

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

**Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 und Platelet Derived  
Growth Factor im Serum und in bronchoalveolärer  
Lavage bei idiopathischen Lungenfibrosen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Eva Vogel  
aus Rottendorf

Würzburg, Juli 2003

Referent: Prof. Dr. med. M. Schmidt  
Korreferent: Prof. Dr. med. G. Ertl  
Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

Die Promovendin ist Ärztin im Praktikum.

*Damit das Mögliche entsteht,  
muss immer wieder das Unmögliche versucht werden.*

Herrmann Hesse

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. METHODIK</b>	<b>4</b>
2.1. Patientengruppe	4
2.2. Materialgewinnung	4
2.3. Labormethoden	6
2.3.1. Vorbereitung des Probenmaterials für die Testung im ELISA	6
2.3.2. Human PDGF-AB Immunoassay	7
2.3.3. Human TGF $\beta$ 1 Immunoassay	8
2.4. Evaluation der Krankenblätter	9
2.5. Statistische Auswertung	10
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>11</b>
3.1. Einteilung der Patienten in verschiedene Diagnosegruppen	11
3.2. Konzentrationen der untersuchten Zytokine im Serum	14
3.2.1. Serum-Konzentration von PDGF-AB	14
3.2.2. Serum-Konzentration von TGF $\beta$ 1	15
3.3. Konzentrationen der bestimmten Zytokine in der BALF	16
3.3.1. BALF-Konzentration von PDGF-AB	16
3.3.2. BALF-Konzentration von TGF $\beta$ 1	18
3.4. Zusammenhang der Zytokinkonzentrationen im Serum und in der BALF mit anderen Parametern bei Patienten mit IIP	19
3.5. PDGF-AB und TGF $\beta$ 1 bei Patienten mit UIP im Vergleich zu Patienten mit NSIP oder DIP	20

3.5.1. PDGF-AB in der BALF bei Patienten mit UIP und NSIP/DIP	21
3.5.2. TGF $\beta$ 1 in der BALF bei Patienten mit UIP und NSIP/DIP	22
3.5.3. Beziehung zwischen TGF $\beta$ 1 in der BALF und anderen Parametern der Diagnosegruppen UIP und NSIP/DIP	23
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>24</b>
4.1. Problematik der BAL	24
4.2. Klassifikation und Klinik der IIP	25
4.3. Pathogenese der Lungenfibrose	30
4.4. Das Zytokin PDGF	33
4.4.1. Allgemeine Aspekte des Zytokins	33
4.4.2. PDGF und pulmonale Fibrose	33
4.5. Das Zytokin TGF $\beta$ 1	37
4.5.1. Allgemeine Aspekte des Zytokins	37
4.5.2. TGF $\beta$ 1 und pulmonale Fibrose	38
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>45</b>

## 1. EINLEITUNG

Die Gruppe der idiopathischen interstitiellen Pneumonien (IIP) ordnet man den Interstitiellen Lungenerkrankungen (ILD) zu. In dieser Übergruppe wird eine Vielzahl unterschiedlicher Lungenerkrankungen zusammengefasst, bei denen pathophysiologische Veränderungen des Interstitiums zu einer Lungenfibrose führen können. Bei den IIP löst ein noch unbekannter Stimulus eine interstitielle Entzündungsreaktion aus. Im Verlauf der anschließenden Fibrogenese kommt es zu Veränderungen der Gewebearchitektur und zu einer Zunahme des interstitiellen Bindegewebes. Im Endstadium zeigt sich ein fibrotischer Umbau und Destruktion des Lungengerüsts.

Die IIP bilden keine homogene Entität, sondern es existieren sieben verschiedene Subtypen, die sich z. B. durch ihr histopathologisches Bild, durch den klinischen Verlauf und durch ihre Prognose voneinander abgrenzen lassen. Es wird heute zwischen Usual Interstitial Pneumonia (UIP), Nonspecific Interstitial Pneumonia (NSIP), Cryptogenic Organizing Pneumonia (COP), Acute Interstitial Pneumonia (AIP), Respiratory Bronchiolitis - Associated Interstitial Lung Disease (RB-ILD), Desquamative Interstitial Pneumonia (DIP) und Lymphoid Interstitial Pneumonia (LIP) unterschieden (2). Die Prävalenz der IIP beträgt 6-15 /100.000 (13). Der Anteil von UIP wird auf über 60 % geschätzt (26).

Die Patienten erkranken meist schleichend und aus völliger Gesundheit. Unproduktiver Husten und Dyspnoe sind die hauptsächlichen Beschwerden, wobei eine Progredienz der Symptomatik erkennbar ist. Bei der Auskultation der Lunge kann man bei mehr als 80 % der Patienten, vor allem basal, ein trockenes Knistern am Ende der Inspiration hören. Es erinnert ein wenig an das Geräusch, das beim Öffnen eines Klettverschlusses entsteht. Deshalb wird es auch velcro rales genannt (1, 2). Im weiteren Verlauf sind Zyanose, Ödeme

oder pulmonaler Hochdruck, der terminal zum Rechtsherzversagen führen kann, zusätzliche Symptome einer IIP. Generell kommt es zu keiner spezifischen extrapulmonalen Manifestation. Lediglich Gewichtsverlust, Unwohlsein oder Müdigkeit können mit der chronischen Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden (1, 2).

Die Diagnosefindung einer IIP ist ein dynamischer Prozess. Neben der Anamnese und klinischen Untersuchung kommen technische Untersuchungsverfahren zur Diagnosestellung und -Sicherung zum Einsatz. Zur Zeit gilt die Bronchoskopie neben Lungenfunktionsuntersuchungen, high-resolution computed tomography (HRCT) Scanning und histopathologischer Beurteilung von Lungengewebe, das während einer video-assistierten Thorakoskopie (VATS) gewonnen wurde, zum diagnostischen Standard (1, 2, 45).

Die Therapieoptionen, die heute zur Verfügung stehen, sind in ihrem Erfolg immer noch sehr bescheiden. Man stützt sich auf den Einsatz von Kortikosteroiden, Immunsuppressiva und antifibrotischen Substanzen als Monotherapie oder auch in Kombination. Adjuvante Maßnahmen wie z. B. die supportive Sauerstoffgabe können hilfreich sein. Als Ultima Ratio bleibt die Lungentransplantation. Aber trotz Therapie kann man Patienten mit IIP nicht heilen. Die Mortalität nach fünf Jahren wird mit 50 % angegeben. Folgende Tabelle stellt die Sterblichkeit bei IIP nach 5 Jahren anderen Erkrankungen gegenüber.

<b>Erkrankung</b>	<b>Mortalität nach 5 Jahren</b>
IIP	50%
Bronchialkarzinom	85%
Akuter Myokardinfarkt	25%
Mammakarzinom	20%
Prostatakarzinom	15%

*Tab. 1: Mortalität bei IIP und anderen Erkrankungen (modifiziert nach 36)*

Da die medikamentöse Therapie der IIP unbefriedigend ist, muss über neue Therapiemöglichkeiten nachgedacht werden. Neue Strategien können mit dem erweiterten Wissen über die Ätiologie und Pathogenese entwickelt werden. Große Hoffnungen werden in Substanzen gesteckt, die beispielweise Zytokine, Proteasen, Oxidantien oder Wachstumsfaktoren für Fibroblasten inhibieren. Man darf dabei aber nicht vergessen, dass hierbei ein Netzwerk von zahlreichen Interaktionen zwischen verschiedenen Zytokinen und anderen Mediatoren besteht.

In diesem Zusammenhang steigt zunehmend das Interesse einen effizienten, sicheren Marker zu finden, der eine frühzeitigere Diagnose zulässt oder zum Monitoring des Krankheitsverlaufs genutzt werden kann. Zum einen konzentriert man sich auf Parameter der bronchoalveolären Lavage (BAL). Aber Veränderungen der Surfactanzzusammensetzung, die Differenzierung gewonnener Zellen oder die Bestimmung von Entzündungsmediatoren brachten noch nicht den erwünschten Durchbruch (39). Zum anderen hofft man auf Serumparameter. Leider sind die Serumspiegel der meisten Mediatoren, die an der Kollagenablagerung und an der Entzündungsreaktion in der Lunge beteiligt sind, zu niedrig, um aussagekräftig zu sein. So versuchte man beispielweise über Serumkonzentrationen von Prokollagen oder Laktatdehydrogenase (LDH) Schlüsse über die Aktivität der Erkrankung zu ziehen. Jedoch konnten sich auch diese Parameter nicht durchsetzen (39).

Im Rahmen dieser Studie sollte untersucht werden, ob in der bronchoalveolären Lavagenflüssigkeit (BALF) und im Serum von Patienten mit ILD die profibrotischen Zytokine Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) und Platelet Derived Growth Factor AB (PDGF-AB) erhöht messbar sind und mit der Krankheitsaktivität korrelieren.



## **2. METHODIK**

### **2.1. Patientengruppe**

Die BALF und die Seren von 103 Patienten wurden untersucht. Von September 1996 bis Oktober 1999 unterzogen sich diese Patienten in der Endoskopieabteilung des Schwerpunktes Pneumologie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg einer Bronchoskopie und BAL. Am selben Tag wurde außerdem eine Blutprobe entnommen. In den meisten Fällen befanden sich die Patienten in stationärer Behandlung der Medizinischen Klinik. Die Indikation zur Bronchoskopie und Lavage ist aus diagnostischen Gründen gestellt worden. Neben den Ergebnissen der BAL wurde die Diagnose durch geeignete radiologische und laborchemische Methoden sowie die Beurteilung einer transbronchialen Biopsie (TBB) oder Biopsierung unter VATS ergänzt und gesichert.

### **2.2. Materialgewinnung**

Die BAL wurde während einer diagnostischen Bronchoskopie gewonnen. Am Untersuchungstag erhielt der Patient als Prämedikation Midazolam-HCl in einer Dosierung von 3 mg bis maximal 15 mg. Unmittelbar vor der Bronchoskopie wurden die Schleimhäute des Rachenraums mit Oxybuprocain-HCl anästhesiert und über eine Nasensonde wurde dem Patienten Sauerstoff angeboten. Bei Bedarf spritzte man dem Patienten subcutan 7,5 mg bis 15 mg Hydrocodon-HCl als Antitussivum.

Nach Einführen des flexiblen Bronchoskops und Lagekontrolle wurde über das Endoskop die Schleimhaut des Tracheobronchialbaumes mittels Oxybuprocain-HCl betäubt. Nun erfolgte die eigentliche Bronchoskopie mit Beurteilung der Bronchialschleimhäute. Danach wurde das Bronchoskop in den rechten Mittellappen eingeführt und in „wedge-Position“ gebracht. Der nächste Untersuchungsschritt war die BAL. Der Untersucher spülte mit jeweils 40 ml Portionen angewärmter 0,9%iger Kochsalzlösung den Bronchoalveolarraum. Anschließend wurde unter Sog der größte Teil der Spülflüssigkeit zurückgewonnen und in einem Polypropylen-Tube gesammelt. Diesen Vorgang wiederholte man vier bis fünf Mal. Auf diese Weise wurde der Bronchoalveolarraum mit 160 - 200 ml NaCl-Lösung gespült, wobei im aktuellen Patientenkollektiv ein mittlerer Return von 75 ml erreicht wurde. Nach der Lavage nahm der Untersucher eventuell noch eine TBB vor. Für die anschließenden zwei Stunden sollte der Patient nüchtern sein. Am Nachmittag wurde eine Lungenübersichtsaufnahme angefertigt, um einen Pneumothorax auszuschließen.

Die BAL wurde in dem Polypropylen-Tube auf plus 4° Celsius heruntergekühlt, um Zelladhäsionen zu vermeiden. Im nativen Zustand wurde in der Fuchs-Rosendahl-Kammer die Gesamtzellzahl der BAL ermittelt. Außerdem bestimmte man den Anteil an Epithelzellen sowie an vitalen Zellen und führte einen Hämoglobintest durch. Patienten mit einer hämorrhagischen Lavage sind nicht in das Patientenkollektiv aufgenommen worden.

Anschließend wurde das Material in konischen Polypropylen-Tubes zehn Minuten lang bei 1350 U/min und plus 4° Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in 1ml-Aliquots bei minus 80° Celsius gelagert.

Diese Aliquots waren das Ausgangsmaterial der weiteren Untersuchungen.

Am Untersuchungstag wurden bei einer Venenpunktion vom Patienten zwei Serummonovetten Blut abgenommen. Nach Zentrifugation mit 4000 U/min bei Raumtemperatur wurde das Serum abpipettiert und ebenfalls in 1ml-Aliquots bei minus 80° Celsius gelagert.

## 2.3. Labormethoden

### 2.3.1. Vorbereitung des Probenmaterials für die Testung im ELISA

In Vorversuchen mit den verwendeten Quantikine® Human TGF- $\beta$ 1 und Human PDGF-AB Immunoassays (R&D Systems, Minneapolis, USA) stellten wir fest, dass bei Testung der nativen BALF der Messbereich des ELISA's nicht erreicht wird. Deshalb war es nötig die BALF um den Faktor 10 zu konzentrieren.

Zunächst wurden die aufgetauten Proben in Dialysierschläuche (Spectra/Por®, Spectrum Laboratories INC., USA) pipettiert. In diesen Dialysier-Cellophan-Schläuchen konnte die BALF über vier Stunden bei plus 4° Celsius gegen Aqua dest. diffundieren. Nach der Hälfte der Dialysierzeit wurde das destillierte Wasser gewechselt. Dieser Arbeitsschritt war notwendig, da man durch das Konzentrieren der BALF auch das darin enthaltene Kochsalz um den Faktor 10 konzentriert. Diese hohe NaCl-Konzentration hätte möglicherweise zu Fehlreaktionen bei der Messung geführt.

Vom Dialysat wurden 5 ml abpipettiert und in ein Polypropylen-Tube gefüllt. Dieses Tube wurde mit einer perforierten Folie verschlossen und in einen Gefriertrockner zum Lyophilisieren gegeben. Die gefriergetrockneten Proben wurden bei minus 20 ° Celsius gelagert, bis eine ausreichende Anzahl vorbereiteter Proben für eine ELISA-Testreihe vorhanden war.

Am Tag der Testung erfolgte die eigentliche Konzentrierung. Die gefriergetrocknete Probe wurde nicht mehr mit 5 ml Aqua dest. gelöst, sondern nur noch mit 0,5 ml Aqua dest. - entsprechend dem Zehntel des ursprünglichen Volumens.

Diese Arbeitsschritte waren bei der Bestimmung der Serumkonzentrationen von TGF  $\beta$ 1 und PDGF-AB nicht erforderlich. Am Untersuchungstag wurden die Serumproben aufgetaut und im nativen Zustand getestet. Lediglich in einigen wenigen Fällen musste die Serumprobe um den Faktor 2 verdünnt werden, um mit den Testwerten im Messbereich des ELISA's zu liegen.

