

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

Klinische Relevanz der Bestimmung von MMP-9 und TIMP-1
in BALF bei Lungenfibrose- und Sarkoidosepatienten

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Julia Meyer
aus Erfurt

Würzburg, Juli 2009

Referent: Professor Dr. M. Schmidt

Koreferent: Professor Dr. H. Hebestreit

Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2009

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinem Ehemann in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung	1
1.1 Überblick Interstitielle Lungenkrankheiten	1
1.2 Idiopathische Lungenfibrose	2
1.3 Sarkoidose	6
1.4 Probleme des Managements	9
1.5 Neue Erkenntnisse in der Pathogenese der Lungenfibrose	10
1.6 MMP-9 und TIMP-1	11
1.7 Ziel der Studie	13
II. Material und Methoden	14
2.1 Studienpopulation	14
2.2 Lungenfunktionsanalysen	17
2.3 Bronchoalveoläre Lavage	17
2.4 ELISA	18
MMP-9	19
TIMP-1	20
2.5 Evaluation der Krankenblätter	21
2.6 Statistische Auswertung	21
III. Ergebnisse	22
3.1 Lungenfunktionsanalysen	
zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	22
nach 2 Jahren	23
3.2 BALF- Zellanalyse	25
3.3 Konzentrationen der untersuchten Zytokine in BALF	
MMP-9	26
TIMP-1	27
molares Verhältnis	29
3.4 Korrelation MMP-9 zu TIMP-1	30

3.5 Zusammenhang mit BALF- Parametern	
3.5.1 MMP-9	31
3.5.2 TIMP-1	36
3.5.3 molares Verhältnis MMP-9/TIMP-1	38
3.6 Zusammenhang mit Lungenfunktionswerten	
3.6.1 zum Zeitpunkt der Diagnosedstellung	
MMP-9	39
TIMP-1	41
molares Verhältnis MMP-9/TIMP-1	43
3.6.2 nach 2 Jahren	45
IV. Diskussion	49
4.1 Bedeutung der Zytokine	49
4.2 Zusammenhang zu BALF- Parametern	55
4.3 Zusammenhang mit Lungenfunktionswerten	59
4.4 Ausblick	61
V. Zusammenfassung	62
VI. Literaturverzeichnis	64

Abkürzungen

AIP	Acute interstitial pneumonia
AM	Alveolarmakrophagen
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BOOP	Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia
COP	Cryptogenic organizing pneumonia
DCO	Diffusionskoeffizient für Kohlenmonoxid
DIP	Desquamative interstitial pneumonia
DPLD	Diffuse parenchymal lung disease
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EOS	Eosinophile
GM-CSF	Granulozyten- Monozyten- Koloniestimulierender Faktor
GsZz	Gesamtzellzahl
HELP	T-Helferzellen
HRCT	High resolution computerized tomography
IFN- γ	Interferon- gamma
IIP	Idiopathic interstitial pneumonia
IL	Interleukin
IPF	Idiopathische Lungenfibrose
kD	kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LIP	Lymphocytic interstitial pneumonia
LY	Lymphozyten
MMP	Matrix- Metalloproteinase
n	Anzahl der Personen
NSIP	Non- specific interstitial pneumonia
PDGF	Platelet-deriving-growth-factor
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PO2	Sauerstoffpartialdruck
RB-ILD	Respiratory bronchiolitis- associated interstitial lung disease
SUPP	T-Suppressorzellen
TGF- β	Transforming-growth-factor
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLC	Totale Lungenkapazität
T-LY	T-Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- alpha
UIP	Usual interstitial pneumonia
VC	Vitalkapazität

I. Einleitung

1.1 Überblick Interstitielle Lungenkrankheiten

Interstitielle Lungenerkrankungen sind eher seltene Erkrankungen, die jedoch oft mit schweren und therapierefraktären Verläufen einhergehen. Für den Kliniker stellen sie eine große Herausforderung dar, da bereits die Diagnosestellung schwierig ist.

Die Anamnese kann wenig aussagekräftig sein und diagnostische Mittel wie radiologische Bildgebung und invasive chirurgische Eingriffe müssen ausgeschöpft werden. Genaue Richtlinien zur optimalen Behandlung interstitieller Lungenkrankheiten fehlen oder zeigen eine geringe Ansprechrage. Aus diesen Gründen und wegen gefährlicher Nebenwirkungen unter der Therapie mit Immunsuppressiva werden neue Therapieansätze gesucht. Diese beziehen sich unter anderem auf neue Erkenntnisse in der Pathogenese.

Im Vordergrund dieser Studie steht die Entwicklung einer Fibrose. Zwei Krankheiten, die im Endstadium jeweils in einer irreversiblen Lungenfibrose resultieren und Gegenstand unserer Arbeit wurden sind die idiopathische Lungenfibrose und die pulmonale Sarkoidose. Nach Klassifikation durch die American Thoracic Society ordnet man sie den diffusen parenchymatösen Lungenkrankheiten zu (DPLD, Abb.1).

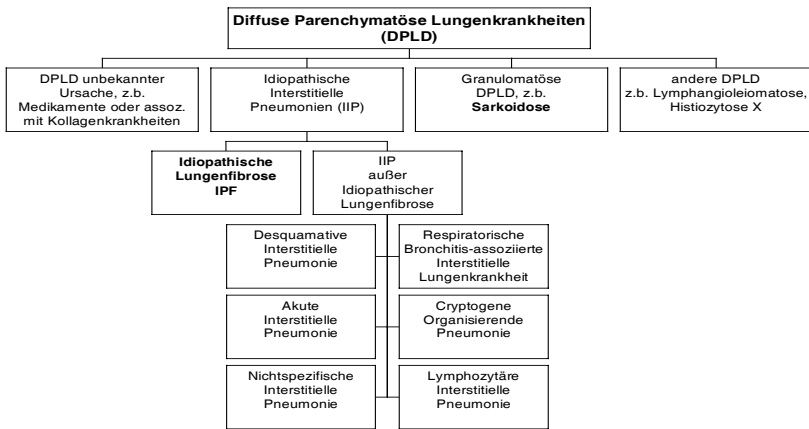


Abb.1 Diffuse Parenchymatöse Lungenkrankheiten, modifiziert nach (4)

1.2 Idiopathische Lungenfibrose

Die *idiopathische Lungenfibrose* (IPF) gehört zum Formenkreis der idiopathischen interstitiellen Pneumonien. Sie ist auf die Lunge beschränkt und wird histologisch durch den Typ UIP (usual interstitial pneumonia) definiert (3). Nach neuester Klassifikation der American Thoracic Society und European Respiratory Society im Jahre 2001 (4) bildet die IPF (syn. UIP oder CFA-cryptogenic fibrosing alveolitis) eine eigenständige Krankheitsgruppe. Dem gegenüber stehen die idiopathischen interstitiellen Pneumonien anderer Ursache (siehe Abb.1). Diese schließen die nonspecific interstitial pneumonia (NSIP), cryptogenic organizing pneumonia (COP), acute interstitial pneumonia (AIP), desquamative interstitial pneumonia (DIP), lymphocytic interstitial pneumonia (LIP) und respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease (RB-ILD) ein. Trotz intensiver Forschungsarbeit ist die Ursache der IPF noch immer unbekannt.

Die Prävalenz der IPF liegt bei 6-14,6 /100.000 (4). Die Erkrankten sind meist älter als 50 Jahre, etwas häufiger sind Männer betroffen (44,26). Das Initialsymptom ist eine langsam fortschreitende Dyspnoe, oft kommt ein unproduktiver Husten hinzu. In der Lungenfunktionsanalyse sind eine reduzierte totale Lungenkapazität (TLC) und Vitalkapazität (VC), ein reduzierter arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO_2) und Diffusionskoeffizient für Kohlenmonoxid (DCO) typisch. Eine restriktive Ventilationsstörung mit Diffusionsstörung prägt dementsprechend das Bild. Der Verlauf ist durch ein allmähliches Fortschreiten der Erkrankung charakterisiert. Die Patienten versterben an respiratorischer Insuffizienz, komplizierten pulmonalen Infekten oder Folgen der Rechtsherzinsuffizienz. Die mittlere Überlebenszeit der Erkrankten beträgt im Durchschnitt 2,5 bis 3,5 Jahre nach Diagnosestellung (3,38). Die Mortalitätsrate liegt bei 68% (27).

Die Diagnosestellung sowohl der IPF, als auch der Sarkoidose, erfordert eine interdisziplinäre Zusammenarbeit von Pulmologen, Radiologen und Pathologen. In einer ausführlichen Anamneseerhebung muss nach Auslösern wie inhalativen Noxen, Medikamenten, ionisierenden Strahlen, Autoimmunerkrankungen und Mikroorganismen gefahndet werden, um Differentialdiagnosen auszuschließen. Es folgen eine klinische Untersuchung, Lungenfunktionsanalysen, Bronchoskopie sowie eine radiologische Bildgebung (Rö-Thorax, HR-CT). Dabei wird die Bronchoskopie vor allem zum Ausschluss einer Sarkoidose benötigt.

Im Röntgenbild der idiopathischen Lungenfibrose sind peripher typische streifig-retikuläre Zeichnungen, im Endstadium basal gelegene zystische Veränderungen als Ausdruck einer Wabenlunge zu sehen (Abb.2). Im Verlauf schrumpft die Lunge und das Zwerchfell tritt höher. Charakteristisch für Computertomographieaufnahmen sind Bronchiektasien, Zysten und die ungleichmäßige Verteilung der Fibrose, die vor allem basal und peripher zu sehen ist (Abb.3). Wenn keine Kontraindikationen vorliegen, sollte eine chirurgische Lungenbiopsie, zum Beispiel während einer videoassistierten Thorakoskopie, gewonnen werden. Obwohl eine große Anzahl von Diagnosen

ohne Lungenbiopsie gestellt werden kann, ist eine definitive Diagnose nur mithilfe der Biopsie möglich (4).



Abb.2: Röntgen-Thoraxaufnahme eines Patienten mit IPF



Abb.3: Irreversible Lungenfibrose im Thorax-CT

zu Abb.2/3: Hans-Holger Jend, update 10.08.2008, „Die Lunge im Netz“, Sammlung fibrosierender Lungenkrankheiten, entnommen am 15.10.2008 aus <http://www.mevis-research.de/~hhl/Lunge/SammliFibFr.html>

Histopathologische Merkmale einer UIP sind unregelmäßig verteilte Veränderungen im Interstitium, bestehend aus Fibrose, milder Entzündungsreaktion, Zysten (Wabenlunge) und normalem Gewebe (27). Schon bei schwacher Vergrößerung kann man diese histologischen Variationen, typisch für UIP, erkennen. Die vermehrte Kollagenablagerung führt zu einer Verdickung der Alveolarsepten mit Narbenbildung. Die vergrößerten Alveolen werden umsäumt von Bronchialepithel, Lymphozyten, Plasmazellen und hyperplastischen Typ II- Pneumozyten. Sie sind meist mit eingedicktem Muzin gefüllt. Typisch für eine UIP sind außerdem sogenannte Fibroblast- Foci (Abb.4). Dies sind Ansammlungen von aktiv proliferierenden Myofibroblasten und Fibroblasten (13). Sie repräsentieren Zonen mit aktiver Fibrose im Gegensatz zu den Zonen mit alten inaktiven Kollagenablagerungen. Fibroblast-Foci kommen in entzündeten, fibrotischen und zystischen Arealen vor. Obwohl

sie nicht pathognomonisch für die UIP sind, ist ihr histologischer Nachweis für die Diagnosestellung essentiell (27).

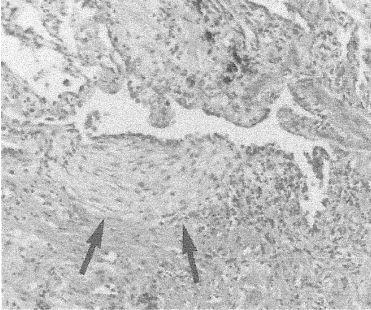


Abb.4: Histopathologisches Präparat einer UIP mit charakteristischen Fibroblast- Foci, entnommen aus (26)

Ein Problem in der Behandlung der interstitiellen Lungenerkrankungen sind fehlende Richtlinien. Momentaner Goldstandard der Therapie von IPF ist der Einsatz von Kortikosteroiden. Der richtige Zeitpunkt des Therapiebeginns, die Dosis und die Dauer einer Therapie mit Kortikosteroiden muss jedoch individuell herausgefunden werden und stellt sicherlich für viele Pulmologen eine Herausforderung dar. Trotz geringer Ansprechraten von 15-30% bei IPF empfehlen die meisten Fachärzte eine Behandlung der IPF gleich nach Diagnosesicherung (2). Von einem Nicht-Ansprechen auf die Kortisonbehandlung spricht man bei fehlender Verbesserung nach drei Monaten (7). Da dies eine Verbesserung der Symptome auch unter längerer Therapiedauer unwahrscheinlich macht, wird eine Umstellung auf andere Immunsuppressiva empfohlen. Besonders Azathioprin oder Cyclophosphamid werden in Kombination mit Kortison oder allein verabreicht. Auch sie heilen die Krankheiten nicht aus, können aber unter anderem eine Dosiseinsparung von Prednisolon bewirken. Ultima ratio ist die Lungentransplantation.

1.3 Sarkoidose

Die *Sarkoidose* ist eine systemische granulomatöse Erkrankung unbekannter Ursache, die vorwiegend die Lunge und das lymphatische System des Menschen betrifft.

Im Gegensatz zur Lungenfibrose erkranken an *Sarkoidose* meist Menschen unter 40 Jahren, mit einem Anstieg unter den 20-29 Jährigen (9). Die Prävalenz wird auf 1- 40 Fälle pro 100.000 geschätzt, wobei das weibliche Geschlecht etwas häufiger erkrankt (2). Regionale Unterschiede und Rassenunterschiede sind berichtet worden. So scheinen Skandinavien, Irland und die schwarze Bevölkerung in den USA am meisten betroffen zu sein (22). Obwohl die Sarkoidose eine systemische Erkrankung ist, äußert sie sich zu 90 % mit Symptomen, die die Lunge betreffen ((9), pulmonale Sarkoidose). Dabei kommt es zu einer restriktiven und obstruktiven Ventilationsstörung. Häufig wird über Dyspnoe, trockenen Husten und retrosternalen Brustschmerz geklagt. Unspezifische Symptome wie subfebrile Temperaturen, Gewichtsverlust und Schwäche können hinzukommen. Extrapulmonale Manifestationen betreffen unter anderem das Lymphsystem, Herz, Leber, Haut mit Erythema nodosum, Augen und das Nervensystem. Der Verlauf der Sarkoidose ist unterschiedlich. Er variiert von selbst-limitierend, chronisch bis progressiv, kann auf ein Organ begrenzt sein oder multisystemisch auftreten. Die Gesamtmortalität beträgt 1-5 % (9).

Die Sarkoidose (syn. Morbus Boeck, Lymphogranulomatosis benigna) wird oft zufällig im Rahmen einer Routine- Röntgenuntersuchung entdeckt (Abb.5). Anhand des Röntgen- Thorax kann man die pulmonale Sarkoidose in Röntgentypen einteilen. *Typ 1* zeigt neben einer mediastinalen oder bilateralen hiliären Lymphadenopathie keine Infiltrate der Lunge. Im *Typ 2* weisen die Patienten eine Lymphadenopathie, im *Typ 3* Infiltrate der Lunge auf. *Typ 4* wird definiert durch eine pulmonale Infiltration oder Fibrose ohne Adenopathie. Das Endstadium einer Sarkoidose kann dem Bild einer Lungenfibrose ähneln.

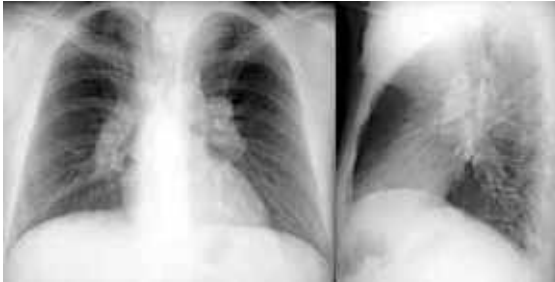


Abb. 5: Das Röntgenbild zeigt eine bilaterale Lymphadenopathie, die häufig im Rahmen einer Routineuntersuchung auffällt (Sarkoidose Röntgentyp I).

