

W. Kullich  
F. Niksic  
K. Burmucic  
G. Pöllmann  
G. Klein

## Effekte des Chemokins MIP-1 $\alpha$ auf Anämie und Entzündungsmechanismen bei Rheumatoider Arthritis

### Effects of the chemokine MIP-1 $\alpha$ on anemia and inflammation in rheumatoid arthritis

■ **Zusammenfassung** Das Makrophagenentzündungsprotein-1 (MIP-1 $\alpha$ ) ist ein Mitglied der C-C Chemokine mit primär entzündungsanregenden Eigenschaften wie Chemotaxis und Immunmodulation. Zusätzlich zu seinen Effekten auf Entzündungsmechanismen besitzt MIP-1 $\alpha$  auch die Fähigkeit, das hämatopoetische System zu beeinflussen. Die Hemmung erythroider Vorläuferzellen macht MIP-1 $\alpha$  zu einem interessanten Immunparameter bei RA (Rheumatoide Arthritis), da ge-

rade diese Erkrankung des rheumatischen Formenkreises häufig mit einer Anämie verbunden ist.

84 Patienten mit gesicherter RA (ACR-Kriterien) wurden betreffend ihrer entzündlichen Aktivität und der eventuellen Ausbildung einer Anämie untersucht.

MIP-1 $\alpha$ , das Akute-Phase-Protein Serumamyloid A (SAA), Erythropoietin (EPO) und der Transferrin-Rezeptor (TfR) wurden enzymimmunologisch, der Immunmarker Neopterin radioimmunologisch gemessen.

Es zeigte sich, dass bei der Hälfte der RA-Patienten eine sogenannte Anämie chronischer Erkrankungen (ACD) mit hohem MIP-1 $\alpha$  bestand. Der TfR korrelierte mit EPO.

Die Ergebnisse beweisen, dass hohe MIP-1 $\alpha$ -Spiegel eng mit den entzündlichen Prozessen bei RA verknüpft sind. Zusätzlich zu den Funktionen von MIP-1 $\alpha$  bei der Regulation entzündlicher Vorgänge erscheint eine Beteiligung an der Entstehung der Anämie bei RA wahrscheinlich.

■ **Summary** Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) is an interesting chemokine because in addition to its variety proinflammatory activities including chemotaxis and immunomodulation, it is a potent inhibitor of hematopoietic stem cell proliferation.

Inhibition of erythroid progenitor cells due to MIP-1 $\alpha$  or other cytokines can play a role in the pathogenesis of anemia which is one of the most common extra-articular features of active rheumatoid arthritis (RA).

In 84 patients with RA, serological and immunological parameters were assessed to detect inflammatory mechanisms and anemia in relation to the serum concentrations of MIP-1 $\alpha$ . All patients fulfilled the ACR criteria for the diagnosis of a definite or classic RA. We used a quantitative enzyme immuno assay for the detection of MIP-1 $\alpha$  as well as for the measurement of the acute phase protein serum amyloid A (SAA), the erythropoiesis inducer erythropoietin (EPO) and the transferrin receptor (TfR). The immune activation marker neopterin was measured radioimmunologically.

Half of the patients with RA were anemic with hemoglobin values below 12 g/dl. MIP-1 $\alpha$  was found to be elevated significantly in serum of patients with active rheumatoid arthritis and in patients with anemia. Most of the anemic patients with markedly elevated acute phase reactions had an anemia with chronic diseases and not a functional iron deficiency alone. TfR correlated with EPO.

Eingegangen: 10. Februar 2001  
Akzeptiert: 10. April 2002

Univ. Doz. Dr. Werner Kullich (✉)  
Dr. Katharina Burmucic  
Univ. Prof. Dr. Gert Klein  
Ludwig Boltzmann Institut für  
Rehabilitation interner Erkrankungen  
Thorerstraße 26  
5760 Saalfelden, Austria

Dr. Franz Niksic · Dr. Georg Pöllmann  
Univ. Prof. Dr. Gert Klein  
Sonderkrankeanstalt für rheumatische  
Erkrankungen und  
Herz-Kreislaufkrankheiten  
der PVArb., Saalfelden  
5760 Saalfelden, Austria

The results show that enhanced expression of MIP-1 $\alpha$  is indicative of systemic inflammation in RA. Moreover, besides the regulation of inflammatory processes, this chemokine may influence the pathogenesis of anemia in RA patients.

#### ■ Schlüsselwörter

Rheumatoide Arthritis/chronische Polyarthritits – Makrophagenentzündungsprotein-1 $\alpha$  – Chemokine – Akute-Phase-Reaktionen

#### ■ Key words

Rheumatoid arthritis – anemia – MIP-1 $\alpha$  – chemokines – acute phase reactions

## Einleitung

Das Makrophagenentzündungsprotein MIP-1 $\alpha$  ist ein 8 kDa Polypeptid mit entzündungsanregenden Eigenschaften (26). Es ist definiert als C-C Chemokin und besitzt strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Mitgliedern der C-C Chemokin-Familie, wie RANTES und MCAF (Monocyte Chemotactic Activating Factor). MIP-1 $\alpha$  stammt aus aktivierten Makrophagen, B- und T-Lymphozyten sowie aktivierten Fibroblasten. Es wirkt chemotaktisch auf Makrophagen aber auch neutrophile Granulozyten und T-Zellen und daher kommt ihm bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle bei der selektiven Anlockung von Abwehrzellen zum Ort der Entzündung zu. Das heißt, Chemokine können auch vergleichbar wie „Signallampen“ agieren, die den „Verkehr“ immunkompetenter Zellen bei wichtigen „Kreuzungspunkten“ der Lymphgewebe regeln (21).

Hatano et al. (17) weisen eine erhöhte Expression von MIP-1 $\alpha$  auch aus den Neutrophilen der Synovialflüssigkeit bei RA nach. Untersuchungen von Tanaka et al. (31) wiederum zeigen, dass MIP-1 $\alpha$  bei Rheumatoider Arthritis (RA) eindeutig durch mononukleäre Phagozyten, welche das RA-Synovialgewebe infiltrieren, produziert wird und nicht von Endothelzellen, welche in dieser Studie im Vergleich ebenfalls untersucht wurden. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass MIP-1 $\alpha$  in vivo von den Entzündungszellen und nicht von Endothelzellen abstammt. Es wird angenommen, dass das retikuläre Netzwerk für den raschen Transport löslicher Faktoren wie MIP-1 ausgerichtet ist (10). Nach Tanaka et al. (31) induziert MIP-1 $\alpha$  eher die Adhäsion und Chemotaxis von T-Zellen als von neutrophilen Granulozyten.

