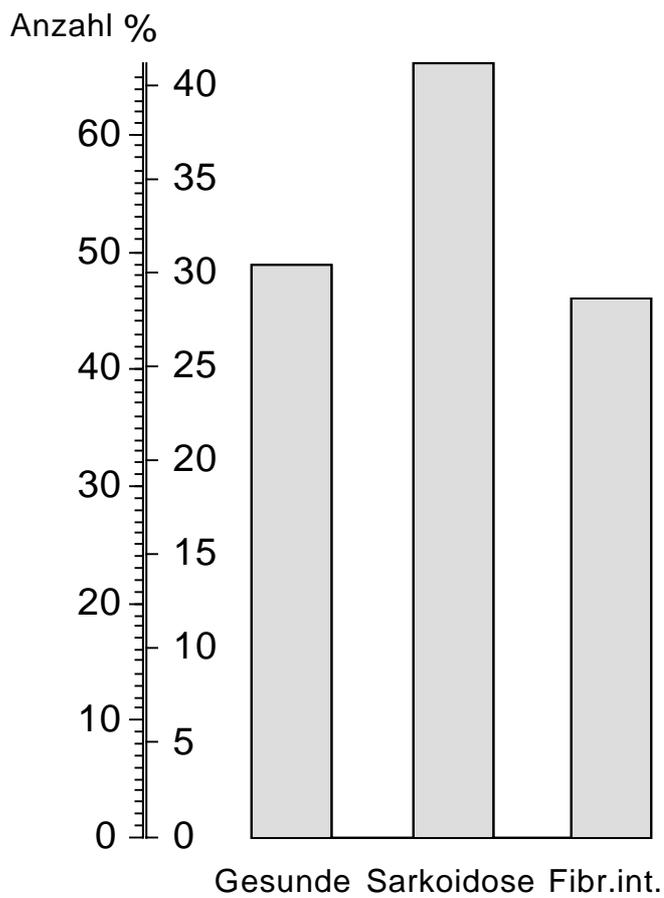
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Diagnosen

Die untersuchte Patientengruppe umfasst 66 Patienten mit Sarkoidose im Vergleich zu 46 Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. Hinzu kommen 49 gesunde Kontrollpersonen (Tab.1, Abb.1).

<b>Diagnose</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Sarkoidose	66	40.99 %
fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen	46	28.57 %
Gesunde	49	30.43 %
Gesamt	161	100.00 %

***Tabelle 1.** Anzahl und Prozentsatz der Patienten in den Diagnosegruppen.*



**Abbildung 1.** Diagnose. Anzahl und Prozentsatz der Patienten mit den genannten Diagnosen. Fibr.int. = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen.

## 4.2 Diagnosen und Demographisches

Von den 161 Patienten und Probanden waren 76 (48,4 %) männlich und 83 (51,6 %) weiblich.

Der jüngste Patient war 21, die älteste Patientin 81 Jahre alt. Das mittlere Alter der Patienten und Probanden betrug 46.2 Jahre. Wobei die Sarkoidosepatienten im Mittel 49.2 und die Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen 57.3 Jahre alt waren. Der Mittelwert der Kontrollpersonen betrug 32.1 Jahre.

Die Frauen waren mit  $46.4 \pm 16.3$  Jahren um 4 Monate Jahre älter, als die Männer mit  $46.1 \pm 14.7$  Jahren. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ( $p = 0.92$  im U-Test nach Mann und Whitney).

Das Alter der Patienten mit Sarkoidose war signifikant niedriger, als das der Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. Die Kontrollpersonen wiederum waren signifikant jünger, als die Sarkoidosepatienten.

Der Frauenanteil in den drei Gruppen ist nicht signifikant unterschiedlich (Tab.2).

Diagnose	Geschlecht				Alter	
	n	m n	w n	%	MW	ST
Gesunde	49	20	29	59.18%	32.143	7.494
Sarkoidose	66	35	31	46.97%	49.156	13.586
fibros. Lungenerkrankungen	interstit. 46	23	23	50.00%	57.283	13.072
Gesamt	161	78	83	51.55%	46.264	15.489

**Tabelle 2.** Alter und Geschlecht der Lungenpatienten. *m* = männlich, *w* = weiblich, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung.  $p = 0.42$  für Unterschiede in der Geschlechterverteilung in den Diagnosegruppen aus dem Chi-Quadrat-Test,  $p < 0.000005^{***}$  für Altersunterschiede zwischen den 3 Gruppen,  $p = 0.0010^{***}$  für Altersunterschiede zwischen den beiden Diagnosen und  $p < 0.000005^{***}$  für Altersunterschiede zwischen Gesunden und Sarkoidose-Patienten.  $p$  aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis bzw. aus dem U-Test nach Mann und Whitney .

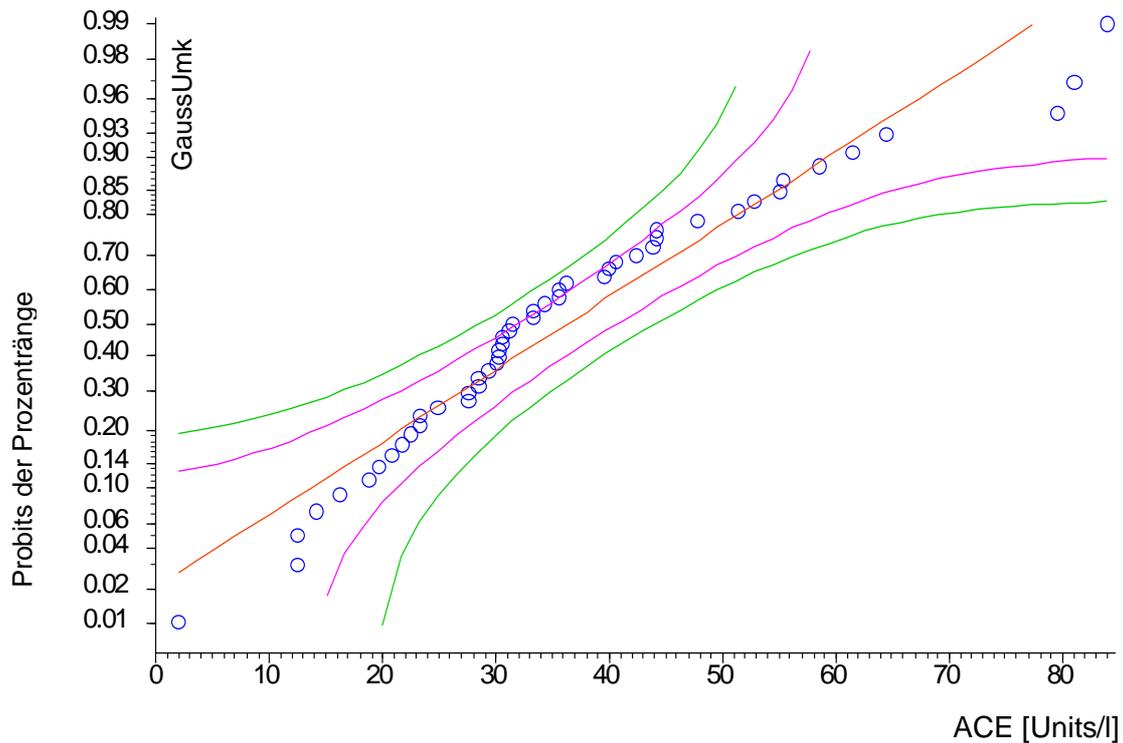
## 4.3 Serummarker

Das Hauptziel dieser Studie bestand darin, neue Normwerte für ACE zu bestimmen und Normwerte für Lysozym, sIL-2R und IL-8 zu erstellen.

Die ACE-Werte wiesen keine vollkommene Gaußverteilung auf. Allerdings waren die Abweichungen nicht schwerwiegend. Ideal gaußverteilte Werte würden auf der mittleren (roten) Geraden liegen. Wenn sich alle Punkte zwischen den inneren (magentafarbenen) Linien befänden, wäre das noch tolerabel. Erschienen jedoch einige Punkte außerhalb der äußeren (grünen) Linien, existierte keine Gaußverteilung mehr.

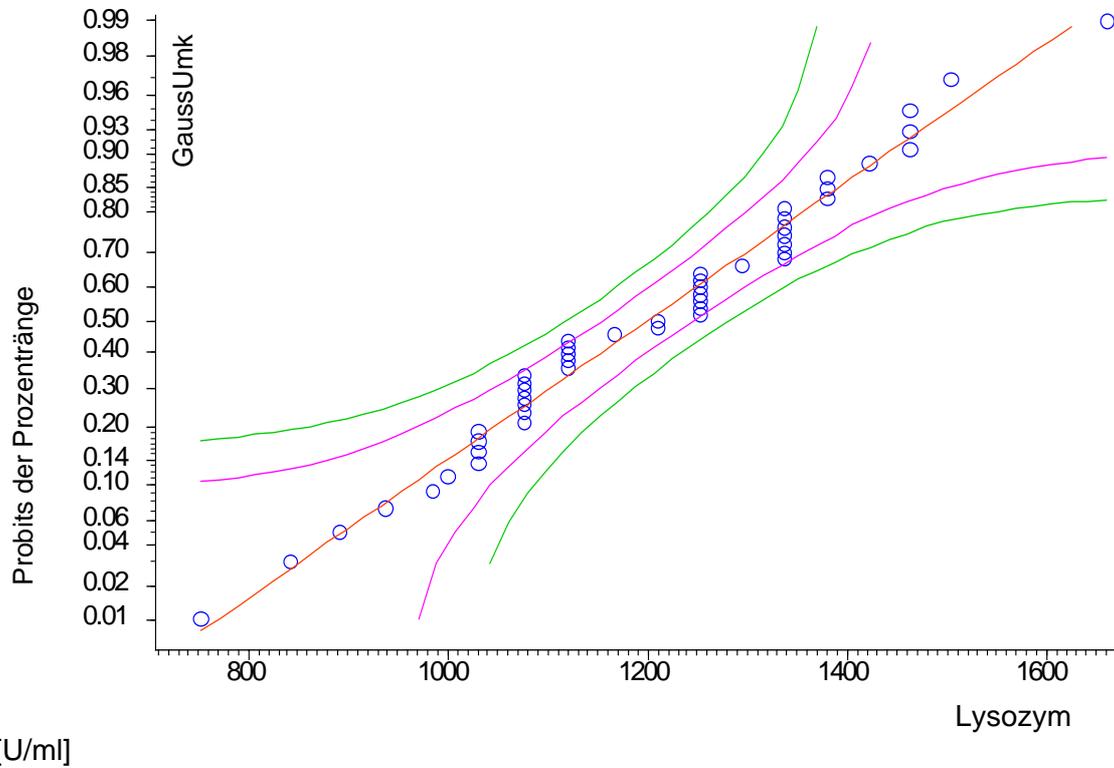
Zwischen einem ACE von 31 bis 45 U/l lagen die Werte zwar auf der oberen magentafarbenen Begrenzung, das heißt immer noch im 30%-Bereich und bei einem ACE von 38 U/l sogar leicht darüber im 1%-Bereich. Allerdings konnte man zur Gewinnung des Normbereiches von einer Gaußverteilung ausgehen.

Eine spezielle Einteilung der y-Achse - Probit genannt - bewirkte, dass gaußverteilte Werte auf der roten Geraden lagen. Für ACE und besonders für Lysozym zeigte diese Probit-Darstellung, dass man eine Gaußverteilung annehmen konnte (Abbildung 2).



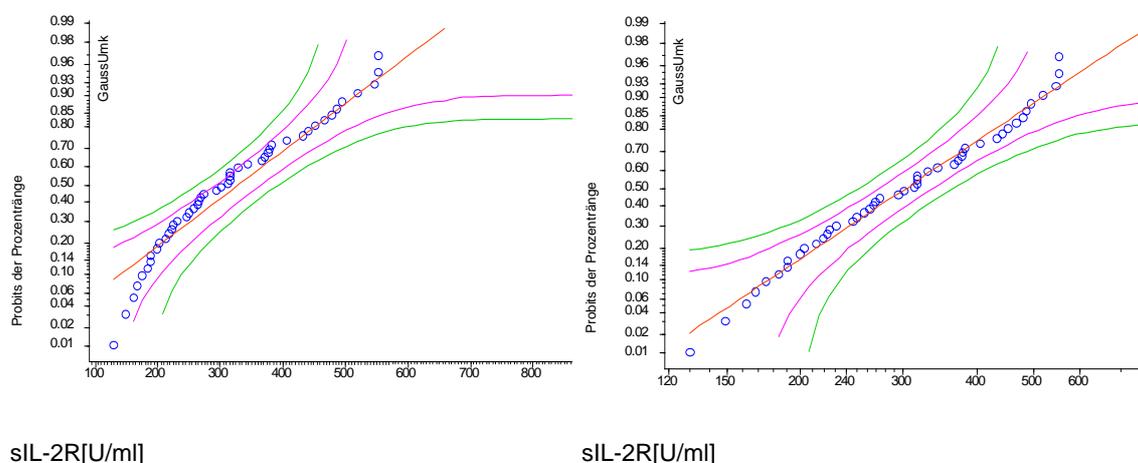
**Abbildung 2.** Probit-Darstellung zur Beurteilung der Verteilung der ACE-Werte der gesunden Probanden. Auf der mittleren roten Linie würden die Punkte bei idealer Gaußverteilung liegen. Die magentafarbenen Linien begrenzen den 30%-Bereich und die äußeren grünen den 1%-Bereich für Punkte aus einer Gaußschen Normalverteilung.

Die Lysozym-Werte lagen noch deutlicher auf der mittleren Geraden (Abbildung 3). In dieser Grafik ist erkennbar, dass keiner der Lysozym-Werte außerhalb des 30%-Bereiches lag, was eine Gaußverteilung nahe legte. Ebenso existierten keine - zwar tolerierbaren - „Ausreißer“ im 1%-Bereich.



**Abbildung 3.** Probit-Darstellung zur Beurteilung der Verteilung der Lysozym-Werte der gesunden Probanden. Auf der mittleren roten Linie würden die Punkte bei idealer Gaußverteilung liegen. Die magentafarbenen Linien begrenzen den 30%-Bereich und die äußeren grünen den 1%-Bereich für Punkte aus einer Gaußschen Normalverteilung.

Die Werte von sIL-2R jedoch wiesen eine offensichtliche Biegung auf, welche vermuten ließ, dass hier keine ideal gaußverteilten Werte vorlagen. Nach logarithmischer Transformation kamen diese einer Gaußverteilung allerdings deutlich näher. Dies konnte man anhand der beiden Grafiken in Abbildung 4 gut erkennen. Die Verteilung der sIL-2R-Werte war gerade im unteren Anteil der rechten logarithmisch transformierten Grafik zwischen 120 und 240 U/ml augenscheinlich linearer.

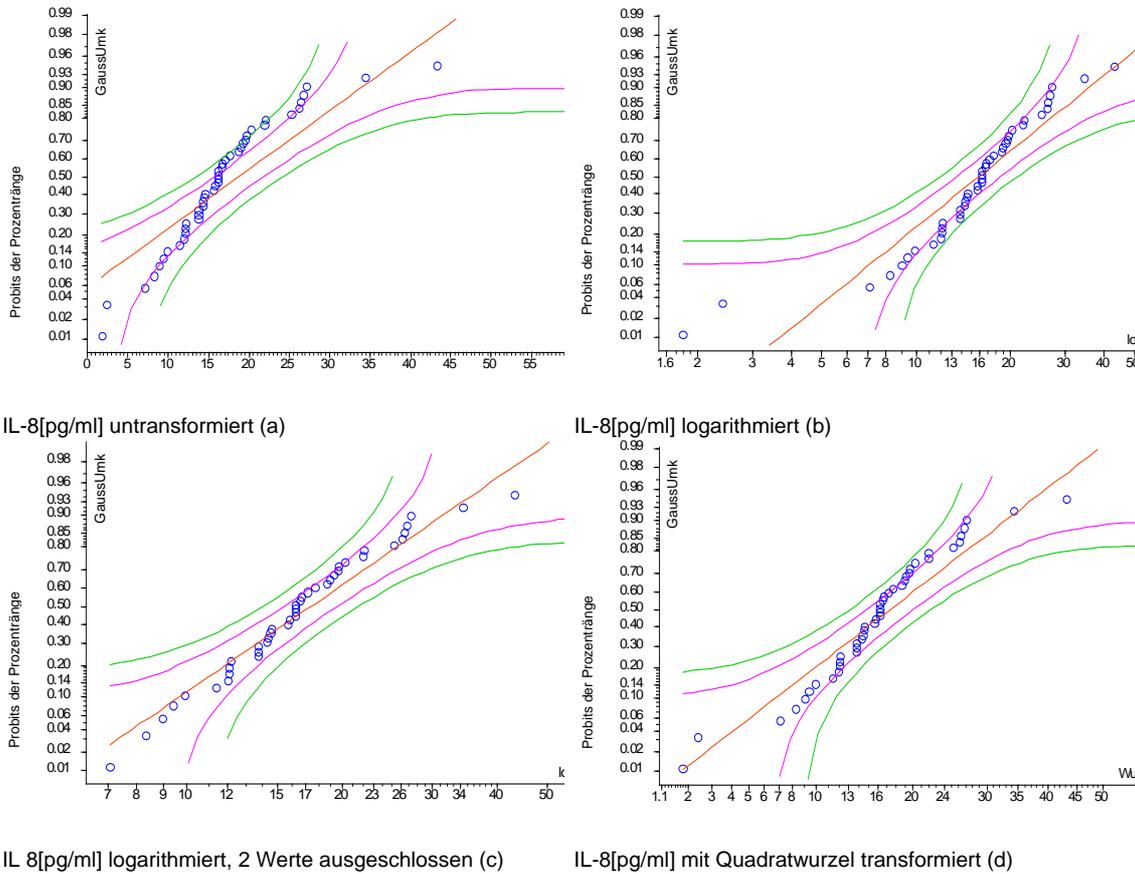


**Abbildung 4.** Probit-Darstellung zur Beurteilung der Verteilung der sIL-2R-Werte der gesunden Probanden. Linkes Bild (a) = untransformierte Werte, rechtes Bild (b) = Achse mit  $\log(\text{sIL-2R})$  transformiert. Auf der mittleren roten Linie würden die Punkte bei idealer Gaußverteilung liegen. Die magentafarbenen Linien begrenzen den 30%-Bereich und die äußeren grünen den 1%-Bereich für Punkte aus einer Gaußschen Normalverteilung.

Die Messwerte von IL-8 waren am problematischsten, da sie die stärkste Abweichung von der Gaußverteilung zeigten. Einige Punkte lagen sogar außerhalb des 1%-Bereiches (Abbildung 5a)!

Teilte man aber die x-Achse logarithmisch ein (Abb. 5b), fielen die zwei sehr niedrigen Werte im Bereich zwischen 1.6 und 3 pg/ml auf, welche die Verteilung zerstörten. Zeichnete man die Probit-Darstellung nun ohne diese beiden Werte, ergab sich eine bessere Verteilung (Abb. 5c). Dies war natürlich nicht zulässig. Als Kompromiss wurde

eine andere Transformation gewählt, die eine brauchbare Annäherung an die Gaußverteilung bewirkte, nämlich die Transformation mit der Quadratwurzel (Abb. 5d).



**Abbildung 5.** Probit-Darstellung zur Charakteristik der Verteilung der IL-8-Werte der gesunden Probanden. (a) untransformierte Werte, (b) Achse mit  $\log(\text{IL-8})$  transformiert, (c) Achse nach Ausschluss der beiden niedrigsten Werte mit  $\log(\text{IL-8})$  transformiert, (d) Achse mit  $\sqrt{\text{IL-8}}$  transformiert. Auf der mittleren roten Linie würden die Punkte bei idealer Gaußverteilung liegen. Die magentafarbenen Linien begrenzen den 30%-Bereich und die äußeren grünen den 1%-Bereich für Punkte aus einer Gaußschen Normalverteilung.