Hans-Holger Jend, update 10.08.2008, „Die Lunge im Netz“, Sammlung fibrosierender Lungenkrankheiten, entnommen am 15.10.2008 aus <http://www.mevis-research.de/~hhj/Lunge/Samm1FibFr.html>

Bei Verdacht auf das Vorliegen einer Sarkoidose, oder um diese auszuschließen, wird oftmals eine Bronchoskopie mit Entnahme von bronchoalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF) durchgeführt und eine Biopsie endo- oder transbronchial entnommen. Die Verdachtsdiagnose wird dann bestätigt, wenn nichtverkäsende Granulome, vor allem im Interstitium, nachgewiesen werden (siehe Abb.6). Diese Granulome bestehen aus hochdifferenzierten mononukleären Epitheloid- und Riesenzellen, Makrophagen und Lymphozyten (meistens $CD4^+$ T-Zellen; (2)). Abgesehen von den perigranulomatösen Alveolarepten, die von Lymphozyten und Fibroblasten infiltriert sind, sind die Alveolarepten im Wesentlichen unverändert. Zu Beginn der Erkrankung besteht wahrscheinlich eine Entzündung (Alveolitis, (36)). Danach folgt die Entstehung von Granulomen. Im Endstadium findet man fibrotische und zystische Veränderungen als Ausdruck einer Parenchymfibrose und Wabenlunge.

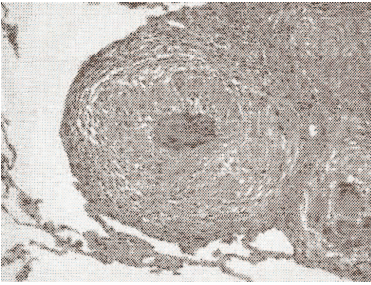


Abb. 6: Histopathologisches Präparat einer Sarkoidose. Dargestellt ist ein nicht-verkäsendes Granulom, entnommen aus (11).

Die Behandlung der *pulmonalen Sarkoidose* scheint in einigen Fällen nicht angemessen: Im Stadium 1 der Sarkoidose ist die Wahrscheinlichkeit für eine Spontanremission relativ hoch (60-90%). Deshalb sollte Kortison erst einmal nicht eingesetzt werden (11). Auch Patienten im Endstadium mit Fibrose ohne Entzündungsaktivität sollten nicht therapiert werden, da das Risiko-Nutzen-Verhältnis gering ist (31).

Schließlich ist die Mehrheit der Pulmologen der Meinung, dass symptomatische Patienten in fortgeschrittenem Stadium behandelt werden sollten (2). In Studien von 1986 (Turner-Warwick et al, (43)) und 1967 (James et al, (23)) variieren die objektiven Ansprechraten auf Kortison von 60-100%, wobei der Anteil an Personen im Anfangsstadium und eine damit verbundene erhöhte Remissionsrate unklar ist. Nach Weglassen der Therapie erleiden über 75% der chronisch Erkrankten einen Rückfall (25). Diese Feststellung führt zu kontroversen Ansichten über eine Langzeittherapie mit Kortikosteroiden. Es ist also unklar, in wieweit Kortison das Fortschreiten der Erkrankung verhindern kann. Ergänzend zu Steroiden können weitere Immunsuppressiva eingesetzt werden. Die Ultima Ratio im Endstadium bleibt eine Lungentransplantation.

1.4 Probleme des Managements

Das Management beider Krankheiten könnte einerseits verbessert werden, wenn es bestimmte Marker gäbe, die eine schnellere Diagnosestellung bewirken. Damit könnten die Krankheiten eher entdeckt und somit eher behandelt werden. Des Weiteren ist es noch nicht möglich, einzuschätzen, bei welchen Personen die Sarkoidose selbstlimitierend ist und bei welchen sie chronisch progredient fortschreitet. Demzufolge werden Marker gesucht, die helfen, den Verlauf der Krankheit vorherzusagen. Patienten, die auf eine immunsuppressive Therapie ansprechen, müssten von jenen unterschieden werden können, bei denen die Behandlung nur zusätzliche Risiken mit sich bringt. Indem auf der einen Seite Patienten rechtzeitig und ausreichend mit Immunsuppressiva behandelt werden und auf der anderen Seite Non-Responder von einer doch durchaus aggressiven Therapie verschont bleiben, könnte die Lebensqualität der Betroffenen verbessert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine immunsuppressive Behandlung der idiopathischen Lungenfibrose und progressiven pulmonalen Sarkoidose nützlich sein kann, die Ansprechraten auf Kortison aber nicht befriedigend sind. Dies ist ein Grund für die Suche nach neuen Therapieansätzen, die sich unter anderem auf neueste Erkenntnisse in der Fibrogenese beziehen.

Bisherige Überlegungen zur Pathophysiologie erklärten die *Lungenfibrose* als Folge einer chronischen Entzündungsreaktion mit vermehrter Kollagenproduktion und -ablagerung an den Alveolarsepten und im Interstitium (38). Die ursächlich postulierte Inflammation des Lungengewebes ist bei der idiopathischen Form jedoch nur schwach ausgeprägt und auch bei der Sarkoidose kein typisches histologisches Kriterium. Auch die Tatsache, dass die Ansprechraten auf Immunsuppressiva sehr gering sind, war entscheidend für die Aufstellung einer neuen Hypothese.

1.5 Neue Erkenntnisse in der Pathogenese der Lungenfibrose

Die Forschung beschäftigt sich seit einiger Zeit mit bestimmten zellulären Signalstoffen. Diese Botenstoffe regulieren netzwerkartig die interzelluläre Kommunikation. Sie haben Einfluss auf Proliferation und Funktion von benachbarten Zellen. In der Lunge fungieren sie als Mediatoren zwischen Epithel und den beweglichen Zellen, wie beispielsweise Entzündungszellen und Fibroblasten. Zu diesen Botenstoffen gehören neben Interleukinen, Tumornekrosefaktor- alpha ($\text{TNF-}\alpha$), Interferon- gamma ($\text{IFN-}\gamma$), Granulozyten-Monozyten- Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Transforming-growth-factor ($\text{TGF-}\beta$), Platelet-deriving-growth-factor (PDGF) auch Matrix Metalloproteinasen (32).

Letztgenannten wurde vielfach eine Beteiligung an der Pathogenese fibrosierender Krankheiten zugeschrieben. Unter den Lungenkrankheiten wurden Matrix Metalloproteasen bereits in Zusammenhang mit der Entstehung von idiopathischen interstitiellen Lungenkrankheiten, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), Asthma bronchiale, Tumoren, Metastasen, zystischer Fibrose und infektiöser Pneumonie gebracht. Gonzales et al. beschrieben erstmals 2001 eine Beteiligung dieser Proteasen auch an kardialer und pulmonaler Sarkoidose (17). Über die Bedeutung der Metalloproteasen ist man sich jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar. Es bleibt zu klären, ob sie ursächlich für die Krankheitsentstehung sind oder im Verlauf eines Krankheitsprozesses (sekundär) auftreten.

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von mindestens 24 zinkabhängigen Proteasen. Aktuell sind im Menschen 24, in Mäusen 25 unterschiedliche MMPs entdeckt worden. Sie besitzen die Fähigkeit, extrazelluläre Matrix (ECM) abzubauen, wobei verschiedene MMPs unterschiedliche Substratspezifitäten besitzen. Sie werden in sechs Gruppen eingeteilt. Dazu gehören: *Kollagenasen* (MMP-1, -8, -13), *Stromelysine* (MMP-3, -10, -11), *Matrilysine* (MMP-7), *Membrantyp- MMPs* (MT1-MMP, MT2-MMP,

usw.), *Elastasen* (MMP-12), *Gelatinase A* (MMP-2) und *Gelatinase B* (MMP-9) (33). Freigesetzt als Proenzyme können sie in vivo via Enzymkaskade aktiviert werden. Sie werden unter anderem von spezifischen Inhibitoren (TIMPs = tissue inhibitor of matrix metalloproteinases) gehemmt.

In den vergangenen Jahren konnten mehrere Studien zeigen, dass Matrix Metalloproteinasen und deren spezifische Inhibitoren an dem Gewebsumbau (Remodeling) bei idiopathischer Lungenfibrose maßgeblich beteiligt sind (19,14,41,20). Entgegen der früheren Auffassung, dass eine chronische Entzündung am Anfang der Ausbildung einer Fibrose steht, scheinen nach neuesten Erkenntnissen Kommunikationsstörungen zwischen Epithel und Fibroblasten vordergründig zu sein. Aufgrund von noch unbekanntem Auslösern werden die epithelialen Basalmembranen in der Lunge geschädigt (15). Eine daraufhin stattfindende fokale Fibroblastenproliferation führt zu einer vermehrten Produktion und Deposition von extrazellulärer Matrix (41). Das Missverhältnis von Matrixaufbau und Matrixabbau ist ein bedeutender Faktor in der Pathogenese der IPF. Es kann durch Wirkung und Dysregulation von erwähnten Proteasen und Inhibitoren verursacht sein und ist Gegenstand dieser Studienarbeit.

1.6 MMP-9 und TIMP-1

In unserer Studie untersuchten wir die humane Matrix Metalloproteinase-9 und deren spezifischen Inhibitor TIMP-1. MMP-9 ist eine Kollagenase mit einem Molekulargewicht von 92 kD (auch *Gelatinase B* genannt). Da Basalmembranen eine Form von extrazellulärer Matrix darstellen und vor allem aus Kollagen Typ IV bestehen, ist für das Verständnis der Pathogenese vor allem diese Kollagenase von Relevanz. Die katalytische Aktivität richtet sich gegen extrazelluläre Matrixbestandteile einschließlich denaturiertes Kollagen (Gelatin), Typ IV-, V- und IX- Kollagen, Elastin und andere Bestandteile von

Basalmembranen (45). MMP-9 wird während der Reifung im Knochenmark von Neutrophilen synthetisiert und in Granula gespeichert. Neutrophile sezernieren MMP-9 entweder allein, oder in Verbindung mit Lipocalin (5). Während es die Wirkung von benachbarten Zellen und Botenstoffen modifiziert, kann es gleichzeitig wiederum von jenen Zellen beeinflusst werden. So kann Interleukin-8 Neutrophile stimulieren, gespeichertes MMP-9 freizusetzen (42). Durch Wirkung proinflammatorischer Typ I Zytokine wie TNF- α und Interleukin-1 β , kann die Produktion zusätzlich in anderen Zellen einsetzen (37,48). In vivo wird MMP-9 meistens als Proenzym freigesetzt und mittels Enzymkaskade aktiviert. Dabei gehen etwa 10-20 kDa des Molekulargewichts verloren, was auf die Abspaltung der Prodomäne zurückzuführen ist. Diese Prodomäne kann von MMP-3, MMP-2 oder MMP-1 gespalten werden (34), wobei MMP-3 der effektivste Aktivator sein soll (16). Der stärkste zirkulierende Inhibitor von MMP-9 ist α_2 -Makroglobulin. Eine weitere extrazelluläre Kontrolle über die MMP-9-Aktivität wird durch eine spezielle Familie von Inhibitoren geleistet, die tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). Zur Zeit sind vier Subtypen beschrieben worden: TIMP-1, -2, -3, und -4. Zwar haben alle TIMPs eine Affinität zu MMP-9, meistens wird jedoch MMP-9 von Zellen in einem nonkovalentem Komplex mit TIMP-1 sezerniert (5). Außer an TIMP-1 gebunden, kann es als latentes Enzym, als aktiviertes Enzym, an Lipocalin gebunden, oder als Homodimer vorkommen.

Normalerweise werden Metalloproteinasen-9 in der gesunden Lunge nicht von lokalen Zellen produziert. Studien konnten jedoch zeigen, dass unter bestimmten Umständen viele Zellen der Lunge diese Signalstoffe exprimieren können. Dazu gehören Bronchialepithelzellen, Clarazellen, Alveolarzellen Typ II, Fibroblasten, Makrophagen, Leukozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Eosinophile (5). So vielfältig wie die Substrate für die Protease sind, so verschieden sind auch die Wirkungen. Neben der Spaltung von Basalmembranen kann es die kollagenolytische Aktivität von MMP-13 (12) und Fibroblasten in Kollagengels (50) erhöhen. Durch Spaltung von IL-8 potenziert es die chemotaktische Wirkung von IL-8 auf Neutrophile um das zehnfache

(42). Indem es α_1 -Antitrypsin degradiert, schützt es die Neutrophilen Elastase-Aktivität (30).

1.7 Ziel der Studie

Während sich ein Großteil der bisherigen Arbeiten mit der Expression von MMPs und ihrer Wirkung auf zellulärer Ebene beschäftigten, wollten wir die Bedeutung von MMP-9 und deren spezifischen Inhibitor TIMP-1 für den klinischen Alltag herausfinden.

Da die Entnahme von bronchoalveolärer Lavage für den Pulmologen ein routiniertes Verfahren ist und in vielen Fällen im Prozess der Abklärung von Symptomen einer Lungenerkrankung durchgeführt wird, verwendeten wir als Untersuchungsmedium die BALF. Sie kann außerdem die Veränderungen, die am Ort des Geschehens, also in der Lunge stattfinden, besser widerspiegeln, als das Serum als Medium.

Ziel unserer Arbeit war es, Konzentrationen von MMP-9 und TIMP-1 in der BALF von Patienten mit IPF und Sarkoidose sowie Gesunden zu messen und Unterschiede herauszuarbeiten.

Wir wollten klären, ob die Bestimmung der Proteasen eine klinische Relevanz hat, indem wir Korrelationen zu diagnostischen Parametern, wie zum Beispiel Lungenfunktionswerten, untersuchten.

II. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

An der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg, Schwerpunkt Pneumologie, untersuchten wir 115 Patienten, die sich im Zeitraum von März 1999 bis April 2004 zur Abklärung von Symptomen einer Lungenerkrankung einer diagnostischen Bronchoskopie mit bronchoalveolärer Lavage (BAL) unterzogen hatten. Alle Patienten gaben in Anwesenheit mehrerer Zeugen bei der täglichen Visite ihr Einverständnis.

Folgende Einteilung in Diagnosegruppen wurde vorgenommen:

IPF

Die IPF-UIP Gruppe bestand aus 32 Patienten, 18 Männer und 14 Frauen, deren Durchschnittsalter 61 Jahre betrug. Die Diagnose, in allen Fällen die Erstdiagnose, wurde aufgrund von Klinik, Lungenfunktionsanalysen, Röntgen-Thorax und HR-CT, BALF-Parametern, sowie histopathologischen Kriterien gestellt. Es musste in der Lungenbiopsie, die transbronchial oder durch videoassistierte Thorakoskopie gewonnen wurde, eine für die UIP charakteristische Histologie nach Katzenstein und Myers vorliegen. Infektiöse Auslöser konnten durch mikrobiologische Untersuchungen ausgeschlossen werden. Keiner der Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Biopsie Steroide oder andere Immunsuppressiva. Jeder Erkrankte bekam für die ersten sechs Wochen ein Steroid (Prednisolon 1mg/kgKG/d) verabreicht. Daraufhin folgte eine Reevaluation mit Röntgen-Thoraxübersicht und Lungenfunktionsprüfung. Bei Ansprechen auf Kortison wurde dieses langsam reduziert und parallel dazu Azathioprin (Imurek®, 2-3 mg/ kgKG/ d) über 18 Monate verabreicht. Bei

Nichtansprechen auf Kortison therapierte man mit Cyclophosphamidstößen (Endoxan i.v.) einmal monatlich in steigender Dosis.

Sarkoidose

Die Sarkoidose- Gruppe setzte sich aus 60 zum Zeitpunkt der Bronchoskopie unbehandelten Patienten zusammen. Darunter befanden sich 30 Männer und 30 Frauen. Das Alter der Erkrankten variierte von 21 bis 75 Jahre, im Durchschnitt 47 Jahre. Die Diagnose wurde auf Basis typischer klinischer, radiologischer und histologischer Kriterien gestellt. Bei Indikationsstellung führte man eine transbronchiale Lungenbiopsie, in fünf Fällen zusätzlich eine videoassistierte Thorakoskopie durch. In der BAL fanden sich meist erhöhte CD4/CD8 T-Lymphozytenraten sowie im Serum erhöhte ACE- Spiegel. Charakteristische Befunde im HR-CT unterstützten die Diagnose. Dabei unterteilten wir in drei prognostisch unterschiedliche Gruppen, ähnlich der bekannten Einteilung in Röntgentypen 1, 2+3 und 4. Die Therapie erfolgte mit Glucokortikoiden (1mg/kgKG/d).

