

Abschätzung der radiologischen Progredienz
aus punktuell gemessenen Laborparametern bei Patienten
mit Rheumatoider Arthritis

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Michael Jannis Winkens
geboren am 19.02.1983 in Erkelenz

Gutachter

Prof. Dr. G. Hein, Jena

Prof. Dr. R. Bräuer, Jena

Prof. Dr. B. Swoboda, Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01. Dezember 2009

1 Abkürzungsverzeichnis

^{99m} Tc	metastabiles Technetium-Isotop
ACR	American College of Rheumatology
AKA	Anti-Keratin-Antikörper
al.	alii
APF	antiperinukleärer Faktor
BMI	body mass index
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCP	cyclic citrullinated peptide
CD	cluster of differentiation
COBRA	Combinatietherapie Bij Reumatoïde Artritis
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CrP	C-reaktives Protein
CTX	carboxy-terminales (C-terminales) Telopeptid
DA	Durchschnittsalter
DAS	disease activity score
dED	durchschnittliche Erkrankungsdauer
DMARD	disease modifying anti-rheumatic drug
Dpyd	Desoxypyridinolin
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
g	Konstante der Schwerebeschleunigung der Erde
HCl	Salzsäure
HFBA	heptafluorobutyric acid
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Mb.	Morbus
MCP	monocyte chemoattractant protein
MCV	mutated citrullinated vimentin

MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomografie
N.	Nervus
n	Anzahl der Patienten
NF- κ B	nukleärer Faktor κ B
n. s.	nicht signifikant
OPG	Osteoprotegerin
P	Progredienz
p	Signifikanzniveau
PAD	Peptidylarginin-Deiminase
PAMP	pathogen associated molecular patterns
Pyd	Pyridinolin
r	Korrelationskoeffizient
RA	Rheumatoide Arthritis
RAI	Ritchie Articular Index
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RF	Rheumafaktor
SD	Standardabweichung
SF	Synovialflüssigkeit
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
sRANKL	soluble Receptor Activator of NF- κ B-Ligand
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TLR	toll-like receptor
U	units
U/min	Umdrehungen pro Minute
VAS	visuelle Analogskala

2 Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Abkürzungsverzeichnis.....	3
2 Inhaltsverzeichnis	5
3 Zusammenfassung	7
4 Einleitung	9
4.1 Rheumatoide Arthritis	9
4.1.1 Definition	9
4.1.2 Symptomatik und Diagnostik	9
4.1.3 Prävalenz.....	14
4.1.4 Pathogenese.....	14
4.2 Diagnostisch relevante Laborparameter	18
4.2.1 Allgemeine Entzündungsparameter – das C-reaktive Protein	18
4.2.2 Knorpelmarker.....	18
4.2.2.1 COMP	18
4.2.2.2 CTX-II.....	19
4.2.3 Knochenmarker.....	20
4.2.3.1 CTX-I.....	20
4.2.3.1 Das OPG-sRANKL-RANK-System	22
4.2.4 Knochen- und Knorpelabbaumarke – die Kollagen-Crosslinks.....	23
4.2.5 Anti-CCP- und Anti-MCV-Antikörper	25
5 Zielstellung	28
6 Methodik	29
6.1 Patientenkollektiv	29
6.2 Materialien.....	31
6.2.1 Ermittlung der BSG und CrP-Konzentration.....	31
6.2.2 Ermittlung der Konzentration von COMP	32
6.2.3 Ermittlung der Konzentration von CTX-I und CTX-II.....	33
6.2.4 Ermittlung der Konzentration von sRANKL und OPG	33
6.2.5 Ermittlung der Kollagen-Crosslink-Konzentration	33
6.2.5.1 Materialgewinnung.....	33
6.2.5.2 Methodik.....	33

Inhaltsverzeichnis	6
6.2.5.3 Probenvorbereitung und HPLC	34
6.3 Statistik	35
7 Ergebnisse	36
8 Diskussion.....	47
9 Schlussfolgerung	61
10 Literatur- und Quellenverzeichnis.....	63
11 Anhang.....	78
11.1 tabellarischer Lebenslauf.....	78
11.2 Danksagung.....	79
11.3 Ehrenwörtliche Erklärung	80

3 Zusammenfassung

EINLEITUNG Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische, meist das Knorpel- und Knochengewebe destruierende Systemerkrankung, deren Pathogenese bis heute nicht hinreichend geklärt werden konnte. Besonders schwierig ist es, bereits in den ersten Wochen und Monaten nach der Diagnosestellung „Rheumatoide Arthritis“ Aussagen über den weiteren Verlauf dieser Erkrankung zu treffen und so optimalerweise diejenigen Patienten zu identifizieren, die auf Grund einer aggressiven Verlaufsform einer intensivierten Therapie, zum Beispiel mit so genannten Biologicals bedürfen.

ZIELSTELLUNG Ziel dieser Arbeit ist es, retrospektiv zu untersuchen, inwieweit die radiologische Progredienz mit einer Reihe von Labormarkern sowie dem Patientenalter korreliert, ob also statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen dem Grad der radiologisch detektierbaren, bisher stattgehabten Destruktion des Skelettsystems und dem Ausmaß der pathologischen Veränderung von Laborparametern nachzuweisen sind.

PATIENTENGUT UND METHODIK Es wurden zwischen 1998 und 2004 insgesamt 40 Patienten aus der Rheumatologischen Fachambulanz der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität Jena in diese retrospektive Querschnittsstudie einbezogen, die alle jeweils die ACR-Kriterien zur Diagnose der Rheumatoiden Arthritis erfüllten. Diese 40 Patienten besaßen ein Durchschnittsalter (DA) von $54,6 \pm 17,6$ Jahren und eine durchschnittliche Erkrankungsdauer (dED) von $9,3 \pm 10,8$ Jahren. Das Kollektiv bestand aus 29 weiblichen (DA $54,2 \pm 19,1$ Jahre; dED $10,7 \pm 12,2$ Jahre) und elf männlichen Patienten (DA $55,6 \pm 13,8$ Jahre; dED $5,6 \pm 4,6$ Jahre). Es erfolgte die Ermittlung der Blutkörperchengsenkungsgeschwindigkeit (BSG) bei 34 Patienten ($n = 34$) sowie der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CrP) im Serum ($n = 36$) und in der Synovialflüssigkeit ($n = 25$). Bei insgesamt 26 Patienten wurde die Konzentration des Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in der Synovialflüssigkeit gemessen. Bei allen 40 Patienten wurden die Konzentrationen des C-terminalen Telopeptides des Typ-I-Kollagens (CTX-I) im Urin und im Serum sowie die des C-terminalen Telopeptides des Typ-II-Kollagens (CTX-II) im Urin bestimmt. Außerdem wurden die Konzentrationen des löslichen Rezeptor-Aktivator-Liganden des nukleären Faktors κ B (sRANKL) in der Synovialflüssigkeit ($n = 22$) und im Serum ($n = 16$) sowie von Osteoprotegerin (OPG) in der Synovialflüssigkeit ($n = 17$) und im Serum ($n = 16$) ermittelt. Schließlich erfolgte die Messung der Konzentrationen der Kollagen-Crosslinks

Pyridinolin (Pyd) und Desoxypyridinolin (Dpyd) im Urin (bei jeweils $n = 38$ Patienten), in der Synovialflüssigkeit ($n = 39$) sowie im Blutserum ($n = 19$).

Die radiologische Progredienz (P) berechnet sich aus dem Quotienten des Röntgenstadiums nach Steinbrocker an Hand aktueller, für das Krankheitsbild repräsentativer Röntgenaufnahmen geteilt durch die bisherige Krankheitsdauer in Jahren des jeweiligen Patienten.

ERGEBNISSE Nach Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergeben sich folgende Ergebnisse: Die Progredienz korreliert negativ mit dem kalendarischen Alter des Patienten ($r = -0,48$; $p = 0,002$; $n = 40$), das heißt je jünger der Patient ist, desto klinisch aggressiver ist die RA bisher verlaufen. Außerdem zeigt sich ein positiver Zusammenhang von P mit der CrP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit ($r = 0,62$; $p = 0,001$; $n = 25$), nicht aber im Serum ($r = 0,13$; n.s.; $n = 36$). Hochsignifikant ist ein Zusammenhang zwischen der CTX-II-Konzentration im Urin und der Progredienz ($r = 0,69$; $p < 0,0005$; $n = 40$). Es kann außerdem eine positive Korrelation zwischen der Progredienz und der CTX-I-Konzentration im Urin ($r = 0,36$; $p = 0,022$; $n = 40$) nachgewiesen werden; im Serum ist eine solche Relation dagegen nicht signifikant ($r = 0,22$; n.s.; $n = 40$). Statistisch signifikante Beziehungen zwischen der Progredienz und den Markern COMP, sRANKL, OPG, Pyd oder Dpyd ergeben sich weder im Blutserum noch im Urin oder in der Synovialflüssigkeit. Nach den Ergebnissen einer multiplen, linearen Regressionsanalyse besteht in der Kombination verschiedener, oben genannter Parameter die stärkste statistische Beziehung zwischen der Progredienz und einer Formel, welche die CTX-I-Konzentration im Serum, die CTX-II-Konzentration im Urin und die Pyridinolinkonzentration in der Synovialflüssigkeit beinhaltet ($R^2 = 0,651$; $n = 39$). Mittels dieser Formel kann keine Aussage zur lokalen Entzündungsaktivität im engeren Sinne getroffen werden.

SCHLUSSFOLGERUNG Aus den vorliegenden Ergebnissen wird ersichtlich, dass retrospektiv die radiologisch detektierbaren Destruktionsvorgänge des Knochen- und Knorpelmaterials von RA-Patienten relativ gut mit einem (CTX-II im Urin) oder mehreren (CTX-II im Urin, CTX-I im Serum und Pyd in der Synovialflüssigkeit) Abbaumarkern beschrieben werden können. Die Zerstörungsprozesse des skelettalen Stützsystems und die intraartikulären Inflammationszustände scheinen zwei pathogenetisch voneinander getrennte Mechanismen darzustellen, da laborchemische Entzündungsparameter nicht signifikant in die erwähnte Formel integriert werden können. Eine Aussage, ob sich die untersuchten Laborparameter zur Prädiktion von radiologisch sichtbaren Destruktionen eignen, bleibt zukünftigen Studien vorbehalten.

4 Einleitung

4.1 Rheumatoide Arthritis

4.1.1 Definition

Die Rheumatoide Arthritis (RA) – im deutschen Sprachraum auch oft noch als chronische Polyarthritiden bezeichnet – ist eine entzündliche Systemerkrankung, welche hauptsächlich mit Knorpelabbau und -zerstörung in bestimmten Gelenken sowie Erosionen beziehungsweise Destruktionen der darunter liegenden Knochensubstanz einhergeht (Harris 1990). Daneben ist allerdings auch das allgemeine Bindegewebe mit den Folgen einer Serositis und damit einem Befall von extraartikulären Kompartimenten wie zum Beispiel Schleimbeutel und -häute betroffen.

Fakultativ ist eine Manifestation in extraartikulären Organen möglich; als häufigste viszerale Komplikationen treten Pleuritiden, Perikarditiden, Keratokonjunktivitiden sowie digitale Vaskulitiden auf. Außerdem ist die Entstehung von Rheumaknoten eine weitere Folge der Systemerkrankung Rheumatoide Arthritis; sie finden sich sowohl in Sehnen als auch subkutan vor allem an den Streckseiten der Gelenke.

4.1.2 Symptomatik und Diagnostik

Unspezifische Allgemeinsymptome sind zunächst Abgeschlagenheit, nächtliches Schwitzen und Myalgien. Später kommt es zu einer Polyarthritiden, eventuell verbunden mit einer Bursitis mit Bildung eines Pannus und Zerstörung des Gelenks. Die RA beginnt oft symmetrisch an den kleinen Gelenken der Finger (zum Beispiel Fingergrund- und proximale Interphalangealgelenke); im Falle eines akuten Entzündungsschubes kann es zu schmerzhaften Gelenkergüssen kommen. Außerdem besteht die Möglichkeit der Entstehung nervaler Engpasssyndrome wie zum Beispiel dem Karpaltunnelsyndrom. Hierbei kann auf Grund der Entzündung der Sehnenscheiden der N. medianus komprimiert werden – Parästhesien sowie motorische und sensible Funktionsverluste sind dann Folgeerscheinungen. Folgen der digitalen Gelenkdestruktionen können sein: Schwanenhalsdeformität der Finger durch Überstreckung im Mittelgelenk und Beugung im Endgelenk, Knopflochdeformität der Fingermittelgelenke oder eine ulnare

Fingerdeviation. Später zeigen sich weitere Entzündungssymptome typischerweise an zentripetaler gelegenen Gelenken, vor allem jedoch den Knie- und Sprunggelenken. Eine Manifestation der Rheumatoiden Arthritis an den distalen Interphalangealgelenken sowie an Brust- oder Lendenwirbelsäule ist nahezu ausgeschlossen.

Sonderformen der Rheumatoiden Arthritis sind unter anderem das so genannte Felty-Syndrom – eine schwere Verlaufsvariante im Erwachsenenalter, die mit einer Hepatosplenomegalie, generalisierten Lymphknotenschwellungen, einer Granulozytopenie und in 95 Prozent der Fälle mit HLA-DR4 positiven Befunden einhergeht – oder der Mb. Still – eine von vielen chronischen, juvenilen Verlaufsvarianten der RA, welcher insbesondere durch hohes Fieber, Polyarthritis, Exantheme, einer Polyserositis von Perikard und Pleura gekennzeichnet ist und insgesamt eine deutlich schlechtere Prognose als die typische Rheumatoide Arthritis besitzt.

1987 wurden vom American College of Rheumatology die folgenden Kriterien zur Diagnosesicherung der RA festgelegt (Arnett et al. 1988):

- Morgensteifigkeit über mindestens eine Stunde
- schmerzhafte Anschwellung in mindestens drei Gelenkregionen
- Arthritis von Hand-, Fingergrund- und Mittelgelenken
- symmetrischer Gelenkbefall
- Rheumaknötchen
- serologischer Nachweis von Rheumafaktoren
- typische radiologisch diagnostizierbare Veränderungen.

Zur Sicherung der Diagnose müssen mindestens vier dieser sechs Kriterien über sechs Wochen Bestand haben.

Typisch für die RA und sonografisch gut zu erkennen ist die so genannte Baker-Zyste im Bereich der Kniekehle – es ist das morphologische Korrelat einer Hernie der Kniegelenkscapsel. Neben den oben beschriebenen viszeralen Beteiligungen kann sich schließlich auch ein Sicca-Syndrom – ein sekundäres Sjögren-Syndrom – mit verminderter Speichelproduktion manifestieren.

Ein diagnostischer Nachweis von Knorpel- und Gelenkveränderungen ist auf mehrfache Weise möglich: Die konventionelle Röntgenaufnahme betroffener Gelenke lässt die Einteilung in mehrere Klassifikationen der sichtbaren Destruktionen zu – neben der hier verwendeten Klassifikation nach Steinbrocker, folglich Tab. 4, Seite 30 (Steinbrocker et al. 1949) sind heute

eher die Beurteilungen nach dem (modifizierten) Larsen-Score (Larsen et al. 1977, Larsen und Thoen 1987) (s. Tab. 1, S. 11) oder dem modifizierten Sharp-Score (Keystone et al. 2004, Breedveld et al. 2006) (s. Tab. 2, S. 12) üblich. Zur Berechnung des Larsen-Scores werden konventionelle Röntgenbilder der oberen und unteren Extremitäten aufgenommen; hieraus ergeben sich 120 repräsentative Gelenke, von denen jedem der entsprechende radiologische Veränderungsgrad zugeteilt wird. In der Addition dieser Zahlenwerte ergibt sich schließlich ein Gesamtscore, der so genannte modifizierte Damagescore, an Hand dessen eine Verlaufsbeobachtung beziehungsweise Beurteilung der radiologischen Progredienz möglich wird (Larsen et al. 1977, Larsen und Thoen 1987).

Tab. 1: modifizierter Larsen-Score zur radiologischen Beurteilung der knöchernen Destruktionen der Rheumatoiden Arthritis mit Hilfe von Standardreferenzfilmen

<i>Gradeinteilung</i>	<i>Art der radiologischen Veränderungen</i>
Grad 0	<u>keine Veränderung</u>
Grad 1A	<u>geringe Veränderungen:</u> -periartikuläre Weichteilschwellung und/oder -periartikuläre Osteoporose und/oder -leichte Gelenkspaltverschmälerung
Grad 1B	zusätzlich zu Grad 1A subchondrale Zystenbildungen
Grad 2A	<u>deutliche frühe Veränderungen:</u> -obligate Gelenkspaltverschmälerungen an den tragenden Gelenken, -obligate Erosionen außer an den tragenden Gelenken
Grad 2B	zusätzlich zu Grad 2A subchondrale Zystenbildungen
Grad 3	<u>mittlere destruktive Veränderungen:</u> -obligate Gelenkspaltverschmälerungen und Erosionen an allen Gelenken
Grad 4	<u>schwer destruktive Veränderungen:</u> -Knochendeformierung an den tragenden Gelenken mit noch teilweise Erhalt der ursprünglichen Gelenkflächen
Grad 5	<u>Mutilationen:</u> -völlige Zerstörung der Gelenkoberflächen

Tab. 2: modifizierter Sharp-Score (Keystone et al. 2004, Breedveld et al. 2006)

<i>Gradeinteilung</i>	<i>Art der radiologischen Veränderungen</i>
Grad 0	keine Veränderungen
Grad 1	eine Erosion <i>oder</i> Destruktion der Gelenkoberfläche bis 20 Prozent
Grad 2	zwei Erosionen <i>oder</i> Destruktion der Gelenkoberfläche 21-40 Prozent
Grad 3	drei Erosionen <i>oder</i> Destruktion der Gelenkoberfläche 41-60 Prozent
Grad 4	vier Erosionen <i>oder</i> Destruktion der Gelenkoberfläche 61-80 Prozent
Grad 5	fünf Erosionen <i>oder</i> Destruktion der Gelenkoberfläche >80 Prozent

Szintigrafisch ist eine Zweiphasenszintigrafie mittels ^{99m}Tc -Phosphonat möglich: in der Frühphase zeigt sich in der Weichteilszintigrafie Lokalisation und Intensität von Entzündungsherden, in der Spätphase der Zweiphasenszintigrafie die Intensität der Knorpel- und Knochendegradationen. Es besteht des Weiteren die Möglichkeit einer Arthroskopie mit Synovialisbiopsie zur histologischen Untersuchung.

Da sich in letzter Zeit Hinweise auf eine Mitbeteiligung der Angiogeneese an der frühen Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis finden lassen (Walsh et al. 1998, Koch 2000, Distler et al. 2003), gewinnen nach und nach diejenigen Methoden an Bedeutung, die eine Neovaskularisation in den betroffenen Gelenken verifizieren können. So etabliert sich die Ultrasonografie zur Diagnostik von Gelenkergüssen sowie von Sehnen- und Gelenkkapselschwellungen. Außerdem sind der konventionelle B-Mode-Ultraschall, die farbkodierte Dopplersonografie und der so genannte Power-Doppler-Ultraschall präzise diagnostische Methoden, um eine Synovitis beziehungsweise synoviale Neovaskularisationen bei Patienten mit aktiver Rheumatoider Arthritis nachzuweisen (Hensch et al. 2007). So ist der Power-Doppler-Ultraschall der Dopplersonografie bei der Bestimmung des Blutflusses in kleinen Gefäßen wie zum Beispiel den Kapillaren deutlich überlegen (Eriksson et al. 1991), weil geringere Strömungsgeschwindigkeiten des Blutes subtil detektiert werden können (Kollmann et al. 1998). Ein Gefäßfluss ist mit Hilfe des Power-Doppler-Ultraschalls somit relativ genau von anderen Flüssigkeitsansammlungen – zum Beispiel einem Gelenkerguss – zu unterscheiden. Außerdem ist er hilfreich bei der exakten Diskriminierung zwischen einzelnen Gefäßen.

Seit Ende des letzten Jahrzehnts des vergangenen Jahrhunderts spielt die Nutzung der Kernspintomografie (Magnetresonanztomografie (MRT)) zur bildgebenden Detektion früher

osteochondralen und synovialen Veränderungen im Rahmen einer Rheumatoiden Arthritis eine immer größer werdende Rolle. Mit Hilfe einer MRT von Gelenken, an denen sich die Rheumatoide Arthritis typischerweise zuerst manifestiert – zum Beispiel Handgelenke, Vorfußgelenke und gegebenenfalls auch die Halswirbelsäule – kann frühzeitig die Differenzierung zwischen erosiver und nicht-erosiver Arthritis erfolgen. Minimalinvasive, arthroskopische Untersuchungen konnten beweisen, dass die kernspintomografisch sichtbaren Erosionen auch intraoperativ makroskopisch erkennbaren Gelenkveränderungen entsprechen (Ostendorf et al. 2001). Insgesamt besitzt die MRT-Untersuchung betroffener Gelenke gegenüber dem konventionellen Röntgen besonders in der Frühdiagnostik der Rheumatoiden Arthritis eine deutlich höhere Sensitivität, hat sich jedoch auf Grund der immens höheren Kosten noch nicht als Standarddiagnostik etabliert.

Im Rahmen der Labordiagnostik konnten bisher keine zufrieden stellenden prognostischen Parameter identifiziert werden. Üblich ist die Bestimmung allgemeiner Entzündungsparameter wie zum Beispiel Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CrP) im Serum, Vorhandensein von Rheumafaktoren oder Vorhandensein des HLA-DRB1-Genotyps. Aus diesen Methoden ergeben sich jedoch Nachteile: Zum einen können Entzündung des Gelenks und seine Zerstörung zwei zum Teil voneinander unabhängige Vorgänge darstellen (Emery und Salmon 1995, Mulherin et al. 1996, Kirwan 1997, Cunnane et al. 2001), zum anderen kann die Gelenkdestruktion immer noch weiter fortschreiten, während die Entzündungsvorgänge erfolgreich medikamentös unterdrückt werden konnten. Außerdem kann durch Röntgenaufnahmen der betroffenen Extremitäten und Gelenke die Zerstörung des Knochens und der Knorpelverlust nur schätzungsweise und ungenau ermittelt werden.

Der lange Zeit einzige, serologisch messbare Parameter zur Hilfe der Diagnosestellung war der Rheumafaktor (RF). Hierbei handelt es sich um Antikörper vor allem vom IgM-, aber auch vom IgG-, IgA-, und IgG-Typ gegen zirkulierende IgG-Antikörper. Etwa 60-70 Prozent aller RA-Patienten sind RF-positiv – auch seropositiv genannt. Allerdings sind auch zirka 5 Prozent der nicht betroffenen Normalbevölkerung seropositiv. Des Weiteren kann der RF im Serum von bis zu 20 Prozent der Patienten mit anderen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises nachgewiesen werden. Mittlerweile sind weitere Antikörper – wie zum Beispiel der Anti-CCP-Antikörper (s. Seite 25) – bekannt, welche die Diagnostik der Rheumatoiden Arthritis erleichtern und sicherer machen.