Da die sIL-2R-Werte und die IL-8-Werte nicht gaußverteilt waren, umfasste der 2-s-Bereich nicht näherungsweise 95% der Werte. Allerdings ließ sich sIL-2R durch Logarithmieren auf eine Verteilung bringen, die nicht mehr wesentlich von einer Gaußverteilung abwich (Abb. 4b).

Aus den Logarithmen der Werte der Patienten berechnete man den Mittelwert, die Standardabweichung und als  $MW \pm 1.96 \times ST$  den 95%-Bereich. In Tabelle 3 wurden diese Ergebnisse delogarithmiert eingetragen. Der Mittelwert stellte damit das sogenannte „geometrische Mittel“ dar und der Bereich, der asymmetrisch war, umfasste 95% der Probanden.

Für IL-8 wurde das analoge Verfahren, mit der Quadratwurzel anstelle des Logarithmus ausgeführt.

Tabelle 3 veranschaulicht die Mittelwerte der einzelnen Serummarker und ihre Normbereiche. Das Normspektrum von ACE bezogen auf ein 95%-Konfidenzintervall lag zwischen 1.55 und 71.17 Units/l, mit einem Mittelwert von 36.4 Units/l. Der Normbereich von Lysozym reichte von 836.51 bis 1563.64 U/ml mit einem Mittelwert von 1200.1 U/ml. sIL-2R-Normwerte befanden sich zwischen 133.91 und 682.84 U/ml, der Mittelwert ist 302.4 U/ml. Hingegen betragen die Normwerte von IL-8 3.12 bis 43.02 pg/ml, der Mittelwert lag bei 17.3 pg/ml.

Die Genauigkeit der Mittelwerte war für ACE: 31 bis 41 Units/l, für Lysozym: 1148 bis 1252 U/ml, für sIL-2R: 269 bis 340 U/ml und für IL-8: 15.5 bis 20.4 pg/ml.

Marker	Transf.	n	MW	ST	95% -Bereich	
ACE [Units/l]	-	49	36.365	17.762	1.55	71.17
Lysozym [U/ml]	-	49	1200.082	185.497	836.51	1563.64
sIL-2R [U/ml]	Geom	48	302.398	1.515	133.91	682.84
IL-8 [pg/ml]	Wurzel	46	17.331	1.495	3.12	43.02

**Tabelle 3.** Normbereich der Marker anhand der Gruppe der gesunden Probanden. Wegen der Abweichungen von der Gaußschen Normalverteilung wurden die angegebenen Werte für sIL-2R aus den logarithmierten Rohwerten berechnet, die für IL-8 aus der Quadratwurzel der Rohwerte. Transf. = Art der Transformation, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, 95%-Bereich = Bereich, in dem 95% der Werte liegen. Die Standardabweichungen von sIL-2R und IL-8 sind die der transformierten Werte.

Ein anderer Weg, um das Problem der fehlenden Gaußverteilung zu umgehen bestand darin, statt des Mittelwertes den Median mit seinen Vertrauensbereichen zu berechnen. Der Median setzte keine besondere Verteilung voraus, die Bereiche waren aber etwas breiter, da der Median das weniger präzise Verfahren war.

In diesem Fall lag der Normbereich für ACE zwischen 12.500 und 80.720 Units/l, bei einem Median von 31.400 Units/l. Für Lysozym reichte der Normbereich von 852.600 bis 1495.000 U/ml, während der Median bei 1210.000 U/ml lag. Der Normbereich für sIL-2R erstreckte sich von 151.275 bis 552.000 U/ml mit einem Median von 307.000 U/ml. Für IL-8 schließlich wurde der nicht-pathologische Bereich von 2.988 pg/ml und 57.650 pg/ml eingegrenzt. Hier betrug der Median 16.300 pg/ml.

Der Präzisionsbereich dieser Untersuchung lag für ACE zwischen 29.5 und 39 Units/l, der des Lysozyms zwischen 1121 und 1253 U/ml, der des sIL-2R zwischen 255 und 367.5 U/ml und der des IL-8 zwischen 14.4 und 18.7 pg/ml.

Diese Werte differierten von denen aus Tabelle 3, die Mediane lagen jedoch in den dort angegebenen Genauigkeitsbereichen (Tab.5).

<b>Marker</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Median</b>	<b>95%-Bereich</b>	
ACE [Units/l]	49	31.400	12.500	80.720
Lysozym [U/ml]	49	1210.000	852.600	1495.000
sIL2-R [U/ml]	48	307.000	151.275	552.000
IL-8 [pg/ml]	46	16.300	2.988	57.650

**Tabelle 4.** Normbereiche der Marker aus dem **Median** der Marker-Werte bei den gesunden Probanden

### **4.3.1 Diagnose und Serummarker**

IL-8 zeigte keinerlei Unterscheidung zwischen den Diagnosegruppen. Der signifikante Effekt von ACE und sIL-2R war nur unspezifisch zwischen den gesunden Kontrollen und den Lungenpatienten. Das bedeutete, dass man mithilfe von ACE und sIL-2R zwar feststellen könnte, dass bei erhöhten Werten eine Lungenerkrankung vorliegen könnte. Allerdings war es nicht möglich, allein anhand dieser Marker die Diagnose zu stellen. Dabei war zu beachten, dass ACE Werte in der vorliegenden Untersuchung fast nur bei den Sarkoidose-Patienten und den Kontrollen erhoben wurden.

Lysozym jedoch differenzierte auch zwischen den Lungenerkrankungen. Bei Sarkoidose fand sich höheres und bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen ein gegenüber den gesunden Kontrollen erniedrigtes Lysozym (Tab. 5).

Marker	Diagnose:	n	MW	ST	p	P
ACE [Units/l]	Sarkoidose	58	50.1552	30.7812	0.035 *	0.41
	interstitielle LE.	4	38.9250	31.4924		
	Gesunde	49	36.3653	17.7623		
Lysozym [U/ml]	Sarkoidose	64	1417.25	526.5	0.0078 **	0.0069**
	interstitielle LE.	30	1123.40	581.9		
	Gesunde	49	1200.08	185.5		
sIL-2R [U/ml]	Sarkoidose	64	1014.33	983.5	< 0.000005 ***	0.20
	interstitielle LE.	28	711.75	565.1		
	Gesunde	48	329.58	145.9		
IL-8 [pg/ml]	Sarkoidose	17	48.6588	63.767	0.11	0.39
	interstitielle LE.	40	36.4250	47.249		

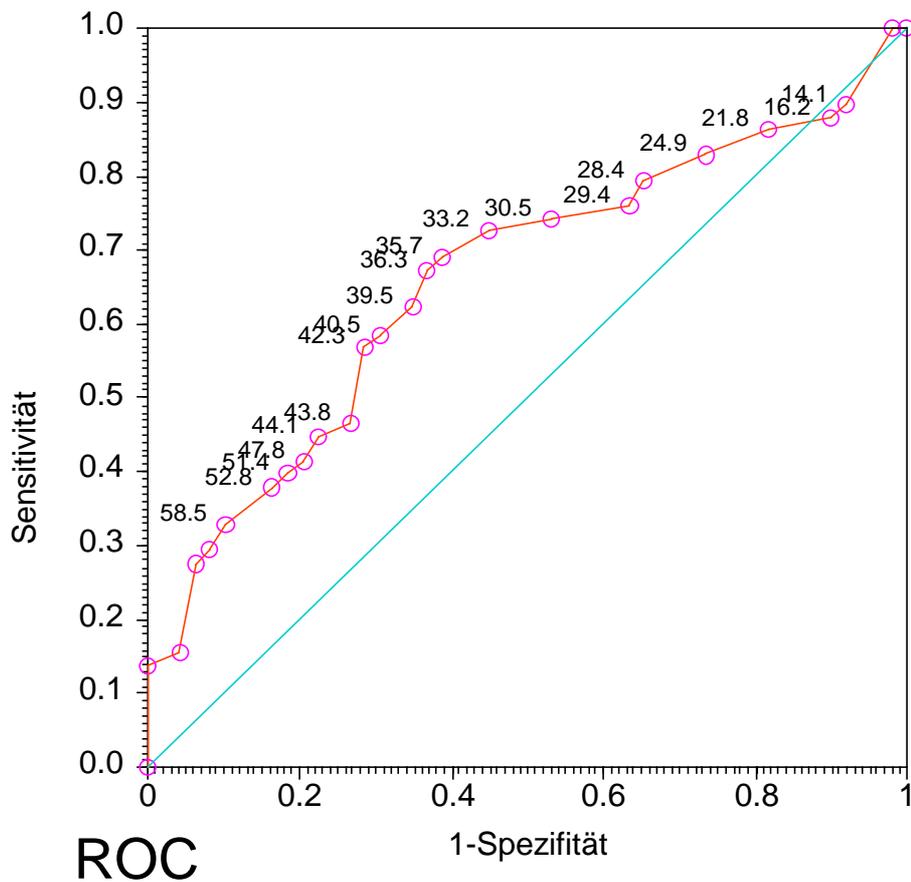
**Tabelle 5.** Entzündungsmarker der Diagnosegruppen. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, interstitielle LE = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankung. p zwischen allen 3 Gruppen aus der Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis und p zwischen den beiden Lungenerkrankungs-Gruppen aus dem U-Test nach Mann und Whitney. Das p in der Rangvarianzanalyse gilt jeweils für **alle** Diagnosen; Signifikanz besagt: „nicht alle Werte sind gleich, mindestens einer ist anders“

Alle vier Mittelwerte der Serummarker lagen bei den Sarkoidose-Patienten signifikant über denen der gesunden Probanden. Das heißt, erhöhte Werte der untersuchten Marker ließen eine Sarkoidose-Erkrankung vermuten. So lagen beispielsweise die ACE-Werte der Sarkoidose-Patienten im Mittel bei 50.2 Units/l im Gegensatz zu 36.4 Units/l bei den Gesunden. Der Mittelwert des Lysozyms von Sarkoidose-Kranken lag bei 1417.2 U/ml, gegenüber 1200.1 U/ml bei den Kontrollen. Auch die sIL-2R-Werte der Sarkoidose-Patienten waren mit 1014.3 U/ml deutlich über denjenigen der Gesunden mit 329.6 U/ml. Zwar wurde die Signifikanzschwelle im Vergleich der IL-8-Werte von Sarkoidose-Patienten mit gesunden Kontrollen nicht ganz erreicht. Doch rundete man den p-Wert auf 0.050, so erhielt man deutlich unterscheidende Werte zwischen Sarkoidose-Patienten mit 48.6 pg/ml und Gesunden mit 18.8 pg/ml (Tabelle 6).

Parameter		n	MW	ST	P
	Gesunde	46	18.7935	11.803	—
ACE [Units/l]	Gesund	49	36.365	17.762	0.011*
	Sarkoidose	58	50.155	30.781	
Lysozym [U/ml]	Gesund	49	1200.082	185.497	0.027*
	Sarkoidose	64	1417.250	526.513	
sIL-2R [U/ml]	Gesund	48	329.583	145.851	<0.000005 ***
	Sarkoidose	64	1014.328	983.535	
IL-8 [pg/ml]	Gesund	46	18.793	11.803	0.050
	Sarkoidose	17	48.659	63.767	

**Tabelle 6.** Vergleich der Sarkoidose-Patienten mit den gesunden Probanden bezüglich der Serummarker. MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung, p aus dem U-Test nach Mann und Whitney. Der p-Wert bei Il-8 ist auf 0.050 abgerundet und liegt ganz leicht über der Signifikanzschwelle, daher wurde kein Stern-Symbol angebracht.

Mittels einer Receiver-Operating-Characteristic (ROC) lässt sich derjenige Markerwert festlegen, der optimal zwischen den Diagnosegruppen trennt. Der Wert, welcher am weitesten von der blauen Diagonalen entfernt war, spiegelte ein relativ ausgewogenes Verhältnis zwischen Sensitivität und Spezifität wieder. Dies bedeutete, dass möglichst viele Kranke richtigerweise als krank erkannt wurden und Gesunde als gesund. Die nachfolgende Grafik sollte dies für ACE zeigen. Hier wurden Sarkoidose-Patienten mit den gesunden Kontrollen verglichen. In diesem Fall lag er bei 36.3 Units/l.



## ROC

Receiver-Operating Characteristic von ACE  
negativ-positiv für Gesunde und Sarkoidosepatienten

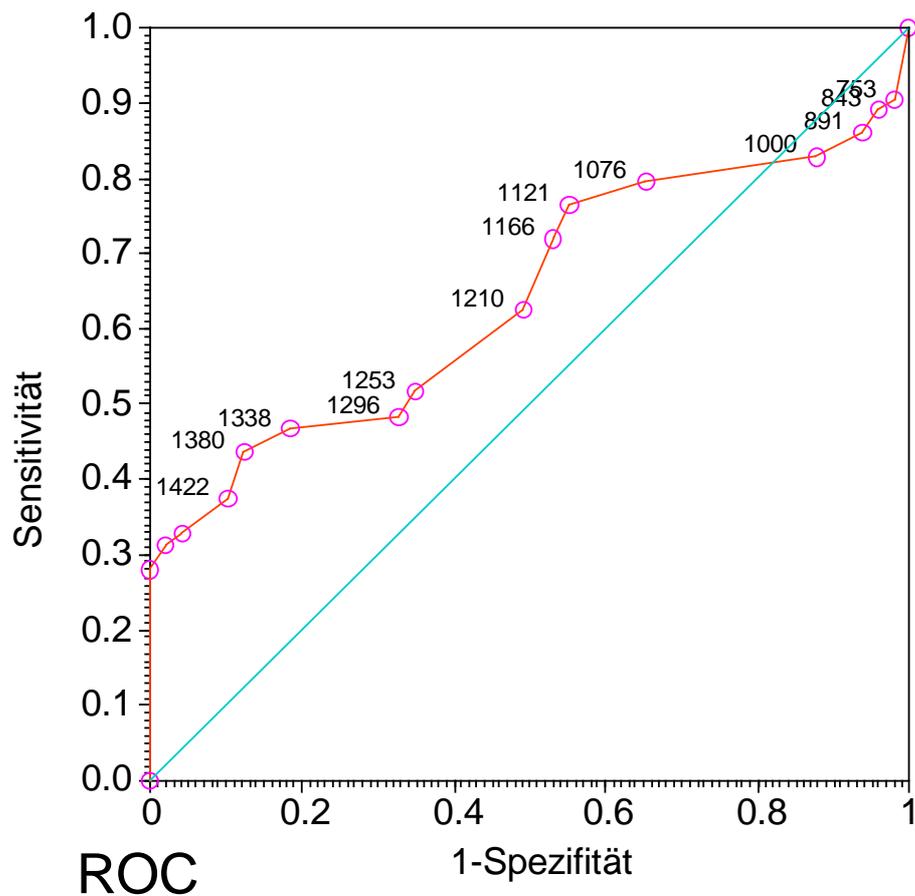
Wenn man als Trennung zwischen Gesunden und Sarkoidose-Patienten den ACE-Wert 16.2 Units/l (Zeile 3 in Tabelle 7) wählte, dann erhielt man eine sehr gute Sensitivität von 87.93%. Hier waren 51 Kranke richtig positiv und nur 7 falsch negativ eingeordnet. Die Spezifität aber war mit 10.2% indiskutabel, denn 44 Gesunde wurden fälschlicherweise als krank bezeichnet und nur 5 waren richtig negativ. Bei einem Wert von 58.5 Units/l erhielt man zwar mit 89.8 % eine gute Spezifität, allerdings auf Kosten einer sehr hohen Anzahl von fälschlicherweise als krank eingestuft gesunden

Personen. Dies zeigte, dass man keinen eindeutigen Wert erhielt, der genaue Auskunft darüber gab, ob der Pat. an Sarkoidose litt oder nicht!

Erst bei Werten um 37 Units/l erhielt man annähernd gleich gute Sensitivität und Spezifität mit (grau unterlegt in Tab. 7). Allerdings waren die Sensitivität mit 67.24%, als auch die Spezifität mit 63.27% nicht sehr genau. Abhängig davon, ob Sensitivität oder Spezifität entscheidend waren, wählte man als trennenden Wert einen leicht unterhalb oder leicht oberhalb von 37 Units/l liegenden.

ACE[Units/l] bis	Sarkoidose		Gesunde		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
2.000	58	0	1	48	100.00%	2.04%
14.100	52	6	4	45	89.66%	8.16%
16.200	51	7	5	44	87.93%	10.20%
21.800	50	8	9	40	86.21%	18.37%
24.900	48	10	13	36	82.76%	26.53%
28.400	46	12	17	32	79.31%	34.69%
29.400	44	14	18	31	75.86%	36.73%
30.500	43	15	23	26	74.14%	46.94%
33.200	42	16	27	22	72.41%	55.10%
35.700	40	18	30	19	68.97%	61.22%
36.300	39	19	31	18	67.24%	63.27%
39.500	36	22	32	17	62.07%	65.31%
40.500	34	24	34	15	58.62%	69.39%
42.300	33	25	35	14	56.90%	71.43%
43.800	27	31	36	13	46.55%	73.47%
44.100	26	32	38	11	44.83%	77.55%
47.800	24	34	39	10	41.38%	79.59%
51.400	23	35	40	9	39.66%	81.63%
52.800	22	36	41	8	37.93%	83.67%
58.500	19	39	44	5	32.76%	89.80%
61.500	17	41	45	4	29.31%	91.84%
64.500	16	42	46	3	27.59%	93.88%
79.600	9	49	47	2	15.52%	95.92%
83.900	8	50	49	0	13.79%	100.00%
145.800	0	58	49	0	0.00%	100.00%

**Table 7.** *R O C, Receiver-Operating-Characteristic* von ACE, gruppiert nach gesunden Kontrollen (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.



ROC  
Receiver-Operating Characteristic von Lysozym  
negativ-positiv für Gesunde und Sarkoidosepatienten

Die ROC-Grafik für den Vergleich von Sarkoidose-Patienten und Gesunden in Bezug auf den Marker Lysozym war wenig aussagekräftig. Dagegen konnte man in Tabelle 9 erkennen, dass ein eher niedriger Lysozym-Wert um 843.00 U/ml zwar mit 89.06% eine gute Sensitivität zeigte. Hier nahm man allerdings in Kauf, dass bei einer Spezifität von nur 4.08% beinahe alle Gesunden als falsch positiv – also krank - angesehen wurden (Z. 2, Tab. 8).

Ebenso präsentierte ein hoher Lysozym-Wert um 1503.00 U/ml eine sehr gute Spezifität mit 97.96%, was bedeutete, dass nahezu jeder Gesunde als nicht krank erkannt würde. Im Gegenzug wurden jedoch 44 von 64 Sarkoidose-Patienten als gesund erkannt (falsch negativ), was nicht tolerierbar war.