Sarkoidose-Gruppe 1

40 Personen, darunter 18 männliche, bildeten die Sarkoidose-Gruppe 1 und zeigten neben einer mediastinalen oder bihiliären Lymphadenopathie im HR-CT keine Infiltrate der Lunge (Röntgentyp 1). Das Durchschnittsalter betrug 45 Jahre.

Sarkoidose-Gruppe 2

Die Gruppe 2 bestand aus 14 Patienten - neun Männer und fünf Frauen - die radiologisch eine Lymphadenopathie und Infiltrate der Lunge, jedoch keine Zeichen einer Fibrose aufwiesen (Röntgentypen 2+3). Im Durchschnitt waren sie 46 Jahre alt.

Sarkoidose-Gruppe 3

Nur sechs Personen, drei davon männlich, hatten zum Zeitpunkt der Bronchoskopie den Röntgentyp 4 mit einer pulmonalen Infiltration oder Fibrose ohne Adenopathie erreicht. Sie bildeten die Sarkoidose- Gruppe 3. Das mittlere Alter der Betroffenen lag bei 60 Jahren. Aufgrund der geringen Fallzahl in dieser Gruppe haben wir nachfolgend die Gruppe 2 und 3 zusammengefasst.

Kontrollgruppe

In die Studie eingeschlossen wurden 23 Personen, bei denen sich der Verdacht auf eine interstitielle Lungenerkrankung nach Durchführung der Bronchoskopie und Beurteilung der BALF und Biopsie nicht bestätigen konnte. Diese Patienten werteten wir als Kontrollpersonen, da Daten von gesunden Personen aus ethischen Gründen nicht verfügbar waren. Unter ihnen waren 16 Männer und sieben Frauen. Sie waren im Durchschnitt 52 Jahre alt. Folgende Erkrankungen wurden diagnostiziert: chronisches Asthma bronchiale, Tuberkulose, Cor pulmonale, respiratorische Globalinsuffizienz, Lymphknotengranulomatose, unklare Autoimmunerkrankung. Personen mit tumorösen Erkrankungen wie Bronchialkarzinom, Pleuramesotheliom, Lymphangiosis carcinomatosa oder Lymphom wurden ausgeschlossen.

In Tabelle 1 sind demografische Daten zusammengetragen.

	IPF	Sarkoidose 1	Sarkoidose 2*	Sarkoidose 3*	Kontrolle
Patienten (n)	32	40	14	6	23
Alter	61 ± 2	45 ± 2	46 ± 3	60 ± 7	52 ± 3
Geschlecht m:w	18 : 14	18 : 22	9 : 5	3 : 3	16 : 7
Rö- Typen		1	2+3	4	

Tab. 1

* nachfolgend werden beide Gruppen zusammengefasst

2.2. Lungenfunktionsanalysen

Lungenfunktionsprüfungen wurden mit einem Ganzkörperplethysmographen, einem Pneumotachographen, CO₂- und O₂-Analysegeräten und einem Blutgasanalysegerät meist am Vortag der Bronchoskopie in der Ambulanz der Universitätsklinik durchgeführt. Patienten mit IPF und Sarkoidose im Röntgentyp 2+3 und 4 blieben im Follow-up. Bei diesen führte man regelmäßig Kontrolluntersuchungen durch. Lungenfunktionsanalysen 1 und 2 Jahre (\pm 4 Monate) nach Diagnosestellung konnten dann, wenn vorhanden, zur Bewertung des Krankheitsverlaufs herangezogen werden. Einige Patienten waren nicht mehr in universitärer Behandlung. In diesem Falle kontaktierten wir den weiterbehandelnden Facharzt. Es wurden demzufolge Lungenfunktionsanalysen unterschiedlicher Gerätehersteller verwendet. Als aussagekräftigste Parameter einer interstitiellen Lungenerkrankung wie der IPF und Sarkoidose erschienen uns vor allem die Vitalkapazität (VC), die totale Lungkapazität (TLC), die Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (DCO) und der partielle Sauerstoffdruck (PO₂). Angaben wurden in Absolutwerten und in Prozent (%) des patientenbezogenen Sollwertes gemacht, um eine interindividuelle Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Nicht immer lagen bei den Patienten alle Messparameter vor. Die Anzahl der Patienten, bei denen der untersuchte Wert vorhanden war, ist mit (n) angegeben.

2.3 Bronchoalveoläre Lavage

Die Bronchoskopie mit BAL führte man in der Pneumologie der Universitätsklinik Würzburg standardmäßig durch.

Am Abend erhielt der Patient ein langwirksames Diazepam-Präparat. 0,5 mg Atropinsulfat und 7,5 mg Hydrocodon- HCl (Dicodid) als Antitussivum wurden

am Morgen vor der Untersuchung gespritzt. Bei Bedarf verabreichte man 5- 10 mg Midazolam i.v. Nach Anästhesie des Rachens bis zu den Plicae Vocales mit 4%iger und der Trachea mit 1%iger Lidocainlösung führte der untersuchende Arzt einen Tubus (Woodbridge 8,5) über das flexible Bronchoskop (BF, Olympus Co. Hamburg) in den rechten Mittellappenbronchus ein. Nach einer Routine-Inspektion okkludierte man diesen zunächst, spülte ihn mit 40 ml Aliquot einer 37 °C warmen, sterilen 0,9%igen Natriumchloridlösung und saugte eine erste Portion BAL Flüssigkeit mit einem Druck von maximal –0,4 mbar in ein Polypropylen-Tube. Dieses Gefäß stand in Eiswasser und enthielt einen Gazefilter (zwei Lagen sterile Verbandsgaze). Nachdem die erste Portion verworfen wurde, spülte man vier- bis fünfmal mit 40 ml Natriumchloridlösung, um ein Aspirationsvolumen von mindestens 120 ml zu gewinnen. Eine transbronchiale Biopsie wurde anschließend vorgenommen. Die BALF wurde auf 4° Celsius heruntergekühlt und noch am selben Tag verarbeitet. Für die Zellzählung, in die nur Entzündungszellen, keine Erythrozyten und Epithelzellen, eingingen, wurden 20 µl Lavageflüssigkeit in eine Fuchs-Rosenthalkammer gefüllt und ausgezählt. Es folgten eine Vitalitätsprüfung und Epithelienzählung. Für Zytokin-, Eiweiß- und Lysozymmessungen wurde die Flüssigkeit bei 4°C und 1350 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in 1 ml Aliquots bei –80°C tiefgefroren.

2.4 ELISA

Konzentrationen an humanem MMP-9 und TIMP-1 in BALF wurden mittels kommerzieller ELISAs (Quantikine®, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) gemessen. Die Untersuchungsmethode benutzt die quantitative Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik, bei der ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für das zu messende Zytokin ist, auf einer Mikrotiterplatte haftet.

Da ein Mol MMP-9 von einem Mol TIMP-1 (1:1) nicht-kovalent gebunden wird, wurden die Konzentrationen der Zytokine in unserer Arbeit in nmol/ μ l angegeben.

humanes MMP-9

Der verwendete ELISA erkannte rekombinantes und aktives humanes MMP-9. Die Nachweisgrenze für MMP-9 wurde durch den Hersteller mit 0,156 ng/ml angegeben. Für die Durchführung der Immunoassays wurden BAL- Proben unmittelbar vor Gebrauch bei Raumtemperatur aufgetaut und Gefrierkristalle aufgelöst. Fast immer mussten die Proben in Calibrator Diluent verdünnt werden, da erste Ergebnisse außerhalb des Messbereichs lagen. Folgende Verdünnungen wurden angefertigt: 1:10; 1:20; 1:50.

Wir legten bei jeder Messung Standardkurven an. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe mit rekombinatem MMP-9 hergestellt. Der höchste Standardwert lag bei 20 ng/ml, als Nullstandard diente Calibrator Diluent. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde 100 μ l Assay Diluent vorgelegt. Dann pipettierte man 100 μ l der Proben, des Nullstandards und der Standardverdünnungsreihe dazu, jeweils im Doppel. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden wurde das in dem untersuchten Material vorhandene MMP-9 von seinen wandständigen Antikörpern gebunden. Vier Waschvorgänge entfernten nichtgebundene Substanzen. Im Anschluss gaben wir 200 μ l eines polyklonalen Antikörpers hinzu. Nach einer Stunde Inkubation bindete dieser an das zuvor immobilisierte MMP-9. Waschvorgänge wurden erneut vorgenommen und eine Substratlösung zugefügt, die eine Farbreaktion bewirkte. Nach Zugabe von Stoplösung konnten wir die optische Dichte bei 450 nm messen (ELISA-Reader, Fa. Behring, Mannheim). Die ermittelten Extinktionswerte der Standardproben trugen wir auf logarithmischem Papier über den entsprechenden Konzentrationen auf und zeichneten eine Standardkurve als Ausgleichsgerade ein. Die Extinktion verhielt sich proportional zu dem Gehalt an MMP-9. Die Mittelwerte aus den Doppelbestimmungen wurden berechnet

und mit Hilfe der Standarddeichkurve die Konzentration an MMP-9 in den Proben ermittelt. Zum Schluss wurden die Ergebnisse mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren multipliziert.

humanes TIMP-1

Die minimal nachweisbare Konzentration von TIMP-1 lag laut Herstellerangabe bei 0,08 ng/ml. Die Vorbereitung des ELISA beinhaltete unter anderem das Auftauen der BAL- Proben sowie eine Verdünnung mit Calibrator Diluent um den Faktor 10 oder 20. Eine TIMP-1 Standardlösung wurde angefertigt und mit Hilfe dieser eine Standardverdünnungsreihe von 10 ng/ml bis 0 ng/ml hergestellt. Wir pipettierten 100µl Assay Diluent RD1X und je zweimal 50 µl des Standards und der BAL- Probe in die Mikrotiterplatte. Nach zweistündiger Inkubation wurde die Platte dreimal mit einem Waschpuffer ausgewaschen. 200 µl einer Konjugatlösung, die einen polyklonalen Antikörper gegen TIMP-1 enthielt, wurde hinzugegeben und wiederum eine Stunde vor Licht geschützt inkubiert. Danach erfolgten drei Waschvorgänge. Eine anschließend aufgetragene Substratlösung reagierte mit den vorhandenen TIMP-1 Komplexen. Nach 30 Minuten Inkubation musste eine Stopplösung pipettiert und sofort die optische Dichte bei 450 nm mittels ELISA- Readers abgelesen werden. Dies war mit Hilfe der graphischen Erstellung einer Standarddeichkurve möglich. Von den Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte gebildet und die Endkonzentrationen unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren berechnet.

2.5 Evaluation der Krankenblätter

Wichtige Informationen für die Studie erbrachte die Aufarbeitung der Krankenblätter. Parameter, wie zum Beispiel Alter, Geschlecht, Rauchverhalten sowie Nebendiagnosen der Patienten, wurden herausgearbeitet. Klinische, histologische und radiologische Befunde wurden gesammelt und dienten als Basis für die Gruppeneinteilung der Patienten. Einige Patienten erschienen nach Diagnosestellung nicht mehr in der Uniklinik und wurden von niedergelassenen Pulmologen weiterbetreut. Hierzu gab die Patientenakte Aufschluss. Durch Kontaktaufnahme mit dem weiterbehandelndem Allgemein- oder Lungenfacharzt konnten wir Lungenfunktionsparameter auch ein und zwei Jahre nach Diagnosestellung gewinnen.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte auf einem PC mithilfe der Datenverarbeitungsprogramme Excel und SPSS. Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Aufgrund fehlender Normalverteilung verwendeten wir nichtparametrische Tests. Für Gruppenvergleiche arbeiteten wir mit dem U-Test nach Mann-Whitney. Dabei sprach man erst von einer statistischen Signifikanz, wenn $p < 0,05$ war. Die Korrelationsanalyse erfolgte mittels des Rangkorrelationstests nach Spearman. Aussagekräftig erschienen uns Werte von $|r| > 0,5$.

III. Ergebnisse

3.1 Lungenfunktionsanalysen

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

IPF

Diese Patientengruppe fällt durch deutlich geringere Lungenvolumina und Gasaustauschparameter auf. Die Vitalkapazität beträgt im Durchschnitt 63 % und ist, verglichen mit Kontrollen (86%), Sarkoidose- Gruppe 1 (92%) und Sarkoidose- Gruppe 2/3 (89%) signifikant reduziert. Die Totale Lungkapazität der IPF- Patienten beträgt in unserer Studie durchschnittlich 62%. Sie ist um 30% signifikant geringer als in der Kontroll- und Sarkoidose 1- Gruppe und um 26% geringer als in der Sarkoidose 2/3. Außerdem sind der Diffusionskoeffizient für CO (DCO, 72%) und der partielle Sauerstoffdruck (69 mmHg) signifikant niedriger im Vergleich zu anderen Gruppen.

Sarkoidose

Die Vitalkapazität sowie die Totale Lungkapazität von Patienten im Sarkoidose- Stadium 1 beträgt 92 % des Sollwertes. Damit besitzen sie die größten Lungenvolumina unter allen Studienteilnehmern. In einem fortgeschrittenem Stadium (Röntgentyp 2+3 und 4 zusammengefasst) ist die VC um 4 % und die TLC um 3 % vermindert.

Zwischen den drei Gruppen sind die aufgezählten Unterschiede wegen großer Streubreite nicht signifikant (siehe Tabelle 2).

Kontrollgruppe

In der Vergleichsgruppe weisen die Patienten im Durchschnitt eine Vitalkapazität von 86% des Sollwertes auf. Sie ist niedriger als in der Sarkoidosegruppe.

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Lungenfunktionsparameter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung innerhalb der Patientengruppen.

	<u>IPF</u>	<u>Sarkoidose 1</u>	<u>Sarkoidose2+3</u>	<u>Kontrolle</u>
VC %	63 ± 3* (29)	92 ± 3,6 (33)	89 ± 3,7 (18)	86 ± 6 (16)
TLC %	62 ± 2,4*(29)	92 ± 2,4 (33)	88 ± 3,3 (18)	92 ± 5,3 (16)
DCO %	72 ± 4,5* (26)	102 ± 5,2 (24)	87 ± 6 (16)	108 ± 10 (13)
PO₂ mmHg	69 ± 1,7* (28)	79 ± 1,6 (29)	75 ± 2,2 (18)	74 ± 2 (16)

Tab. 2: Lungenfunktionswerte bei Diagnosestellung

Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler

(n) entspricht der Anzahl der untersuchten Patienten

*p< 0,05 vs. Kontrolle, Sarkoidose1 und Sarkoidose 2/ 3

Nach zwei Jahren

Von 32 Personen mit idiopathischer Lungenfibrose blieben 13 im Follow- up. Die restlichen entzogen sich einer weiteren Verlaufskontrolle, zwei verstarben. Aus der Sarkoidosegruppe 2/3 konnten von initial 20 Personen sieben über zwei Jahre beobachtet werden (Abb.7). Es verstarb ein Patient im fortgeschrittenem Stadium.

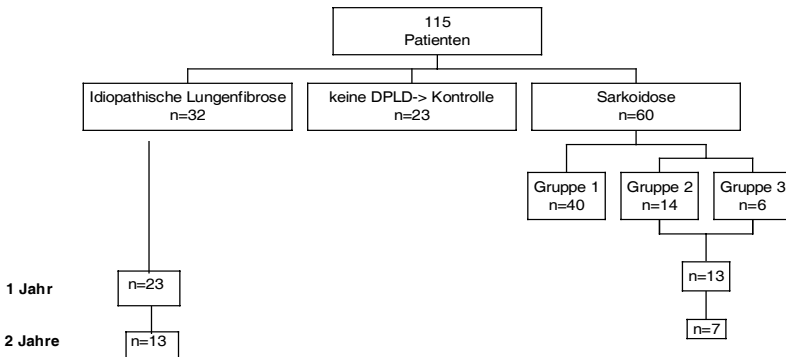


Abb. 7 Anzahl der Patienten, die im Follow- Up blieben, aufgeteilt in IPF und Sarkoidose-Gruppe 2 und 3

Die Lungenfunktionsparameter waren im Vergleich zu den Vorwerten innerhalb der jeweiligen Patientengruppe nicht signifikant vermindert. Jedoch zeigte sich erneut eine Signifikanz zwischen beiden Diagnosegruppen. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Lungenfunktionswerte zwei Jahre nach Diagnosestellung.