MIP-1 $\alpha$  verursacht wie bereits erwähnt primär die Anhäufung von mononukleären Zellen in der Phase der chronischen Entzündung (3); bei akuter Entzündung hingegen ist vorwiegend das Zytokin Interleukin-8, welches auch zu den Chemokinen gehört, dafür verantwortlich, um Neutrophile an den Ort der Entzündung anzulocken.

Zusätzlich zu seiner Rolle bei der Entzündung dürfte MIP-1 $\alpha$  auch Effekte auf hämatopoetische

Vorläuferzellen besitzen (13, 20). MIP-1 $\alpha$  wurde von Graham et al. (13, 15) als aktive Komponente eines Knochenmarkextraktes beschrieben, die die Proliferation von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen hemmt. Inzwischen gibt es mehrere Hinweise, dass das Makrophagenentzündungsprotein MIP-1 $\alpha$  die Proliferation von hämatopoetischen Progenitorzellen – in Abhängigkeit von ihrem Reifegrad – moduliert. Studien von Broxmeyer et al. (4) konnten nachweisen, dass natürliches und rekombinantes MIP-1 $\alpha$  die stimulierten humanen koloniebildenden Vorläuferzellen der CFU-GM im Knochenmark supprimiert. Weiters unterdrückte MIP-1 $\alpha$  humane und murine BFU-E (Burst Forming Unit Erythroid), also Vorläufer der roten Zellreihe und CFU-GEMM (= Multipotential Progenitors). Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass von den MIPs nur MIP-1 $\alpha$  diesen direkten suppressiven Effekt auf unreife Vorläufer haben dürfte. Die beschriebene MIP-1 $\alpha$  mediierte Suppression der Proliferation von unreifen Vorläuferzellen wird hauptsächlich durch den Rezeptor CCR-1 vermittelt, der von diesen Progenitorzellen exprimiert wird (30).

Die Anämie als häufigste systemische Manifestation einer Rheumatoiden Arthritis hat bei dieser entzündlich-rheumatischen Erkrankung eine große Bedeutung und kann durchaus das Allgemeinbefinden der Patienten erheblich beeinträchtigen (29). Da das Ausmaß der Anämie in der Regel mit der Aktivität der Grunderkrankung zunimmt, sind es gerade die Patienten mit hoch aktiver Erkrankung, bei denen diese Form der Anämie besondere Problematik erlangt. Da als mögliche pathogenetische Faktoren dieser Anämie auch eine Vielzahl von proinflammatorischen Faktoren diskutiert werden, wie z. B. verschiedene Zytokine bzw. Chemokine, wurde in der vorliegenden Studie, basierend auf den theoretischen Grundlagen der Hämatologie und Immunologie, versucht in vivo zu überprüfen, ob bei Rheumatoider Arthritis auch ein Einfluss von MIP-1 $\alpha$  auf die Entzündung und Ausbildung einer Anämie nachweisbar ist.

## Material und Methoden

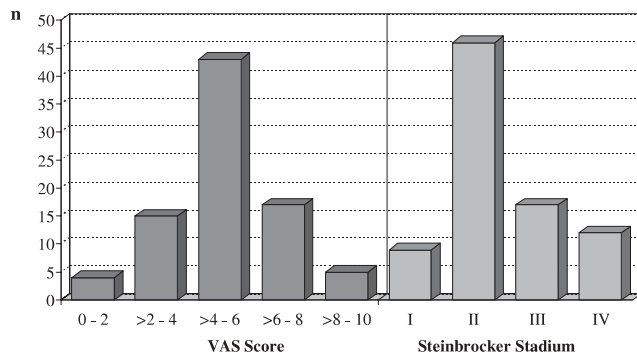
Es wurden 84 Patienten mit nach ACR-Kriterien gesicherter RA bei Aufnahme in ein stationäres Rehabilitationsverfahren in die Untersuchungen eingeschlossen. Das Alter der Patienten betrug  $51,4 \pm 13,5$  Jahre. Als mittlere Erkrankungsdauer wurden  $11,5 \pm 9,7$  Jahre ermittelt. Bei 60% der RA-Patienten lag eine kontinuierliche Erkrankungsprogression vor, 27% zeigten eine sehr rasche, 13% eine minimal progressive Verlaufsform. Weitere Daten des Kollektivs zum radiologischen Steinbrocker-Stadium sowie einer globalen Schmerzerhebung mit Hilfe einer visuellen Analogskala (VAS; Score 0–10) sind in Abbildung 1 dargestellt.

Eine aktive RA wurde bei Patienten definiert, welche klinisch und serologisch aktiv waren, d.h. welche geschwollene und schmerzhafte Gelenke gemäß den ACR-Kriterien hatten und bei denen eine Erhöhung von C-reaktivem Protein  $>1,0$  mg/dl, Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit  $>15$  mm/h und Serum Amyloid A (SAA)  $>20$  ng/ml bestand.

Die Messungen des Makrophagenentzündungsproteins MIP-1 $\alpha$  wurden mittels eines quantitativen Sandwich-Enzymimmunoassays durchgeführt, der einen monoklonalen Antikörper verwendet, welcher spezifisch für MIP-1 $\alpha$  ist (Quantikine Human MIP-1 $\alpha$  Immunoassay R&D-Systems, Minneapolis, USA).

Das Akute-Phase-Protein Serumamyloid A (SAA), welches ein besonders sensibler Marker für die Detektion von entzündlichen Vorgängen ist, wurde ebenfalls mit Hilfe eines Festphasen-ELISAs bestimmt (Cytoscreen Human SAA Immunoassay Kit, BioSource International, Camerillo, USA).

Das Pteridin Neopterin wurde quantitativ im Serum mit Hilfe eines Radioimmunoassays erfasst (IBL, Neopterin-RIA; Gesellschaft für Immunchemie und Immunbiologie, Hamburg, Deutschland).