### 2.3.2. Human PDGF-AB Immunoassay

Der Immunoassay zur Bestimmung der PDGF-AB-Konzentrationen arbeitet mit der Sandwich-ELISA-Technik. Er wird zu Forschungszwecken zur quantitativen Bestimmung von PDGF-AB in Zellkulturüberständen, Serum und Plasma verwendet. Die Sensitivitätsgrenze des Tests beträgt 8,4 pg/ml. Zur Ermittlung einer Standardkurve läuft bei jeder Bestimmung eine Standardreihe bekannter PDGF-AB-Konzentrationen mit. Diese wird durch Verdünnung einer stock solution von 2000 pg/ml rekombinanten PDGF-AB hergestellt. Bei der Messung der Zytokinkonzentrationen werden die Proben immer doppelt aufgetragen.

Die Messungen von PDGF-AB in der BALF und im Serum verlaufen nach dem gleichen Versuchsablauf. Die lyophilisierten BALF-Proben wurden mit 0,5 ml Aqua dest. rekonstituiert und auf diese Weise um den Faktor 10 konzentriert. Serumproben werden mit einer Kalibratorflüssigkeit um den Faktor 50 verdünnt. Nach Vorbereitung der Standardverdünnungsreihe wird zunächst in den Näpfen der Mikrotiterplatte 50 µl Assay-Diluent vorgelegt. Danach pipettiert man den Nullstandard, die Standardverdünnungsreihe sowie die Proben in üblicher Weise in die Wells der Mikrotiterplatte. Das vorhandene PDGF-AB wird während einer Inkubationszeit von zwei Stunden von einem immobilisierten monoklonalen Antikörper, der spezifisch für PDGF-AA ist, gebunden. Es folgt ein Waschvorgang, bei dem alle ungebundenen Substanzen entfernt werden. Nun wird ein polyklonaler Antikörper gegen PDGF-BB zu den Wells gegeben und zwei Stunden lang inkubiert. Im folgenden Versuchsschritt werden durch Waschen alle ungebundenen Antikörper-Enzym-Komplexe entfernt. In einer Farbreaktion werden nach Zugabe des Farbreagens also nur immobilisierte Antigen-Antikörper-Komplexe nachgewiesen. Die Farbintensität verhält sich dabei proportional zur Menge an PDGF-AB, welches im initialen Schritt gebunden wurde. Die optische Dichte wird mit einem ELISA-Reader bei 450 nm Wellenlänge bestimmt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Standardverdünnungsreihe lässt sich eine Eichkurve erstellen, mit deren Hilfe man die Konzentrationen der untersuchten Proben ermitteln kann. Bei der

Angabe der Ergebnisse werden die Konzentrations- bzw. Verdünnungsfaktoren berücksichtigt.

### 2.3.3. Human TGF $\beta$ 1 Immunoassay

Der Sandwich-ELISA dient zur quantitativen Bestimmung von aktivem humanen TGF  $\beta$ 1 in Zellkulturüberständen, Serum und Plasma. Das Sensitivitätsminimum des Immunoassays liegt bei einer TGF  $\beta$ 1-Konzentration von 7 pg/ml. Dabei erkennt der Test sowohl natürliches als auch rekombinantes TGF  $\beta$ 1. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde bei jeder Testung eine Standardkurve ermittelt. Dafür wird eine Verdünnungsreihe von 2000 pg/ml bis zu 15,6 pg/ml mit rekombinatem TGF  $\beta$ 1 hergestellt. Auch hier werden wieder Doppelbestimmungen der Zytokinkonzentrationen durchgeführt. Zur Bestimmung der TGF  $\beta$ 1-Konzentration in der BALF wird das Testprotokoll von Zellkulturüberständen verwendet. Nach Lösung der lyophilisierten BALF mit 0,5 ml Aqua dest., muss latentes TGF  $\beta$ 1 aktiviert werden. Dies geschieht durch Zufügen von 0,1 ml 1N HCl. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten werden die Proben durch 0,1 ml 1,2N NaOH / 0,5M HEPES wieder neutralisiert. Nun pipettiert man den Null-Standard, die Standardverdünnungsreihe und die aktivierten Proben in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte, die mit löslichem TGF  $\beta$  Rezeptor Typ II beschichtet sind. Während einer Inkubationszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur reagiert vorhandenes TGF  $\beta$ 1 mit dem gebundenen Rezeptor. Nichtgebundene Substanzen werden bei einem Waschvorgang entfernt. Im nächsten Schritt bindet ein polyklonaler Antikörper an das zuvor immobilisierte TGF  $\beta$ 1. Nach einem erneuten Waschvorgang, bei dem man ungebundene Substanzen entfernt, werden diese Komplexe in einer Farbreaktion nachgewiesen. Mit Hilfe eines ELISA-Readers wird die Optische Dichte der Farbkomplexe bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Extinktion verhält sich dabei direkt proportional zur Farbintensität, und damit auch zum Gehalt an TGF  $\beta$ 1 in der Probe. Anhand der Eichkurve, die aus den Messergebnissen der Standardverdünnungsreihe errechnet wird, ermittelt man

die Konzentrationen an TGF  $\beta$ 1 der eingesetzten Proben. Bei der Errechnung der Endkonzentrationen werden Konzentrations- bzw. Verdünnungsfaktoren miteinbezogen.

Auch in den Serumproben muss zunächst latentes TGF  $\beta$ 1 aktiviert werden. Zu 0,1 ml Serum gibt man 0,1 ml 2.5N Essigsäure / 10M Urea. Nach zehn Minuten Inkubationszeit neutralisiert man die Probe durch Zugabe von 0,1 ml 2,7N NaOH / 1M HEPES. Dann werden die aktivierten Serumproben mit einem Kalibrator 10fach verdünnt. Die weitere Vorgehensweise zur Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum entspricht dem Protokoll von Zellkulturüberständen. Der Verdünnungsfaktor 10 wird bei der Angabe der Endkonzentration berücksichtigt.

#### **2.4. Evaluation der Krankenblätter**

Neben der Bestimmung der Konzentrationen von TGF  $\beta$ 1 und PDGF-AB in der BALF und im Serum wurden Patientendaten durch die Evaluation der Krankenblätter gesammelt. So erhielt man allgemeine Patienteninformationen wie z. B. Geschlecht, Alter oder Rauchverhalten. Außerdem wurden Parameter der BAL, der Lungenfunktionsprüfung und aktueller Blutuntersuchungen erfasst. Unter den Laborwerten fanden sich auch Bestimmungen von Angiotensin Converting Enzyme (ACE) oder Lysozym.

## 2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms STASY (Easy und Stasy PIC GmbH, München). Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Zur Korrelationsanalyse wurde der Rangkorrelationstest nach Spearman verwendet. Für ein aussagekräftiges Ergebnis sollte der Korrelationskoeffizient  $R > 0,5$  betragen. Bei Gruppenvergleichen wurde auf den U-Test nach Mann-Whitney zurückgegriffen. Von statistischer Signifikanz sprach man erst ab einem p-Wert  $< 0,05$ .

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Einteilung der Patienten in verschiedene Diagnosegruppen**

Unter Berücksichtigung der gewonnenen Patientendaten konnte das Patientenkollektiv sechs verschiedenen Diagnosegruppen zugeordnet werden. Bei dieser Arbeit wird zwischen Patienten mit Bronchitis, Sarkoidose, Pneumonie, Exogen Allergischer Alveolitis (EAA), IIP und übrigen ILD unterschieden.

Unter den 103 untersuchten Fällen befanden sich 16 Patienten, bei denen keine Lungenerkrankung festgestellt werden konnte. Da Daten von gesunden Freiwilligen nicht verfügbar waren, wurden die Werte von diesen 16 Patienten als Kontrollwerte verwendet.

##### Diagnosegruppe Bronchitis

Die Diagnosegruppe Bronchitis umfasst fünf Patienten, die neben den klinischen Symptomen einer Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) in der BAL häufig „Rauchermakrophagen“ oder eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten zeigen. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 43 Jahre. Drei Patienten der Gruppe sind Männer.

##### Diagnosegruppe Sarkoidose

Patienten mit Sarkoidose bilden mit 28 Fällen die größte Diagnosegruppe. Gesichert wird die Diagnose neben der Anamnese vor allem durch den Nachweis von epitheloidzelligen Granulomen in der Biopsie, eine erhöhte Aktivität von ACE im Serum und radiologische Veränderungen in der Lungenübersichtsaufnahme. Das Alter der Erkrankten reicht von 27 bis 78 Jahre. In dieser Gruppe sind 18 Patienten männlich. Hinsichtlich des



Krankheitsverlaufs ist das Kollektiv heterogen. Es finden sich sowohl Patienten mit akuter als auch mit chronischer Sarkoidose.

#### Diagnosegruppe Pneumonie

Die Diagnosegruppe Pneumonie besteht aus sieben Patienten, die an einer Pneumonie leiden und zwei Patienten, bei denen eine Miliartuberkulose diagnostiziert werden konnte. Das Alter der Erkrankten variiert von 41 bis 77 Jahre. Von den Betroffenen sind 7 Patienten weiblich.

#### Diagnosegruppe EAA

Diese Diagnosegruppe umfasst sechs Patienten, die neben ihren anamnestischen Symptomen nach Allergenexposition, in der BAL durch eine massive Lymphozytose auffallen. Hierbei überwiegen die CD 8 positiven Zellen. Der Quotient aus CD 4 zu CD 8 positiven Zellen ist kleiner eins. Außerdem findet man in der Biopsie Granulome. In der Diagnosegruppe findet sich lediglich ein Mann. Das Durchschnittsalter der Betroffenen beträgt 57 Jahre.

#### Diagnosegruppe IIP

Die heterogene Diagnosegruppe IIP setzt sich aus 15 Patienten mit UIP, sechs Patienten mit NSIP und zwei Patienten mit DIP zusammen. Die Diagnose IIP wurde nach anfänglichem Verdacht in den meisten Fällen nach Biopsierung unter VATS, selten nur durch TBB, und anschließender histologischer Untersuchung im Pathologischen Institut der Universität Würzburg gesichert. Im weiteren Verlauf wird diese Patientengruppe weiter untergliedert. Patienten mit NSIP und DIP werden zu einer Untergruppe NSIP/DIP zusammengefasst und der Untergruppe UIP gegenübergestellt. Das durchschnittliche Alter der Patienten beträgt 59 Jahre. Die geschlechtliche Verteilung ist mit 12 Männern und 11 Frauen nahezu ausgewogen.

#### Diagnosegruppe übrige ILD

In dieser Patientengruppe werden 16 Fälle unterschiedlicher Formen von ILD zusammengefasst, die keiner der anderen Diagnosegruppen zugeordnet

werden konnten. So finden sich beispielsweise Patienten mit Kollagenosen oder Silikosen in dieser heterogenen Gruppe wieder. Unter den Erkrankten befinden sich neun Männer. Das Durchschnittsalter beträgt 62 Jahre.

#### Diagnosegruppe Kontrolle

Diese Gruppe wird von 16 Patienten mit sehr unterschiedlichen Beschwerden und differenten Indikationen zu einer Bronchoskopie mit BAL gebildet. Mit 5 Patienten war eine unklare Dyspnoe ein häufiger Grund für ein solches invasives Vorgehen. Bei 4 Patienten war die vorausgegangene Bildgebung auffällig, was weiterer Abklärung bedurfte. In 7 Fällen sollte durch eine Bronchoskopie pulmonale Herde beispielsweise bei einer Karditis oder bei Verdacht auf eine Neurosarkoidose ausgeschlossen werden. Mit der weiteren Diagnostik konnte bei ihnen allen eine Lungenerkrankung ausgeschlossen werden. Das durchschnittliche Alter beträgt 48 Jahre. Unter den Patienten der Kontrollgruppe sind 12 Männer.

Die zahlenmäßige Aufteilung der 87 Patienten mit ILD auf die unterschiedlichen Diagnosegruppen und die 16 Patienten der Kontrollgruppe wird in der Abbildung 1 graphisch dargestellt.

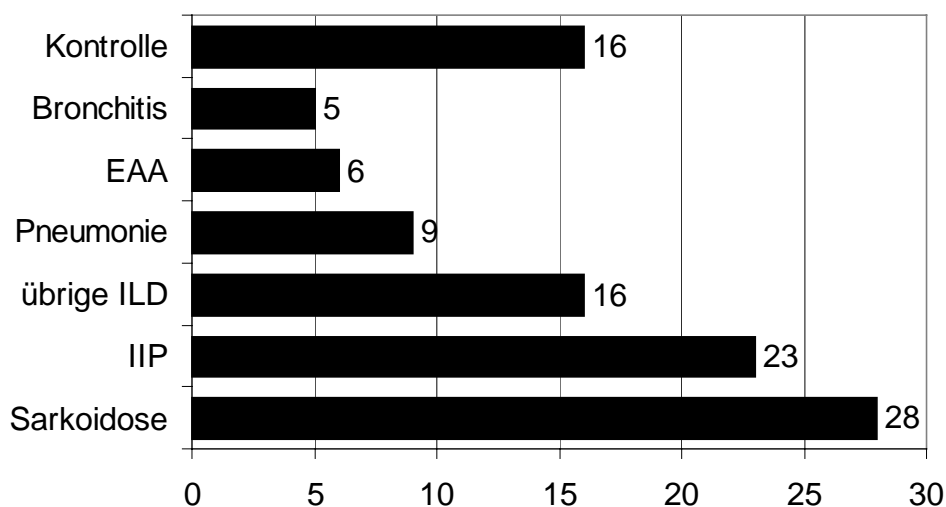


Abb. 1: Zuordnung der Patienten auf einzelne Diagnosegruppen

## 3.2. Konzentrationen der untersuchten Zytokine im Serum

### 3.2.1. Serum-Konzentration von PDGF-AB

In allen untersuchten Serumproben konnte die Zytokinkonzentration von PDGF-AB bestimmt werden. Lediglich bei acht Patienten lagen Serumproben nicht in ausreichender Menge vor. Deshalb reduziert sich die Probenanzahl in der Diagnosegruppe Sarkoidose und in der Kontrollgruppe um jeweils einen Patienten und in der Diagnosegruppe übrige ILD und IIP um jeweils drei. Eine Übersicht der arithmetischen Mittelwerte der gemessenen PDGF-AB-Konzentrationen im Serum in den verschiedenen Diagnosegruppen gibt Abbildung 2.