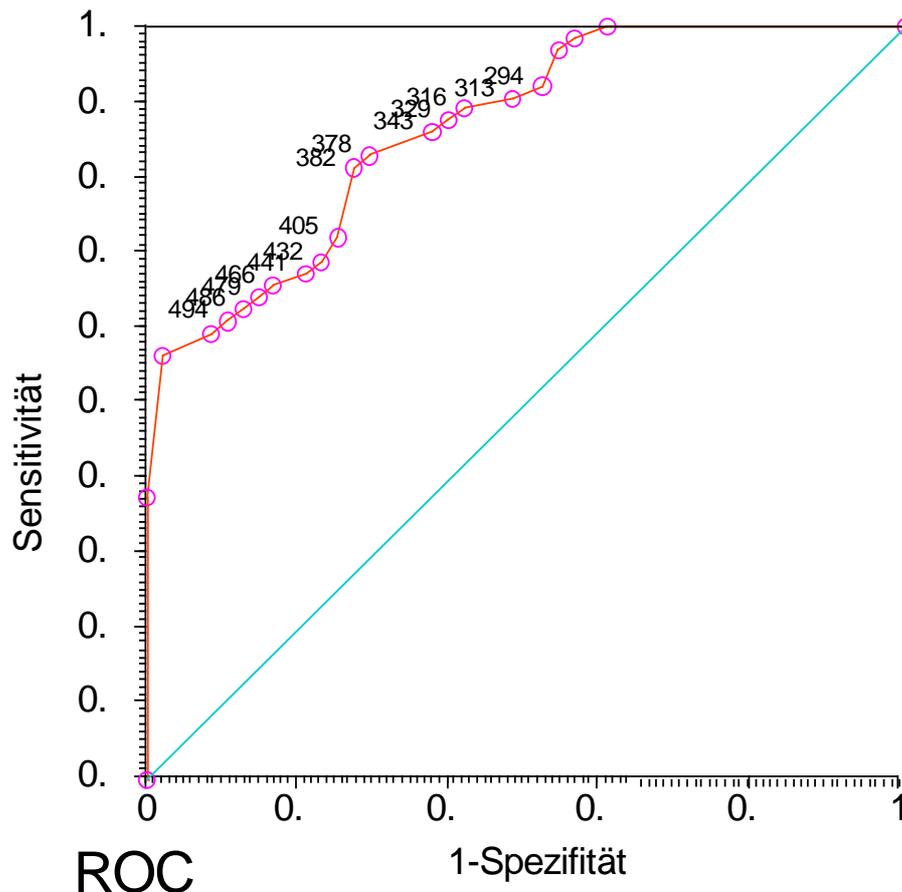
Wählte man einen Wert um 1210.00 U/ml erhielt man eine ungefähre Annäherung von Sensitivität mit 62.5% und Spezifität mit 51.02%. Eine Sensitivität von etwas über 60% bezeichnete keine sehr klare Trennschärfe.

<b>Lysozym</b> [U/ml] bis	Sarkoidose		Gesunde		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
753.000	58	6	1	48	90.63%	2.04%
843.000	57	7	2	47	89.06%	4.08%
891.000	55	9	3	46	85.94%	6.12%
1000.000	53	11	6	43	82.81%	12.24%
1076.000	51	13	17	32	79.69%	34.69%
1121.000	49	15	22	27	76.56%	44.90%
1166.000	46	18	23	26	71.88%	46.94%
<b>1210.000</b>	<b>40</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>24</b>	<b>62.50%</b>	<b>51.02%</b>
1253.000	33	31	32	17	51.56%	65.31%
1296.000	31	33	33	16	48.44%	67.35%
1338.000	30	34	40	9	46.88%	81.63%
1380.000	28	36	43	6	43.75%	87.76%
1422.000	24	40	44	5	37.50%	89.80%
1463.000	21	43	47	2	32.81%	95.92%
1503.000	20	44	48	1	31.25%	97.96%
1660.000	18	46	49	0	28.13%	100.00%
2862.000	0	64	49	0	0.00%	100.00%

**Tabelle 8.** *R O C, Receiver-Operating-Characteristic von Lysozym, gruppiert nach gesunden Kontrollen (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.*

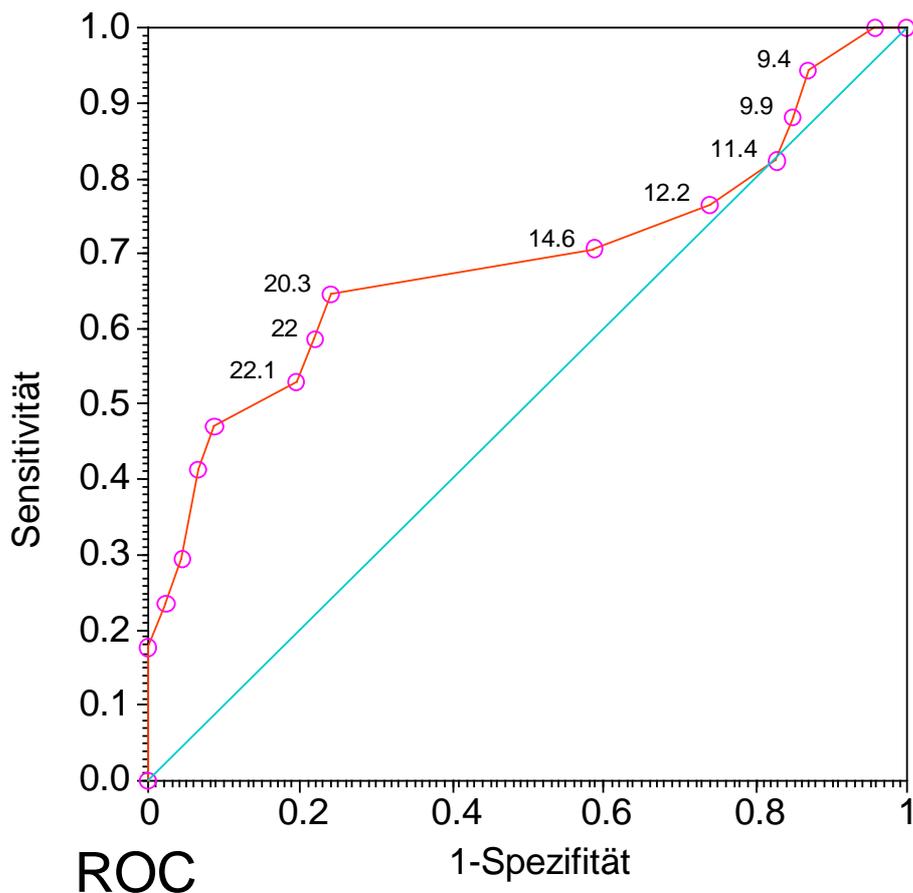
Die untenstehende ROC-Grafik grenzte die sIL-2R-Werte der Sarkoidose-Patienten gegen die der Gesunden ab. Auf den ersten Blick war ein deutlicher Unterschied zu den vorhergehenden Grafiken zu erkennen. Die Kurve verlief gleichmäßiger und bei 382.00 U/ml konnte man eine leichte Spitze feststellen. Hier zeigten auch die Sensitivität und die Spezifität wesentlich akzeptablere Werte von 81.25%, bzw. 72.92% (Z.10, Tab. 9), da die falsch negativen und die falsch positiven Diagnosen mit 12, bzw. 13 ebenfalls erheblich niedriger waren. Von 64 Sarkoidose-Patienten wurden nur 12 als nicht krank

erkannt, während von 48 Kontrollen nur 13 als nicht gesund angegeben wurden. Eine noch höhere Genauigkeit könnte erreicht werden, wenn man das Alter mit einbezüge (s. Kap. 7.3.2)! Die Trennschärfe von sIL-2R war folglich deutlich genauer als die von ACE oder Lysozym!



sIL-2R [U/ml] bis	Sarkoidose		Gesunde		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
263.000	64	0	19	29	100.00%	39.58%
269.000	63	1	21	27	98.44%	43.75%
274.000	62	2	22	26	96.88%	45.83%
294.000	59	5	23	25	92.19%	47.92%
313.000	58	6	25	23	90.63%	52.08%
316.000	57	7	28	20	89.06%	58.33%
329.000	56	8	29	19	87.50%	60.42%
343.000	55	9	30	18	85.94%	62.50%
378.000	53	11	34	14	82.81%	70.83%
382.000	52	12	35	13	81.25%	72.92%
405.000	46	18	36	12	71.88%	75.00%
432.000	44	20	37	11	68.75%	77.08%
441.000	43	21	38	10	67.19%	79.17%
466.000	42	22	40	8	65.63%	83.33%
479.000	41	23	41	7	64.06%	85.42%
486.000	40	24	42	6	62.50%	87.50%
494.000	39	25	43	5	60.94%	89.58%
519.000	38	26	44	4	59.38%	91.67%
552.000	36	28	47	1	56.25%	97.92%
907.000	24	40	48	0	37.50%	100.00%
4651.000	0	64	48	0	0.00%	100.00%

**Table 9.** R O C, Receiver-Operating-Characteristic von sIL-2R, gruppiert nach gesunden Kontrollen (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.



**ROC**  
Receiver Operating Characteristic von IL-8  
negativ-positiv für Gesunde und Sarkoidosepatienten

Die ROC-Grafik des Zytokins IL-8 präsentierte ebenso, wie ACE oder Lysozym eine eher mittelmäßige Trennung zwischen Sarkoidose-Patienten und gesunden Kontrollen. Der Cut-off-Wert lag in diesem Fall bei 20.3 pg/ml. Wie in der vorherigen Tabelle wurde für IL-8 eine nicht sehr aussagestarke Sensitivität mit 64.71% erreicht, auch wenn die Spezifität mit 76.09% deutlich besser zu sein schien (Z. 7, Tab. 10).

<b>IL-8</b> [pg/ml] bis	Sarkoidose		Gesunde		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
2.400	17	0	2	44	100.00%	4.35%
9.400	16	1	6	40	94.12%	13.04%
9.900	15	2	7	39	88.24%	15.22%
11.400	14	3	8	38	82.35%	17.39%
12.200	13	4	12	34	76.47%	26.09%
14.600	12	5	19	27	70.59%	41.30%
20.300	11	6	35	11	64.71%	76.09%
22.000	10	7	36	10	58.82%	78.26%
22.100	9	8	37	9	52.94%	80.43%
27.200	8	9	42	4	47.06%	91.30%
34.400	7	10	43	3	41.18%	93.48%
43.300	5	12	44	2	29.41%	95.65%
59.700	4	13	45	1	23.53%	97.83%
62.700	3	14	46	0	17.65%	100.00%
262.000	0	17	46	0	0.00%	100.00%

**Table 10.** *R O C, Receiver-Operating-Characteristic von IL-8, gruppiert nach gesunden Kontrollen (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.*

**ROC-Tabellen zur Differenzierung von Sarkoidose und fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen:**

Da ACE nicht routinemäßig bei Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen erhoben wurde, war die Fallzahl mit 4 Patienten entsprechend klein. Die Trennschärfe von ACE war in diesem Vergleich als eher vage anzusehen. Bei dem Wert 37.700 Units/l lag die Spezifität zwar bei 75.00%, jedoch war die Sensitivität mit den angegebenen 63.79% schwach (Z. 3, Tab.11). Besser wäre diese bei 22.800 Units/l. Hier entsprach die Spezifität allerdings nur 50%.

ACE [Units/l]bis	Sarkoidose		fibr.int.Lungenerkr.		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
11.800	54	4	1	3	93.10%	25.00%
22.800	48	10	2	2	82.76%	50.00%
37.700	37	21	3	1	63.79%	75.00%
83.400	8	50	4	0	13.79%	100.00%
145.800	0	58	4	0	0.00%	100.00%

***Tabelle 11.** R O C, Receiver-Operating-Characteristic von ACE, gruppiert nach fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.*

Wie in Zeile 10 der Tabelle 12 erkennbar, näherten sich Sensitivität und Spezifität hier bei einem Lysozym-Wert von 1195.00 U/ml mit 64.06%, bzw. 63.33% einander an. 41 von 64 Sarkoidosepatienten wurden erfasst und 19 von 30 Patienten mit einer fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankung wurden richtigerweise negativ hinsichtlich einer Sarkoidose getestet. Dies ist folglich der Wert, der die meisten Sarkoidosepatienten erkannte und die meisten Patienten mit einer fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankung nicht als Sarkoidosepatienten einordnete.

Lysozym [U/ml]bis	Sarkoidose		fibr.int.Lungenerkr.		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
520.000	64	0	5	25	100.00%	16.67%
557.000	63	1	6	24	98.44%	20.00%
701.000	59	5	9	21	92.19%	30.00%
736.000	58	6	10	20	90.63%	33.33%
770.000	57	7	11	19	89.06%	36.67%
905.000	55	9	13	17	85.94%	43.33%
970.000	53	11	14	16	82.81%	46.67%
1095.000	51	13	17	13	79.69%	56.67%
1159.000	47	17	18	12	73.44%	60.00%
1195.000	41	23	19	11	64.06%	63.33%
1231.000	36	28	20	10	56.25%	66.67%
1372.000	30	34	22	8	46.88%	73.33%
1380.000	28	36	23	7	43.75%	76.67%
1439.000	24	40	24	6	37.50%	80.00%
1501.000	20	44	25	5	31.25%	83.33%
1695.000	16	48	26	4	25.00%	86.67%
2032.000	8	56	27	3	12.50%	90.00%
2152.000	6	58	28	2	9.38%	93.33%
2305.000	5	59	29	1	7.81%	96.67%
2549.000	4	60	30	0	6.25%	100.00%
2862.000	0	64	30	0	0.00%	100.00%

**Tabelle 12.** R O C, Receiver-Operating-Characteristic von Lysozym, gruppiert nach fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Markern war sIL-2R noch weniger in der Lage, die Krankheitsbilder Sarkoidose und fibrosierende interstitielle Lungenerkrankung voneinander zu unterscheiden. Möchte man einen Wert erhalten, bei dem sich Sensitivität und Spezifität möglichst entsprechen, bot sich bestenfalls ein sIL-2R von 553.00 U/ml mit jeweils nicht ganz 60% an (Z. 13, Tab. 13).

sIL-2R [U/ml]bis	Sarkoidose		fibr.int.Lungenerkr.		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
220.000	64	0	1	27	100.00%	3.57%
266.000	63	1	2	26	98.44%	7.14%
279.000	61	3	3	25	95.31%	10.71%
293.000	60	4	4	24	93.75%	14.29%
296.000	58	6	6	22	90.63%	21.43%
350.000	55	9	7	21	85.94%	25.00%
410.000	46	18	8	20	71.88%	28.57%
438.000	44	20	9	19	68.75%	32.14%
441.000	43	21	10	18	67.19%	35.71%
475.000	42	22	12	16	65.63%	42.86%
496.000	39	25	13	15	60.94%	46.43%
510.000	38	26	15	13	59.38%	53.57%
553.000	36	28	16	12	56.25%	57.14%
582.000	34	30	17	11	53.13%	60.71%
634.000	31	33	18	10	48.44%	64.29%
677.000	30	34	19	9	46.88%	67.86%
706.000	29	35	20	8	45.31%	71.43%
768.000	28	36	21	7	43.75%	75.00%
853.000	27	37	22	6	42.19%	78.57%
945.000	23	41	23	5	35.94%	82.14%
1144.000	19	45	25	3	29.69%	89.29%
1501.000	10	54	26	2	15.63%	92.86%
2090.000	8	56	27	1	12.50%	96.43%
2687.000	4	60	28	0	6.25%	100.00%
4651.000	0	64	28	0	0.00%	100.00%

**Table 13.** ROC, Receiver-Operating-Characteristic von sIL-2R, gruppiert nach fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.

Ähnlich verhielt es sich mit IL-8, wie Zeile 8 in der Tabelle 14 zeigte. In diesem Falle lagen Sensitivität und Spezifität jeweils unter 60%. Der korrelierende IL-8-Wert betrug 22.00 pg/ml.

IL-8 [pg/ml]bis	Sarkoidose		fibr.int.Lungenerkr.		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
2.600	17	0	2	38	100.00%	5.00%
9.000	16	1	5	35	94.12%	12.50%
10.300	15	2	8	32	88.24%	20.00%
10.600	14	3	9	31	82.35%	22.50%
13.000	13	4	11	29	76.47%	27.50%
14.600	12	5	14	26	70.59%	35.00%
19.300	11	6	22	18	64.71%	55.00%
22.000	10	7	23	17	58.82%	57.50%
29.700	8	9	28	12	47.06%	70.00%
36.100	7	10	32	8	41.18%	80.00%
38.300	5	12	33	7	29.41%	82.50%
85.800	3	14	37	3	17.65%	92.50%
230.200	1	16	40	0	5.88%	100.00%
262.000	0	17	40	0	0.00%	100.00%

**Tabelle 14.** R O C, Receiver-Operating-Characteristic von IL-8, gruppiert nach fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten (negativ) und Sarkoidose (positiv). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.

### 4.3.2 Geschlecht und Alter und Serummarker

Bei den Kontrollen fanden sich keine Geschlechtsunterschiede bezüglich der Marker. Selbst der Unterschied des ACE von  $40.6 \text{ Units/l} \pm 19.8$  bei männlichen Personen und  $33.4 \text{ Units} \pm 15.9$  bei weiblichen Personen, war mit  $p = 0.061$  im U-Test nach Mann und Whitney nicht signifikant.

Für die Marker ACE, Lysozym und IL-8 fand sich im Altersbereich der gesunden Kontrollpersonen zwischen 22 und 53 Jahren keine Altersabhängigkeit, sIL-2R dagegen nahm mit dem Alter signifikant ab (Tabelle 15).

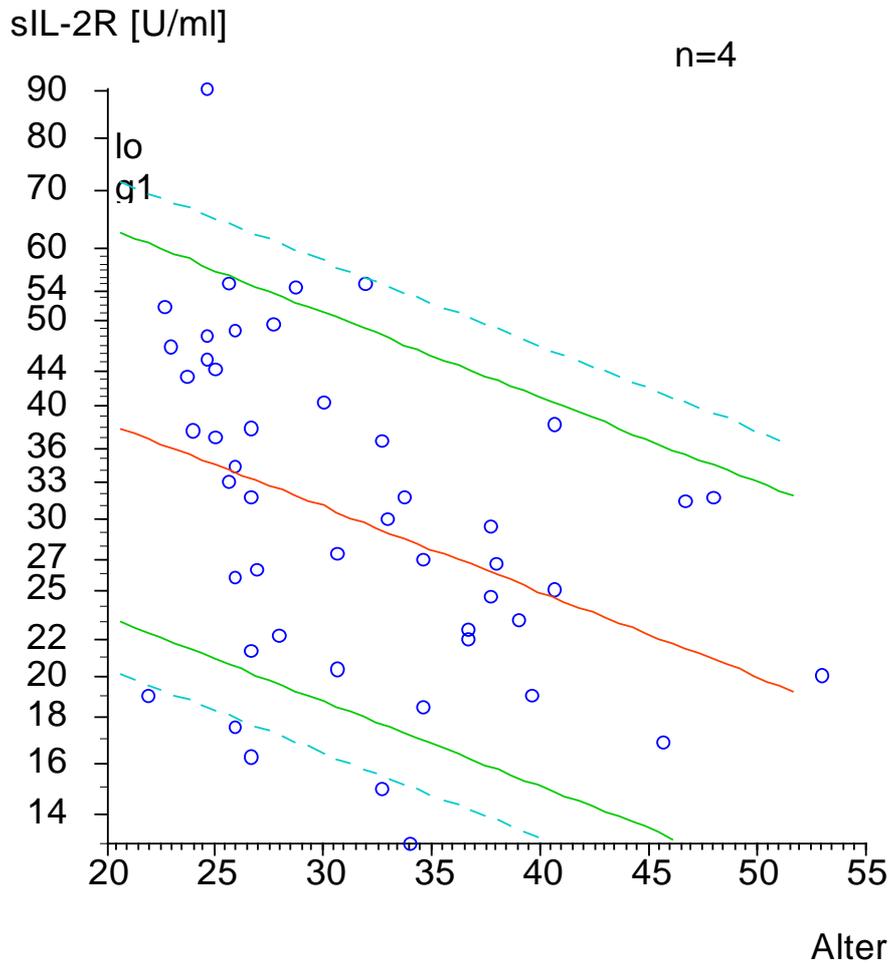
Aus diesem Grunde konnte man die Normbereiche der Tabelle 3 bzw. der Tabelle 4 für ACE, Lysozym und IL-8 ohne Berücksichtigung des Alters benutzen, wohingegen man für sIL-2R eine Trennung nach Altersgruppen benötigte.