	<i>IPF</i>	<i>Sarkoidose2+3</i>
2J.-VC %	58 ± 4* (13)	83 ± 7 (7)
2J.-TLC %	57 ± 3* (13)	87 ± 4 (7)
2J.-DCO %	54 ± 5* (12)	79 ± 8 (6)
2J.-PO₂ mmHg	67 ± 2 (12)	73 ± 4 (6)

Tab. 3: Lungenfunktionswerte zwei Jahre nach Diagnosestellung

Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler
(n) entspricht der Anzahl der untersuchten Patienten

*p< 0,05 vs. Sarkoidose 2/ 3

3.2 BALF- Zellanalyse

Polymorphkernige Neutrophile in der BAL waren in der Fibrosegruppe signifikant erhöht.

Einen charakteristischen Anstieg der Lymphozytenkonzentration verzeichneten wir in allen Stadien der Sarkoidose ($p < 0,05$ vs. Kontrolle; $p < 0,05$ vs. UIP-Gruppe).

Alveolarmakrophagen waren in UIP und Sarkoidose 1 signifikant erniedrigt im Vergleich zu Nicht- Erkrankten.

Der Gehalt an Eosinophilen in Prozent erlangte in UIP höchste Werte. In Kontrolle und Sarkoidose 1 ergab sich eine signifikante Reduktion der Eosinophilen ($p < 0,05$ vs. UIP).

Die Gesamtzellzahl unterschied sich in den einzelnen Diagnosegruppen nicht wesentlich voneinander.

Die Proteinspiegel in der UIP-, Sarkoidose 1 - und 2/3- Gruppe waren signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). In Tabelle 4 sind alle Ergebnisse veranschaulicht.

	IPF	Sarkoidose 1	Sarkoidose 2/3	Kontrolle
GsZz / ml ($\cdot 10^4$)	29 ± 2	24 ± 3	25 ± 4	29 ± 5
Protein g/l	$0,29 \pm 0,04^*$	$0,28 \pm 0,04^*$	$0,46 \pm 0,09^*$	$0,18 \pm 0,02$
PMN %	$22 \pm 2^*/ \circ$	11 ± 1	12 ± 2	12 ± 3
Lymphozyten %	13 ± 2	$26 \pm 3^*/ **$	$26 \pm 4^*/ +$	14 ± 2
AM %	$63 \pm 3^*$	$63 \pm 3^*$	62 ± 4	74 ± 4
Eosinophile %	$1,7 \pm 0,5^*/ \circ$	$0,4 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$

Tab. 4: BALF- Zellen in UIP (n= 32), Sarkoidose-Gruppe1 (n= 40), Sarkoidose- Gruppe 2/ 3 (n= 20) und in Kontrollgruppe (n= 23)

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; + $p < 0,05$ vs. UIP; ** $p < 0,005$ vs. UIP

\circ $p < 0,05$ vs. Sarkoidose 1 ; $\circ\circ$ $p < 0,001$ vs. Sarkoidose 1 und 2/3

3.3 Konzentrationen der untersuchten Zytokine in BALF

MMP-9

MMP-9 Konzentrationen konnten wir in der Lavageflüssigkeit von 104 Patienten messen. Bei den übrigen Patienten lagen nach wiederholten Messungen MMP-9 Konzentrationen nicht in dem vorgeschriebenen Wertebereich. Für weitere Messungen war das Untersuchungsmaterial nicht ausreichend. Deshalb reduziert sich die Anzahl der Ergebnisse in der Kontrollgruppe um zwei, in der Fibrosegruppe um sechs und in der Sarkoidosegruppe um drei Personen.

In IPF ist MMP-9 im Vergleich zu den Kontrollpatienten signifikant erhöht ($p < 0,005$). In der Kontrollgruppe sind die Kollagenase-Spiegel mit durchschnittlich $0,04 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ am niedrigsten. Dabei bewegen sich die Werte zwischen dem Minimum von $0,007$ und dem Maximum von $0,186 \text{ nmol}/\mu\text{l}$. Die höchste Durchschnitts-Konzentration ist in der IPF- Gruppe mit $0,22 \text{ nmol}/\mu\text{l}$ zu verzeichnen. Die Einzelwerte variieren von $0,034$ bis $0,971 \text{ nmol}/\mu\text{l}$. Wie sich herausstellte, sind auch im Stadium 1 und Stadium 2/3 der Sarkoidose MMP-9-Spiegel ($0,13 \text{ nmol}/\mu\text{l}$) signifikant erhöht, verglichen mit Kontrollpersonen ($p < 0,05$). Betrachtet man das Stadium 2 separat, so liegt der Durchschnittswert für MMP-9 bei $0,10 \text{ nmol}/\mu\text{l}$. Im Stadium 3 errechnet sich eine MMP-9 Konzentration von durchschnittlich $0,23 \text{ nmol}/\mu\text{l}$, die der in der UIP- Gruppe ähnelt. Sie ist folglich höher als in Sarkoidose 1 und 2. Im Gruppenvergleich, d.h. zwischen IPF und Sarkoidose 1, IPF und Sarkoidose 2/3, sowie zwischen Sarkoidose 1 und Sarkoidose 2/3 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb.8).

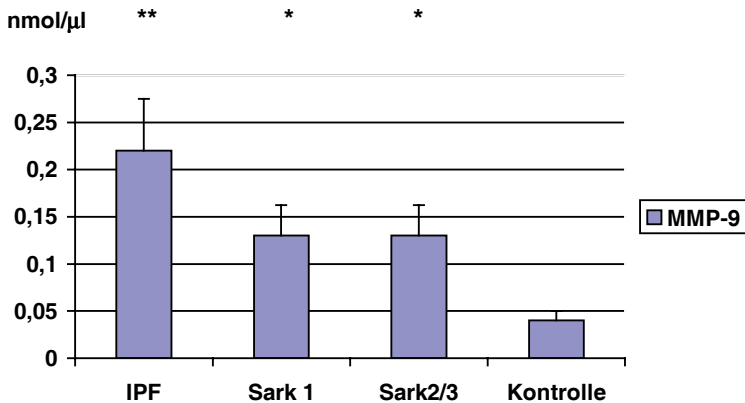


Abb. 8: MMP-9 Konzentrationen in BALF in IPF (n=26), Sarkoidose- Stadium 1 (n=39), Sarkoidose- Stadium 2/3 (n=18) und Kontrollgruppe (n=21)

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

** $p < 0,005$ vs. Kontrolle

TIMP-1

Insgesamt wurden TIMP-1 Konzentrationen in der BALF von 107 Patienten mittels ELISA gemessen (Abb.9). In acht Fällen war zu wenig Untersuchungsmaterial vorhanden, nachdem erste Messungen außerhalb des angegebenen Bereichen lagen. Folglich verringert sich die Zahl der untersuchten Patienten in der UIP- Gruppe um fünf und in der Sarkoidose-Gruppe um drei.

Die höchsten Spiegel an TIMP-1 besitzen Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose. Sie liegen im Durchschnitt bei 1,03 nmol/μl und sind signifikant höher - um ca. 36 % - als bei Patienten in der Kontroll- und Sarkoidose 1-Gruppe ($p < 0,05$). Die Durchschnitts-Konzentration an TIMP-1 in der Kontrolle beträgt 0,37 nmol/μl und weicht nur gering von der in der Sarkoidose- Gruppe 1 mit 0,38 nmol/μl ab. In einem fortgeschrittenerem Stadium der Sarkoidose (2/3)

ist der Mittelwert mehr als doppelt so hoch - 0,89 nmol/ μ l- verglichen mit dem Anfangsstadium der Sarkoidose und den Kontrollpersonen ($p < 0,05$). Stellt man die Ergebnisse der Fibrosegruppe denen der Sarkoidose- Gruppe 2/3 gegenüber, so differieren sie kaum. Betrachtet man die Stadien 2 und 3 der Sarkoidose separat, dann ergibt sich ein Durchschnittswert für TIMP-1 von 1,03 nmol/ μ l in Stadium 2 und 0,53 nmol/ μ l in Stadium 3. Im Mann-Whitney Test bestätigen sich die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch nicht ($p > 0,05$).

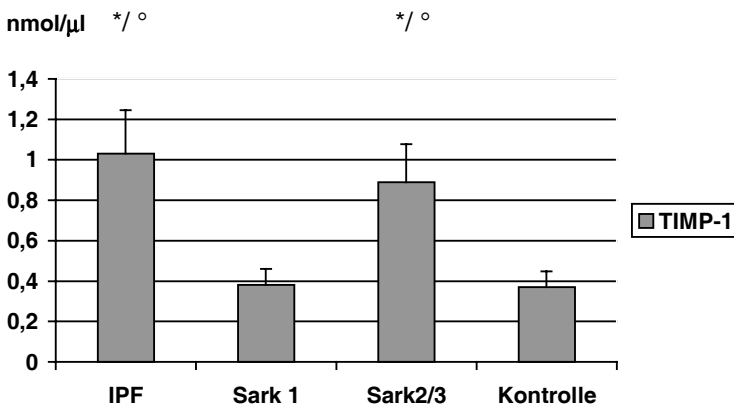


Abb. 9: TIMP-1 Konzentrationen in BALF in IPF (n=27), Sarkoidose- Stadium 1 (n=39), 2/3 (n=18) und in Kontrollgruppe (n=23)

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

° $p < 0,05$ vs. Sarkoidose 1

Molares Verhältnis MMP-9/ TIMP-1

Nachdem die Konzentrationen für MMP-9 und TIMP-1 ermittelt wurden, berechneten wir das molare Verhältnis beider Enzyme zueinander (Ratio). Da ein Mol MMP-9 von einem Mol TIMP-1 (1:1) nicht-kovalent gebunden wird, wurden die Konzentrationen der Enzyme in nmol/μl angegeben. Somit lassen sich beide Enzyme tatsächlich vergleichen. Von 104 Patienten liegen uns sowohl Werte der MMP-9 - als auch der TIMP-1- Konzentrationen in der Lavage vor (Abb.10).

Die im Durchschnitt niedrigste MMP-9/TIMP-1 Ratio findet sich in der Kontrollgruppe mit 0,18. Bemerkenswert ist der Mittelwert in der Lungenfibrose mit durchschnittlich 0,32, der als einziger das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ vs. Kontrolle erreicht. Im Stadium 1 der Sarkoidose ist der Mittelwert etwas niedriger (0,29) als in IPF. Im Stadium 2/3 verzeichnen wir einen Mittelwert von 0,21. Teilt man Sarkoidose 2/3 auf, so errechnet sich ein Verhältnis von MMP-9/TIMP-1 in Stadium 2 von $0,12 \pm 0,02$ und in Stadium 3 von $1,59 \pm 1,07$.

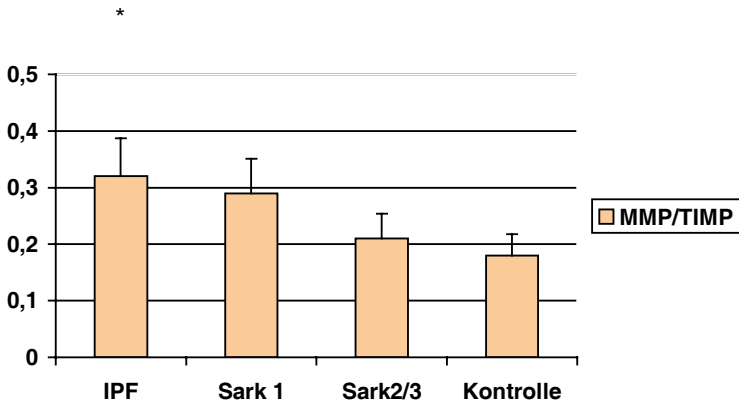


Abb.10 : Molare Ratio MMP-9/ TIMP-1 in BALF in IPF (n=26), Sarkoidose- Stadium 1 (n=39), 2/3 (n=18) und in Kontrollgruppe (n=21)

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Die Ergebnisse aller Zytokinmessungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

	IPF	Sarkoidose 1	Sarkoidose 2/3	Kontrolle
MMP-9	0,22 ± 0,05**	0,13 ± 0,04*	0,13 ± 0,03*	0,04 ± 0,09
TIMP-1	1,03 ± 0,26** [◦]	0,38 ± 0,07	0,89 ± 0,23** [◦]	0,37 ± 0,07
MMP-9/TIMP-1	0,32 ± 0,06*	0,29 ± 0,06	0,21 ± 0,07	0,18 ± 0,03

Tab. 5

* p < 0,05 vs. Kontrollgruppe

** p < 0,005 vs. Kontrollgruppe

◦ p < 0,05 vs. Sarkoidose 1

3.4 Korrelation von MMP-9 mit TIMP-1

Von 104 Personen wurden sowohl MMP-9 als auch TIMP-1 Konzentrationen gemessen.

Jeder MMP-9- Messwert wurde seinem dazugehörigem gemessenem TIMP-1- Wert gegenübergestellt. Nach statistischer Analyse ergibt sich eine signifikante positive Korrelation für beide Zytokine mit $p < 0,001$. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r_s = 0,6$ für alle Proben. Betrachtet man die Diagnosegruppen einzeln, zeigen sich allerdings Differenzen im Verhältnis zwischen MMP-9 und TIMP-1. Innerhalb der Lungenfibrosegruppe ist die Korrelation von MMP-9 mit TIMP-1 am höchsten mit $r_s = 0,64$ ($p < 0,01$; $n = 26$). Im Sarkoidose Stadium 1 beträgt der Korrelationskoeffizient $0,56$ ($p < 0,005$, $n = 39$), im Stadium 2/3 ist r_s niedrig ($0,39$; n.s.; $n = 18$). Mit $r_s = 0,5$ zeigt die Korrelation in der Kontrollgruppe einen mittelguten Zusammenhang auf ($p < 0,05$; $n = 21$).

3.5 Zusammenhang mit BALF-Parametern

3.5.1 MMP-9

In IPF

Bei Patienten mit Lungenfibrose zeigt sich eine signifikante negative Korrelation von MMP-9 mit dem prozentualen Anteil an Alveolarmakrophagen ($r_s = -0,69$; $p < 0,01$; $n = 26$). Außerdem korreliert der prozentuale Lymphozytenanteil mit MMP-9, dabei beträgt $r_s = 0,56$ ($p < 0,01$). Die absolute Zahl der Lymphozyten korreliert mit $r_s = 0,47$ ($p < 0,05$). Deutlich wird auch der Zusammenhang zwischen MMP-9 und Neutrophilen. Zum prozentualen Anteil korreliert es mit $r_s = 0,46$, zur absoluten Neutrophilenzahl mit $r_s = 0,47$ ($p < 0,05$). Der Proteingehalt in der Lavage korreliert mit MMP-9 Konzentrationen, $r_s = 0,57$ ($p < 0,01$).

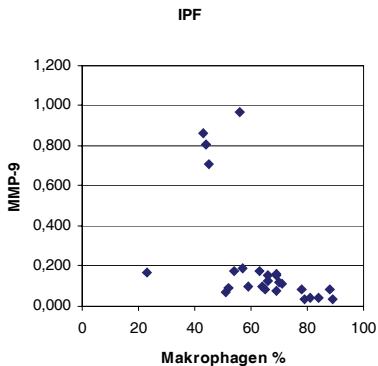


Abb. 11 Negativer Zusammenhang zwischen MMP-9 und Makrophagenanzahl innerhalb der Lungenfibrosegruppe

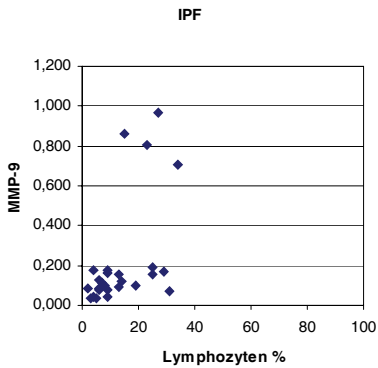


Abb. 12 Positive Korrelation von MMP-9 zum Lymphozytengehalt

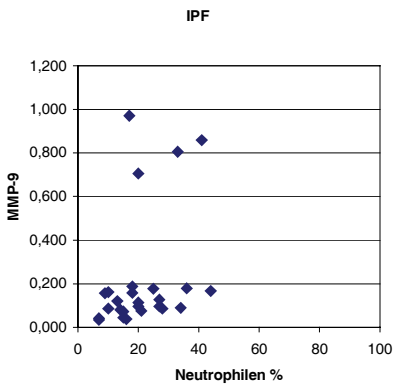


Abb. 13 Korrelation zwischen MMP-9 und Neutrophilengehalt

In Sarkoidose 1

Zur absoluten Neutrophilenzahl korreliert MMP-9 signifikant mit einem Korrelationskoeffizienten r_s von 0,51. Zur Prozentzahl korreliert es jedoch nur mit $r_s = 0,44$ ($p < 0,01$; $n = 39$).