**Abb. 1** Schmerzmessung (visuelle Analogskala; Score 0–10) und radiologische Klassifizierung nach Steinbrocker bei 84 RA-Patienten

Die Konzentration des löslichen Transferrin-Rezeptors (sTfR), welcher ein Hauptmediator der Eisenaufnahme ist, wurde enzymimmunologisch mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern spezifisch für TfR detektiert (Quantikine IVD<sup>®</sup> Human sTfR, R&D-Systems, Wiesbaden, Deutschland).

Auch die Messung des die Erythropoese regulierenden Faktors Erythropoietin (EPO) wurde ebenfalls mit Hilfe eines kommerziellen ELISA-Testkits vorgenommen (Quantikine IVD<sup>®</sup> Human EPO, R&D-Systems, Minneapolis, USA).

Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit nach WESTERGREN (BSG, 1h-Wert), das C-reaktive Protein, rotes und weißes Blutbild, der IgM-Rheumafaktor sowie die Serumeisenwerte und Ferritin wurden routinemäßig bestimmt.

In Anlehnung an die Empfehlungen der Österreichischen Gesellschaft für Bioanalytik in Wien (32) wurden zur Beurteilung einer Anämie Hämoglobin (Hb)-Werte von  $<12,5$  g/dl beim Mann und  $<11$  g/dl bei der Frau herangezogen, da diese Richtlinien noch etwas genauer eine Anämie definieren als Studien, die sich an die WHO-Kriterien (36) halten, welche eine Anämie als eine Hämoglobinkonzentration unter 120 g/l bei Frauen und unter 130 g/l bei Männern definieren (19). Mit Hilfe der MCV (Mean Corpuscular Volume) wurde die Anämie als mikrozytär ( $<80$  fl) oder normozytär ( $>80$  bis  $>96$  fl) bewertet. Bei RA ist es ohne Knochenmarksbiopsien sehr schwierig den Anämietyp zu bestimmen. Es wurde daher versucht, bei Patienten mit erniedrigtem Hb und Serumeisen mit Hilfe von MCV ( $<80$  fl) und Serum Ferritin ( $<20$  ng/ml) eine Eisenmangelanämie von der entzündungsbedingten Anämie bei Rheumatoider Arthritis in Anlehnung an die Empfehlungen von Vreugdenhil et al. (34) abzugrenzen. Da sich damit zeigte, dass insbesondere bei hohen MIP-1 $\alpha$ -Spiegeln in der überwiegenden Mehrheit des Kollektivs eine Anämie chronischer Erkrankungen beobachtet werden konnte, andererseits mit den oben genannten Parametern unserer Meinung nach nur eine grobe Abgrenzung der Anämietypen möglich ist und auch wie beschrieben eine Differenzierung mit Hilfe des Transferrinrezeptors nicht verlässlich durchführbar war, wurde in den weiteren Berechnungen auf eine Untergruppierung der Anämietypen verzichtet.

Alle durchgeführten immunologischen Testverfahren wurden zur Qualitätssicherung in Doppelbestimmung vorgenommen, zusätzlich wurden geeignete Kontrollsera zur Qualitätskontrolle bei jedem Ansatz mitgeführt.

Die EDV-mäßige Datenerfassung und die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Lotus 1,2,3 Millennium Edition (Lotus Development Corporation, USA) und der sta-

tistischen Programmpakete MedCalc Statistics for Biomedical Research Vs. 5.0 (MedCalc Software, Belgien) und Systat 7.0 Statistics for Windows (SPSS Inc., USA). Dabei wurden vor allem folgende Testverfahren verwendet: Deskriptive Statistik, Wilcoxon U-Test, Student t-Test sowie Regressionsanalysen zur Berechnung kausaler Korrelationen.

## Ergebnisse

Bei den 84 ausgewerteten Patienten mit RA wurde in der Hälfte der Fälle labordiagnostisch eine in der Regel leichte Anämie mit Hämoglobin-Werten von  $11,0 \pm 1,0$  g/dl (Medianwert 11,3) und einem Serum-eisen von  $65 \pm 34$  ng/dl festgestellt, die restlichen 50% zeigten keine Veränderungen des roten Blutbildes und des Serumeisenspiegels.

Serum-Ferritin war bei der Anämiegruppe im Mittel mit 116,7 ng/ml vermutlich infolge der verstärkten Akute-Phase-Reaktionen zwar höher als bei RA ohne Anämie, aufgrund der sehr hohen Streuungen der Ferritinwerte bei den RA-Patienten ergab sich erwartungsgemäß kein statistischer Signifikanzunterschied.

Es fällt auf, dass unter den anämischen RA-Patienten ein wesentlich höherer Prozentsatz (28,6%) eine deutliche Erhöhung der Entzündungsparameter Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit und C-reaktives Protein hatte als bei RA ohne Anämie, wo nur in 7,1% eine akute Exazerbation bestand. Misst man nun MIP-1 $\alpha$ , so findet man erwartungsgemäß signifikant höhere Serumspiegel von diesem Entzündungsprotein bei jenen Fällen mit erhöhten Entzündungsparametern wie CRP, SAA und BSG, d.h. mit

serologisch aktiver RA als bei der Gruppe ohne Anämie ( $p < 0,03$ ) (Tab. 1).