Marker	Korrelation mit dem Alter		
	n	tau	p
ACE	49	0.0551	0.58
Lysozym	49	0.0643	0.51
sIL-2R	48	-0.2905	0.0036**
IL-8	46	0.0150	0.88

*Tabelle 15. Veränderungen der Serummarker mit dem Alter bei gesunden Kontrollpersonen. tau = Korrelationskoeffizient nach Kendall, p aus der Kendallschen Rangkorrelation.*

Wie Abbildung 6 zeigt, lagen die höchsten sIL-2R-Werte in einem Abschnitt zwischen 24 und 32 Jahren bei den Gesunden. sIL-2R sank also mit zunehmendem Alter, was das negative tau in Tabelle 15 erläuterte.

Es wäre möglich, dass das sIL-2R in höherem Alter noch weiter sänke, allerdings war unsere älteste Kontrollperson 55 Jahre alt.



**Abbildung 6.** Beziehung zwischen Alter und sIL-2R. Jeder Punkt stellt einen Gesunden dar, dessen Alter man auf der x-Achse und dessen sIL-2R-Wert man auf der logarithmisch geteilten y-Achse abliest. Die Punkte stellen die gesunden Kontrollpersonen dar.

Die zugehörige Tabelle 16 der sIL-2R-Normwerte wurde mit Hilfe einer Approximation aus folgenden Parametern gewonnen:

Soll-Wert für log (sIL-2R);  $y = 2.4805791 - 0.071379 \times z$   
 $z = (\text{Alter} - 32.29) / 7.5002$   
 Standardabweichung:  $s = 0.1675625$

Tabelle 16 illustriert noch einmal deutlich, wie die Werte von sIL-2R abnehmen, je höher das Alter der Personen war. Sie verhielten sich somit umgekehrt reziprok zueinander.

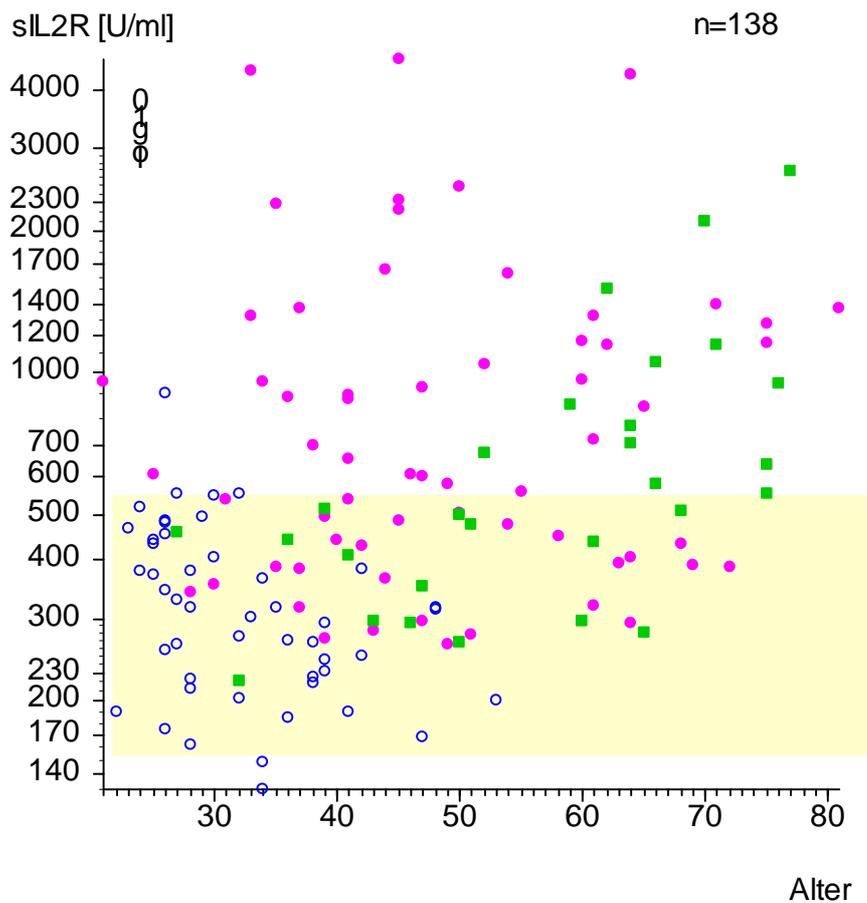
<b>Altersabhängige Normbereiche für sIL-2R</b>					
<b>Alter</b>	5.00%	10.00%	50%	90.00%	95.00%
20	209.854	239.732	395.874	653.715	746.788
25	188.076	214.853	354.791	585.874	669.288
30	168.558	192.556	317.972	525.073	599.831
35	151.065	172.573	284.973	470.582	537.582
40	135.388	154.664	255.399	421.746	481.793
45	121.338	138.613	228.895	377.978	431.793
50	108.745	124.228	205.140	338.753	386.983
55	97.460	111.336	183.851	303.598	346.823

**Tabelle 16.** Normbereiche für sIL-2R für die angegebenen Altersgruppen. Angegeben sind wie üblich die Grenzen für 5 bis 95% und für 10 bis 90%. Die Bereiche wurden mit der obigen Formel berechnet.

Die Veränderung des ACE mit dem Alter war innerhalb der Gruppe der Sarkoidose-Patienten nicht signifikant (Tab. 15), ebenso verhielt es sich mit den restlichen Serummarkern. Zwar sanken ACE und IL-8 mit steigendem Alter und Lysozym und sIL-2R stiegen mit zunehmendem Alter, jedoch jeweils nicht signifikant. Ähnlich erschien das Bild bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. ACE und Lysozym fielen mit zunehmendem Alter und IL-8 stieg mit zunehmendem Alter. Allerdings ohne Signifikanz. Einzig sIL-2R zeigte eine signifikante Altersabhängigkeit. Zwar offenbarte es bei der Sarkoidose nur eine leichte Steigerung im Alter. Bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen dagegen stieg sIL-2R mit zunehmendem Alter signifikant an (Tab. 17).

Marker	n	Korrelation mit dem Alter	
		tau	p
Sarkoidose			
ACE	58	-0.1169	0.20
Lysozym	62	0.0241	0.78
sIL-2R	62	0.0342	0.69
IL-8	15	-0.1635	0.40
fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen			
ACE	4	-0.6667	0.17
Lysozym	30	-0.0279	0.83
sIL-2R	28	0.4554	0.0007***
IL-8	40	0.0649	0.56

**Table 17.** Veränderungen der Serummarker mit dem Alter bei Patienten mit Sarkoidose und mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. tau = Korrelationskoeffizient nach Kendall, p aus der Kendallschen Rangkorrelation.



**Abbildung 7.** Beziehung zwischen Alter und sIL-2R. Jeder Punkt stellt einen Patienten, bzw. Gesunden dar, dessen Alter man auf der x-Achse und dessen sIL-2R-Wert man auf der logarithmisch geteilten y-Achse abliest. Die Punkte sind nach Diagnose markiert. ○ = gesunde Kontrollen, ● = Sarkoidose, ■ = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankung. Der gelbe Bereich ist der 95%-Bereich für die gesunden Kontrollpersonen ohne Berücksichtigung des Alters.

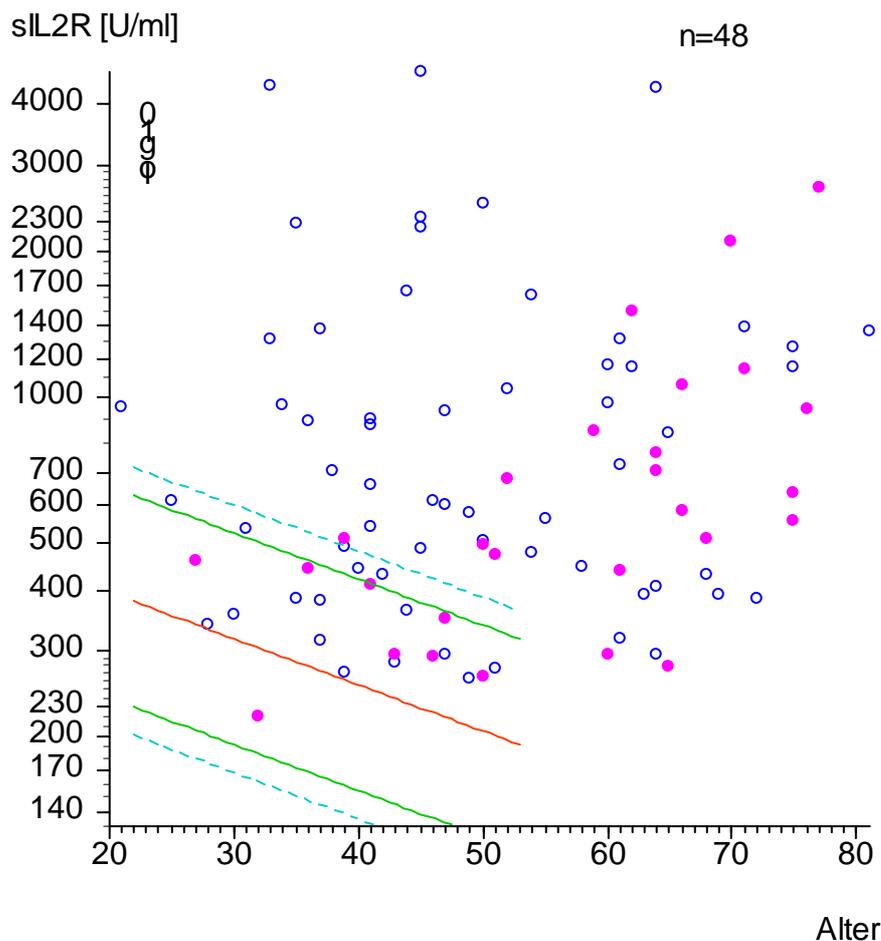
Betrachtete man die obenstehende Graphik wurde augenscheinlich, dass oberhalb des gelben Bereichs (sIL-2R von 550U/ml) nur noch in der rechten Hälfte fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen (grüne Quadrate) auftraten. Dies illustrierte, dass die Werte der Patienten mit fibrosierender interstitieller Lungenerkrankung mit zunehmendem Alter anstiegen, so dass erhöhte Werte von ca. 700 U/ml erst ab ca. dem 55. Lebensjahr gemessen wurden. Die höchsten Werte traten ab ca. dem 60. Lebensjahr auf. Wenn man sich z.B. eine Parallele zur Y-Achse bei 60 Jahren auf der X-Achse

einzeichnete, würde ersichtlich, dass links von dieser Linie keine Symbole für die fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen über 900 U/ml vorkämen.

Dieser Umstand bedeutete, dass man in dem darunter liegenden Altersabschnitt die Krankheitsbilder anhand des sIL-2R-Wertes differenzieren konnte. Außerdem unterstrich diese Tatsache die Wichtigkeit der Berücksichtigung des Alters der Patienten: Wurden z.B. bei einem Patienten, der älter als 60 Jahre ist erhöhte sIL-2R-Werte (über 550 U/ml) festgestellt, könnte das auf eine interstitielle Lungenerkrankung hindeuten. Ob es sich jedoch um eine Sarkoidose handelte, wäre dadurch alleine nicht eindeutig belegbar. War der Patient hingegen jünger als 60 Jahre, könnte das auf eine Sarkoidose hinweisen.

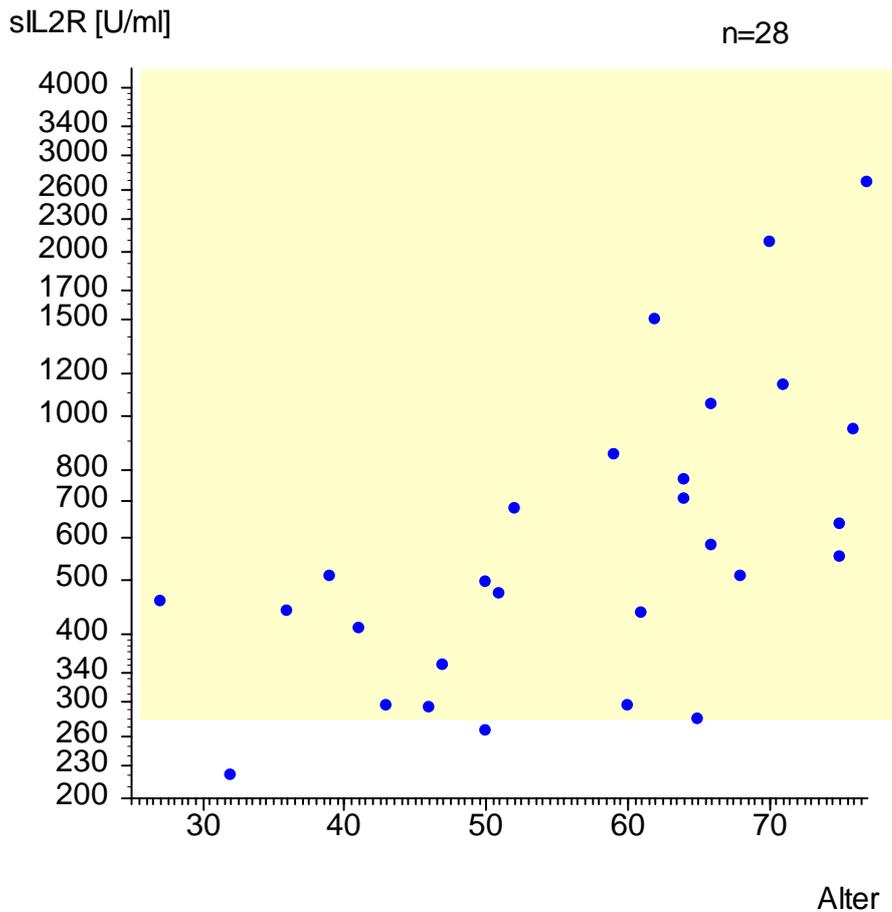
Die gesunden Kontrollen, deren Werte klar unter denen der Patienten lagen, sind durch den gelb unterlegten Bereich dargestellt.

Wenn man die Altersabhängigkeit des sIL-2R also mit in Betracht zog, dann erkannte man in Abbildung 8, dass auch im Alter unter 50 Jahren die Werte sowohl der Sarkoidose-Patienten, als auch der Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen erhöht waren.



**Abbildung 8.** Beziehung zwischen Alter und sIL-2R. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar, dessen Alter man auf der x-Achse und dessen sIL-2R-Wert man auf der logarithmisch geteilten y-Achse abliest. Die Punkte sind nach Diagnose markiert. ○ = Sarkoidose, ● = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankung. Die eingezeichneten Linien stellen den Normbereich dar, der aus der Gruppe der gesunden Kontrollen gewonnen ist. Rote durchgezogene Linie = Mitte (50%), grüne durchgezogene Linie = Bereich 10% bis 90%, gestrichelte türkise Linie = Bereich 5% bis 95%.

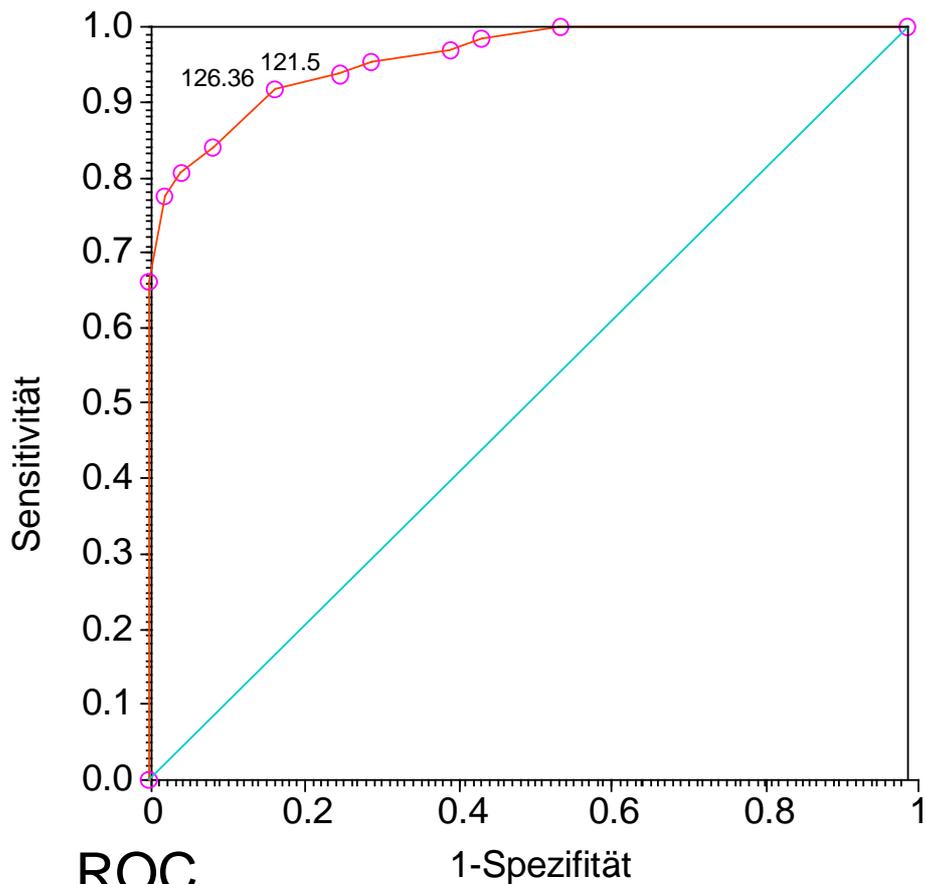
Abbildung 9 unterstreicht nochmals die Altersabhängigkeit des Markers sIL-2R in Bezug auf die Diagnosestellung hinsichtlich Sarkoidose bzw. fibrosierende interstitielle Lungenerkrankung.



**Abbildung 9.** zur Differenzierung von Sarkoidose und fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. Beziehung zwischen Alter und sIL-2R. Die Punkte stellen die Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen dar. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar, dessen Alter man auf der x-Achse und dessen sIL-2R-Wert man auf der logarithmisch geteilten y-Achse abliest. Der gelbe Bereich ist der 95%-Bereich (aus dem Median) für die Patienten mit Sarkoidose.

Die Trennung von gesunden Kontrollen und Sarkoidosepatienten ließ sich wesentlich verbessern, indem man sIL-2R mit dem Alter multiplizierte. Wählte man den Wert  $sIL-2R \times \text{Alter} / 100 = 130$ , dann bekam man sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von über 80%.

Die Graphik wurde dann fast ideal (Tab. 18)!



**ROC**  
Receiver-Operating Characteristic von sIL-2R x Alter  
negativ-positiv für Gesunde und Sarkoidosepatienten

sIL-2R [U/ml]*Alter [a] bis	Sarkoidose		Gesunde		TP/DP	TN/DN
	r.pos.	f.neg.	r.neg.	f.pos.	Sensitivität	Spezifität
92.750	62	0	22	26	100.00%	45.83%
105.000	61	1	27	21	98.39%	56.25%
106.000	60	2	29	19	96.77%	60.42%
114.660	59	3	34	14	95.16%	70.83%
121.500	58	4	36	12	93.55%	75.00%
126.360	57	5	40	8	91.94%	83.33%
151.680	52	10	44	4	83.87%	91.67%
163.800	50	12	46	2	80.65%	95.83%
176.640	48	14	47	1	77.42%	97.92%
235.820	41	21	48	0	66.13%	100.00%
2758.400	0	62	48	0	0.00%	100.00%

**Tabelle 18** R O C, Receiver-Operating-Characteristic des neu gebildeten Parameters sIL-2R\*Alter, gruppiert nach Sarkoidose (positiv) und Gesunden (negativ). Empirische Sensitivität und Spezifität bei den verschiedenen Einteilungen.