In Sarkoidose 2/3

In einem fortgeschrittenem Status der Sarkoidose korreliert MMP-9 deutlich bezüglich der Polymorphkernigen Neutrophilenzahl in Prozent mit $r_s=0,68$ und $p<0,05$ ($n=18$). Ein ebenfalls hoher Zusammenhang besteht zum prozentualen Makrophagengehalt mit $r_s=-0,68$ und $p<0,05$ ($n=18$). Dies bestätigt sich auch in der Berechnung mit der absoluten Zellzahl. Andere aussagekräftige Zusammenhänge lassen sich nicht erkennen.

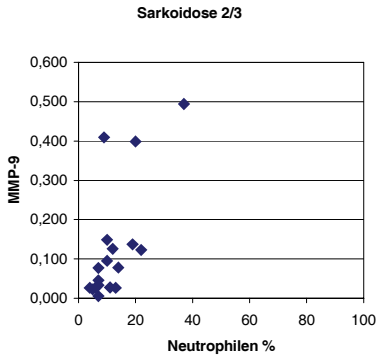


Abb. 14 Positiver Zusammenhang zwischen MMP-9 Titern und Neutrophilengehalt innerhalb der Sarkoidose- Gruppe 2/3

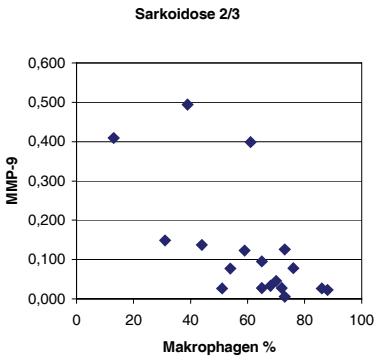


Abb. 15 Negative signifikante Korrelation von MMP-9 zum Makrophagengehalt

In der Kontrollgruppe

Am stärksten korreliert der prozentuale Makrophagengehalt in BALF mit MMP-9 ($r_s = -0,71$; $p < 0,01$; $n = 21$). Ein ähnlich aussagekräftiger Wert ergibt sich für die prozentuale Lymphozytenkonzentration ($r_s = 0,7$; $p < 0,01$; $n = 21$). Auch in dieser Diagnosegruppe findet sich ein Zusammenhang zur Neutrophilenzahl in Prozent ($r_s = 0,50$; $p < 0,05$).

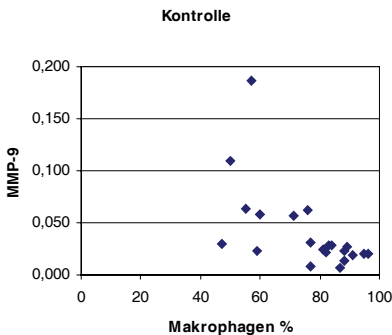


Abb. 16 Korrelation von MMP-9 zur Makrophagenanzahl in der Kontrolle

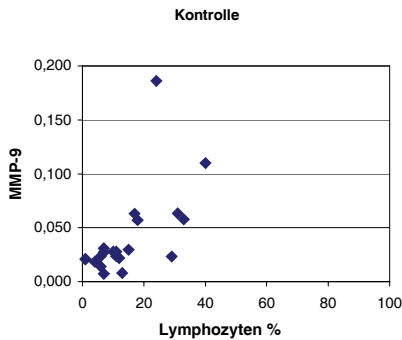


Abb. 17 Korrelation von MMP-9 zur Lymphozytenzahl

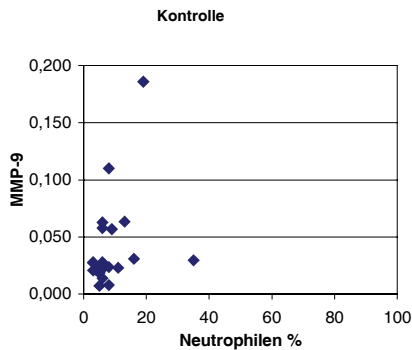


Abb. 18 Korrelation von MMP-9 zum Neutrophilengehalt

In allen Patienten

Wir führten anschließend eine Korrelationsanalyse zwischen Lavageparametern aller untersuchten Personen und MMP-9 Konzentrationen durch. Dabei besteht bei allen Personen ein deutlicher Zusammenhang zwischen Polymorphkernigen Neutrophilen und MMP-9 (für PNM %: $r_s = 0,64$; für PNM absolut: $r_s = 0,57$; $p < 0,01$; $n = 104$).

Auch zu den Makrophagen in BALF besteht insgesamt ein negativer Zusammenhang (für AM %: $r_s = -0,579$; $p < 0,01$; $n = 104$).

3.5.2 TIMP-1

In IPF

Bemerkenswerte Zusammenhänge zwischen Konzentration an TIMP-1 in der BALF und typischen Lavageparametern lassen sich innerhalb der Lungenfibrose- Gruppe ermitteln. Sehr hoch korreliert TIMP-1 mit der Lymphozytenkonzentration. Für den Prozentwert beträgt $r_s = 0,71$ und für den absoluten Wert $r_s = 0,72$ ($p < 0,01$; $n = 27$). Eine weitere signifikante, jedoch negative Korrelation besteht zu dem prozentualen Makrophagengehalt in BALF. Der Korrelationskoeffizient ist $r_s = -0,55$ ($p < 0,01$; $n = 27$). Wie schon MMP-9-, so korrelieren auch TIMP-1-Werte in UIP mit dem Proteingehalt in der Lavage ($r = 0,7$; $p < 0,01$; $n = 27$).

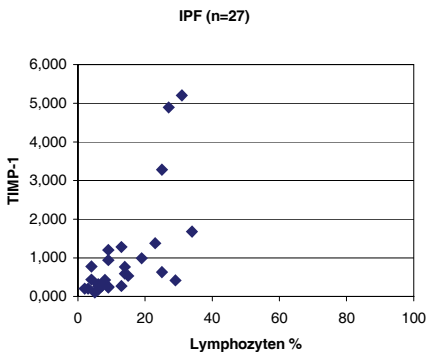


Abb. 19 Zusammenhang zwischen TIMP-1 und Lymphozytenzahlen innerhalb der Lungenfibrosegruppe

In Sarkoidose 1

Im Anfangsstadium der Sarkoidose lassen sich keine aussagekräftigen Zusammenhänge der TIMP- Konzentrationen mit Lavageparametern feststellen. Eine schwache signifikante Beziehung besteht zu dem Anteil an Makrophagen in Prozent ($r=-0,4$; $p<0,05$; $n=39$) und dem an Polymorphkernigen Neutrophilen in Prozent ($r=0,36$; $p<0,05$; $n=39$).

In Sarkoidose 2/3

Der Gehalt an TIMP-1 in BALF hängt mit dem Proteingehalt zusammen. R_s beträgt 0,5 ($p<0,05$; $n=18$).

In Kontrollgruppe

Bei der Analyse von Lavagewerten der Vergleichsgruppe konnten wir lediglich einen Zusammenhang von TIMP-1 Konzentrationen mit dem Proteingehalt feststellen ($r=0,52$; $p<0,5$; $n=22$).

In allen Patienten

Zu den Polymorphkernigen Neutrophilen korreliert TIMP-1 nur mäßig (für PNM %: $r_s= 0,433$; für PNM absolut: $r_s = 0,404$; $p<0,01$; $n=107$).

3.5.3 molares Verhältnis MMP-9/TIMP-1

In IPF

Es ergeben sich Zusammenhänge zwischen dem molaren Verhältnis von MMP zu TIMP und der absoluten Makrophagenzahl mit $r_s = -0,56$ ($p < 0,01$; $n = 26$) und dem prozentualen Neutrophilengehalt mit $r_s = 0,48$ ($p < 0,05$; $n = 26$).

In Sarkoidose 1

Die molare Ratio MMP-9/TIMP-1 korreliert im Anfangsstadium der Sarkoidose schwach mit dem Gehalt an Neutrophilen. Der Faktor nach Spearman beträgt 0,41 ($p < 0,01$, $n = 39$).

In Sarkoidose 2 und 3

Ein negativer Zusammenhang zu dem Makrophagengehalt besteht ($r_s = -0,6$ zu dem Prozentwert, mit $r_s = -0,53$ zum Absolutwert; $p < 0,05$; $n = 18$).

In Kontrollgruppe

Die signifikant niedrige molare Ratio in der Lavage von Kontrollpatienten korreliert nicht signifikant und nur schwach ($|r_s| < 0,5$) mit den untersuchten Parametern.

In allen Patienten

Es bestehen keine aussagekräftigen Zusammenhänge zwischen dem molaren Verhältnis beider Zytokine und den Parametern in der BALF- Analyse.

3.6 Zusammenhang der untersuchten Zytokine mit Lungenfunktionswerten

3.6.1 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

MMP-9

In IPF, Sarkoidose 1, Sarkoidose 2/3

In der Korrelationsanalyse zwischen MMP-9 Konzentrationen und Lungenfunktionswerten (Vitalkapazität, totale Lungenkapazität, Diffusionskoeffizient für Kohlendioxid und Sauerstoffpartialdruck) ergaben sich keine Signifikanzen und keine aussagekräftigen Zusammenhänge (siehe Tabellen 6,7,8).

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	0,217	0,309	24
VC%	-0,045	0,835	24
Tlc	0,189	0,377	24
TLC%	-0,177	0,409	24
DCO%	-0,092	0,677	23
Po ₂	0,048	0,823	24

Tab. 6: IPF- Gruppe ohne Zusammenhang zwischen MMP-9 und Lungenfunktionswerten

Vc - absolute Vitalkapazität

Tlc - absolute Totale Lungenkapazität

DCO% - prozentualer Diffusionskoeffizient für Kohlendioxid

Po₂ - Sauerstoffpartialdruck

(*) - p<0.05

n - Anzahl der Patienten

VC% - prozentuale Vitalkapazität

TLC% - prozentuale Totale Lungenkapazität

Sign. - Signifikanz- zweiseitig

(**) - p<0.01

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,224	0,217	32
VC%	-0,274	0,129	32
Tlc	-0,175	0,339	32
TLC%	-0,232	0,200	32
DCO%	-0,036	0,870	23
Po ₂	-0,313	0,098	29

Tab. 7: Innerhalb der Sarkoidose 1 gibt es keine Zusammenhänge zwischen Lungenfunktionswerten und MMP-9

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,041	0,880	16
VC%	0,465	0,070	16
Tlc	0,050	0,854	16
TLC%	0,440	0,088	16
DCO%	0,341	0,233	14
Po ₂	0,035	0,897	16

Tab. 8: Innerhalb der Sarkoidose 2/3 fehlen aussagekräftige Zusammenhänge zwischen MMP-9 und Lungenfunktionen

In Kontrollgruppe

In unserer Kontrollgruppe besteht ein signifikant hoher Zusammenhang zwischen MMP-9 und der Diffusionskapazität für Kohlendioxid in Prozent (DCO %; $r_s=0,78$; $p<0,01$; $n=14$). Für die übrigen Lungenfunktionswerte ergaben sich keine Zusammenhänge mit MMP- Titern.

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	0,114	0,685	15
VC%	0,382	0,160	15
Tlc	-0,198	0,478	15
TLC%	-0,064	0,820	15
DCO%	0,775(**)	0,001	14
Po ₂	0,161	0,567	15

Tab. 9: Kontrollgruppe

In allen Patienten

In der Gesamtkorrelation von MMP- Titern und Lungenfunktionswerten aller Patienten konnten keine aussagekräftigen Zusammenhänge ermittelt werden. Schwach negative und signifikante Korrelationen bestehen zur Vitalkapazität (VC) und Totalen Lungenkapazität (TLC) bei Diagnosestellung (für VC %: $r_s = -0,3$; für TLC %: $r_s = -0,32$, $p < 0,05$; $n = 87$; siehe Tabelle 10).

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-,287(**)	,007	87
VC %	-,300(**)	,005	87
Tlc	-,326(**)	,002	87
TLC %	-,319(**)	,003	87
DCO%	-,102	,386	74
Po ₂	-,239(*)	,029	84

Tab. 10: Korrelation aller MMP-9 Titer mit entsprechenden Lungenfunktionsparametern

TIMP-1

In IPF, Sarkoidose 1 und Kontrollgruppe

Lungenfunktionswerte korrelieren nicht aussagekräftig mit TIMP-1 Konzentrationen innerhalb der Fibrose-, Sarkoidose-1 und Kontrollgruppe. Dies wird in nachfolgenden Tabellen 11-13 veranschaulicht.

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	0,229	0,271	25
VC%	-0,038	0,855	25
Tlc	0,143	0,495	25
TLC%	-0,230	0,269	25
DCO%	-0,132	0,538	24
Po ₂	-0,153	0,466	25

Tab. 11: IPF

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,181	0,323	32
VC%	-0,260	0,151	32
Tlc	-0,109	0,553	32
TLC%	-0,234	0,197	32
DCO%	-0,066	0,764	23
Po2	0,064	0,742	29

Tab. 12: Sarkoidose 1

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,141	0,602	16
VC%	0,165	0,542	16
Tlc	-0,163	0,545	16
TLC%	-0,009	0,974	16
DCO%	0,039	0,889	15
Po2	-0,171	0,528	16

Tab. 13: Kontrollgruppe

In Sarkoidose 2/3

Mit $r_s = -0,59$ besteht ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen der TIMP- Konzentration und der DCO % bei 14 erkrankten Patienten. Das Signifikanzniveau ist erreicht $p < 0,05$ (Tabelle 14).

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	0,156	0,564	16
VC%	-0,221	0,412	16
Tlc	-0,006	0,983	16
TLC%	-0,381	0,146	16
DCO%	-0,591(*)	0,026	14
Po2	0,215	0,425	16

Tab. 14: Sarkoidose 2/3

In allen Patienten

Im Vergleich aller TIMP-1 Messungen mit den Lungenfunktionsparametern des jeweiligen Patienten erbrachte die Korrelationsanalyse keine aussagekräftigen Ergebnisse.

Schwach negative, signifikante Korrelationen bestehen auch hier zur Vitalkapazität (VC) und Totalen Lungenkapazität (TLC) bei Diagnosestellung (für VC %: $r_s = -0,3$; für TLC %: $r_s = -0,35$ ($p < 0,01$; $n = 89$, Tabelle 15).

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,223(*)	0,036	89
VC %	-0,302(**)	0,004	89
Tlc	-0,277(**)	0,009	89
TLC %	-0,348(**)	0,001	89
DCO %	-0,322(**)	0,005	76
Po ₂	-0,192	0,076	86

Tab. 15: Korrelation aller TIMP-1-Konzentrationen mit Lungenfunktionsparametern

molares Verhältnis MMP-9/ TIMP-1

In IPF, Sarkoidose 1 und Kontrollgruppe

In den folgenden Tabellen 16-18 sind Ergebnisse der Korrelationsanalyse zwischen molarer Ratio und Lungenfunktionsparametern zusammengefasst. Dabei lässt sich kein signifikanter Zusammenhang herausstellen.

	molare Ratio		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,049	0,821	24
VC%	0,087	0,688	24
Tlc	-0,001	0,997	24
TLC%	0,085	0,692	24
DCO%	0,077	0,727	23
Po2	0,053	0,806	24

Tab. 16: Fehlende Korrelationen zwischen Molarer Ratio und Lungenfunktionswerten innerhalb der Lungenfibrosegruppe

	molare Ratio		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,016	0,930	32
VC%	-0,143	0,436	32
Tlc	-0,008	0,966	32
TLC%	-0,069	0,709	32
DCO%	-0,117	0,596	23
Po2	-0,416(*)	0,025	29

Tab. 17: Sarkoidose 1

	molare Ratio		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	0,032	0,909	15
VC%	-0,132	0,639	15
Tlc	0,052	0,854	15
TLC%	-0,057	0,840	15
DCO%	0,280	0,333	14
Po2	0,329	0,232	15

Tab. 18: Kontrollgruppe

In Sarkoidose 2/3

Bei den untersuchten Patienten in einem fortgeschrittenem Stadium der Sarkoidose berechneten wir einen Zusammenhang zur Lungenfunktion bei Diagnosestellung (Tab.19). Nach Spearman beträgt der Korrelationskoeffizient für die prozentuale Vitalkapazität 0,58 ($p < 0,05$) und für die Totale Lungenkapazität 0,64 ($p < 0,01$). Mit dem Diffusionskoeffizienten für CO korreliert die molare Ratio mit $r_s = 0,72$ ($p < 0,01$).

	molare Ratio		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,162	0,549	16
VC%	0,576(*)	0,019	16
Tlc	0,032	0,905	16
TLC%	0,640(**)	0,008	16
DCO%	0,723(**)	0,003	14
Po2	-0,165	0,542	16

Tab. 19: Sarkoidose 2/3

In allen Patienten

Zwischen Lungenfunktionswerten bei Diagnosestellung und molarer Ratio in der BALF aller Patienten besteht kein Zusammenhang.

	molare Ratio		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
Vc	-0,152	0,159	87
VC%	-0,102	0,345	87
Tlc	-0,089	0,410	87
TLC%	-0,027	0,803	87
DCO%	0,090	0,448	74
Po ₂	-0,189	0,085	84

Tab. 20: Die Korrelation aller Verhältnisse von MMP/TIMP mit entsprechenden Lungenfunktionsparametern erbrachte keine Signifikanz.