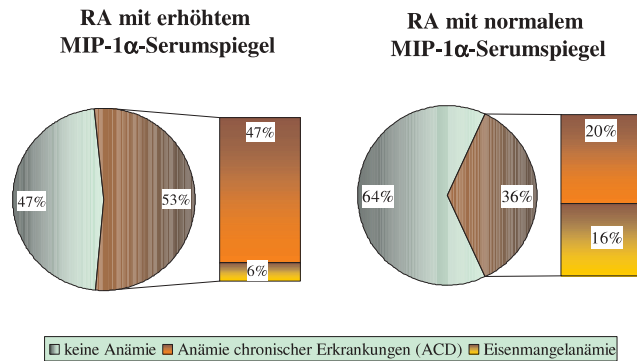
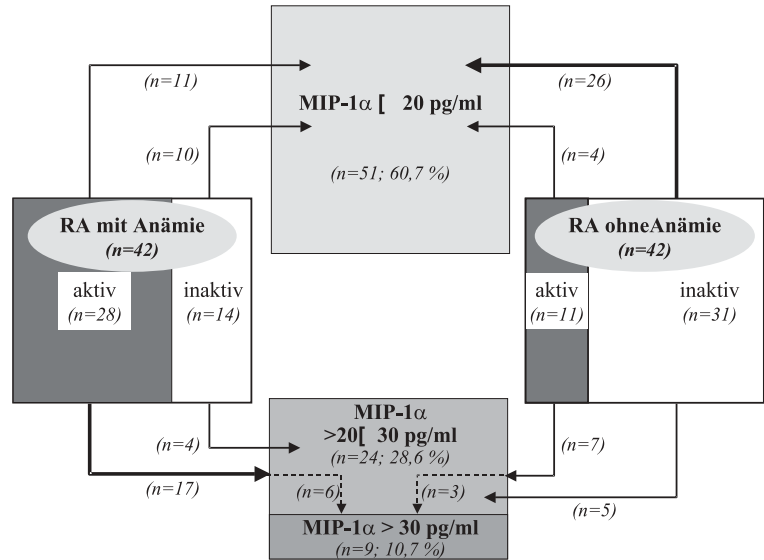
Interessanterweise zeigte das Makrophagenabbau-produkt Neopterin, welches als eher unspezifischer Marker der Makrophagenaktivierung gilt, keine signifikanten Unterschiede betreffend die Anämie, obwohl die spezifischen Entzündungsmarker wie Serumamyloid A, C-reaktives Protein und die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit bei RA + Anämie signifikant erhöht waren. Andererseits bestand aber eine schwache signifikante Korrelation zwischen MIP-1 $\alpha$  und Neopterin im Serum ( $r=0,3$ ;  $p < 0,05$ ). Neben den erwarteten Veränderungen von Hämoglobin, Hämatokrit, MCV und Serumeisen unterscheiden sich auch die Werte von sTfR und EPO signifikant bei Patienten mit Anämie von jenen ohne Anämie (Tab. 1). Auffallend ist der fehlende EPO-Anstieg bei hohen MIP-1 $\alpha$ -Spiegeln (Tab. 2), den man aufgrund der Hämoglobin-, Eisen- und sTfR-Werte erwarten würde.

Bei der weiteren Aufteilung des Patientenkollektivs in aktive und inaktive RA-Fälle scheint auf den ersten Blick die Höhe der mittleren MIP-1 $\alpha$ -Werte in der Gruppe mit Anämie ohne Unterschied zu jenen in der Gruppe ohne Anämie zu sein (Abb. 2), obwohl ohne diese „aktiv-inaktiv“-Unterteilung bei Anämie signifikant höhere MIP-1 $\alpha$ -Spiegel gemessen wurden (Tab. 1). Diese Diskrepanz erklärt sich durch die Patientenverteilung: in der Anämie-Gruppe war die Mehrheit der Patienten den aktiven RA-Patienten zuzuordnen, wogegen in der Gruppe ohne Anämie die Verteilung umgekehrt war. 28 aktive Patienten mit Anämie und hohen MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegeln besitzen natürlich eine andere statistische Gewichtung als 11 aktive Fälle ohne Anämie; dasselbe gilt auch für

**Tab. 1** Labormessparameter von 84 Patienten mit Rheumatoider Arthritis unterteilt in eine Gruppe mit Anämie und eine Gruppe ohne Anämie (MIP = Macrophage Inflammatory Protein, SAA = Serumamyloid A, BSG = Blutkörperchengeschwindigkeit 1 h-Wert, CRP = C-reaktives Protein, MCV = Mean Corpuscular Volume, TfR = Transferrin-Rezeptor, EPO = Erythropoitin)

Messparameter	RA-Patienten mit Anämie n = 42			RA-Patienten ohne Anämie n = 42			Signifikanz (p)
	$\bar{x}$	S	$\tilde{x}$	$\bar{x}$	S	$\tilde{x}$	
MIP-1 $\alpha$ (pg/ml)	27,5	15,7	25,6	20,3	14,2	17,7	< 0,03
SAA (ng/ml)	136	152	71	53	88	11	< 0,004
BSG (mm/1 h)	37,6	20,3	36,5	20,2	18,5	12	< 0,002
CRP (mg/dl)	2,6	1,9	2,1	1,2	2,5	0,5	< 0,01
Neopterin (nmol/l)	15,8	14	13,2	13	10,5	9,9	n.s.
Serumeisen (ng/dl)	65	34	54	122	39	119	< 0,0001
Hämoglobin (g/dl)	11	1	11,3	13,5	0,8	13,4	< 0,0001
Hämatokrit (%)	35	3	35	41	2	41	< 0,0001
MCV (fl)	85	5	86	88	4	88	< 0,005
Serum Ferritin (ng/ml)	116,7	147,8	74	98,3	88,2	71,5	n.s.
TfR (nmol/l)	28	11,5	23,7	23,5	7,4	21	< 0,05
EPO (mIU/ml)	19,5	26	12,5	7,8	4,2	7,2	< 0,01

**Abb. 2** Häufigkeitsverteilung von MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegeln in Bezug auf Aktivität und Anämie bei RA



**Abb. 3** Verteilung der RA-Patienten mit bzw. ohne Anämie

die 31 inaktiven Fälle ohne Anämie im Vergleich zu 14 Patienten mit inaktiver RA + Anämie.

Bei weiterer Untersuchung des Krankengutes zeigte sich auch, dass die Mehrheit der Patienten mit Anämie und gleichzeitig erhöhtem MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegel (53%) eine Anämie der chronischen Erkrankung (ACD, Anaemia of Chronical Diseases mit deutlich erhöhten Entzündungsparametern (BSG >15, CRP  $\geq$ 1, SAA >20) besitzt (47%) (Abb. 3). Weiters ist aus Tabelle 2 zu entnehmen, dass die Entzündungsparameter im Mittel mehr oder minder parallel zu der Höhe des MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegels ansteigen. Gleichzeitig kann man eine Verringerung von Hämoglobin und Serumeisen beobachten. Erythropoietin verringerte sich nicht signifikant, der Transferrin-Rezeptor war interessanterweise bei normalen MIP-1 $\alpha$ -Werten niedriger als bei erhöhten.