4.1.3 Prävalenz

Die RA ist die weltweit häufigste entzündliche rheumatische Erkrankung. Ihre Prävalenz beträgt in der Allgemeinbevölkerung in Mitteleuropa etwa ein Prozent und nimmt mit steigendem Alter zu – im Alter von über 55 Jahren liegt sie bei zirka zwei Prozent. Die Inzidenz der RA beträgt in Deutschland zirka 30:100.000 / Jahr (Williamson und McColl 2001). Der Gipfel des Erstmanifestationsalters liegt bei den Frauen zwischen dem 55. und 65., bei den Männern zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr obwohl der Erkrankungsbeginn bereits in der Adoleszenz liegen kann. Frauen sind insgesamt ungefähr dreimal häufiger betroffen als Männer (Masi und Medsger 1989, Miehle 1994).

4.1.4 Pathogenese

Die genauen Ursachen der RA sind noch unklar. Man weiß bisher, dass es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung handelt, bei der genetische, aber auch umweltbedingte Faktoren eine Rolle spielen (Klareskog et al. 1995, Struyk et al. 1995, VanderBorghet et al. 2000). So existieren bisher nebeneinander mehrere Hypothesen zur Ätiologie der RA:

Die *Erregerhypothese* geht davon aus, dass Erreger wie zum Beispiel das Epstein-Barr-Virus, das Parvovirus B19, Retroviren oder Bakterien wie Chlamydien, Enterobakterien oder Mykobakterien primär entweder in den Gelenken verbleiben oder – nach Bekämpfung durch das Immunsystem – durch Generieren kreuzreagierender Epitope zu Autoimmunreaktionen führen (Zvaifler 1989, Miehle 1994).

Im Sinne der *Autoimmunhypothese* kommt es zu einer pathologischen Umverteilung der T-Zellen zu Gunsten der CD4-Helferzellen gegenüber den CD8-Regulatorzellen, sodass T-Suppressorzellen die aktivierten B-Lymphozyten nicht mehr genügend kontrollieren können. Dies hat zur Folge, dass übermäßig Zytokine wie zum Beispiel IL-1, IL-6 und IFN- α gebildet werden; damit kommt es zur Sezernierung von Metalloproteinasen, Prostaglandinen und toxischen Sauerstoffradikalen. Diese Entzündungsmediatoren können knorpel- und knochendestruierende Enzyme freisetzen, die wiederum eine rheumatoide Synovitis provozieren können (Burmester et al. 1987, Zvaifler 1989, Hein et al. 1995). Des Weiteren produzieren die unkontrolliert proliferierenden B-Lymphozyten unter anderem spezifische, gegen das Typ-II-

Kollagen gerichtete IgG-Antikörper – auch dies lässt den Schluss einer Autoimmunhypothese zu. Untermauert werden konnte dieser Verdacht ebenfalls durch den therapeutischen Einsatz gegen B-Lymphozyten gerichteter Immunsuppressiva, was zu einer Symptomverbesserung führte (Ronnelid et al. 1994, Gause und Berek 2001).

In der entzündeten Synovia von Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnten große Konzentrationen von B-Zellen nachgewiesen werden. Mögliche Funktionen derer sind die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die Aktivierung von T-Zellen, die Produktion von Autoantikörpern wie zum Beispiel dem Rheumafaktor oder die Präsentation von Antigenen. So könnte bei der RA die Interaktion zwischen T-Zellen und B-Zellen über das CD-40-/ CD-40-Ligand-System gestört sein, und es zu einer Hyperaktivität der B-Zellen kommen (Kyburz et al. 1999). Es folgte eine exzessive IL-4-Produktion, die wiederum zu einer Unterdrückung der Apoptose der B-Zellen führte. Außerdem würde auf diese Weise die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen gefördert – so ist die Entstehung der Rheumafaktoren zu erklären.

Eine weitere Theorie zur Rolle der B-Lymphozyten lautet, dass es von einem mutierten B-Zell-Klon zur Produktion dysfunktionaler Immunglobuline (zum Beispiel IgG) kommt und die Entzündungskaskade durch eine daraus folgende TNF- α -Ausschüttung und die Aktivierung des Komplementsystems in Gang gesetzt würde (Edwards und Cambridge 1998). Die intrasynovialen B-Zellen scheinen in der Pathogenese eine wichtige Rolle zu spielen, da Patienten mit therapierefraktärer RA von einer Behandlung mit Rituximab – einem rekombinanten, monoklonalen, chimären Antikörper, der gegen das Oberflächenantigen CD-20, welches auf fast allen B-Zellen präsentiert wird, gerichtet ist – profitieren (Edwards et al. 2004).

Daneben wird mittlerweile eine antigenlose Stimulierung – die so genannte bystander-Aktivierung – der T-Lymphozyten diskutiert, da bisher ein Erregernachweis nicht gelungen ist. Diese so genannte bystander-Aktivierung geschieht wahrscheinlich durch Zytokine wie IL-2, IL-6 oder TNF- α ; die daraufhin stimulierten T-Lymphozyten ihrerseits regen Monozyten wiederum zur TNF- α -Produktion an – es beginnt ein autostimulatorischer Kreislauf, der nun auch nicht durch Suppressoren wie zum Beispiel IL-10 unterdrückt werden kann, da die IL-10-Produktion nicht durch die antigenlos stimulierten T-Lymphozyten beeinflussbar ist (Unutmaz et al. 1994, Sebbag et al. 1997, Hein et al. 1999). Allerdings konnte die bystander-Aktivierung bisher nicht durch T-Lymphozyten-Funktion hemmende Immunsuppressiva verhindert werden: die Zahl der T-Lymphozyten war zwar regredient, eine geringere Aktivität der T-Lymphozyten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Neben diesen Mechanismen der erworbenen Immunfunktionen werden in letzter Zeit auch eventuelle Einflüsse des angeborenen Immunsystems auf die Prädisposition an Rheumatoider Arthritis zu erkranken untersucht. So scheinen bestimmte Toll-like-Rezeptoren (TLR) als bedeutsame Komponente des angeborenen Immunsystems in dieser Hypothese eine wichtige Rolle zu spielen. Die Bindung bestimmter Liganden (so genannter PAMPs („pathogen associated molecular patterns“), also molekulare Muster oder Moleküle von Mikroorganismen – zum Beispiel Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien) an den TLR führt über eine intrazelluläre Signaltransduktion über den NF- κ B zur Ausschüttung von TNF- α (Hamann et al. 2004). Der TLR-9 ist direkt an der Rheumafaktorproduktion autoreaktiver B-Lymphozyten beteiligt (Leadbetter et al. 2002). In Gelenkpunktaten von RA-Patienten konnten sowohl erhöhte Konzentrationen des TLR-2 – besonders an bereits zerstörtem Knochen- und Knorpelgewebe (Seibl et al. 2003) – als auch eines TLR-2-Liganden (Peptidoglykan) nachgewiesen werden (van der Heijden et al. 2000). Eine intraartikuläre Gabe von Peptidoglykan führt so zu einer Hochregulation der TLR-2-mRNA, in der Folge zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 sowie verschiedener Matrixmetalloproteinasen (Kyburz et al. 2003) und im Endeffekt zu einer Arthritis (Liu et al. 2001).

Schließlich besagt die *Genetische Hypothese*, dass eine Prädisposition zur Erkrankung an RA durchaus molekulargenetisch begründet sein kann: So ist das Risiko für einen Patienten, von RA betroffen zu sein, überzufällig groß, wenn sein eineiiger Zwilling bereits erkrankt ist (Miehle 1994, Lautenschläger et al. 1997, Gräfenstein 1997). Diese Konkordanzrate beträgt für eineiige Zwillinge aber nur etwa 30 Prozent, sodass noch andere Faktoren für das Entstehen der RA ursächlich sein müssen. Es fiel auf, dass die Allele HLA-DRB1*04-01 und HLA-DRB1*04-04 in Mitteleuropa sehr stark mit dem Auftreten der Rheumatoiden Arthritis verbunden sind (Bernhard und Villiger 2001). Da jedoch zirka 30 Prozent der kaukasischen Bevölkerung positiv für HLA-DRB1*04 sind, die oben genannte Prävalenz jedoch nur 1 Prozent beträgt, geht man davon aus, dass das Allel HLA-DRB1*04 mindestens zur Ausbildung einer gewissen genetischen Sensitivität beiträgt (Edwards und Cambridge 1998). Das häufige Auftreten der Allele HLA-DRB1*04-01 und HLA-DRB1*04-04 lässt die Vermutung zu, dass die jeweiligen MHC-II-Rezeptoren ein bisher unbekanntes Antigen bevorzugt präsentieren. Mehrere Studien konnten hier den Hinweis geben, dass eine bestimmte Aminosäuresequenz in der dritten hypervariablen Region der polymorphen β -Kette in beiden der oben erwähnten MHC-II-Rezeptoren für das

gehäufte Auftreten von RA verantwortlich gemacht werden kann (Cairns et al. 1985, Hein et al. 1995, Geiler et al. 1997, Hein et al. 1999).

Außer einer Beteiligung der MHC-Moleküle konnte in letzter Zeit eine Vielzahl von Genen identifiziert werden, die mit dem Auftreten der Rheumatoiden Arthritis in Verbindung gebracht werden wie zum Beispiel das Gen für den TNF-Rezeptor (Glossop et al. 2003), das MCP-1 („monocyte chemoattractant protein 1“) (Gonzalez-Escribano et al. 2003) oder aber eine genetische Disposition für eine vermehrte, PAD-vermittelte Peptid-Zitrullinierung, welche mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zum Auftreten von Autoimmunreaktionen führen kann (Schellekens et al. 1998).

Insgesamt führen diese Vorgänge letztendlich alle zu einer Synovitis. Dabei granuliert die ursprünglich gesunde, dünne Synovialmembran durch den Entzündungsreiz, ist von T- und B-Lymphozyten sowie von Makrophagen infiltriert und nimmt an Dicke erheblich zu. Das Granulationsgewebe proliferiert weiter; es entsteht der Pannus, ein Verbund mesenchymaler Zellen, welcher die Knochen- und Knorpelstrukturen destruiert (Firestein 2001). Durch die chronische Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten in der Synovialflüssigkeit setzen diese konsekutiv Kollagenasen, Hydrolasen und weitere lysosomale Enzyme frei, was schließlich zur irreversiblen Zerstörung zunächst des Knorpel- und später des Knochen- und auch Sehngewebes führt. Die Folgen sind Deformierungen der betroffenen Gelenke sowie der Verlust der physiologischen Funktionen. Außerdem kommt es über eine Zytokin vermittelte Rekrutierung und Aktivierung von immunkompetenten und inflammatorisch wirksamen Zellen sowie einer Angiogenese zur lokalen Entzündungsreaktion und damit zu unspezifischen Symptomen wie Schwellung oder Schmerzen der beteiligten Gelenke. Der Patient reduziert die Bewegungen in den betroffenen Gelenken schmerzbedingt auf ein Minimum. Daneben kann es durch die ständig anhaltenden oder schubweise vorkommenden intraartikulären Entzündungsvorgänge zu einer Fibrosierung der Gelenkkapsel und schlimmstenfalls zu einer dauernden Gelenkversteifung (Ankylose) kommen.

4.2 Diagnostisch relevante Laborparameter

4.2.1 Allgemeine Entzündungsparameter – das C-reaktive Protein

Das C-reaktive Protein (Molekulargewicht 105 kDa) wird in der Leber gebildet und gehört zu den Akut-Phase-Proteinen (Hurlimann et al. 1966). Als unspezifischer Entzündungsparameter kann es zur Bestimmung des Schweregrades, aber auch zur Verlaufskontrolle von vor allem bakteriellen Infektionen oder anderen inflammatorischen Prozessen im Körper gemessen werden. In der Kaskade der unspezifischen Abwehrreaktion wird die CrP-Produktion vor allem von IL-6 stimuliert; das CrP selbst dagegen ist ein wichtiger Aktivator des Komplementsystems. Generell steigt die CrP-Konzentration im Serum also nach Gewebsverletzungen, einer Infektion oder bei sterilen Entzündungen wie zum Beispiel bei der Rheumatoiden Arthritis (Nielen et al. 2004b). So ist es auch sinnvoll, dass die Bestimmung des CrP-Levels bei der RA durchgeführt wird, denn die Serumkonzentrationen korrelieren eindeutig mit der Krankheitsaktivität (Amos et al. 1977, McConkey et al. 1979, Mallya et al. 1982, Dixon et al. 1984).

4.2.2 Knorpelmarker

4.2.2.1 COMP

COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) ist ein 524 kDa schweres, zur Gruppe der Thrombospondine gehörendes, nichtkollagenes, homopentamerisches Glykoprotein der extrazellulären Knorpelmatrix frei von Glukosaminoglykan-Seitenketten, dessen N-terminalen Enden jeweils durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Oldberg et al. 1992, DiCesare et al. 1994a). Die C-terminalen Enden können mit dem dreidimensionalen Kollagennetzwerk in Wechselwirkung treten und es so stabilisieren (Wisłowska M 2005). Der weitaus größte Anteil von COMP befindet sich im Knorpel, verschwindend kleinere Mengen sind in der Synovialmembran, Sehnen und dem Meniskus nachweisbar (DiCesare et al. 1994b, DiCesare et al. 1997, Neidhart et al. 1997, Recklies et al. 1998). In anderen bindegewebsreichen Geweben wie Lunge oder Haut befindet sich COMP wahrscheinlich gar nicht (Recklies et al. 1998). Die COMP-Konzentration im Serum bei gesunden Probanden beträgt etwa 5 U/l (Neidhart et al. 1997) – bei RA-Patienten ist sie signifikant erhöht (10,4 U/l \pm 3,6 U/l) (Wisłowska M 2005).

Die Aufgabe von COMP besteht in der Bindung von Typ-II-Kollagenfasern und der Stabilisation des Fasernetzwerkes im Gelenkknorpel (Rosenberg et al. 1998). In frühen Stadien der RA steigt die Serumkonzentration von COMP an, während sie in späteren, fortgeschrittenen Stadien wieder abfällt (Skoumal et al. 2003). Letzteres könnte ein Hinweis darauf sein, dass die absolute Knorpelmasse im Gelenk mit der Dauer der rheumatischen Erkrankung abnimmt, somit also absolut auch weniger Abbaumasse zur Verfügung steht (Marti et al. 1999). COMP im Serum besitzt eine relativ hohe Sensitivität und Spezifität bei degenerativen und entzündlichen Gelenkerkrankungen. Bei einer Schädigung des Gelenkknorpels – sei sie degenerativer, entzündlicher oder traumatischer Natur – gelangt COMP oder dessen Abbaufragmente in den Synovialspalt und weiter, da keine Filtration in den Lymphknoten stattfindet, ins Serum, wo es dann gemessen werden kann.

4.2.2.2 CTX-II

Das C-terminale, quervernetzende Telopeptidfragment von Typ-II-Kollagen – kurz CTX-II – ist ein sehr spezifischer und sensitiver Marker des Knorpeluntergangs. Es wird durch einen ELISA gemessen, indem monoklonale Antikörper der Maus gegen eine bestimmte Aminosäuresequenz (EKGPDP) des menschlichen Typ-II-Kollagen-C-Telopeptides gerichtet sind. Diese Sequenz wurde ausschließlich in Typ-II-Kollagen gefunden und nicht in anderen Kollagenen, wie zum Beispiel dem Typ-I-Kollagen des Knochens. Der entwickelte Antikörper ist hochspezifisch für Peptide, die ein freies, C-terminales Prolin enthalten (Christgau et al. 2001). CTX-II wird über verschiedene enzymatische Prozesse abgebaut, in erster Linie sind hier die Matrix-Metalloproteinasen von den Typen 1, 8 und 13 zu nennen (Billingham et al. 1997, Kojima et al. 2001). Typ-II-Kollagen stellt mengenmäßig den größten Anteil des Kollagens im Knorpel; sein Nachweis ist außerdem spezifisch für Umbauvorgänge im Gelenkknorpel (Prockop und Kivirikko 1995). Damit führt die kontinuierliche Zerstörung von Gelenkknorpel in Rahmen von destruktiven Erkrankungen wie RA oder auch Osteoarthritis zur erhöhten Freisetzung von CTX-II in die Synovialflüssigkeit und später in Blut und in den Urin (Jung et al. 2004).

Des Weiteren sind die CTX-II-Spiegel im gesamten Körper auch jeweils altersabhängig: Bei Kindern und Jugendlichen, die sich im körperlichen Wachstum befinden und somit dort eine erhöhte Knorpelumsatzrate vorliegt, wurden hohen CTX-II-Werte gemessen; die CTX-II-Konzentration bleibt im Alter von 30 bis 50 Jahren relativ stabil auf niedrigem Niveau und steigt

bei Patienten über 50 Jahren vor allem bei Frauen – wahrscheinlich im Sinne eines erhöhten Knorpelmetabolismus – wieder leicht an. Es kommt durch den relativen Östrogenmangel nicht nur zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität und einer verminderten Osteoklastenapoptose, sondern auch zu einer herab gesetzten Stimulation der Chondrozyten (Hughes et al. 1996, Kameda et al. 1997, Ushiyama et al. 1999). Außerdem zeigt im Umkehrschluss eine postmenopausale Hormonersatztherapie einen signifikant protektiven Effekt auf den Knorpelstoffwechsel durch niedrigere CTX-II-Konzentrationen im Urin (Forsblad d'Elia et al. 2004). Schließlich korreliert die Höhe der CTX-II-Werte positiv mit dem BMI der untersuchten Patienten (Mouritzen et al. 2003).

4.2.3 Knochenmarker

4.2.3.1 CTX-I

Fragmente des karboxyterminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens (CTX-I) stellen einen weiteren Marker für die abgelaufene Zerstörung von Typ-I-Kollagen dar. Bei der Messung von CTX-I wird ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) verwendet. Dieser reagiert spezifisch mit der nur in der α -1-Kette des Typ-I-Kollagens vorhandenen, β -isomerisierten Aminosäuresequenz EKAH β DGGR (Landewe et al. 2006) (s. Abb. 1 auf S. 21 sowie Abb. 2 auf S. 24). Schon während der kontinuierlichen, physiologischen Knochenumbauveränderungen wird Typ-I-Kollagen abgebaut. Der Nachweis einer erhöhten CTX-I-Konzentration in Blutserum, Urin oder Synovialflüssigkeit ist zunächst einmal ein Parameter für Entzündungsvorgänge im Rahmen einer Synovialitis beziehungsweise eines allgemeinen Gewebeunterganges. Generell ist Typ-I-Kollagen das am weitesten im menschlichen Körper verbreitete Kollagen; sein größter Anteil findet sich im Knochengewebe – Typ-I-Kollagen stellt etwa 90 Prozent der gesamten organischen Knochenmatrix – es ist allerdings auch das massenreichste Matrixprotein in Sehnen, Bändern und dem Bindegewebe (Hakala et al. 1995).

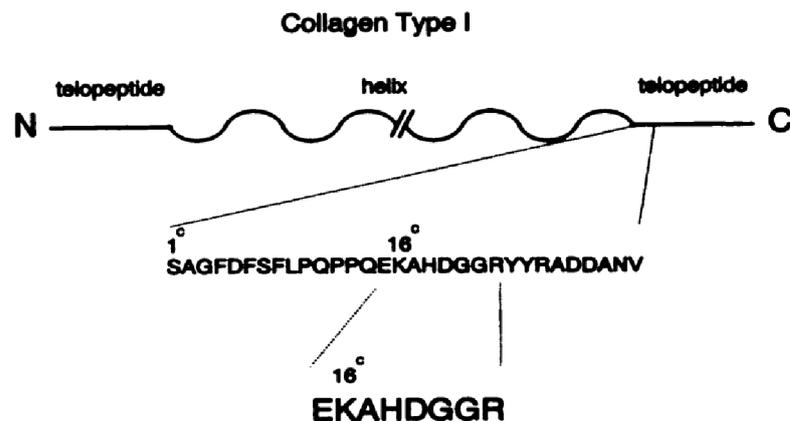


Abb. 1: Schema der Lokalisation der CTX-I-Aminosäuresequenz im Typ-I-Kollagen (Bonde et al. 1994)

CTX-I wird im Gelenk nach seiner Freisetzung aus dem defekten Knochengewebe beziehungsweise anderen Typ-I-Kollagen enthaltenden Geweben über die Synovialflüssigkeit resorbiert, dem Blutstrom zugeführt und fast ausschließlich renal ausgeschieden; dafür sprechen auch die hohen Konzentrationsunterschiede von CTX-I zwischen Serum und Synovialflüssigkeit zu Gunsten letzterer (Hakala et al. 1995). Diese Eigenschaften machen CTX-I einer Messung im Blut, Urin und der Synovialflüssigkeit zugänglich.

Bei Untersuchungen des C-terminalen Telopeptids des Typ-I-Kollagens (CTX-I) konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von CTX-I besser mit der aktuellen Aktivität der RA korreliert als zum Beispiel lediglich unspezifische Entzündungsmarker wie BSG oder CrP (Hakala et al. 1995). In dieser Studie wird auch der Rückschluss gezogen, dass eine massiv erhöhte CTX-I-Konzentration im Serum auf eine bereits weit fortgeschrittene Gelenkzerstörung hindeuten kann – davon ausgehend, dass zuerst die Knorpelmatrix angegriffen und zerstört wird, bevor die darunter liegende Knochensubstanz geschädigt wird.

Des Weiteren scheint nicht nur der Abbau, sondern auch der kompensatorische Wiederaufbau, also die Neubildung von Typ-I-Kollagen in einem von der RA zerstörten Gelenk deutlich erhöht zu sein. Dies ließ sich in einer Studie feststellen, in der die entsprechenden – bei der Neusynthese in die Synovialflüssigkeit abgegebenen Propeptide quantitativ gemessen wurden (Hakala et al. 1995). Außerdem lassen die CTX-I-Konzentrationen im Allgemeinen auf einen relativ aktuellen Stand der Gelenkzerstörung beziehungsweise deren Fortschritt schließen, während dies mit konventionellen, das heißt nicht labortechnischen Methoden (zum Beispiel Röntgen der

betroffenen Gelenke) nicht möglich ist – hier kann nur die bereits länger zurück liegende Destruktion mit einer Latenz von zirka sechs Monaten diagnostiziert werden.