3.6.2 Zusammenhang der untersuchten Zytokine mit Lungenfunktionsparametern nach zwei Jahren

MMP-9

Für MMP-9- Konzentrationen finden sich keine signifikanten Zusammenhänge mit Lungenfunktionsparametern nach zwei Jahren. Dies stellten wir für jede einzelne Diagnosegruppe fest, sowie in der Analyse aller Patienten.

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
2J.- Vc	-0,247	0,309	19
2J.-VC%	-0,396	0,093	19
2J.- Tlc	-0,123	0,616	19
2J.-TLC%	-0,353	0,139	19
2J.-DCO%	-0,404	0,107	17
2J.- Po ₂	-0,171	0,527	16

Tab. 21: Fehlende Korrelation zwischen MMP-9 Titern und den Lungenfunktionsparametern nach 2 Jahren in der Gesamtanalyse aller Patienten

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
2J.- Vc	-0,032	0,923	12
2J.- VC%	-0,112	0,729	12
2J.- Tlc	0,175	0,587	12
2J.- TLC%	0,063	0,846	12
2J.-DCO%	-0,064	0,853	11
2J.- Po ₂	-0,227	0,502	11

Tab. 22: Aufteilung in IPF- Patienten

	MMP-9		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
2J.- Vc	-0,429	0,337	7
2J.- VC%	-0,250	0,589	7
2J.- Tlc	0,071	0,879	7
2J.- TLC%	-0,429	0,337	7
2J.-DCO%	-0,486	0,329	6
2J.- Po ₂	0,100	0,873	5

Tab. 23: Aufteilung in Patienten mit fortgeschrittener Sarkoidose (Stadium 2/3)

TIMP-1

Zwischen TIMP-1-Konzentrationen der Patienten im Follow-Up und den entsprechenden Lungenfunktionsparametern nach zwei Jahren bestehen keine Zusammenhänge. Dies bestätigte auch die Aufteilung in IPF- und Sarkoidose 2/3 – Gruppen.

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
2J.- Vc	0,145	0,541	20
2J.- VC%	0,150	0,527	20
2J.- Tlc	0,035	0,885	20
2J.- TLC%	-0,084	0,724	20
2J.- DCO%	-0,015	0,951	18
2J.- Po ₂	0,120	0,646	17

Tab. 24: Fehlende Korrelation zwischen TIMP-1 Titern und den Lungenfunktionsparametern nach zwei Jahren in der Gesamtanalyse aller Patienten im Follow- Up.

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
2J.- Vc	0,228	0,453	13
2J.- VC%	0,143	0,642	13
2J.- Tlc	0,214	0,482	13
2J.- TLC%	-0,060	0,845	13
2J.- DCO%	-0,007	0,983	12
2J.- Po ₂	0,161	0,618	12

Tab. 25: Aufteilung in IPF- Patienten

	TIMP-1		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	n
2J.- Vc	0,071	0,879	7
2J.- VC%	0,536	0,215	7
2J.- Tlc	-0,250	0,589	7
2J.- TLC%	-0,179	0,702	7
2J.-DCO%	-0,200	0,704	6
2J.- Po ₂	-0,100	0,873	5

Tab. 26: Aufteilung in Patienten mit fortgeschrittener Sarkoidose (Stadium 2/3)

molares Verhältnis MMP-9/ TIMP-1

Von 19 Personen - sieben mit fortgeschrittener Sarkoidose und 12 mit IPF - liegen Lungenfunktionsparameter nach zwei Jahren vor (siehe Tabelle 3). Diese sind jeweils schlechter im Vergleich zum Beginn der Studie. Dies drückt einen prozentualen Abfall der Lungenfunktion im Laufe des Krankheitsgeschehens aus.

Wir haben in unseren Messungen einen Zusammenhang des molaren Verhältnisses MMP-9/ TIMP-1 zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Vitalkapazität nach zwei Jahren feststellen können (Abb.20).

Der Spearmansche Korrelationskoeffizient beträgt für VC % sowie für VC/l - 0,53. Das Signifikanzniveau ist kleiner als 5 %.

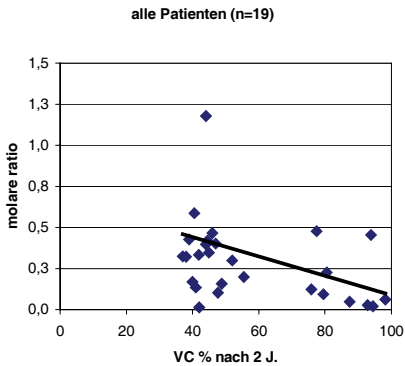


Abb. 20 Korrelation zwischen dem Verhältnis MMP/TIMP zur Vitalkapazität nach zwei Jahren bei Patienten mit fortgeschrittener Sarkoidose und idiopathischer Fibrose im Follow- Up

Von sieben Patienten mit Sarkoidose im fortgeschrittenem Stadium liegen Lungenfunktionsanalysen zwei Jahre nach Diagnosestellung vor. Mit der VC % nach zwei Jahren korreliert die molare Ratio MMP-9/ TIMP-1 negativ mit $r_s = -0,64$ und mit der VC/ I mit $r_s = -0,53$. Die Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant.

Innerhalb der Lungenfibrosegruppe besteht kein Zusammenhang zwischen molarer Ratio und den Lungenfunktion nach zwei Jahren. Alle Ergebnisse der Korrelationsanalyse waren $|r_s|$ kleiner 0,5 und nicht signifikant.

IV. Diskussion

Die Entstehung einer irreversiblen Fibrosierung der Lunge ist der limitierende Faktor im Krankheitsgeschehen der progressiven pulmonalen Sarkoidose und idiopathischen Lungenfibrose. Geringe Therapieerfolge und eine relativ hohe Mortalität machen ein tiefgründiges Erforschen der Pathogenese erforderlich. Bis heute sind Ursache und Entstehungsmechanismen beider Krankheiten weitgehend unklar.

Die Schädigung der epithelialen Basalmembranen in der Lunge wird dabei als Schlüsselereignis angesehen (15,6). Durch diese entstandenen Defekte im Alveolarepithel und in den Basalmembranen können Zellen vom Interstitium in den Alveolarraum migrieren (6). Dazu gehören inflammatorische Zellen, exsudative Faktoren und interstitielle Zellen (15). Die Fibrosierung ist charakterisiert durch einen erheblichen Fibroblastenanstieg und einen komplexen Umsatz von extrazellulärer Matrix (ECM) (39). Das Missverhältnis von Matrixsynthese und deren Degradation scheint dabei besonders relevant zu sein. In den vergangenen Jahren konnten viele Studien einen Zusammenhang zwischen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren Inhibitoren (TIMPs) an der Entstehung einer Lungenfibrose aufweisen. Sie scheinen im Lungenremodeling eine entscheidende Rolle zu spielen (19,14,41,20).

4.1 Bedeutung der Zytokine

MMP-9

In der IPF- Gruppe waren die im Durchschnitt höchsten MMP-9 Konzentrationen aller untersuchten Patienten zu verzeichnen. Dabei wurde ein

signifikanter Anstieg der MMP-9 Werte bei Patienten mit Lungenfibrose verglichen mit Kontrollpatienten deutlich (siehe Abb.8). Einen ähnlichen Studienaufbau hatten Henry et al. (20), die den Gehalt an proMMP-9 in der BALF mittels ELISA bei Patienten mit IPF und Sarkoidose untersuchten. Auch sie fanden bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose die höchsten Werte, wobei sie aber keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollpatienten feststellten. Der von uns verwendete ELISA erkannte latentes (proMMP-9) und aktives Zytokin, konnte jedoch dazwischen nicht differenzieren und spiegelte somit den Gesamtgehalt an MMP-9 wider. Die tatsächliche Aktivität an MMP-9 bestimmten u.a. Suga et al. (41), sowie Selman et al. (39). Sie fanden mittels Zymographie in den Präparaten mit histologisch gesicherter Diagnose IPF vom Typ UIP eine signifikant höhere Expression an MMP-9 im Vergleich zu Kontrollpräparaten von gesunden Personen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit unserem Fund. Ein MMP-9 Anstieg in BALF ist jedoch nicht spezifisch für eine idiopathische Lungenfibrose, denn wie unsere Arbeit zeigen konnte, ist MMP-9 auch in der BALF von Sarkoidosepatienten signifikant zu Kontrollpatienten erhöht. Obwohl zu erkennen war, dass bei Patienten mit IPF die Titer höher waren, als bei denen mit Sarkoidose, konnten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass nur in der IPF Gruppe die Lungenfunktion signifikant zur Kontrolle erniedrigt war. Wenn MMP- Konzentrationen von dem Ausmaß der Beeinträchtigung der Lungenfunktion abhängen, kann die fehlende Signifikanz der Gruppenunterschiede dadurch bedingt sein.

Im Vergleich der verschiedenen Stadien der Sarkoidose untereinander wurde deutlich, dass die Enzymkonzentration nahezu identisch ist. Patienten im Anfangsstadium hatten demnach im Durchschnitt ähnlich hohe Spiegel wie Patienten in einem fortgeschrittenem Stadium. Als mögliche Ursache dafür kann man die Ergebnisse der BALF- Zellanalyse (siehe Tab.4/ Ergebnisse) sehen. Diese konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zellzusammensetzung erkennen lassen. Auch die Lungenfunktionsanalysen erbrachten keine signifikanten Differenzen (siehe Tab.2/ Ergebnisse).

Demzufolge könnten sich ähnliche klinische Parameter der Sarkoidosegruppen in ähnlich hohen MMP-9 Konzentrationen widerspiegeln.

Betrachtet man die Sarkoidose mit Röntgentyp 4 separat, so lässt sich erkennen, dass die Titer ähnlich hohe Werte wie in IPF erreichen.

Dass MMP-9 Titer in Sarkoidosepatienten im Vergleich zu Gesunden erhöht sind, ergab auch die Studie von Henry et al. (20). Sie postulierten, dass die Titer mit der Ausprägung des radiologischen Typs der Sarkoidose bzw. des fibrotischen Phänotyps zunehmen. Dabei waren MMP-9 Werte in Röntgentyp 1 und 2+3 nahezu gleich niedrig, im Röntgentyp 4 waren sie jedoch viermal höher (n.s.). Auch sie verzeichneten die höchste Konzentration bei Patienten mit IPF. Nach unserem Wissen sind sie bisher die einzigen, die ebenfalls MMP-9 Messungen in der BALF von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose und pulmonaler Sarkoidose durchführten.

Die tendenziell höhere Konzentration von MMP-9 in IPF und Sarkoidose ist vereinbar mit der Pathogenese der Lungenfibrose. Diese ist assoziiert mit chronischer Inflammation und der unregelmäßigen Verteilung von aktiv proliferierenden Fibroblasten, sogenannten Fibroblast Foci. MMP-9 degradiert Basalmembranen, ein Mechanismus, der für die Migration von Fibroblasten in den Alveolarraum von Bedeutung ist und die anschließende Fibrosierung begünstigt. Abgesehen davon kann MMP-9 die Aktivität vieler Proteasen und Zytokine modulieren. So spaltet es unter anderem α_1 -Antitrypsin (30), welches die Elastase von neutrophilen Granulozyten in Schach hält. Durch das entstehende Ungleichgewicht an Proteasen-Antiproteasen könnten ebenfalls vermehrt Lungenstrukturen abgebaut werden. Wenn man bedenkt, dass die Elastase ihrerseits pro- MMPs durch proteolytische Spaltung der Prodomäne aktivieren kann (18), so erkennt man eine synergistische Potenzierung der Wirkung dieser Enzyme. Wenn es an CD-44 gebunden ist, kann MMP-9 außerdem latentes TGF- β freisetzen (49). Auch über diesen Weg könnte MMP-9 eine verstärkte Fibrogenese bewirken, da TGF- β seinerseits die Zellwanderung mesenchymaler Zellen stimuliert und die Differenzierung zu Myofibroblasten bewirkt.

Ob die Zytokinmessung eine Bedeutung im Alltag hat, ist in der Literatur bislang nicht ausreichend beschrieben. Wie wir zeigen konnten, zeichnet sich eine diagnostische Relevanz der Zytokinbestimmung in unserer Studie ab. Wir konnten demonstrieren, dass MMP-9 am Krankheitsgeschehen der idiopathischen Lungenfibrose und der pulmonalen Sarkoidose maßgeblich beteiligt ist. Nach unserer Studie kann ein hoher MMP-9-Wert in der Lavage einen ersten Hinweis geben, dass es sich um eine interstitielle fibrosierende Lungenkrankheit, in diesem Fall eine idiopathische Lungenfibrose handelt. Niedrige Konzentrationen sprechen eher gegen eine Fibrose. Ein Ziel wäre es, anhand der MMP-9 Konzentrationen Lungenkrankheiten voneinander differenzieren zu können. Damit würde sich der umfangreiche diagnostische Prozess verkürzen und man könnte eventuell rechtzeitiger eine Therapie einleiten.

Betrachtet man die einzelnen Ergebnisse aus den Patientengruppen, so überschneiden sich einige Werte (Abb.21). Zum Beispiel variieren innerhalb der Kontrollgruppe MMP-9 Konzentrationen von 0.007 bis 0.186 und in der IPF Gruppe von 0.034 bis 0.971 nmol/µl. In dem Bereich zwischen 0.034 und 0.186 kann man demzufolge keine definitive Einteilung zu einer Patientengruppe vornehmen. Für den klinischen Alltag bräuchte man aber einen Schwellen- bzw. Grenzwert, der bei Überschreiten oder Unterschreiten eine diagnostische Aussage zulässt.

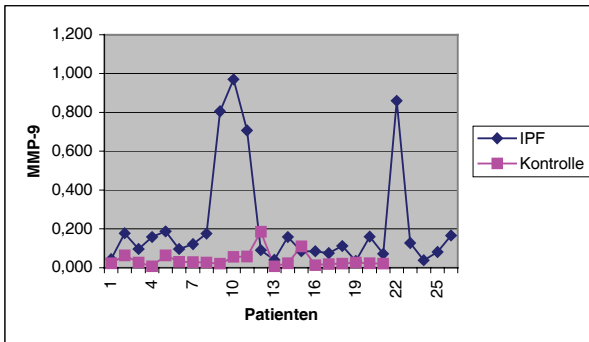


Abb.21 MMP-9 Ergebnisse der Fibrose- und Kontrollgruppe

TIMP-1

Wie wir beweisen konnten, hängt der Gehalt an MMP-9 in der Lunge auch von der Konzentration an TIMP-1, dem spezifischen Inhibitor dieser Protease, ab. Deshalb bestimmten wir zusätzlich die Konzentration von TIMP-1 in BALF und das molare Verhältnis von MMP zu TIMP. Anders als in der Arbeit von Henry et al. (20), bei denen der spezifische Inhibitor in der IPF- und Sarkoidose- Gruppe 3 nicht signifikant erhöht war, waren TIMP-1 Spiegel in unserer Fibrose- und Sarkoidose 2/3- Gruppe signifikant erhöht, sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe, als auch zur Sarkoidose 1. Die höchsten Durchschnittskonzentrationen an TIMP-1 fanden sie in der Lungenfibrosegruppe, was auch unsere Untersuchungen ergaben. Das lässt vermuten, dass auch der spezifische Inhibitor von MMP-9 an dem Krankheitsprozess von Sarkoidose und idiopathischer Lungenfibrose beteiligt sein könnte.

Genauso wenig wie man sich in der Literatur über das Verhältnis von Protease zu Inhibitor einig ist, ist man sich auch nicht über die Bedeutung beider Zytokine im Klaren. So könnte TIMP-1 nicht nur Inhibitor sein, sondern auf anderem Wege das Remodeling der Lunge begünstigen. Wie Ramos et al. (35) vermuten, könnte ungebundenes TIMP das Überleben von Fibroblasten begünstigen und damit eine profibrogene Wirkung besitzen.