Bei einem sIL-2R-Wert von 126.360 U/ml wurde eine Sensitivität von 91.94% erreicht, das bedeutete, dass über 90% der Patienten als richtig positiv erkannt wurden! Die Spezifität lag bei diesem Wert bei 83.33%, was ausdrückte, dass über 80% der Gesunden als richtig negativ erachtet wurden.

Die Größe sIL-2R x Alter / 100 trennte folglich nahezu perfekt zwischen Gesunden und Sarkoidosepatienten. Allerdings bliebe anzumerken, dass die älteste Kontrollperson 50 Jahre alt war und Daten über ältere Gesunde in unserer Studie nicht erhoben wurden. Hinsichtlich der Differenzierung zwischen Sarkoidose und fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten sind zusätzliche Methoden nötig, da sIL-2R x Alter / 100 hier nicht ausreichte.

## **4.4 Blutbild und Serumchemie**

### **4.4.1 Diagnose und Blutbild**

Stellte man die Sarkoidose den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen in Bezug auf das Blutbild gegenüber, so ließen sich einige Unterschiede feststellen.

Bei der Sarkoidose konnten im Vergleich zu den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen sowohl die Leukozyten als auch die LDH signifikant erniedrigt sein. Dagegen konnten die Lymphozyten bei der Sarkoidose gegenüber den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen signifikant erhöht sein.

Die Entzündungsparameter IgG und CRP waren zwar beide bei der Sarkoidose gegenüber den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen erniedrigt, jedoch nicht signifikant (Tab. 19).

Blutbild	Diagnose	n	MW	ST	p
Leukozyten [G/l]	Sarkoidose	63	6.717	2.501	<0.000005***
	fibros.interstit. LE	46	9.543	3.736	
Lymphozyte n [%]	Sarkoidose	59	20.514	10.356	0.0062**
	fibros.interstit. LE	44	15.228	9.282	
IgG [mg/dl]	Sarkoidose	36	1115.722	310.837	0.46
	fibros.interstit. LE.	31	1187.000	451.033	
LDH [U/l]	Sarkoidose	61	202.836	114.363	0.00001***
	fibros.interstit. LE	45	245.911	75.369	
CRP [mg/dl]	Sarkoidose	42	0.855	0.887	0.21
	fibros.interstit. LE	41	2.183	3.868	

**Table 19.** Blutbild-Werte bei Patienten mit Sarkoidose und mit anderen Lungenerkrankungen. fibros. interstit. LE = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen, MW = Mittelwert, ST = Standardabweichung. p aus dem U-Test nach Mann und Whitney.

#### 4.4.2 Demographie und Blutbild

Im Folgenden wurde die Abhängigkeit der Blutbildparameter der beiden betrachteten Diagnosegruppen vom Alter untersucht. Während sich in Bezug auf Leukozyten, Lymphozyten und IgG keine signifikanten Korrelationen fanden, stellte sich dies bei den beiden übrigen Parametern anders dar.

Die LDH stieg mit dem Lebensalter der Sarkoidose-Patienten signifikant an, während es bei den Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen mit steigendem Alter abnahm, wenn auch nicht signifikant (negatives tau).

In der Gruppe der Sarkoidose-Patienten fand sich ein nicht signifikanter Abfall des CRP mit dem Alter, was sich wiederum im negativen tau widerspiegelte. Bei den anderen

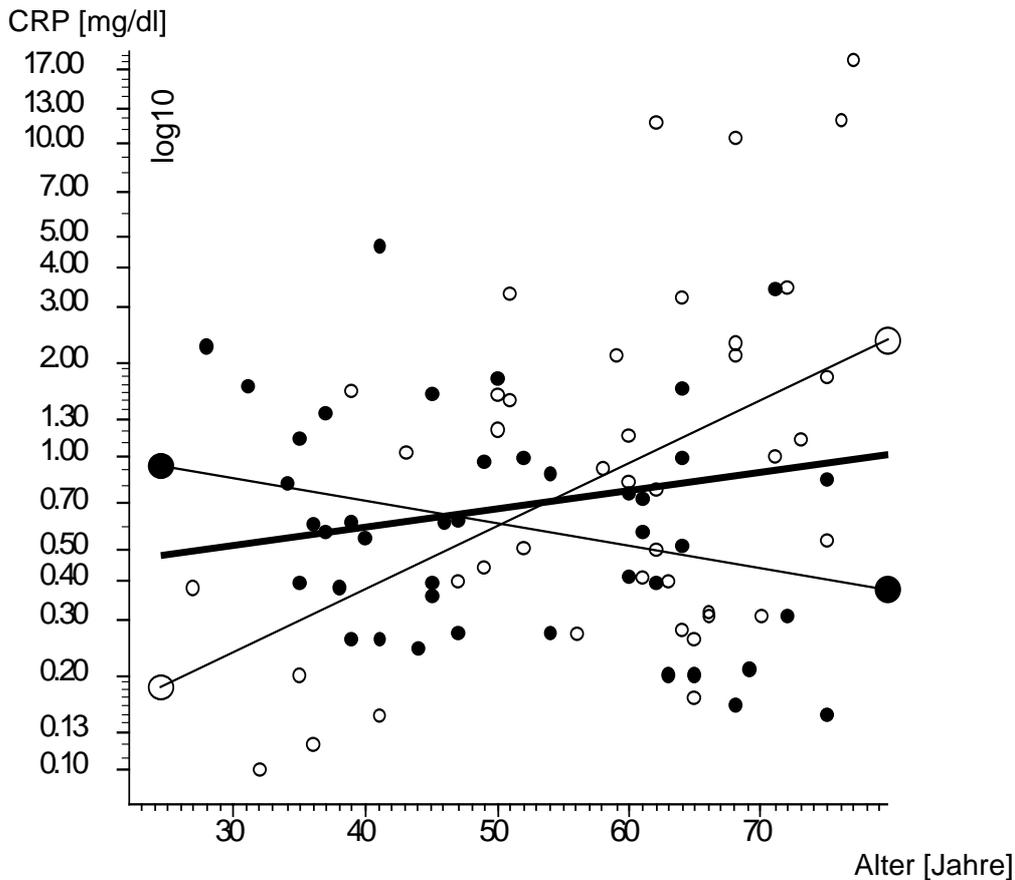
Lungenpatienten zeigte sich mit dem Alter ein signifikanter Anstieg (Tab. 20). Dieser Unterschied war bei CRP im Verlauf sogar signifikant (Abb. 10).

	Sarkoidose			fibrosierende Lungenerkrankungen		interstitielle
	n	tau	p	n	tau	p
Leukozyten [G/l]	63	0.0193	0.82	46	0.0528	0.61
Lymphozyten [%]	59	0.1319	0.14	44	-0.0302	0.77
IgG [mg/dl]	36	-0.0998	0.39	31	0.0542	.67
LDH [U/l]	61	0.1748	0.047 *	45	-0.0981	0.34
CRP [mg/dl]	42	-0.1920	0.073	41	0.2646	0.015 *

*Tabelle 20. Abhängigkeit der Blutbildparameter vom Alter für Patienten mit Sarkoidose und mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. tau = Kendallscher Korrelationskoeffizient. p aus der Kendallschen Rangkorrelation.*

In der folgenden Abbildung 10 erkannte man, dass besonders bei Patienten ab 60 Jahren die CRP-Werte der Sarkoidose-Patienten niedriger waren, als die der Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. Während bei den Sarkoidose-Patienten das CRP mit steigendem Alter abnahm, stieg es bei den Patienten der anderen Gruppe mit zunehmendem Alter signifikant an.

Obwohl der Abfall bei den Sarkoidose-Patienten nicht signifikant war, ließ sich im Vergleich dieser beiden Ergebnisse der Unterschied des Steigens, bzw. des Abfallens mit Hilfe von Regressionsgeraden als signifikant darstellen (Abb. 10).



**Abbildung 10.** CRP-Verlauf mit dem Alter, im Vergleich der Sarkoidose-Patienten mit den Patienten mit anderen Lungenerkrankungen. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar,  $\circ$  = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen,  $\bullet$  = Sarkoidose, dessen Alter man unten auf der x-Achse und dessen CRP-Wert man links auf der y-Achse ablesen kann. Die y-Achse ist logarithmisch geteilt, die dicke Linie ist die gemeinsame Regressionsgerade aller Patienten. Die beiden Regressionsgeraden für die Gruppen sind dünner und an den Enden mit den entsprechenden Symbolen gekennzeichnet. Der Unterschied der Steigungen ist signifikant ( $p = 0.00036^{***}$  im Test auf gleiche Steigung der Regressionsgeraden nach Draper und Smith).

#### 4.4.3 Serummarker und Blutbild

Um die diagnostische Breite zu erweitern, konnte man die Serummarker ACE, Lysozym, sIL-2R und IL-8 mit den Entzündungsparametern Leukozyten, Lymphozyten, IgG, LDH und CRP in Korrelation setzen.

Sowohl bei der Sarkoidose, als auch bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen verhielten die Leukozyten sich gegensinnig zu ACE, wobei diese Beziehung bei den Sarkoidose-Patienten sogar signifikant war. Das bedeutete, je höher das ACE war, desto niedriger war die Anzahl der Leukozyten.

Bei den Lungenerkrankten ohne Sarkoidose zeigte sich trotz der niedrigen Fallzahl ein signifikant gegensinniges Verhältnis der Lymphozyten zu ACE, welches bei den Sarkoidose-Patienten nicht signifikant war. Ebenso war eine reziproke Korrelation der fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen zwischen CRP und ACE als signifikant zu erkennen. Das heißt, die Zahl der Lymphozyten war umso geringer, bzw. das CRP umso niedriger, je höher das ACE war.

Verglich man die beiden Diagnosegruppen hinsichtlich einer Korrelation zwischen Lysozym und den Entzündungsparametern, so ließ sich diese bei der Sarkoidose signifikant in Bezug auf das CRP feststellen. Auch in diesem Falle handelte es sich um eine widersinnige Korrelation, was bedeutete, dass bei erhöhten Lysozym-Werten das CRP sank. Im Gegensatz dazu lieferte die Gegenüberstellung von Lysozym und IgG bei den übrigen Lungenkranken eine signifikante gleichsinnige Korrelation.

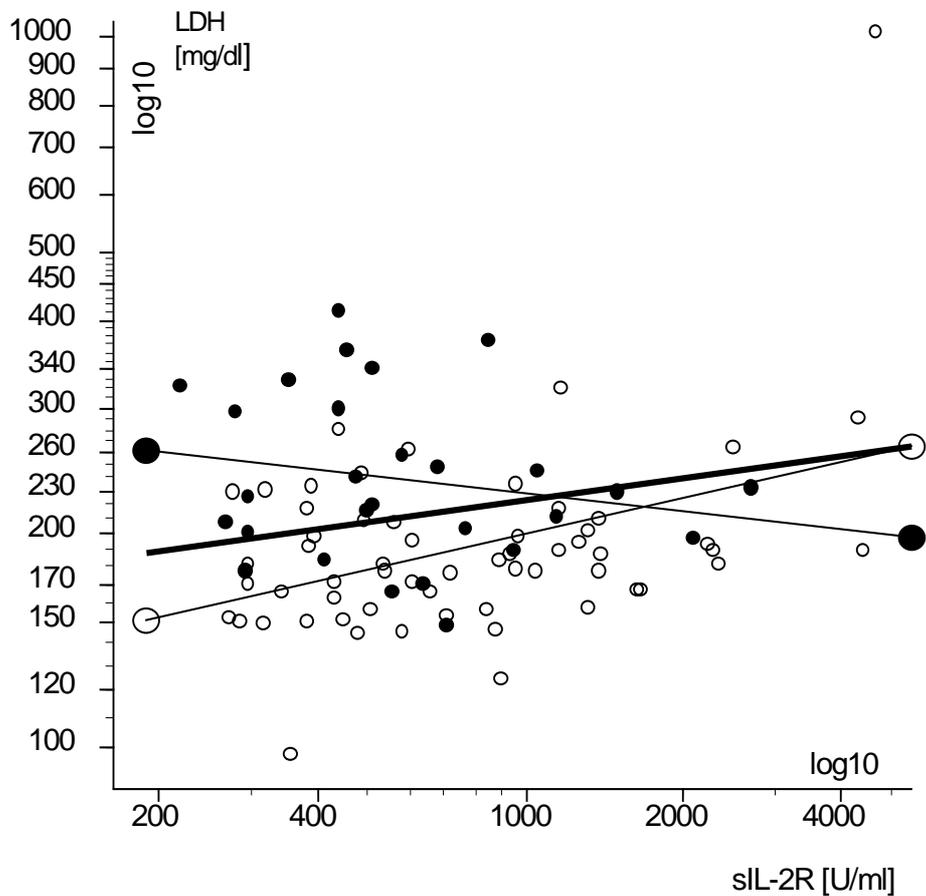
Hinsichtlich des sIL-2R ergaben sich zwei signifikante Korrelationen auf der Seite der Sarkoidose-Gruppe. Je niedriger die Lymphozytenzahl, desto höher waren die Werte des sIL-2R, was eine widersinnige Korrelation darstellte. Hingegen stieg die LDH mit ansteigendem sIL-2R.

Zwischen IL-8 und den Blutbildparametern ergaben sich keine signifikanten Korrelationen (Tab. 20).

Korrelation	Sarkoidose			fibrosierende Lungenerkrankungen		interstitielle
	N	rho	p	n	rho	p
ACE						
Leukozyten [G/l]	57	-0.3867	0.0030*	4	-0.2000	0.75
Lymphozyt. [%]	54	-0.0459	0.74	4	-1.0000	<0.00005***
IgG [mg/dl]	35	0.1566	0.37	–	–	–
LDH [U/l]	55	-0.1859	0.17	4	0.8000	0.20
CRP [mg/dl]	37	0.0044	0.98	4	-1.0000	<0.00005***
Lysozym						
Leukozyten [G/l]	61	0.0734	0.57	30	0.2128	0.26
Lymphozyt. [%]	57	-0.2521	0.059	29	-0.2038	0.29
IgG [mg/dl]	35	0.1964	0.26	20	0.5974	0.0054*
LDH [U/l]	59	-0.0409	0.76	30	-0.0721	0.70
CRP [mg/dl]	41	0.3512	0.024*	28	0.1734	0.38
sIL-2R						
Leukozyten [G/l]	61	-0.0364	0.78	28	-0.0041	0.98
Lymphozyt. [%]	57	-0.2848	0.032*	27	-0.2704	0.17
IgG [mg/dl]	35	0.1633	0.35	18	-0.1466	0.63
LDH [U/l]	59	0.2770	0.034*	28	-0.1670	0.40
CRP [mg/dl]	41	0.2643	0.095	27	0.3282	0.095
IL-8						
Leukozyten [G/l]	15	0.0751	0.79	40	-0.2063	0.20
Lymphozyt. [%]	14	-0.0945	0.78	38	0.2236	0.18
IgG [mg/dl]	8	0.2857	0.51	26	-0.0287	0.89
LDH [U/l]	15	-0.1090	0.70	39	0.2310	0.16
CRP [mg/dl]	12	0.1997	0.58	35	-0.0198	0.91

**Tabelle 21.** Korrelation der Serummarker mit den Blutbild-Parametern, für Patienten mit Sarkoidose sowie für Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. rho = Spearmanscher Korrelationskoeffizient. p aus der Spearmanschen Rangkorrelation. ACE in Units/l, Lysozym in U/ml, sIL-2R in U/ml, IL-8 in pg/ml, Leukozyten in G/l, Lymphozyten in %, IgG in mg/dl, LDH in U/l, CRP in mg/dl.

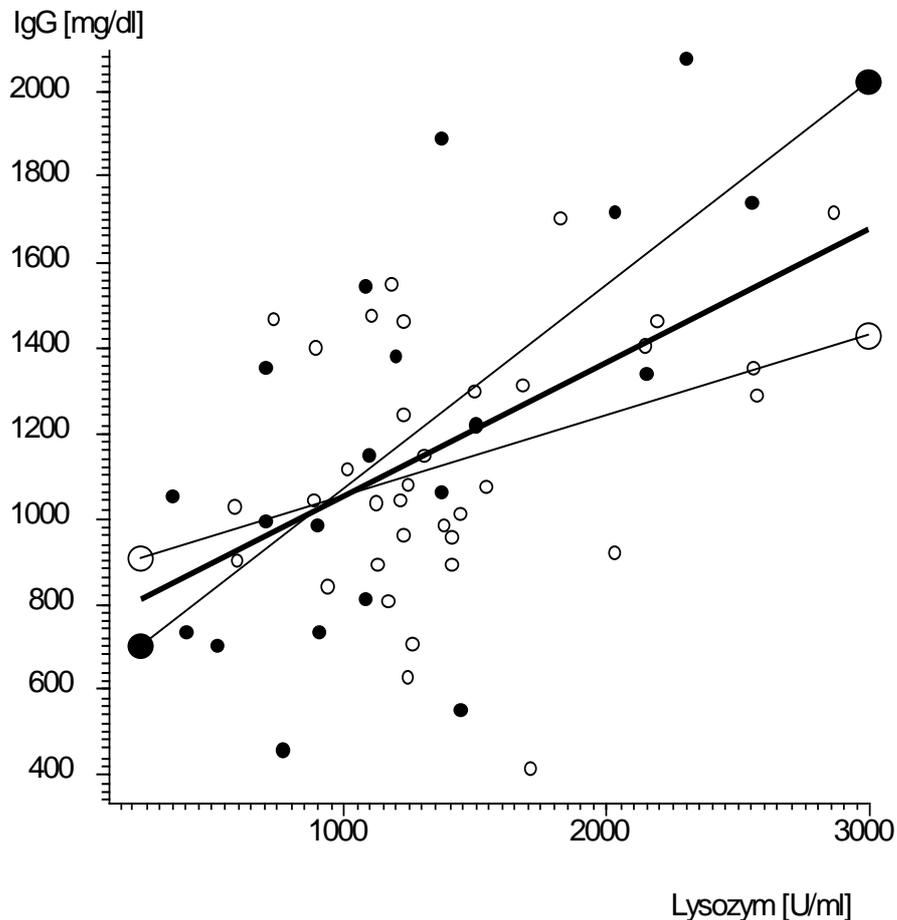
In einem Vergleich der Regressionsgeraden von Sarkoidose-Patienten und Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen, der allerdings Gaußverteilung voraussetzt, ergab sich für die Beziehung zwischen sIL-2R und LDH ein signifikanter Unterschied in der Steigung der Regressionsgeraden ( $p = 0.013^*$ ). Das heißt, die Divergenz der gleichsinnigen Korrelation einerseits (Sarkoidose) und der widersinnigen Korrelation (fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen) andererseits war signifikant (Abbildung 11). Die Korrelationen charakterisierten also die beiden Diagnosegruppen.



**Abbildung 11.** LDH-Verlauf mit sIL-2R im Vergleich der Sarkoidose-Patienten zu den Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar, ○ = Sarkoidose, ● = fibrosierende interstitielle Lungenerkrankungen, dessen sIL-2R man unten auf der x-Achse und dessen LDH man links auf der y-Achse ablesen kann. Beide Achsen sind logarithmisch geteilt. Die dicke Linie ist die gemeinsame Regressionsgerade aller Patienten. Die beiden Regressionsgeraden für die Gruppen sind dünner und an den Enden mit den entsprechenden Symbolen gekennzeichnet.