In einer Längsschnittstudie konnte gezeigt werden, dass es eine ständig währende Beziehung zwischen klinisch detektierbaren Zeichen einer Arthritis, wie zum Beispiel geschwollenen Gelenken sowie steigenden allgemeinen Entzündungsparametern, und der Degradation von Typ-I-Kollagen – gemessen an der CTX-I-Konzentration – gibt (Landewe et al. 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass die Inflammation im Gelenk die Zerstörung von Knochen- und Knorpelmatrix selbst auslösen und unterhalten kann.

4.2.3.2 Das OPG – sRANKL – RANK – System

Bedeutend für die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis sind unter anderem auch die Differenzierung und die Aktivierung der Knochen abbauenden Osteoklasten. Diese Vorgänge werden gefördert durch sRANKL (löslicher Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktors Kappa B (NF- κ B) Ligand), ein zur TNF-Familie gehörendes Protein, das vor allem von aktivierten T-Lymphozyten, aber auch von Osteoblasten, Fibroblasten, Chondrozyten sowie von Monozyten gebildet wird (Wong et al. 1997, Kong et al. 1999a, Kong et al. 1999b, Hofbauer und Heufelder 2001). sRANKL bindet physiologischerweise an RANK (Rezeptor-Aktivator von NF- κ B), der sich wiederum auf der Oberfläche von Osteoklasten und dendritischen Zellen befindet. Durch diese Anlagerung wird NF- κ B in den Zellkern transloziert; hier fungiert er als positiver Transkriptionsfaktor für antiapoptotisch wirkende Gene, das heißt sowohl die Anzahl wie auch die Aktivität der Osteoklasten nimmt zu. Die aktivierten Osteoklasten sind letztendlich für die destruktiven Prozesse am Knochen, wie zum Beispiel die Entstehung von Zysten und Usuren, verantwortlich.

Osteoprotegerin (OPG) gehört dagegen zur TNF-Rezeptor-Familie und ist ein löslicher Rezeptor von sRANKL, kann es kompetitiv binden und so vollständig inaktivieren (Fuller et al. 1998, Burgess et al. 1999, Kong et al. 1999a). Man kann also sRANKL und OPG auch als Agonist beziehungsweise Antagonist des Osteoklasten induzierten Knochenabbaus ansehen; folglich stehen RANK und OPG in Konkurrenz um die Bindung von sRANKL. Tatsächlich haben mehrere Studien nachweisen können, dass gerade die Konzentrationen von sRANKL vor allem im Serum aber auch in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten signifikant erhöht sind (Ziolkowska et al. 2002, Skoumal et al. 2005, Hein et al. 2008). Offensichtlich sind die im Zuge

der für die RA typischen Autoimmunreaktion massenhaft eingewanderten T-Lymphozyten unter anderem verantwortlich für die erhöhte sRANKL-Konzentration. Kompensatorisch ist bei RA-Patienten auch die Konzentration des Gegenspielers OPG erhöht, trotzdem besteht ein relativer Mangel. An dieser Stelle besteht nun auch ein therapeutischer Ansatz, der in tierexperimentellen Studien bestätigt werden konnte: durch Gabe von löslichen TNF-Rezeptoren konnte die funktionelle Konzentration von sRANKL gesenkt und so der systemische Knochenverlust zumindest gebremst werden.

4.2.4 Knochen- und Knorpelabbaumarker – die Kollagen-Crosslinks

Um die kollagenen Fasernetzwerke, die den wesentlichen Teil des Stütz- und Bindegewebes im menschlichen Körper ausmachen, ausreichend zu stabilisieren, benötigt es neben geringer elektrostatischer und hydrophober Kräfte stabiler Quervernetzungen, der so genannten Kollagen-Crosslinks (van Daele et al. 1994).

Bei der intrazellulären Prokollagensynthese wird zunächst eine Tripelhelix aus drei Polypeptid- α -Ketten gebildet; nach Ausschleusung in den Extrazellularraum werden die C- und N-terminalen Enden enzymatisch abgeschnitten – es entsteht das wasserunlösliche Tropokollagen. Diese Tropokollagenmoleküle können sich jetzt miteinander verbinden und verdrillen bis auf die jeweiligen Polypeptidenden – die Telopeptide. Dabei kommt es zu extrem stabilen Quervernetzungen mit benachbarten Telopeptiden – durch die Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (Pyd) oder Desoxypyridinolin (Dpyd) (siehe Abb. 2 auf Seite 24). Diese Crosslinkbildung wird über die Verbindung bestimmter Lysin- oder Hydroxylysinreste durch das Enzym Lysyloxidase katalysiert. Dabei ist es von Bedeutung, in welchem Grad die Lysinreste hydroxyliert sind (Barber et al. 1982, Seibel et al. 1989, Seibel et al. 1992). Dieser Hydroxylierungsgrad ist wiederum gewebsspezifisch unterschiedlich: so findet sich im Typ-II-Kollagen des Knorpels fast ausschließlich Pyd, während im Knochen beide Crosslinks vorkommen. Die Ratio Pyd/Dpyd liegt hier bei etwa 3:1 bis 4:1 und ist von Alter und Geschlecht unabhängig (Seibel et al. 1992, Takahashi et al. 1996). Eine Freisetzung von Kollagen-Crosslinks ist generell ein Indikator für eine stattfindende Resorption des Knochens beziehungsweise des Knorpels. Die Urinkonzentration von Pyd und Dpyd steigt also auch während normaler Umbauprozesse wie zum Beispiel dem Wachstum im Kindes- und Jugendalter an. So korreliert die Höhe der Crosslinkausscheidung mit der Geschwindigkeit des Längenwachstums (Rauch et al. 1996). Zwar

befindet sich Kollagen nicht ausschließlich in Knochen und Knorpel, sondern auch in geringerem Ausmaß in weiteren Binde- und Stützgeweben wie zum Beispiel Sehnen, Bändern, der Aorta oder im Dentin (Robins et al. 1991, Eyre 1995, Kollerup 1996); ein erhöhter Pyd- oder Dpyd-Abbau kann beim Erwachsenen jedoch relativ spezifisch auf eine erhöhte Knorpel- und/oder Knochendegradation – je nach Pyd/Dpyd-Ratio – schließen lassen, also zum Beispiel Mb. Paget, Osteoporose, Arthrosen oder Arthritiden.

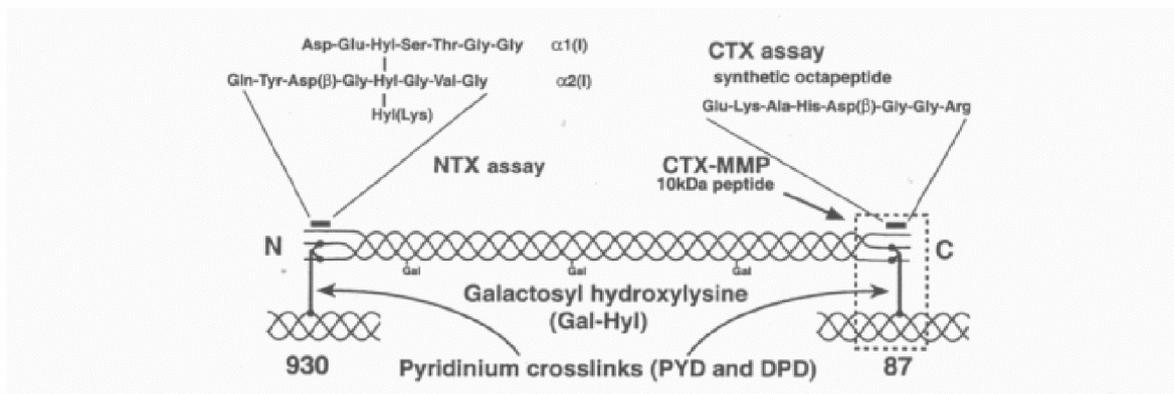


Abb. 2: Molekulare Basis der heute üblichen Marker des Kollagenabbaus (Seibel 2000)

Die Abbildung zeigt diejenigen Aminosäureketten, welche in den jeweiligen Assays zum Nachweis der Abbauprodukte des Kollagens spezifisch für diese sind (CTX: C-terminales Telopeptid; NTX: N-terminales Telopeptid). Galaktosyliertes Hydroxylysin (Gal-Hyl) ist ein weiteres Kollagenabbauprodukt. Außerdem ist schematisch die Lokalisation sowie die Funktion der Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (hier: DPD) skizziert.

Bei der Knochendegradation wird die Kollagenolyse meist unmittelbar durch die Osteoklasten verursacht; dabei werden die Crosslinks freigesetzt. Wegen ihrer komplexen Struktur erfolgt keine weitere Metabolisierung, sondern sie werden direkt zunächst in die Synovialflüssigkeit und danach in die Blutbahn abgegeben und schließlich über die Niere frei (35-45 Prozent), glykolisiert oder Peptid gebunden (55-65 Prozent) ausgeschieden (Seyedin et al. 1993, James et al. 1996). Damit ist gewährleistet, dass der Nachweis von Pyd oder Dpyd in einem der Kompartimente mit einer sehr hohen Spezifität einerseits für das Gewebe Knorpel beziehungsweise Knochen, andererseits aber auch für den Prozess der Degradation einhergeht.

Pyridinolin findet sich zu einem Teil in Typ-I-Kollagen und bildet das Hauptvernetzungsmolekül in Typ-II-Kollagen des Knorpels, Desoxypyridinolin dagegen findet sich hauptsächlich in Typ-I-Kollagen des Knochens (Kollerup 1996). Damit ergibt sich, dass einer erhöhten

Pyridinolinausscheidung eine vermehrte Degradation von Knorpelsubstanz zu Grunde liegt. Parallel dazu folgt, dass der Schluss von einer erhöhten Desoxypyridinolinausscheidung auf eine Zerstörung von Knochensubstanz potenziell möglich ist. Dies konnte durch zahlreiche Studien untermauert werden (Black et al. 1989, McLaren et al. 1992, Guerrero et al. 1996).

Andererseits sollte die Spezifität des Nachweises von Dpyd doch kritisch beurteilt werden: Da über den Stoffwechsel der Gewebe, die ebenfalls Typ-I-Kollagen enthalten, noch wenig bekannt ist, kann also aus einer erhöhten Desoxypyridinolinausscheidung nicht ausschließlich auf das Vorliegen einer Krankheit mit Zerstörung des Knochengerstes geschlossen werden, andere Ursachen wie Zahnerkrankungen beziehungsweise Erkrankungen an Aorta oder Bändern sollten differenzialdiagnostisch in Betracht gezogen werden. Auf der anderen Seite ist nahe liegend, dass bei erhöhten Dpyd-Werten das Augenmerk eher auf Knochenerkrankungen gerichtet wird, da der erhöhte Knochenstoffwechsel auf Grund der großen Masse der Knochensubstanz im menschlichen Körper wahrscheinlich am ehesten die Ursache der erhöhten Desoxypyridinolinausscheidung ist (Robins et al. 1991, Seibel et al. 1993). Abbildung 2 auf S. 24 gibt die molekulare Basis der heute üblichen Marker des Kollagenabbaus wieder.

Die Normwerte für die Ausscheidung freier Crosslinks liegt einer Studie zu Folge bei 8-24 nmol/mmol Kreatinin bei gesunden Männern beziehungsweise bei 10-28 nmol/mmol Kreatinin bei gesunden, prämenopausalen Frauen (Nakamura 1996).

4.2.5 Anti-CCP- und Anti-MCV-Antikörper

In letzter Zeit konnten neben dem Rheumafaktor weitere Autoantikörper identifiziert werden, welche bei der Rheumatoiden Arthritis überzufällig häufig als positiv diagnostiziert werden können. So zeigte sich schon vor über 30 Jahren, dass der anti-perinukleäre Faktor (APF) sowie der anti-Keratin-Antikörper (AKA) eine fast hundertprozentige Spezifität für die RA aufweisen können (Nienhuis und Mandema 1964, Young et al. 1979). Trotz dieser vorteilhaften Spezifität konnten sich diese Marker in der klinischen Praxis nicht etablieren, da die Sensitivität mit 25 Prozent äußerst gering und der Test damit kaum klinisch anwendbar war. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts nahm man an, dass diese Antikörper gegen Filaggrin, ein Protein, das ausschließlich in Epithelzellen exprimiert wird und dort für die Vernetzung von Zytokeratinfilamenten verantwortlich ist, gerichtet sind (Steiner 2004). Heute weiß man, dass nicht das Filaggrin selbst, sondern nur seine Zitryllreste Bindungsstellen für die Autoantikörper

darstellen. Zum Nachweis dieser Autoantikörper stellte man nun synthetische, zyklische Zitrullinpeptide her. Die erste Generation der so genannten Anti-CCP-Antikörper erreichten eine Spezifität für RA von über 85 Prozent und eine Sensitivität von 65-70 Prozent (Schellekens et al. 1998) – die zweite Generation der Anti-CCP-Antikörper konnte die Spezifität für RA sogar noch auf 96-98 Prozent steigern (Lee und Schur 2003, Vallbracht et al. 2004).

Physiologisch entsteht Zitrullin im Rahmen der posttranslationalen Modifikation der Proteinsynthese durch Deiminierung der Aminosäure Arginin durch das Enzym Peptidylarginin-Deiminase (PAD). Hierbei, so wird vermutet, ändert sich die Proteinstruktur – neue Epitope könnten entstehen mit der „Gefahr“ der Fehlerkennung des Immunsystems als körperfremd und somit zur Autoimmunreaktion führen (Schellekens et al. 1998).

Da Filaggrin ausschließlich in Epithelzellen und nicht zum Beispiel in Gelenken exprimiert wird, schien es relativ unwahrscheinlich, dass Filaggrin auch den Primärauslöser der Autoimmunreaktion der RA darstellt. Es war wahrscheinlicher, dass weitere Zitrullin-enthaltene Proteine im Körper existieren, welche als die eigentlichen Antigene fungieren. So konnten schließlich Isoenzyme der PAD (PAD 2 und PAD 4) in der entzündeten Synovialhaut der betroffenen Gelenke nachgewiesen werden (Suzuki et al. 2003, Vossenaar et al. 2004, Chang et al. 2005, Nakayama-Hamada et al. 2005). Fibrinogen jedenfalls, welches in der Leber synthetisiert und nach dem Transport durch die Gelenkkapsel in der Gelenkhaut zu unlöslichem Fibrin polymerisiert wird, ist ein Substrat jener Isoenzyme (Nakayama-Hamada et al. 2005). Auf Grund der Tatsache, dass Antikörper gegen zitrulliniertes Fibrinogen ebenfalls hochspezifisch und hochsensitiv für die RA sind, ist anzunehmen, dass das zitrullinierte Fibrin beziehungsweise Fibrinogen die auslösenden Autoantigene in der Pathogenese der RA repräsentieren könnten (Nogueira et al. 2003, Nielen et al. 2005). Es ist allerdings noch nicht bekannt, ob Fibrinogen auch im Blut oder in der Synovialflüssigkeit zitrulliniert werden kann und so eventuell für systemische Entzündungsreaktionen des Organismus verantwortlich ist.

So besitzt die Bestimmung von anti-CCP-Antikörpern mittlerweile einen hohen diagnostischen Stellenwert bereits in der Frühsterkennung der Rheumatoiden Arthritis. Bei Patienten mit unklaren Gelenkbeschwerden, die noch nicht hinreichend die ACR-Kriterien der RA erfüllten, konnten teilweise hohe anti-CCP-Antikörper-Titer nachgewiesen werden – in Einzelfällen bis zu 14 Jahre bevor es zum typischen „Ausbruch“ der RA kam (Nielen et al. 2004a). Außerdem ließ sich feststellen, dass RA-Patienten mit einem positiven anti-CCP-Antikörper-Titer einem schwereren Krankheitsverlauf unterliegen, das heißt, dass eine größere radiologische Schädigung

der Gelenke vorliegt und dass diese Patienten sich in objektiv klinisch schlechterem Allgemeinzustand befinden als solche mit negativem anti-CCP-Antikörper-Spiegel (Ronneld et al. 2005).

Ein weiterer, hochempfindlicher Marker ist der Autoantikörper gegen eine physiologisch vorhandene Isoform des Vimentin – einem ubiquitären Zytoskelettprotein –, das mutierte zitrullinierte Vimentin (MCV). MCV-Antikörper kommen vermehrt im Synovialgewebe von an RA erkrankten Patienten vor und scheinen auch selbst an der Pathogenese beteiligt zu sein. Synoviale B-Lymphozyten sind in der Lage, lokal im inflammatorisch betroffenen Gelenk Antikörper gegen zitrulliniertes Vimentin zu bilden und somit auch hier potenziell die Entzündungskaskade zu provozieren (De Rycke et al. 2005). Außerdem werden auch im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung im mutierten Vimentin Argininreste durch die PAD in Zitrullinreste deiminiert; auch hier stellen diese durch die Änderung der Proteinstruktur wieder Neoepitope dar (Dejaco et al. 2006).

Der Vorteil der anti-MCV-Antikörper liegt nun vor allem in der höheren Sensitivität im Vergleich zum Anti-CCP-Antikörper sowohl im Frühstadium (71 Prozent vs. 25-42 Prozent) als auch bei bereits fortgeschrittener Erkrankung (69,5-82 Prozent vs. 39-94 Prozent) (Feist et al. 2007). Außerdem korreliert die Höhe des anti-MCV-Antikörper-Spiegels im Gegensatz zu der des anti-CCP-Antikörper-Spiegels eher mit klinischen Gesichtspunkten des Schweregrades der RA wie dem DAS 28, der BSG, der CrP-Konzentration, dem RF-Spiegel sowie der Anzahl der geschwollenen Gelenke (Keskin et al. 2008). Eine andere Forschergruppe konnte eine positive Korrelation zwischen dem anti-MCV-Antikörper-Spiegel und dem DAS 28 jedoch nicht bestätigen (Ursum et al. 2008).

Nach bisheriger Meinung eignet sich so die Bestimmung der anti-MCV-Antikörper vor allem bei Patienten mit dringendem Verdacht auf eine Rheumatoide Arthritis, deren Seren jedoch negativ auf Rheumafaktoren und anti-CCP2-Antikörper waren (Szekanecz et al. 2008).

In unserer Untersuchung wurden weder Anti-CCP-Antikörper noch anti-MCV-Antikörper in die Auswertung einbezogen, da sich 1998 – zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahme – diese Antikörperbestimmungen zu diagnostischen Zwecken noch nicht ausreichend etabliert hatten.

5 Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob die radiologische Progredienz jeweils mit bei Rheumatoider Arthritis typischerweise vom Normwert abweichenden Laborparametern in einem statistisch signifikanten Zusammenhang steht. Es stellt sich die Frage, ob es einen oder mehrere spezifische Marker gibt, der im Idealfall die zukünftige – zumindest radiologische – Entwicklung der Gelenkdestruktion und damit das Schicksal der Patienten in deren Krankheitsgeschichte prognostizieren kann und somit gegebenenfalls eine gezieltere, das heißt eine frühere und gegebenenfalls radikalere, therapeutische Intervention dem Patienten zu Gute kommen gelassen wird.

Anhand der theoretischen Darlegungen und des Standes der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse lassen sich die folgenden Hypothesen formulieren:

1. Die Progredienz P korreliert mit dem Alter des Patienten sowie mit den unspezifischen Entzündungsmarkern BSG und CrP.
2. Es besteht eine positive Korrelation zwischen P und den Knorpelabbauprodukten COMP und CTX-II.
3. Es besteht ein positiver statistischer Zusammenhang zwischen der Progredienz P und den Knochenmarkern CTX-I und sRANKL beziehungsweise ein negativer statistischer Zusammenhang zwischen der Progredienz P und dem osteoprotektiven Marker OPG.
4. Die Progredienz P korreliert mit den Kollagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin, welche bei Knorpel- und/oder Knochendestruktion typischerweise vermehrt freigesetzt werden.

Neben diesen Hypothesen ergibt sich die Fragestellung, ob an Hand der zu erwartenden Ergebnisse Rückschlüsse auf die Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis möglich sind.

6 Methodik

6.1 Patientenkollektiv

In die Untersuchung sind 40 Patienten (29 weibliche, hiervon neun prämenopausal und 20 postmenopausal; elf männliche) mit der Diagnose Rheumatoide Arthritis – gesichert durch die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) – im Alter von 16 bis 80 Jahren eingegangen. Die Altersgrenze zur Differenzierung zwischen prä- und postmenopausal wurde mit einem Lebensalter von 50 Jahren festgelegt. Die Patienten stammen aus dem Patientengut der rheumatologischen Station beziehungsweise der rheumatologischen Fachambulanz der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität zu Jena der Jahre 1998 bis 2004. Sie wurden zum Zeitpunkt der Röntgenaufnahme beziehungsweise der Materialentnahmen alle stadiengerecht mit Glukokortikoiden und / oder DMARDs therapiert; eine Behandlung mit Biologicals erfolgte nicht. Die epidemiologischen Daten des untersuchten Krankenguts sind Tabelle 3 auf Seite 29 zu entnehmen.

Tab. 3: epidemiologische Daten des untersuchten Krankenguts

	Anzahl	durchschnittliches Alter in Jahren	SD	Alters- median in Jahren	durchschnittliche Erkrankungsdauer in Jahren	SD	Median der Erkrankungs- dauer in Jahren
weiblich prämenopausal	9	29,1	9,7	32,0	10,4	11,6	4,0
weiblich postmenopausal	20	65,6	7,9	65,5	10,8	12,7	5,5
weiblich gesamt	29	54,2	19,1	59,0	10,7	12,2	5,0
männlich	11	55,6	13,8	54,0	5,6	4,6	5,0
Gesamt	40	54,6	17,6	57,5	9,3	10,8	5,0

Von den Patienten wurden aus den vorliegenden Krankenakten folgende Parameter bestimmt: Erkrankungsdauer in Jahren (berechnet sich aus der Differenz zwischen Zeitpunkt der Probenentnahme und Zeitpunkt der gesicherten Diagnose Rheumatoide Arthritis),

Röntgenstadium nach Steinbrocker (Stadium 0 bis IV) (Steinbrocker et al. 1949), Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) bei 34 Patienten sowie die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CrP) bei 36 Patienten im Serum jeweils in einem zeitlich eng gefassten Rahmen von maximal 14 Tagen.

Die Progredienz der Krankheit wurde definiert als Quotient P gleich Röntgenstadium nach Steinbrocker (s. Tab. 4 auf S. 30) dividiert durch die Erkrankungsdauer in Jahren. Daraus ergibt sich, dass der Zahlenwert der Progredienz umso mehr zunimmt je größer der Zahlenwert des bestimmten Röntgenstadiums – also die bereits fortgeschrittene Gelenkdestruktion – ist und je kürzer die Krankengeschichte des Patienten andauert.