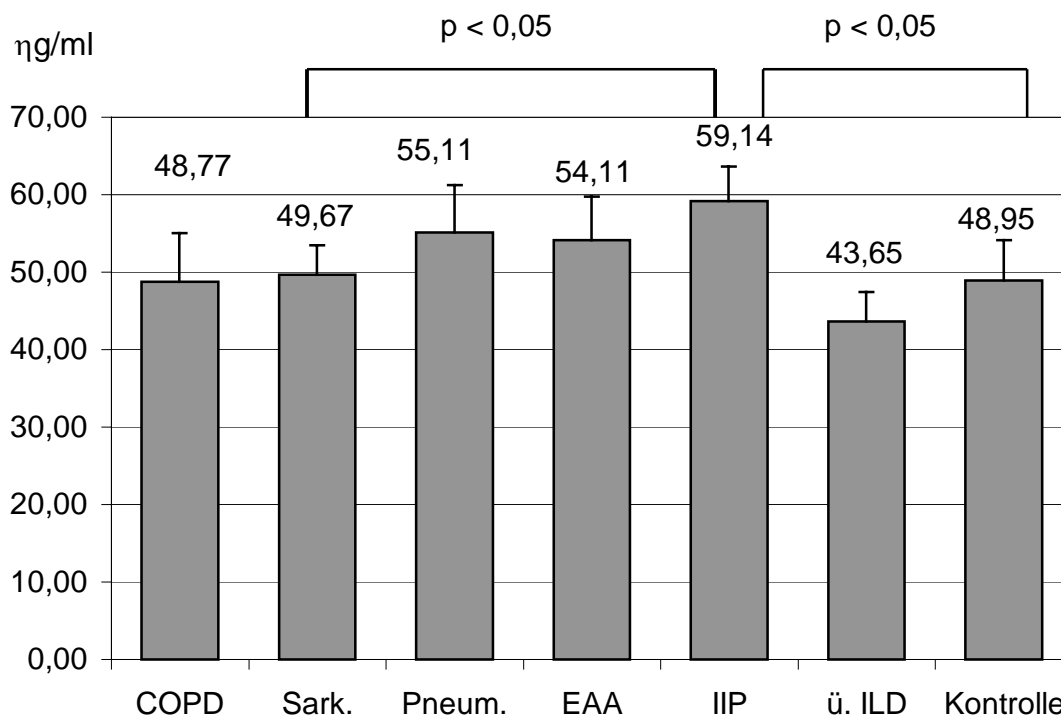


Abb. 2: Konzentrationen von PDGF-AB im Serum in den einzelnen Diagnosegruppen (Sark.: Sarkoidose; Pneum.: Pneumonie; ü. ILD: übrige ILD)

Im Vergleich zur durchschnittlichen Serumkonzentration von PDGF-AB der Kontrollgruppe liegen Patienten der Diagnosegruppe Bronchitis mit 48,77  $\eta\text{g/ml}$  knapp unter dem Durchschnittswert. Patienten mit übrigen ILD unterschreiten den Kontrollwert mit einer Serumkonzentration von 46,35  $\eta\text{g/ml}$  deutlich. Die Differenz beträgt 5,30  $\eta\text{g/ml}$ . Alle anderen Diagnosegruppen zeigen höhere Serumspiegel von PDGF-AB als die Kontrollgruppe. Am auffälligsten ist der Unterschied mit mehr als 10  $\eta\text{g/ml}$  bei der Diagnosegruppe IIP.

Die Unterschiede der PDGF-AB-Konzentrationen wurden im U-Test nach Mann-Whitney auf Signifikanz überprüft. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Serumkonzentration von PDGF-AB im Serum bei Patienten mit IIP signifikant ( $p = 0,036$ ) erhöht. Für diese Diagnosegruppe bestand außerdem ein signifikanter Unterschied zur Diagnosegruppe Sarkoidose bezüglich der PDGF-AB-Konzentration im Serum. Hier errechnete sich der p-Wert auf 0,038. Weiter signifikante Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.

### 3.2.2. Serum-Konzentration von TGF $\beta$ 1

Die Serumspiegel von TGF  $\beta$ 1 lagen alle im messbaren Bereich des ELISA's. Bei der Bestimmung dieses Parameters lagen ebenfalls nicht von jedem Patienten genügend Serumproben vor. So werden die Diagnosegruppen Sarkoidose und Pneumonie sowie die Kontrollgruppe um jeweils einen Patienten, die Diagnosegruppen übrige ILD und IIP um jeweils zwei Patienten hinsichtlich dieses Parameters verkleinert.

Betrachtet man die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen von TGF  $\beta$ 1 im Serum der einzelnen Diagnosegruppen, kann man keine wesentlichen Unterschiede erkennen. Der höchste Mittelwert, nämlich 47,71  $\eta\text{g/ml}$ , ließ sich für Patienten mit IIP errechnen. Den niedrigsten Mittelwert mit 40,02  $\eta\text{g/ml}$  findet man in der Diagnosegruppe EAA.

Bei der statistischen Untersuchung der Ergebnisse konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für TGF  $\beta$ 1 im Serum zwischen den einzelnen Diagnosegruppen gefunden werden. Die nachstehende Graphik gibt eine

Übersicht über die ermittelten Serumwerte von TGF  $\beta$ 1 in den verschiedenen Diagnosegruppen.

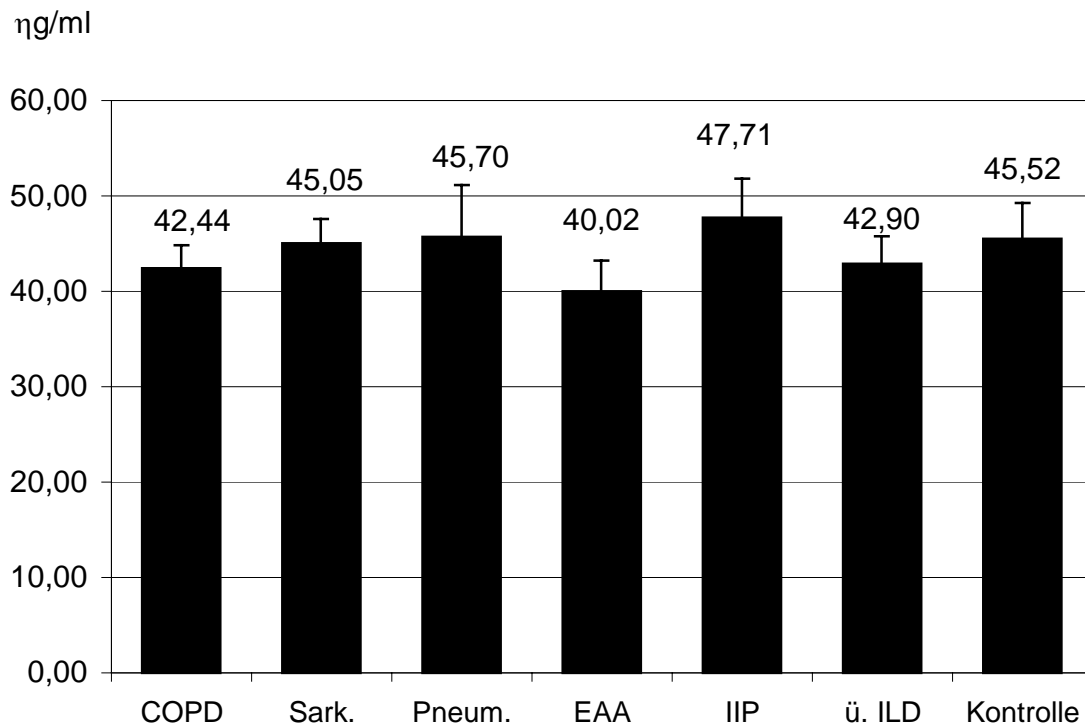


Abb. 3: TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen im Serum in den einzelnen Diagnosegruppen (Sark.: Sarkoidose; Pneum.: Pneumonie; ü.ILD: übrige ILD)

### 3.3. Konzentrationen der bestimmten Zytokine in der BALF

#### 3.3.1. BALF-Konzentration von PDGF-AB

Abgesehen von fünf Fällen war für die Untersuchung von PDGF-AB in der BALF ausreichend Probenmaterial vorhanden. Daher musste bei zwei

Patienten der Diagnosegruppe EAA und bei jeweils einer Person der Diagnosegruppe übrige ILD, IIP und der Kontrollgruppe auf die Bestimmung verzichtet werden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse kann man feststellen, dass lediglich Patienten der Diagnosegruppe EAA mit 14,56 pg/ml und der COPD-Gruppe mit 13,72 pg/ml unter dem Mittelwert 16,18 pg/ml der Kontrollgruppe fallen. Für Patienten der anderen Diagnosegruppen errechneten sich höhere Mittelwerte für PDGF-AB in der BALF. Die Diagnosegruppe IIP zeigt bei einem Mittelwert von 16,44 pg/ml nahezu identische Spiegel von PDGF-AB in der BALF wie die Kontrollgruppe. Deutlicher fallen die Spiegel der Diagnosegruppe übrige ILD, Pneumonie und Sarkoidose ins Auge. Sehr bemerkenswert ist die Differenz von fast 5 pg/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Patienten mit übrigen ILD.

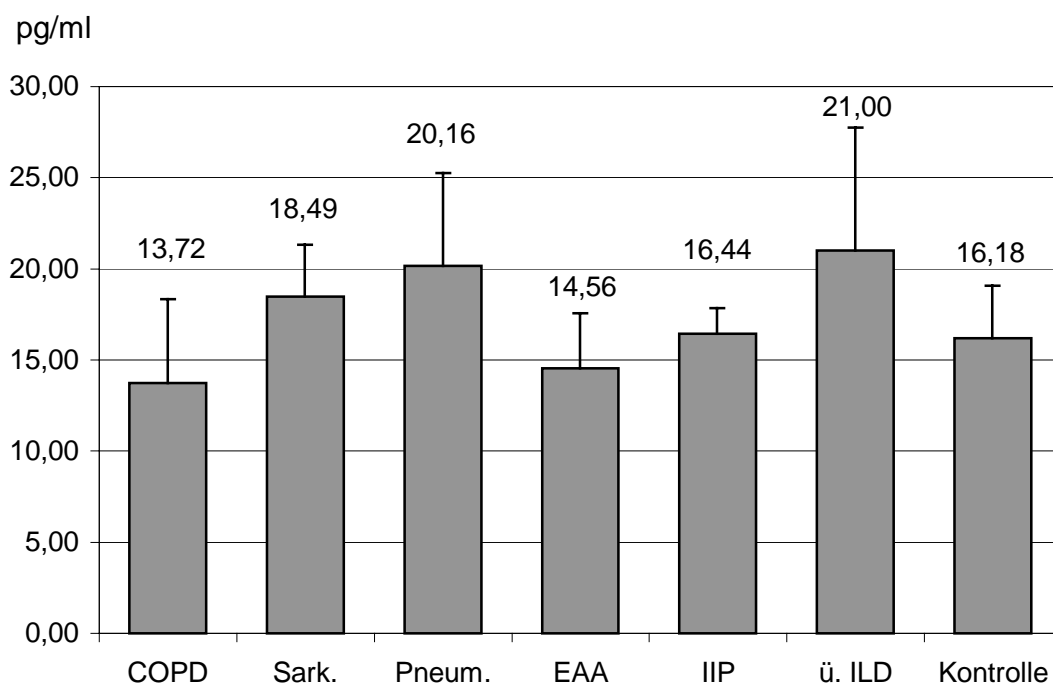


Abb. 4: Konzentration von PDGF-AB in der BALF der einzelnen Diagnosegruppen (Sark.: Sarkoidose; Pneum.: Pneumonie; ü. ILD: übrige ILD)

Augenscheinliche Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen bezüglich der PDGF-AB-Spiegel in der BALF sollten sich im Mann-Whitney-Test bestätigen, um aussagekräftig zu sein. Bei der Errechnung der p-Werte im U-Test konnte allerdings wegen der großen Streubreite der Werte keine Unterscheidung zwischen einzelnen Diagnosegruppen gefunden werden, die das Signifikanzniveau erreichte.

### 3.3.2. BALF-Konzentration von TGF $\beta$ 1

Bei jedem Patienten lag genügend Material vor, um TGF  $\beta$ 1 in der BALF zu bestimmen. Keine Probe lag unterhalb der Nachweisgrenze.

In der Übersicht der ermittelten TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen in den einzelnen Diagnosegruppen erkennt man, dass drei Patientengruppen ähnliche TGF  $\beta$ 1-Spiegel aufweisen wie die Kontrollgruppe, für die sich ein Durchschnittswert von 11,43 pg/ml ergab.

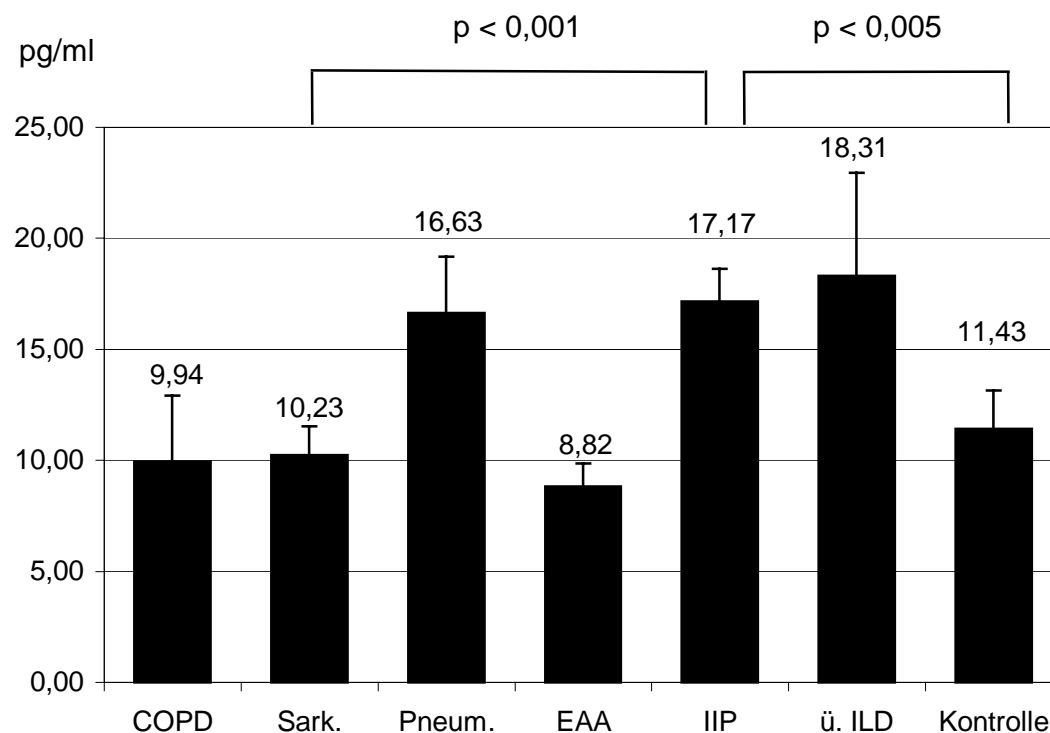


Abb.5: TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen der BALF in den einzelnen Diagnosegruppen  
(Sark.: Sarkoidose; Pneum.: Pneumonie; ü. ILD: übrige ILD)

Nahezu identisch mit der Kontrollgruppe ist der Mittelwert der Diagnosegruppe Bronchitis mit 9,94 pg/ml und der der Diagnosegruppe Sarkoidose mit 10,23 pg/ml. Etwas niedriger fällt der Mittelwert der Diagnosegruppe EAA aus. Die mittlere Differenz zur Kontrollgruppe beträgt 2,61 pg/ml. Im Gegensatz dazu findet man deutlich erhöhte TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen der BALF in den Diagnosegruppen Pneumonie mit 16,63 pg/ml, IIP mit 17,17 pg/ml und übrige ILD mit 18,31 pg/ml.