Mit steigendem Lysozym stieg auch IgG. Dies ist signifikant für alle Patienten ohne Sarkoidose. Aber auch in der Sarkoidose-Gruppe nahm IgG mit Lysozym zu, allerdings nicht signifikant. Der Unterschied im Anstieg war mit  $p = 0.059$  im Vergleich der Regressionsgeraden nach Draper-Smith knapp nicht signifikant.

Der erwartete Lysozym Anstieg mit steigendem IgG fiel bei den Sarkoidose-Patienten flacher aus (Abb. 12).



**Abbildung 12.** Leukozyten-Verlauf mit sIL-2R im Vergleich der Sarkoidose-Patienten zu den Patienten mit anderen Lungenerkrankungen. Jeder Punkt stellt einen Patienten dar, ○ = Sarkoidose, ● = andere Lungenerkrankungen, dessen sIL-2R man unten auf der x-Achse und dessen Leukozyten-Zahl man links auf der y-Achse ablesen kann. Die Achsen ist logarithmisch geteilt. die dicke Linie ist die gemeinsame Regressionsgerade aller Patienten. Die beiden Regressionsgeraden für die Gruppen sind dünner und an den Enden mit den entsprechenden Symbolen gekennzeichnet.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diagnosen**

In der vorliegenden Untersuchung wurde der aus 66 Patienten bestehenden Sarkoidose-Gruppe ein Kollektiv aus 49 gesunden Personen als Kontrollgruppe gegenübergestellt. Eine 46 Patienten umfassende Gruppe mit fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten wurde wiederum mit diesen beiden Gruppen verglichen.

### **5.2 Diagnose und Demographie**

Bei der Gegenüberstellung der Sarkoidose-Gruppe und der Gruppe der fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten hinsichtlich des Alters, ließ sich feststellen, dass die Sarkoidosepatienten signifikant jünger waren, als die anderen Patienten. Dies zeigten auch andere Publikationen [99,100]. Die Personen der Kontrollgruppe wiederum waren signifikant jünger, als die Sarkoidosepatienten. Dieser Umstand ist allerdings zum Teil darauf zurück zu führen, dass die Gesunden hauptsächlich aus dem Bekanntenkreis des Verfassers stammten. Insofern ist dem Altersunterschied zwischen Sarkoidosepatienten und Patienten mit anderen fibrosierenden interstitiellen Erkrankungen der Lunge mehr Bedeutung beizumessen.

Dass die Frauen ein wenig älter waren, als die Männer ließ sich nicht signifikant untermauern.

## 5.3 Serummarker

Im Bereich der Sarkoidose-Diagnostik fehlte weiterhin ein allgemein gültiger Cut-Off-Wert eines Parameters, der exklusiv belegen konnte, ob eine Person an Sarkoidose erkrankt wäre oder nicht. Dieser sollte nun in der vorliegenden Arbeit für ACE, Lysozym, sIL-2R und IL-8 bestimmt werden. Zwar existierten Normwerte für die genannten Serummarker, jedoch schienen diese von Untersuchung zu Untersuchung stark zu variieren [98].

Eine Erhöhung des Serum-ACE bei der Sarkoidose wurde bereits vor fast 30 Jahren erstmals von Liebermann beschrieben [97]. Auch der Anstieg des Lysozymspiegels im Serum beim Vorliegen einer Sarkoidose wurde schon vor über 25 Jahren von Klockars festgestellt [101]. Somit stellten diese Serummarker die ältesten Parameter zur Untersuchung einer Sarkoidose dar. Beide galten außerdem als Spiegel der totalen Granulomlast des Körpers [30].

Zur Bestimmung der ACE-Aktivität im Serum fand in der vorliegenden Arbeit ein kinetischer Test [3] Verwendung. Der hier vorgegebene Normbereich lag zwischen 18 und 55 ACE Units/l. Diese Werte wurden in einer Studie mit 80 gesunden Personen zwischen 18 und 70 Jahren erhalten [3].

Demgegenüber fanden wir ein Normspektrum, das wesentlich weiter gefasst war: Unser Normbereich umspannte Werte von 1.55 bis 71.17 Units/l, wobei die Berechnung des Mittelwertes von ACE  $36.4 \pm 17.8$  Units/l ergab. Die Genauigkeit reichte von 31 bis 41 Units/l. Aufgrund der mangelnden Gaußverteilung spiegelte der Median mit 31.4 Units/l bei einer Spannweite von 29.5 bis 39 Units/l „richtigere“ Werte wieder. Der Normbereich des Medians lag zwischen 2.5 und 80.7 Units/l. Eine andere Studie zur Untersuchung von Serummarkern gab 1995 den Normbereich bei Gesunden mit unter 21.4 U/l (colorimetrische Methode von Kasahara und Ashihira, 1981) an, was deutlich unter den Werten in unserer Untersuchung lag, wobei unklar war, ob der Median oder der Mittelwert berechnet wurde [105]. Im selben Jahr arbeiteten Schmidt et al. mit einem Median von 14.4 U/l bei einer Spannweite von 14 bis 19.8 U/l [108]. Der Median in der aktuellen Arbeit war wesentlich höher. Eine weitere Studie, die Serummarker

verglichen, nutzte 1997 einen Kontrollbereich von 8 bis 23.5 U/l (ACE Colour Test; Fujirebio, Tokio), wobei alle darüber liegenden Werte als erhöht angesehen wurden [111]. Dieser Bereich lag ebenfalls weit unter unserem. Allerdings war ungewiss, worauf sich der Kontrollbereich bezog. Ruprecht et al. erhielten 2001 einen nicht-genotyp-korrigierten Mittelwert bei Gesunden von  $48.0 \pm 16.8$  Units/l. Ein Mittelwert, der über 10 U/l über dem von uns errechneten lag. Im Gegensatz dazu befand sich der Mittelwert der Homozygoten des Genotyps DD bei  $59.8 \pm 14.4$  Units, der Heterozygoten des Genotyps DI bei  $47.7 \pm 14.9$  Units/l und schließlich der Homozygoten des Genotyps II bei  $32.2 \pm 9.5$  Units/l. Dieser Mittelwert entsprach noch am ehesten unserem Ergebnis. Auch der Normbereich ohne Genotyp-Korrektur lag mit Werten zwischen 15.0 und 80.9 Units/l über dem unseren. Dagegen entsprach er für den DD-Genotyp 31.8 bis 87.8 Units/l, für den DI-Genotyp 18.6 bis 76.8 Units/l und für den II-Genotyp 13.7 bis 50.7 Units/l. Der DD-Genotyp wies demzufolge die höchsten Werte auf. Die unserem Ergebnis ähnlichsten Werte zeigte hier die DI-Gruppe, bzw. die nicht-genotyp-korrigierte Gruppe. Verwendet wurde das gleiche Testkit, das auch in der vorliegenden Untersuchung genutzt wurde [98].

Allerdings wurden auch Mittelwerte in anderen Einheiten angegeben. Liebermann gab 1989 in einer Untersuchung zu ACE einen Mittelwert von  $22.6 \pm 6$  Units/ml an [102]. Eine andere Studie bezog sich 1990 auf Werte unter 40 U/ml (modifizierter spektrophotometrischer Assay von Cushman und Cheung) [104].

Planck et al. nutzten 2002 in einer Studie in Skandinavien einen Normbereich zwischen 8 und 32 U/ml bei gesunden Personen, wobei 32 U/ml als Cut-Off-Wert verwendet wurde. Diese Werte wurden mit einer colorimetrischen Untersuchungsmethode berechnet (ACE Colour kit, Fujirebio Inc, Tokio, Japan) [103].

Hier wurde die Schwierigkeit der Vergleichbarkeit einzelner Studien ersichtlich, wie Liebermann [102] und Ruprecht et al. bereits feststellten [98], da verschiedene Labors mit unterschiedlichen Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivität arbeiteten. Daraus resultierten auch diverse Einheiten, die sich oft nicht linear umrechnen ließen. Selbst bei der Verwendung gleicher Methoden und gleicher Testkits kam es zu unterschiedlichen Norm- und Mittelwerten, wie die vorliegende Untersuchung zeigte.

Ein weiterer zu untersuchender Serummarker, der routinemäßig zur Diagnostik von Sarkoidose herangezogen wurde, war das Lysozym. In der vorliegenden Studie wurde bei den Kontrollpersonen ein Mittelwert von  $1200.1 \pm 185.5$  U/ml errechnet. Der Normalbereich erstreckte sich von 836.5 bis 1563.6 U/ml. Die hierfür gängige Methode wurde weiter oben beschrieben. In einer anderen Arbeit wurde ein Mittelwert von  $11.0 \pm 6.6$  µg/ml angegeben [106]. Auch hier besteht das Problem der verschiedenen Tests und Einheiten und daraus folgend der mangelnden Analogie.

Während man bei ACE und Lysozym auf das Problem der ungenügenden Übertragbar- und Vergleichbarkeit stieß, fand sich mit sIL-2R, einem löslichen Rezeptormolekül, das die T-Zell-Aktivierung widerspiegelte [87] ein möglicherweise unkomplizierterer Parameter zur Untersuchung einer Sarkoidose. Der Normbereich des Testkits wurde zwischen 85 und 961 U/ml angegeben, wobei statt eines Mittelwertes der Median erstellt wurde. Dieser betrug 456 U/ml [4]. In unserer Untersuchung der Kontrollgruppe erhielten wir niedrigere Werte. Der Median lag bei 307.0 U/ml bei einer Spannweite von 255 und 367.5 U/ml und einem Normbereich von 151.3 bis 552.0 U/ml. Der Mittelwert entsprach  $302.4 \pm 17.8$  U/ml mit einem Normalbereich zwischen 133.9 und 682.8 U/ml. Eine Studie in Hinblick auf die Sensitivität von sIL-2R bezogen auf die Sarkoidose-Aktivität aus dem Jahre 1990 berief sich auf den Normbereich zwischen 80 und 300 U/ml bei Gesunden und lag somit unterhalb des von uns erstellten Bereichs (Cellfree Interleukin-2 Receptor Bead Kit, T Cell Sciences Inc, Cambridge, MA)[104]. Pizzolo beschrieb 1991 einen Normbereich bei Gesunden von 100 bis 500 U/ml, mit einem Mittel bei ungefähr 250 U/ml, was wiederum niedriger als unsere Werte war (Cellfree Interleukin-2 Receptor Bead Kit, T Cell Sciences Inc, Cambridge, MA) [95]. Ziegenhagen et al. nutzten 1997 den ELISA von DPC (Biermann, Bad Nauheim, Deutschland) der einen Normalbereich zwischen 99 und 919 U/ml mit einem Median von 583 U/ml ergab [32]. In diesem Falle wurden höhere Werte erzielt, als bei uns. Eine Untersuchung von sIL-2R als biochemischem Marker für *acute graft-versus-host-disease* aus dem Jahre 2000 präsentierte einen sIL-2R-Mittelwert der Kontrollgruppe von  $573 \pm 2$  U/ml (T Cell Diagnostics, Cambridge, MA) [96]. Auch dieses Ergebnis differierte stark von unserem. In einer Untersuchung von Zytokinassays bei

granulomatösen Lungenkrankheiten aus demselben Jahr wurden Werte unter 1000 U/ml als normal beschrieben, was sehr weit gefasst war (ELISA, Reagenzien der Firma Medgenix)[107]. Unser Mittelwert und Normbereich lagen zwischen denen der anderen und stellten damit tatsächlich neue Werte dar.

Mit IL-8 existierte ein weiterer Serummarker, der zwar nicht in das übliche Repertoire der Sarkoidose – Diagnostik gehörte, allerdings bei interstitiellen fibrosierenden Lungenkrankheiten, wie idiopathischer Lungenfibrose erhöht ist und daher erhoben wurde [61]. Unsere Arbeit ergab aus der Gruppe der Gesunden Normwerte zwischen 3.12 und 43.02 pg/ml. Der Mittelwert betrug hier 17.3 pg/ml. In einer anderen Untersuchung zu IL-8 und Sarkoidose wurde 1995 ein oberer Grenzwert von 5.8 pg/ml angegeben, die untere Nachweisgrenze mit 3.0 pg/ml (ELISA kit, Toray, Tokio, Japan) [105]. Dies befand sich entschieden unterhalb unseres Ergebnisses. Ebenfalls 1995 wurden in einer Sarkoidose-Studie IL-8-Medianwerte für Kontrollen von 20 pg/ml mit einer Spannweite von 0 bis 72 pg/ml dargestellt (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [108]. In unserer Arbeit erhielten wir einen niedrigeren Median von 16.3 pg/ml mit einer Spannweite von 3.0 pg/ml und 57.7 pg/ml. Ziegenhagen et. al. erhielten 1998 einen Serum-Mittelwert von  $5.2 \pm 0.8$  pg/ml in ihrer Kontrollgruppe (CLB, Amsterdam, Holland) [61].

### **5.3.1 Diagnose und Serummarker**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kollektiv aus gesunden Personen als Referenzgruppe für ACE-, Lysozym-, sIL-2R- und IL-8-Normalwerte untersucht. Alle Mittelwerte der vier Serummarker lagen bei den Sarkoidose-Patienten signifikant über denen der gesunden Personen. Besonderes Augenmerk wurde nun darauf gelegt, bestimmen zu können, ob ein Patient ab einem bestimmten ACE-Wert – einem Grenzwert - tatsächlich an einer Sarkoidose leidet. Denn auch andere Krankheiten wie die Berylliose, die Asbestose oder Morbus Gaucher wiesen erhöhte ACE-Werte auf

[52]. Aus diesem Grunde erschien es sinnvoll, verschiedene Krankheitsbilder hinsichtlich ihrer ACE-Mittelwerte miteinander zu vergleichen. Mittels einer Receiver-Operating-Characteristic (ROC) wurde versucht, einen Wert zu erhalten, der eine ebenso hohe Sensitivität wie Spezifität aufweist. Ein solcher Cut-off-Wert sollte Gesunde eindeutig von Kranken trennen. Bei 36.3 U/l ACE erhielten wir eine Sensitivität von 67.3%, was bedeutet, dass immerhin 2/3 der Kranken als krank und über die Hälfte der Gesunden als gesund erkannt wurden. Die Spezifität lag bei 63.3%. Hier lagen Sensitivität und Spezifität am Nächsten beieinander, was in diesem Falle den Cut-off-Wert auszeichnete. Im Vergleich mit der Gruppe der fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten ergab sich zwar eine bessere Trennschärfe, die eine Spezifität von 75% lieferte, wobei möglicherweise auch die eher geringe Fallzahl der untersuchten Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten eine Rolle gespielt haben könnte. Die Sensitivität lag bei 63.8%. Der entsprechende Cut-off-Wert wurde mit 37.7 U/l angegeben.

Es ließ sich somit feststellen, dass ACE mit einer Sensitivität von knapp 70 % relativ gut zwischen krank und gesund unterscheiden konnte, und eine überraschend gute Spezifität im Vergleich der einzelnen Krankheiten Sarkoidose und unserem Kollektiv der fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten präsentierte. Allerdings wurde ACE fast ausschließlich bei Sarkoidosepatienten erhoben. Weitere Untersuchungen in Hinblick auf die fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten könnten mehr Aufschluss geben. Insofern wird ACE weiterhin bei bereits erfolgter und gesicherter Diagnose zur Verlaufsüberwachung dienen. Außerdem wird es als Screening-Parameter zum ersten Herausfiltern von tatsächlich Erkrankten bei Verdachtsdiagnosen ebenso von Nutzen bleiben. Auch Schürmann kam zu der Ansicht, dass eine Erhöhung des ACE-Spiegels die Diagnose einer Sarkoidose höchstens unterstützen könnte [109], während Ziegenhagen et al. feststellten, dass die Erhebung von ACE-Werten für eine Aussage in Bezug auf das Ausmaß der Erkrankung nicht hilfreich sei [110].

Bereits 1990 entdeckte die Forschungsgruppe um Rigat einen Deletions-/Insertions- (D-/I-) Polymorphismus des ACE-Gens, der einen Teil der interindividuellen Variabilität der ACE-Werte erklären konnte [39]. Die DD-Homozygoten wiesen hier die höchsten und die II-Homozygoten die niedrigsten Werte auf. Die DI-Heterozygoten lagen dazwischen. Aus diesem Grunde schlugen Ruprecht et al. 2001 vor, eine Genotypen-

Bestimmung im Rahmen der Sarkoidose-Diagnostik durchzuführen [98]. Dies wurde auch von Planck [103] und Schürmann bekräftigt. Trotzdem gibt es keinen ausreichenden Beweis für einen zwingenden Effekt des ACE-D-/I-Gen-Polymorphismus auf die Sarkoidose [109].

Verglich man Lysozym und ACE anhand der Mittelwerte, zeigte sich, dass das Lysozym besser noch als ACE in der Lage war, zwischen Sarkoidose und den Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten zu trennen. Während der Lysozym-Wert dieser Gruppe signifikant unterhalb des Lysozym-Wertes der Gesunden lag, befand sich der Lysozym-Wert der Sarkoidosepatienten signifikant darüber.

Wand man die ROC-Analyse auf das Lysozym an, so erhielt man im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine kaum aussagekräftige Grafik. Diese lieferte nur eine sehr ungenaue Trennschärfe zwischen gesund und krank (Sarkoidose). Bei 1210.0 U/ml erreichte Lysozym eine Sensitivität von 62.5% und eine Spezifität von 51% gegenüber Gesunden. Hieraus ließ sich schließen, dass Lysozym kein spezifischer Serummarker für Sarkoidose war. Zwar erzielte man bei 1195.0 U/ml eine Spezifität von ca. 64 % gegenüber den Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten und damit eine dezent bessere Trennschärfe als den Gesunden gegenüber. Allerdings lagen diese beiden Lysozym-Werte relativ eng beieinander. Wir kamen ebenso wie Romer [82] und Tomita et al. [106] zu dem Ergebnis, dass Lysozym-Werte auch dann erhöht sein konnten, wenn die ACE-Werte sich im Normbereich befanden. Damit diene Lysozym ebenso wie ACE eher zum Monitoring bei einer bereits gestellten Diagnose.

Im Vergleich der Mittelwerte von sIL-2R der gesunden Kontrollgruppe sowohl mit der Gruppe der Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten, als auch mit der Sarkoidose-Gruppe zeigte sich ebenfalls, dass dieser Parameter lediglich zwischen gesund und krank signifikant unterscheiden konnte, nicht zwischen den beiden kranken Gruppen. In der ROC-Analyse präsentierte sIL-2R jedoch eine gute Trennschärfe im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Die Kurve der Grafik wies bei 382.00 U/ml eine deutliche Spitze auf, bei der die Sensitivität über 80% lag. Wir fanden hier einen Cut-off-Wert, der deutlich Sarkoidosepatienten von gesunden Personen abgrenzte. Auch die Spezifität von sIL-2R mit knapp 73% untermauerte die Nützlichkeit dieses

Serummarkers in dieser Hinsicht. Die Trennschärfe zu Gesunden konnte noch wesentlich verbessert werden, wenn man sIL-2R mit dem Alter multiplizierte. Durch diese Methode erhielt man Werte, mit einer äußerst hohen Sensitivität und Spezifität (über 90%, bzw. 80%). Da das Alter unseres Kontrollkollektivs nur bis 55 Jahre reichte, müssen noch Untersuchungen mit älteren Normalpersonen diese Werte bekräftigen. Eine Differenzierung zwischen Sarkoidose und fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten war nur bedingt möglich, weswegen hierzu weiterführende Methoden in diese Richtung von Bedarf sind.