Tab. 4: Röntgenstadien der Rheumatoiden Arthritis nach Steinbrocker (Steinbrocker et al. 1949)

<i>Stadium</i>	<i>radiologische Indizien</i>
0	keinerlei pathologischen Veränderungen
I	Frühstadium Radiologisch kein Nachweis von destruktiven Gelenkveränderungen, Osteoporose möglich. Kein Nachweis von Muskelatrophien, Tendosynovitis, subkutaner Knötchenbildung oder Gelenkdeformitäten
II	Mäßig fortgeschrittenes Stadium Röntgenologisch Nachweis einer Osteoporose, leichte Knorpel- oder Knochendestruktion möglich. Atrophie der gelenknahen Muskulatur, mögliches Vorliegen von subkutanen Knötchen und/oder Tendosynovitis. Kein Nachweis von Gelenkdeformitäten und/oder Versteifung
III	Stark fortgeschrittenes Stadium Röntgenologischer Nachweis von Osteoporose sowie Knorpel- und Knochenzerstörungen. Ausgeprägte Muskelatrophie, mögliches Vorliegen von subkutaner Knötchenbildung und Tendosynovitis, Gelenkdeformation, Subluxation, ulnare Deviation und/oder Gelenküberdehnung. Kein Nachweis von Gelenkversteifungen
IV	Endstadium Sämtliche Zeichen wie unter III sowie fibröse und knöcherne Gelenkversteifungen (Ankylosen)

Bei der Bestimmung der Röntgenstadien an Hand von klinikinternen Röntgenbefunden wurden abweichend von der Steinbrocker-Klassifikation gegebenenfalls weitere Unterteilungen in Stadien wie zum Beispiel 1,5 vorgenommen, wenn der Befund nicht eindeutig genau einem Stadium zuzuordnen war. Grundsätzlich wurden jedoch – sofern möglich – die Röntgenstadien entsprechend der klinisch-radiologisch schwersten Destruktion zugeteilt.

Die Höhe der Progredienz ist in Tab. 5 auf S. 31 dargestellt [Röntgenstadium nach Steinbrocker/Erkrankungsdauer in Jahren].

Tab. 5: Höhe der radiologischen Progredienz des untersuchten Patientenkollektivs

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Männer	11	0	7,5	1,12	2,18
Frauen prämenopausal	9	0	20	4,43	6,75
Frauen postmenopausal	20	0	3	0,55	0,68
Frauen gesamt	29	0	20	1,75	4,08
Gesamtkollektiv	40	0	20	1,60	3,64

6.2 Materialien

Wie Tabelle 6 auf S. 32 zu entnehmen, wurde bei allen 40 Patienten die Konzentration des CTX-I im Serum und Urin sowie des CTX-II im Urin bestimmt. Außerdem wurden im Urin die Spiegel der Kollagen-Crosslinks (Dpyd und Pyd) von jeweils 38 Patienten als weitere Abbaumarker von Knochen und Knorpel nachgewiesen.

Aus dem Serum wurde die Konzentration der Crosslinks von jeweils 19 Patienten, von sRANKL und OPG von jeweils 16 Patienten sowie die CrP-Konzentration von insgesamt 36 und die BSG von insgesamt 34 Patienten bestimmt.

Aus der Synovialflüssigkeit (SF) wurde die Konzentration der Crosslinks bei insgesamt 39 Patienten, die COMP-Konzentration von 26 Patienten, die CrP-Konzentration von 25 Patienten, die sRANKL-Konzentration von 22 Patienten sowie die OPG-Konzentration von 17 Patienten bestimmt.

Tab. 6: Anzahl der Patienten, bei denen der jeweilige Laborwert im jeweiligen Kompartiment bestimmt wurde

Labormarker	Anzahl der Patienten	Labormarker	Anzahl der Patienten
CrP (Serum)	36	sRANKL (SF)	22
CrP (SF)	25	Pyd (Serum)	19
BSG (Serum)	34	Pyd (Urin)	38
COMP (SF)	26	Pyd (SF)	39
CTX-II (Urin)	40	Dpyd (Serum)	19
CTX-I (Serum)	40	Dpyd (Urin)	38
CTX-I (Urin)	40	Dpyd (SF)	39
OPG (Serum)	16	Pyd-/Dpyd- Quotient (Serum)	19
OPG (SF)	17	Pyd-/Dpyd- Quotient (Urin)	38
sRANKL (Serum)	16	Pyd-/Dpyd- Quotient (SF)	39

6.2.1 Ermittlung der BSG und der Konzentration von CrP

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) wurde mit der Westergrenmethode durchgeführt und demzufolge nach einer Stunde abgelesen.

Das C-reaktive Protein (CrP) wurde quantitativ mittels Immunnephelometrie vom Institut für Klinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena bestimmt.

6.2.2 Ermittlung der Konzentration von COMP

Zur Ermittlung der Konzentrationen des „Cartilage Oligomeric Matrix Protein“ sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im Blutserum wurden jeweils ELISA-Kits der Firma AnaMar Medical AB, Uppsala, Schweden verwendet.

6.2.3 Ermittlung der Konzentrationen von CTX-I und CTX-II

Die C-terminalen Telopeptide des Kollagen I (in Urin und Serum) beziehungsweise II (in Urin) wurden jeweils mittels ELISA-Kits der Firma Nordic Bioscience Diagnostics, Herlev, Dänemark bestimmt.

6.2.4 Ermittlung der Konzentrationen von sRANKL und OPG

Zur Bestimmung der Konzentrationen von sRANKL und OPG sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit wurden jeweils ELISA-Kits der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim verwendet.

6.2.5 Ermittlung der Crosslink-Konzentrationen

6.2.5.1 Materialgewinnung

Zur Nutzung der nach notwendigen Routineuntersuchungen verbliebenen Restmengen der Synovialflüssigkeit bei ohnehin punktionspflichtigen Kniegelenksergüssen wurde die schriftliche Einverständniserklärung des jeweiligen Patienten eingeholt. Nach der Entnahme wurde die Synovialflüssigkeit bei 4°C mit 3000 g zentrifugiert und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die CL-Bestimmung im Urin wurde Spontanurin, der morgens zwischen 7 und 11 Uhr gesammelt wurde, verwendet. Er wurde ebenfalls bei 4°C mit 3000 g zentrifugiert und danach bei -80°C gelagert. Am gleichen Vormittag wurde eine Blutprobe aus dem peripher-venösen System zur Serumgewinnung entnommen und analog zu der Urinprobe bei -80°C aufbewahrt.

Generell lag die Zustimmung der Ethikkommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena vor.

6.2.5.2 Methodik

Die Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC) ist ein chemisch-analytisches Verfahren mittels dessen es gelingt, Stoffgemische zu trennen und mit Hilfe von Detektoren anschließend einzeln zu analysieren und zu quantifizieren.

Hierbei zeigen die einzelnen Stoffe jeweils eine differente Affinität zu jeweiligen Adsorptionsmitteln, durch die das Stoffgemisch geleitet wird. Die für jeden Stoff charakteristische Verweilzeit an der Kieselgel-Oberfläche lässt sich durch seine jeweilige Polarität erklären. An Hand dieser Verweilzeit lassen sich Rückschlüsse auf die Stoffidentität ziehen.

6.2.5.3 Probenvorbereitung und HPLC

Alle vorhandenen Patientenproben wurden bezüglich der Ermittlung der Crosslink-Konzentrationen im Serum, Urin und Synovialflüssigkeit (SF) einer Doppelbestimmung unterzogen. Um die Crosslinks in eine peptidfreie Form zu überführen, wurden 250 µl Urin und 250 µl 32-prozentige HCl beziehungsweise je 1 ml Serum beziehungsweise SF und je 1 ml 32-prozentige HCl in Speißglasampullen gegeben und schließlich für 16 Stunden bei 116°C hydrolysiert.

Als nächster Schritt folgte eine Partitionschromatografie zur Reinigung des Hydrolysats; hierbei wurden die Säulen (Gilson-Spitzen für 5 ml Pipette) mit Glaswolle gestopft. Gleichzeitig erfolgte die Herstellung von CF-1-Slurry aus mobiler Phase und 5 Prozent CF-1-Zellulose. Nun wurden die Urinhydrolysate mit 0,5 ml CF-1-Slurry, 0,5 ml Essigsäure und 2 ml N-Butanol – die Serum- und SF-Hydrolysate mit der jeweils doppelten Menge – gemischt und auf die CF-1-Säule aufgetragen, um die Crosslinks an der Zellulose absorbieren zu lassen. Anschließend wurde die Speißglasampulle mit 2 ml (bei den Urinproben – beziehungsweise 5 ml bei den Blut- und SF-Proben) mobiler Phase ausgespült und ebenfalls auf die Säule gegeben. Daraufhin wurde die Säule mit drei Mal je 5 ml mobiler Phase ausgewaschen und mittels Druckluft trocken geblasen. Um schließlich die wässrige von der organischen Phase zu trennen, wurde das aufgefangene Eluat im Falconröhrchen bei 2000 U/min für zehn Minuten zentrifugiert; die wässrige Phase wurde in Rollrandgläser gefüllt und gefriergetrocknet. Diese hierdurch entstandenen trockenen Lyophilisate wurden mit Loadingpuffer – bestehend aus 10 ml Wasser für die HPLC plus 0,13 ml einprozentiges HFBA in 0,25 ml für Urin beziehungsweise 0,4 ml für Serum und SF – gelöst und bis zur eigentlichen Messung bei -20°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Messung beider Crosslinks per HPLC mittels einer Ionenpaarchromatografie und Gradiententrennung unter Fluoreszenzdetektion (Extinktion 295 nm, Emission 395 nm). Um die jeweiligen Proben quantifizieren zu können, wurde die HPLC-Methode über einen externen Standard der Firma

Immundiagnostik, Heidelberg, der definierte Mengen an reinem Pyd beziehungsweise Dpyd enthielt, durch eine Zweitpunkteichung kalibriert. Das Detektionslimit bei dieser Methode lag bei 25 fmol für Pyd und bei 56 fmol für Dpyd. Die Crosslinkwerte im Urin wurden auf die Kreatininausscheidung korrigiert. Die Kreatininkonzentration wurde aus der gleichen Urinprobe bestimmt.

6.3 Statistik

Die statistische Auswertung sowie das Erstellen der Grafiken erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 11.5.1. Das Erstellen von Tabellen erfolgte mit den Programmen Microsoft Word 2007 sowie Microsoft Excel 2007.

Die bivariaten Korrelationsanalysen wurden mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

Um eine lineare Korrelation verschiedener Labormarker gleichzeitig, das heißt in Kombination miteinander nachzuweisen, wurden jeweils multiple, lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der so genannte Rückwärts-Algorithmus angewandt: Hierbei werden alle in Frage kommenden Variablen in einem einzigen Schritt in einen Block eingeschlossen und anschließend an Hand von Entfernungskriterien nacheinander entfernt. Entfernungskriterium bei der hier angewandten Rückwärtsmethode ist eine F-Wahrscheinlichkeit bei einseitiger Testung von mehr als zehn Prozent.

7 Ergebnisse

Die Untersuchung ergab, dass eine negative Korrelation zwischen der Progredienz und dem kalendarischen Alter der Patienten besteht (Korrelationskoeffizient $r = -0,48$, Signifikanzniveau $p = 0,002$, Anzahl der Patienten $n = 40$), das heißt, je früher im Alter der Patienten die Diagnose Rheumatoide Arthritis gestellt wurde, desto klinisch dramatischer verlief die Krankheit bisher (s. Diagramm 1, S. 36). Dies lässt sich noch stärker verdeutlichen, wenn man das Gesamtkollektiv in Hinsicht auf Alter und Geschlecht unterteilt: Hier fällt auf, dass die momentane Progredienz der RA der prämenopausalen Frauen am stärksten mit ihrem Alter korreliert (s. Diagramm 2, S. 37), das Alter bei der Progredienz der postmenopausalen Frauen ($r = -0,13$, $p = 0,58$, $n = 20$) beziehungsweise der untersuchten Männer ($r = 0,41$, $p = 0,22$, $n = 11$) jedoch lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Die Korrelation der Progredienz mit dem Alter aller Frauen dagegen zeigt wiederum eine statistische Signifikanz ($r = -0,60$, $p = 0,001$, $n = 29$).

Diagramm 1: Korrelation der Progredienz der RA mit dem Patientenalter ($n = 40$; $r = -0,48$; $p = 0,002$)

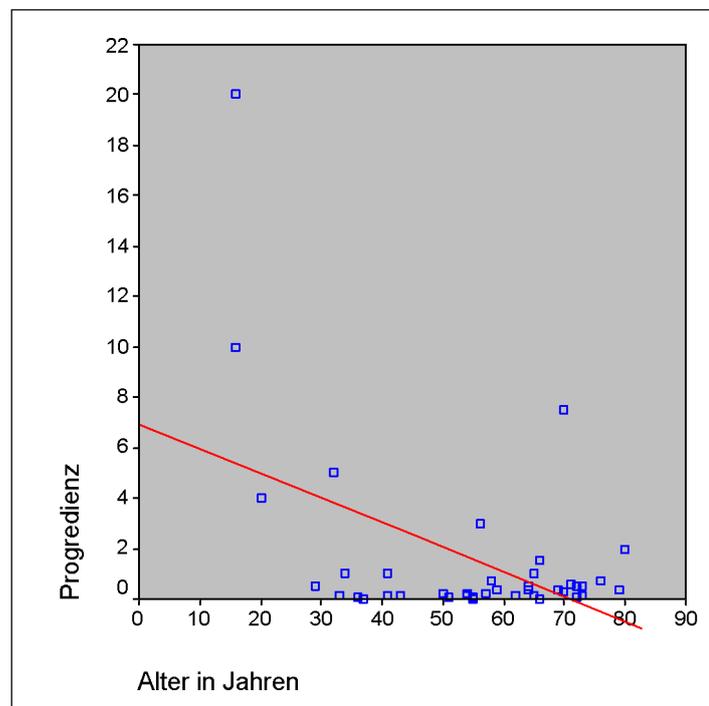
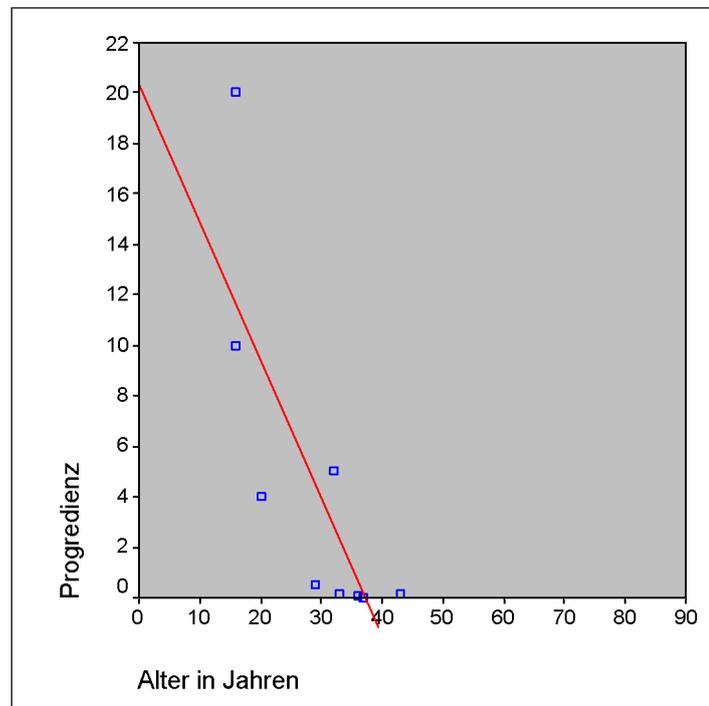
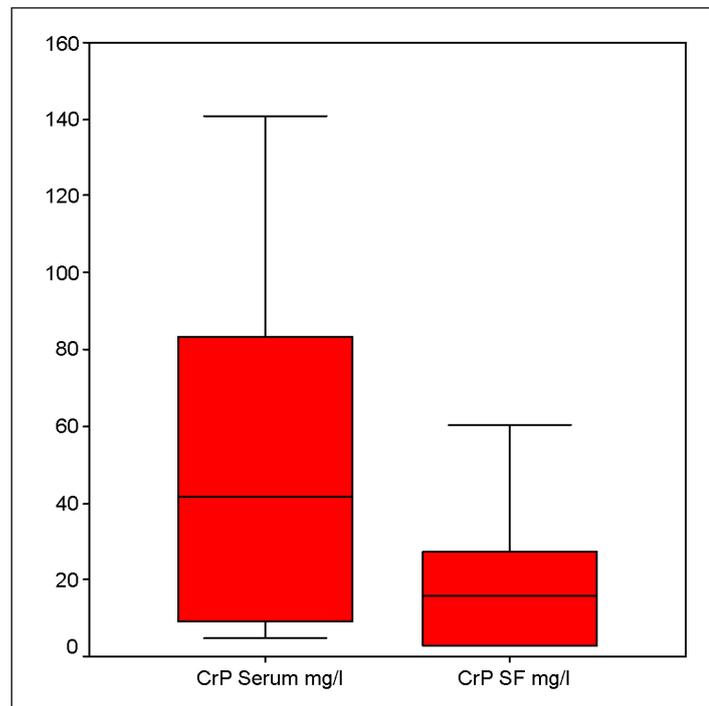


Diagramm 2: Korrelation der Progredienz der RA mit dem Patientenalter nur bei prämenopausalen Frauen (n = 9; r = -0,79; p = 0,012)



Die quantitative Bestimmung des C-reaktiven Proteins ergab im Blutserum eine mittlere Konzentration von 40,7 (\pm 35,8) mg/l und in der Synovialflüssigkeit eine mittlere Konzentration von 20,8 (\pm 22,6) mg/l (s. Diagramm 3, S. 38).

Diagramm 3: Darstellung der Verteilung der CrP-Konzentrationen im Serum und in der Synovialflüssigkeit



Es konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der Progredienz P und der Konzentration von CrP in der Synovialflüssigkeit ($r = 0,62$, $p = 0,001$, $n = 25$) (s. Diagramm 4, S. 39) nachgewiesen werden – und hier wiederum vor allem bei den Frauen ($r = 0,70$, $p < 0,0005$, $n = 17$) –; allerdings brachte eine Unterteilung dieser Gruppe in prä- und postmenopausale Frauen – wahrscheinlich auf Grund der jeweils relativ kleinen Zahl der involvierten Patientinnen – weder in der einen noch in der anderen Gruppe statistisch relevante Beziehungen zu Tage.

Die Konzentration des unspezifischen Entzündungsmarkers CrP im Serum zeigte in keiner der Gruppen einen statistisch gesicherten Zusammenhang (für das Gesamtkollektiv: $r = 0,13$, $p = 0,45$, $n = 36$) (s. Diagramm 5, S. 39).

Diagramm 4: Korrelation der Progredienz der RA mit der CrP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit (n = 25; r = 0,62; p = 0,001)

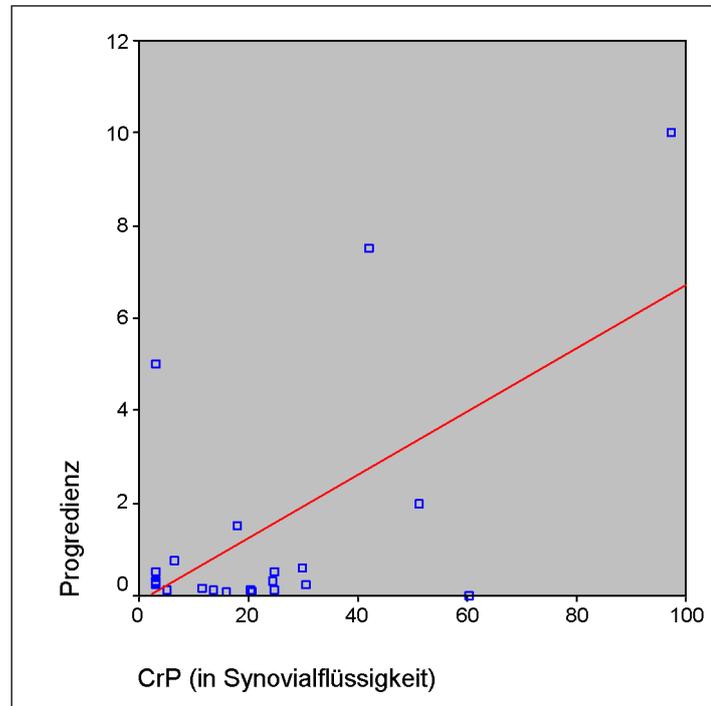
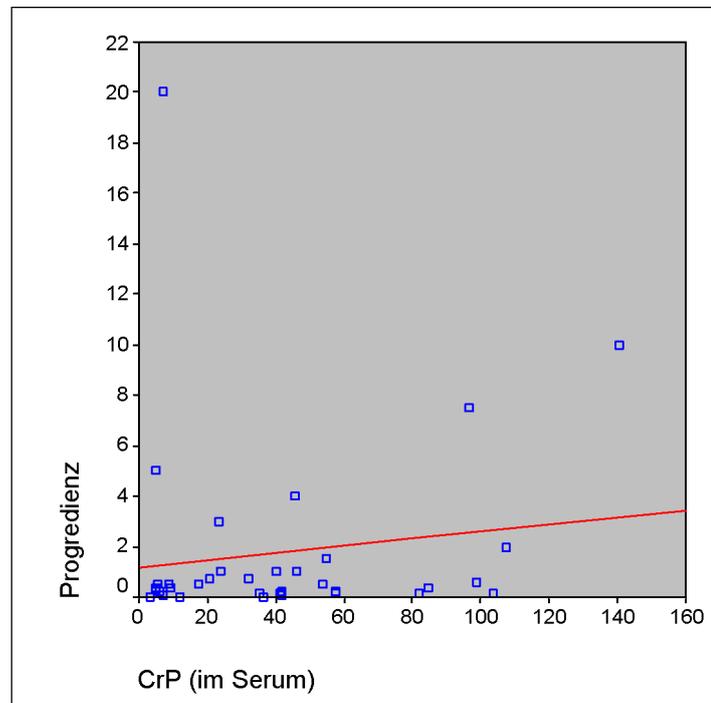


Diagramm 5: Korrelation der Progredienz der RA mit der CrP-Konzentration im Serum (n = 36; r = 0,13; n.s.)