Kurz zu erwähnen ist auch die statistische Beobachtung, dass bei hohen MIP-1 $\alpha$ -Spiegeln ein höhe-

rer Prozentsatz an Invaliditätspensionen und eine verringerte Häufigkeit an Berufstätigen bestand (Abb. 4). Diese Tatsache erklärt sich im aktiveren Verlauf der RA bei diesen Patienten, es fällt auch auf, dass RA-Patienten in Pension oder vorzeitiger Invaliditätspension und hohem MIP-1 $\alpha$  auch in einem höheren Prozentsatz unter einer Anämie leiden.

### Diskussion

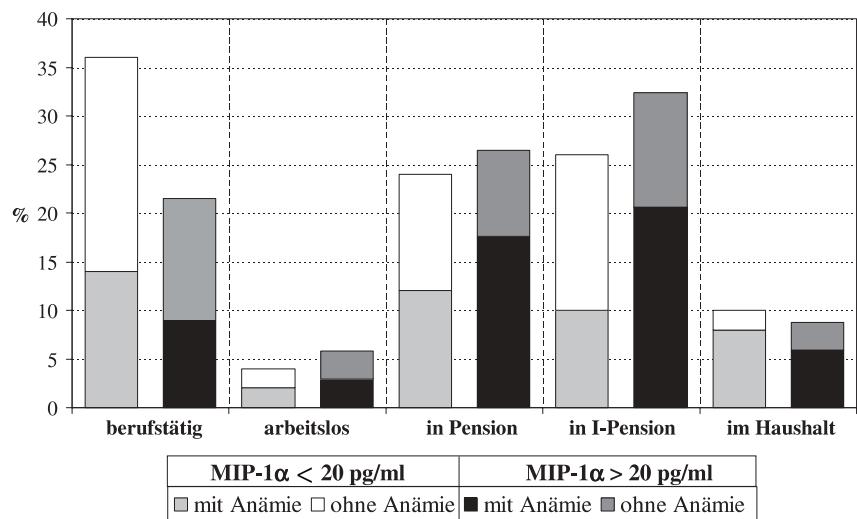
Bei den untersuchten Patienten mit Rheumatoider Arthritis ergaben sich vor allem in Abhängigkeit von der Höhe der Entzündungsparameter SAA, CRP und BSG erhöhte Serumspiegel des Makrophagenproteins MIP-1 $\alpha$ . Es bestätigten sich damit die Ergebnisse früherer eigener Studien (22, 23) sowie die Berichte anderer Autoren (2, 17). So konnten auch BORZI et al. (2) mit Hilfe einer flow-cytometrischen Analyse von mehreren intrazellulären Chemokinen nachweisen, dass bei RA-Patienten eine Erhöhung von MIP-1 $\alpha$  und Interleukin-8 auftritt. Im gesunden Organismus dürfte MIP-1 $\alpha$  eine Funktion bei der Immunabwehr von Mikroorganismen spielen, dafür sind die proinflammatorischen Eigenschaften von Bedeutung. Aus Arbeiten von COOK (8) an Mäusen geht klar hervor, dass MIP-1 $\alpha$  für eine entzündliche Immunantwort benötigt wird. Eine Beeinflussung von MIP-1 $\alpha$  kann daher sehr bedeutend bei der Kontrolle von Entzündungsprozessen sein.

MIP-1 $\alpha$  kann im Rahmen seiner potenten entzündungsanregenden Eigenschaften die Histaminabgabe steigern (24), wodurch eine Verbindung zu Schmerzmechanismen im Rahmen der RA gegeben sein müsste. Eine Regressionsanalyse unserer Daten zeigt

**Tab. 2** Labormesswerte (Mittelwert und Standardabweichung) von Parametern der Hämatopoese und Entzündung bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (n=84) in Bezug auf die Serumkonzentration von dem Makrophagenentzündungsprotein (MIP)-1 $\alpha$

	Einheit	MIP-1 $\alpha$					
		Deutlich erhöht (>30 pg/ml)		Mäßig erhöht (>20≤30 pg/ml)		Im Normbereich (≤20 pg/ml)	
		$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
MIP-1 $\alpha$	pg/ml	54,1	19,1	24	2,9	14,4	3,8
Erythropoietin	mIU/ml	8,9	1,8	9,3	7,4	10,7	6,5
Transferrin-Rezeptor	nmol/l	31	6,9	28,7	6,7	23,5	7,2
Serumeisen	ng/dl	65	19	87	56	104	42
Hämoglobin	g/dl	10,6	1,2	11,9	1,8	12,4	1,3
SAA	ng/ml	190	95	92	85	78	117
BSG	mm/l h	44,9	19	31,6	23,3	24,4	18,8
CRP	mg/dl	4,2	0,6	2	2,3	1,4	1,8
Neopterin	nmol/l	21,6	13,3	18,8	8,1	10,8	3,6

**Abb. 4** Häufigkeitsverteilung betreffend die Berufsausübung bei 84 Patienten mit RA in Bezug auf die Höhe der MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegel



te mit  $p=0,06$  jedoch knapp kein signifikantes Resultat bei dem Vergleich zwischen MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegeln und dem mit Hilfe einer visuellen Analogskala (VAS) erfassten Schmerzscore. Ein kausaler Zusammenhang von MIP-1 $\alpha$  zu Schmerz musste daher in dem von uns untersuchten Patientenkollektiv als nicht gegeben angesehen werden.

Zusätzlich zu seinen entzündungsanregenden Eigenschaften besitzt MIP-1 $\alpha$  aber auch die Fähigkeit, das hämatopoetische System zu beeinflussen. Das heißt, dass die biologischen Funktionen von MIP-1 $\alpha$  die Regulation entzündlicher Prozesse und die Hemmung der frühen Hämatopoese beinhalten (5). Diese Eigenschaft macht das Chemokin MIP-1 $\alpha$  zu einem äußerst interessanten Immunparameter, da ja die Anämie chronischer Erkrankungen (ACD) bzw. ein Eisenmangel bei RA verbreitet vorkommt (1, 34). Auch ein eventueller gastrointestinaler Blutverlust in

Folge einer Antirheumatika-Therapie ist möglich (12) und muss daher ausgeschlossen werden.