Beim Vergleich mit anderen Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten mussten wir leider feststellen, dass hier sowohl die Sensitivität, als auch die Spezifität nur bei etwas mehr als 50% lagen, was für eine möglichst exakte diagnostische Trennung nicht ausreichte. Dennoch könnte sIL-2R maßgeblich dazu beitragen, die Diagnose einer Sarkoidose zu festigen. Außerdem schien sIL-2R bei der Beurteilung der Krankheitsschwere und des Verlaufs eine wichtige Rolle einzunehmen [111,112].

Für IL-8 erhielten wir durch die ROC-Grafik einen Cut-off-Wert von 20.3 pg/ml beim Vergleich von Gesunden mit Sarkoidosepatienten. Mit einer Sensitivität von 65% und einer Spezifität von 76% lag die Aussagekraft dieses Parameters unter der von ACE und über der von Lysozym, aber deutlich unter der von sIL-2R, die am höchsten war. In bezug auf ACE widersprach dieses Ergebnis einer anderen Arbeit [105]. Allerdings befanden sich Sensitivität und Spezifität in Hinblick auf eine Trennung zwischen Sarkoidose und Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten nur bei knapp unter 60%, was den differentialdiagnostischen Wert von IL-8 in dieser Hinsicht nicht unterstützte.

### 5.3.2 Geschlecht und Alter und Serummarker

Die Normwerte aller vier untersuchten Serummarker konnten sowohl auf männliche, wie auch auf weibliche Patienten bezogen werden, da kein signifikanter Unterschied von uns festgestellt werden konnte. Dies stimmte mit den Ergebnissen anderer Autoren überein [98,113,106,61].

Ebenso existierte bei ACE, Lysozym und IL-8 keine signifikante Altersabhängigkeit. Die Normbereiche dieser Serummarker ließen sich folglich ohne Berücksichtigung des Alters verwenden.

Im Gegensatz dazu konnten wir eine Korrelation bei sIL-2R registrieren. Mit ansteigendem Lebensalter sank der Wert des sIL-2R signifikant ab ( $p=0.0036^{**}$ ). Dies wurde von einer anderen Studie aus dem Jahre 1991 ebenso festgestellt [113]. Insofern müsste man für eine exaktere Interpretation bei der Beurteilung von sIL-2R-Werten das Alter der Individuen miteinbeziehen. Möglicherweise können hier altersgruppenspezifische Normbereiche, wie in Tabelle 16 dargestellt weiterhelfen.

Die gegensinnige Korrelation zwischen ansteigendem Alter und absinkenden Serumwerten von ACE und IL-8 in der Gruppe der Sarkoidosepatienten war nicht signifikant, ebenso wenig, wie die gleichsinnige Beziehung von Lysozym und sIL-2R. Ähnliches war in der Gruppe der Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten ACE, Lysozym und IL-8 betreffend zu erkennen. Das gleichzeitige Ansteigen von sIL-2R bei zunehmendem Alter deckte allerdings eine signifikante Beziehung auf. Die Verteilung der erhöhten sIL-2R-Werte bei der Sarkoidose umfasste relativ gleichmäßig das gesamte Altersspektrum. Bei den Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheiten jedoch stiegen die Werte vor allem ab dem 60. Lebensjahr an. Dies ließ einen interessanten Schluss zu: Erhöhte sIL-2R-Werte vor dem 60. Lebensjahr könnten die Diagnose einer Sarkoidose gegenüber einer anderen Fibrosierenden Interstitiellen Lungenkrankheit erhärten. Dieser neue Aspekt bedarf zwar noch weiterer Untersuchung, scheint aber ebenfalls die Bedeutung von sIL-2R in der Sarkoidose-Diagnostik nachdrücklich zu unterstreichen.

## **5.4 Blutbild und Serumchemie**

### **5.4.1 Diagnose und Blutbild**

Da beim Vergleich von Sarkoidose mit den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen hinsichtlich der klassischen Entzündungsparameter des Blutbildes einige Besonderheiten auffielen, sollte dies bei der Differentialdiagnostik beachtet werden.

So fanden wir bei den Sarkoidosepatienten signifikant erniedrigte Leukozytenzahlen und einen Abfall der Serum-Lactatdehydrogenase (LDH) gegenüber den Werten der anderen hier untersuchten Lungenerkrankungen. Ebenso wiesen das Immunglobulin G (IgG) und das C-reaktive Protein (CRP) bei der Sarkoidose ein - wenn auch nicht signifikant - niedrigeres Niveau auf.

Dagegen bestand eine erhöhte Lymphozytenzahl bei der Sarkoidose gegenüber der bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen, die sich als signifikant darstellte.

### **5.4.2 Demographie und Blutbild**

Unter Einbeziehung des Alters konnte die Aussagekraft einzelner Parameter noch erhöht werden. Von Bedeutung waren hier allerdings lediglich die LDH und das CRP, die im Vergleich der untersuchten Lungenerkrankungen nahezu gegensinnige Verläufe zeigten. Während die LDH bei der Sarkoidose mit zunehmendem Alter einen signifikanten Anstieg erkennen ließ, nahm dieser Wert bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen im Laufe des Alters ab. Dagegen stieg bei diesen im

Alter das CRP signifikant an, während es bei der Sarkoidose sank. Auch dieser Unterschied hinsichtlich des CRP stellte sich als signifikant dar. Dies könnte damit zusammenhängen, dass das CRP ein Protein der akuten Phase war. Da die akute Form der Sarkoidose, namentlich das Löfgren-Syndrom eher die jüngeren Patienten betraf, würde das zu erhöhten CRP-Werten passen. Ob sich diese Korrelation als zutreffend und nützlich erweist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

### **5.4.3 Serummarker und Blutbild**

Setzte man die Entzündungsparameter in Korrelation zu den Serummarkern, so erhielt man zusätzliche Diagnostikparameter von unterschiedlicher Brauchbarkeit.

Im allgemeinen galt für die Sarkoidosepatienten, dass bei erhöhten ACE-, Lysozym- und sIL-2R-Werten die Leukozyten, die Lymphozyten und das CRP jeweils signifikant erniedrigt waren. Im Gegensatz zu diesem reziproken Verhältnis zeigten IgG (nicht signifikant) und LDH hier erhöhte Werte. In ähnlichem Maße wurde dies auch bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen deutlich. Insofern mag dieses Ergebnis von zusätzlich unterstützendem Wert sein.

Außerdem könnte die Divergenz der Regressionsgeraden beider Diagnosegruppen hinsichtlich der signifikanten Korrelation zwischen sIL-2R und LDH von größerem diagnostischen Nutzen sein. Das bedeutete, dass das gleichzeitige Ansteigen von sIL-2R und LDH bei Sarkoidose und das Absinken von LDH beim Anstieg von sIL-2R bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen die beiden Krankheiten zu unterscheiden vermochte. Allerdings müssen dies noch weitere Untersuchungen untermauern.

## 6. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Norm - und Cut-off-Werte für ACE, sIL-2R, Lysozym und IL-8 in Bezug auf die granulomatös-entzündliche Systemerkrankung Sarkoidose zu bestimmen.

Gerade das Enzym ACE betreffend, stieß man hier auf einige Schwierigkeiten. Diese begannen bereits bei der Angabe seiner Serum-Werte in den verschiedenen Veröffentlichungen. Während von einigen Autoren Mittelwerte verwendet wurden, nannten andere den Median. Wieder andere beschrieben Normwerte bzw. -bereiche, die sich wiederum auf Mittelwerte bzw. Mediane bezogen; manchmal allerdings blieb der Bezug unklar. Weiterhin traf man in verschiedenen Publikationen auf ACE-Werte, die dann als nicht pathologisch bezeichnet wurden, wenn sie unterhalb einer gewissen Grenze, eines sogenannten Cut-off-Wertes lagen. Die Sensitivität bzw. Spezifität wurde leider nur sehr selten berücksichtigt. Wie weiter oben bereits erwähnt, existierte keine exklusive Einheit. So wurde die ACE-Aktivität in Units, Units pro Liter oder Units pro Milliliter angegeben. Ebenso differierten die Labormethoden zur Bestimmung der ACE-Aktivität im Serum. Oftmals wurden innerhalb derselben Klinik verschiedene Methoden zur Messung der ACE-Aktivität verwendet.

Ein weiteres Problem des ACE bestand in der Tatsache, dass eine große Variabilität der ACE-Aktivität von Individuum zu Individuum bestand, wenn auch die Werte innerhalb der Einzelpersonen beständig blieben [98].

Daher spielte der D/I-Polymorphismus des ACE-Gens eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Normalwerte gesunder Personen. So fanden Ruprecht et al. für die unterschiedlichen ACE-Genotypen bei Personen kaukasischen Ursprungs - in diesem Falle aus Norddeutschland - auch verschiedene ACE-Mittelwerte, bzw. Normbereiche. Die Verteilung der Genotypen zeigte, dass die meisten (ca.50%) heterozygot (DI) waren, gefolgt von den DD-Homozygoten (ca.30%) und den II-Homozygoten (ca.20%). Die Gruppe der DD-Homozygoten zeigte die höchsten, die der II-Homozygoten die niedrigsten Werte. Dazwischen lagen die heterozygoten Werte [98]. Da unser

Normbereich zu dem der Heterozygoten am besten passte, konnte man vermuten, dass wiederum ein Großteil unserer Kontrollgruppe dem heterozygoten Genotyp angehörte.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Genotypenverteilung zwischen Kaukasiern und Afroamerikanern divergierte. So zeigten Afroamerikaner des DD-Genotyps ein dreimal höheres Risiko, an Sarkoidose zu erkranken als Europäer desselben Genotyps und dieses wurde bei einer positiven Familienanamnese noch verstärkt [116]. Auch bei Sarkoidose-Patienten ließ sich der Gen-Polymorphismus nachweisen [109].

Wie von Ruprecht et al. vorgeschlagen, könnte es daher ein wichtiger Schritt sein, routinemäßig den ACE-Genotyp unter Berücksichtigung verschiedener ethnischer Gruppen zu bestimmen [19,98]. Dennoch gab es keinen zwingenden Zusammenhang zwischen dem Gen-Polymorphismus und der Sarkoidoseerkrankung [109]. Wie und ob sich der Polymorphismus des ACE-Gens bei anderen Krankheiten mit erhöhter ACE-Aktivität auswirkt, muss noch untersucht werden.

Trotz der besprochenen Hindernisse konnte in der vorliegenden Arbeit ein neuer Normbereich des Medians von 2.5 bis 80.7 Units/l erstellt werden. Der Median als bessere Alternative zum Mittelwert betrug 31.4 Units/l. Außerdem konnten wir zeigen, dass ACE bei einem Cut-off-Wert von 36.3 U/l mit einer Sensitivität von knapp 70 % relativ gut krank von gesund trennen kann. Allerdings erwartungsgemäß nicht gut genug, um als alleiniger Marker für Sarkoidose zu dienen. Indes konnten wir einen Cut-off-Wert darstellen, der vor allem als primärer Screening-Parameter bei dem Verdacht auf eine Sarkoidose von Nutzen sein kann. Eine signifikante altersspezifische Verteilung der ACE-Werte ließ sich nicht feststellen.

Obwohl sich mit Lysozym ein unspezifischer Marker für Sarkoidose präsentierte, dessen Einheit ebenfalls sehr variabel angegeben wurde, nimmt es eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Diagnostik der Sarkoidose ein. Beim Vergleich der Mittelwerte präsentierte Lysozym eine deutliche Abgrenzung zwischen Gesunden, Sarkoidosepatienten und Patienten mit anderen fibrosierenden interstitiellen Lungenkrankheiten. Wobei die Werte der Sarkoidosepatienten am höchsten und die der Patienten der anderen Gruppe am niedrigsten waren. Der neue Mittelwert von Lysozym betrug  $1200.1 \pm 185.5$  U/ml, während der Normalbereich sich von 836.5 bis 1563.6 U/ml erstreckte.

Darüber hinaus konnte das Lysozym auch bei erniedrigten ACE-Werten erhöht sein und somit den Hinweis auf eine Sarkoidose liefern. Allerdings lag die Sensitivität unseres Cut-off-Wertes von 1210.0 U/ml unter der von ACE. Die Lysozymwerte wiesen keine signifikanten Altersunterschiede auf.

Das Protein sIL-2R betreffend, erhielten wir einerseits einen neuen Mittelwert und Normbereich, andererseits eine interessante, möglicherweise nützliche Begebenheit. Der von uns erzielte Mittelwert lag mit  $302.4 \pm 17.8$  U/ml zwischen den Werten aus anderen Untersuchungen. Diese befanden sich sowohl oberhalb unseres Mittelwertes, als auch darunter, nicht jedoch auf gleichem Niveau. Ebenso verhielt es sich mit unserem Normbereich zwischen 133.9 und 682.8 U/ml. Insofern konnte man davon ausgehen, dass wir tatsächlich neue Werte erstellt hatten.

Überdies hatten wir mit 382.00 U/ml einen Cut-off-Wert bestimmt, der mit hoher Sensitivität (über 80%) Sarkoidosepatienten von Gesunden trennte. In dieser Hinsicht schien sich mit sIL-2R ein besserer Serummarker für die Sarkoidose anzubieten, als dies bisher mit ACE der Fall war. Untermauert wurde die diagnostische Bedeutung von sIL-2R in unserer Untersuchung noch dadurch, dass dieser Marker eine Altersabhängigkeit zeigte. Diesbezüglich konnten wir feststellen, dass erhöhte sIL-2R-Werte vor dem 60. Lebensjahr den Verdacht auf eine Sarkoidose im Gegensatz zu einer anderen fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankung konsolidieren könnten. Natürlich müssen weitere entsprechende Untersuchungen in dieser Richtung folgen.

IL-8 zeigte beim Vergleich der Mittelwerte keinerlei Unterscheidung zwischen den Diagnosegruppen und stellte somit keinen spezifischen Serummarker dar. Zwar fanden wir auch hier mit Werten zwischen 3.12 und 43.02 pg/ml einen neuen Normbereich und ebenfalls einen neuen Mittelwert mit 17.3 pg/ml. Diese Ergebnisse lagen teils deutlich über den bisher angegebenen Normbereichen. Den Cut-off-Wert von 20.3 pg/ml zeitigte eine Sensitivität, die gerade über der von Lysozym lag, allerdings noch unter der von ACE. Infolge seiner mangelnden Spezifität diente IL-8 auch nicht als Parameter für eine Ausschlussdiagnose in Hinsicht auf die Sarkoidose. Die IL-8-Werte ließen sich ohne signifikante Altersbeschränkung anwenden.

Sämtliche untersuchten Serummarker konnten ohne Einschränkung auf männliche und weibliche Personen übertragen werden, da sich hier keine geschlechtsspezifischen Unterschiede von signifikanter Bedeutung nachweisen ließen.

Das Blutbild und die Serumchemie betreffend konnten wir bei den Sarkoidosepatienten gegenüber den Patienten mit fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen signifikant erhöhte Lymphozyten feststellen und signifikant erniedrigte Leukozyten und Serum-LDH. Dementsprechend konnten Leukozyten, Lymphozyten und die Serum-LDH bei der Diagnostik helfen.

Außerdem zeigten CRP und LDH sowohl bei der Sarkoidose, als auch bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen altersabhängige Werte.

Zusätzlich dazu könnte sich die Divergenz zwischen dem gleichzeitigen Ansteigen von sIL-2R und LDH bei Sarkoidose und dem Absinken von LDH beim Anstieg von sIL-2R bei den fibrosierenden interstitiellen Lungenerkrankungen als nützlicher Parameter zur Differentialdiagnose erweisen. Weitergehende Untersuchungen diesbezüglich könnten von Nutzen sein.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Hurst P.L., Lovell-Smith C.J.: Optimized Assay for serum angiotensin converting enzyme activity. *Clin. Chem.* 1981; 27: 2048-52.
2. Neels H.M., Scharpe S.L., van Sande M.E., Verkerk R.M., Van Acker K.J.: Improved micromethod for assay of serum angiotensin converting enzyme. *Clin. Chem.* 1982; 28 (6): 1352-5.
3. Bühlmann Laboratories AG Allschwil 1, Schweiz: Angiotensin Converting Enzyme/ACE kinetic; Order Code: KK-ACK; Revision date: October 12/2000.
4. Milenia Biotech, Hohe Straße 4-8, 61231 Bad Nauheim: Milenia sIL-2R (MK2R), MK2R – C – Version: 2002-01-07; Bedienungsanleitung.
5. Quantikine<sup>R</sup> Human IL-8 Immunoassay, Catalog Number D8050, R&D Systems, Inc. 614 McKinley Place N.E. Minneapolis, MN 55413 USA; Bedienungsanleitung.
6. Fabel, Pneumologie; 2. Auflage, Urban und Schwarzenberg, 1995; München, Wien, Baltimore; S.465-488.
7. Boeck, C.: Multiple benign sarcoid of the skin. *J. cutan. Genito-urinary Dis.* 17 (1899) S.543-550.
8. Hosada, Y., M. Odaka: History of Sarcoidosis in Extrapulmonary Sarcoidosis. *Sem. Resp. Medicine Vol. 13, Nr.5 (1992); S.359-367.*
9. Hutchinson, J.: Case of Mortimer's malady. *Arch. Surg.* 9 (1898); S.307-314.
10. Teirstein, A.S., Lesser, M.; World-wide distribution and epidemiology of sarcoidosis. In: Fanburg, B. ed. Sarcoidosis and other granulomatous diseases of the lung. Basel, Dekker, 1983; pp. 101-134.
11. Müller-Quernheim, J.; Sarcoidosis: immunopathogenic concepts and their clinical application. *Eur. Respir. J.*, 1998; 12: 716-738.
12. Geraint James, D.; Sarcoidosis 2001. *Postgrad. Med. J.*, 2001; 77: 177-180.
13. Rybicki, B.A., Major, M., Popovich, J. Jr., Maliarik, M.J., Ianuzzi, M.C.: Racial differences in sarcoidosis incidence: a 5-year study in health maintenance Organization. *Am. J. Epidemiol.* 1997; 145: 234-241.

14. Rybicki, B.A., Harrington, D., Major, M. et al. Heterogeneity of familial risk in sarcoidosis. *Genet. Epidemiol.* 1996; 13: 23-33.
15. Martinetti, M., Tinelli, C., Kolek, V., et al. "The sarcoidosis map": a joint survey of clinical and immunogenic findings in two European countries. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152: 557-564.
16. Richeldi, L., Sorrentino, R., Saltini, C. HLA-DPB 1 glutamate 69: a genetic marker of beryllium disease. *Science* 1993; 262: 242-244.
17. Furuya, K., Yamaguchi, E., Itho, A. et al. Deletion Polymorphism in the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene as a genetic risk factor for sarcoidosis. *Thorax* 1996; 51: 777-780.
18. Arbustini, E., Grasso, M., Leo, G. et al. Polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene in sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996; 153: 851-854.
19. Sharma, P. Smith, I., Maguire, G., Stewart, S., Shneerson, J., Brown, M.J. Clinical value of ACE genotyping in diagnosis of sarcoidosis. *Lancet* 1997; 349: 1602-1603.
20. Tomita, H., Ina, Y., Sugiura, Y. et al. Polymorphism in the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene and sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1997; 156: 255-259.
21. Kuwano, K., Nomoto, Y., Kunitake, R., et al. Detection of adenovirus E1A DNA in puömonarx fibrosis using nested polymerase chain reaction. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1445-1449.
22. Bocart, D., Lecossier, D., de Lassence, A., Valeyre, D., et al. A search for mycobacterial DNA in tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992; 145: 1142-1148.
23. Gerdes, J., Richter, E., Rüsç-Gerdes, S., et al. Mycobacterial nucleic acids in sarcoid lesions. *Lancet* 1992; 339: 1536-1537.
24. Ghossein, R.A., Ross, D.G., Salomon, R.N., Rabson, A.R. A search for mycobacterial DNA in sarcoidosis using the PCR. *Am. J. Clin. Pathol.* 1994; 101: 733-737.
25. Di Alberti, L., Piatelli, A., Artese, L., et al. Human herpesvirus 8 variants in sarcoid tissues. *Lancet* 1997; 350: 1655-1661.
26. Puolokkainen, M., Campbell, L.A., Kuo, C.C., et al. Serological response to Chlamydia pneumoniae in patients with sarcoidosis. *J. Infection* 1996; 33:199-203.