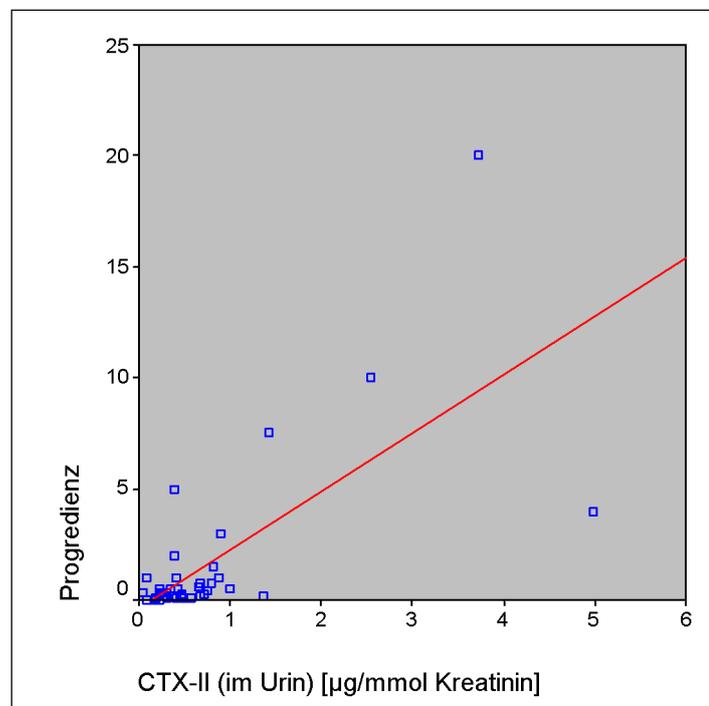
Ein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen P und der BSG konnte weder im Gesamtkollektiv noch in der männlichen oder den weiblichen Gruppen nachgewiesen werden ($r = 0,012$, $p = 0,95$, $n = 34$; Daten nicht dargestellt).

Die Bestimmung von COMP erbrachte in der Synovialflüssigkeit eine Konzentration von durchschnittlich $91,8 (\pm 100,7) \mu\text{g/ml}$ im vorliegenden Patientenkollektiv.

Es bestehen keinerlei statistisch signifikanten Beziehungen zwischen der Progredienz und COMP in allen untersuchten Untergruppen.

Bei der Betrachtung des Knorpelabbaumarkers CTX-II fand sich eine positive Korrelation zwischen der Progression und der CTX-II-Konzentration im Urin des gesamten Kollektives ($r = 0,69$, $p < 0,0005$, $n = 40$) (s. Diagramm 6, S. 40) und zwar sowohl für die Männer ($r = 0,63$, $p = 0,037$, $n = 11$) als auch für die Frauen ($r = 0,70$, $p < 0,0005$, $n = 29$). Dabei zeigten sich bei Letzteren keine Signifikanzen bei der Differenzierung zwischen prä- oder postmenopausal.

Diagramm 6: Korrelation der Progredienz der RA mit der CTX-II-Konzentration im Urin ($r = 0,69$; $p < 0,0005$; $n = 40$)

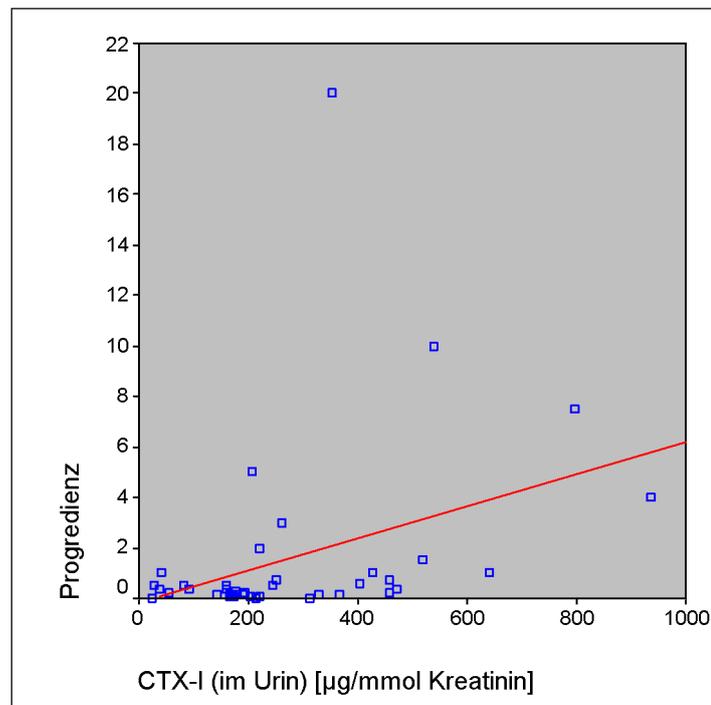


Die durchschnittliche Konzentration von CTX-I beträgt $0,342 (\pm 0,3)$ ng/ml im Serum beziehungsweise $276,4 (\pm 205,0)$ $\mu\text{g}/\text{mmol}$ Kreatinin im Urin bei jeweils allen 40 Patienten.

Die mittlere Konzentration von CTX-II beträgt $0,752 (\pm 1,0)$ $\mu\text{g}/\text{mmol}$ Kreatinin im Urin bei ebenfalls 40 Patienten.

Die Korrelationsanalysen ergeben, dass lediglich die Progredienz mit der CTX-I-Konzentration im Urin in einem positiven Zusammenhang steht ($r = 0,36$, $p = 0,022$, $n = 40$) (s. Diagramm 7, S. 41). Auch hier zeigt sich, dass dieser Zusammenhang eher bei Männern ($r = 0,75$, $p = 0,008$, $n = 11$) als bei Frauen ($r = 0,29$, $p = 0,124$, $n = 29$) statistische Signifikanz besitzt.

Diagramm 7: Korrelation der Progredienz der RA mit der CTX-I-Konzentration im Urin ($n = 40$; $r = 0,36$; $p = 0,022$)



Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Progredienz und der CTX-I-Konzentration im Serum konnte hingegen nicht bewiesen werden ($r = 0,221$; n.s.; $n = 40$).

Die durchschnittliche Konzentration von sRANKL beträgt im Serum $538,2 (\pm 823,1)$ pmol/l bei insgesamt 16 Patienten und in der Synovialflüssigkeit $1159,4 (\pm 2935,0)$ pmol/l bei 22 Patienten. Der sRANKL(SF) / sRANKL (Serum)-Quotient beträgt damit für das Gesamtkollektiv 2,15.

Die mittlere Konzentration von Osteoprotegerin beträgt im Serum 3,61 (\pm 1,1) pmol/l bei insgesamt 16 Patienten und in der Synovialflüssigkeit 11,00 (\pm 4,4) pmol/l bei 17 Patienten.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen P und diesen für den Knochenmetabolismus bedeutsamen Zytokinen sRANKL beziehungsweise dessen Gegenspieler OPG konnte nicht bewiesen werden.

Jedoch bestehen – wie den Tabellen 8 und 9 auf den Seiten 44 und 45 zu entnehmen ist – durchaus statistische Beziehungen dieser Zytokine untereinander: So korreliert die sRANKL-Konzentration in der Synovialflüssigkeit sehr stark mit der im Serum ($r = 0,979$; $p < 0,0005$; $n = 13$); statistisch signifikante, negative Korrelationen zwischen sRANKL und OPG konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Ebenso bestehen keine statistischen Zusammenhänge zwischen sRANKL beziehungsweise OPG und den Entzündungsmarkern CrP und BSG.

Die ermittelten Konzentrationen der Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin sind in Tabelle 7 auf S. 42 dargestellt:

Tabelle 7: Kollagen-Crosslink-Konzentrationen in den jeweiligen untersuchten Kompartimenten

	Pyd (Serum) [nmol/l]	Dpyd (Serum) [nmol/l]	Pyd (Urin) [nmol/mol Krea]	Dpyd (Urin) [nmol/mol Krea]	Pyd (SF) [nmol/l]	Dpyd (SF) [nmol/l]
Mittelwert	14,5	15,3	95,1	14,9	25,3	4,4
Standardabw.	9,0	20,8	65,8	10,7	40,7	5,6
Anzahl der Patienten	19	19	38	38	39	39

Die Korrelationsanalyse konnte zeigen, dass es lediglich einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Progredienz P und Pyd gemessen im Urin bei den männlichen Patienten gab ($r = 0,79$, $p = 0,004$, $n = 11$) – weitere Korrelationen zwischen der Progredienz und Pyd – egal, ob im Serum oder Synovialflüssigkeit beziehungsweise bei Frauen gemessen – ergaben sich nicht.

Des Weiteren fanden sich ebenso keine Korrelationen zwischen der Progredienz und den Quotienten aus Pyd/Dpyd aus allen drei Kompartimenten.

In den Tabellen 8 und 9 auf den Seiten 44 und 45 sind die statistisch signifikanten Korrelationen der Labormarker miteinander sowie die Korrelationen mit der radiologischen Progredienz nach Geschlecht beziehungsweise nach Prä- oder Postmenopause detailliert aufgeführt.

Tab. 8: statistisch signifikante Korrelationen der Progredienz mit gemessenen Labormarkern sowie der Labormarker untereinander

		CrP (SF)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	Alter	
Progredienz	<i>r</i>	0,623 (**)	0,360 (*)	0,694 (**)	-0,475 (**)	
	<i>p</i>	0,001	0,022	< 0,0005	0,002	
	<i>n</i>	25	40	40	40	
		CrP (Serum)	Pyd (Urin)	Dpyd (Urin)	CrP (SF)	
BSG	<i>r</i>	0,626 (**)	0,390 (*)	0,379 (*)	0,506 (*)	
	<i>p</i>	< 0,0005	0,027	0,032	0,014	
	<i>n</i>	34	32	32	23	
		Dpyd (SF)	CrP (SF)			
CrP (Serum)	<i>r</i>	0,366 (*)	0,708 (**)			
	<i>p</i>	0,031	< 0,0005			
	<i>n</i>	35	24			
		Dpyd (Urin)	Pyd (Serum)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	CTX-I (Serum)
Pyd (Urin)	<i>r</i>	0,935 (**)	0,660 (**)	0,722 (**)	0,593 (**)	0,717 (**)
	<i>p</i>	< 0,0005	0,002	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005
	<i>n</i>	38	19	38	38	38
		Pyd (Serum)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	CTX-I (Serum)	
Dpyd (Urin)	<i>r</i>	0,496 (*)	0,750 (**)	0,636 (**)	0,766 (**)	
	<i>p</i>	0,031	< 0,0005	< 0,0005	< 0,0005	
	<i>n</i>	19	38	38	38	
		sRANKL (Serum)				
Pyd (SF)	<i>r</i>	0,918 (**)				
	<i>p</i>	< 0,0005				
	<i>n</i>	15				
		sRANKL (SF)		Alter		
Dpyd (SF)	<i>r</i>	0,783 (**)	0,321 (*)			
	<i>p</i>	< 0,0005	0,047			
	<i>n</i>	22	39			
		CTX-II (Urin)				
CrP (SF)	<i>r</i>	0,648 (**)				
	<i>p</i>	< 0,0005				
	<i>n</i>	25				
		sRANKL (SF)				
sRANKL (Serum)	<i>r</i>	0,979 (**)				
	<i>p</i>	< 0,0005				
	<i>n</i>	13				
		CTX-II (Urin)	CTX-I (Serum)			
CTX-I (Urin)	<i>r</i>	0,660 (**)	0,837 (**)			
	<i>p</i>	< 0,0005	< 0,0005			
	<i>n</i>	40	40			
		CTX-I (Serum)	Alter			
CTX-II (Urin)	<i>r</i>	0,654 (**)	- 0,508 (**)			
	<i>p</i>	< 0,0005	0,001			
	<i>n</i>	40	40			

(*): Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

(**): Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

männlich		BSG	CrP (S)	Pyd (Urin)	Dpyd (Urin)	Pyd/Dpyd (Urin)	Pyd (S)	Dpyd (S)	Pyd/Dpyd (S)	Pyd (SF)	Dpyd (SF)	Pyd/Dpyd (SF)
<i>r</i>		0,534	0,511	0,788 (**)	0,589	-0,017	0,077	-0,330	0,881 (*)	-0,244	0,225	-0,325
<i>p</i>		0,112	0,108	0,004	0,057	0,961	0,884	0,524	0,020	0,470	0,506	0,329
<i>n</i>		10	11	11	11	11	6	6	6	11	11	11
		CrP (SF)	sRANKL (SF)	sRANKL (S)	OPG (SF)	OPG (S)	COMP (SF)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	CTX-I (S)		
<i>r</i>		0,302	0,576	-0,817	-0,135	-0,613	-0,187	0,746 (**)	0,632 (*)	0,431		
<i>p</i>		0,467	0,135	0,091	0,828	0,271	0,631	0,008	0,037	0,185		
<i>n</i>		8	8	5	5	5	9	11	11	11		
weiblich, gesamt		BSG	CrP (S)	Pyd (Urin)	Dpyd (Urin)	Pyd/Dpyd (Urin)	Pyd (S)	Dpyd (S)	Pyd/Dpyd (S)	Pyd (SF)	Dpyd (SF)	Pyd/Dpyd (SF)
<i>r</i>		-0,063	0,101	0,080	0,155	-0,194	-0,204	0,000	-0,170	-0,006	-0,153	0,082
<i>p</i>		0,769	0,629	0,691	0,439	0,332	0,503	1,000	0,578	0,976	0,438	0,680
<i>n</i>		24	25	27	27	27	13	13	13	28	28	28
		CrP (SF)	sRANKL (SF)	sRANKL (S)	OPG (SF)	OPG (S)	COMP (SF)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	CTX-I (S)		
<i>r</i>		0,791 (**)	-0,093	-0,170	0,025	-0,512	-0,033	0,292	0,700 (**)	0,192		
<i>p</i>		<0,0005	0,752	0,618	0,938	0,108	0,899	0,124	<0,0005	0,319		
<i>n</i>		17	14	11	12	11	17	29	29	29		
weiblich, prämenop.		BSG	CrP (S)	Pyd (Urin)	Dpyd (Urin)	Pyd/Dpyd (Urin)	Pyd (S)	Dpyd (S)	Pyd/Dpyd (S)	Pyd (SF)	Dpyd (SF)	Pyd/Dpyd (SF)
<i>r</i>		-0,175	0,057	0,033	0,042	0,028	-0,807	-0,208	0,258	-0,048	-0,147	-0,015
<i>p</i>		0,708	0,904	0,934	0,914	0,943	0,099	0,737	0,675	0,910	0,729	0,973
<i>n</i>		7	7	9	9	9	5	5	5	8	8	8
		CrP (SF)	sRANKL (SF)	sRANKL (S)	OPG (SF)	OPG (S)	COMP (SF)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	CTX-I (S)		
<i>r</i>		0,844	-1,000 (**)	-0,568	1,000 (**)	-0,818	0,317	0,298	0,649	0,167		
<i>p</i>		0,156	<0,0005	0,432	<0,0005	0,182	0,683	0,436	0,059	0,667		
<i>n</i>		4	2	4	2	4	4	9	9	9		
weiblich, postmenop.		BSG	CrP (S)	Pyd (Urin)	Dpyd (Urin)	Pyd/Dpyd (Urin)	Pyd (S)	Dpyd (S)	Pyd/Dpyd (S)	Pyd (SF)	Dpyd (SF)	Pyd/Dpyd (SF)
<i>r</i>		0,163	0,012	0,255	0,406	-0,223	0,549	-0,171	0,486	-0,065	-0,056	0,065
<i>p</i>		0,531	0,962	0,306	0,095	0,375	0,159	0,686	0,222	0,785	0,816	0,785
<i>n</i>		17	18	18	18	18	8	8	8	20	20	20
		CrP (SF)	sRANKL (SF)	sRANKL (S)	OPG (SF)	OPG (S)	COMP (SF)	CTX-I (Urin)	CTX-II (Urin)	CTX-I (S)		
<i>r</i>		0,140	0,131	0,259	-0,157	-0,107	-0,156	0,309	0,372	0,317		
<i>p</i>		0,649	0,686	0,574	0,664	0,820	0,611	0,186	0,106	0,173		
<i>n</i>		13	12	7	10	7	13	20	20	20		

(*): Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant. (**): Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.
(S): Serum; andere Abkürzungen: siehe Verzeichnis

Tab. 9: Korrelation von P mit gemessenen Laborparametern differenziert zwischen Alter und Geschlecht

Bei dem Versuch, die Progredienz als eine Gleichung von mehreren Laborparametern gleichzeitig zu beschreiben, konnte mittels einer multiplen linearen Regressionsanalyse gezeigt werden, dass die Konzentrationen der Marker CTX-I (im Blutserum) und CTX-II (im Urin) zusammen genommen diese Vorgabe recht gut erfüllen (s. Tab. 10, S. 46).

Tab. 10: Korrelationskoeffizienten der multiplen linearen Regressionsanalyse zur Abschätzung der Progredienz in Abhängigkeit von den Konzentrationen von CTX-II im Urin sowie CTX-I im Serum

	nicht standardisierte Koeffizienten		standardisierte Koeffizienten	Signifikanz p
	b	Standardfehler		
Konstante	0,824	0,627		0,197
CTX-II (Urin)	3,683	0,530	0,972	< 0,0005
CTX-I (Serum)	-5,845	1,923	-0,425	0,004

abhängige Variable: Progredienz

$$R^2 = 0,585$$

Der Einschluss der Pyd-Konzentration in der Synovialflüssigkeit in dieses Modell der multiplen linearen Regressionsanalyse zur Beschreibung der radiologischen Progredienz kann den R^2 -Wert insgesamt sogar noch leicht erhöhen (siehe Tab. 11 auf Seite 46).

Tab. 11: Korrelationskoeffizienten der multiplen linearen Regressionsanalyse zur Abschätzung der Progredienz in Abhängigkeit von den Konzentrationen von Pyd in der Synovialflüssigkeit, CTX-II im Urin sowie CTX-I im Serum

	nicht standardisierte Koeffizienten		standardisierte Koeffizienten	Signifikanz p
	b	Standardfehler		
Konstante	1,281	0,622		0,047
Pyd (SF)	-0,024	0,009	-0,265	0,015
CTX-II (Urin)	3,939	0,509	1,039	< 0,0005
CTX-I (Serum)	-5,907	1,818	-0,428	0,003

abhängige Variable: Progredienz

$$R^2 = 0,651$$

8 Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis ist eine schubweise verlaufende, chronisch-progrediente, meist das Knorpel- und Knochengewebe destruierende, aber gelegentlich sich auch extraartikulär manifestierende Systemerkrankung, deren Pathogenese bis heute nicht hinreichend geklärt werden konnte. Insbesondere ist bisher eine ungefähre Abschätzung der Progression, also der chronischen Zerstörung des kollagenen Stützgewebes nicht möglich. Dabei wäre besonders eine Aussage über diese Progredienz von immenser therapeutischer Konsequenz – der behandelnde Rheumatologe könnte sein Therapieregime individuell der destruktiven Intensität der Rheumatoiden Arthritis entsprechend anpassen. Auf der einen Seite können so folgenschwere und für das Gesundheitssystem auch ökonomisch bedeutsame Nebenwirkungen von spezifischen Medikamenten durch adäquate Therapie reduziert werden; auf der anderen Seite könnten Patienten mit einer prognostizierten raschen Progredienz von einer aggressiveren medikamentösen Behandlung, zum Beispiel mit Biologicals, erheblich profitieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob im Rahmen einer retrospektiven Querschnittsstudie mit 40 Patienten (29 weibliche, hiervon neun prämenopausal und 20 postmenopausal; elf männliche) mit gesicherter Diagnose einer Rheumatoiden Arthritis valide Labormarker existieren, die mit einem angemessenem Sicherheitsgrad die bisherige Progression der Erkrankung beschreiben können.

Zu Beginn unserer Studie im Jahr 2005 existierte keine Studie, die sich auf dieser Basis mit der Ermittlung beziehungsweise der Berechnung der wahrscheinlichen Progredienz der Rheumatoiden Arthritis beschäftigte. Im Jahr 2007 wurde eine britische Längsschnittstudie über ein sehr ähnliches Thema publiziert (Young-Min et al. 2007); diese Studie wird im weiteren Verlauf der Diskussion ausführlich besprochen.

Die oben genannten, modernen Laborparameter stehen zum einen sowohl für die lokale als auch die systemische Entzündungssituation (CrP in Synovialflüssigkeit (SF) und Serum, BSG), andererseits stellen sie repräsentative Abbaumarker des Knochen- und Knorpelstoffwechsels (COMP in SF, CTX-II im Urin, CTX-I im Serum und Urin, sRANKL und OPG jeweils im Serum und SF sowie Pyridinolin und Desoxypyridinolin jeweils im Serum, Urin und SF) dar. Außerdem wurde versucht, die Destruktionsintensität der Rheumatoiden Arthritis klinisch-mathematisch zu definieren. Zu diesem Zweck wurden von den 40 Patienten zeitnah, das heißt im Mittel innerhalb von zwei Wochen, im Rahmen der üblichen Diagnostik Röntgenaufnahmen von

repräsentativen Gelenken (meist von den Hand- sowie den Metakarpophalangeal- und den proximalen Interphalangealgelenken, aber auch bei individuellen Beschwerden vom Vorfuß oder der Halswirbelsäule) angefertigt und anschließend von erfahrenen Radiologen befundet. An Hand dieses Befundes erfolgt die Einteilung nach Steinbrocker (siehe Tab. 4 auf S. 30). Zur Ermittlung der Progredienz wurde das Röntgenstadium nach Steinbrocker dividiert durch die Anzahl der Erkrankungsjahre. Dieser Quotient kann einen näherungsweisen Aufschluss darüber geben, wie rasch die Destruktion vor allem in den betroffenen Gelenken bisher fortgeschritten ist. So spricht ein hoher Zahlenwert der Progredienz für eine bisher aggressive Form der RA und kann Ausschlag gebend für eine Intensivierung der antirheumatischen Therapie sein. Ein niedriger Zahlenwert der Progredienz kann Hinweise darauf geben, dass entweder die RA (noch) nicht besonders aggressiv verlaufen ist oder die bisherige antirheumatische Therapie recht effektiv war. Die Progredienz kann selbstverständlich keine Aussage darüber geben, ob sich der Patient in einem akuten Schub der RA oder in Remission befindet; schließlich treten radiologische Veränderungen erst mit einer Latenzzeit von zirka sechs Monaten auf und wären somit im akuten Schub nicht detektierbar.

Schließlich wurde eine lineare Korrelationsanalyse durchgeführt, welche überprüft, ob die Progredienz mit den Laborparametern in statistisch signifikantem Zusammenhang steht.

In der vorliegenden Studie wurde das Röntgenstadium nach Steinbrocker aus den schriftlich dokumentierten Röntgenbefunden ermittelt. Die Befundung war jeweils von einem Fach-Radiologen vorgenommen worden. Diese verbalen Beurteilungen mussten zunächst in Zahlenwerte übersetzt werden.