Im Gruppenvergleich nach Mann-Whitney ergaben sich eine Reihe signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen hinsichtlich TGF  $\beta$ 1 in der BALF. Am signifikantesten sind die Unterschiede, wenn man die Diagnosegruppe IIP mit anderen vergleicht. Im Vergleich zu Patienten mit Sarkoidose ist TGF  $\beta$ 1 in der BALF bei IIP signifikant erhöht ( $p = 0,000$ ). Der Unterschied zur Kontrollgruppe ist ebenfalls signifikant. Hierbei errechnet sich der p-Wert auf 0,004. Des weiteren unterscheidet sich die Diagnosegruppe IIP signifikant hinsichtlich der Zytokinkonzentration in der BALF von der Diagnosegruppe EAA ( $p = 0,005$ ) und von Patienten mit Bronchitis ( $p = 0,012$ ).

### **3.4. Zusammenhang der Zytokinkonzentrationen im Serum und in der BALF mit anderen Parametern bei Patienten mit IIP**

#### PDGF-AB

Die Diagnosegruppe IIP fällt mit den höchsten mittleren PDGF-AB-Konzentrationen im Serum auf.

Im Gegensatz dazu zeigen sich in der Korrelationsanalyse nach Spearman keine signifikanten Beziehungen zwischen PDGF-AB im Serum und anderen Parametern.



PDGF-AB in der Lavage korreliert signifikant mit der Gesamteiweißkonzentration der BALF ( $R = 0,577 / p = 0,002$ ). Weitere Signifikanzen konnten nicht festgestellt werden.

### TGF $\beta$ 1

Auch hinsichtlich des Zytokins TGF  $\beta$ 1 fällt die Diagnosegruppe IIP durch höhere Konzentrationen im Serum und in der Lavage auf.

In der Korrelationsanalyse nach Spearman können jedoch für TGF  $\beta$ 1 im Serum keine signifikanten Beziehungen festgemacht werden.

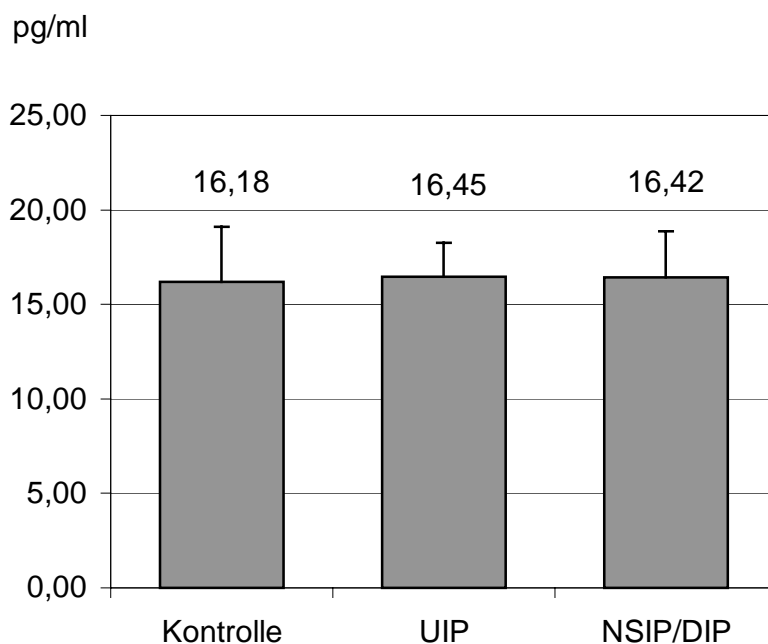
Im Gegensatz dazu korreliert TGF  $\beta$ 1 in der BALF positiv ( $R = 0,492$ ) mit dem prozentualen Anteil an Neutophilen Granulozyten (PMN%) der Differenzierung gewonnener Zellen. Das Signifikanzniveau wird mit  $p = 0,008$  deutlich erreicht. Außerdem besteht eine negative Korrelation zum prozentualen Anteil an T-Suppressorzellen ( $R = -0,414 / p = 0,030$ ). Betrachtet man jedoch absolute Zellzahlen, so erreicht keine Korrelation das Signifikanzniveau.

### **3.5. PDGF-AB und TGF $\beta$ 1 bei Patienten mit UIP im Vergleich zu Patienten mit NSIP oder DIP**

Die bisherigen Erkenntnisse und das Wissen über einen signifikanten Unterschied im Gruppenvergleich zwischen Patienten mit IIP und der Kontrollgruppe hinsichtlich der TGF  $\beta$ 1-Konzentration in der BALF führen zu einer Erweiterung der statistischen Analysen. Es stellt sich die Frage, wie sich die Untergruppen UIP und NSIP/DIP bezüglich der Zytokinkonzentrationen von PDGF-AB und TGF  $\beta$ 1 im Serum und in der Lavage verhalten. Bei der Untersuchung der Zytokinkonzentrationen im Serum können, wie schon erwartet, keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

### 3.5.1. PDGF-AB in der BALF bei Patienten mit UIP und NSIP/DIP

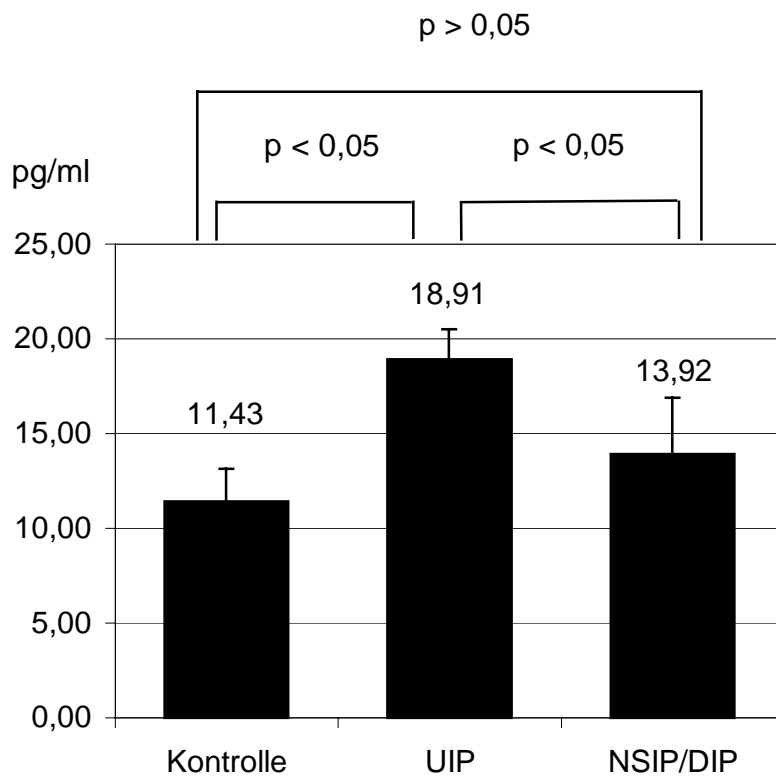
Das Zytokin PDGF-AB zeigt in der BALF keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen. Der arithmetische Mittelwert der IIP-Gruppe ist vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe. Auch eine weitere Untergliederung zwischen UIP und NSIP/DIP ergibt keine gravierenden Differenzen. Die Spiegel von PDGF-AB in der BALF betragen in den Untergruppen UIP und NSIP/DIP nahezu identische Werte. Nachstehende Abbildung gibt einen graphischen Überblick über die ermittelten PDGF-AB-Konzentrationen in der BALF bei Patienten mit UIP bzw. NSIP/DIP im Vergleich zu Kontrollpersonen.



*Abb. 6: Konzentration von PDGF-AB in der BALF in den Diagnosegruppen UIP und NSIP/DIP im Vergleich zur Kontrollgruppe*

### 3.5.2. TGF $\beta$ 1 in der BALF bei Patienten mit UIP und NSIP/DIP

Im Gegensatz zu PDGF-AB ist die Zytokinkonzentration von TGF  $\beta$ 1 bei Patienten mit IIP signifikant erhöht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die Konzentration von TGF  $\beta$ 1 in der BALF um ca. 50 Prozent gesteigert. Untergliedert man diese Gruppe weiter in UIP und NSIP/DIP, kommt man zu einem überraschenden Ergebnis. Patienten mit UIP fallen durch einen deutlich höheren TGF  $\beta$ 1-Wert in der BALF auf. Der arithmetische Mittelwert errechnet sich auf 18,91 pg/ml. Daraus ergibt sich eine Differenz zur Kontrollgruppe von mehr als 7 pg/ml. Demgegenüber ist die mittlere Konzentration von TGF  $\beta$ 1 in der Untergruppe NSIP/DIP im Vergleich zur Kontrolle nur gering erhöht. Der Mittelwert wird mit 13,92 pg/ml angegeben. Eine Übersicht der Ergebnisse gibt nachfolgende Graphik.



*Abb. 7: Konzentration von TGF  $\beta$ 1 in der BALF in den Diagnosegruppen UIP und NSIP/DIP im Vergleich zur Kontrollgruppe*

Im Gruppenvergleich nach Mann-Whitney wird der Unterschied zwischen Patienten mit UIP und Patienten mit NSIP/DIP bezüglich TGF  $\beta$ 1 in der BALF durch einen p-Wert von 0,031 bestätigt. Ansonsten ergeben sich keine weiteren Signifikanzen.

Folglich besteht ein signifikanter Unterschied zwischen UIP und NSIP/DIP hinsichtlich TGF  $\beta$ 1 in der Lavage, nicht aber für PDGF in der BALF oder Serumspiegel der untersuchten Zytokine.

### 3.5.3. Beziehung zwischen TGF $\beta$ 1 in der BALF und anderen Parametern der Diagnosegruppen UIP und NSIP/DIP

Von Interesse sind signifikante Korrelationen für TGF  $\beta$ 1 in der BALF in den Untergruppen UIP und NSIP/DIP.

In der Untergruppe NSIP/DIP kann lediglich eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an T-Helferzellen (Helper%), der bei der Differenzierung gewonnener Zellen bestimmt wurde, und TGF  $\beta$ 1 in der Lavage gefunden werden ( $R = -0,881 / p = 0,002$ ).

Bei Patienten mit UIP zeigt sich zum einen eine negative Korrelation ( $R = -0,465$ ) zur Gesamtzellzahl der BALF. Dabei beträgt der p-Wert 0,039. Zum anderen korreliert TGF  $\beta$ 1 in der Lavage in der Gruppe UIP positiv mit PMN% ( $R = 0,535 / p = 0,019$ ).

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Problematik der BAL

Die Methode der BAL wurde bereits 1967 in den Klinikalltag eingeführt. Aber erst die Etablierung des Bronchoskops mit Fiberoptik führte zu einer weiten Verbreitung der Technik (39, 46). Heute ist vor allem das Differentialzellbild der Entzündungszellen aus der Lavagenflüssigkeit bei der Diagnostik und Aktivitätsbeurteilung interstitieller Lungenerkrankungen hilfreich.

Die Bedeutung der BAL für wissenschaftliche Zwecke ist enorm. Bei der Erforschung des Pathomechanismus der IIP ist die BALF als Untersuchungsmaterial sehr hilfreich. Der Stellenwert der BAL im Klinikalltag wird dagegen kontrovers diskutiert. Die bei der Lavage gewonnene Spülflüssigkeit entspricht nicht der epithelialen Grenzflüssigkeit. Auch unter Berücksichtigung bestimmter Verhältnisse, beispielsweise dem Albumingehalt in Lavage und Serum, ist der genaue Verdünnungsfaktor nicht bekannt. Zum anderen repräsentieren die Konzentrationen relevanter Parameter, wie z. B. profibrotischer Zytokine, in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit nicht die Verhältnisse im Interstitium (29, 46). Aber die BALF wird von einem Ort gewonnen, der am Krankheitsprozess beteiligt ist oder zumindest in enger Beziehung dazu steht (46). Beim Vergleich der Differenzierung von Zellen, die bei einer Lavage gewonnen wurden, mit der von Zellen, die aus Lungenbiopsien extrahiert wurden, kann man durchaus Korrelationen feststellen (21). Außerdem ist der bronchoalveoläre Raum routinemäßigen Kontrollen zugänglich und eine Wiederholung der BAL ist gegebenenfalls möglich. Beim Monitoring einer IIP ist es von größerer Bedeutung, den Verlauf und das Ausmaß der Entzündung zu erkennen, als den Grad der Lungenschädigung anhand von Lungenfunktions- oder Röntgenuntersuchungen zu beurteilen (39). Sollte die Diagnosefindung erschwert sein

kann die BAL wichtige Hinweise für Differentialdiagnosen wie z. B. Histiozytose X geben (2).

Unter Berücksichtigung der Grenzen der BALF hat diese Methode also dennoch ihren Stellenwert im klinischen Bereich. Kein Parameter der BALF stellt eine definitive Diagnose und kann alleine entscheidend für eine Therapieindikation sein. Aber sie kann den diagnostischen Prozess und das Monitoring einer ILD erleichtern und möglicherweise prognostische Hinweise geben (2, 39).

#### **4.2. Klassifikation und Klinik der IIP**

Heute umfasst die Gruppe der IIP sieben unterschiedliche Formen: UIP, NSIP, COP, AIP, RB-ILD, DIP und LIP. Bis vor kurzem wurde der Oberbegriff IIP noch mit dem Begriff Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) gleichgesetzt. Doch nun ist der Begriff IPF nur noch dem histopathologischen Subtyp UIP vorbehalten (1, 2). Die sieben Subtypen der IIP unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihrer histopathologischen Kriterien, sondern variieren auch in der klinischen Manifestation. Anna-Luise Katzenstein und Jeffrey L. Meyers beschreiben in einem State of the Art Bericht (26) die histopathologischen Kriterien für die Zuordnung zu den wichtigsten Subtypen der IIP. Erweitert wird diese Ausführung unter anderem durch die neue Klassifikation der IIP (2).