Zwischen dem Stadium 1 der Sarkoidose und der Kontrollgruppe konnten wir keine signifikanten Unterschiede feststellen, denn die Konzentrationen waren fast identisch. Tatsächlich erwarteten wir einen niedrigeren Gehalt an TIMP-1 in der Kontrollgruppe. Wie aber im Methodenteil beschrieben wurde, besteht die Kontrollgruppe nicht aus gesunden Probanden, sondern aus Personen mit Symptomen einer Lungenerkrankung. Aus diesem Grund könnte der TIMP-1-Spiegel erhöht sein. In der immunhistochemischen Untersuchung normaler Lungen konnte von Selman et al. (39) keine Färbung des Inhibitors beobachtet werden. Die Interpretation der Rolle von TIMP bleibt schwierig. Henry et al. verzeichneten sogar eine signifikante Reduktion an TIMP-1 in BALF von

Patienten im Stadium 1 und 2 der Sarkoidose, verglichen mit Kontrollen. Bedenkt man, dass die Wahrscheinlichkeit der spontanen Remission im Röntgentyp 1 der Sarkoidose am größten ist, so sollte die Rolle des Inhibitors in folgenden Arbeiten weiter untersucht werden, um sich dessen Bedeutung in der Pathogenese klarer zu werden.

Molares Verhältnis MMP-9/TIMP-1

Ein Überschuss an TIMP-1 zu MMP-9 war in der BALF aller Patientengruppen zu verzeichnen. Bei der Berechnung des molaren Verhältnisses MMP-9/TIMP-1 (Ratio) war es im Gruppenvergleich bei Fibrosepatienten signifikant höher als bei Kontrollpersonen (siehe Abb.10). Wir schlussfolgern aus unseren Beobachtungen, dass eine erhöhte MMP-9/TIMP-1 Ratio im Krankheitsgeschehen der idiopathischen Lungenfibrose beteiligt ist. Inwieweit sie reflektorisch mit dem Ausmaß der Krankheit ansteigt, oder ursächlich für die Krankheitsentstehung ist, muss in weiteren Arbeiten untersucht werden. Das fehlende Ansteigen innerhalb der Sarkoidose- Gruppe 2/3 verglichen zur Sarkoidose- Gruppe 1 ist schwierig zu interpretieren.

Eine Ursache dafür könnte die schwache Korrelation von MMP-9 zu TIMP-1 innerhalb unserer fortgeschrittenen Sarkoidosegruppe sein. Während in allen übrigen Patientengruppen beide Enzyme signifikant mit einem Koeffizienten von mindestens 0,5 zueinander korrelierten, ist dieser mit 0,39 in Sarkoidose 2/3 nicht signifikant. Diese Gruppe weist jedoch auch die kleinste Fallzahl auf, so dass sich Messfehler besonders stark auf das Endergebnis auswirken.

Es sollten sich daher Untersuchungen an einem größeren Kollektiv anschließen, um mögliche Messfehler gering zu halten.

Am geringsten war die molare Ratio bei Kontrollpersonen. Zusammenfassend kann man sagen, dass in der Diagnosegruppe mit der schlechtesten Prognose (IPF) die Balance zwischen Protease und deren Inhibitor am stärksten

zugunsten von MMP-9 verschoben ist. Deshalb nehmen wir an, dass weniger TIMP-1, sondern vielmehr MMP-9 einen profibrogenen Effekt besitzt.

Ein im Vergleich zu gesunden Patienten erhöhtes MMP-9 : TIMP-1 Verhältnis in der BALF fand auch Henry et al., im Stadium 3 der Sarkoidose war es sogar signifikant erhöht. Dennoch verzeichneten sie das höchste Verhältnis in der Fibrosegruppe, es war allerdings wegen des hohen Standardfehlers nicht signifikant.

In der Literatur gibt es keine weiteren Studien, die das molare Verhältnis von MMP-9 : TIMP-1 in der BALF von Patienten mit Sarkoidose oder Lungenfibrose untersuchten. Viele Arbeiten beschäftigten sich mit immunhistochemischen Fragen. Gonzales et al. (17) konnten in den pulmonalen und kardialen Granulomen von Patienten mit Sarkoidose nur eine geringe TIMP-1- Färbung mittels immunhistochemischer Analyse beobachten, wobei MMP-9 in diesen stark exprimiert wurde. Die kardialen Granulome stammten von Patienten im fortgeschrittenem Stadium und die pulmonalen Granulome von Patienten in einem frühen Stadium der Sarkoidose. Sie unterschieden sich kaum in dem Vorhandensein beider Zytokine. Gonzales et al. vertreten daraufhin die Ansicht, dass die Balance bei Sarkoidose zugunsten von MMP-9 verschoben ist.

4.2 Zusammenhang zu BALF-Parametern

MMP-9 korreliert in jeder unserer Diagnosegruppen positiv mit dem Neutrophilengehalt in der BALF; im Durchschnitt mit $r_s = 0,64$. Diesen Zusammenhang beschrieben auch Suga et al. (41), die unter IPF- Erkrankten eine signifikante, positive Korrelation der MMP-9- Aktivität mit dem prozentualen Neutrophilengehalt in der Lavage fanden ($r_s = 0,53$ vs. $0,47$ in unserer Arbeit). Die höhere Korrelation kann daher rühren, dass Suga et al. mittels Zymographie die tatsächliche MMP-9- Aktivität bestimmten und der Gehalt an Neutrophilen in der Lavage der Patienten unterschiedlich war. In der

von ihnen durchgeführten immunhistochemischen Analyse der Lungen der an IPF erkrankten Personen zeigte sich, dass MMP-9 intensiv von Neutrophilen exprimiert wird. Auch Selman et al. (39) fanden mittels Immunhistochemie in fast allen Präparaten mit IPF die stärkste MMP-9-Färbung in intravaskulären und interstitiellen Neutrophilen. Da wir in unserer Arbeit keine Färbung durchführten, d.h. BALF- Zellen nicht auf MMP-9 angefärbt haben, kann die Frage nach der Herkunft dieser Protease nicht ausreichend von uns beantwortet werden. Wir können nur vermuten, dass Neutrophile an der Produktion beteiligt sind. Um alleinige Quelle für MMP-9 zu sein, ist die Korrelation jedoch zu gering.

Besonders die von uns gefundene Korrelation zum Lymphozytengehalt in der BALF von IPF- und Kontrollgruppe lässt vermuten, dass MMP-9 in diesen Gruppen auch von Lymphozyten stammt. Weeks et al. (46) konnten zeigen, dass Lymphozyten unter bestimmten Umständen MMP-9 synthetisieren. *In vitro* untersuchten Leppert und Mitarbeiter (29) die Migration von T-Lymphozyten durch ein Basalmembranäquivalent. Dabei exprimierten T-Zellen MMP-9. Dass Lymphozyten MMP-9 abhängig von ihrem Aktivierungsgrad sezernieren, der durch Zytokine oder chemotaktische Faktoren verändert wird, fanden andere Forscher (47,24). Den Zusammenhang zur Anzahl der Lymphozyten in BALF konnten Suga et al. (41) in ihrer Studie nicht nachweisen. In ihrer durchgeführten Immunhistochemie zeigte sich keine MMP-9 Färbung in Lymphozyten, was auch Selman (39) berichtet.

In vielen immunhistochemischen Analysen wurde beobachtet, dass Makrophagen MMP-9 produzieren können (41,39). Laut Lemjabbar sind Alveolarmakrophagen die Hauptakteure im Entzündungsgeschehen der IPF und können spontan profibrotische Zytokine freisetzen (28). Dazu gehören neben MMP-9 auch PDGF, TGF- β und chemotaktische Faktoren, die wiederum Neutrophile rekrutieren. Auch in der Pathogenese der Sarkoidose spielen die Alveolarmakrophagen eine zentrale Rolle (8). Durch ihre Fähigkeit, das auslösende Agens den Lymphozyten zu präsentieren, sowie Zytokine zu produzieren und zu sezernieren, kommt ihnen eine wichtige Funktion zu. Der

Alveolarmakrophagenabhängige- Fibroblast- Growth- Factor aktiviert pulmonale Fibroblasten und Fibronectin, die wiederum für die Lungenfibrose mitverantwortlich sind.

Interessanterweise korrelieren die MMP-9 Konzentrationen unserer Patienten signifikant negativ mit dem prozentualen Alveolarmakrophagengehalt. Die Kontrollgruppe hatte in der Zellanalyse den durchschnittlich höchsten Makrophagengehalt und erreichte auch die strengste Korrelation zu MMP-9. Je mehr Alveolarmakrophagen in der BALF vorkommen, desto geringer sind die Spiegel an profibrotischem MMP. In diesem Fall würde den Makrophagen ein protektiver Effekt zukommen, verdeutlicht am Kontrollkollektiv.

Wenn man von der Korrelationsanalyse auf die Produktionsquelle des Zytokins schließen könnte, dann würde MMP-9 in unserer Studie vermutlich nicht von Makrophagen stammen. Vielmehr wären es neben Neutrophilen auch Zellen, welche nicht von der BALF- Analyse erfasst werden. So berichtete man über MMP-9 positive subepitheliale Myofibroblasten (19,14,39) und Alveolarepithelzellen (39) in IPF- Präparaten, über MMP-9 positive multinukleäre Riesenzellen und Epitheloidzellen (17) in Sarkoidosegranulomen. Diese und weitere Zellarten könnten für die Produktion der Matrix Metalloproteinasen mit verantwortlich sein.

Die von uns gefundene Korrelation zwischen der MMP-9 Konzentration und dem Gesamteiweiß in der BALF von Lungenfibrosepatienten kann auf den möglichen Zusammenhang mit einer bestehenden Blut- Lungen-Schrankenstörung hinweisen, wie sie Agostini (1) aufgrund einer massiven Rekrutierung von polymorphkernigen Neutrophilen beschreibt. Durch den Übertritt von Zytokinen von der Blut- auf die Alveolarseite könnten höhere Konzentrationen bei Fibrosepatienten zu messen sein. In der Sarkoidose- und Kontrollgruppe ermittelten wir keinen Zusammenhang. Es scheint, dass die Zytokinproduktion hier lokal stattfindet und keine Schrankenstörung vorliegt.

Der Fund, dass TIMP-1 nicht mit inflammatorischen Zellen aus der BALF-Analyse korreliert, steht in gutem Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien. Diese zeigten, dass TIMP-1 vor allem in interstitiellen Zellen vorkommt (39). Eine Ausnahme stellte die idiopathische Lungenfibrose dar, in der wir eine positive Abhängigkeit der TIMP-1 Konzentrationen von dem Lymphozytengehalt und einen negativen Zusammenhang zum Alveolarmakrophagengehalt fanden. Daraus könnte man schlussfolgern, dass in den IPF- Lungen TIMP-1 wahrscheinlich nicht von Alveolarmakrophagen, sondern zu einem Teil von Lymphozyten stammt und auch von Zellen, die nicht mittels BALF- Analyse erfasst werden (Fibroblasten, Epithelzellen). Selman et al. zeigten in der immunhistochemischen Analyse von Lungenpräparaten mit IPF, dass TIMP-1 in Arealen dichter Narben, vor allem in interstitiellen Makrophagen, und auch in Fibroblasten/Myofibroblasten vorkommt (39). Auch in der immunhistochemischen Analyse von Sarkoidosegranulomen berichteten Gonzales et al. über positive TIMP-1 Färbung in Riesenzellen, Epitheloid- und Endothelzellen, sowie in Fibroblasten (17). Diese Erkenntnisse unterstützen unsere Vermutung.

Zum Proteingehalt der BALF korrelierte TIMP in der IPF-, Sarkoidose 2/3 -, und Kontrollgruppe. Diese Interpretation als Ausdruck einer gestörten Blut-Lungenschranke ist fraglich, da der Korrelationskoeffizient innerhalb der Sarkoidose 2/3 -, und Kontrollgruppe relativ niedrig ist ($r=0,5$). Die höhere Korrelation bei Lungenfibrosepatienten ($r=0,7$) und die Feststellung, dass auch MMP mit dem Gesamteiweißgehalt der BALF korreliert, bestätigt unsere Annahme, dass bei der idiopathischen Lungenfibrose eine Blut- Lungen-Schrankenstörung im Sinne Agostinis (1) vorliegen kann.

4.3 Zusammenhang zu Lungenfunktionswerten

Erstmals wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Lungenfunktion und MMP-9 bzw. TIMP-1 in der Lavageflüssigkeit von Sarkoidose- und Lungenfibrosepatienten besteht. Relevant schien uns die Frage, ob die Titer mit den klinischen Parametern Vitalkapazität, Totale Lungenkapazität, Diffusionskoeffizient für CO und dem Sauerstoffpartialdruck einhergehen.

Innerhalb der verschiedenen Diagnosegruppen ließen sich keine einheitlichen und aussagekräftigen Zusammenhänge zwischen *MMP-9 oder TIMP-1* und der Lungenfunktion des jeweiligen Patienten ermitteln (bei Diagnosestellung, ein Jahr und zwei Jahre später). Eine Studie von Beeh et al. (7), die den MMP-9 Gehalt aus dem Sputum von IPF- Patienten (n=15) in Beziehung zur Vitalkapazität setzte, konnte ebenfalls keine aussagekräftige Korrelation aufzeigen ($r_s = -0,3$, n.s.).

Die in der Kontrollgruppe gefundene positive Korrelation zwischen MMP-9 und DCO sowie die negative zwischen TIMP-1 und DCO bei Sarkoidose- Patienten im Stadium 2/3 lassen keine weiteren Rückschlüsse zu.

In der *Gesamtanalyse* stellten wir jedoch fest, dass MMP-9 und TIMP-1 Spiegel signifikant negativ mit Lungenfunktionsparametern bei Diagnosestellung korrelieren, wenn auch nicht aussagekräftig, d.h. $r < 0,5$ (Tab.10, Tab.15). Das bedeutet, dass eine hohe MMP-9 Aktivität bei Patienten mit einer schlechteren Lungenfunktion gemessen wurden.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass ein Zusammenhang nur in einer hinreichend großen Untersuchungsgruppe zu erkennen ist und die Fallzahlen der einzelnen Diagnosegruppen zu gering sind. Studien mit größeren Fallzahlen müssten sich anschließen, um unsere Hypothese zu bestätigen. Demnach könnten hohe MMP- bzw. TIMP Konzentrationen in der Lavage mit reduzierten Lungenfunktionsparametern einhergehen.

Da eine Funktion der Metalloproteinase-9 die Spaltung von Basalmembranen ist, kann eine gesteigerte Aktivität dieser Protease in Alveolardestruktion resultieren, die sich wiederum in einer Reduktion der Lungenfunktionsparameter ausdrückt. TIMP-1 Konzentrationen könnten reflektorisch mit einer MMP-9 Zunahme ansteigen und Ausdruck einer gesteigerten Destruktion von Lungengewebe sein.

Suga (41) und Choi (10) untersuchten mithilfe der Zymographie MMP-9-Konzentrationen in progressiver IPF. Suga (41) teilte in seiner Studie IPF-Patienten in eine langsam progressive (n=19) und eine schnell progressive (n=7) Gruppe ein. Letztere schloss die Patienten ein, die innerhalb von drei Jahren nach Diagnosestellung starben. Die Lungenfunktion wurde nur zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfasst und war deutlich schlechter, als in der langsam progressiven Gruppe. Er fand eine wesentlich höhere MMP-9 Aktivität in der schnell progressiven Gruppe. Dies wiederum steht in Einklang mit unserem Ergebnis, dass eine hohe MMP-9 Aktivität bei Patienten mit einer schlechteren Lungenfunktion gemessen wurde.

Unsere Berechnungen eines Zusammenhangs zwischen *molarer Ratio* und Lungenfunktion in der IPF- Gruppe ergaben kein einheitliches Ergebnis. Innerhalb der *übrigen Diagnosegruppen* korrelierte die molare Ratio nicht aussagekräftig mit Lungenfunktionsparametern. Auch in der *Gesamtanalyse* aller Patienten wurde dieser Zusammenhang nicht deutlich.

Es ergab sich aber noch folgender Fund:

Die Vitalkapazität von Patienten im *Follow-Up* - 7 mit Sarkoidose im Stadium 2/3 und 12 mit IPF- korrelierte signifikant negativ mit dem molaren Verhältnis von MMP zu TIMP ($r_s=-0,53$) zu Beginn der Erkrankung. Das könnte bedeuten, dass Patienten mit einer höheren molaren Ratio eine signifikant schlechtere Vitalkapazität nach zwei Jahren aufweisen, als Patienten mit einer niedrigen Ratio (siehe Abb.20/ Ergebnisse).