Beide Methoden unterliegen höchstwahrscheinlich interindividuellen und sicherlich auch intraindividuellen Unterschieden. Um diese Fehlerquellen zu minimieren und so möglichst wenig falsch-hohe oder falsch-niedrige Zahlenwerte für das Röntgenstadium zu erhalten, wurde in dieser Studie entschieden, noch gewisse Abstufungen zwischen den klassischen Steinbrocker-Röntgenstadien vorzunehmen und Stufen wie 1,5 (zum Beispiel bei Befundkonstellationen wie „fragliche zystische Arrosionen“, „geringe Gelenkspaltverschmälerung“ oder „mögliche kleine Erosionen“) eingeführt. Außerdem ist die Frage berechtigt, weshalb in dieser Arbeit die doch veraltete Klassifikation nach Steinbrocker von 1949 und nicht eine weitaus aktuellere wie zum Beispiel der modifizierte Sharp-Score oder der modifizierte Larsen-Score zur Anwendung gekommen ist. Im Gegensatz zu den neueren Scores, welche Röntgenaufnahmen aller Hand- beziehungsweise Fußgelenke zur Ermittlung der Endsumme benötigen, entspricht die

Steinbrocker-Klassifikation des Patienten dem Grad seines am schwersten destruierten Gelenks. Diese Methodik mag zwar im Vergleich zwischen einzelnen Patienten recht unpräzise erscheinen, war jedoch bei der Zugrundelegung der schriftlichen Befunddokumentation die einzig sinnvolle Lösung, auch wenn sie lediglich eine grobe Einordnung in verschiedene Schweregrade erlaubt.

Eine weitere Bias in der Berechnung der Progredienz liegt in jedem Fall in der Angabe der bisherigen Erkrankungsdauer – sie wird aus der Differenz zwischen dem Jahr der Probenabnahme beziehungsweise der Aufnahme des Röntgenbildes und dem Jahr der Erstdiagnosestellung der RA ermittelt; so ist aber gerade das Jahr der Erstdiagnose oft unklar. In den medizinischen Akten der Rheumatologischen Fachambulanz wird zwar in fast jedem Fall dieses Jahr erwähnt, jedoch kommt es nicht selten vor, dass die Patienten vorher monate- oder gar jahrelang mit ihren auch unspezifischen Beschwerden ein regelrechtes, so genanntes „Doctor-hopping“ betrieben haben, also von einem Facharzt zum nächsten entweder überwiesen werden oder aus Unzufriedenheit mit dessen Behandlungsstrategien von selbst wechseln. Außerdem gehen Patienten mit ihren spezifischen Beschwerden oft erst zum Arzt, wenn diese Beschwerden sie ernsthaft im Alltag beeinträchtigen, also hier zum Beispiel die Gelenke unerträglich stark schmerzen oder ein übliches Bewegen nicht mehr möglich ist. Zu diesem Zeitpunkt des Auftretens der Erstsymptome ist die RA histopathologisch schon mindestens um Monate fortgeschritten – ein exakter Erstdiagnosezeitpunkt ist also retrospektiv in nahezu keinem Fall möglich. Damit gelingt logischerweise die Rückrechnung der Erkrankungsdauer auch nur näherungsweise; Konsequenzen sind eine falsch-niedrige Angabe der Erkrankungsdauer und – unter Zuhilfenahme der oben genannten Formel – eine falsch-hohe Berechnung der Progredienz. Hierbei handelt es sich jedoch lediglich um einen systemischen Fehler; da dieser bei allen Patienten in etwa gleichem Maße auftritt, eliminiert er sich partiell bei der Berechnung der Korrelationen der Progredienz mit den verschiedenen Labormarkern.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass die Progredienz der Rheumatoiden Arthritis negativ mit dem kalendarischen Patientenalter korreliert ($r = -0,48$, $p = 0,002$, $n = 40$), das heißt je früher im Lebensalter eines Patienten die Diagnose RA erstmals gestellt wird, desto klinisch schwerer ist wahrscheinlich der Verlauf beziehungsweise das Outcome. Hier gilt natürlich zu beachten, dass die Patientenwahl rein zufällig verlief – es konnte also nicht vorhergesagt werden, ob sich der Patient zum Zeitpunkt der Probenentnahme gerade in einer – eventuell medikamentös

induzierten – Remission oder in einem akuten Schub der Krankheit befand. Allerdings spiegelt die negative Korrelation zwischen Alter und Progredienz schon die allgemeine Lehrmeinung wider, dass vornehmlich junge Frauen – in dieser Studie durch neun prämenopausale Patientinnen repräsentiert ($r = -0,79$, $p = 0,012$, $n = 9$) – unter vermehrt akuten Schüben der RA leiden, während im Alter – natürlich zumeist unter adäquater Therapie – der weitere Fortschritt der Autoimmunerkrankung sowohl bei Männern als auch bei Frauen weniger aggressiv verläuft.

Als Schlussfolgerung aus diesem Ergebnis käme in Frage, dass junge und vor allem weibliche Patienten mit der Erstdiagnose der Rheumatoiden Arthritis einem besonders konsequenten und intensiven Therapieschema unterliegen sollten, um die Krankheit möglichst früh in eine Remission zu bringen oder zumindest den rapiden Fortschritt zu bremsen. Immerhin haben diese Betroffenen – bei einem geschätzten Diagnosealter von circa 25 Jahren und einer Lebenserwartung von etwa 80 Jahren – 55 Jahre lang mit der RA und ihren Folgen und somit auch einer gewissen sozialen Beeinträchtigung zu leben, so dass eine aggressivere Therapie in Kauf genommen werden müsste, während bei älteren Patienten bei einem geschätzten Diagnosealter von 65 Jahren die Therapiedauer von circa 15 Jahren eine wesentlich kürzere ist und so – nach einer sorgfältigen Einzelfallüberprüfung – eventuell schwere Nebenwirkungen aggressiver Antirheumatika vermieden werden können.

Die von uns gemessenen CrP-Konzentrationen im Serum ($40,7 \pm 35,8$ mg/l) beziehungsweise in der Synovialflüssigkeit ($20,8 \pm 22,6$ mg/l) spiegeln im Allgemeinen die bisherigen Forschungsergebnisse wider (Rowe et al. 1987, Sukenik et al. 1988, Walters et al. 1989).

Selbst im entzündeten beziehungsweise von der RA betroffenen Gelenk ist die CrP-Konzentration durchschnittlich niedriger als gleichzeitig im Serum; dieser Effekt ist wahrscheinlich der hepatischen CrP-Synthese geschuldet. Trotzdem ist die synoviale CrP-Konzentration relativ gesehen immer noch niedriger als erwartet, wenn man einerseits davon ausgeht, dass die einzelnen CrP-Moleküle direkt aus dem Serum passiv in die Gelenkflüssigkeit diffundieren (Rowe et al. 1987). Andererseits ist das CrP-Molekül offenbar in der Lage, direkt an Lymphozyten oder Phagozyten zu binden und mit deren Hilfe die Serum-Gelenk-Schranke zu überwinden (Kushner et al. 1981, Gewurz 1982).

Es kann in der vorliegenden Studie belegt werden, dass die CrP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit mit der im Serum in engem positivem, statistisch signifikanten Zusammenhang ($r = 0,708$; $p < 0,0005$; $n = 24$) steht. So ist es umso erstaunlicher, dass die

Progredienz lediglich mit der CrP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit positiv korreliert ($r = 0,62$; $p = 0,001$; $n = 25$) (s. Diagramm 4 auf S. 39), nicht jedoch mit der im Blutserum ($r = 0,13$, $p = 0,45$, $n = 36$) (s. Diagramm 5 auf S. 39). Es bleibt fraglich, aus welchem Grund dieser Zusammenhang ausschließlich mit der synovialen CrP-Konzentration besteht. Eine statistische Bias könnte eventuell zu diesem Problem beitragen: Da die Bestimmung der CrP-Konzentration im Serum heutzutage zu den Routinemessmethoden zur Aktivitätsbestimmung bei der RA gehört, wurde bei fast jedem Patienten dieser Studie (36 von 40) diese Untersuchung durchgeführt. Andererseits lag gerade einmal bei gut der Hälfte der Patienten (25 von 40) ein punktionspflichtiger Kniegelenkserguss vor – wahrscheinlich war bei diesen Patienten der Krankheitsaktivitätsgrad demnach deutlich erhöht. So ergibt sich aus den restlichen Patienten, deren Synovialflüssigkeit nicht zur Symptomlinderung abpunktiert werden musste (15 von 40), eine Anzahl, deren CrP-Konzentration im Gelenk unbekannt ist. Es bleibt also von Interesse, zu erfahren, ob die positive Korrelation zwischen der Progredienz und der CrP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit unter der Prämisse, dass auch nicht-interventionspflichtige Kniegelenksergüsse ausschließlich zu diagnostischen Zwecken punktiert werden, weiter Bestand hat. Diese hier beschriebene angedachte Erweiterung des diagnostischen Spektrums in der RA dürfte jedoch allein an ethischen Vorgaben und Grundsätzen scheitern.

So gesehen scheint es vorerst diagnostisch sinnvoller, zur Abschätzung des Verlaufs der RA die CrP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit ausschließlich nur bei Vorliegen eines punktionspflichtigen Ergusses zu bestimmen.

Bei 26 von 40 Patienten, deren Konzentration des Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) in der Synovialflüssigkeit bestimmt wurde, ergab sich ein Mittelwert von $91,8 (\pm 100,7) \mu\text{g/ml}$. Eine Korrelation dieser Werte mit der radiologischen Progredienz konnte nicht ermittelt werden. Bereits Roux-Lombard stellte fest, dass es keinen Zusammenhang zwischen der COMP-Konzentration – allerdings im Serum gemessen – und der radiologischen Progression der Rheumatoiden Arthritis zu geben scheint. Allerdings wurde in dieser Studie zur Beurteilung der Progression der Larsen-Score (s. Tab. 1 auf S. 11) heran gezogen (Roux-Lombard et al. 2001). Er konnte ebenfalls nachweisen, dass eine akute Entzündungssituation – gemessen durch die Bestimmung der CrP-Konzentration im Serum – nicht mit einem gleichzeitigen Knorpelabbau – repräsentiert durch eine hohe COMP-Konzentration – korreliert; damit zeigt COMP also nicht die entzündliche Komponente der RA an (Roux-Lombard et al. 2001). Auch in der vorliegenden

Studie liegen keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen COMP in der Synovialflüssigkeit und CrP im Serum ($r = -0,33$; n.s.; $n = 25$) beziehungsweise CrP in der Synovialflüssigkeit ($p = -0,163$; n.s.; $n = 25$) vor.

Young-Min dagegen konnte in seiner Längsschnittstudie zeigen, dass die COMP-Konzentration im Serum zu Studienbeginn sehr wohl mit der über zwei Jahre beobachteten radiologischen Progression korreliert (Young-Min et al. 2007).

Betrachtet man nun Studien, die sich isoliert mit dem Zusammenhang von COMP mit der Aktivität der Rheumatoiden Arthritis beschäftigen, stellt man fest, dass die Serum-COMP-Konzentration signifikant mit dem Alter der Patienten und ihrem DAS-Wert (Disease Activity Score) sowie dem Vorhandensein von Rheumaknötchen korreliert, andererseits ist sie unabhängig vom Krankheitsstadium, der Anzahl der geschwollenen und druckschmerzhaften Gelenke sowie der Dauer der für RA typischen Morgensteifigkeit und der Krankheit überhaupt. Im Gegensatz zu den Akute-Phase-Proteinen, wie zum Beispiel BSG, CrP und Rheumafaktoren, ist COMP ein relativ guter Indikator für die reale, das heißt röntgenologisch sichtbare Gelenkdestruktion und damit für den Fortschritt und die Aggressivität der RA (Marti et al. 1999). Zwar lässt sich noch im frühen Krankheitsstadium eine positive Beziehung zwischen COMP und CrP – jeweils im Serum gemessen – feststellen, mit Abklingen der Symptome eines Krankheitsschubes sinkt das CrP jedoch wieder langsam auf Normalwerte; COMP dagegen bleibt als Marker für andauernden Knorpelschaden und –abbau auf hohem Niveau. So ist es auch nicht verwunderlich, dass der Serum-COMP-Spiegel mit der Größe des betroffenen Gelenks korreliert, dass also die COMP-Konzentration bei Befall des Knie- oder gar Hüftgelenkes schon sehr hoch liegt (Di Cesare et al. 1996). Des Weiteren lassen hohe COMP-Serumwerte auf eine schlechtere Prognose bei RA schließen; dies hat zur Folge, dass eine aggressivere Therapie angeschlagen werden sollte (Wollheim et al. 1997). Ein weiterer Vorteil von COMP für das Therapieregime liegt in seiner Eigenschaft, dass es bereits früh im Krankheitsverlauf der RA nachweisbar ist, das heißt bevor die Kollagenmatrix und damit der gesamte Knorpel zerstört ist, kann man medikamentös intervenieren und so die Krankheitsprogression verlangsamen. In diesem Zusammenhang ist COMP auch als Prediktor eines Therapieerfolges, zum Beispiel einer Behandlung mit TNF- α -Antikörpern (Infliximab) oder mit TNF- α -Rezeptorantagonisten (Etanercept) besonders geeignet (Crnkic et al. 2003). Die COMP-Konzentration lässt sich auch in der Synovialflüssigkeit (sfCOMP) messen, die absoluten Werte sind hier am eigentlichen Ort des Entzündungsprozesses höher als die im Serum (Neidhart et al. 1997). Allgemein erhöht ist die synoviale COMP-

Konzentration zum Beispiel nach traumatischer Knieverletzung, im frühen Stadium nach sekundärer Arthrose (Lohmander et al. 1994) und bei reaktiver Arthritis (Saxne et al. 1993). Analog zur Serum-COMP-Konzentration ist die sfCOMP-Konzentration bei Patienten mit lang andauernder, aktiver, destruktiver Rheumatoiden Arthritis im Vergleich zu gesunden Kontrollen erniedrigt (Saxne und Heinegard 1992). Die Freisetzung von COMP ist eng mit einer späteren Gelenkdestruktion im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis verknüpft (Forslind et al. 1992, Mansson et al. 1997).

Bei der Untersuchung der Konzentrationen des C-terminalen, quervernetzenden Telopeptidfragmentes des Typ-II-Kollagens (CTX-II) im Urin ergab sich ein Mittelwert von $0,752 (\pm 1,0) \mu\text{g}/\text{mmol}$ Kreatinin. Dieser Wert entspricht ungefähr dem Doppelten des in der Literatur angegebenen und für Gesunde geltenden Normalwertes. In der Korrelationsanalyse, in der die Stärke des Zusammenhangs zwischen der radiologischen Progredienz und der CTX-II-Konzentration berechnet wurde, fand sich als Ergebnis eine positive Korrelation mit CTX-II im Urin ($r = 0,36$; $p = 0,022$; $n = 40$), nicht jedoch im Serum ($r = 0,221$; n.s.; $n = 40$).

Die Korrelationsanalyse konnte eine starke positive, statistisch signifikante Beziehung zwischen den CTX-II-Werten im Urin und der radiologischen Progredienz belegen ($r = 0,694$; $p < 0,0005$; $n = 40$).

Die Ermittlung der Konzentration des C-terminalen, quervernetzenden Telopeptidfragmentes des Typ-I-Kollagens (CTX-I) ergab einen Mittelwert von $276,4 (\pm 205,0) \mu\text{g}/\text{mmol}$ Kreatinin im Urin beziehungsweise von $0,342 (\pm 0,3) \text{ng}/\text{ml}$ im Serum bei jeweils 40 Patienten. In der internationalen Literatur findet man Standardwerte von etwa $340 \mu\text{g}/\text{mmol}$ Kreatinin beziehungsweise $0,3$ bis $0,55 \text{ng}/\text{ml}$ bei gesunden Probanden.

In einer sich über vier Jahre erstreckenden Längsschnittstudie von Garnero et al. konnte gezeigt werden, dass hohe CTX-I- und CTX-II-Konzentrationen unabhängig voneinander ein erhöhtes Risiko bezüglich der beschleunigten Geschwindigkeit der radiologischen Progression – Garnero et al. berechneten sie im Rahmen der COBRA-Studie mit Hilfe des modifizierten Sharp-Scores – darstellen (Garnero et al. 2002). Bei diesen Patienten korrelierten Urin-Konzentrationen von CTX-I und CTX-II mäßig mit klinischen Parametern der momentanen Aktivität der Krankheit (BSG und DAS28). Dagegen fand sich kein Zusammenhang zwischen der CTX-I-beziehungsweise der CTX-II-Konzentration im Urin und der bisherigen Krankheitsdauer oder der momentan röntgenologisch sichtbaren Gelenkzerstörung – gemessen im Sharp Score (Garnero et

al. 2002). Auch in der vorliegenden Untersuchung korrelierten die CTX-I-Werte im Serum und Urin beziehungsweise die lediglich im Urin gemessenen CTX-II-Werte nicht mit der bisherigen Erkrankungsdauer ($p = -0,312$; n.s.; $n = 40$ beziehungsweise $p = -0,261$; n.s.; $n = 40$ beziehungsweise $p = 0,242$; n.s.; $n = 40$).

Weiterhin konnte Garnero nachweisen, dass anfangs erhöhte CTX-I- und CTX-II-Werte sowohl unter einer Kombinationstherapie von Prednisolon, Methotrexat und Sulfasalazin (im Rahmen der COBRA-Studie) als auch unter Sulfasalazin alleine wieder um zirka 40 Prozent gesenkt werden konnten. Die Höhe des Abfalls der Crosslaps®-Werte drei Monate nach Krankheitsbeginn konnte signifikant die weitere – röntgenologisch sichtbare – Krankheitsprogression beschreiben. Bemerkenswert ist, dass dieser Effekt unabhängig von der subjektiven, momentanen Krankheitsaktivität und von den klinisch messbaren Entzündungsparametern war (Garnero et al. 2002).

Erhöhte CTX-II-Werte in Untersuchungen der Synovialflüssigkeit nach einer Knieverletzung gaben erste Hinweise (Lohmander et al. 2003), dass die Aufnahme von CTX-II in Routinemessungen von RA-Patienten erfolgreich verlaufen könnte.

Patienten, deren CTX-II-Spiegel sich wieder weitestgehend normalisiert hatte, hatten eine weitaus größere Chance, keine weiteren Gelenkerstörungen mehr zu entwickeln (Landewe et al. 2004).

In einer weiteren, experimentellen Studie (Ishikawa et al. 2004) wurde durch eine Injektion von IL-1 α , Onkostatine M und Plasminogen in Ratten eine Kollagen induzierte Arthritis ausgelöst. Diese Kollagen induzierte Arthritis spiegelt im Tiermodell recht realistisch wesentliche Aspekte der Pathogenese und Immunreaktionen der RA wider (Holmdahl et al. 1989, Joe et al. 1999, Brand et al. 2003, Ishikawa et al. 2004). Auch hier korrelierte die CTX-II-Konzentration im Urin mit den histopathologisch festgestellten Gelenkdestruktionen; der Spiegel stieg bereits nach wenigen Tagen an.

In einem anderen Tierexperiment auch an Ratten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Höhe der in der Synovialflüssigkeit gemessenen CTX-II-Konzentrationen stark mit dem mikroskopisch erkennbaren Zerstörungsgrad der Gelenke sowohl bei der Kollagen induzierten Arthritis als auch bei der Arthrose in Zusammenhang steht; dagegen war diese Korrelation der im Blutserum gemessenen CTX-II-Konzentrationen nur bei der induzierten Arthritis, nicht aber bei Arthrose nachweisbar (Oestergaard et al. 2006). Des Weiteren bewies dieselbe Studie, dass bei Ratten, die antirheumatisch – im Experiment mit Dexamethason – behandelt wurden, die CTX-II-

Konzentrationen im Serum und der Synovialflüssigkeit abfielen, und dieser Abfall auch mit einer Besserung des mikroskopisch sichtbaren Zustandes des Gelenkknorpels einher ging.

Insgesamt ist in der vorliegenden Untersuchung auffällig, dass die Progredienz besser mit den CTX-I- und -II-Konzentrationen im Urin – nicht aber mit Pyridinolin, Desoxypyridinolin, deren Quotienten, sRANKL, OPG oder COMP – korreliert.

Bei hoher Sensitivität und Spezifität des CTX-II-ELISA-Tests kann von einer sichereren Detektion früh abgebauter und damit in Synovialflüssigkeit, Blutserum und schließlich Urin sezernierter Knorpelfragmente ausgegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der radiologischen Progredienz und dem Knochenabbaumarker sRANKL beziehungsweise dessen Antagonisten OPG gefunden werden.

Wie im Ergebnisteil bereits erwähnt, ist die mittlere Konzentration von sRANKL bei den hier untersuchten Patienten mit Rheumatoider Arthritis in der Synovialflüssigkeit etwa doppelt so hoch wie die im Serum. Dies widerspricht einerseits Resultaten der Arbeitsgruppe um Hein, welche in einem vergleichbaren Patientenkollektiv höhere sRANKL-Konzentrationen im Serum nachweisen konnte (Hein et al. 2008), stimmt andererseits aber wiederum mit Ergebnissen weiterer Studien zu diesem Thema überein (Ziolkowska et al. 2002, Skoumal et al. 2005).

So berechneten Hein et al. einen sRANKL(SF) / sRANKL (Serum)-Quotienten von 0,9 bei RA-Patienten (Hein et al. 2008); die Ermittlung dieses Quotienten beim hier diskutierten Patientenkollektiv liegt dagegen bei 2,15.

Die mittleren OPG-Konzentrationen liegen mit 3,61 pmol/l im Serum beziehungsweise 11,00 pmol/l in der Synovialflüssigkeit deutlich über den in der Fachliteratur angegebenen Normwerten (Ziolkowska et al. 2002, Kolarz et al. 2003). Dies ist zum Teil mit einer durch den Anstieg der sRANKL-Konzentration zu begründenden kompensatorischen Upregulation des als Antagonisten geltenden Osteoprotegerins zu erklären. Andererseits wären durchaus erniedrigte OPG-Spiegel zu erwarten: das in der vorliegenden Studie verwendete ELISA-Kit detektiert ausschließlich freies und damit nicht sRANKL-gebundenes OPG. Durch die pathologische Konzentrationszunahme von sRANKL und der damit stärkeren Abbindung von OPG sollte also gerade die Konzentration des freien OPG sinken. Hein et al. postulieren in diesem Zusammenhang – von einer niedrigen OPG-Konzentration ausgehend –, dass die Upregulation des freien OPG bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis nicht ausreicht, um die vermehrt

gebildeten sRANKL-Moleküle zu binden beziehungsweise zu neutralisieren und somit die Osteoklastenaktivierung sowie die konsekutive Destruktion des Knochenmaterials nicht verhindern kann (Hein et al. 2008).

In der vorliegenden Untersuchung konnten sowohl im Blut, als auch im Urin und in der Synovialflüssigkeit deutlich erhöhte Werte der Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (Pyd) und Desoxypyridinolin (Dpyd) ermittelt werden (s. Tab. 7 auf S. 42) – diese entsprechen den Konzentrationen, die laut internationaler Literatur mit von RA betroffenen Patienten vergleichbar sind.

Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Höhe der Konzentration der Kollagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin in den drei verschiedenen Kompartimenten Blutserum, Urin und Synovialflüssigkeit sowie der Progredienz der RA besteht den Ergebnissen der Studie zu Folge – mit Ausnahme einer positiven Korrelation zwischen der Progredienz P mit dem im Urin bestimmten Knorpel- und auch Knochenabbauprodukt Pyd bei den männlichen Patienten und damit einer relativ kleinen Fallzahl ($r = 0,79$, $p = 0,004$, $n = 11$) – nicht. Dies kann bedeuten, dass der Abbau und die aktuelle Freisetzung von Produkten des Knorpel-beziehungsweise Knochenstoffwechsels mit der voraus gegangenen Destruktionsintensität der Krankheit in keinem Zusammenhang steht. So kann vorerst von einer erhöhten Crosslink-Konzentration nicht auf radiologisch detektierbare, ossäre Destruktionen geschlossen werden. Allerdings wäre zu beachten, dass der Röntgenbefund, welcher als Grundlage für die Berechnung der Progredienz dient, der tatsächlichen klinischen Situation im Sinne eines akuten Schubes um einige Zeit hinterher hinkt. Durch den akuten Schub werden erst Mediatoren freigesetzt, die unter anderem eine mikroskopisch sichtbare Knochenzerstörung provozieren – hierbei erfolgt die Freisetzung der messbaren Parameter (zum Beispiel Desoxypyridinolin); dagegen sind die dadurch verursachten und letztlich makroskopisch sichtbaren Knochenveränderungen erst Wochen oder Monate später im Röntgenbild detektierbar.

Young-Min et al. (2007) konnten in einer Längsschnittstudie zeigen, dass die Konzentration von Pyridinolin im Urin mit dem radiologischen Fortschreiten der Rheumatoiden Arthritis prospektiv in positivem Zusammenhang steht.

In Laboruntersuchungen von RA-Patienten, bei denen man Pyd- und Dpyd-Konzentrationen im Serum und in der Synovialflüssigkeit gemessen hat, stellte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Crosslinkwerten im Serum und Laborparametern, welche die Aktivität und den

Schweregrad der Krankheit messen, heraus, außerdem waren diese Werte signifikant höher als bei gesunden Probanden (Furumitsu et al. 2000).

Ähnliche Ergebnisse erreichte man bei der statistischen Untersuchung der Crosslinkkonzentrationen in der Synovialflüssigkeit, sie zeigten eine positive Verbindung mit Synovialflüssigkeitskonzentrationen von IL-1 β und IL-6. Schließlich waren die Pyd-Konzentrationen – aber nicht die Dpyd-Konzentrationen – in der Synovialflüssigkeit signifikant höher als die der Serumkonzentrationen; jedes Wertepaar korrelierte auch hier positiv miteinander (Furumitsu et al. 2000).

Takahashi konnte in einer weiteren Studie nachweisen, dass sowohl freie als auch peptidgebundene Kollagen-Crosslinks mit einem momentan erhöhten Entzündungsgeschehen in Verbindung stehen (Takahashi et al. 1999).

Kaufmann et al. zeigten, dass eine akute Synovitis, zum Beispiel im akuten Schub der RA, zu einer Verdopplung der Urinausscheidung an Pyridinolin führt (Kaufmann et al. 2003).

Der in unserer Studie ermittelte Quotient aus Pyd/Dpyd wies keine statistisch signifikante Korrelation zur röntgenologischen Progredienz der RA auf – weder im Serum noch im Urin oder der Synovialflüssigkeit. Müller et al. stellten die Hypothese auf, dass die Höhe des Pyd/Dpyd-Quotienten proportional zur Masse des degradierten Kollagens ist – also somit einen quantitativen Abbaumarker darstellt (Muller et al. 1996).

Eine erhöhte Pyd-Konzentration in den Körperflüssigkeiten ist also in erste Linie auf eine Zerstörung der betroffenen Gelenke zurück zu führen. Eine gesteigerte Dpyd-Konzentration hängt sowohl mit einer Schädigung der angegriffenen Knochensubstanz in der Nähe der von RA befallenen Gelenken als auch eventuell mit einem systemisch erhöhten Knochenumsatz zusammen.

Jedoch scheint der Zusammenhang zwischen der Progredienz und den einzelnen Kollagen-Crosslinks für sich betrachtet zu gering zu sein, um aus der Crosslink-Bestimmung eine Aussage über den momentanen Fortschritt der Krankheit ziehen zu können.

In der in dieser Studie durchgeführten multiplen, linearen Regressionsanalyse korrelierten die Konzentrationen der Marker CTX-I (im Blutserum) und CTX-II (im Urin) zusammen genommen stark positiv mit der radiologischen Progression (siehe Tab. 10 auf Seite 46; $R^2 = 0,585$, $n = 40$). Der Einschluss der Pyd-Konzentration in der Synovialflüssigkeit in dieses Modell kann den R^2 -Wert sogar noch leicht anheben (s. Tab. 11 auf Seite 46; $R^2 = 0,651$; $n = 39$). Dies lässt den

Schluss zu, dass hohe Werte für diese Marker eine aggressiv verlaufene Destruktionsintensität anzeigen. Der R^2 -Wert, der in diesen Modellen angegeben wird, sagt übrigens aus, dass eine multiple lineare Regressionsanalyse, welche die Konzentrationen von CTX-I im Serum, CTX-II im Urin und gegebenenfalls Pyridinolin in der Synovialflüssigkeit beinhaltet, die Variabilität der radiologischen Progression zu 58,5 Prozent beziehungsweise zu 65,1 Prozent erklären kann.

Eine sehr ähnliche Studie wurde bereits 2007 von der Forschungsgruppe um Young-Min durchgeführt. Sie beinhaltete die longitudinale Beobachtung von 132 Patienten mit Rheumatoider Arthritis über den Zeitraum von zwei Jahren. Folgende klinische Parameter wurden zur Abschätzung des Therapieerfolgs regelmäßig untersucht: DAS-28, RAI (siehe auch (Ritchie et al. 1968), Einschätzung der Krankheitsaktivität durch den behandelnden Arzt und den Patienten an Hand der VAS. Die Patienten erhielten ebenfalls – wie in dieser Untersuchung – eine Basistherapie der Rheumatoiden Arthritis mit DMARDs, also Behandlungsschemata, welche eine Mono- oder Kombinationstherapie mit Methotrexat, Sulfasalazin und/oder Glukokortikoiden vorsehen. Als Laborparameter wurden der Rheumafaktor, die genetische DNA-Untersuchung auf das so genannte „shared epitope“ sowie den HLA-DR1- und –DR4-Status, die BSG, die Matrixmetalloproteinasen (MMP) 1, 3 und 13, der Gewebsinhibitor der MMP (TIMP-1) und COMP jeweils im Serum analysiert. Außerdem wurden die Konzentrationen von Pyridinolin, Desoxypyridinolin, glykosyliertem Pyridinolin sowie von CTX-II jeweils im Urin gemessen. Des Weiteren wurde zur Quantifizierung der radiologisch detektierbaren Destruktionen der Larsen-Score bestimmt. Zur radiologischen Progredienz wurde von Young-Min et al. jedoch lediglich die Aussage getroffen, ob sich der Larsen-Score während der Beobachtungszeit von zwei Jahren verschlechterte oder nicht. An Hand dessen wurden die Patienten in zwei Kohorten eingeteilt und untereinander bezüglich der Veränderungen oben genannter Variablen (zum Beispiel klinische Assessments oder Laborparameter) verglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die biochemischen Marker MMP-3, CTX-II und COMP jeweils zu Beginn der Längsschnittuntersuchung mit dem radiologischen Schweregrad als auch zum Ende mit der radiologischen Progression positiv korrelieren. Tabelle 12 auf Seite 59 gibt die Zahlenwerte dieser Korrelationen wieder.

Tab. 12: Korrelationskoeffizienten für biochemische Marker bezogen auf die radiologische Progredienz (nach Young-Min et al. 2007)

Marker	Korrelation der Marker mit der Progredienz zu Beginn der Untersuchung		Korrelation der Marker mit der Progredienz nach Ablauf von zwei Jahren	
	R	p	R	p
MMP-3 (Serum)	0,4007	< 0,0001	0,4080	< 0,0001
CTX-II (Urin)	0,2852	0,0033	0,4063	< 0,0001
COMP (Serum)	0,2658	0,0038	0,3796	< 0,0001
CrP (Serum)	0,2248	0,014	0,4224	< 0,0001
Pyd (Urin)	0,2005	0,0393	0,3210	0,0004

Eine sich anschließende, multivariate Analyse der Daten ergab, dass die Kombination aus einer pathologisch erhöhten MMP-3-Konzentration im Serum und einer pathologisch erhöhten CTX-II-Konzentration im Urin diejenigen biochemischen Marker darstellen, welche als einzige unabhängig voneinander die radiologische Progression der Rheumatoiden Arthritis vorhersagen können. Hier sind somit diese „modernen“ Laborparameter den „traditionellen“ (wie zum Beispiel CrP) weit überlegen (Young-Min et al. 2007).

So gibt es sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten in den Resultaten Young-Mins und der hier diskutierten Arbeit:

In beiden Fällen gehört der Knorpelabbauparameter CTX-II (jeweils im Urin bestimmt) zu den Größen des multivariaten Modells. Dies lässt offenbar den Schluss zu, dass der Abbau von Typ-II-Kollagen eine wichtige Komponente in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis ist und einen Marker der progredienten Gelenkdestruktion darstellt. So zeigt einerseits eine hohe CTX-II-Konzentration eine bisher stark aufgetretene, radiologisch sichtbare Destruktion des Skelettsapparates an, andererseits kann man ebenfalls auf eine weitere Zerstörung der Knorpel- und Knochenintegrität und eine fortwährende Aggravation schließen. In diesem Punkt ist eine Konklusion auf eine Umstellung des Therapieschemas durchaus denkbar: Auf Grund hoher CTX-II-Konzentrationen erscheint bei gesicherter Rheumatoider Arthritis eine Therapieeskalation (zum Beispiel unter Zuhilfenahme von Biologicals) notwendig.

Young-Min untersuchte keine CTX-I-Konzentrationen; in der hier vorliegenden Studie wurden die Konzentrationen der Matrixmetalloproteinase nicht berücksichtigt – es wäre sicherlich

interessant zu erforschen, wie multivariate Datenanalysen aussähen, die diese Parameter unter anderen in ihre Berechnungen involvierten.

In unserer Studie konnte kein Bezug zwischen der COMP-Konzentration in der Synovialflüssigkeit und der radiologischen Progredienz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu belegte Young-Min einen Zusammenhang zwischen der COMP-Konzentration – allerdings im Blutserum – und der radiologischen Progression. Ein Grund dafür ist möglicherweise ein Phänomen, das Skoumal 2003 beschrieb: Wie bereits einleitend erwähnt, sind hohe COMP-Spiegel typisch für den Beginn einer chondrodestruktiven Erkrankung – hieraus resultiert wahrscheinlich die positive Korrelation zwischen COMP-Spiegel und Progredienz in der Studie Young-Mins. Im Verlauf der den Knorpel abbauenden Rheumatoiden Arthritis steht immer weniger Knorpelmasse zum Abbau zur Verfügung (Skoumal et al. 2003), so dass dies eventuell eine Erklärung für unsere Ergebnisse ist. In weiteren prospektiven Studien sollte der Frage nachgegangen werden, ob erhöhte COMP-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit ebenfalls Prädiktoren für eine erhöhte radiologische Progression darstellen bzw. ob erhöhte COMP-Spiegel im Serum schwere radiologisch sichtbare Destruktionen zu beschreiben in der Lage sind.

Schließlich ist bemerkenswert, dass weder in der Gleichung der multivariaten Datenanalyse Young-Mins (Young-Min et al. 2007) noch in der hier vorliegenden multiplen linearen Regressionsanalyse ein Entzündungsparameter wie BSG oder das CrP – weder im Serum noch in der Synovialflüssigkeit – als signifikanter Marker für die progrediente Gelenkzerstörung aufzufinden ist. So kann der durch die Rheumatoide Arthritis bedingte Zerstörungsprozess des Knochen- und Knorpelmaterials durch eine Gleichung, welche die Marker MMP-3 im Serum und CTX-II im Urin beziehungsweise CTX-I im Serum, CTX-II im Urin und Pyridinolin in der Synovialflüssigkeit beinhaltet besser als durch eine Funktion, welche die CrP-Konzentration einbezieht, beschrieben werden. Diese Aussage lässt wiederum den Schluss zu, dass die Gelenkzerstörung einerseits und der Inflammationsprozess andererseits zwei Prozesse darstellen, die nicht zwangsläufig zusammen gehören und möglicherweise zwei völlig voneinander unabhängige Merkmale der Rheumatoiden Arthritis illustrieren – eine Hypothese, die bereits von van den Berg formuliert wurde (van den Berg und van Riel 2005).

9 Schlussfolgerung

Schlussfolgernd lässt sich Folgendes feststellen:

1. Betrachtet man die Progredienz als Variable, die – wie in der vorliegenden Studie – die Aggressivität der Rheumatoiden Arthritis retrospektiv beschreibt, ist subsumierbar, dass die Krankheit umso destruktiver verläuft je jünger der einzelne Patient bei Erstdiagnose ist.

Weiterhin diagnostisch sinnvoll – nicht nur zur Abschätzung der Progredienz, sondern auch zur Identifikation eines erneuten Krankheitsschubes – ist die CrP-Konzentrationsbestimmung im Blutserum. Aussagen über die diagnostische Wertigkeit von synovialen CrP-Konzentrationen bezüglich der Progredienz sind aus dem vorliegenden Datenmaterial nicht möglich. Eine synoviale CrP-Messung bei sämtlichen Patienten mit Rheumatoider Arthritis wäre durchaus interessant, jedoch auf Grund ethischer Prinzipien nicht umsetzbar.

2. Eine möglichst exakte Deskription der zurück liegenden gelenknahen Knochendestruktion durch einen singulären Abbaumarker ist näherungsweise am besten durch die Bestimmung der CTX-I-Konzentration im Urin möglich.

Analog dazu kann die stattgehabte Knorpelzerstörung am ehesten durch die Höhe der CTX-II-Konzentration im Urin beschrieben werden.

Ökonomisch sinnvoller scheint die Messung des CTX-II-Spiegels im Urin: Einerseits ist die Stärke der Korrelation von Progredienz und CTX-II-Konzentration im Urin ($r = 0,69$) gemessen am Pearson-Korrelationskoeffizienten deutlich höher als mit der CTX-I-Konzentration im Urin ($r = 0,36$), andererseits dürfte die Knorpelsubstanz auf Grund der anatomischen Gegebenheiten eher von destruktiven Prozessen betroffen sein als der darunter liegende Knochen.

3. Die beste Beschreibung einer radiologisch sichtbaren Skelettzerstörung durch die Rheumatoide Arthritis und damit der Progredienz liefert einer multiplen, linearen Regressionsanalyse zu Folge die Kombination der CTX-I-Konzentration im Serum, der CTX-II-Konzentration im Urin und der Pyridinolinkonzentration in der Synovialflüssigkeit ($R^2 = 0,651$). Aussagen über die lokale Entzündungssituation im betroffenen Gelenk – gemessen durch die synoviale CrP-Konzentration – lassen sich aus diesen Parametern jedoch nicht statistisch signifikant treffen. Diese Tatsache könnte ein

Indiz für die getrennt voneinander stattfindenden Prozesse der Inflammationsreaktion einerseits beziehungsweise der Knochen- und Knorpeldestruktion andererseits darstellen.

4. Auf Grund verschiedener systematischer, oben diskutierter Mängel im Studiendesign und der Bestimmung von Laborwerten wird die Planung einer prospektiven Studie auf Basis der hier durchgeführten empfohlen.

Außerdem könnten in einer solchen Studie neben konventionellen Röntgenaufnahmen modernere diagnostische Verfahren wie die Magnetresonanztomografie oder Power-Doppler-Sonografie betroffener Gelenke zur Anwendung kommen. Die Durchführung einer prospektiven Längsschnittstudie würde neben der Erfassung der individuellen Progredienz auch eine Differenzierung in Früh- und Spätstadien der Rheumatoiden Arthritis ermöglichen.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Amos RS, Constable TJ, Crockson RA, Crockson AP, McConkey B. 1977. Rheumatoid arthritis: relation of serum C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rates to radiographic changes. *Br Med J*, 1 (6055):195-197.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31 (3):315-324.
- Barber M, Bordoli RS, Elliott GJ, Fujimoto D, Scott JE. 1982. The structure(s) of pyridinoline(s). *Biochem Biophys Res Commun*, 109 (3):1041-1046.
- Bernhard J, Villiger PM. 2001. Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie. *Schweiz Med Forum*, 8:179-183.
- Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschesche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR. 1997. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest*, 99 (7):1534-1545.
- Black D, Farquharson C, Robins SP. 1989. Excretion of pyridinium cross-links of collagen in ovariectomized rats as urinary markers for increased bone resorption. *Calcif Tissue Int*, 44 (5):343-347.
- Bonde M, Qvist P, Fledelius C, Riis BJ, Christiansen C. 1994. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated. *Clin Chem*, 40 (11 Pt 1):2022-2025.
- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. 2003. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol*, 25 (1):3-18.
- Breedveld FC, Weisman MH, Kavanaugh AF, Cohen SB, Pavelka K, van Vollenhoven R, Sharp J, Perez JL, Spencer-Green GT. 2006. The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum*, 54 (1):26-37.
- Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, Kelley M, Hsu H, Boyle WJ, Dunstan CR, Hu S, Lacey DL. 1999. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*, 145 (3):527-538.

- Burmester GR, Jahn B, Rohwer P, Zacher J, Winchester RJ, Kalden JR. 1987. Differential expression of Ia antigens by rheumatoid synovial lining cells. *J Clin Invest*, 80 (3):595-604.
- Cairns JS, Curtsinger JM, Dahl CA, Freeman S, Alter BJ, Bach FH. 1985. Sequence polymorphism of HLA DR beta 1 alleles relating to T-cell-recognized determinants. *Nature*, 317 (6033):166-168.
- Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S, Yamamoto K. 2005. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 44 (1):40-50.
- Christgau S, Garnero P, Fledelius C, Moniz C, Ensig M, Gineyts E, Rosenquist C, Qvist P. 2001. Collagen type II C-telopeptide fragments as an index of cartilage degradation. *Bone*, 29 (3):209-215.
- Crnkic M, Mansson B, Larsson L, Geborek P, Heinegard D, Saxne T. 2003. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) decreases in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab or etanercept. *Arthritis Res Ther*, 5 (4):R181-185.
- Cunnane G, Fitzgerald O, Beeton C, Cawston TE, Bresnihan B. 2001. Early joint erosions and serum levels of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 3, and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44 (10):2263-2274.
- De Rycke L, Nicholas AP, Cantaert T, Kruithof E, Echols JD, Vandekerckhove B, Veys EM, De Keyser F, Baeten D. 2005. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum*, 52 (8):2323-2330.
- Dejaco C, Klotz W, Larcher H, Duftner C, Schirmer M, Herold M. 2006. Diagnostic value of antibodies against a modified citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 8 (4):R119.
- Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M. 1996. Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res*, 14 (6):946-955.
- Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Chen FS, Leslie M, Perris R. 1997. Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium. *FEBS Lett*, 412 (1):249-252.

- DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M. 1994a. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett*, 354 (2):237-240.
- DiCesare PE, Morgelin M, Mann K, Paulsson M. 1994b. Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur J Biochem*, 223 (3):927-937.
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. 2003. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med*, 47 (3):149-161.
- Dixon JS, Bird HA, Sitton NG, Pickup ME, Wright V. 1984. C-reactive protein in the serial assessment of disease activity in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 13 (1):39-44.
- Edwards JC, Cambridge G. 1998. Rheumatoid arthritis: the predictable effect of small immune complexes in which antibody is also antigen. *Br J Rheumatol*, 37 (2):126-130.
- Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM, Shaw T. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 350 (25):2572-2581.
- Emery P, Salmon M. 1995. Early rheumatoid arthritis: time to aim for remission? *Ann Rheum Dis*, 54 (12):944-947.
- Eriksson R, Persson HW, Dymling SO, Lindstrom K. 1991. Evaluation of Doppler ultrasound for blood perfusion measurements. *Ultrasound Med Biol*, 17 (5):445-452.
- Eyre DR. 1995. The specificity of collagen cross-links as markers of bone and connective tissue degradation. *Acta Orthop Scand Suppl*, 266:166-170.
- Feist E, Egerer K, Burmester GR. 2007. [Autoantibody profile in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol*, 66 (3):212-214, 216-218.
- Firestein GS. 2001. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Forsblad d'Elia H, Christgau S, Mattsson LA, Saxne T, Ohlsson C, Nordborg E, Carlsten H. 2004. Hormone replacement therapy, calcium and vitamin D3 versus calcium and vitamin D3 alone decreases markers of cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial [ISRCTN46523456]. *Arthritis Res Ther*, 6 (5):R457-468.
- Forslind K, Eberhardt K, Jonsson A, Saxne T. 1992. Increased serum concentrations of cartilage oligomeric matrix protein. A prognostic marker in early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 31 (9):593-598.

- Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. 1998. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*, 188 (5):997-1001.
- Furumitsu Y, Inaba M, Yukioka K, Yukioka M, Kumeda Y, Azuma Y, Ohta T, Ochi T, Nishizawa Y, Morii H. 2000. Levels of serum and synovial fluid pyridinium crosslinks in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 27 (1):64-70.
- Garnero P, Landewe R, Boers M, Verhoeven A, Van Der Linden S, Christgau S, Van Der Heijde D, Boonen A, Geusens P. 2002. Association of baseline levels of markers of bone and cartilage degradation with long-term progression of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis: the COBRA study. *Arthritis Rheum*, 46 (11):2847-2856.
- Gause A, Berek C. 2001. Role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *BioDrugs*, 15 (2):73-79.
- Geiler T, Lorenz HM, Kalden JR, Manger B. 1997. [Pathogenesis of rheumatoid arthritis]. *Med Klin (Munich)*, 92 (6):347-353.
- Gewurz H. 1982. Biology of C-reactive protein and the acute phase response. *Hosp Pract (Hosp Ed)*, 17 (6):67-81.
- Glossop JR, Nixon NB, Dawes PT, Hassell AB, Matthey DL. 2003. No association of polymorphisms in the tumor necrosis factor receptor I and receptor II genes with disease severity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 30 (7):1406-1409.
- Gonzalez-Escribano MF, Torres B, Aguilar F, Rodriguez R, Garcia A, Valenzuela A, Nunez-Roldan A. 2003. MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*, 64 (7):741-744.
- Gräfenstein K. 1997. *Klinische Rheumatologie: Diagnostik, Klinik, Behandlung*. 1te Aufl. Landsberg: Ecomed Fachverlag.
- Guerrero R, Diaz Martin MA, Diaz Diego EM, Disla T, Rapado A, de la Piedra C. 1996. New biochemical markers of bone resorption derived from collagen breakdown in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int*, 6 (4):297-302.
- Hakala M, Aman S, Luukkainen R, Risteli L, Kauppi M, Nieminen P, Risteli J. 1995. Application of markers of collagen metabolism in serum and synovial fluid for assessment of disease process in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 54 (11):886-890.

- Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. 2004. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes. *J Immunol Methods*, 285 (2):281-291.
- Harris ED, Jr. 1990. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, 322 (18):1277-1289.
- Hein G, Oelzner P, Sprott H, Manger B. 1999. [Rheumatology update. Current knowledge of etiology, pathophysiology, diagnosis, and therapy of selected arthritic disorders. Part I: pathogenesis and differential diagnosis]. *Med Klin (Munich)*, 94 (9):485-495.
- Hein G, Bolwin R, Brauer R, Eidner T, Franke S, Oelzner P, Sprott H. 1995. [Rheumatology update--1. Summary of clinically significant current knowledge and outlook perspective of relevant trends in etiopathogenetic research, diagnostic methods and therapeutic possibilities]. *Med Klin (Munich)*, 90 (4):231-239.
- Hein GE, Meister M, Oelzner P, Franke S. 2008. sRANKL and OPG in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in comparison to non-destructive chronic arthritis. *Rheumatol Int*, 28 (8):765-769.
- Hensch A, Hrsg. 2007. Stellenwert von B-mode-, Power Doppler- und Echoverstärker-Sonografie bei RA-Patienten unter anti-TNF-alpha-Therapie. 35 Kongress der DGRh und 21 Jahrestagung der ARO. Hamburg:
- Hofbauer LC, Heufelder AE. 2001. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*, 79 (5-6):243-253.
- Holmdahl R, Mo J, Nordling C, Larsson P, Jansson L, Goldschmidt T, Andersson M, Klareskog L. 1989. Collagen induced arthritis: an experimental model for rheumatoid arthritis with involvement of both DTH and immune complex mediated mechanisms. *Clin Exp Rheumatol*, 7 Suppl 3:S51-55.
- Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. 1996. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*, 2 (10):1132-1136.
- Hurlimann J, Thorbecke GJ, Hochwald GM. 1966. The liver as the site of C-reactive protein formation. *J Exp Med*, 123 (2):365-378.
- Ishikawa T, Nishigaki F, Christgau S, Noto T, Mo J, From N, Minoura K, Hirayama Y, Ohkubo Y, Mutoh S. 2004. Cartilage destruction in collagen induced arthritis assessed with a new biochemical marker for collagen type II C-telopeptide fragments. *J Rheumatol*, 31 (6):1174-1179.

- James IT, Walne AJ, Perrett D. 1996. The measurement of pyridinium crosslinks: a methodological overview. *Ann Clin Biochem*, 33 (Pt 5):397-420.
- Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL. 1999. Animal models of rheumatoid arthritis and related inflammation. *Curr Rheumatol Rep*, 1 (2):139-148.
- Jung M, Christgau S, Lukoschek M, Henriksen D, Richter W. 2004. Increased urinary concentration of collagen type II C-telopeptide fragments in patients with osteoarthritis. *Pathobiology*, 71 (2):70-76.
- Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. 1997. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med*, 186 (4):489-495.
- Kaufmann J, Mueller A, Voigt A, Carl HD, Gursche A, Zacher J, Stein G, Hein G. 2003. Hydroxypyridinium collagen crosslinks in serum, urine, synovial fluid and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis compared with osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42 (2):314-320.
- Keskin G, Inal A, Keskin D, Pekel A, Baysal O, Dizer U, Sengul A. 2008. Diagnostic Utility of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Anti-Modified Citrullinated Vimentin Antibodies in Rheumatoid Arthritis. *Protein Pept Lett*, 15 (3):314-317.
- Keystone EC, Kavanaugh AF, Sharp JT, Tannenbaum H, Hua Y, Teoh LS, Fischkoff SA, Chartash EK. 2004. Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum*, 50 (5):1400-1411.
- Kirwan JR. 1997. The relationship between synovitis and erosions in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 36 (2):225-228.
- Klareskog L, Ronnelid J, Holm G. 1995. Immunopathogenesis and immunotherapy in rheumatoid arthritis: an area in transition. *J Intern Med*, 238 (3):191-206.
- Koch AE. 2000. The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments. *Ann Rheum Dis*, 59 Suppl 1:i65-71.
- Kojima T, Mwale F, Yasuda T, Girard C, Poole AR, Lavery S. 2001. Early degradation of type IX and type II collagen with the onset of experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 44 (1):120-127.

- Kolarz G, Schödl C, Skoumal M, Woloszczuk W, Wottawa A. 2003. Osteoprotegerin serum levels in rheumatoid arthritis. *J für Mineralstoffwechsel*, 10 (3):10-12.
- Kollerup G. 1996. Urinary excretion of collagen cross-links : Pyridinoline and Deoxypyridinoline, biochemical markers of bone resorption. *Dan Med Bull*, 43(2)
- Kollmann C, Turetschek K, Mostbeck G. 1998. Amplitude-coded colour Doppler sonography: physical principles and technique. *Eur Radiol*, 8 (4):649-656.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. 1999a. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397 (6717):315-323.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. 1999b. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402 (6759):304-309.
- Kushner I, Gewurz H, Benson MD. 1981. C-reactive protein and the acute-phase response. *J Lab Clin Med*, 97 (6):739-749.
- Kyburz D, Corr M, Brinson DC, Von Damm A, Tighe H, Carson DA. 1999. Human rheumatoid factor production is dependent on CD40 signaling and autoantigen. *J Immunol*, 163 (6):3116-3122.
- Kyburz D, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Gay RE, Carson DA, Gay S. 2003. Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum*, 48 (3):642-650.
- Landewe R, Geusens P, Boers M, van der Heijde D, Lems W, te Koppele J, van der Linden S, Garnero P. 2004. Markers for type II collagen breakdown predict the effect of disease-modifying treatment on long-term radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50 (5):1390-1399.
- Landewe RB, Geusens P, van der Heijde DM, Boers M, van der Linden SJ, Garnero P. 2006. Arthritis instantaneously causes collagen type I and type II degradation in patients with early rheumatoid arthritis: a longitudinal analysis. *Ann Rheum Dis*, 65 (1):40-44.
- Larsen A, Thoen J. 1987. Hand radiography of 200 patients with rheumatoid arthritis repeated after an interval of one year. *Scand J Rheumatol*, 16 (6):395-401.

- Larsen A, Dale K, Eek M. 1977. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*, 18 (4):481-491.
- Lautenschläger J, Jendro MC, Mau W, Zeidler H. 1997. Die Bedeutung des HLA-DRB1-Gens bei der chronischen Polyarthrit. *Akt Rheumatol*, 22:1-6.
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, 416 (6881):603-607.
- Lee DM, Schur PH. 2003. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 62 (9):870-874.
- Liu ZQ, Deng GM, Foster S, Tarkowski A. 2001. Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis. *Arthritis Res*, 3 (6):375-380.
- Lohmander LS, Saxne T, Heinegard DK. 1994. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 53 (1):8-13.
- Lohmander LS, Atley LM, Pietka TA, Eyre DR. 2003. The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 48 (11):3130-3139.
- Mallya RK, Vergani D, Tee DE, Bevis L, de Beer FC, Berry H, Hamilton ED, Mace BE, Pepys MB. 1982. Correlation in rheumatoid arthritis of concentrations of plasma C3d, serum rheumatoid factor, immune complexes and C-reactive protein with each other and with clinical features of disease activity. *Clin Exp Immunol*, 48 (3):747-753.
- Mansson B, Geborek P, Saxne T. 1997. Cartilage and bone macromolecules in knee joint synovial fluid in rheumatoid arthritis: relation to development of knee or hip joint destruction. *Ann Rheum Dis*, 56 (2):91-96.
- Marti C, Neidhart M, Gerber T, Hauser N, Michel BA, Hauselmann HJ. 1999. [Cartilage oligomeric matrix protein (COMP): the role of a non-collagen cartilage matrix protein as a marker of disease activity and joint destruction in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis]. *Z Rheumatol*, 58 (2):79-87.
- Masi AT, Medsger TA. 1989. *Epidemiology of rheumatic diseases*. 11te Aufl. Philadelphia: Lea & Feabiger.
- McConkey B, Davies P, Crockson RA, Crockson AP, Butler M, Constable TJ, Amos RS. 1979. Effects of gold, dapsone, and prednisone on serum C-reactive protein and haptoglobin and

- the erythrocyte sedimentation rate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 38 (2):141-144.
- McLaren AM, Hordon LD, Bird HA, Robins SP. 1992. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture. *Ann Rheum Dis*, 51 (5):648-651.
- Miehle W. 1994. *Chronische Polyarthritits - Diagnose und Therapie*. 1te Aufl. Basel: EULAR-Verlag.
- Mouritzen U, Christgau S, Lehmann HJ, Tanko LB, Christiansen C. 2003. Cartilage turnover assessed with a newly developed assay measuring collagen type II degradation products: influence of age, sex, menopause, hormone replacement therapy, and body mass index. *Ann Rheum Dis*, 62 (4):332-336.
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. 1996. Clinical improvement and radiological deterioration in rheumatoid arthritis: evidence that the pathogenesis of synovial inflammation and articular erosion may differ. *Br J Rheumatol*, 35 (12):1263-1268.
- Muller A, Hein G, Franke S, Herrmann D, Henzgen S, Roth A, Stein G. 1996. Quantitative analysis of pyridinium crosslinks of collagen in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using high-performance liquid chromatography. *Rheumatol Int*, 16 (1):23-28.
- Nakamura H, Mori, T., Genma, R., Suzuki, Y., Natsume, H., Andoh, S., Kitahara, R., Nagasawa, S., Nishiyama, K., and Yoshimi, T. 1996. Urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline measured by immunoassay in hypothyroidism. *ClinEndocrinolOxf*, 44(4):447-451.
- Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. 2005. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun*, 327 (1):192-200.
- Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. 1997. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol*, 36 (11):1151-1160.
- Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, Aarden L, Dijkmans BA, Hamann D. 2005. Antibodies to citrullinated human

- fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64 (8):1199-1204.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. 2004a. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*, 50 (2):380-386.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Gast T, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. 2004b. Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50 (8):2423-2427.
- Nienhuis RL, Mandema E. 1964. A New Serum Factor in Patients with Rheumatoid Arthritis; the Antiperinuclear Factor. *Ann Rheum Dis*, 23:302-305.
- Nogueira L, Chapuy-Regaud S, Constantin A, Clavel C, Sebbag M, Cantagrel A. 2003. Antibodies to deaminated fibrinogen are the most efficient serological criterion for early rheumatoid arthritis diagnosis. *Arthritis Res Ther*, 5(suppl 1):S6.
- Oestergaard S, Chouinard L, Doyle N, Karsdal MA, Smith SY, Qvist P, Tanko LB. 2006. The utility of measuring C-terminal telopeptides of collagen type II (CTX-II) in serum and synovial fluid samples for estimation of articular cartilage status in experimental models of destructive joint diseases. *Osteoarthritis Cartilage*, 14 (7):670-679.
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. 1992. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem*, 267 (31):22346-22350.
- Ostendorf B, Peters R, Dann P, Becker A, Scherer A, Wedekind F, Friemann J, Schulitz KP, Modder U, Schneider M. 2001. Magnetic resonance imaging and miniarthroscopy of metacarpophalangeal joints: sensitive detection of morphologic changes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44 (11):2492-2502.
- Prockop DJ, Kivirikko KI. 1995. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem*, 64:403-434.
- Rauch F, Rauch R, Woitge HW, Seibel MJ, Schonau E. 1996. Urinary immunoreactive deoxypyridinoline in children and adolescents: variations with age, sex and growth velocity. *Scand J Clin Lab Invest*, 56 (8):715-719.

- Recklies AD, Baillargeon L, White C. 1998. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 41 (6):997-1006.
- Ritchie DM, Boyle JA, McInnes JM, Jasani MK, Dalakos TG, Grieveson P, Buchanan WW. 1968. Clinical studies with an articular index for the assessment of joint tenderness in patients with rheumatoid arthritis. *Q J Med*, 37 (147):393-406.
- Robins SP, Black D, Paterson CR, Reid DM, Duncan A, Seibel MJ. 1991. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *Eur J Clin Invest*, 21 (3):310-315.
- Ronneld J, Lysholm J, Engstrom-Laurent A, Klareskog L, Heyman B. 1994. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid arthritis synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis Rheum*, 37 (7):1023-1029.
- Ronneld J, Wick MC, Lampa J, Lindblad S, Nordmark B, Klareskog L, van Vollenhoven RF. 2005. Longitudinal analysis of citrullinated protein/peptide antibodies (anti-CP) during 5 year follow up in early rheumatoid arthritis: anti-CP status predicts worse disease activity and greater radiological progression. *Ann Rheum Dis*, 64 (12):1744-1749.
- Rosenberg K, Olsson H, Morgelin M, Heinegard D. 1998. Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem*, 273 (32):20397-20403.
- Roux-Lombard P, Eberhardt K, Saxne T, Dayer JM, Wollheim FA. 2001. Cytokines, metalloproteinases, their inhibitors and cartilage oligomeric matrix protein: relationship to radiological progression and inflammation in early rheumatoid arthritis. A prospective 5-year study. *Rheumatology (Oxford)*, 40 (5):544-551.
- Rowe IF, Sheldon J, Riches PG, Keat AC. 1987. Comparative studies of serum and synovial fluid C reactive protein concentrations. *Ann Rheum Dis*, 46 (10):721-726.
- Saxne T, Heinegard D. 1992. Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol*, 31 (9):583-591.
- Saxne T, Glennas A, Kvien TK, Melby K, Heinegard D. 1993. Release of cartilage macromolecules into the synovial fluid in patients with acute and prolonged phases of reactive arthritis. *Arthritis Rheum*, 36 (1):20-25.

- Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*, 101 (1):273-281.
- Sebbag M, Parry SL, Brennan FM, Feldmann M. 1997. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 27 (3):624-632.
- Seibel MJ. 2000. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int*, 11 Suppl 6:S18-29.
- Seibel MJ, Duncan A, Robins SP. 1989. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol*, 16 (7):964-970.
- Seibel MJ, Gartenberg F, Silverberg SJ, Ratcliffe A, Robins SP, Bilezikian JP. 1992. Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 74 (3):481-486.
- Seibel MJ, Cosman F, Shen V, Gordon S, Dempster DW, Ratcliffe A, Lindsay R. 1993. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 8 (7):881-889.
- Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, Michel BA, Seger RA, Gay S, Lauener RP. 2003. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol*, 162 (4):1221-1227.
- Seyedin SM, Kung VT, Daniloff YN, Hesley RP, Gomez B, Nielsen LA, Rosen HN, Zuk RF. 1993. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 8 (5):635-641.
- Skoumal M, Kolarz G, Klingler A. 2003. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 32 (3):156-161.
- Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G, Woloszczuk W, Hawa G, Klingler A. 2005. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int*, 26 (1):63-69.
- Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. 1949. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc*, 140 (8):659-662.

- Steiner G. 2004. Autoantikörper in der Diagnostik der Rheumatoiden Arthritis. *Rheuma Plus*, 2
- Struyk L, Hawes GE, Chatila MK, Breedveld FC, Kurnick JT, van den Elsen PJ. 1995. T cell receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 38 (5):577-589.
- Sukenik S, Henkin J, Zimlichman S, Skibin A, Neuman L, Pras M, Horowitz J, Shainkin-Kestenbaum R. 1988. Serum and synovial fluid levels of serum amyloid A protein and C-reactive protein in inflammatory and noninflammatory arthritis. *J Rheumatol*, 15 (6):942-945.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 34 (4):395-402.
- Szekanecz Z, Soos L, Szabo Z, Fekete A, Kapitany A, Vegvari A, Sipka S, Szucs G, Szanto S, Lakos G. 2008. Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Rheumatoid Arthritis: As Good as it Gets? *Clin Rev Allergy Immunol*, 34 (1):26-31.
- Takahashi M, Suzuki M, Naitou K, Miyamoto S, Kushida K. 1999. Comparison of free and peptide-bound pyridinoline cross-links excretion in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (2):133-138.
- Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Suzuki M, Sano M, Miyamoto S, Inoue T. 1996. Concentrations of pyridinoline and deoxypyridinoline in joint tissues from patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 55 (5):324-327.
- Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S. 1994. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med*, 180 (3):1159-1164.
- Ursum J, Nielen MM, van Schaardenburg D, van der Horst AR, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, Hamann D. 2008. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study. *Arthritis Res Ther*, 10 (1):R12.
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S. 1999. Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 7 (6):560-566.

- Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M, Forger F, Siebert U, Helmke K. 2004. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 63 (9):1079-1084.
- van Daele PL, Birkenhager JC, Pols HA. 1994. Biochemical markers of bone turnover: an update. *Neth J Med*, 44 (2):65-72.
- van den Berg WB, van Riel PL. 2005. Uncoupling of inflammation and destruction in rheumatoid arthritis: myth or reality? *Arthritis Rheum*, 52 (4):995-999.
- van der Heijden IM, Wilbrink B, Tchetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, Breedveld FC, Tak PP. 2000. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum*, 43 (3):593-598.
- VanderBorghet A, Geusens P, Vandevyver C, Raus J, Stinissen P. 2000. Skewed T-cell receptor variable gene usage in the synovium of early and chronic rheumatoid arthritis patients and persistence of clonally expanded T cells in a chronic patient. *Rheumatology (Oxford)*, 39 (11):1189-1201.
- Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ. 2004. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis*, 63 (4):373-381.
- Walsh DA, Wade M, Mapp PI, Blake DR. 1998. Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. *Am J Pathol*, 152 (3):691-702.
- Walters MT, Stevenson FK, Goswami R, Smith JL, Cawley MI. 1989. Comparison of serum and synovial fluid concentrations of beta 2-microglobulin and C reactive protein in relation to clinical disease activity and synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 48 (11):905-911.
- Williamson AA, McColl GJ. 2001. Early rheumatoid arthritis: can we predict its outcome? *Intern Med J*, 31 (3):168-180.
- Wislowska M JB. 2005. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in rheumatoid arthritis and knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*, 24 (3):278-284.
- Wollheim FA, Eberhardt KB, Johnson U, Saxne T. 1997. HLA DRB1* typing and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) as predictors of joint destruction in recent-onset rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 36 (8):847-849.

- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*, 272 (40):25190-25194.
- Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. 1979. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*, 2 (6182):97-99.
- Young-Min S, Cawston T, Marshall N, Coady D, Christgau S, Saxne T, Robins S, Griffiths I. 2007. Biomarkers predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis and perform well compared with traditional markers. *Arthritis Rheum*, 56 (10):3236-3247.
- Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, Luszczkiewicz G, Wiland P, Dziewczopolski W, Filipowicz-Sosnowska A, Pazdur J, Szechinski J, Kowalczewski J, Rell-Bakalarska M, Maslinski W. 2002. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum*, 46 (7):1744-1753.
- Zvaifler NJ. 1989. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. 11te Aufl. Philadelphia: Lea & Febiger.

11 Anhang

11.1 tabellarischer Lebenslauf

Familienname: Winkens

Vornamen: Michael Jannis

Geburtsdatum: 19. Februar 1983

Geburtsort: Erkelenz (NRW)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Eltern: Margarete Winkens, geb. Graab
Hausfrau

Dr. Hans-Dieter Winkens
Arzt

Wohnort: Karl-Liebnecht-Str. 17; 07749 Jena

Schulzeit

Grundschule: Juli 1989 – November 1989 Luise-Hensel-Grundschule in Erkelenz (NRW)
November 1989 – Juli 1993 Kath. Grundschule in Steinheim/Westf. (NRW)

Weiterführende Schule: Juli 1993 – Februar 1999 Städt. Gymnasium in Steinheim/Westf. (NRW)
Februar 1999 – Juni 2001 Staatl. Gymnasium Fridericianum in Rudolstadt (Thür.)

Schulabschluss: Juni 2001; Abitur

Zivildienst: Juli 2001 – Mai 2002 im Pflegedienst, Kreiskrankenhaus Rudolstadt (Thür.)

Studium: Oktober 2002 bis Dezember 2008 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
1. Ärztliche Prüfung (M 1): September 2004
Abschluss mit Staatsexamen (M 2): November 2008

Famulaturen: März 2005, Klinik für Innere Medizin, KKH Rudolstadt, ChA PD Dr. Meier
März 2006, Klinik für Diagnostische Radiologie, KKH Stollberg/Erzgeb., ChA Dr. Teufl
September 2006, Orthopädische Fachpraxis Jena, Dres. Zink/Häckel
März 2007, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Helios-Kliniken Blankenhain (Thür.),
ChA Dr. Worm

Praktisches Jahr: August 2007 bis Juli 2008
1. Terial: Chirurgie, Robert-Koch-Krankenhaus Apolda, ChA Dr. Frosch
2. Terial: Innere Medizin, Thüringen-Kliniken Rudolstadt, ChA PD Dr. Meier
3. Terial: Anästhesie und Intensivmedizin; FSU Jena, Prof. Dr. Reinhart

Promotion: 2006 bis 2009, Prof. Dr. Hein, Klinik für Innere Medizin III, FSU Jena

Ärztl. Tätigkeit: Assistenzarzt für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Jena,
Prof. Dr. Reinhart (seit Januar 2009)

11.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil G. Hein für die Möglichkeit der Durchführung und Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. med. A. Müller für die Unterstützung bei der Literaturoauswahl sowie Frau Dr. rer. nat. S. Franke und Herrn Dr. med. T. Eidner für ihre Unterstützung bei der Datenerfassung.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der FSU Jena, Frau Dr.-Ing. Heike Hoyer und Herrn Dr. rer. nat. Rüdiger Vollandt für die angenehme Beratung in statistischen Fragen.

Außerdem gilt mein freundschaftlicher Dank Frau Dr. med. Claudia Foltys für die Korrektur und die vielen hilfreichen Tipps zur Anfertigung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich meinen Eltern für die Ermöglichung meines Medizinstudiums und insbesondere meinem Vater für die Mithilfe zur Korrektur dieser Arbeit.

Schließlich danke ich meiner Ehefrau Katharina für ihre endlose Geduld sowie ihre emotionale Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

11.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. habil G. Hein

Dr. med. A. Müller

Dr.-Ing. Heike Hoyer

Dr. rer. nat. Rüdiger Vollandt

Dr. med. Claudia Foltys

Dr. med. Hans-Dieter Winkens

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 28. Januar 2009