Charakteristisch für UIP ist die zeitlich heterogene und räumlich fleckförmige Verteilung der interstitiellen Veränderungen. Neben normalen Lungenabschnitten kann man Zonen mit Interstitieller Fibrose, Honeycombing und Entzündungsreaktionen erkennen (1, 2, 26). Sogenannte Fibroblast Foci, nicht generell spezifisch für UIP, kann man in allen veränderten Zonen finden. Hier sind spindelförmige Fibroblasten meist mit ihrer Längsachse parallel zum Alveolareseptum ausgerichtet und fallen durch ihr myxoidartiges Zytoplasma auf. Mit dem Subtyp NSIP eröffnet sich das Feld für gewisse Unsicherheiten. Im letzten Konsensus zur Klassifikation der IIP einigte man sich darauf, den Begriff

NSIP als vorläufige Diagnose anzusehen, bis Klarheit über die Art der Erkrankung und klinische Begleitumstände herrscht (2). Das histologische Bild der NSIP ist durch eine diffuse Fibrosierung der Alveolarsepten und eine Hyperplasie von Pneumozyten geprägt. Außerdem findet man ein moderates, homogen erscheinendes Entzündungsinfiltrat aus Lymphozyten und einigen Plasmazellen (2). Nur äußerst selten kann man Honeycombing und Fibroblast Foci beobachten (2, 26).

COP wurde neu in die Gruppe der IIP aufgenommen. Diese Entität weist ebenfalls ein idiopathisches Wesen auf und auch das histologische Erscheinungsbild zeigt deutliche Parallelen zu den IIP (2). Die Entzündung befindet sich im Stadium der Organisation, wobei das Bindegewebe zeitlich einheitlich ist. Man findet fleckförmig im Interstitium ein mildes Entzündungsinfiltrat, eine Hyperplasie der Typ II Pneumozyten und schaumige Makrophagen (2). Die eigentlichen Lungenarchitektur bleibt bei der COP erhalten.

Der Subtyp AIP kennzeichnet sich durch eine ubiquitäre, aktive interstitielle Fibrose ohne Kollagenablagerung und Hyperplasie der Typ II Pneumozyten als Reaktion auf einen diffusen Alveolarschaden (2, 26). Der Phase der Organisation geht die Phase der exsudativen Entzündung voraus. Hier findet man neben der akuten interstitiellen Entzündungsreaktion Überreste von hyalinen Membranen, kleine arterielle Thromben oder Zellatypien des Bronchialepithels, die Ausdruck der akuten Lungenschädigung sind (2, 26).

Bei der RB-ILD kann man schon bei niedriger Vergrößerung fleckförmig um die Bronchiolen und in den peribronchialen Alveolarräumen Cluster von bräunlichen, feingranulierten Makrophagen sehen (2). Außerdem zeigt sich ein unterschiedlich dichtes Infiltrat aus Lymphozyten und Histiocyten sowie eine leichte peribronchiale Fibrosierung. Zeichen des Lungenemphysems sind häufig.

Für eine DIP spricht ein monotones, uniformes Erscheinungsbild (2, 26). Im Gegensatz zu den RB-ILD mit einer Konzentration auf peribronchiale Areale ist bei der DIP die Lunge diffus befallen. Nahezu alle distalen Atemräume sind mit zahlreichen, fein granulierten Makrophagen ausgefüllt. Die Alveolarsepten sind mäßig verbreitert. Das Entzündungszellinfiltrat ist spärlich und wird vor allem

durch Plasmazellen und gelegentlich auch durch Eosinophile Granulozyten gebildet. Ansammlungen von Lymphozyten und Zeichen eines Lungemphysems können beobachtet werden.

Eine LIP zeigt eine Hyperplasie von Typ II Pneumozyten und ein diffuses, dichtes interstitielles Infiltrat aus lymphoiden Zellen (2). Vor allem T-Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen sind zu finden. Häufig kann man auch lymphoide Hyperplasien beobachten. Alveolarsepten sind verbreitert und zum Teil zerstört, so dass Veränderungen der Lungenarchitektur erkennbar sind. Differentialdiagnostisch ist die LIP neben anderen ILD, wie zum Beispiel UIP oder NSIP, auch von Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue-Lymphomen abzugrenzen.

<b>histopathologische Kriterien</b>	<b>UIP</b>	<b>DIP</b>	<b>NSIP</b>	<b>AIP</b>
zeitliches Erscheinungsbild	bunt	uniform	uniform	uniform
interstitielle Entzündung	gering	gering	mild bis moderat	gering
Fibroblastenproliferation	prominente Fibroblast Foci	keine	selten, evtl. Fibroblast Foci	diffus
Honeycombing	ja	keine	selten	keine
Makrophagen intraalveolär	gelegentlich, lokal	diffus	gelegentlich, dicht	keine
Hyaline Membranen	keine	keine	keine	gelegentlich, dicht

*Tab. 2: Übersicht über histopathologische Kriterien der wichtigsten IIP-Subtypen in modifizierter Form nach 26*

Neben den histopathologischen Kriterien bestehen zwischen den einzelnen Subtypen der IIP aber auch Unterschiede im klinischen Verlauf und in der Prognose.

Betroffene einer UIP sind in der Regel über 50 Jahre alt. Männer erkranken zweimal häufiger als Frauen. Die hauptsächlichen klinischen Symptome einer



UIP sind trockener, unproduktiver Husten und Dyspnoe. Die Beschwerden treten plötzlich auf und es zeichnet sich eine Progredienz der Symptomatik ab. In der Lungenfunktionsprüfung zeigen sich restriktive Veränderungen und es kommt zu einer Abnahme der Diffusionskapazität für CO (2). Im späteren Krankheitsverlauf treten Zyanose, Cor pulmonale oder periphere Ödeme hinzu (1, 2, 26). Die Prognose einer UIP ist schlecht. Das Ansprechen auf die zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten ist oft gering. Die Mortalität beträgt zwischen 59 % und 70 %. Die Krankheit dauert von Diagnosestellung bis zum Tod durchschnittlich 2,8 bis 6 Jahre an (26). Neuere Studien geben eine noch kürzere mittlere Überlebenszeit von 2,5 bis 3,5 Jahren an (1, 2). In vielen Fällen versterben die Patienten mit UIP bei einer Progredienz der Erkrankung an respiratorischem Versagen. Andere Todesursachen sind Herzversagen, ischämiebedingte Herzerkrankungen, Infektionen oder Lungenembolien (1).

Das Durchschnittsalter bei Patienten mit NSIP beträgt ungefähr 49 Jahre, wobei aber auch Kinder erkranken können. Es gibt keine Predominanz hinsichtlich Geschlecht oder Rauchverhalten der Betroffenen (2). Die Symptome sind ebenfalls Husten und Dyspnoe. Außerdem beobachtet man Gewichtsverlust und Müdigkeit. Die Prognose ist im Gegensatz zu Patienten mit UIP gut. Es scheint, dass die Mortalität vom Ausmaß der Fibrose abhängt. Patienten mit geringen fibrotischen Veränderungen sprechen auf eine Kortikosteroidtherapie an und haben bessere Überlebenschancen. Bei stark fortgeschrittenen Formen einer NSIP hat aber selbst eine zytotoxische Therapie keinen Effekt (26). Jedoch kommt es unter Therapie in den überwiegenden Fällen zu einer Stabilisation oder Besserung der Symptome (2).

Die geschlechtliche Verteilung der Patienten mit COP ist ausgewogen, doch sind Nichtraucher doppelt so häufig betroffen wie Raucher (2). Bei Ausbruch der Erkrankung sind die Patienten durchschnittlich 55 Jahre alt. Nach einer Periode von weniger als 3 Monaten mit teilweise produktivem Husten und Dyspnoe folgen Gewichtsverlust, Myalgie und Episoden mit Frösteln oder intermittierendem Fieber (2). Die meisten Patienten erfahren eine Komplettremission unter oralen Kortikosteroiden. Nur bei einigen wenigen kommt es vor

allein während der Steroidreduktion zu einer Progression und sie versterben an respiratorischem Versagen.

Das Erkrankungsalter bei AIP ist sehr variabel. Der Ausbruch ist akut. In vielen Fällen bestehen Prodromi einer Virusinfektion des oberen Respirationstraktes. Zunächst sind Atemnot, Husten und Fieber die vorherrschenden Symptome (1, 2, 26). Im weiteren Verlauf kommt es schnell zum respiratorischen Versagen und in durchschnittlich 62 % der Fälle nach ein bis zwei Monaten zum Tod (2, 26).

Wahrscheinlich wurden ursprünglich Fälle mit RB-ILD der Untergruppe DIP zugerechnet. Doch es existieren Unterschiede im klinischen Verlauf und der Bildgebung, so dass die eigene Entität RB-ILD entstand (2). Bei der RB-ILD kommt es zu einer Ausbildung einerILD bei bereits vorbestehenden pathologischen Veränderungen einer Bronchiolitis. Betroffen sind besonders männliche Raucher zwischen 40 und 50 Jahren mit mehr als 30 Pack-Years in der Raucheranamnese. Nur einige Patienten klagen über signifikante Beschwerden. Falls die Betroffenen das Rauchen einstellen, kommt es zu einer Verbesserung der Dyspnoe oder Hypoxämie. Berichte über die Entstehung einer schweren Lungenfibrose liegen derzeit nicht vor (2). Außerdem ist nicht ausgeschlossen, ob eine RB-ILD sich im Verlauf zu einer DIP weiterentwickeln kann (2).

Das Durchschnittsalter bei Patienten mit DIP liegt bei 42 Jahren. Männer sind nahezu zweimal häufiger betroffen. Normalerweise spielt das Rauchverhalten eine große Rolle. Jedoch gibt es auch Fälle unter Nichtrauchern (2). Die Inzidenz beträgt weniger als 3% allerILD (1). Die Hauptsymptome sind auch hier trockener Husten und Dyspnoe über Wochen und Monate. Eine Steroidtherapie und der Verzicht auf Zigarettenrauchen führen häufig zu guten Erfolgen. Die Überlebensrate nach 10 Jahren wird mit 70 % angegeben (1, 2).

Die Inzidenz der idiopathischen LIP ist sehr gering, wobei häufiger Frauen während der fünften Lebensdekade betroffen sind (2). Die Patienten klagen über langsam progredienten Husten und Dyspnoe begleitet von Fieber, Gewichtsverlust und Brustschmerzen. Meist spricht eine Therapie mit

Kortikosteroiden an. Doch in mehr als ein Drittel der Fälle entwickelt sich unter dieser Therapie eine diffuse Lungenfibrose.

<b>klinische Merkmale</b>	<b>UIP</b>	<b>DIP</b>	<b>NSIP</b>	<b>AIP</b>
Erkrankungsalter	57	42	49	49
Auftreten bei Kindern	nein	selten	gelegentlich	selten
Beginn	plötzlich	plötzlich	subakut bis plötzlich	akut
Ansprechen auf Steroide	gering	gut	gut	gering
Restitutio ad integrum möglich	nein	ja	ja	ja
Mortalitätsrate	11%	27%	68%	62%

*Tab. 3: Übersicht über klinische Merkmale der wichtigsten IIP-Subtypen in modifizierter Form nach 26*

### **4.3. Pathogenese der Lungenfibrose**

Bis heute bleibt die Frage nach den Auslösern und dem genauen Pathomechanismus der IIP unbeantwortet. Mögliche Auslösefaktoren sind Zigarettenrauchen, berufliche Staubexposition oder Virusinfektionen. Auch eine genetische Prädisposition wird diskutiert (1, 8, 36). Wahrscheinlich spielen mehrere Faktoren zusammen.

Es existieren mehrere Hypothesen, wie es zur Ausbildung einer Lungenfibrose kommt. Eine weit verbreitete Erklärungstheorie ist die Fibrogenese aufgrund einer chronischen Entzündung nach Schädigung des Lungenparenchyms (10, 11, 57). Überschießende Reparaturmechanismen bewirken eine Akkumulation

von mesenchymalen Zellen und Synthese von Matrixproteinen (38). Häufig spricht man kurzgesagt nur von „injury and repair“.

Auf zellulärer Ebene kommt es zunächst aus noch unbekannter Ursache zu einer Zellschädigung von Epithel und Endothel (18). Einige Autoren vermuten Immunkomplexe als möglichen Stimulus (37, 42, 57). Die Kontinuität von Basalmembranen wird dadurch unterbrochen (42). Diese Veränderungen des Mikromilieus und die Freisetzung biologischer Signalstoffe führen zu einer alveolären Entzündungsreaktion (38).

Die Frühphase der Entzündungsreaktion wird vor allem durch Interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) und PDGF geprägt, welche unter anderem von Alveolarmakrophagen freigesetzt werden (14, 18, 30, 57). Durch Chemokine werden weitere Zellen z. B. Neutrophile und Eosinophile Granulozyten, Monozyten oder Lymphozyten rekrutiert (11). Sobald diese Zellen das Lungenparenchym erreicht haben, werden sie aktiviert und setzen nun ihrerseits Signalstoffe frei. Dabei wirken sie auf sich selbst und auf ortständige Zellen (14). Bei wiederholten akuten und chronischen Entzündungen des Interstitiums finden komplexe Interaktionen zwischen Entzündungszellen und ortständigen Zellen statt, die unter anderem durch Zytokine kontrolliert werden (10, 14, 32, 57). Diese Abfolge von Zellschädigung und Reparaturvorgängen führt zu einer veränderten Lungenarchitektur.

Die Anzahl an Pneumozyten Typ I nimmt drastisch ab (38). Die Epitellücken werden durch Pneumozyten Typ II geschlossen (42). Dies wird zum einen durch Proliferation und zum anderen durch Hyperplasie der Zellen erreicht (10). Weitere Effektorzellen sind Fibroblasten, die in die Orte der akuten Lungenschädigung auswandern (42, 57). Dort differenzieren sich Fibroblasten zu Myofibroblasten und proliferieren (10, 48). Aktiviert werden die Fibroblasten unter anderem durch Mediatoren wie z. B. TGF  $\beta$ , die von Makrophagen und Pneumozyten freigesetzt werden (10, 57). Die Aktivierung der Bindegewebszellen resultiert in einer gesteigerten Genexpression von Kollagen, Fibronectin, Proteoglykanen und anderen Matrixproteinen. Diese Gewebebestandteile werden an den Orten der Gewebeschädigung abgelagert, wo sie zu Verdichtungen des Interstitiums führen. In den fibrotischen Arealen sind

Fibroblasten ultrastrukturell verändert. So zeigt sich ihre erhöhte sekretorische Aktivität z. B. in einem erweiterten Endoplasmatischen Retikulum (10). Aggregationen solcher Fibroblasten und Myofibroblasten werden Fibroblast Foci genannt (26, 52). Man vermutet, dass die Fibroblast Foci Zonen akuter Lungenschädigung darstellen (26). Dort sind Alveolarzellen zerstört und die Basalmembran liegt frei. Durch Fibroblastenproliferation und Kollagenablagerung wird der Schaden behoben.