Die ACD-Anämie bei RA ist meist nur leicht bis mittelschwer ausgeprägt (7–12 g/dl Hb) und es ist schon lange bekannt, dass der Grad der Anämie häufig mit der Aktivität der RA korrespondiert (11).

Ferritin fungiert bei RA als Akute-Phase-Protein (1, 18) und war daher als Parameter für den Eisenstoffwechsel in unseren Untersuchungen nicht geeignet. Es ist ja bekannt, dass die Serum Ferritinspiegel aus diesem Grund bei Entzündungsvorgängen ansteigen (35), wodurch meist eine Korrelation mit der BSG bzw. dem CRP besteht, nicht jedoch eine Korrelation mit Eisenstoffwechselfparametern bei RA nachzuweisen ist (1).

Bei Personen mit chronischen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis soll die Bestimmung des löslichen Transferrin-Rezeptors wertvolle Hin-

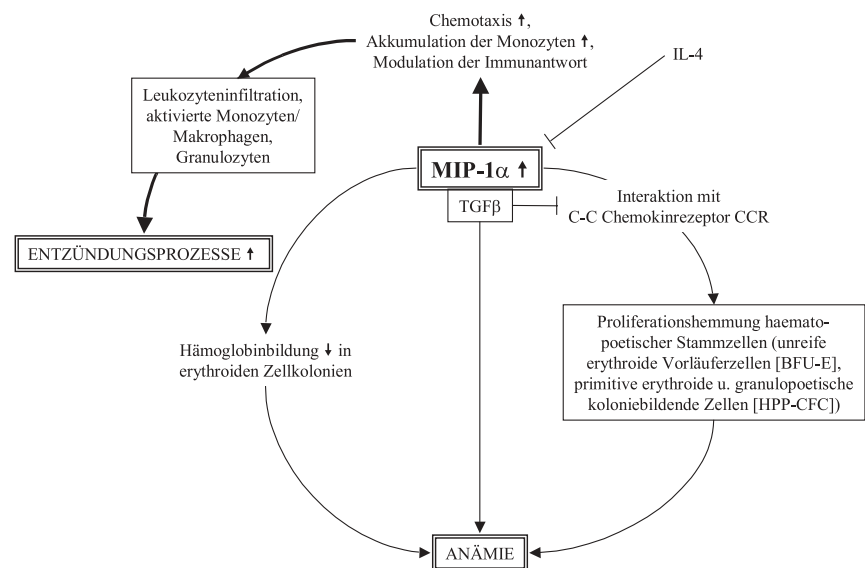
weise bieten, um einen funktionellen Eisenmangel zu erkennen (25). Lösliche Transferrin-Rezeptoren (sTfR) entstehen durch Proteolyse an einer spezifischen Stelle in der extrazellulären Domäne des TfR. Dadurch entstehen Monomere, die im Serum und Plasma nachgewiesen werden können. Es besteht eine konstante Beziehung zwischen TfR-Anzahl und Konzentration von sTfR im Serum, wodurch indirekt der TfR-Gesamtgehalt gemessen werden kann. Unsere Messungen ergaben interessanterweise, dass RA-Patienten mit erhöhtem Transferrin-Rezeptor häufig auch hohe MIP-1 $\alpha$ -Serumspiegel besitzen – eine Tatsache, die durchaus auch auf die Bedeutung dieses Chemokins bei der Anämie der RA hinweisen kann. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten einer italienischen Studie, in der die sTfR-Spiegel sowohl mit dem Grad der Anämie als auch der Aktivität des entzündlichen Prozesses in Beziehung gebracht wurden (38). Diese Beobachtungen sowie unsere Resultate zeigen, dass der sTfR nicht nur bei einer reinen Eisenmangelanämie, sondern auch bei einer ACD-vermutlich in geringerem Ausmaß – ansteigen kann. Er trägt somit zwar zur Bestätigung der Anämie bei, die klare Unterscheidung zwischen Anämie chronischer Erkrankungen und reinem Eisenmangel erscheint aber bei RA mit diesem Parameter zweifelhaft. Der sTfR korrelierte auch signifikant mit dem Erythropoietin (Korrelationskoeffizient  $r=0,52$ ;  $p<0,0001$ ). Es fällt jedoch auf, dass bei hohem MIP-1 $\alpha$  kein Anstieg der mittleren EPO-Spiegel verzeichnet werden konnte, obwohl diese Patienten deutlich niedrigere Serumeisenspiegel und hohe sTfR-Werte hatten (Tab. 2). Die Ursache dafür könnte in einer bei RA durch Zytokine verursachten verminderten EPO-Freisetzung liegen (9,

33). In diesem Zusammenhang erscheint es von Bedeutung darauf hinzuweisen, dass auch Pteridine wie Neopterin und Dihydroneopterin die renale EPO-Produktion hemmen können (28) und die Serum-Neopterin Spiegel bei den von uns untersuchten RA-Patienten parallel zu MIP-1 $\alpha$  anstiegen (Tab. 2; Korrelationskoeffizient  $r=0,33$ ,  $p<0,02$ ).

Aufgrund von Beobachtungen der Hemmung von Vorläuferzellen der roten Zellreihe (BFU-E und CFU-E; Burst Forming Unit-Erythroid und Colony Forming Unit-Erythroid) durch proinflammatorische Zytokine bei RA-Anämiepatienten wird angenommen, dass bestimmte Zytokine wie TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 eine Rolle in der Pathogenese der ACD bei RA spielen können (33). Dazu kann natürlich auch das von uns in dieser Studie untersuchte Zytokin MIP-1 $\alpha$  gerechnet werden. Das Zytokin TNF könnte zwar über die Beeinflussung von Erythropoietin (EPO) im Sinne einer „Down-Regulation“ eine Rolle bei der Verursachung der ACD spielen, aber es wird auch ein Mechanismus vermutet, der unabhängig von einer EPO-Suppression ist (9). Dieser könnte ein direkter Effekt von TNF auf die Vorläufer der roten Zellreihe sein, aufgrund unserer Untersuchungen sollte auch MIP-1 $\alpha$  in dem Netzwerk Entzündungsmechanismen – Anämieentstehung beachtet werden.