27. Hua Bing, Li Quing-di, Wang Fu-min, et al. *Borrelia burgdorferi* infection may be the cause of sarcoidosis. *Chin. Med. J.* 1992; 105: 560-563.
28. Martens, H., Zöllner, B., Zissel, G., et al. Anti-*Borrelia burgdorferi* immunoglobulin seroprevalence in pulmonary sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 1997; 10: 1356-1358.
29. Mitchel, D.N., Scadding, J.N. Sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1974; 110: 774-802.
30. Gilbert, S., Steinbrech, D.S., Landas, S.K., et al. Amounts of angiotensin-converting enzyme mRNA reflect the burden of granulomas in granulomatous lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148: 483-486.
31. Müller-Quernheim, J. Pfeifer, S., Strausz, J., et al. Correlation of clinical and immunological parameters of the inflammatory activity of pulmonary sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991; 144: 1322-1329.
32. Ziegenhagen, M.W., Benner, U.K., Zissel, G., Zabel, P., Schlaak, M., Müller-Quernheim, J. Sarcoidosis: TNF-alpha release from alveolar macrophages and serum level of sIL-2R are prognostic markers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 1997; 156: 1586-1592.
33. Eklund, A., Blaschke, E. Elevated serum neopterin in sarcoidosis. *Lung* 1986; 164: 325-332.
34. Carrington, C.B., Gaensler, E.A., Coutu, R.E., Fitzgerald, M.X., Gupta, R.G. Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonie. *New Engl. J. Med.* 1978; 298: 801-809.
35. Baudin, B. New Aspects on Angiotensin-Converting-Enzyme: from Gene to disease. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40 (3): 256-265.
36. Soubrier, F., Hubert, C., Testut, P., Nadaud, S., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme: I. Biochemistry and structure of the gene. *J. Hypertens.* 1993; 11: 471-476.
37. Costerousse, O., Allegrini, J., Lopez, M., Alhenc-Gelas, F. Angiotensin I converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem. J.* 1993; 290: 33-40.
38. Sibony, M., Gasc, J.M., Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Corvol, P. Gene expression and tissue localization of the two isoforms of angiotensin I converting enzyme. *Hypertension* 1993; 21: 827-835.

39. Rigat, B., Hubert, C., Alhenc-Gelas, F., Cambien, F., Corvol, P., Soubrier, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J. Clin. Invest* 1990; 86: 1343-1346.
40. Rieder, M.J., Taylor, S.L., Clark, A.G., Nickerson, D.A., Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat. Genet.* 1999; 22: 59-62.
41. Caldwell, P.R., Seegal, B.C., Hsu, K.C., Das, M., Soffer, R.L. Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 1976; 191: 1050-1051.
42. Baudin, B., Berard, M., Carrier, J.L., Legrand, Y., Drouet, L. Vascular origin determines angiotensin I converting enzyme expression in endothelial cells. *Endothelium* 1997; 5: 73-84.
43. Berard, M., Carrier, J.L., Baudin, B., Drouet, L. Culture of porcine brain capillary endothelial cells: improvement using human hemangioma-conditioned medium. *J. Tiss. Cult. Meth.* 1992; 14: 101-106.
44. Ryan, U.S., Ryan, J.W., Whitaker, C., Chin, A. Localization of angiotensin-converting enzyme (kininase II)-II-Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue* 1976; 8: 125-146.
45. Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G., et al. Two putative active centers in human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85: 9386-9390.
46. Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Hubert, C., Allegrini, J., Lattion, A.L., Corvol, P. The angiotensin I converting enzyme (kininase II): progress in molecular and genetic structure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1990, 15(Suppl.6): 25-29.
47. Bernstein, K.E., Martin, B.M., Edwards, A.S., Bernstein, E.A. Mouse angiotensin I converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 11945-11951.
48. Baudin, B., Mario, N., Gaba, S., Giboudeau, J. Spectroscopic studies on angiotensin I converting enzyme. *Enzym. Prot.* 1994; 48:265-274.
49. Ehlers, M.R.W., Fox, E.A., Strydom, D.J., Riordan, J.F. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 7741-7745.
50. Erdös, E.G., Skidgel, R.A. The angiotensin I converting enzyme. *Lab. Invest.* 1987; 56: 345-348.

51. Cushman, D.W., Ondetti, M.A. Inhibitors of angiotensin-converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacol.* 1980; 29:1871-1877.
52. Beneteau-Burnat, B., Baudin, B. Angiotensin-converting enzyme: clinical applications and laboratory investigations on serum and other biological fluids. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1991; 28: 337-356.
53. Drouet, L., Baudin, B., Baumann, F.C., Caen, J.P. Serum angiotensin-converting enzyme: an endothelial cell marker. Application to thromboembolic pathology. *J. Lab. Clin. Med.* 1988; 112: 450-457.
54. Plassart, F., Cynober, L., Baudin, B., Lioret, N., Beneteau-Burnat, B., Nooand, X.B., et al. Plasma fibronectin and angiotensin-converting enzyme: markers of primary pulmonary injury in burn patients. *Clin. Chim. Acta* 1994; 227: 135-144.
55. Baggilioni, M., Clark-Lewis, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS* 1992; 307 (1): 97-101.
56. Baggilioni, M., Walz, A., Kunkel, S.L. *J. Clin. Invest.* 1989; 84: 1045.
57. Baldwin, E.T., Weber, I.T., St.Charles, R., Xuan, J.C., Appella, E., Yamada, M., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88: 502.
58. Mukaida, N., Shiroo, M., Matsushima, K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J. Immunol.* 1989; 143 (4): 1366-1371.
59. Leonard, E.J., Yoshimura, T. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 1990; 2: 479.
60. Bazzoni, F., Casatella, M., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., Baggilioni, M. *J. Exp. Med.* 1991; 173: 771.
61. Ziegenhagen, M.W., Zabel, P., Zissel, G., Schlaak, M., Müller-Quernheim, J. Serum level of interleukin-8 is elevated in idiopathic pulmonary fibrosis and indicates disease activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 157: 762-768.
62. Seitz, M., Dewald, B., Gerber, N., Baggilioni, M. *J. Clin. Invest.* 1991; 87: 463.
63. Moser, B., Schumacher, C., von Tschärner, V., Clark-Lewis, J., Baggilioni, M. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 10666.
64. Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., Vignais, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 168: 1103.

65. Park, J.S., Kim, Y.S., Jee, Y.K., Myong, N.H., Lee, K.Y. Interleukin-8 production in tuberculous pleurisy: Role of mesothelial cells stimulated by cytokine network involving tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$ . *Scan. J. Immunol.* 2002; 57: 463-469.
66. Pace, E., Gjomarkaj, M., Melis, M., et al. Interleukin-8 induces lymphocyte chemotaxis into the pleural space: Role of pleural macrophages. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1999; 159:592-599.
67. Kurashima, K., Mukaida, N., Fujimura, M., Yasui, M., Nakazumi, Y., Matsuda, T. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 155: 1474-1477.
68. Immunologie, Grundlagen-Klinik-Praxis; 4. neubearbeitete und erweiterte Auflage; 1997; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; S. 45-69.
69. Baggilioni, M., Dewald, B., Walz, A. in: Inflammation, basic principles and clinical correlates. 2<sup>nd</sup> Ed., (J.I. Gallin, I.M. Goldstein, R. Snyderman, eds.) Raven Press, New York, in press.
70. Stryer, L., Biochemie, Aus dem Englischen übersetzt von Günther Stoll; 4. Auflage; Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akad. Verl., 1996; S. 219-245.
71. ebd., 449.
72. Klinke, R., Silbernagel, S. Lehrbuch der Physiologie. 2. neugestaltete und überarbeitete Auflage; 1996; Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York; S. 194.
73. Mason, D.Y., Taylor, C.R. The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *J. Clin. Pathol.* 1975; 28: 124-132.
74. McClelland, B.L., van Furth, R. In vitro synthesis of lysozyme by human and mouse tissues and leukocytes. *Immunology* 1975; 28: 1099-1114.
75. Bodel, P.T., Major, P.T., Gee, B.L. Increased production of endogenous pyrogen and lysozyme by blood monocytes in sarcoidosis. *Yale J. Biol. Med.* 1979; 52:247-256.
76. Koivunen, E., Grönhagen-Riska, C., Klockars, M., Selroos, O. Blood monocytes and serum bone marrow lysozyme in sarcoidosis. *Acta Med. Scand.* 1981; 210: 107-110.
77. Miyauchi, J., Sasadaira, H., Watanabe, K., Watanabe, Y. Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in human monocytes and macrophages. *Cell Tissue Res.* 1985; 242: 269-277.

78. Pantelidis, P., Southcott, A.M., Cambrey, A.D., Laurent, G.J., du Bois, R.M. Activation of peripheral blood mononuclear cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis: visualisation of single cell activation products. *Thorax* 1994; 49: 1146-1151.
79. Osserman, E.F., Lawler, O.P. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and myelomonocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 1966; 289: 1074-1076.
80. Costabel, U. Biochemistry. In: James, D.G. (ed) Sarcoidosis and other granulomatous disorders. Marcel Dekker, New York; S. 438-439.
81. Pascual, R.S., Gee, J.B.L., Finch, S.C. Usefulness of serum lysozyme measurement in diagnosis and evaluation in sarcoidosis. *N. Engl. J. Med.* 1973; 289: 1074-1076.
82. Romer, F.K., Ahlbom, G., Jensen, J.U. Relationship between angiotensin-converting enzyme and lysozyme in sarcoidosis. *Eur. J. Respir. Dis.* 1982; 63: 330-336.
83. Selroos, O.B.N. Biochemical marker in sarcoidosis. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1986; 24: 185-216.
84. Uchiyama, T., Broder, S., Waldmann, T. A. A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T-cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells. *J. Immunol.* 1981; 126: 1393.
85. Tsudo, M., Uchiyama, T., Uchino, H. Expression of Tac-antigen on activated normal human B-cells. *J. Exp. Med.* 1984; 160: 612.
86. Herrmann, F., Cannistra, S.A., Levine, H., Griffin, J.D. Expression of Interleukin-2 by gamma interferon-induced human leukemic and normal monocyte cells. *J. Exp. Med.* 1985; 162: 1111.
87. Junghans, R.P., Stone, A.L., Lewis, M.S. Biophysical characterization of a recombinant soluble interleukin 2 receptor (Tac). *J. Biol. Chem.* 1996; 271, (18): 10453-10460.
88. Smith, K.A. The structure of high affinity IL-2 receptors: alpha chains and beta chains. *Immunol. Today.* 1987; 8: 11.
89. Teshigawara, K., Wang, H.M., Kato, K., Smith, K.A. Interleukin-2 high affinity receptor expression depends on two distinct binding proteins. *J. Exp. Med.* 1987; 165: 223.
90. Takeshita, T., Asao, H., Sugamura, K. et al. *Science.* 1992; 257: 379-382.

91. Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., Gallo, R.C. Selective in vivo growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 1976; 193: 1007-1008.
92. Mier, J.W., Gallo, R.C. Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from phytohemagglutinin stimulated lymphocyte conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980; 77: 6134-6138.
93. Robb, R.J., Munck, A., Smith, K.A. T-cell growth factors: quantification, specificity, and biological relevance. *J. Exp. Med.* 1981; 154: 1455-1474.
94. Greene, W.C. The human interleukin-2 Receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 1986; 4: 69-95.
95. Pizzolo, G. The soluble interleukin-2 receptor as a new biological marker in diseases. *Allergol. Et Immunopathol.* 1991; 19, (4); 176-180.
96. Mathias, C., Mick, R., Grupp, S., Duffy, K. et al. Soluble interleukin-2 receptor concentration as a biochemical indicator for acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Hema. Stem Cell Res.* 2000; 9: 393-400.
97. Liebermann, J. Elevation of serum angiotensin-converting-enzyme (ACE) level in sarcoidosis. *Am. J. Med.* 1975; 59: 365-372.
98. Ruprecht, B., Schürmann, M., Ziegenhagen, M.W., et al. Korrigierte Normwerte für das Serum-ACE durch Genotypisierung eines Deletions-/Insertions-Polymorphismus des ACE-Gens. *Pneumologie*. 2001; 55: 326-332.
99. Takeo, T., Sonoko, N., Kiyoko, S. et al. Soluble Interleukin-2 Receptor in Blood from Patients with Sarcoidosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Sarcoidosis*. 1994; 11: 102-109.
100. Ziegenhagen, M.W., Schrum, S., Zissel, G. et al. Increased Expression of Proinflammatory Lavage Cells of Patients with Progressing Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Sarcoidosis. *J. Investig. Med.*; 1998; 46: 223-231.
101. Klockars, M., Selroos, O. Immunohistochemical demonstration of lysozyme in the lymph nodes and Kveim reaction papules in sarcoidosis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A*. 1977; 85: 169-173.
102. Liebermann, J. Enzymes in Sarcoidosis. Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE). *Clin. Lab. Med.* 1989; 9: 745-55.
103. Planck, A., Eklund, A., Yamaguchi, E., Grunewald, J. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in relation to HLA-DR in sarcoidosis. *J. Int. Med.* 2002; 251: 217-22.

104. Keicho, N., Kitamura, K., Takaku, F. et al. Serum Concentration of Soluble Interleukin-2 Receptor as a Sensitive Parameter of Disease Activity in Sarcoidosis. *Chest*. 1990; 98: 1125-29.
105. Yokoyama, T., Kanada, T., Kobayashi, I. et al. Serum levels of Interleukin-8 as a marker of disease activity in patients with chronic sarcoidosis. *J. Med.* 1995; 26: 209-19.
106. Tomita, H., Sato, S., Matsuda, R. et al. Serum Lysozyme Levels and Clinical Features of Sarcoidosis. *Lung*. 1999; 177: 161-67.
107. Belli, F., Capria, A., Moraiti, A. et al. Cytokines Assay in Peripheral Blood and Bronchioalveolar Lavage in the Diagnosis and Staging of Pulmonary Granulomatous Diseases. *Int. J. Immuno. Pharm.* 2000; 13: 61-67.
108. Schmidt, M., Wirtz, H. Sarkoidose der Lunge: Klinischer Verlauf und entzündliche Aktivität. *Pneumologie*. 1995; 49: 226-32.
109. Schürmann, M. Angiotensin-Converting Enzyme Gene Polymorphisms in Patients with Pulmonary Sarcoidosis. Impact on Disease Severity. *Am. Pharmacogenomics*. 2003; 4: 233-43.
110. Ziegenhagen, M.W., Rothe, M.E., Schlaak, M. Bronchoalveolar and serological parameters reflecting the severity of sarcoidosis. *Eur. Respir. J.* 2003; 21: 407-13.
111. Ziegenhagen, M.W., Benner, U.K., Zissel, G. Sarcoidosis: TNF- $\alpha$  Release from Alveolar Macrophages and Serum Level of sIL-2R Are Prognostic Markers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997; 156: 1586-92.
112. Rothkrantz-Kos, S., van Dieijnen-Visser, M.P., Mulder, P. Potential Usefulness of Inflammatory Markers to Monitor Respiratory Functional Impairment in Sarcoidosis. *Clin. Chem.* 2003; 49: 1510-17.
113. Caruso, C., Di Lorenzo, G., Modica, M.A. Soluble Interleukin-2 Receptor Release Defect in Vitro in elderly Subjects. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1991; 59: 27-35.
114. Rothagi, P.K. Serumangiotensin converting enzyme in pulmonary disease. *Lung*. 1982; 160: 287-301.
115. Pertschuk, L.P., Silverstein, E., Friedland, J. Immunohistologic diagnosis of sarcoidosis. Detection of angiotensin-converting enzyme in sarcoid granulomas. *Am. J. Clin. Pathol.* 1987; 75: 350-54.

116. Maliarik, M.J., Rybicki, B.A., Malvitz, E. et al. Angiotensin-converting Enzyme Gene Polymorphism and Risk of Sarcoidosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158: 1566-70.

# Danksagung

Zuerst gebührt Herrn Prof. Dr. Schmidt ein herzlicher Dank für die Überlassung des Themas der vorliegenden Promotion. Nicht nur durch seine unkomplizierte und aufgeschlossene Art, sondern auch wegen der schnellen und klaren Korrektur der Manuskripte sorgte er dafür, dass kaum Probleme auftauchten, bzw. schnell behoben werden konnten. Auch für seine geduldige und nie bedrängende Präsenz bei Fragen möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Weiterhin schulde ich Frau Margreth Wechner aus dem pneumologischen Labor aufrichtige Dankbarkeit, die zu jeder Zeit, auch nachdem ich länger im Labor abwesend war, Hilfe und Rat – in allen Lebenslagen – bereitstellte. Gerne spendete sie auch Trost, wenn einmal ein schwieriger, mühseliger Test wiederholt werden musste. Unsere gemeinsame Begeisterung für die härtere Seite des Rock´n´Roll machte auch die langwierigere Arbeit im Labor zur Freude!

Darüber hinaus war mir Frau Meister, die Herrin der Bibliothek in der Inneren Klinik eine große Hilfe, als die Artikelrecherche via Internet begann. Unermüdlich erklärte sie aufs Neue, welche Kästchen der Masken wie ausgefüllt werden mussten!

Außerdem bin ich Frau Haubitz sehr verbunden, die mir ihre Dienste als Statistikerin zur Verfügung stellte und ihr Wissen sehr anschaulich und verständlich vermittelte.

Schließlich bedanke ich mich bei Frau Mewis im medizinischen Dekanat, die durch ihre speziellen Ratschläge das i-Tüpfelchen bei der Abgabe dieser Promotion beitrug.

# Lebenslauf

Karlstr. 21  
63739 Aschaffenburg

## Christian Sieber

Persönliche Informationen:	Familienstand: ledig	
	Staatsangehörigkeit: deutsch	
	Geburtstag: 30.01.1973	
	Geburtsort: Würzburg	
	Eltern: Dr.med.dent. Karl-Heinz Sieber, Gerdi Sieber	
Ausbildung:	09/1979 – 07/1983	Volksschule Volkach
	09/1983 – 07/1993	Egbert-Gymnasium Münsterschwarzach
	07/1993	Allgemeine Hochschulreife
	05/1995 – 07/2001	Studium der Zahnheilkunde an der Bayerischen Maximilian Universität Würzburg
	07/2001	Approbation
Ersatzdienst:	09/1993 – 11/1994	Springer im OP der Neurochirurgischen Klinik der Bayerischen Maximilian Universität Würzburg
Außerberufliche Tätigkeit:	12/1994 – 03/1995	Pflegehelfer in der Neurochirurgischen Klinik der Bayerischen Maximilian Universität Würzburg
Berufliche Tätigkeit:	09/2001 – 03/2003	Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dr.Kral in Grettstadt
	04/2003 – 08/2003	Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dr.Sieber in Volkach
	09/2003 – heute	Assistenz Zahnarzt in der Praxis Dr.Neuber in Aschaffenburg

Aschaffenburg, den 25.04.2005

---

Christian Sieber