Trotz des Überschusses an Inhibitoren, würde eine verhältnismäßige Zunahme von profibrotischem MMP zu einer Verschlechterung der Lungenfunktion

führen. Könnte demnach die molare Ratio dann als prognostischer Marker für den Krankheitsverlauf dienen?

Da wir nur die Verlaufsdaten von 19 Patienten besaßen, ist es möglich, dass die Korrelationsfaktoren in einer größeren Fallgruppe bessere Werte annehmen. Der Zusammenhang müsste sich dann auch für die einzelnen Diagnosegruppen bestätigen, denn wir haben Sarkoidose- und Lungenfibrosepatienten aufgrund der geringen Fallzahl zusammengefasst. Eine weitere Fehlermöglichkeit ergibt sich aus der Therapie innerhalb der zwei Jahre nach Diagnosestellung. Zwar wurden Erkrankte mit einem ähnlichen Behandlungsschema therapiert (siehe Methoden), dennoch gab es interindividuelle Unterschiede in der Therapie, die sich auf die Lungenfunktion auswirken konnten. In erneuten Untersuchungen wäre es denkbar, dass sich die Ergebnisse dann wegen anderer Medikation nicht wiederholen.

4.4 Ausblick

MMP-9 und TIMP-1 wirken auf ganz unterschiedliche Zellsysteme und werden von zahlreichen Zellen aufgrund unterschiedlicher Reize synthetisiert. Sie dienen der Zell- Zell Kommunikation, spalten verschiedenste Substrate und modulieren die Aktivität anderer Proteasen und Zytokine. Über die Bedeutung für die Fibrogenese und vor allem für den klinischen Alltag weiß man bislang nur wenig. Da MMP-9 bzw. TIMP-1 Konzentrationen aber vermutlich nur Moment-Konzentrationen sind und sich im Krankheitsgeschehen ändern, sollten Verlaufskontrollen bei ein und dem selben Patienten durchgeführt werden. Erst dann kann man Rückschlüsse auf die mögliche Beteiligung und Rolle der untersuchten Zytokine in diesem dynamischen Krankheitsprozess ziehen. Problematisch bleibt der Einfluss von Störfaktoren, die soweit wie möglich ausgeschaltet werden müssen, um die Messungen untereinander vergleichbar zu machen. In Zukunft müssen weitere Untersuchungen an größeren

Patientengruppen durchgeführt werden, um herauszufinden, ob sich die gemessenen Enzyme aus der Lavage als Marker für den Verlauf der Krankheit eignen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden Konzentrationen von MMP-9, TIMP-1 und deren molares Verhältnis in der Lavageflüssigkeit von Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose (IPF), pulmonaler Sarkoidose und Kontrollpersonen mittels ELISA gemessen und miteinander verglichen. Ein möglicher Zusammenhang zu Lavageparametern sollte geklärt werden. Ziel unserer Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit die Bestimmung dieser Enzyme mit dem Ausmaß und dem Verlauf der Erkrankungen korreliert. Dazu wurden Enzymkonzentrationen von allen Patienten mit Lungenfunktionsparametern zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, ein und zwei Jahre später korreliert.

MMP-9 und *TIMP-1* Werte waren in der IPF- Gruppe am höchsten, gefolgt von Sarkoidose im fortgeschrittenen Stadium und Sarkoidose im Anfangsstadium. Die niedrigste Konzentration an MMP-9 lag in der Kontrollgruppe vor, ebenso die von TIMP-1. Bis auf TIMP- Spiegel der Sarkoidose- Gruppe 1 waren alle Werte signifikant höher, als in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede zwischen IPF- und Sarkoidosegruppen erreichten kein Signifikanzniveau. Eine Beteiligung an der Fibrogenese konnte dementsprechend sowohl für MMP-9, als auch für TIMP-1 bestätigt werden. Weiter vermuten wir, dass die Konzentrationen mit der Stärke des fibrotischen Umbaus in der Lunge ansteigen.

Die *molare Ratio* von Fibrosepatienten war signifikant höher als bei Kontrollen. Eine Imbalance zwischen beiden Enzymen zugunsten von MMP scheint in der Pathogenese der IPF eine wichtige Rolle zu spielen.

MMP-9 korrelierte in der Gesamtanalyse signifikant sowohl zur prozentualen Anzahl der polymorphkernigen Neutrophilen, als auch negativ zur prozentualen Anzahl der Makrophagen. *TIMP-1* korrelierte mit dem Proteingehalt, innerhalb der IPF- Gruppe mit Lymphozyten und negativ mit Makrophagen. Die *molare Ratio* korrelierte negativ mit Alveolarmakrophagen bei IPF- und Sarkoidosepatienten. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass vermutlich Neutrophile und Lymphozyten an der Produktion der Enzyme beteiligt sind. Eine weitere Quelle scheinen Zellen zu sein, die nicht mit der BALF erfasst wurden, wie zum Beispiel Fibroblasten und Epithelzellen.

Es stellte sich keine Beziehung zwischen *MMP-9* bzw. *TIMP-1* und dem klinischen Ausmaß der Erkrankung, gemessen an den Lungenfunktionswerten, heraus.

Die *molare Ratio* von Patienten mit Sarkoidose im fortgeschrittenem Stadium und denen mit IPF korrelierte jedoch signifikant negativ mit deren Vitalkapazität nach zwei Jahren. Aufgrund dieser Ergebnisse kamen wir zu der Schlussfolgerung, dass eine höhere Ratio mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion im Verlauf einhergehen könnte. Wenn dies in weiteren Studien bestätigt werden könnte, hätte die Bestimmung von MMP-9/TIMP-1 eine prognostische Bedeutung im Klinikalltag.

VI. Literaturverzeichnis

1. Agostini C, Semenzato G:
Immune responses in the lung: basic principles
Lung 1990; Suppl: 1001-1012
2. American Thoracic Society:
Statement on Sarcoidosis
Am J Respir Crit Care Med 1999;160:736-755
3. American Thoracic Society:
Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment International
Consensus Statement
Am J Respir Crit Care Med 2000;161:646-664
4. American Thoracic Society:
American Thoracic Society/ European Respiratory Society International
Multidisciplinary Consensus Classification Of The Idiopathic Interstitial
Pneumonias
Am J Respir Crit Care Med.2002;165:277-304
5. Atkinson JJ and Senior RM:
Translational Review: Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling
Am J Respir Cell Mol Biol 2003;28:12-24
6. Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura T, Fukuda Y, Crystal RG:
Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders
Am J Pathol 1986;122:443-461

7. Beeh, K.M., Beier, J., Kornmann O., Buhl R.:
Sputum matrix metalloproteinase- 9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and their molar ratio in patients with chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis and healthy subjects
Respiratory Medicine 2003, 97: 634-639

8. Bois du RM :
The alveolar macrophage in sarcoidosis
Sarcoidosis 1990; 7:15-18

9. Bresnitz EA.,Strom BL. :
Epidemiology of sarcoidosis
Epidemiol Rev 1983;5:124-156

10. Choi K.H., Lee H.B., Jeong M.Y., Rhee Y.K., Chung M.J., Kwak Y.G. and Lee Y.C. :
The role of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in cryptogenic organizing pneumonia.
Chest 2002; 121: 1478-1485

11. Culver D.A., Thomassen M.J., Kavuru M.S.:
Pulmonary sarcoidosis: New genetic clues and ongoing treatment controversies
Cleveland Clinic J Med 2004;71:88-106

12. Engsig M.T., Chen Q.T., Vu T.H., Pedersen A.C., Therkidsen B., Lund L.R., Henriksen K., Lenhard T., Foged N.T., Werb Z., and Delaisse J.M.:
Matrix metalloproteinase- 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones
J Cell Biol 2000; 151: 879-890

13. Fukuda Y., Basset F., Ferrans V.J., and Yamanaka N:
Significance of early intraalveolar fibrotic lesions and integrin expression
in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis
Hum Pathol 1995; 26: 53-61

14. Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N:
Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue
inhibitor of metalloproteinases-2 in interstitial lung diseases
Lab Invest 1998;78:687-698

15. Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y:
The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural
remodeling in patients with diffuse alveolar damage
Am J Pathol 1987;126:171-182

16. Goldberg G.I., Strongin A., Collier I.E., Genrich L.T., and Marmer B.L:
Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of
metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with
interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin
J Biol Chem 1992; 267: 4583-4591

17. Gonzalez AA, Segura AM, Horiba K, Qian S, Yu ZX, Stetler-Stevenson
W, Willerson JT, McAllister HA, and Ferrans VJ:
Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lesions of
cardiac and pulmonary sarcoidosis: An immunohistochemical study
Hum Pathology 2002;33:1158-1164

18. Gushima Y, Ichikado K, Suga M, Okamoto T, Iyonaga K, Sato K,
Miyakawa H, Ando M:
Expression of matrix metalloproteinases in pigs with hyperoxia-induced
acute lung injury

Eur Respir J 2001;18:827-837

19. Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD:
Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis
Am J Pathol 1996;149:1241-1256
20. Henry MT, McMahon K, Mackarel AJ, Prikk K, Sorsa T, Maisi P, Sepper R, FitzGerald MX, O'Connor CM:
Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in sarcoidosis and IPF
Eur Respir J 2002;20:1220-1227
21. Hunnighake GW, and Crystal RG:
Pulmonary sarcoidosis: a disorder mediated by excess helper T-lymphocyte activity at sites of disease activity
N Engl J Med 1981;305:429-434
22. James G.D.:
Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders
Marcel Dekker, New York 1994
23. James DG, Carstairs LS, Trowell J, Sharma OP:
Treatment of sarcoidosis: report of a controlled therapeutic trial
Lancet 1967; 2: 625-628
24. Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC:

Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production
by human peripheral blood lymphocytes
J Immunol 1997;158:2327-2333

25. Johns CJ., Schonfeld SA., Scott PP., et al:
Longitudinal study of chronic sarcoidosis with low-dose maintenance
corticosteroids
Ann NY Acad Sci 1986;465:702-712

26. Johnston ID., Prescott RJ., Chalmers JC., Rudd RM.:
British Thoracic Society study of cryptogenic fibrosing alveolitis: current
presentation and initial management. Fibrosing Alveolitis Subcommittee
of the Research Committee of the British Thoracic Society
Thorax 1997;52:38-44

27. Katzenstein AL A., Myers JL:
State of the Art: Idiopathic Pulmonary Fibrosis
Clinical relevance of pathologic classification
Am J Respir Crit Care Med 1998,157:1301-1315

28. Lemjabbar H, Gosset P, Lechapt-Zalcman E, Franco-Montoya
ML, Wallaert B, Harf A, and Lafuma C :
Overexpression of alveolar macrophage gelatinase B (MMP-9) in
patients with idiopathic pulmonary fibrosis
Am J Respir Cell Mol Biol 1999;20:903-913

29. Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL:
T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro
J Immunol 1995;154:4379-4389

30. Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, and Werb Z:
The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo
Cell 2000,102:647-655
31. Lynch JP., Kazerooni EA., Gay SE.:
Pulmonary sarcoidosis
Clin Chest Med 1997;18:755-785
32. Moller DR:
Cells and cytokines involved in the pathogenesis of sarcoidosis
Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis 1999;16:24-31
33. Nagase H, Woessner J:
Matrix metalloproteinases
J Biol Chem 1999;274:21491-91494
34. Peppin G.J., and Weiss S.J.:
Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils
Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83: 4322-4326
35. Ramos C, Montano M, Garcia-Alvarez J, Ruiz V., Uhal B.D., Selman M., and Pardo A.:
Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression
Am J Respir Cell Mol Biol 2001, 24: 591-598

36. Rosen Y, Athanassiades TJ, Moon S, Lyons HA:
Nongranulomatous interstitial pneumonitis in sarcoidosis: relationship to the development of epithelioid granulomas
Chest 1978; 74: 122-125
37. Schwingshackl A., Duszyk M., Brown N., and Moqbel R.:
Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha
J. Allergy Clin. Immunol. 1999; 104: 983-989
38. Selman M., King TE., Pardo A.:
Idiopathic Pulmonary Fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy
Ann Intern Med 2001;134:136-151
39. Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, and Pardo A:
TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis.
A prevailing nondegradative lung microenvironment?
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000;279:L562-L574
40. Semenzato G, Pezzutto A, Chilosi M, and Pizzolo G:
Redistribution of T lymphocytes in the lymph nodes of patients with sarcoidosis
N Eng J Med 1982;306:48-49
41. Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M:
Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias
Am J Respir Crit Care Med 2000;162:1949-1956

42. Steen van den P.E., Proost P, Wuyts A., van Damme J., Opdenakker G.:
Neutrophil gelatinases B potentiates interleukine-8 tenfold by
aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and
GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact
Blood 2000; 96: 2673-2681

43. Turner-Warwick M, McAllister W, Lawrence R, Britten A, Haslam PL:
Corticosteroid treatment in pulmonary sarcoidosis: do serial lavage
lymphocyte counts, serum angiotensin converting enzyme
measurements, and gallium-67 scans help management?
Thorax 1986; 41: 903-913

44. Turner-Warwick M., Burrows B., Johnson A.:
Cryptogenic fibrosing alveolitis: clinical features and their influence on
survival
Thorax 1980;35:171-180

45. Vu T.H., and Z. Werb.1998:
Gelatinases B: structure, regulation, and function.
Matrix Metalloproteinases. W.C. Parks and R.P. Mecham. editors.
Academic Press, San Diego.115-148

46. Weeks BS, Schnaper HW, Handy M, Holloway E, and Kleinman HK:
Human T lymphocytes synthesize the 92 kDa type IV collagenase
(gelatinase B)
J Cell Physiol 1993;157:644-649

47. Xia MD, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM,
Goetzl EJ:
Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T
cell migration through a model basement membrane

J Immunol 1996,156:160-167

48. Yao P.M., Maitre B., Delacourt C., Buhler J.M., Harf A., and Lafuma C.:
Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in
response to IL-1beta and TNF-alpha
Am J Physiol 1997; 273: L866-L874

49. Yu Q, and Stamenkovic I:
Cell Surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates
TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis
Genes Dev 2000;14:163-176

50. Zhu Y.K., Liu X.D., Skold C.M., Umino T, Wang H.J., Spurzem J.R.,
Kohayama T., Ertl R.F., and Rennard S.I.
Synergistic neutrophil elastase-cytokine interaction degrades collagen in
three- dimensional culture
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001; 281:L868-L878

51. Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini Z, Ben- Dor A, Lollini L,
Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, and
Heller R:
Gene expression analyses reveals matrilysin as a key regulator of
pulmonary fibrosis in humans
Proc Natl Acad Sci.USA 2002;99:6292-6297

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Schmidt für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates.

Herrn Professor Dr. Hebestreit danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Priv.-Doz. M. Kolb danke ich für die kompetente Betreuung und stetige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit trotz großer Entfernung.

Bei Frau M. Wechner bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit und Hilfe bei der Durchführung der Messungen.

Zuletzt gilt mein Dank meinem lieben Ehemann und meiner Familie, welche mich immer wieder zur Beendigung der Arbeit ermutigt haben.

Lebenslauf

Name: Julia Meyer, geb. Blechschmidt

Geburtsdatum/- ort: 16. April 1980, Zwickau

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1986- 1993 Grundschule Friedrich- Engels, Zwickau

1993- 1994 Käthe- Kollwitz- Gymnasium, Zwickau

1994- 1998 Gerhart- Hauptmann- Gymnasium, Zwickau

07/1998 Abiturprüfung mit der Gesamtnote 1,7

Hochschulbildung

05/1999- 04/2005 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

04/2005- 01/2006 Studium der Humanmedizin an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Mai 2001 Ärztliche Vorprüfung

Mai 2002 1. Staatsexamen

April 2004 2. Staatsexamen

Dezember 2005 3. Staatsexamen,
Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote „gut“

Praktisches Jahr

10/2004- 02/2005 Innere Medizin, Bürgerspital Solothurn, Schweiz

02/2005- 06/2005 Pädiatrie, Helios-Klinikum Erfurt

06/2005- 09/2005 Chirurgie, Helios-Klinikum Erfurt

Beruf

seit 02/2006 Assistenzärztin in der 2. Medizinischen Klinik, Prof.
Dr. Schmidt, Helios-Klinikum Erfurt

22.12.2008 Geburt meiner Tochter Jennifer

Erfurt, Juli 2009