Die Folge dieser Gewebereaktionen ist entweder eine verzögerte, aber vollständige Wiederherstellung der Ausgangssituation oder generalisierte fibrotische Umbauvorgänge der Lunge (10, 57). Die entscheidenden Faktoren sind nicht bekannt. Ein Erklärungsmodell ist das Ungleichgewicht zwischen profibrotischen und antifibrotischen Faktoren (11).

Dies ist aber nur eine von vielen Hypothesen. Andere sehen weniger in der chronischen Entzündung des Interstitiums als vielmehr in einer gestörten Wundheilung den entscheidenden Pathomechanismus, der die Fibrogenese auslöst und aufrechterhält (52). Sie argumentieren, dass im histopathologischen Bild einer UIP eine ausgeprägte Entzündungsreaktion fehlt. Außerdem korreliert der Grad der Entzündung nicht mit dem Krankheitsverlauf und eine IPF spricht nur sehr schlecht auf eine antiinflammatorische Therapie an.

Aber im weiteren Sinn sehen die meisten Theorien in der Lungenfibrose einen fehlgeschlagenen Reparaturversuch (7, 10, 37). Im Gegensatz zur normalen Wundheilung ist der Reparaturprozess überschießend und eventuell auch chronisch (38).

## 4.4. Das Zytokin PDGF

### 4.4.1. Allgemeine Aspekte des Zytokins

Erstmals wurde das Glykoprotein PDGF in den  $\alpha$ -Granulas von Thrombozyten gefunden (14, 32). PDGF ist ein Homo- oder Heterodimer aus zwei verschiedenen Peptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Drei unterschiedliche Isoformen von PDGF sind bekannt: PDGF-AA, PDGF-BB und PDGF-AB. Das Molekulargewicht beträgt zwischen 28 und 35 kDa (14). PDGF-AA wird in mesenchymalen Zellen synthetisiert. Makrophagen produzieren vornehmlich die Isoformen AB und BB (6). In der Lunge sind aktivierte Fibroblasten, Makrophagen, glatte Muskelzellen sowie Epithel- und Endothelzellen Syntheseorte für PDGF (14, 23). An der Zielzelle bindet PDGF an einen Thyrosinkinase-Rezeptor der Zelloberfläche, von dem ebenfalls zwei verschiedene Typen,  $\alpha$  und  $\beta$ , existieren. Der PDGF-Rezeptor (PDGF-R)  $\alpha$  hat sowohl zur PDGF-A-Kette als auch zur PDGF-B-Kette die gleiche Affinität. Dahingegen ist die Affinität des PDGF-R  $\beta$  höher zur PDGF-B-Kette (32).

### 4.4.2. PDGF und pulmonale Fibrose

Die Entstehung einer Lungenfibrose basiert auf der vermehrten Ansammlung und übersteigerten Proliferation von mesenchymalen Zellen sowie einer verstärkten Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen. Schon lange sind die *in vitro* – Eigenschaften von PDGF bekannt, die diesem Zytokin eine entscheidende Rolle bei der Fibrogenese zusprechen.

PDGF ist ein sehr potentes Mitogen und wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten oder glatte Muskelzellen (14, 32, 38). Außerdem induziert PDGF die Synthese von Glykosaminoglykanen und führt zu einer gesteigerten Produktion von kollagenen Fasern (32).

Auch die Ergebnisse verschiedener Tierversuche konnten die Bedeutung von PDGF v. a. für die Frühphase der Fibrogenese bekräftigen. Man konnte bei

transgenen Mäusen mit einer bis zu 20 fach erhöhten Expression von PDGF deutlich fibrotische Veränderungen im Lungenparenchym erkennen (24). Die Überexpression von PDGF führte neben emphysematösen Veränderungen und entzündlichen Infiltraten zu fibrotischen Arealen. Die Zellzahl und die Ablagerung von Extrazellulärer Matrix war gesteigert. Jedoch hatte die Überexpression des Zytokins PDGF alleinig nicht das Potential zu einer generalisierten Lungenfibrose. Ähnliche Auswirkungen hatte die intratracheale Gabe von rekombinatem humanen PDGF-BB bei Ratten (60). Histologisch war eine peribronchiale und perivaskuläre Zunahme mesenchymaler Zellen und eine gesteigerte Kollagenablagerung lediglich bei intratrachealer Verabreichung zu beobachten. Eine systemische Gabe führte zu keiner Parenchymveränderung. Daraus kann man mutmaßen, dass PDGF als lokaler Mediator parakrin wirkt.

Um jedoch den Effekt von PDGF und anderen Mediatoren näher untersuchen zu können, war die Induktion einer Lungenfibrose im Tiermodell notwendig. Weit verbreitet ist das „Bleomycin-Modell“, aber es existieren auch andere etablierte Modelle. Eine transiente Überexpression von IL-1 $\beta$  mittels adenoviralem Gentransfer bei Ratten führte zunächst zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie z. B. IL-1 $\beta$ , Interleukin-6 oder TNF- $\alpha$  in der BALF (30). Sieben Tage nach deren Maximum, also 14 Tage nach dem Gentransfer, fand man in der BALF einen signifikanten Spitzenwert von PDGF. Danach lag die Konzentration von PDGF wieder im Normalbereich. Demgegenüber stieg die Konzentration von TGF  $\beta$ 1 in der BALF bereits eine Woche früher signifikant an und erreichte ebenfalls am Tag 14 ein Maximum. Aber anders als PDGF blieb TGF  $\beta$ 1 in der BALF weiter bis zum Tag 60 im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Begleitet wurden die Maximalwerte der Zytokine in der BALF von einer erhöhten Anzahl an Makrophagen im Entzündungszellinfiltrat. Histologisch war eine Zunahme an Myofibroblasten und Ablagerung von Kollagen erkennbar, die im weiteren Verlauf in einer schweren Lungenfibrose gipfelten.

Eine anderer Ansatzpunkt die Bedeutung von PDGF bei der Ausbildung einer Lungenfibrose nachzuweisen, ist der Versuch, die Wirkung des Zytokins durch

geeignete Faktoren zu inhibieren. In einer Studie werden im „Bleomycin-Hamster-Modell“ Tiere mit dem indirekten Inhibitor Pirfenidon vorbehandelt (20). Dies führte zur Reduktion der PDGF-Konzentration in der BALF bei vorbehandelten Tieren. Der mitogene Effekt dieser BALF auf kultivierte Fibroblasten im Vergleich zur Kontrolllavage ohne Pirfenidon-Einsatz war signifikant vermindert.

Vergleichbar ist auch der Versuch Rezeptoren für PDGF bei einer intratrachealen Gabe von Vanadumpentoxid an Ratten spezifisch zu blockieren (47). Eine sonst beobachtete Zunahme mesenchymaler Zellen fand nicht statt. Zudem reduzierte sich die Menge an abgelagertem Kollagen, die ohne Vanadumpentoxid nach zwei Wochen deutlich sichtbar ist. Wahrscheinlich wird dies durch die verminderte Anzahl mesenchymaler Zellen erreicht.

Die Erkenntnisse der Tierversuche halfen beim weiteren Verständnis der Abläufe der humanen Lungenfibrose und bildeten die Grundlagen für nachfolgende Untersuchungen. Mittels *in situ* Hybridisationen konnte im Lungenparenchym von Patienten mit IIP die Expression der Messenger RNA (mRNA) von PDGF sowohl in lokalen als auch in einwandernden Makrophagen und in Epithelzellen nachgewiesen werden (3). In den Epithelzellen werden dann auch PDGF-ähnliche Proteine hergestellt. Bei immunhistochemischen Tests zeigt sich eine vermehrte Synthese in fibrotischen Arealen. Bei Gesunden konnte aber weder die mRNA noch die Synthese von PDGF nachgewiesen werden.

Neben den fibrotisch veränderten Gewebeproben von Patienten mit IIP ist am Lebenden aber auch die Untersuchung der BALF und der auf diesem Weg gewonnenen Zellen möglich. Alveolarmakrophagen von Patienten mit IIP setzten spontan und ohne jegliche Stimulation im Vergleich zu Zellen, die von gesunden Normalpersonen gewonnen wurden, bis zu viermal soviel PDGF frei (41). Dies wird wohl über eine erhöhte Transkriptionsleistung erreicht, wobei die mRNA der PDGF-B-Kette bis zu zehnmal häufiger transkribiert wird (41).

Das Ziel der aktuellen Studie war es, die BALF eingehender auf das Zytokin PDGF zu untersuchen und mögliche Konsequenzen für den klinischen Alltag zu



ziehen. Neben der BALF wird außerdem die PDGF-Konzentration im Serum bestimmt, denn das Serum ist als Untersuchungsmedium für den Kliniker besonders leicht zugänglich. So konnte gezeigt werden, dass das Zytokin PDGF-AB sowohl im Serum als auch in der BALF bei Patienten mit IIP nachweisbar ist. Im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Diagnosegruppe Sarkoidose ist die Konzentration von PDGF-AB im Serum signifikant erhöht, jedoch ergibt sich für PDGF-AB im Serum keine Korrelation zu klinischen Parametern. Die Bedeutung dieser Gruppenunterschiede darf nicht zu hoch bemessen werden. Das Zytokin im Serum hat nur eine begrenzte Halbwertszeit und sollte daher im Serum am besten am Abnahmetag bestimmt werden. Das Protokoll dieser Studie konnte diese Bedingung aber nicht erfüllen. Zum anderen sind die IIP keine Systemerkrankung, sondern spielen sich ausschließlich im Kompartiment Lunge ab.

Von großer diagnostischer und klinischer Bedeutung wäre der signifikante Unterschied bezüglich PDGF-AB im Serum allerdings, wenn sich die Serumwerte kongruent mit den Konzentrationen von PDGF-AB in der Lavage verhalten würden. PDGF-AB im Serum wäre ein einfach zugänglicher Parameter, der für den Patienten im Gegensatz zu einer diagnostischen Bronchoskopie mit Lavage kaum belastend ist. Doch die Erwartungen konnten nicht erfüllt werden. Die Konzentration von PDGF-AB in der BALF bei Patienten mit IIP erreicht annähernd gleiche Werte sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Untergruppen UIP und NSIP/DIP. Im Vergleich zu anderen Diagnosegruppen ist für das Zytokin PDGF-AB kein großer Unterschied ersichtlich. PDGF-AB in der BALF korreliert bei IIP nur positiv mit dem Gesamteiweiß in der Lavage und nicht mit klinisch bedeutsamen Parametern. So lässt sich anhand der Konzentration von PDGF-AB in der BALF auch keine Aussagen über den klinischen Verlauf oder die Prognose einer IIP treffen. Eventuell lässt sich dieser Sachverhalt durch das Patientenkollektiv erklären. Patienten der Diagnosegruppe IIP sind bereits längere Zeit erkrankt und haben das Anfangsstadium bereits durchlaufen. PDGF ist dahingegen ein profibrotisches Zytokin der Initialphase und tritt im späteren Krankheitsverlauf eher in den Hintergrund.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass das Zytokin PDGF-AB sowohl in der Lavage als auch im Serum des Patientenkollektivs nachweisbar ist. Doch die Zytokinkonzentrationen ist in beiden Untersuchungsmedien bei fibrotisierenden Lungenerkrankungen nicht signifikant erhöht. Es bestehen keine Korrelationen zu klinischen Parametern oder zum Krankheitsverlauf. Somit ergeben sich keine Konsequenzen für den klinischen Alltag von Patienten mit IIP hinsichtlich dieses Mediators. Die Relevanz des profibrotischen Zytokins PDGF bei der Entstehung einer Lungenfibrose wird noch kontrovers diskutiert. Neben den bereits erwähnten Studien, die PDGF einen großen Stellenwert in der Entstehung einer Lungenfibrose zusprechen, existieren aber auch andere Studienergebnisse, die diesem Zytokin eher weniger Bedeutung schenken und andere Mediatoren favorisieren (40). Weitere Untersuchungen werden in Zukunft folgen müssen, um bessere Einsicht gewähren zu können.

## **4.5. Das Zytokin TGF $\beta$ 1**

### 4.5.1. Allgemeine Aspekte des Zytokins

Vor über 20 Jahren wurde TGF  $\beta$ 1 erstmals isoliert und charakterisiert (33). Der Name TGF entstand durch die Eigenschaft des Zytokins, normale Zellen in Kultur zu Zellwachstum anzuregen, das in seiner Art an virus-transformiertes Zellwachstum erinnerte (7). Aktives TGF  $\beta$ 1 ist ein 25 kDa schweres Homodimer, das durch eine Disulfidbrücke verbunden ist. In der Lunge wird die latente Form des Zytokins von Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen sowie von Fibroblasten freigesetzt (32, 62). Welche Substanz *in vivo* das latente TGF  $\beta$ 1 aktiviert, ist noch nicht gänzlich geklärt. Denkbar sind Redoxreaktionen oder Reaktionen mit proteolytischen Substanzen, freien Radikalen oder Molekülen wie z. B. Thrombospondin oder Integrin  $\alpha$ v $\beta$ 6 (32, 33).

Rezeptoren für TGF  $\beta$ 1 finden sich auf nahezu allen Zelltypen (62). Das aktive TGF  $\beta$ 1 bindet an der Zelloberfläche und über eine intrazelluläre Signaltransduktion kommt es zu Veränderungen der Transkriptionsleistung im Zellkern (33). Es existieren mindestens drei Rezeptorsubtypen. Interessant für die Fibrogenese sind besonders der Rezeptor Typ I bei der Akkumulation von Matrixproteinen und der Typ II für die Modulation des Zellwachstums (7, 32).