Es konnte in vitro gezeigt werden, dass ein von Makrophagen abstammender Inhibitor der hämatopoetischen Stammzellen SCI dem Zytokin MIP-1 $\alpha$  ident ist (13, 15) und dass SCI/MIP-1 $\alpha$  sowohl in den funktionellen als auch antigenen Eigenschaften mit der CFU-S hemmenden Aktivität normaler Knochenmarkszellen verglichen werden kann. Das Molekül MIP-1 $\alpha$  hat eine starke Tendenz zu einer nichtkovalenten extensiven Selbstaggregation. Untersuchungen mit

**Abb. 5** Theoretische Rolle von MIP-1 $\alpha$  bei Entzündung und Anämieausbildung bei der rheumatoiden Arthritis



Hilfe von Stammzellassays und Monozytengestalt-Testverfahren zeigen alle, dass die Bioaktivität äquivalent ist, unabhängig, ob das Molekül aggregiert oder elongiert ist (14). Das heißt die Molekülgestalt hat vermutlich keine Auswirkung auf die biologische Aktivität. Es wird angenommen, dass MIP-1 $\alpha$  jenes endogen produzierte Chemokin ist, welches in Kooperation mit TGF- $\beta$  die Zellzyklusblockade primitiver normaler Vorläuferzellen bewirkt (27). Auch die Resultate von McGuckin et al. (16) zeigen, dass MIP-1 $\alpha$  aufgrund seiner Fähigkeit, partiell die Vorläuferzelllinie HEL sowie die Hämoglobinbildung in entwickelten Kolonien zu reduzieren, eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklungsphase erythroider Zellen spielt.

Tierversuche zu SCID-Mäusen (= Severe Combined Immuno Deficient Mice) zeigen, dass MIP-1 $\alpha$  ein einzigartiges Muster der Hemmung von der Proliferation von Progenitorzellen besitzen dürfte. Es wirkte aktiv auf bestimmte primitive erythroide und granulopoetische koloniebildende Zellen (HPP-CFS) und reife koloniebildende Zellen nicht jedoch auf Langzeitinitialkulturzellen (LTC-IC) (7). Von Broxmeyer (4) wird angenommen, dass MIP-1 $\alpha$  auf unreife myelopoetische Vorläuferzellen eine direkte suppressive Aktivität besitzt, es andererseits aber auch das Wachstum reifer myelopoetischer Vorläuferzellen anregen könnte. Die Arbeit von SU et al. (30) zeigt, dass die suppressiven Effekte vor allem für BFU-E gelten. Dies dürfte auf der Tatsache beruhen, dass die BFU-Es eine höhere Zahl an MIP-1 $\alpha$ -Bindungsstellen besitzen. Dies bestätigen auch Arbeiten von De Wynter et al. (37), in denen der hemmende Effekt von MIP-1 $\alpha$  auf myeloische

und erythroide Vorläuferzellpopulationen untersucht wurde. MIP-1 $\alpha$  unterdrückte in diesen Versuchen die BFU-E-Kolonien. Langzeitknochenmarkkultursysteme wie von Cashman et al. (6) dargestellt, sind ein interessantes experimentelles Modell zur In-vivo-Untersuchung der hämatopoetischen Zellregulation. Diese Modelle dürften sich gut dazu eignen, relevante Inhibitoren der primitiven normalen hämatopoetischen Vorläuferzellproliferation zu identifizieren.

Abbildung 5 zeigt, basierend auf dem derzeitigen Stand des Wissens, die wichtigsten Wirkmechanismen von MIP-1 $\alpha$  auf Entzündungsprozesse und das hämatopoetische System bei RA. Die Resultate der vorliegenden Studie zeigen, dass das Chemokin MIP-1 $\alpha$  bei RA neben den bekannten Effekten auf die Entzündungsmechanismen zusammen mit mehreren anderen Faktoren des Immunsystems eine Rolle in der Pathogenese der Anämie bei RA spielen kann. Es wäre jedoch falsch das Chemokin MIP-1 $\alpha$  nur isoliert als die Hauptursache für die Entstehung einer Anämie bei RA anzusehen. MIP-1 $\alpha$  kann aber gerade wegen seiner Eigenschaften bei Entzündungsprozessen und Haematopoese einen interessanten „Mosaikstein“ der multifaktorellen Pathogenese der Anämie bei dieser Erkrankung darstellen.

Bei teils nur ansatzweise bekannter Pathogenese ist eine Beeinflussung der Anämie bei RA durch die leider nicht immer realisierbare Unterdrückung der Grunderkrankung oft nicht einfach, ein besseres Verständnis der pathogenetischen Zusammenhänge kann in der Folge auch Weiterentwicklung der therapeutischen Maßnahmen bewirken.

## Literatur

1. Baynes RD, Bothwell TH, Bezwoda WR, Gear AJ, Atkinson P (1987) Hematologic and iron-related measurements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Pathol* 87(2):196–200
2. Borzi RM, Mazzetti I, Macor S, Silvestri T, Bassi A, Cattini L, Facchini A (1999) Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 455(3):238–242
3. Botting RM, Botting JH (2000) Pathogenesis and Mechanisms of Inflammation and Pain. *Clin Drug Invest* 19 (Suppl. 2):1–7
4. Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, Cooper S, Oh KO, Tekamp-Olson T, Kwon BS, Cerami A (1990) Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 76(6):1110
5. Bug G, Aman MJ, Tretter T, Huber C, Peschel C (1998) Induction of macrophage-inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) by interferon- $\alpha$ . *Exp Hematol* 26(2):117–123
6. Cashman JD, Eaves CJ, Sarris AH, Eaves AC (1998) MCP-1, not MIP-1 $\alpha$ , Is the Endogenous Chemokine That Cooperates With TGF- $\beta$  to Inhibit the Cycling of Primitive Normal but not Leukemic (CML) Progenitors in Long-Term Human Marrow Cultures. *Blood* 92(7):2338–2344
7. Cashman JD, Clark-Lewis I, Eaves AC, Eaves CJ (1999) Differentiation stage-specific regulation of primitive human hematopoietic progenitor cycling by exogenous and endogenous inhibitors in an in vivo model. *Blood* 94(11):3722–3729
8. Cook DN (1996) The role of MIP-1 $\alpha$  in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 59(1):61–66
9. Davis D, Charles PJ, Potter A, Feldmann M, Maini RN, Elliott MJ (1997) Anaemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: in vivo effects of tumour necrosis factor alpha blockade. *Br J Rheumatol* 36(9):950–956
10. Ebnet K, Kaldjian EP, Anderson AO, Shaw S (1996) Orchestrated information transfer underlying leukocyte endothelial interactions. *Annu Rev Immunol* 14:155–177



11. Engstedt L, Strandberg O (1966) Hematological data and clinical activity of the rheumatoid disease. *Acta Med Scand* 454 (Suppl):13-29
12. Graham DY, Smith L (1986) Aspirin and the stomach. *Ann Intern Med* 104:390-398
13. Graham GJ, Wright EG, Hewick R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S, Pragnell IB (1990) Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 344(6265):442-444
14. Graham GJ, MacKenzie J, Lowe S, Tsang ML, Weatherbee JA, Issacson A, Medicherla J, Fang F, Wilkinson PC, Pragnell IB (1994) Aggregation of the chemokine MIP-1 alpha is a dynamic and reversible phenomenon. Biochemical and biological analyses. *J Biol Chem* 269(7):4974-4978
15. Graham GJ, Wright EG (1997) Haemopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation. *Int J Exp Path* 78:197-218
16. McGuckin CP, Liu WM, Gordon-Smith EC, Uhr MR (1996) A novel approach to investigating the erythroid lineage, using both receptor analysis and haemoglobin detection. *Br J Haematol* 95(3):457-460
17. Hatano Y, Kasama T, Iwabuchi H, Hanaoka R, Takeuchi HT, Jing L, Mori Y, Kobayashi K, Negishi M, Ide H, Adachi M (1999) Macrophage inflammatory protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 58(5):297-302
18. Heinrich HC (1991) Diagnostik und Therapie der Anämien bei chronischen Erkrankungen. *Infekt-, Entzündungs- und Tumoranämien. Internist Prax* 31:69-73
19. Izaks GJ, Westendorp RGJ, Knook DL (1999) The Definition of Anemia in Older Persons. *JAMA* 281(18):1714-1717
20. Keller JR, Bartemez SH, Sitnicka E, Ruscetti FW, Ortiz M, Cooya JM, Jacobsen S (1994) Distinct and overlapping effects of macrophage inflammatory protein-1 and transforming growth factor  $\beta$  on hematopoietic progenitor/stem cell growth. *Blood* 84:2175
21. Kim CH, Broxmeyer HE (1999) Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 65(1): 6-15
22. Kullich WC, Klein G (1998) High Levels of Macrophage Inflammatory Protein-1 Correlate with Prolactin in Female Patients with Active Rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 17: 263-264
23. Kullich W, Pöllmann G, Klein G (1999) Einfluss von MIP-1 $\alpha$  und Prolaktin auf das Immunsystem und endokrines System bei chronischer Polyarthrit. *Z Rheumatol* 58:239
24. Li HM, Sim TC, Grant JA, Alam R (1996) The production of macrophage inflammatory protein-1 by human basophils. *J Immunol* 157(3): 1207-1212
25. Means RT, Allen J, Sears DA, Schuster SJ (1999) Serum soluble transferrin receptor and the prediction of marrow aspirate iron results in a heterogeneous group of patients. *Clin Lab Haematol* 21(3):161-167
26. Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K (1991) Properties of the novel proinflammatory intercrine cytokine family. *Annu Rev Immunol* 9:617-648
27. Otsuka T, Eaves CJ, Humphries RK, Hogge DE, Eaves AC (1991) Lack of evidence for abnormal autocrine or paracrine mechanisms underlying the uncontrolled proliferation of primitive chronic myeloid leukemia progenitor cells. *Leukemia* 5:861
28. Pagel H, Fandrey J, Schobersberger W, Fuchs D, Jelkmann W (1999) Effects of neopterin and 7,8-dihydro-neopterin on hypoxia-induced renal erythropoietin production. *Eur J Haematol* 62(5):341-345
29. Rave O, Wienands K (1995) Erythropoietin - therapeutische Option bei c.P.-bedingter Anämie. *Z Rheumatol* 54:50-55
30. Su SB, Mukaida N, Wang JB, Zhang Y, Takami A, Nakao S, Matsushima K (1997) Inhibition of Immature Erythroid Progenitor Cell Proliferation by Macrophage Inflammatory Protein-1 by Interacting Mainly With a C-C Chemokine Receptor, CCR1. *Blood* 90(2):605-611
31. Tanaka Y, Fujii K, Hübscher S, Aso M, Takazawa A, Saito K, Ota T, Eto S (1998) Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* 41(8):1365-1377
32. Tomasits J (2000) Laboruntersuchungen - Qualität statt Quantität. *A & P* 54(826):124-129
33. Voulgari PV, Kolios G, Papadopoulos GK, Katsaraki A, Seferiadis K, Drosos AA (1999) Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 92(2):153-160
34. Vreugdenhil G, Baltus CA, van Eijk HG, Swaak AJ (1990) Anaemia of chronic disease: diagnostic significance of erythrocyte and serological parameters in iron deficient rheumatoid arthritis patients. *Br J Rheumatol* 29(2):105-110
35. Weber J, Werre JM, Julius HW, Marx JJM (1988) Decreased iron absorption in patients with active rheumatoid arthritis, with and without iron deficiency. *Ann Rheum Dis* 47:404-409
36. World Health Organization (1968) Nutritional Anaemias: Report of a WHO Scientific Group. World Health Organization, Geneva, Switzerland
37. de Wynter EA, Durig J, Cross MA, Heyworth CM, Testa NG (1998) Differential response of CD34<sup>+</sup> cells isolated from cord blood and bone marrow to MIP-1 alpha and the expression of MIP-1 alpha receptors on these immature cells. *Stem Cells* 16(5):349-356
38. Zoli A, Altomonte L, Mirone L, Magaro M, Ricerca BM, Storti S, Candido A, Bizzi M (1994) Serum transferrin receptors in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 53(10):699-701