#### 4.5.2. TGF $\beta$ 1 und pulmonale Fibrose

Bereits die *in vitro* – Eigenschaften von TGF  $\beta$ 1 räumen dem Mediator eine Schlüsselrolle als „second-line“ Zytokin der Fibrogenese ein. TGF  $\beta$ 1 stimuliert die Zellwanderung mesenchymaler Zellen. Dabei wirkt es chemotaktisch auf Fibroblasten und Makrophagen (38). Mesenchymale Zellen differenzieren sich unter TGF  $\beta$ 1 zu Myofibroblasten, die für die Fibrogenese von großer Bedeutung sind (15, 29, 62). Aber die entscheidende profibrotische Wirkung von TGF  $\beta$ 1 ist die Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen. Dies geschieht zum einen durch die Induktion der Prokollagentranskription in Fibroblasten bzw. Myofibroblasten und somit zu einer erhöhten Syntheseleistung (12, 32, 38). Auch die Synthese von Fibronectin und Elastin wird gesteigert (22, 53). Zum anderen wird durch TGF  $\beta$ 1 die Stabilität der neu synthetisierten Extrazellulären Matrix gesichert. Durch das Zytokin wird die Kollagenasenaktivität reduziert und Inhibitoren von Kollagenasen werden induziert (12, 32, 38). Es scheint, dass das Gen für TGF  $\beta$ 1 über einen autokrinen Mechanismus hochreguliert wird (15, 28). Dies kann einer Aufrechterhaltung und Verstärkung der fibrotischen Prozesse dienen und in einer schweren Lungenfibrose enden.

Damit der Stellenwert von TGF  $\beta$ 1 bei der Fibrogenese noch genauer festgemacht werden konnte, mussten *in vivo* Versuche folgen. Man induzierte mittels Gentransfer eine transiente Überexpression von aktivem TGF  $\beta$ 1 bei Ratten und suchte nach Auswirkungen auf das Lungenparenchym (53). Ab dem siebten Tag wurde eine schwere, prolongierte Fibrose des Interstitiums und der

Pleura evident. Diese Veränderungen waren von einer ausgedehnten Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine begleitet. Ab dem 14. Tag konnte zudem eine Destruktion der normalen Lungenarchitektur beobachtet werden.

Der genaue Pathomechanismus kann dadurch aber noch nicht vollständig geklärt werden. Deshalb greift man, genau wie bei den Untersuchungen zu PDGF, auf die Induktion einer Lungenfibrose z. B. durch Bleomycin oder andere Agentien im Tiermodell zurück. Die transiente Überexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  führt bei Ratten nach einer Woche zu einem Anstieg des profibrotischen Zytokins TGF  $\beta$ 1 in der BALF (30). Am Tag 14 wird ein Maximum erreicht, doch bleibt der TGF  $\beta$ 1-Spiegel in der Lavage bis zum Tag 60 weiter signifikant erhöht. Gleichzeitig kann man ab dem 21. Tag im Lungenparenchym große fibrotische Zonen finden. Die Zahl an Myofibroblasten und Extrazellulärer Matrix ist gesteigert. Im weiteren Verlauf entwickelt sich eine schwere Lungenfibrose.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen versucht man in einer Modifikation durch Blockierung von TGF  $\beta$ 1 den Beweis zu erbringen, dass die fibrotischen Effekte auf dieses Zytokin zurückzuführen sind. Stellvertretend für die vielen verschiedenen Versuchsansätze, die Wirkungen TGF  $\beta$ 1 beispielsweise mit Relaxin (55), Taurin und Niacin (19), löslichen Rezeptoren für TGF  $\beta$ 1 (56) oder neutralisierenden Antikörpern (16) zu blockieren, ist die Wirkung von Decorin zu nennen. Decorin ist ein endogenes Proteoglykan, das an TGF  $\beta$ 1 bindet und so alle Effekte dieses Zytokins unterdrückt. Der Gentransfer dieses Inhibitors vor Bleomycininstillation minderte bei Mäusen die fibrotische Reaktion signifikant (29). Dabei blieb der initiale Anstieg der Entzündungszellen sowohl im Gewebe als auch nachweislich in der BALF unbeeinflusst. Erst später wurde der Effekt von Decorin sichtbar. In der BALF war die absolute Zellzahl und der Anteil an Neutrophilen Granulozyten signifikant reduziert. Zum anderen zeigte die Histologie weniger narbige Verdichtungen und der Hydroxyprolinegehalt war signifikant vermindert. Ähnliche Ergebnisse erhielt man im „Bleomycin-Hamster-Modell“, als man Decorin immer drei und fünf Tage nach Gabe des Agens verabreichte (17). Diese Beobachtungen unterstreichen die Bedeutung von

TGF  $\beta$ 1 als „second-line“ Zytokin während der Repair-Phase und nicht zur Zeit des Gewebeschadens oder der darauffolgenden Akutphase.

Des weiteren rechtfertigen diese Erkenntnisse die nähere Untersuchung von TGF  $\beta$ 1 bei der Ausbildung der humanen Lungenfibrose. Bei immunhistochemischen Untersuchungen und bei *in situ* Hybridisationen von Lungengewebe von Patienten mit IIP konnte man beobachten, dass TGF  $\beta$ 1 in den Fibroblast Foci verstärkt vorkommt (9, 28). Daneben ist TGF  $\beta$ 1 an Orten mit höherer Matrixdichte vermehrt zu finden (9, 27). Man geht davon aus, dass TGF  $\beta$ 1 mit der Zunahme an Extrazellulärer Matrix korreliert, indem das Zytokin als Stimulus für die gesteigerte Genexpression extrazellulärer Matrixproteine agiert (9). Natürlich stehen dem Untersucher außerdem die BALF und die so gewonnenen Zellen eines Patienten mit IIP als Untersuchungsmedium zur Verfügung. Bei Patienten mit IIP ist im Vergleich zu Gesunden oder zu Patienten mit Sarkoidose das Zytokin TGF  $\beta$ 1 in der BALF und in Zellkulturüberständen von Alveolarmakrophagen signifikant erhöht (50). Doch über die klinische Bedeutung für Krankheitsverlauf und prognostische Aussagen der erhöhten TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen in der BALF ist bisher nur wenig bekannt. Eine Studie konnte zeigen, dass die Konzentration von TGF  $\beta$ 1 in der BALF durchaus eine prognostische Aussagekraft bei Patienten mit IIP besitzt (22). Bei erhöhten bronchoalveolären TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen hatten Patienten im Vergleich zu Betroffenen mit niedrigeren TGF  $\beta$ 1-Werten zwar eine signifikant bessere Lungenfunktion, jedoch zeigten Patienten mit höheren TGF  $\beta$ 1-Spiegeln in der BALF eine signifikant reduzierte Überlebenszeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentration von TGF  $\beta$ 1 sowohl im Serum als auch in der BALF bestimmt, wobei mögliche Beziehungen zwischen der TGF  $\beta$ 1-Konzentration und klinischen Parametern, Krankheitsverlauf oder Prognose einer IIP herausgefunden werden sollten.

Das Zytokin TGF  $\beta$ 1 war im Untersuchungsmaterial aller Patienten dieser Studie nachweisbar. Die mittlere Serumkonzentration von TGF  $\beta$ 1 ist bei Patienten mit IIP im Vergleich zu anderen Diagnosegruppen zwar höher, aber der Unterschied ist viel zu gering um signifikant zu sein. Vielmehr werden relativ

ähnliche Werte im Serum der einzelnen Diagnosegruppen erzielt, so dass die Konzentration von TGF  $\beta$ 1 im Serum keinen Hinweis auf die Art der Erkrankung geben kann. Auch zum klinischen Verlauf oder die Prognose können keine Schlüsse gezogen werden, denn es fehlen Korrelationen für TGF  $\beta$ 1 im Serum zu diesen Parametern. Die Bestimmung der ZytokinKonzentration im Serum bei Patienten mit IIP bringt folglich keine neuen Aufschlüsse. Die Lungenfibrose beschränkt sich auf das Organ Lunge, systemische Veränderungen sind nicht festzustellen. Relevante Marker verlassen die Lunge nicht in ausreichender Menge, um eine Veränderung der Serumkonzentration hervorzurufen (39).

Im Gegensatz hierzu steht die mittlere Konzentration von TGF  $\beta$ 1 in der BALF bei Patienten mit IIP. Abgesehen von der Diagnosegruppe übrige ILD und Pneumonie ist der Mittelwert von TGF  $\beta$ 1 in der Lavage gegenüber den anderen Diagnosegruppen sichtbar erhöht. Patienten mit Pneumonie lassen sich meist schon anhand der Klinik von anderen ILD abgrenzen. Bezüglich der relativ hohen mittleren TGF  $\beta$ 1-Konzentration in der BALF bei Patienten mit übrigen ILD bekommt man bei näherer Betrachtung der Einzelergebnisse auch einen anderen Blickwinkel. Eine Übersicht der Einzelergebnisse von TGF  $\beta$ 1 in der BALF bei Patienten mit übrigen ILD gibt folgendes Diagramm.

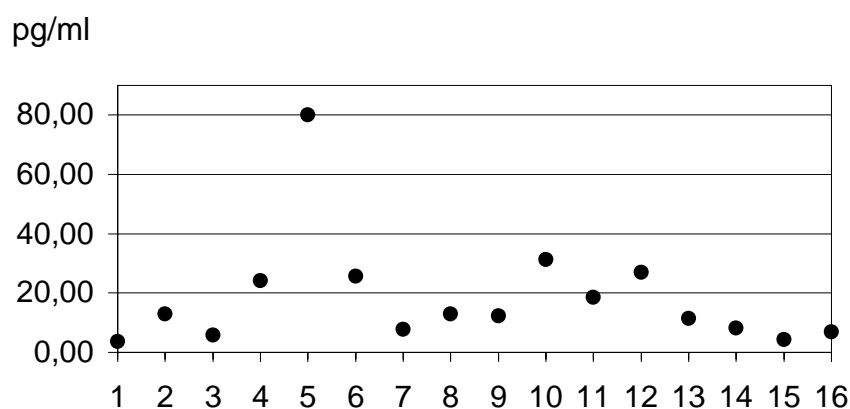


Abb. 8: Einzelergebnisse von TGF  $\beta$ 1 in der Lavage bei den 16 Patienten mit übrigen ILD

Errechnet man den Median der ermittelten Daten bei übrigen ILD, erhält man einen Wert von 12,61 pg/ml. Dieser entspricht nahezu dem Kontrollwert. Somit bestehen wahrscheinlich doch Unterschiede in der bronchoalveolären Konzentration von TGF  $\beta$ 1 zwischen Patienten mit IIP und den anderen Diagnosegruppen. Zusammenfassend kann man dem Parameter TGF  $\beta$ 1 in der BALF also eine diagnostische Relevanz für Patienten mit IIP zusprechen. Hohe Konzentrationen von TGF  $\beta$ 1 in der Lavage weisen auf eine IIP hin. Zumal für TGF  $\beta$ 1 in der Lavage bei Patienten mit UIP im Vergleich zu Patienten mit NSIP/DIP ein signifikanter Unterschied besteht. Das bedeutet, dass Patienten mit dem stärker fibrotischen Phänotyp, wie er bei einer UIP zu beobachten ist, höhere Konzentrationen von TGF  $\beta$ 1 in der BALF aufweisen. Diese Tatsache ist sehr hilfreich und kann den Diagnoseprozess beschleunigen. Ein signifikant erhöhter TGF  $\beta$ 1-Wert in der BALF kann erste Hinweise geben, dass es sich um eine IIP oder genauer um eine UIP handeln kann. Eine beweisende Histologiegewinnung unter VATS wird aber dennoch in den meisten Fällen erforderlich sein.

Die positive Korrelation zwischen TGF  $\beta$ 1 und Neutrophilen Granulozyten in der Lavage - sowohl bei Patienten mit IIP, als auch bei Patienten mit UIP - deutet darauf hin, dass diese Zellen ein möglicher Ursprungsort des Zytokins sein könnte. Zu anderen klinischen Parametern, wie Lungenfunktionswerte, Krankheitsdauer oder Ansprechen auf Therapie konnten in der aktuellen Studie keine Korrelationen gefunden werden. Eventuell gibt TGF  $\beta$ 1 jedoch durch die positive Korrelation zu den Neutrophilen Granulozyten indirekt einen prognostische Hinweis. Einige Studien konnten nämlich zeigen, dass ein ansteigender Prozentsatz von Neutrophilen Granulozyten in der BALF mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (1, 21). Außerdem konnte man beobachten, dass Patienten mit stark erhöhten TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen in der BALF eine signifikant kürzere Überlebenszeit hatten als Patienten mit TGF  $\beta$ 1-Konzentrationen unter der Nachweisgrenze (22).

All diese Daten sprechen TGF  $\beta$ 1 eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese einer Lungenfibrose zu. Die Bedeutung für TGF  $\beta$ 1 als second-line Zytokin bei

der Fibrogenese wird bestärkt. Mit der aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Mediator in der BALF zugänglich ist und bei Patienten mit fibrotisierenden Lungenerkrankungen signifikant erhöht ist. Möglicherweise kann man zudem anhand der TGF  $\beta$ 1-Konzentration in der BALF prognostische Hinweise erhalten. Aber die genaue klinische Bedeutung bleibt noch zu klären.



## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der aktuellen Arbeit wurde im Serum und in der BALF von 87 Patienten die Zytokine PDGF-AB und TGF  $\beta$ 1 bestimmt. Nach der Analyse wurden die Patienten verschiedenen Diagnosegruppen zugeordnet. Als Kontrollgruppe verwendete man die Daten von 16 Patienten, die sich einer Bronchoskopie mit Lavage unterzogen, aber nicht an einer Lungenerkrankung leiden.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse kam man zu dem Resultat, dass weder für PDGF-AB, noch für TGF  $\beta$ 1 im Serum signifikante Unterschiede vorliegen. Andere Ergebnisse zeigen sich für das Untersuchungsmedium BALF. Die Konzentration von TGF  $\beta$ 1, aber nicht von PDGF-AB, in der Lavage von Patienten mit IIP ist im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Außerdem zeigen Patienten mit UIP signifikant höhere Werte von TGF  $\beta$ 1 in der BALF als Patienten mit NSIP/DIP. Das bedeutet, dass Patienten mit einem stärker fibrotischen Phänotyp höhere Spiegel des profibrotischen Zytokins TGF  $\beta$ 1 in der BALF aufweisen. Dies spricht für eine Verbindung zwischen fibrotischen Phänotypen von ILD und den erhöhten BALF-Spiegeln von TGF  $\beta$ 1.

Es wurde keine Beziehung zwischen TGF  $\beta$ 1-Werten in der BALF und klinischem Verlauf, Prognose oder diagnostischen Parametern beobachtet. Ob die Bestimmung des Parameters TGF  $\beta$ 1 in der BALF einen Stellenwert im klinischen Alltag erhält, müssen prospektive Studien zeigen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. American Thoracic Society:  
Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment  
International Consensus Statement  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000;161:646-664.
2. 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.
3. Antoniadou H.N., Bravo M.A., Avila R.E., Galanopoulos T., et al.:  
Platelet-derived Growth Factor in Idiopathic Pulmonary Fibrosis  
J. Clin. Invest. 1990;86:1055-1064.
4. Awad M.R., El-Gamel A., Hasleton P., Turner D.M., et al.:  
Genotypic Variation In The Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Gene  
Transplantation 1998;66(8):1014-1020.
5. Bonner J.C., Badgett A., Lindroos P.M., Osornio-Vargas A.R.:  
Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Downregulates the Platelet-derived  
Growth Factor  $\alpha$ -Receptor Subtype on Human Lung Fibroblasts In Vitro  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1995;13:496-505.

6. Bonner J.C., Lindroos P.M., Rice A.B., Moomaw C.R., Morgan D.L.:  
Induction of PDGF receptor- $\alpha$  in rat myofibroblasts during pulmonary fibrogenesis in vivo  
Am. J. Physiol. 1998;274:L72-L80.
7. Border W.A., Noble N.A.:  
Transforming Growth Factor  $\beta$  In Tissue Fibrosis  
N. Engl. J. Med. 1994;331(19):1286-1292.
8. Britton J., Hubbard R.:  
Recent advances in the aetiology of cryptogenic fibrosing alveolitis  
Histopathol. 2000;37:387-392.
9. Broekelmann T.J., Limper A.H., Colby T.V., McDonald J.A.:  
Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;88:6642-6646.
10. Crouch E.:  
Pathobiology of pulmonary fibrosis  
Am. J. Physiol. 1990;259:L159-L184.
11. Coker R.K., Laurent G.J.:  
Pulmonary fibrosis: cytokines in the balance  
Eur. Respir. J. 1998;11:1218-1221.
12. Eickelberg O., Köhler E., Reichenberger F., Bertschin S., et al.:  
Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3  
Am. J. Physiol. 1999;276:L814-L824.

13. Fichter J., Sybrecht G.W.:  
Interstitielle Lungenerkrankungen. In: Thiemes Innere Medizin: TIM.  
Stuttgart; New York: Thieme;1999:1505-1516.
14. Gauldie J., Jordana M., Cox G.:  
Cytokines and pulmonary fibrosis  
Thorax 1993;48:931-935.
15. Gauldie J., Sime P.J., Xing Z., Marr B., Tremblay G.M.:  
Transforming Growth Factor- $\beta$  Gene Transfer to the Lung Induces  
Myofibroblast Presence and Pulmonary Fibrosis. In: Desmouliere A.,  
Tuchweber B. editors. Tissue repair and fibrosis: current topics in  
pathology.  
Berlin: Springer-Verlag;1999 (93):35-45.
16. Giri S.N., Hyde D.M., Hollinger M.A.:  
Effect of antibody to transforming growth factor  $\beta$  on bleomycin induced  
accumulation of lung collagen in mice  
Thorax 1993;48:959-966.
17. Giri S.N., Hyde D.M., Braun R.K., Gaarde W., et al.:  
Antifibrotic Effect of Decorin in a Bleomycin Hamster Model of Lung  
Fibrosis  
Biochem. Pharmacol. 1997;54:1205-1216.
18. Goldstein R.H., Fine A.:  
Potential Therapeutic Initiatives for Firogenic Lung Diseases  
Chest 1995;108:848-855.

19. Gurujeyalakshmi G., Hollinger M.A., Giri S.N.:  
Regulation of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 mRNA Expression by  
Taurine and Niacin in Bleomycin Hamster Model of Lung Fibrosis  
Am. J. Cell Mol. Biol. 1998;18:334-342.
20. Gurujeyalakshmi G., Hollinger M.A., Giri S.N.:  
Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung  
fibrosis at the translational level  
Am. J. Physiol. 1999;276:L311-L318.
21. Haslam P.L., Turton C.W.G., Heard B., Lukoszek A., et al.:  
Bronchoalveolar lavage in pulmonary fibrosis: comparison of cells  
obtained with lung biopsy and clinical features  
Thorax 1980;35:9-18.
22. Hiwatari N., Shimura S., Yamauchi K., Nara M., et al.:  
Significance of Elevated Procollagen-III-Peptide and Transforming  
Growth Factor- $\beta$  Levels of Bronchoalveolar Lavage Fluids from Idiopathic  
Pulmonary Fibrosis Patients  
Tohoku J. Exp. Med. 1997;181(2):285-295.
23. Homma S., Nagaoka I., Abe H., Takahashi K., et al.:  
Localization of Platelet-derived Growth Factor and Insulin-like Growth  
Factor I in the Fibrotic Lung  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1995;152:2084-2089.
24. Hoyle G.W., Li J., Finkelstein J.B., Eisenberg T., et al.:  
Emphysematous Lesions, Inflammation, and Fibrosis in the Lungs of  
Transgenic Mice Overexpressing Platelet-Derived Growth Factor  
Am. J. Pathol. 1999;154(6):1763-1775.

25. Kapanci Y., Desmouliere A., Pache J.-C., Redard M., Gabbiani G.:  
Cytoskeletal Protein Modulation in Pulmonary Alveolar Myofibroblasts during Idiopathic Pulmonary Fibrosis  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1994;152:2163-2169.
26. Katzenstein A.-L.A., Myers J.L.:  
Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Relevance of Pathologic Classification  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998;157:1301-1315.
27. Khalil N., O'Conner R.N., Unruh H.W., Warren P.W., et al.:  
Increased Production and Immunohistochemical Localisation of Transforming Growth Factor- $\beta$  in Idiopathic Pulmonary Fibrosis  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1991;5:155-162.
28. Khalil N., O'Conner R.N., Flanders K.C., Unruh H.:  
TGF- $\beta$ 1, But Not TGF- $\beta$ 2 or TGF- $\beta$ 3, Is Differentially Present in Epithelial Cells of Advanced Pulmonary Fibrosis: An Immunohistochemical Study  
Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 1996;14:131-138.
29. Kolb M., Margetts P.J., Galt T., Sime P.J., et al.:  
Transient Transgene Expression of Decorin in the Lung Reduces the Fibrotic Response to Bleomycin  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 163:770-777.
30. Kolb M., Margretts P.J., Anthony D.C., Pitossi F., Gauldie J.:  
Transient expression of IL-1 $\beta$  induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis  
J. Clin. Invest. 2001;107:1529-1536.

31. Lasky J.A., Tonthat B., Liu J.-Y., Friedman M., Brody A.R.:  
Upregulation of the PDGF-alpha Receptor Precedes Asbestos-induced Lung Fibrosis in Rats  
Am. J. Respr. Crit. Care Med. 1998;157:1652-1657.
32. Lasky J.A., Brody A.R.:  
Interstitial Fibrosis and Growth Factors  
Environ. Health Perspect. 2000;108(Suppl. 4):751-762.
33. Letterio J.J., Roberts A.B.:  
Molecule of the Month TGF  $\beta$ : A Critical Modulator of Immune Cell Function  
Clin. Immunol. Immunopathol. 1997;84(3):244-250.
34. Liebow A.A.:  
Definition and classification of interstitial pneumonias in human pathology  
Prog. Respir. Res. 1975;8:1-31.
35. Ludowicka A., Ohba T., Trojanowska M., Yamakage A., et al.:  
Elevated Levels of Platelet Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Scleroderma  
J. Rheumatol. 1995;22(10):1876-1883.
36. Manson R.J., Schwarz M.I., Hunninghake G.W., Musson R.A.:  
Pharmacological Therapy for Idiopathic Pulmonary Fibrosis Past, Present and Future  
Am. J. Crit. Care Med. 1999;160:1771-1777.

37. Martinet Y., Rom W.N., Grotendorst G.R., Martin G.R., et al.:  
Exaggerated Spontaneous Release Of Platelet-Derived Growth Factor  
By Alveolar Macrophages From Patients With Idiopathic Pulmonary  
Fibrosis  
N. Engl. J. Med. 1987;317:202-209.
38. Martinet Y., Menard O., Vaillant P., Vignaud J.-M., Martinet N.:  
Cytokines in human lung fibrosis  
Arch. Toxicol. Suppl. 1996;18:127-139.
39. Müller-Quernheim J.:  
Serum Markers for the Staging of Disease Activity of Sarcoidosis and  
Other Interstitial Lung Diseases of Unknown Etiology  
Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis. 1998;15:22-37.
40. Mutsaers S.E., Harrison N.K., McAnulty R.J., Liao J.Y., et al.:  
Fibroblast mitogens in BALF from asbestos-exposed subjects with and  
without clinical evidence of asbestosis: no evidence for the role of PDGF,  
TNF- $\alpha$ , IGF-1, or IL-1 $\beta$   
J. Pathol. 1998;185(2):199-203.
41. Nagaoka I., Trapnell B.C., Crystal R.G.:  
Upregulation of Platelet-derived growth Factor-A and -B Gene  
Expression in Alveolar Macrophages of Individuals with Idiopathic  
Pulmonary Fibrosis  
J. Clin. Invest. 1990;85:2023-2027.
42. Nicod L.P.:  
Recognition and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis  
Drugs 1998;55(4):555-562.



43. Ohta K., Nakano J., Nishizawa M., Kaneta M., et al.:  
Suppressive Effect of Antisense DNA of Platelet-Derived Growth Factor  
on Murine Pulmonary Fibrosis With Silica Particles  
Chest 1997;111:105S.
44. Park C.S., Chung S.W., Ki S.Y., Lim G.-I., et al.:  
Increases Levels of Interleukin-6 Are Associated with Lymphocytosis in  
Bronchoalveolar Lavage Fluids of Idiopathic Nonspecific Interstitial  
Pneumonia  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2000;162:1162-1168.
45. Reynolds H.Y.:  
Diagnostic and Management Strategies for Diffuse Interstitial Lung  
Diseases  
Chest 1998;113:192-202.
46. Reynolds H.Y.:  
Use of Bronchoalveolar Lavage in Humans – Past Necessity and Future  
Imperative  
Lung 2000;178:271-293.
47. Rice A.B., Moomaw C.R., Morgan D.L., Bonner J.C.:  
Specific Inhibitors of Platelet-Derived Growth Factor or Epidermal Growth  
Factor Receptor Tyrosine Kinase Reduce Pulmonary Fibrosis in Rats  
Am. J. Pathol. 1999;155(1):213-221.
48. Rodemann H.P., Binder A., Burger A., Güven N., et al.:  
The underlying cellular mechanism of fibrosis  
Kidney Int. Suppl. 1996;54:S32-S36.

49. Rojas-Valencia L., Montiel F., Montano M., Selman M., Pardo A.:  
Expression of a 2.8-kb PDGF-B/c-sis Transcript and Synthesis of PDGF-Like Protein by Human Lung Fibroblasts  
Chest 1995;108:240-245.
50. Salez F., Gosset P., Copin M.C., Degros C.L., et al.:  
Transforming growth factor- $\beta$ 1 in sarcoidosis  
Eur. Respir. J. 1998;12:913-919.
51. Sasaki M., Kishima M., Ito T., Watanabe A., et al.:  
Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, Interleukin-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$   
Mediators Inflamm. 2000;9:155-160.
52. Selman M., King T.E., Prado A.:  
Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Prevailing and Evolving Hypotheses about Its Pathogenesis and Implications for Therapy  
Ann. Intern. Med. 2001;134:136-151.
53. Sime P.J., Xing Z., Graham F.L., Csaky K.G., Gauldie J.:  
Adenovector-mediated Gene Transfer of Active Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Induces Prolonged Severe Fibrosis in Rat Lung  
J. Clin. Invest. 1997;100(4):768-776.
54. Uh S.T., Inoue Y., King T.E., Chan E.D., et al.:  
Morphometric Analysis of Insulin-like Growth Factor-I Localisation in Lung Tissue of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998;158:1626-1635.

55. Unemori E.N., Pickford L.B., Salles A.L., Piercy C.E., et al.:  
Relaxin Induces an Extracellular Matrix-degrading Phenotype in Human Lung Fibroblasts In Vitro and Inhibits Lung Fibrosis in a Murine Model In Vivo  
J. Clin. Invest. 1996;98(12):2739-2745.
56. Wang Q., Wang Y., Hyde D.M., Gotwals P.J., et al.:  
Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor  $\beta$  soluble receptor in hamsters  
Thorax 1999;54:805-812.
57. Ward P.A., Hunninghake G.W.  
Lung Inflammation and Fibrosis  
Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1998;157:S123-S129.
58. Westergren-Thorsson G., Hernnäs J., Särnstrand B., Oldberg A., et al.:  
Altered Expression of Small Proteoglycans, Collagen, and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Developing Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Rats  
J. Clin. Invest. 1993;92:632-637.
59. Xing Z., Jordana M., Gauldie J., Wang J.:  
Cytokines and pulmonary inflammatory and immune diseases  
Histol. Histopathol. 1999;14:185-201.
60. Yi E.S., Lee H., Yin S., Piguet P., et al.:  
Platelet-Derived Growth Factor Causes Pulmonary Cell Proliferation and Collagen Deposition in Vivo  
Am. J. Pathol. 1996;149:539-548.

61. Yoshida M., Sakuma-Mochizuki J., Abe K., Arai T., et al.:  
In Vivo Gene Transfer of an Extracellular Domain of Platelet-Derived  
Growth Factor  $\beta$  Receptor by the HVJ-Liposome Method Ameliorates  
Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999;265:503-508.
  
62. Zhang K., Phan S.H.:  
Cytokines and Pulmonary Fibrosis  
Biol. Signals 1996;5:232-239.

## **Dankesworte**

Herrn Professor Dr. med. G. Ertl danke ich für die Möglichkeit, an der Medizinischen Klinik promoviert werden zu können und für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Dr. med. M. Schmidt gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Überlassung des Themas und die Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Frau M. Wechner danke ich für die jederzeit freundliche Hilfsbereitschaft im Labor sowie ihre unerschöpfliche Geduld und Interesse an dieser Arbeit. Jederzeit fand sie ein aufmunterndes Wort und hatte immer Zeit bei Problemen jeder Art.

Für die allzeit freundliche und tatkräftige Betreuung meiner Arbeit und die großzügige Unterstützung bei den Vorbereitungen für die Teilnahme am World Congress on Lung Health Florence 2000 möchte ich mich ganz besonders bei Priv.-Doz. Dr. med. M. Kolb bedanken. Seine Ratschläge waren mir immer wieder Ansporn und Ermutigung, was nicht zuletzt zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrug.

Außerdem danke ich für die Hilfe von Dr. med. J. Schönberger und Dr. med. J. Willner.

## Lebenslauf

Name: Vogel  
Vorname: Eva  
Geburtsdatum: 04. Juni 1977  
Geburtsort: Würzburg  
Eltern: Peter und Rita Vogel

Schulbildung: 1983 – 1987 Grundschule Rottendorf  
1887 – 1996 St. Ursula Schule Würzburg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung: Beginn des Studium der Humanmedizin an der  
Bayrischen Julius-Maximilians-Universität zu  
Würzburg zum Wintersemester 1996/1997  
15.09.1998 Ärztliche Vorprüfung  
31.08.1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
21.03.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
22.05.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung