

**Aus der Klinik für Innere Medizin V,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar,
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals**

**Korrelation von Biomarkern und Lebensqualität bei
Bronchiolitis Obliterans Syndrom (BOS)
nach Lungentransplantation**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2019**

vorgelegt von Natascha Mohr geboren am 30.03.1994 in Kirchheimbolanden

Tag der Promotion: 17. Dezember 2019

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals, Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schäfers

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	2
II.	Verzeichnis der Abkürzungen.....	5
III.	Verzeichnis der Abbildungen	7
IV.	Zusammenfassung auf Englisch.....	8
V.	Zusammenfassung auf Deutsch	10
1.	Einleitung	12
1.1	Lungentransplantation	12
1.2	Abstoßungsreaktionen nach Lungentransplantation	13
1.2.1	Akute Abstoßungsreaktion	13
1.2.1.1	Akute zelluläre Abstoßungsreaktion, Acute Cellular Rejection (ACR)	13
1.2.1.2	Antikörper vermittelte Abstoßungsreaktion, Antibody Mediated Rejection (AMR)	14
1.2.2	Chronische Transplantatdysfunktion, Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD) ..	15
1.2.2.1	Bronchiolitis Obliterans Syndrom (BOS) und Azithromycin Responsive Allograft Dysfunction (ARAD).....	16
1.2.2.2	Restrictive Allograft Syndrom (RAS)	19
1.3	Biomarker	20
1.3.1	Definition Biomarker	20
1.3.2	Biomarker nach Lungentransplantation.....	20
1.3.2.1	Zelluläre Marker	21
1.3.2.2	Zytokine	21
1.3.2.3	Endothelin-1 (ET-1)	23
1.3.2.4	Matrix Metalloproteinasen (MMPs)	24
1.3.2.5	Hyaluronan (HA)	24
1.3.2.6	Defensine.....	25
1.3.2.7	Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1, auch YKL-40).....	25
1.3.2.8	MAC-inhibitory Protein (CD59)	26
1.3.2.9	Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)	26
1.3.2.10	microRNAs (miRNAs).....	27
1.3.2.11	POU Class 2 Associating Faktor 1 (POU2AF1), T-Cell Leukemia/Lymphoma Protein 1A (TCL1A) und B Cell Lymphocyte Kinase (BLK).....	27
1.3.2.12	Stickstoffmonoxid (NO).....	28

1.3.2.13	Lipopolysaccharid (LPS).....	28
1.4	SGQR, CAT und MRC.....	29
1.4.1	St. George's Respiratory Questionnaire (SGQR).....	29
1.4.2	COPD Assessment Test (CAT)	29
1.4.3	Medical Research Council (MRC)	30
2.	Fragestellung	31
3.	Material und Methodik	32
3.1	Patientenkollektiv, Studieneinschluss.....	32
3.2	Biomarker	32
3.2.1	Verarbeitung der Blutproben	32
3.2.2	Messverfahren	33
3.2.2.1	Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)	33
3.2.2.2	Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	34
3.2.2.3	Lipopolysaccharid (LPS).....	34
3.3.	SGQR, CAT und MRC.....	34
3.3.1	Ablauf bei Bearbeitung	34
3.4	Transplantatabstoßung.....	35
3.4.1	BOS Klassifikation nach der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)	35
3.4.2	BOS Klassifikation der Studienteilnehmer.....	36
3.5	Statistische Analyse.....	36
4.	Ergebnisse	38
4.1	Beschreibung des Patientenkollektivs	38
4.2	BOS Klassifikation der Studienteilnehmer.....	40
4.3	Auswertung von SGQR, CAT und MRC.....	41
4.3.1	Ergebnisse SGQR	41
4.3.2	Ergebnisse CAT.....	42
4.3.3	Ergebnisse MRC.....	42
4.3.2	Korrelation zwischen SGQR, CAT, MRC und der FEV1 in % des Solls	42
4.3.3	Die Patienten im BOS Stadium 3 erreichen die höchsten SGQR, CAT und MRC Scores.....	43
4.4	Biomarker	44
4.4.1	Messergebnisse.....	44

4.4.2	Die BOS positiven und BOS negativen Patienten weisen keine signifikanten Unterschiede in ihren IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS Konzentrationen auf	45
5.	Diskussion	46
6.	Danksagung	53
7.	Literaturverzeichnis	54

II. Verzeichnis der Abkürzungen

AATD	Alpha-1-Antitrypsin Deficiency, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel
ACR	Acute Cellular Rejection, akute zelluläre Abstoßungsreaktion
AGEs	Advanced Glycation End Products
AK	Antikörper
AMR	Antibody mediated rejection, Antikörper vermittelte Abstoßungsreaktion
ARAD	Azithromycin Responsive Allograft Dysfunction
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveolar Fluid
BLK	B Cell Lymphocyte Kinase
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BOS	Bronchiolitis Obliterans Syndrom
CAT	COPD Assessment Test
CCL5	Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted, RANTES
CD	Cluster of Differentiation
CF	Cystische Fibrose
CLAD	Chronic Lung Allograft Dysfunction, chronische Transplantatdysfunktion
CMV	Cytomegalievirus
COPD	Chronic obstructive pulmonary Disease, chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CXCL10	Interferon Gamma Induced Protein 10, IP-10
CXCL9	Monokine Induced By Gamma Interferon, MIG
DAD	Diffuse Alveolar Damage, Diffuser Alveolarschaden
DAMP	Damage-associated Molecular Pattern
DSA	Donor spezifischer Antikörper
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ECP	Extracorporale Photopherese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FEF	Forcierter expiratorischer Fluss
FeNO	Fraktioniertes exhaliertes Stickstoffmonoxid
FEV1	Forced Expiratory Pressure in 1 Second, Einsekundenkapazität
FVC	Forcierte expiratorische Vitalkapazität
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HA	Hyaluronan
HAS	HA Synthetase
HBD2	Human β -defensin 2
HLA	Histokompatibilitätsantigen
HMBG1	High-Mobility-Group-Protein B1
HMWHA	High-molecular-weight Hyaluronan
HNPs	Human Neutrophil Peptids
HR	Hazard Ratio
HRCT	High-resolution Computed Tomography, hochauflösende Computertomographie
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin

ILD	Interstitial Lung Disease, Interstitielle Lungenerkrankung
IPF	Idiopathische Pulmonalfibrose
ISHLT	International Society for Heart and Lung Transplantation
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
KI	Konfidenzintervall
LAL	Limulus Amöbozyten Lysat
LAS	Lungenallokations-Score
LB	Lymphozystische Bronchiolitis
LMWHA	Low-molecular-weight Hyaluronan
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Membranangriffskomplex
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1, CCL2
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
miRNA	microRNA
MMP	Matrix Metalloproteinase
MPO	Methoxypsoralen
MRC	Medical Research Council
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MSC	Mesenchymal Stromal Cell, Mesenchymale Stromazelle
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
MyD88	Myeloid Differentiation Protein 88
NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells
NRAD	Neutrophilic Reversible Allograft Dysfunction
OB	Obliterative Bronchiolitis
PAH	Pulmonal arterielle Hypertonie
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PE	Phycoerythrin
PGD	Primary Graft Dysfunction, Primäre Transplantatdysfunktion
POU2AF1	POU Class 2 Associating Faktor 1
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
PY	Pack Year
RAS	Restrictive Allograft Syndrom
rCLAD	restrictive Chronic Lung Allograft Dysfunction
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SGQR	St George's Respiratory Questionnaire
SMAD1	Sma-and Mad-related Protein 1
sRAGE	soluble Receptor for Advanced Glycation End Products
TBB	Transbronchiale Biopsie
TCL1A	T-cell Leukemia/Lymphoma Protein 1A
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TH	T-Helferzelle
THSB1	Thrombospondin 1
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TLC	Totale Lungenkapazität
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
T _{Reg}	Regulatorische T Zell
YKL-40	Chitinase-3-like Protein 1, CHI3L

III. Verzeichnis der Abbildungen

Grafiken:

Grafik 1	Grunderkrankungen der Studienteilnehmer
Grafik 2	BOS Stadien der Studienteilnehmer
Grafik 3	Korrelation zwischen SGQR Total Score und der FEV1 in % des Solls
Grafik 4	Korrelation zwischen SGQR Total Score und CAT
Grafik 5	SGQR Total Score Mittelwerte der Patienten in den BOS Stadien 0 bis 3

Tabellen:

Tabelle 1	BOS Klassifikation nach der ISHLT (2002)
Tabelle 2	Patientencharakteristika
Tabelle 3	Ergebnisse für SGQR, CAT und MRC
Tabelle 4	Messwerte für IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS

IV. Zusammenfassung auf Englisch

Introduction: Long term survival after lung transplantation is mainly limited by Chronic Lung Allograft Dysfunction. Within a period of five years half of the patients develop so-called Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS). The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) distinguishes between BOS stages from 0 to 3. Stages rise according to the degree of lung function decline. Different studies have already identified (predictive) biomarkers which are associated with (future) development of BOS. Based on clinical evidence patients at risk of developing BOS could be identified earlier and be treated with a specific therapy. The following study also deals with the question whether patients with reduced lung function show altered serum concentrations of Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) and Lipopolysaccharide (LPS). Furthermore the present study evaluates in how far St. George's Respiratory Questionnaire (SGQR), COPD Assessment Test (CAT) and Medical Research Council (MRC) depict the degree of lung function decline or the BOS stage respectively in their scores. For lung transplant patients SGQR, CAT and MRC have not been validated so far.

Methods: Between March 2015 and May 2017, 70 lung transplanted patients who were treated in the pulmonary outpatient clinic of the University Hospital in Homburg (Saar) took part in the study. Declarations of consent have been signed by all patients. Blood samples were taken on the day of study enrollment. After that the patients completed SGQR, CAT and MRC. In order to determine the concentration of LPS serum a photometric method was chosen. IL-6, IL-8, TNF- α and RAGE results were measured with the *Luminey Magpix Analyzer*. The BOS stage of each patient was evaluated twice – firstly at the time of enrollment and a second time in September 2017.

Results: At first, 35 patients (50%) were diagnosed for having developed BOS 0, 11 (15.7%), 14 (20.0%), 2 (2.9%) and 8 (11.4%) for the stages 0-p, 1, 2 and 3. In September 2017, after approximately 327 days, 27 patients were placed in BOS stage 0 (38.6%), 11 (15.7%) in stage 0-p, 16 (22.9%) in stage 1, 4 (5.7%) in stage 2 and 12 (17.1%) in stage 3. Neither at the time of enrollment nor after approximately 327 days were there statistically significant differences in IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE and LPS concentrations between the BOS positive and BOS negative groups. The

significance levels between the BOS stages and the reached scores were $p=0.002$ (SGQR), $p=0.033$ (CAT) and $p=0.026$ (MRC). Patients who had developed BOS stage 3 attained significant higher SGQR Total Scores than the patients in stage 0 ($p=0.008$), 0-p ($p=0.001$) and 1 ($p=0.025$). Besides, the patients in stage 3 achieved significantly higher CAT scores than the ones in stage 0 ($p=0.043$) and 0-p ($p=0.031$). Patients in stage 3 assessed the degree of their dyspnea significantly higher on the MRC scale than patients in stage 0 ($p=0.015$).

Conclusion: During the follow-up period further lung function decline or a shift towards higher BOS stages became apparent. BOS patients and the stable lung transplant recipient group do not have significant differences in their IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE and LPS serum concentrations. Patients who have developed BOS stage 3 achieved the highest SGQR, CAT and MRC scores. With regard to SGQR the post-hoc test documents the biggest differences between the groups.

V. Zusammenfassung auf Deutsch

Einleitung: Limitiert wird das Langzeitüberleben nach Lungentransplantation vor allem durch die chronische Transplantatdysfunktion (Chronic Lung Allograft Dysfunction, CLAD). Die Hälfte der Patienten entwickelt innerhalb von fünf Jahren das sogenannte Bronchiolitis Obliterans Syndrom (BOS). Die International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) unterscheidet die BOS Stadien 0 bis 3. Hierbei steigt das Stadium mit zunehmendem Ausmaß der Lungenfunktionseinschränkung an. Verschiedene Studien konnten bereits (prädiktive) Biomarker identifizieren, die mit dem (späteren) Auftreten von BOS assoziiert werden. Auf Basis deren Nachweises könnten Risikopatienten früher identifiziert und einer spezifischen Behandlung zugeführt werden. Auch die nachfolgende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob Patienten mit eingeschränkter Transplantatfunktion veränderte Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE) und Lipopolysaccharid (LPS) Serum Konzentrationen aufweisen. Weiterhin wird beurteilt, inwieweit das St. George's Respiratory Questionnaire (SGQR), der COPD Assessment Test (CAT) und die Medical Research Council (MRC) Dyspnoe Skala den Grad der Lungenfunktionseinschränkung bzw. das BOS Stadien in ihren Scores abbilden. Für Lungentransplantierte wurden SGQR, CAT und MRC bisweilen nicht validiert.

Methoden: Zwischen März 2015 und Mai 2017 nahmen 70 durch die pulmonologische Ambulanz der Universitätsmedizin Homburg (Saar) betreute lungentransplantierte Patienten an der Studie teil. Einwilligungserklärungen liegen für alle Patienten vor. Die Blutproben wurden den Teilnehmern am Tag des Studieneinschlusses entnommen. Danach bearbeiteten sie SGQR, CAT und MRC. Für die Bestimmung der LPS Serum Konzentration wählte man ein photometrisches Verfahren, die Messungen der IL-6, IL-8, TNF- α und RAGE Werte erfolgte mit Hilfe des *Luminex Magpix Analyzers*. Das BOS Stadium eines jeden Patienten wurde einmal zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und ein zweites Mal im September 2017 evaluiert.

Ergebnisse: Anfangs fielen 35 Patienten (50%) in die Kategorie BOS 0, 11 (15,7%), 14 (20,0%), 2 (2,9%) und 8 (11,4%) in die Stadien 0-p, 1, 2 und 3. Nach

durchschnittlich 327 Tagen befanden sich im September 2017 27 Teilnehmer im BOS Stadium 0 (38,6%), 11 (15,7%) im Stadium 0-p, 16 (22,9%) im Stadium 1, 4 (5,7%) im Stadium 2 und 12 (17,1%) im Stadium 3. Sowohl zum Zeitpunkt des Einschlusses als auch nach durchschnittlich 327 Tagen differierten die IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS Konzentrationen zwischen der BOS negativen und BOS positiven Gruppe nicht auf statistisch signifikantem Niveau. Die Signifikanzniveaus zwischen den BOS Stadien und den erreichten Scores liegen bei $p=0,002$ (SGQR), $p=0,033$ (CAT) und $p=0,026$ (MRC). Die dem BOS Stadium 3 zugeordneten Patienten erreichten signifikant höhere SGQR Total Scores als solche die Patienten in den Stadien 0 ($p=0,008$), 0-p ($p=0,001$) und 1 ($p=0,025$). Ferner erzielten die Patienten im Stadium 3 signifikant höhere CAT Scores als die den Stadien 0 ($p=0,043$) und 0-p ($p=0,031$) zugeordneten. Die Patienten im Stadium 3 schätzten den Grad ihrer Dyspnoe Symptomatik auf der MRC Skala signifikant höher ein als solche im Stadium 0 ($p=0,015$).

Schlussfolgerung: Während des Follow-ups zeichnet sich eine Verschlechterung der Lungenfunktion bzw. eine Verschiebung in Richtung der höheren BOS Stadien ab. Die BOS Patienten und die stabilen Transplantatempfänger weisen keine wesentlichen Unterschiede in ihren IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS Serum Konzentrationen auf. Insgesamt erreichten die Patienten im BOS Stadium 3 die höchsten SGQR, CAT und MRC Scores. Für das SGQR belegt der Post-hoc Test hier die stärksten Gruppenunterschiede.

1. Einleitung

1.1 Lungentransplantation

Für Patienten im Endstadium einer Lungenerkrankung stellt die am Menschen erstmals im Jahr 1963 von James Hardy vorgenommene Lungentransplantation [42] heute eine wichtige Therapieoption dar. 2015 wurden nach Angaben der ISHLT 4122 Lungentransplantationen unter Erwachsenen durchgeführt. An die ISHLT können Zentren Daten über durchgeführte Lungen-, Herz- bzw. Herzlungentransplantationen melden. Es wird geschätzt, dass 75% der weltweit durchgeführten Eingriffe erfasst sind [16].

Heute werden vorrangig bilaterale Lungentransplantationen durchgeführt, das Verhältnis unilateral zu bilateral beträgt aktuell ca. 1:4. Während die Zahl der einseitigen Transplantationen seit Jahren auf ähnlichem Niveau liegt, ist eine deutliche Zunahme der bilateralen Transplantationen zu verzeichnen. An die Anstiegsgeschwindigkeit vorheriger Jahrzehnte kann aktuell jedoch nicht angeknüpft werden [16].

Laut der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) nahm man in Deutschland im Jahr 2017 309 Lungentransplantationen vor, auf der Warteliste neu verzeichnet wurden hingegen 403 Patienten. Die Zuteilung von Spenderorganen an potenzielle Kandidaten auf der Warteliste erfolgt durch die Stiftung Eurotransplant. Eurotransplant orientiert sich dabei am 2011 in Deutschland eingeführten Lungenallokations-Score (LAS), wonach Dringlichkeit und Erfolgsaussichten ausschlaggebende Kriterien für die Empfänger Auswahl bilden [83]. Das früher wartezeitbasierte System mit Dringlichkeit wurde abgesetzt, wodurch ein Rückgang der Sterbefälle auf der Warteliste verzeichnet werden konnte [35].

Weltweit stellt die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Chronic obstructive pulmonary disease, COPD) mit 31% die häufigste Indikation zur Transplantation dar, gefolgt von den interstitiellen Lungenerkrankungen mit 30,3% (Interstitial Lung Disease, ILD). Auf Platz drei steht die Cystische Fibrose (CF, 15,6%). Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (Alpha-1-Antitrypsin-Deficiency, AATD) (5%), die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH; 4,4%) und Non-CF-Bronchiektasen (2,7%) schließen sich weiterhin an [16].

Unter allen Indikationen weisen die auf Grund der CF transplantierten Patienten die besten Langzeitüberlebensraten auf [16]. Von der Transplantation verspricht man sich für COPD Patienten insbesondere eine Verbesserung der Lebensqualität, bei Erkrankungen wie der CF, PAH oder der idiopatischen Pulmonalfibrose (IPF) zusätzlich eine Steigerung der Lebenserwartung [43].

Die mittlere Überlebenszeit nach Lungentransplantation wird für die Periode 1990 bis 2015 mit sechs Jahren angegeben. Dabei überlebten unilaterale transplantierte Patienten durchschnittlich kürzer als bilateral transplantierte (4,6 vs. 7,4 Jahre, $p < 0,0001$). Im Vergleich 1990 bis 1998 (72%) vs. 2009 bis 2015 (84%) konnte die 1-Jahres-Überlebensraten um 12% gesteigert werden. Deutliche Verbesserungen erzielte man auch hinsichtlich des Langzeitüberlebens, so wird die 5-Jahres Überlebensrate für die Jahre 2009 bis 2015 mit 57% (vs. 46% für 1990 bis 1998) aufgeführt [16].

1.2 Abstoßungsreaktionen nach Lungentransplantation

1.2.1 Akute Abstoßungsreaktion

1.2.1.1 Akute zelluläre Abstoßungsreaktion, Acute Cellular Rejection (ACR)

Innerhalb des ersten Jahres nach Lungentransplantation erfahren 28% der Patienten mindestens eine behandelte akute Abstoßungsreaktion [16].

Am häufigsten tritt die sogenannte akute zelluläre Abstoßungsreaktion (Acute cellular Rejection, ACR) auf, wo T Lymphozyten des Empfängers die fremden Histokompatibilitätsantigene (HLAs) des Spenders erkennen [72].

Klinisch stehen unspezifische Symptome wie Kurzatmigkeit, Husten (eventuell mit Sputum) und gegebenenfalls leichtes Fieber im Vordergrund. Als hinweisend, jedoch keinesfalls spezifisch, sollte ein FEV1 (Forciertes Expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) Abfall $\geq 10\%$ gewertet werden. Zu den Differentialdiagnosen zählt insbesondere die (opportunistische) Infektion, die Abgrenzung gestaltet sich mitunter als schwierig. Licht ins Dunkel kann die transbronchiale Biopsie (TBB) bringen, sie gilt als diagnostischer Goldstandard. Zum Erregernachweis kann eine zusätzliche bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt werden [6].

Histologisch wird die ACR anhand der ISHLT Klassifikation von 2007 eingeteilt [82]. Als kennzeichnend gelten mononukleäre Zell Infiltrate um kleine Gefäße bzw. Atemwege. Während dem A Grad perivaskuläre Infiltrate zugeordnet werden, steht

beim B Grad der Befall kleiner Atemwege im Vordergrund, alternativ kann hier der Begriff Lymphozytische Bronchiolitis (LB) benutzt werden. Unterteilt wird der A Grad in die Stufen A0 bis A4, per Definition steht A0 dabei für das Nichtvorhandensein einer akuten Abstoßung. A1 bzw. A2 hingegen werden der geringgradigen, A3 bzw. A4 der hochgradigen Abstoßung zugeordnet. Analog hierzu grenzt man bei der LB verschiedene Grade voneinander ab [72].

Etabliert in der ACR Behandlung hat sich die Steroidpulstherapie, nach dreitägiger intravenöser Gabe sollte das Steroid oral ausgeschlichen werden. Die Vorgehensweisen variieren hier jedoch von Zentrum zu Zentrum. Auch bezüglich der Behandlungsbedürftigkeit geringgradiger Abstoßungsreaktionen herrscht Uneinigkeit. Therapieerfolge können nach vier bis sechs Wochen anhand einer Follow-up Bronchoskopie evaluiert werden. Im Falle des Nachweises refraktärer bzw. wiederkehrender ACR sollte eine erneute Steroidgabe oder die Umstellung des immunsuppressiven Regimes erwogen werden (Benzimra et al., 2017).

1.2.1.2 Antikörper vermittelte Abstoßungsreaktion, Antibody Mediated Rejection (AMR)

Neben der zellulären erfährt die humorale Antwort auf die Gewebemerkmale des Spenders zunehmende Beachtung. Bei der Antikörper vermittelten Abstoßungsreaktion (Antibody mediated Rejection, AMR) produziert das Immunsystem des Empfängers Donor spezifische Antikörper (DSA) gegen die fremden HL Antigene des Spenders. Als Antwort auf eine vorherige Sensitivierung können die DSA alternativ präexistieren, in Frage käme hier etwa eine Geburt oder Bluttransfusion. Durch die Bindung des Antikörpers (AK) an das Antigen wird die Komplementkaskade nachfolgend aktiviert (Benzimra et al., 2017).

Äußern kann sich die AMR in Form eines (isolierten) Lungenfunktionsabfalls. Leiden können die Patienten weiterhin unter Dyspnoe, Fieber und Husten. Mitunter zeigt die Symptomatik eine rasche Progredienz [6].

Ein Schema zur AMR Klassifikation bietet der ISHLT Konsensusbericht aus dem Jahr 2016 [55]. Hiernach sollte die AMR zunächst als klinisch oder subklinisch kategorisiert werden. Per Definition geht der klinische Verlauf dabei mit einer Transplantatdysfunktion einher, der subklinische hingegen nicht. Als kennzeichnend für die Transplantatdysfunktion gelten u.a. radiologische Veränderungen. Verlaufen

kann die als klinisch eingestufte AMR sowohl symptomatisch als auch asymptomatisch. Zu den weiteren Diagnosekriterien, anhand derer die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer AMR weiterhin abgestuft wird, zählen der DSA Nachweis, die C4d Immunhistochemie im Hinblick auf eine etwaige Komplementaktivierung und der histopathologische Befund. Unter den (für die AMR als relativ unspezifische geltenden) histologischen Zeichen nennt die ISHLT dabei die Migration neutrophiler Granulozyten, Arteriitis und Kapillaritis. Anhand der Anzahl erfüllter Kriterien erhalten klinische bzw. subklinische AMR die Zusätze definitiv (3/3), wahrscheinlich (2/3) bzw. möglich (1/3) [55].

Randomisierte Studien zur AMR Therapie fehlen, eingesetzt werden heute vor allem intravenöse Immunglobuline (IVIG), die Plasmapherese, der anti-CD20 AK Rituximab und der Proteasom-Inhibitor Bortezomib. Dabei zielen die Therapeutika u.a. auf eine Reduktion der DSA (Benzimra et al., 2017) und der B Zell Zahl [72] ab. Die Behandlungserfolge sind jedoch häufig limitiert [55].

1.2.2 Chronische Transplantatdysfunktion, Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD)

Nicht immer verbessert sich die Lungenfunktion nach Transplantation so wie von Patienten und betreuenden Ärzten erhofft. Zum einen kann das Transplantat im Verlauf nach zunächst erfolgreicher Operation an Funktion einbüßen, zum anderen kann es seine volle Funktion erst gar nicht entfalten. In beiden Fällen spricht man von einer ‚chronischen Dysfunktion des Lungentransplantates‘ (CLAD, Chronic Lung Allograft Dysfunction) [92].

Als Diagnose Kriterium geben Verleden et al. den mindestens drei Wochen persistierenden FEV1 und/oder FVC (forcierte Vitalkapazität) Abfall $\leq 80\%$ von den besten postoperativ erreichten Werten an [92]. Äußern kann sich CLAD in Form eines obstruktiven (Bronchiolitis Obliterans Syndrom, BOS) oder restriktiven (Restrictive Allograft Syndrom, RAS bzw. restrictive Chronic Lung Allograft Dysfunction, rCLAD) Phänotyps [98].

Diagnostische Hilfestellungen zur Differenzierung der Phänotypen bieten die erweiterte Lungenfunktionsdiagnostik, das hochauflösenden Computertomogramm (high-resolution computed tomography, HRCT) des Thorax, die TBB und die BAL.

Den Lungenfunktionsverlust anderweitig erklärende Ursachen, wie die ACR und AMR, sollten in jedem Fall frühzeitig ausgeschlossen werden [92].

1.2.2.1 Bronchiolitis Obliterans Syndrom (BOS) und Azithromycin Responsive Allograft Dysfunction (ARAD)

Das in der Literatur auch als ‚Achillessehne der Lungentransplantation‘ [102] bezeichnete Bronchiolitis Obliterans Syndrom repräsentiert die am häufigsten auftretende CLAD Unterform. Innerhalb von fünf Jahren nach primärer Transplantation entwickeln 50% der Patienten BOS, nach zehn Jahren liegt die Rate bei 76% [106].

Als Risikofaktor für die BOS Entwicklung angesehen wird die ACR, als problematisch gelten insbesondere wiederkehrende sowie hochgradige Episoden [72]. Weiterhin aufgeführt werden der Nachweis Donor spezifischer Antikörper [73], der Nachweis gegen Selbstantigene gerichteter Antikörper [40], gastroösophagealer Reflux [19], die primäre Transplantatdysfunktion (Primary Graft Dysfunction, PDG) [21], verkehrsbedingte Luftverschmutzung [64] sowie die Kolonisation und Infektion der Atemwege. Probleme bereiten hier u.a. *Pseudomonaden*, *Aspergillen* und das Cytomegalievirus (CMV) [97].

Das histologische Korrelat zur Diagnose BOS bildet die obliterative Bronchiolitis (OB), die mit einer Obstruktion kleiner Atemwege einhergeht [63]. Klinisch imponiert die OB durch unproduktiven Husten und Belastungsdyspnoe. Die Symptomatik kann durchaus als unspezifisch bezeichnet werden [32].

Eingeteilt wird BOS nicht primär anhand der Histologie, transbronchial gewonnene Proben weisen häufig eine zu niedrige Sensitivität in der Diagnosestellung auf [23]. Hingegen orientiert sich die BOS Klassifikation der ISHLT [23] am Grad des FEV1 Abfalls, detaillierte Informationen hierzu folgen im Methodikteil. Ergänzend kann eine Bildgebung des Thorax durchgeführt werden. Für BOS Patienten CT-morphologisch beschrieben sind u.a. Bronchiektasen, Air Trapping und die Mosaikperfusion [53]. Die Röntgenaufnahme hingegen weist häufig keine Veränderungen auf [32].

Die frühere Annahme, BOS sei irreversibel, ist heute widerlegt. 2003 wurde in einer Pilotstudie erstmals beobachtet, dass BOS Patienten zum Teil auf Makrolide ansprechen. Bei fünf von sechs Patienten konnte nach mehrwöchiger oraler Azithromycin Gabe ein durchschnittlicher FEV1 Anstieg um 0,63 Liter dokumentiert

werden [33]. Mittlerweile ist die Azithromycin Gabe gängige Praxis. Es wird empfohlen, beim BOS verdächtigen FEV1 Abfall einen Therapie Versuch durchzuführen. Dabei wird das Ansprechen als FEV1 Anstieg $\geq 10\%$ nach zwei bis drei monatiger Behandlungsdauer definiert. Die Response Rate auf Azithromycin liegt bei circa 40% [92].

Bezeichnet wird dieser spezielle Phänotyp als Azithromycin Responsive Allograft Dysfunction (ARAD) oder Neutrophilic Reversible Allograft Dysfunction (NRAD) [98]. Zurückgeführt wird letzterer Begriff auf die prätherapeutisch nachweisbare (und mittels Azithromycin behandelbare) Neutrophilie in der BAL späterer Responder [90]. Der Zusammenhang zwischen Neutrophilie und Therapie Ansprechen konnte jedoch nicht in allen Folgestudien nachvollzogen werden [62]. Der oben erwähnte Azithromycin Therapieversuch sollte daher sowohl bei Patienten mit als auch bei solchen ohne Neutrophilie durchgeführt werden [92].

Bildmorphologisch unterscheiden sich Responder durch häufiger auftretende (und posttherapeutisch vielfach regrediente) zentrilobuläre Veränderungen von nicht Respondern [22]. Bezüglich der Überlegenheit einer gezielten Behandlung gegenüber einer Azithromycin Prophylaxe bzw. umgekehrt fehlen noch Belege (S. E. Verleden et al., 2017), [99]. Zudem kann die Langzeit Azithromycin Einnahme die spätere BOS Progredienz bei ca. einem Drittel der initialen Responder nicht verhindern [34].

Azithromycin wirkt vor allem antiinflammatorisch, auch positive Effekte auf gastroösophagealen Reflux werden diskutiert [88]. Die Azithromycin Gabe wird insgesamt gut toleriert [88], bei einem Teil der Patienten muss jedoch mit enterale Beschwerden, wie Übelkeit und Diarrhoe, gerechnet werden (Meyer et al., 2014). Obgleich BOS Patienten mit low-dose Azithromycin behandelt werden [92], sollte seine mögliche proarrhythmische Wirkung bedacht werden (Meyer et al., 2014). Eine Elektrokardiogramm (EKG) Anfertigung vor Behandlungsstart erweist sich daher als sinnvoll [93].

Die meisten Kliniken stellen ihre Patienten nicht routinemäßig auf Azithromycin ein (Gauthier et al., 2016). Generell werden Lungentransplantierte (lebenslang) mit einer Tripelkombination bestehend aus einem Calcineurininhibitor (Ciclosporin A oder Tacrolimus), Zellzyklusinhibitor (Azathioprin oder Mycophenolat-Mofetil) und Prednisolon behandelt [43]. Bei BOS Verdacht kann ein Switch der Immunsuppressiva erwogen werden, beispielsweise von Ciclosporin auf Tacrolimus

(Meyer et al., 2014) oder von Azathioprin auf Mycophenolat [93]. Alternativ werden heute die mechanistic Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitoren Sirolimus bzw. Everolimus eingesetzt (Gauthier et al., 2016). Einer Intensivierung der Immunsuppression werden insgesamt wenige Effekte zugeschrieben. Insbesondere von der prolongierten high-dose Cortison Gabe sollte abgesehen werden (Meyer et al., 2014). Darüber hinaus kann ein Behandlungsversuch mit dem Leukotrien Rezeptor Antagonisten Montelukast unternommen werden (S. E. Verleden et al., 2017). Bei fehlendem Therapie Ansprechen kommen weiterhin die Rituximab, IVIG, Antithymozytenglobulin und Alemtuzumab (anti-CD52 AK) Gabe in Frage [32].

Zum Schutz gegen opportunistische Erreger wie CMV oder *Pneumocystis jirovecii* kann ggf. eine Infektionsprophylaxe mit Valganciclovir (ggf. Aciclovir) bzw. Cotrimoxazol verordnet werden [43]. Falls vorhanden sollte auch die gastroösophageale Reflux Erkrankung behandelt werden [32].

Die in mehreren Zyklen vorgenommene Extrakorporale Photopherese (ECP) stellt eine zusätzliche Therapieoption für CLAD Patienten dar. Im Rahmen einer Sitzung werden mittels Apherese gewonnene weiße Blutzellen zunächst mit photoaktivem 8-Methoxypsoralen (8-MPO) versetzt. Als kleines Molekül dringt 8-MPO leicht in die Zellen bzw. ihre Kerne ein. Danach erfolgt eine Bestrahlung der Zellen mit UVA Licht, wodurch das Psoralen erst aktiviert wird. Anschließend werden die Zellen reinfundiert. Im aktiven Zustand bildet 8-MPO u.a. kovalente Bindungen mit der DNA [59]. Der genaue Wirkmechanismus der ECP ist noch nicht bis ins Detail geklärt. Es wird angenommen, dass die ECP u.a. die Produktion regulatorischer T Zellen anregt und dadurch die Immuntoleranz induziert [104].

Greer et al. werteten die Daten von 65 mit Hilfe der ECP behandelten Patienten aus. 64 der Patienten wiesen unter Azithromycin Gabe zuvor einen progredienten Lungenfunktionsabfall auf. Die mittlere Follow-up Zeit wird ab dem ECP Beginn mit durchschnittlich 506 Tagen angegeben. Bei acht Patienten stieg die FEV1 während des Zeitraums um $\geq 10\%$ an, bei 27 stabilisierten sich die Werte und bei 30 Patienten sank die FEV1 weiter ab. Patienten ohne Neutrophilie in der BAL sprachen dabei schlechter auf die ECP Therapie an als solche mit (HR 2,13; KI 0,86-5,31). Die Autoren schlussfolgern, dass die ECP eine sinnvolle Zweitlinientherapie für unter Azithromycin progrediente CLAD Patienten darstellt [36].

Pecoraro et al. geben die Überlebensrate für eine Gruppe aus 15 BOS Patienten, die einer ECP Therapie zugeführt wurden, mit $155,6 \pm 13,6$ Monate an. Die

Überlebensrate von 39 BOS Patienten ohne ECP Behandlung lag bei $113,8 \pm 14,5$ Monaten ($p=0,03$) (Pecoraro et al., 2017).

1.2.2.2 Restrictive Allograft Syndrom (RAS)

Vor der Einführung des Begriffs Restrictive Allograft Syndrom [77] wurden die Begriffe ‚chronische Abstoßung‘ und BOS häufig gleichgesetzt [78]. Heute hingegen untergliedert man den Oberbegriff CLAD in verschiedene Subkategorien, der RAS Phänotyp geht dabei charakteristischer Weise mit einer restriktive Ventilationsstörung und einer deutlich schlechteren Prognose verglichen mit BOS einher (Sato et al., 2011).

Unter CLAD Patienten tritt RAS mit einer Prävalenz von 25 bis 35% auf, die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt sechs bis 18 Monate (vs. drei bis fünf Jahre bei BOS Patienten) (S. E. Verleden et al., 2017). Die durchgemachte ACR, Infektionen der Atemwege und die Kolonisation mit *P. aeruginosa* stellen sowohl Risikofaktoren für die spätere BOS als auch RAS Entwicklung dar [94]. Die Eosinophilie in der BAL wird zuweilen stärker mit der RAS Genese in Verbindung gebracht [95].

Diagnostiziert werden sollten BOS und RAS erst, wenn die FEV1 nachweislich über mindestens drei Wochen $<80\%$ der Baseline beträgt [77]. Die Baseline stellt dabei den Mittelwert aus den beiden besten mindestens drei Wochen auseinanderliegenden postoperativen FEV1 Werten dar. Die Restriktion machen Sato et al. an der reduzierten totalen Lungenkapazität (TLC) fest, gewertet wird hier ein Abfall $<90\%$ der Baseline. Zur Berechnung der Baseline mittelt man die zur selben Zeit mit den beiden besten FEV1 Werten erhaltenen TLC Werte. Angewandt werden sollte dieses Prinzip insbesondere für bilateral transplantierte Patienten, wo die Lungenfunktionsmessung nicht durch die native Lunge beeinflusst wird [77].

Andere Autoren beurteilen die Restriktion (zusätzlich) anhand der FVC sowie auf Basis des Tiffenau-Index ($FEV1/FVC \times 100$). Im Sinne einer restriktiven Ventilationsstörung fiele erstere ab, der Tiffenau-Index hingegen bliebe gleich oder stiege an [98], [92], [91]. Eine offizielle RAS Klassifikation existierte zurzeit noch nicht.

Ergänzend kann eine Bildgebung des Thorax durchgeführt werden [84]. Bildmorphologisch für RAS Patienten beschrieben sind u.a. (im Vergleich zu BOS Patienten mitunter stärker ausgeprägte) Milchglastrübungen (ground-glass opacities)

und eine Oberlappen dominante Fibrose (upper lobe-dominant fibrosis) (Sato et al., 2011). Weiterhin genannt werden (sub)pleurale Verdickungen [100]. Als histologisch kennzeichnend für RAS gelten der diffuse Alveolarschaden (Diffuse Alveolar Damage, DAD) (Sato et al., 2011) und die (nachfolgende) pleuroparenchymale Fibroelastose [66]. OB Läsionen kommen ebenfalls vor (Sato et al., 2011). In der Literatur sind ferner Übergänge von BOS zu RAS bzw. umgekehrt beschrieben (G. M. Verleden, Raghu, et al., 2014).

Die genauen Mechanismen der RAS Entstehung ist noch nicht geklärt, Gemeinsamkeiten mit der IPF Genese werden angenommen [100]. In einem Case Report berichten Vos et al. über den Einsatz von Pirfenidon zur RAS Behandlung. Ansonsten wird das Antifibrotikum im Rahmen der IPF Behandlung genutzt (Vos et al., 2013). Ebenfalls eingesetzt werden Tyrosinkinaseinhibitoren wie Nintedanib oder Alemtuzumab (S. E. Verleden et al., 2017). Insgesamt gestaltet sich die Therapie jedoch häufig als schwierig, sodass die Retransplantation die ggf. letzte Therapieoption darstellt. Allerdings überleben die auf Grund von RAS retransplantierten Patienten durchschnittlich kürzer als die infolge von BOS retransplantierten (S. E. Verleden et al., 2017).

1.3 Biomarker

1.3.1 Definition Biomarker

Unter einem Biomarker versteht man ein objektiv messbares Merkmal, dessen Nutzen in seiner Indikatorfunktion liegt. Der Biomarker zeigt u.a. an, in wieweit biologische Prozesse als normal bzw. pathogen gewertet werden können. Aussagen lassen sich u.a. auf diagnostischer, prädiktiver bzw. prognostischer Ebene treffen [2].

1.3.2 Biomarker nach Lungentransplantation

Im Kontext Lungentransplantation wird nach Biomarkern gesucht, die Prozesse wie die akute Abstoßungsreaktion oder CLAD anzeigen könnten. Unter Zuhilfenahme solcher Marker ließe sich die akute Abstoßungsreaktion leichter gegenüber Differentialdiagnosen wie der opportunistischen Infektion abgrenzen. Auf Grundlage BOS, NRAD oder RAS assoziierter Marker könnte man die CLAD Typen besser voneinander unterscheiden. Weiterhin böte sich die Möglichkeit, Risikopatienten

anhand prädiktiver Marker früher zu identifizieren und ggf. einer zeitnahen Therapie zuzuführen. Soweit der Ausblick, nachfolgend soll es insbesondere um Biomarker im Zusammenhang mit BOS gehen.

1.3.2.1 Zelluläre Marker

In verschiedenen Studien wurde die im Rahmen der Bronchoalveolären Lavage gewonnene Spülflüssigkeit (Bronchoalveolar Lavage Fluid, BALF) auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Kennedy et al. bezogen 38 Studien in ihr Review ein, die sich thematisch mit dem Nachweis Neutrophiler Granulozyten in der BALF von BOS Patienten auseinandersetzten. In 36 davon erwies sich deren Zell Zahl als erhöht [52]. Einige Autoren gehen noch weiter, indem sie die Neutrophilie als Prädiktor für die zukünftige BOS Entwicklung werten [52]. Darüber hinaus wird eine erhöhte Zahl an Mesenchymalen Stromazellen (Mesenchymal Stromal Cells, MSCs) mit der zukünftigen BOS Entstehung assoziiert [3]. Experimentell imponierten von BOS Patienten isolierte MSCs durch ihren profibrotischen Phänotyp [101] [52]. Dahingegen weisen BOS Patienten tendenziell einen reduzierten Gehalt an regulatorischen T Zellen (T_{Reg}) in der BALF auf [52]. Funktionell trägt die T Zell Subpopulation u.a. zur Erhaltung der Immuntoleranz bei [97].

1.3.2.2 Zytokine

Neben zellulären Bestandteilen enthält die Spülflüssigkeit zahlreiche Zytokine, darunter das proinflammatorisch wirkende Interleukin-8 (IL-8). Nach Stimulation durch IL-1 α , IL-1 β , IL-17, TNF- α oder Toll-like Rezeptoren (TLRs) wird IL-8 u.a. von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Endothel- und Epithelzellen sezerniert. Zu den wichtigsten Aufgaben zählen Chemotaxis sowie die Aktivierung Neutrophiler Granulozyten [1]. In 18 der 20 durch Kennedy et al. analysierten Studien wiesen die BOS Patienten eine erhöhte IL-8 Konzentration auf [52]. Dabei scheint eine positive Korrelation zwischen der IL-8 Konzentration und der Zahl an Neutrophilen Granulozyten in der BALF zu bestehen [52]. Steigende IL-8 Werte gehen der klinischen Diagnose BOS dabei um bis zu ein Jahr voraus [52]. Dementsprechend wird der IL-8 Nachweis als prädiktiver Marker für die spätere BOS Entwicklung gewertet [7].

Hinsichtlich des IL-6 gestaltet sich die Studienlage insgesamt weniger eindeutig [52]. Vanaudenaerde et al. wiesen in der BALF von BOS Patienten erhöhte IL-6, IL-1 β , und IL-23 Konzentrationen sowie einen reduzierten Gehalt an IL-2 nach. Während erstere genannte die Differenzierung sogenannter TH17-Zellen aus naiven T-Helferzellen (TH-Zellen) fördern, hemmt IL-2 diese. TH17-Zellen produzieren IL-17, welches die IL-8 Produktion induziert. IL-8 wiederum wirkt chemotaktisch auf Neutrophile Granulozyten [89]. In der Studie von Berastegui et al. differierte die IL-6 Konzentration zwischen den BOS Patienten und den stabilen Empfängern hingegen nicht auf statistisch signifikantem Niveau [8]. Weiterhin diskutiert wird, welchen Einfluss der Polymorphismen des IL-6 Gens auf die BOS Genese nimmt. Bestimmte Variationen werden hier mit einer früheren BOS Entwicklung assoziiert [41].

Neben den Interleukinen zählen die CC Chemokine, darunter MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1, auch CCL2 genannt) zur Zytokin Gruppe [52]. MCP-1 wirkt stark chemotaktisch auf mononukleäre Zellen, die Interaktion erfolgt hier über den CCR2 Rezeptor. Beteiligung findet das Signalprotein vor allem im Rahmen chronisch entzündlicher Prozesse und fibroproliferativer Erkrankungen. Experimentell unterzogen Belperio et al. CCR2^{-/-} sowie CCR2^{+/+} Mäuse einer heterotopen Trachea Transplantation. Nach der Transplantation entwickelten die CCR2^{-/-} Tiere (vs. CCR2^{+/+}) BOS in abgeschwächter Form. Die Autoren schlussfolgern, dass die Interaktion zwischen MCP-1 und CCR2 eine wichtige Rolle in der Pathogenese des BOS einnimmt. Durch die Interaktion vermittelt würde insbesondere die Bildung persistierender peribronchialer mononukleärer Zellinfiltrate. Als mögliches zukünftiges Therapieziel verweisen Belperio et al. daher auf den MCP-1/CCR2 Signalweg [5]. Kennedy et al. werteten sechs Studien aus, in denen die MCP-1 Konzentration in der BALF von BOS Patienten bestimmt wurde. Erhöhte MCP-1 Werte wurden in allen sechs nachgewiesen [52].

Ebenso werden CCL5 (Regulated Upon Activation Normal T-Cell Expressed and Secreted, RANTES), CXCL9 (Monokine Induced By Gamma Interferon, MIG), CXCL10 (Interferon Gamma Induced Protein 10, IP-10) [52] sowie die Produktion der letzteren beiden Chemokine induzierende Interferon- γ (IFN- γ) [7] mit der BOS Genese in Verbindung gebracht. Neujahr et al. setzten sich mit einigen dieser Marker auseinander. Dabei kamen sie zum Schluss, dass BOS gefährdete Patienten prospektiv anhand erhöhter CXCL9 sowie CXCL10 Werte identifiziert werden könnten [65].

Daneben rechnet man Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und TNF- α zur Zytokin Familie. Experimentell wurden von stabilen Transplantat Empfängern isolierte bronchiale Epithelzellen (PBECS) in Kultur angelegt und mit TGF- β und TNF- α , ausschließlich mit TNF- α bzw. TNF- β oder gar nicht (Kontrolle) behandelt [11]. Zu den typischen epithelialen Markern der die Lunge auskleidenden Zellen zählen Zytokeratin und E-Cadherin. Der epitheliale Phänotyp kann sich jedoch dem einer mesenchymalen Zelle angleichen (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) [12]. Die mit TGF- β und in höherem Maße die mit TGF- β + TNF- α behandelten Zellen durchliefen ebendiese Veränderung, was sich in der vermehrten Expression der mesenchymalen Marker Vimentin und Fibronectin sowie der Produktion sogenannter Matrix Metalloproteinasen (MMPs), in diesem Fall MMP-9, äußerte. Die Kontrolle und die ausschließlich mit TNF- α behandelten Zellen hingegen wiesen weiterhin einen epithelialen Phänotyp auf. Ebenso exprimierten die von BOS Patienten gewonnenen Gewebeproben (vs. stabile Transplantat Empfänger und Kontroll Gruppe) E-Cadherin signifikant vermindert sowie Vimentin signifikant vermehrt. Die Autoren schlussfolgern, dass das TGF- β vermittelte Atemwegs Remodeling zur OB Entwicklung beitragen könnte [11].

Jonigk et al. analysierten von CLAD Patienten und stabilen Empfängern isolierte TBBs auf die Expression 45 verschiedener Gene hin. Die den TGF- β Signalweg regulierenden Gene, darunter IL-6, MMP-1, Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4), Sma-and Mad-related Protein 1 (SMAD1) und Thrombospondin 1 (THBS1) waren in den Gewebeproben der CLAD Patienten signifikant überexprimiert [51]. In der BALF von BOS Patienten maßen Borthwick et al. erhöhte TGF- β [12], Fisichella et al. erhöhte TNF- α Werte [26].

1.3.2.3 Endothelin-1 (ET-1)

Verwiesen wird zudem auf das durch Alveolarmakrophagen, Endothelien sowie Atemwegsepithelien produzierte [24] Peptidhormon Endothelin-1 (ET-1). Neben inflammatorischen schreibt man ET-1 vor allem vasoaktive Eigenschaften zu. Beteiligung findet ET-1 im Rahmen zahlreicher Lungenerkrankungen, darunter die pulmonal vaskulären und parenchymalen [24]. Im Serum von BOS Patienten (vs. stabile Empfänger) wiesen Salama et al. 3 und 12 Monate nach Transplantation signifikant erhöhte ET-1 Gehälter nach, in transbronchial gewonnenen Biopsien eine signifikant gesteigerte ET-1 messenger RNA (mRNA) Expression. Die ET-1 Serum

Konzentration korrelierte hierbei mit der Frequenz vorangegangener akuter Abstoßungsreaktionen und dem ET-1 Gehalt in der BAL. Auch in den vor Transplantation entnommenen Serumproben späterer BOS Patienten (vs. stabile Empfänger) waren die ET-1 Werte signifikant erhöhte. In ET-1 sehen die Autoren daher einen Biomarker mit prädiktiver Aussagekraft [76].

1.3.2.4 Matrix Metalloproteinasen (MMPs)

Diskutiert wird auch die Rolle der MMPs. Funktionell tragen die Zink haltigen Enzyme [52] zur Aktivierung von Defensinen bei. Daneben degradieren sie die Extrazelluläre Matrix (EZM) [44]. In der Lunge werden diverse Strukturproteine, darunter Kollagen und Elastin, durch MMPs abgebaut. Auf diesem Weg beeinflussen die Enzyme die Zusammensetzung der EZM [71]. BOS Patienten fielen in zahlreichen Studien durch eine verstärkte MMPs Expression auf [44]. In der BALF korrelierte die MMP Konzentration mit dem Gehalt an Neutrophilen. Letztere vermögen hierbei MMPs in ihren Granula zu speichern und freizusetzen [44]. Gehemmt wird die Aktivität der MMPs durch sogenannte Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen (TIMPs), bezüglich der TIMPs gestaltet sich die Studienlage jedoch weniger eindeutig als im Falle der MMPs [52].

1.3.2.5 Hyaluronan (HA)

Hyaluronan (HA) zählt zu den Bestandteilen der EZM, unter homöostatischen Bedingungen liegt HA in seiner hochmolekularen Form vor. Im Gegensatz zur niedermolekularen Form schwächt das High-molecular-weight Polymer (HMWHA) proinflammatorische Prozesse ab. Low-molecular-weight HA (LMWHA) hingegen entsteht im Rahmen der endogenen Gewebeschädigung. Als Damage-associated molecular Pattern (DAMP) interagiert es mit TLRs und aktiviert auf diesem Weg die angeborene Immunantwort. Das Myeloid Differentiation Protein 88 (MyD88) dient dem TLR dabei als Adaptor Molekül. Experimentell unterzogen Todd et al. Wildtyp, TLR2-/-TLR4-/- sowie MyD88-/- Mäuse einer orthotopen Lungentransplantation, anschließend verabreichten sie den Tieren LMWHA. Sechs Tage nach der letzten HA Gabe erfolgte eine histologische Aufarbeitung der Transplantate. In denen der TLR bzw. MyD88 defizienten Mäuse (vs. Wildtyp) fand man hierbei weniger Hinweise auf eine ablaufende zelluläre Abstoßungsreaktion. Zudem enthielt die BALF der

Wildtyp Mäuse vermehrt Neutrophile Granulozyten sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [87].

Deutlich erhöhte HA Konzentrationen wiesen Todd et al. im Serum und der BALF von BOS Patienten nach. In den Gewebeproben der BOS Patienten (vs. stabile Empfänger) war die mRNA Expression der HA Synthetasen 1 und 3 signifikant verstärkt. Insgesamt schlussfolgern die Autoren, dass HA über die Aktivierung der angeborenen Immunantwort zur BOS Entstehung beiträgt [87].

1.3.2.6 Defensine

Weiterhin zählen die durch Neutrophile Granulozyten und Epithelien sezernierten Defensine zu den Mediatoren der angeborenen Immunantwort [52]. Sowohl in der BALF als auch im Serum von BOS Patienten (vs. stabile Empfänger) maßen Tiriveedhi et al. erhöhte α -Defensin (Human Neutrophil Peptids, HNPs) und β -Defensin 2 (Human β -defensin 2, HBD2) Konzentrationen. AAT (α -1-Antitrypsin) kontrolliert die Defensin Funktion, indem es HNPs bindet und ihre inflammatorische Wirkung somit abschwächt. Unter BOS Patienten erwies sich die AAT-HNP Komplex Konzentration in der BALF als erhöht, die an frei zirkulierendem AAT gleichzeitig erniedrigt. Experimentell stimulierten Tiriveedhi et al. in Kultur befindliche Atemwegsepithelien (Primary Small Airway Epithelial Cells, SAECS) durch α -Defensin Zugabe zur HBD2 Produktion und vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine sowie profibrotischer Wachstumsfaktoren. Letzterer wiederum regen Epithelien zur Proliferation und zu Umbauprozessen an. Die Autoren schlussfolgern, dass Defensine die BOS Entstehung über die chronische Stimulation des Epithels fördern [85].

1.3.2.7 Chitinase-3-like Protein 1 (CHI3L1, auch YKL-40)

Im Kontext BOS genannt wird auch das durch Epithelien und Neutrophile Granulozyten sezernierte YKL-40. Funktionell stimuliert das Protein u.a. Alveolarmakrophagen und Fibroblasten zur Sekretion von IL-8, MCP-1 und MMP-9. In den Seren der den BOS Stadien 1 bis 3 zugeordneten Patienten (vs. BOS 0 und vs. gesunde Kontrollgruppe) wiesen Jaksch et al. sowohl unmittelbar vor als auch nach Lungentransplantation signifikant erhöhte YKL-40 Konzentrationen nach. Explizit beziffern die Autoren den YKL-40 Cut off Wert, anhand dessen zukünftige

BOS Patienten bereits vor Transplantation identifiziert werden könnten, auf 109 ng/ml. Sensitivität und Spezifität liegen hierfür bei 85 bzw. 82% [47]. Hohe YKL-40 Serum und BALF Konzentrationen werden darüber hinaus mit einem ungünstigen Verlauf der IPF assoziiert [54].

1.3.2.8 MAC-inhibitory Protein (CD59)

Als Regulatorprotein inhibiert CD59 die Bildung des Membranangriffkomplexes (MAC) und somit die Komplement vermittelte Lyse. Verschiedene Prozesse (diskutiert werden u.a. Zellschädigung und Aktivierung) fördern die Lösung des Proteins von seiner Zelloberfläche. Das gelöste CD59 (soluble CD59, sCD59) zirkuliert frei in Körperflüssigkeiten. Im Serum von BOS Patienten (vs. nicht BOS Patienten) wiesen Budding et al. bei Diagnosestellung eine signifikant erhöhte sCD59 Konzentration nach. Zudem wurde die sCD59 Konzentration derselben Kohorte sechs Monate nach Transplantation analysiert. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Patienten allerdings noch keine BOS typische Symptomatik. Auch hier war der sCD59 Wert der späteren BOS Patienten signifikant erhöht. Nach den Angaben der Autoren reduziert ein sCD59 Wert >400 pg/ml sechs Monate nach Transplantation die Wahrscheinlichkeit auf ein BOS freies Überleben auf 32% (vs. 80% bei einem Wert <400 pg/ml). Budding et al. gehen davon aus, dass die mit der BOS Genese einhergehende chronische Entzündungsreaktion zur verstärkten zellulären CD59 Expression führt. Die Hochregulierung diene dem Schutz vor einer überschießenden Komplementaktivierung. Die Funktionalität des vermehrt exprimierten CD59 scheint allerdings reduziert zu sein. CD59 wiederum löst sich von seiner Zelloberfläche und ist vermehrt im Plasma nachweisbar [13].

1.3.2.9 Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)

Eine Vielzahl an Zellen, darunter epitheliale [80], endotheliale, mononukleäre und neuronale [56], exprimieren RAGE. Vorliegen kann das der Immunglobulin-Superfamilie angehörende Molekül in membrangebundener oder löslicher Form (sRAGE) [37]. Zu den Liganden des RAGE zählen Advanced Glycation End Products (AGEs), S100 Proteine, High Mobility Group Protein Box-1 (HMGB1), Amyloid β [29] und LPS [37]. Ihre Bindung an den Transmembranrezeptor setzt diverse Signalkaskaden in Gang, wodurch Transkriptionsfaktoren wie Nuclear Factor κ -

light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B) aktiviert werden. NF- κ B wiederum fördert die Expression proinflammatorischer Zytokine. Bei sRAGE handelt es sich hingegen um einen Decoy-Rezeptor. Diese speziellen Rezeptoren binden zwar die genannten Liganden, die nachfolgende Signalkaskade wird allerdings nicht eingeleitet [37].

Christie et al. wiesen im Plasma von PGD Patienten (vs. nicht PGD Patienten) sechs und 24 Stunden nach Transplantation signifikant erhöhte sRAGE Werte nach [17].

Dabei gilt die PGD als Risikofaktor für die BOS Entwicklung [21]. Innerhalb von 72 Stunden nach Organ Reperfusion entwickeln 30% der lungentransplantierten Patienten eine PGD, als kennzeichnend gelten bilaterale pulmonale Infiltrate. Beurteilt wird der Schweregrad der PGD auf Basis des Oxygenierungsindex ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) [81]. Pathogenetisch könnte die PGD überschießende epitheliale Reparatur Mechanismen triggern. Diese frühe Epithelschädigung wiederum trüge zur BOS Entstehung bei [80].

1.3.2.10 microRNAs (miRNAs)

Budding et al. wiesen im Serum von BOS Patienten (vs. nicht BOS Patienten) signifikant erhöhte microRNA (miRNA) Konzentrationen nach. Erhöht waren die miRNA Werte dabei bereits vor der klinischen Diagnosestellung. Auch das Serum der COPD und IPF Patienten enthielt signifikant höhere miRNA Konzentrationen als das der gesunden Kontroll Gruppe. Funktionell hemmen miRNAs u.a. die Genexpression, indem sie an die 3'-untranslatierte (3'UTR) Region der mRNA binden. Nach der Meinung der Autoren treten erhöhte miRNA Werte insbesondere im Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Prozessen auf, wie sie BOS, IPF und COPD Patienten aufweisen [14].

1.3.2.11 POU Class 2 Associating Faktor 1 (POU2AF1), T-Cell Leukemia/Lymphoma Protein 1A (TCL1A) und B Cell Lymphocyte Kinase (BLK)

Danger et al. führten eine breit angelegte Genexpressionsanalyse unter Lungentransplantierten durch. Hierbei gelang es den Autoren, BOS Patienten mehr als sechs Monate vor der klinischen Diagnose anhand veränderter POU Class 2 Associating Faktor 1 (POU2AF1), T-Cell Leukemia/Lymphoma Protein 1A (TCL1A)

und B Cell Lymphocyte Kinase (BLK) Expressionsmuster im Blut zu erkennen. BLK reguliert als Src Tyrosinkinase die Aktivität des B Zell Rezeptors. POU2AF1 und TCL1A steuern die Funktion von T und B Zellen. In den Blutproben im Endstadium chronischer Lungenerkrankungen (darunter die CF, IPF und PH) befindlicher Patienten erwies sich die Expression der drei Gene ebenfalls als dysreguliert [20].

1.3.2.12 Stickstoffmonoxid (NO)

Diskutiert wird auch der Nutzen der Stickstoffmonoxid (NO) Messung. In der Ausatemluft von BOS Patienten (vs. stabile Empfänger) wiesen Cameli et al. erhöhte NO Werte (exhaled NO, eNO) nach [15]. Produziert wird NO in der Lunge durch NO Synthetasen (NOS) auf die Stimulation mit proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-1 hin. In der Ausatemluft von Asthma und Bronchiektase Patienten wurden ebenfalls erhöhte NO Werte gemessen. Zurückgeführt werden die erhöhten NO Werte auf in der Lunge ablaufende chronisch entzündliche Prozesse, wie sie Asthma, Bronchiektase und BOS Patienten aufweisen [30]. Funktionell bewirkt NO in der Lunge u.a. eine Vaso- und Bronchodilatation [15]. Maselli et al. hingegen sehen keinen Zusammenhang zwischen der NO Konzentration und der Transplantatfunktion [60].

1.3.2.13 Lipopolysaccharid (LPS)

Exprimiert wird LPS auf der Zellmembran gramnegativer Bakterien, strukturell besteht das Molekül aus drei verschiedenen Teilen: Einer hydrophoben A Lipid Domäne, einem Core-Oligosaccharid und dem O-Antigen aus repetitiven Polysacchariden. Vom A Lipid, das LPS in der Zellmembran verankert, geht die endotoxische Wirkung auf den menschlichen Körper aus. Das Immunsystem aktiviert LPS u.a. über die Interaktion mit TLR4, was zur Freisetzung zahlreicher Entzündungsmediatoren (wie TNF- α und IL1- β) führt. Eine zentrale Rolle nimmt LPS ferner in der Pathogenese des septischen Schocks ein [70], [69].

1.4 SGQR, CAT und MRC

1.4.1 St. George's Respiratory Questionnaire (SGQR)

Das SGQR [48] erfasst durch chronische Atemwegserkrankungen verschuldete Einschränkungen der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Die deutsche Version des Fragebogens besteht aus 50 unterschiedlich stark gewichteten Items, die der Patient möglichst eigenständig beantworten sollte. Die Bearbeitungszeit liegt bei zehn bis fünfzehn Minuten. Untergliedert wird das SGQR in die drei Subskalen ‚Krankheitssymptome‘, ‚Aktivität‘ und ‚Belastung‘. Die Subskala ‚Krankheitssymptome‘ präzisiert den Schweregrad der klinischen Symptomatik. Abgefragt wird u.a. die Frequenz, mit der Husten und Dyspnoe auftreten. Der Aktivitäten Teil erfasst den Umfang, in dem die Atemwegsbeschwerden den/die Patienten(in) in der Bewältigung physischer Aktivitäten (darunter Hausarbeit und Anziehen) beeinträchtigen. Im Belastungsteil geht es um den Umgang mit der Krankheit und das Erleben von Einschränkungen, sei es auf beruflicher, persönlicher oder sozialer Ebene. Die Auswertung sieht die Berechnung separater Scores für die Subskalen sowie die Ermittlung eines sogenannten Total Scores vor. Letzterer fasst alle Items zusammen. Annehmen können die Scores Werte von 0 bis 100. Hierbei gilt je höherer der Wert, desto ausgeprägter die Beeinträchtigung [45].

Ursprünglich für Asthma und COPD Patienten entwickelt [48], erfuhr das SGQR im weiteren Verlauf eine immer breitere Anwendung, beispielsweise bei Bronchiektasen [103]. Spezifische Unterformen mit zum Original äquivalenten Scores wurden entwickelt, darunter das SGQR-C für die COPD [61] oder das SGQR-I für die IPF [105]. Jones et al. validierten das SGQR unter Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen. Die gewonnen Ergebnisse befanden sie als sensitiv und reproduzierbar [49].

1.4.2 COPD Assessment Test (CAT)

Das SGQR umfasst eine Vielzahl an Items, sowohl die Bearbeitung als auch Auswertung kosten Zeit. Aus dieser Situation heraus entstand die Idee, ein kürzeres im klinischen Alltag einfacher handhabbares Tool zu kreieren. Jones et al. entwickelten daher den speziell auf COPD Patienten zugeschnittenen CAT [50]. Der CAT setzt sich aus acht Items zusammen, für die jeweils null bis fünf Punkte

vergeben werden können. Erfragt wird beispielsweise, inwieweit der/die Patient(in) beim Treppensteigen in Atemnot gerät. Ein beschwerdefreier Patient würde hier null Punkte vergeben, ein stark kurzatmiger eher vier oder fünf. Maximal erreicht werden können 40 Punkte. Somit gilt: Je höher der Wert, desto ausgeprägter die Symptomatik.

Die Korrelation zwischen CAT und SGQR-C geben Jones et al. für stabile COPD Patienten mit $r=0,8$ und für akut exazerbierte mit $r=0,78$ an (P. W. Jones et al., 2009). Mehrfach belegt wurden zudem die Reliabilität und Validität des CATs [38].

1.4.3 Medical Research Council (MRC)

Ein erster Vorläufer der MRC Skala wurde bereits 1952 veröffentlicht [27], die überarbeitete Version dann im Jahr 1959 [28]. Die MRC Skala stuft ein, inwieweit der/die Patienten(in) Atemnot bedingt in der Bewältigung alltäglicher Aktivitäten einschränkt ist. Aufgeführt sind fünf Grade, zwischen denen gewählt werden kann. Der erste Grad besagt, dass der Patient nur bei starker Anstrengung in Atemnot gerät. Grad 5 hingegen beschreibt eine Situation, in der der/die Patient(in) das Haus auf Grund von Kurzatmigkeit nicht mehr verlassen könnte. Dadurch, dass die Aussagen verständlich gestaltet ist, bedarf die MRC Skala keiner langen Bearbeitungszeit und ist im klinischen Alltag einfach handhabbar. Neben der MRC Skala existiert eine modifizierte Form, die sogenannte mMRC Skala. Die Grade der mMRC Skala reichen von 0 bis 4, die Antwortmöglichkeiten ähneln denen der MRC Skala. Bereits 1999 schlussfolgerten Bestall et al., dass die MRC Skala das Ausmaß, in dem COPD Patienten durch ihre Krankheit beeinträchtigt sind, zu erfassen vermag [9]. Ein weiterer Vorteil der MRC Skala liegt im hohen Übereinstimmungsgrad, mit dem Patienten untersucherunabhängig konstante Ergebnisse erreichen. Für zwei verschiedene Interviewer geben Mahler et Wells diesen mit 98% an. Zum Studienkollektiv zählten neben COPD auch ILD, Asthma und CF Patienten [57]. Manali et al. setzten die MRC Skala unter IPF Patienten ein, die Korrelation zwischen dem erreichten MRC Grad und der zurückgelegten Distanz im Sechs-Minuten-Gehtest führen sie mit $r=-0,781$ ($p<0,001$) auf [58].

2. Fragestellung

Während einige Patienten nach Lungentransplantation über Jahre hinweg stabile Verläufe aufweisen, ist der ungünstige Verlauf durch den frühzeitig einsetzenden und mitunter progredienten Lungenfunktionsverlust gekennzeichnet. Dabei gibt das BOS Stadium den Grad des FEV1 Verlusts wieder. In der nachfolgenden Studie geht es einerseits um die Frage, inwieweit sich die Biomarker Konzentrationen stabiler Patienten von denen instabiler unterscheiden. Andererseits wird bewertet, ob im Bereich respiratorischer Erkrankungen etablierte Fragebögen/Skalen auch unter lungentransplantierten Patienten Anwendung finden können.

- Wie entwickelt sich die Lungenfunktion während des Studienverlaufs?
- Unterscheiden sich die IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS Serum Konzentrationen der BOS positiven Patienten von denen der BOS negativen?
- Inwieweit lassen die erreichten SGQR, CAT und MRC Scores Rückschlüsse auf das BOS Stadium eines Patienten bzw. den Grad der FEV1 Einschränkung zu?

3. Material und Methodik

3.1 Patientenkollektiv, Studieneinschluss

Betreut werden lungentransplantierte Patienten durch die Ambulanz der Klinik für Inneren Medizin 5. In den ersten Wochen nach der Transplantation finden sich die Patienten dort zu engmaschigen Kontrolluntersuchungen ein, im weiteren Verlauf werden die Abstände tendenziell breiter. Ziel war es, 70 in der Nachsorge befindliche Patienten in die Studie einzuschließen. Berücksichtigt wurden sowohl uni- als auch bilateral transplantierte Empfänger.

Entsprechend informierten wir die Patienten im Rahmen der Nachsorgetermine über die Studie. Bestand Interesse, klärten die Ambulanzärzte über die Details zur Teilnahme auf. Bei Zustimmung unterzeichneten die Patienten eine Einwilligungserklärung. Letztere ist für jeden Patienten vorhanden. Eine Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission liegt ebenfalls vor (Nummer 105/12).

Ein Kontrolltermin in der Ambulanz gestaltet sich dabei wie folgt: Nach der Anmeldung, Gewichtskontrolle, etc. wird den Patienten zunächst Blut entnommen. Danach geht es zur Lungenfunktionsmessung. An diese Routine Blutentnahme knüpften wir die Studien Blutentnahme an. Abgenommen wurden zwei Citrat, zwei Serum, zwei Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), ein BP100 und ein PAXgene Röhrchens. Alle Blutprodukte erhielten eine Patienten spezifische LAB ID. Die Lungenfunktionsmessung wiederum bot Zeit, die Proben zu verarbeiten.

3.2 Biomarker

3.2.1 Verarbeitung der Blutproben

PAXgene und EDTA Vollblut wurden direkt nach Entnahme bei -80 Grad Celsius eingefroren. Das verbliebene EDTA Röhrchen (Primärröhrchen), die beiden Citrat und das BP100 Röhrchen wurden zunächst bei 2500xg für 20 Minuten zentrifugiert, die Serumproben hingegen erst nach 30 Minuten Wartezeit für 10 Minuten bei 1300xg. Das gewonnene Blutplasma wurde anschließend in Sekundärröhrchen überführt, die zellulären Bestandteile mit Ausnahme auf das EDTA Primärröhrchen verworfen. Die Einlagerung der Sekundärröhrchen und des EDTA Primärröhrchens erfolgte ebenfalls bei -80 Grad. Analysiert wurden die Proben auf eine ganze Reihe

von Markern hin. IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS werden in der vorliegenden Arbeit abgehandelt.

3.2.2 Messverfahren

3.2.2.1 Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)

Die Bestimmung der RAGE Serum Konzentration erfolgte mit Hilfe des *Luminex Magpix Analyzers* unter Verwendung sogenannter Beads. Hierbei handelt es sich um magnetische und gleichzeitig farbkodierte Mikropartikel, die mit Analyt spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Die beschichteten Mikropartikel werden zusammen mit Kalibrator Diluent (Kontrolle/Blindwert), den Standards bzw. Proben in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Nach dem Schlüssel Schloss Prinzip bindet der Antikörper den spezifischen Analyten. Die Standards enthalten den Analyten (hier RAGE) in einer festgelegten Konzentration und sind essentiell für die Assay Auswertung. Auf Basis der RAGE Konzentration der Standards wird eine Standardkurve erstellt, zu der die Proben Messungen in Relation gesetzt werden.

Es folgt ein Waschschriff. Während des Waschschriffs wird die Mikrotiterplatte auf eine Magnetplatte gestellt, die die Mikropartikel anzieht. So kann ungebundene Substanz entfernt werden. Danach werden ein Biotin Antikörper und Streptavidin Phycoerythrin (PE) hinzugegeben. Der Biotin Antikörper bindet ebenfalls spezifisch an den Analyten, Streptavidin PE wiederum an Biotin. Dazwischen und danach wird ebenfalls gewaschen. Die abschließende Messung erfolgt im *Luminex Magpix Analyzer*, wobei die Mikropartikel durch einen Magneten auf einem Monolayer gehalten werden. Zwei Leuchtdioden (LEDs) bestrahlen die Beads mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Eine Leuchtdiode erkennt den Analyten, die andere Diode detektiert die Stärke des Streptavidin PE Signals. Dessen Stärke verhält sich direkt proportional zur Menge des gebundenen Analyten (Angaben nach dem Handbuch von *R&D Systems*, Minneapolis für *Magnetic Luminex® Screening Assays*).

3.2.2.2 Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Die IL-6, IL-8 und TNF- α Serum Konzentrationen wurden mit Hilfe des *Magnetic Luminex Performance Assays* bestimmt. Das Messverfahren basiert auf dem eben erklärten Prinzip. Allein in der Vorbereitung ergeben sich einige Unterschiede, wie etwa in der Zubereitung der Standards (Angaben nach dem Handbuch von *R&D Systems*, Minneapolis für *Magnetic Luminex® Performance Assays*).

3.2.2.3 Lipopolysaccharid (LPS)

Bestimmt wurde die LPS Serum Konzentration mit Hilfe des *Toxin Sensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assays*. Der Test beruht auf der Beobachtung, dass das Blut des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus*) bei Kontakt zu Endotoxinen (LPS Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien) gerinnt [4]. Aus den Blutzellen (Amöbozyten) der Krebse kann das sogenannte Limulus Amöbozyten Lysat (LAL) extrahiert werden [46]. Der LAL-Test macht sich ebendieses Prinzip zu Nutze. Die in den Patienten Proben enthaltenen Endotoxine aktivieren ein Proenzym in LAL. Dieses wiederum spaltet ein farbloses Substrat, wodurch letztlich ein farbiges Endprodukt entsteht. Das Endprodukt kann anschließend photometrisch nachgewiesen werden. Wie auch bei den vorherigen Messmethoden wurde mit einer Standardreihe und einer Standardkurve gearbeitet (Angaben nach dem Handbuch *ToxinSensor™ Endotoxin Detection System* von *GenScript*).

3.3. SGQR, CAT und MRC

3.3.1 Ablauf bei Bearbeitung

Während die Patienten auf ihre Befundbesprechung durch die Ambulanzärzte warteten, bearbeiteten sie SGQR, CAT, MRC und einen Aufnahmebogen. Letzterer fragte u.a. Details zur Krankengeschichte, zu bestehenden Komorbiditäten, zum Rauchverhalten sowie zur aktuellen Medikation ab.

Im klinikinternen elektronischen Dokumentationssystem SAP wurden weitere patientenbezogene Daten, darunter Lungenfunktionsparameter, Blutwerte und genauere Informationen zur Grunderkrankung bzw. zum postoperativen Verlauf

abgerufen. Bei der Berechnung der SGQR Scores kam ein spezieller (im Internet frei verfügbarer) SGQR Kalkulator zum Einsatz. Zu den Entwicklern zählen Marco Gelpi, Jonathan Argentiero und Andreas Ronit von der Universitätsklinik Kopenhagen.

Die erhobenen Daten wurden abschließend in pseudonymisierter Form in die klinikeigene Datenbank ‚OpenClinica‘ übertragen.

3.4 Transplantatabstoßung

3.4.1 BOS Klassifikation nach der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)

Eingeführt wurde BOS Klassifikation 1993 [18]. Eine überarbeitete Version veröffentlichte die ISHLT im Jahr 2002 [23].

Grundsätzlich sollte im Verlauf nach Transplantation zunächst der sogenannte Baseline Wert festgelegt werden. Definiert wird die Baseline als Mittelwert aus den beiden höchsten, mindestens drei Wochen auseinander liegenden, postoperativen FEV1 Werten. Die Baseline sollte immer wieder reevaluiert werden, da sich die FEV1 mitunter erst langsam nach Transplantation vollständig aufbaut. Analog zur FEV1 kann die Baseline an Hand des forcierten expiratorischen Flusses (FEF 25–75%) festgelegt werden.

Die BOS Stadien werden wie folgt definiert: Kommt es zum länger anhaltenden Lungenfunktionsabfall, wird ein Mittelwert aus zwei mindestens drei Wochen auseinanderliegenden FEV1 bzw. FEF 25–75% Messungen gebildet. An einer verschlechterten Einzelmessung sollte kein neues BOS Stadium festgemacht werden. Der gewonnene Mittelwert wird in Relation zur Baseline gesetzt. Ein BOS Stadium 0 liegt vor, wenn FEV1 >90% und FEF 25–75% >75% der Baseline betragen. Im BOS Stadium 0-p liegt der FEV1 Wert definitionsgemäß zwischen 81 und 90%, der FEF 25–75% Wert $\leq 75\%$ der Baseline. P steht dabei für potenziell. In diesem Zwischenstadium sollte der weitere Verlauf engmaschig überwacht werden, um einen Übergang ins BOS Stadium 1 nicht zu verpassen. Die BOS Stadien 1 bis 3 werden ausschließlich anhand des prozentualen FEV1 Abfalls definiert. Im Stadium 1 beträgt die FEV1 66 bis 80% der Baseline, in den Stadien 2 und 3 51 bis 65% bzw. $\leq 50\%$. Alle Messungen sollten ohne Einsatz eines Bronchodilatators vorgenommen werden. Zusätzlich zum BOS Stadium kann die Notiz ‚a‘ für Histologie nicht

vorhanden bzw. keine OB nachweisbar oder ‚b‘ für histologisch nachweisbare OB angegeben werden [23].

BOS Stadium	FEV1 in % der Baseline	FEF 25-75% in % der Baseline
0	>90	>75
0-p	81-90	≤75
1	66-80	
2	51-65	
3	≤50	

Tabelle 1: BOS Klassifikation nach der ISHLT (2002)

3.4.2 BOS Klassifikation der Studienteilnehmer

Die Einteilung der Studien Patienten beruht auf ebendieser Klassifikation. Zunächst stellte die IT Abteilung alle im Computersystem verfügbaren FEV1 Messungen der 70 Teilnehmer zusammen. Vom Zeitpunkt der Transplantation an wurde für jeden Patienten ein postoperativer Baseline Wert festgelegt und ggf. reevaluiert. Anhand des am Tag des Einschlusses gemessenen FEV1 Wertes bzw. in Zusammenschau mit der Wochen bzw. Monate vorausgehenden Entwicklung wurde dann das BOS Stadium evaluiert. Beachtung fanden hier auch im SAP System dokumentierte Einträge über etwaige Infektionen, Abstoßungsreaktionen, etc.

Im September 2017 eruierten wir die BOS Stadien ein zweites Mal. Zurückgegriffen wurde auf die aktuellsten im System verfügbaren FEV1 Werte. Da die Patienten über einen längeren Zeitraum hinweg in die Studie eingeschlossen wurden, fallen die zeitlichen Abstände zwischen der ersten und der zweiten BOS Evaluation unterschiedlich aus. Für verstorbene Patienten (n=5, Stand September 2017) wurden die letzten verfügbaren FEV1 Werte gewählt.

3.5 Statistische Analyse

Für qualitativ Variablen sind die absoluten und relativen Häufigkeiten angegeben, für quantitative Mittelwerte und Standardabweichungen. Auf Basis des Kolmogorov-Smirnov Tests wurden die quantitativen Variablen auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft, Zusammenhänge zwischen zwei quantitativen Variablen wurden mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt. Die Berechnung des Signifikanzniveaus erfolgte auf Grundlage der einfaktoriellen

Varianzanalyse ANOVA. Im Rahmen der Gruppenvergleiche angewendet wurde weiterhin der Kruskal-Wallis-Test. Welche Mittelwerte signifikant differieren, wurde anschließend anhand des Bonferroni Post-Hoc-Tests bewertet. Als signifikant angesehen werden Werte $\leq 0,05$. Die Durchführung der statistischen Analyse erfolgte mit Hilfe der IBM SPSS Statistics 24 Software.

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

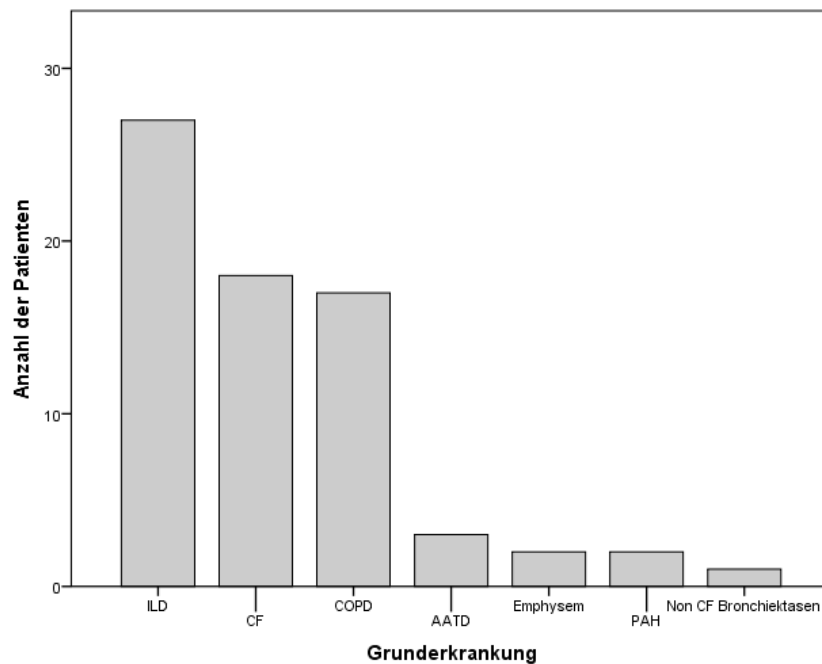
Von März 2015 bis Mai 2017 nahmen 70 Patienten an der Studie teil. Die Population besteht aus 32 (45,7%) Frauen und 38 (54,3%) Männer, die im Zeitraum 1998 bis 2017 transplantiert wurden. Zwischen Transplantation und Studieneinschluss sind durchschnittlich 1802 Tage (Range 28-6844) vergangen. Das mittlere Alter der Teilnehmer beträgt 51 (Range 19-69) Jahre, Gewicht und Körpergröße belaufen sich auf 68 kg (Range 30-112 kg) bzw. 165 cm (Range 147-193 cm). 41 (58,6%) Patienten wurden bilateral und 29 (41,4%) unilateral transplantiert. Ein Patient ist zusätzlich Nieren transplantiert. Bei Studieneinschluss lag die FEV1 in % des Solls bei $71,35 \pm 22,11$. Alle 70 Patienten verneinten, seit der Transplantation geraucht zu haben. 26 (37,1%) Patienten gaben an, auch vor der Transplantation nicht geraucht zu haben. Zum ehemaligen regelmäßigen Konsum bekannten sich 35 (50,0%) Patienten. 9 (12,9%) Patienten bejahten den früheren gelegentlichen bzw. unregelmäßigen Zigarettenkonsum, etwa am Wochenende. Insgesamt liegt der Durchschnitt bei $36,86 \pm 22,47$ Packungsjahren (pack year, py). 13 (18,6%) Patienten gaben weiterhin an, unter einer Tumorerkrankung zu leiden/gelitten zu haben. Tumoren der Haut machen hier den größten Anteil aus. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung wurden zwei (2,9%) Patienten mit Hilfe der ECP behandelt.

Die häufigste Grunderkrankung stellt mit 38,6% der Formenkreis der ILD dar, CF und COPD folgen mit 25,7 bzw. 24,3%. Weiterhin schließen sich der AATD (4,3%), das Emphysem (2,9%), die PAH (2,9%) und die Non CF Bronchiektasen (1,4%) an. Einmal retransplantiert wurden vier (5,7%) Patienten, zweimal retransplantiert wurde ein (1,4%) Patient.

Ausgenommen der Variablen FEV1 in % des Solls ($p < 0,0001$) und der Zeitspanne von Transplantation bis Studieneinschluss ($p < 0,0001$) finden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den BOS Gruppen.

		BOS					
Merkmal		Gesamt (n=70)	0 (n=35)	0-p (n=11)	1 (n=14)	2 (n=2)	3 (n=8)
Geschlecht	männlich	38 (54,3%)	19 (50%)	6 (15,8%)	8 (21,1%)	1 (2,6%)	4 (10,5%)
	weiblich	32 (45,7%)	16 (50%)	5 (15,6%)	6 (18,8%)	1 (3,1%)	4 (12,5%)
Mittleres Alter in Jahren		52,21 ± 13,32	51,66 ± 12,43	52,36 ± 14,69	51,43 ± 12,76	45,5 ± 16,26	48,75 ± 18,21
Gewicht in kg		68,04 ± 18,22	70,19 ± 16,57	70,62 ± 17,51	66,29 ± 22,61	81,5 ± 16,26	54,81 ± 14,94
Größe in cm		165,02 ± 22,34	162,98 ± 29,53	169,82 ± 9,08	167,14 ± 12,71	171,5 ± 9,19	162,0 ± 12,94
Transplantation bis Studieneinschluss in Tagen		1802,19 ± 1569,01	727,14 ± 741,87	2028,36 ± 1055,56	3363,36 ± 1409,95	3058,0 ± 697,21	3148,5 ± 1727,49
Grunderkrankung	ILD	27 (38,6%)	18 (66,7%)	2 (7,4%)	5 (18,5%)	1 (3,7%)	1 (3,7%)
	CF	18 (25,7%)	7 (38,9%)	4 (22,2%)	4 (22,2%)	1 (5,6%)	2 (11,1%)
	COPD	17 (24,3%)	7 (41,2%)	4 (23,5%)	3 (17,6%)	0	3 (17,6%)
	AATD	3 (4,3%)	1 (33,3%)	0	1 (33,3%)	0	1 (33,3%)
	Emphysem	2 (2,9%)	0	1 (50%)	1 (50%)	0	0
	PAH	2 (2,9%)	1 (50%)	0	0	0	1 (50%)
	Non-CF-Bronchiektasen	1 (1,4%)	1 (100%)	0	0	0	0
Lungenflügel	unilateral	29 (41,4%)	19 (65,5%)	4 (13,8%)	5 (17,2%)	1 (3,4%)	0
	bilateral	41 (58,6%)	16 (39,0%)	7 (17,1%)	9 (22,0%)	1 (2,4%)	8 (19,5%)
Anämie	nein	36 (51,4%)	16 (44,4%)	7 (19,4%)	6 (16,7%)	2 (5,6%)	5 (13,9%)
	ja (m: Hb <13,0 g/dl, w: Hb <12,0 g/dl)	34 (48,6%)	19 (55,9%)	4 (11,8%)	8 (23,5%)	0	3 (8,8%)
Hämoglobin in g/dl		12,59 ± 1,72	12,29 ± 1,78	12,93 ± 1,28	12,7 ± 1,78	14,15 ± 1,06	12,89 ± 1,98
Leukozyten x10 ⁹ /l		7,59 ± 2,5	7,26 ± 2,69	7,8 ± 2,54	8,7 ± 1,58	9,8 ± 3,11	6,25 ± 2,16
CRP in mg/l		5,18 ± 12,9	3,97 ± 7,22	4,13 ± 5,66	10,93 ± 25,93	0,8 ± 0,14	2,94 ± 2,75
Kreatinin mg/dl		1,63 ± 0,89	1,45 ± 0,54	1,43 ± 0,33	2,12 ± 1,44	1,26 ± 0,35	1,9 ± 1,25
GFR in ml/min/1,73 m ²		51,95 ± 21,56	54,18 ± 18,17	53,52 ± 21,62	43,92 ± 23,38	61,3 ± 15,7	51,73 ± 32,81
FEV1 des Solls in %		71,35 ± 22,11	79,19 ± 15,84	80,13 ± 20,46	65,71 ± 19,65	60,45 ± 4,31	37,54 ± 21,16
Tumorerkrankung	nein	57 (81,4%)	30 (52,6%)	11 (19,3%)	9 (15,8%)	2 (3,5%)	5 (8,8%)
	ja	13 (18,6%)	5 (38,5%)	0	5 (38,5%)	0	3 (23,1%)
Raucherstatus vor Transplantation	Nichtraucher	26 (37,1%)	11 (42,3%)	3 (11,5%)	7 (26,9%)	1 (3,8%)	4 (15,4%)
	Exraucher (darunter auch die „Exgelenheitsraucher“)	44 (62,9%)	24 (54,5%)	8 (18,2%)	7 (15,9%)	1 (2,3%)	4 (9,1%)
Packyear (py)		36,86 ± 22,47	36,53 ± 28,27	37,57 ± 19,8	35,29 ± 15,5	25 ± 0	44,67 ± 10,79

Tabelle 2: Patientencharakteristika



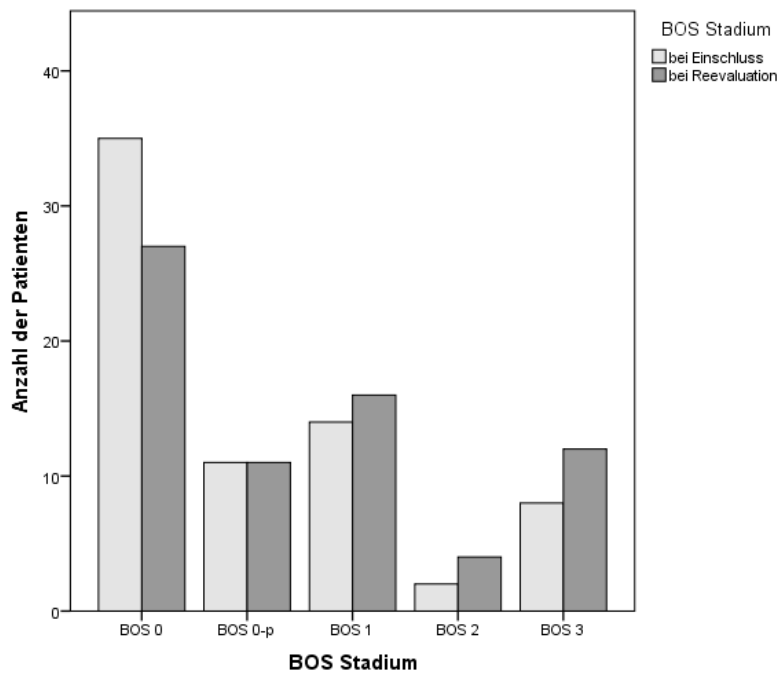
Grafik 1: Das Säulendiagramm stellt die Grunderkrankungen der 70 Studien Patienten dar. Interstitiellen Lungenerkrankung (ILD), Cystische Fibrose (CF), Chronisch Obstruktive Atemwegserkrankung (COPD), Alpha-1-Antitrypsin-Mangel (AATD), Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH)

4.2 BOS Klassifikation der Studienteilnehmer

35 (50%) Patienten fielen bei Einschluss in die Kategorie BOS 0, 11 (15,7%) ins Stadium 0-p, 14 (20,0%) ins Stadium 1, 2 (2,9%) ins Stadium 2 und 8 (11,4%) ins Stadium 3.

Die zweite Evaluation erfolgte im Mittel nach 327 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich noch 27 (38,6%) Patienten im BOS Stadium 0, 11 (15,7%) im Stadium 0-p, 16 (22,9%) im Stadium 1, 4 (5,7%) im Stadium 2 und 12 (17,1%) im Stadium 3.

Die vier zusätzlichen Patienten im Stadium 3 waren zuvor den Stadien 0 (n=1), 0-p (n=1) und 1 (n=2) zugeordnet.



Grafik 2: BOS Stadien bei Einschluss und nach durchschnittlich 327 Tagen bei Reevaluation

4.3 Auswertung von SGQR, CAT und MRC

Das SGQR wurde von insgesamt 66 Patienten bearbeitet. CAT und MRC füllten jeweils 68 Studienteilnehmer aus.

32 dem Stadium 0 zugeordnete Teilnehmer bearbeiteten das SGQR, jeweils 34 CAT und MRC. SGQR, CAT und MRC wurden jeweils von 11 Patienten im Stadium 0p, 13 im Stadium 1, 2 im Stadium 2 und 8 im Stadium 3 ausgefüllt.

4.3.1 Ergebnisse SGQR

Der Total Score Mittelwert beläuft sich insgesamt auf $21,65 \pm 18,04$. Minimum und Maximum betragen 0 bzw. 80,51.

Die Total Score Mittelwerte für die einzelnen Stadien liegen bei $20,66 \pm 16,09$ (BOS 0), $11,27 \pm 12,46$ (BOS 0-p), $20,39 \pm 16,21$ (BOS 1), $15,76 \pm 6,26$ (BOS 2) bzw. $43,37 \pm 21,7$ (BOS 3).

Mittelwert und Standardabweichung für den ‚Symptom‘, ‚Activity‘ und ‚Impact‘ Teil belaufen sich auf $24,48 \pm 19,27$; $29,83 \pm 28,49$ bzw. $16,06 \pm 14,88$.

4.3.2 Ergebnisse CAT

Durchschnittlich erreichten die Patienten $7,04 \pm 5,32$ Punkte im CAT, Minimum und Maximum betragen 0 bzw. 31 Punkte.

Für die einzelnen BOS Stadien ergeben sich im Mittel $6,62 \pm 3,77$ (BOS 0), $5,27 \pm 5,04$ (BOS 0-p), $6,54 \pm 4,96$ (BOS 1), $5,5 \pm 7,78$ (BOS 2) bzw. $12,5 \pm 8,73$ (BOS 3) Punkte.

4.3.3 Ergebnisse MRC

Der Mittelwert für die MRC Dyspnoe Skala beläuft sich insgesamt auf $1,76 \pm 1,07$, Minimum und Maximum betragen 1 bzw. 5.

Für die einzelnen BOS Stadien ergeben sich die folgenden Mittelwerte: $1,56 \pm 0,86$ (BOS 0), $1,55 \pm 0,93$ (BOS 0-p), $1,85 \pm 1,14$ (BOS 1), $1,5 \pm 0,71$ und $2,88 \pm 1,46$ (BOS 3).

Fragebogen/Skala	BOS Stadium					
	Gesamt	0	0-p	1	2	3
SGQR Total	$21,65 \pm 18,04$ (n=66)	$20,66 \pm 16,09$ (n=32)	$11,27 \pm 12,46$ (n=11)	$20,39 \pm 16,21$ (n=13)	$15,76 \pm 6,26$ (n=2)	$43,37 \pm 21,7$ (n=8)
CAT	$7,04 \pm 5,32$ (n=68)	$6,62 \pm 3,77$ (n=34)	$5,27 \pm 5,04$ (n=11)	$6,54 \pm 4,96$ (n=13)	$5,5 \pm 7,78$ (n=2)	$12,5 \pm 8,73$ (n=8)
MRC	$1,76 \pm 1,07$ (n=68)	$1,56 \pm 0,86$ (n=34)	$1,55 \pm 0,93$ (n=11)	$1,85 \pm 1,14$ (n=13)	$1,5 \pm 0,71$ (n=2)	$2,88 \pm 1,46$ (n=8)

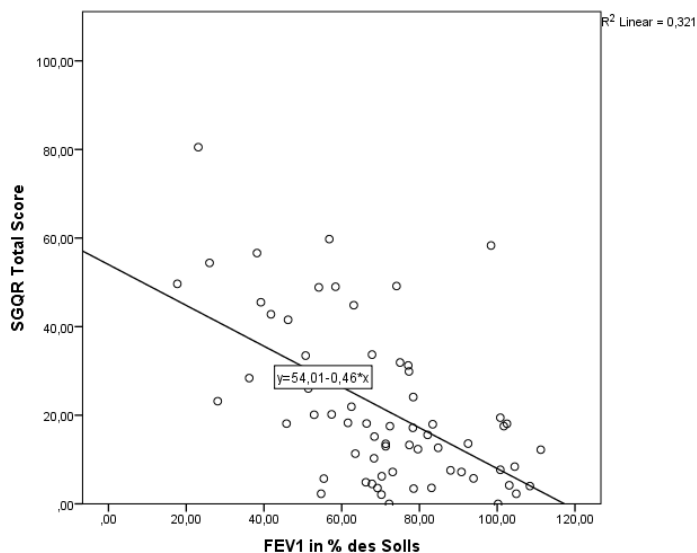
Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen für SGQR, CAT und MRC

4.3.2 Korrelation zwischen SGQR, CAT, MRC und der FEV1 in % des Solls

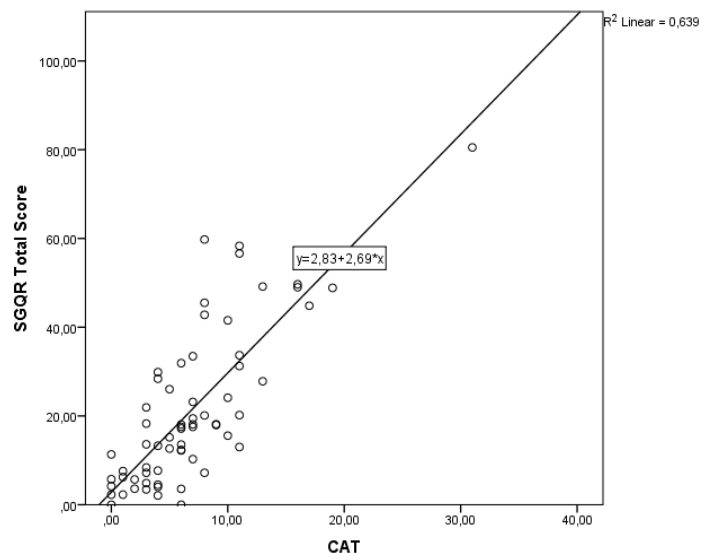
Insbesondere SGQR und CAT korrelieren auf hohem Niveau ($r=0,76$, $p<0,0001$). Die Korrelationskoeffizienten für SGQR und MRC sowie MRC und CAT liegen bei $r=0,734$ ($p<0,0001$) bzw. $r=0,62$ ($p<0,0001$).

Weniger deutlich korrelieren SGQR ($r=-0,53$, $p<0,0001$), MRC ($r=-0,451$, $p<0,0001$) und CAT ($r=-0,388$, $p<0,001$) mit der FEV1 in % des Solls.

Der Kolmogorov-Smirnov Test belegt die Normalverteilung der FEV1 Werte in % des Solls. Hingegen widerlegt er die Normalverteilung der SGQR, CAT und MRC Patienten Scores.



Grafik 3: Korrelation zwischen SGQR Total Score und der FEV1 in % des Solls

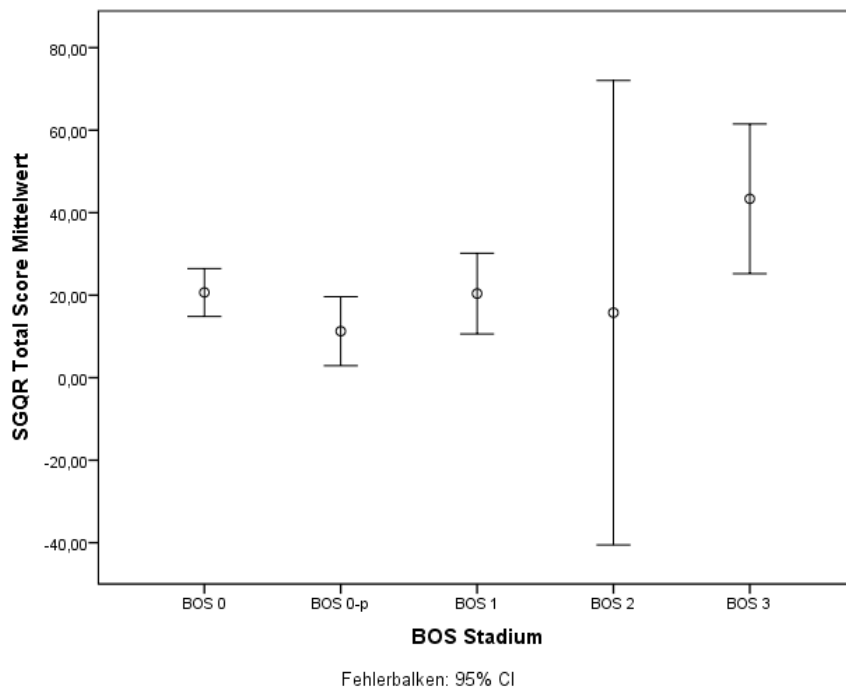


Grafik 4: Korrelation zwischen SGQR Total Score und CAT

4.3.3 Die Patienten im BOS Stadium 3 erreichen die höchsten SGQR, CAT und MRC Scores

Weiterhin stellt sich die Frage, ob SGQR, CAT und MRC klinisch relevante Daten unter Lungentransplantierten liefern. Idealerweise sollten sie hierzu das BOS Stadium, in dem sich ein Patient befindet, treffend abbilden, so die Überlegung. Patienten im BOS Stadium 3 würde man auf Grund weitreichender Einschränkungen höhere Scores zuordnen als Patienten in niedrigeren Stadien.

Die Signifikanzniveaus zwischen den BOS Stadien und den erreichten Scores liegen bei $p=0,002$ (SGQR), $p=0,033$ (CAT) und $p=0,026$ (MRC). Die Patienten im BOS Stadium 3 erreichten signifikant höhere SGQR Total Scores als solche in den Stadien 0 ($p=0,008$), 0-p ($p=0,001$) und 1 ($p=0,025$). Ferner erzielten die Studienteilnehmer im BOS Stadium 3 signifikant höhere Punktzahlen im CAT als die den Stadien 0 ($p=0,043$) und 0-p ($p=0,031$) zugeordneten. Die Patienten im Stadium 3 schätzten den Grad ihrer Dyspnoe Symptomatik auf der MRC Skala signifikant höher ein als die im Stadium 0 ($p=0,015$).



Grafik 5: SGQR Total Score Mittelwerte der Patienten in den BOS Stadien 0 bis 3 bei Studieneinschluss

4.4 Biomarker

4.4.1 Messergebnisse

Bestimmt wurden die Biomarker Konzentrationen für IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS in jeweils 53 Patientenproben, für die restlichen 17 gesammelten Proben stehen die Messungen noch aus. Lagen die Analyse Ergebnisse unter der Standardkurve, wurde die Bestimmungsgrenze mit 0,5 multipliziert. Die Produkte flossen dann in die weiteren Berechnungen ein. Verglichen wurden die Konzentrationen zwischen BOS positiven und negativen Teilnehmern. Zur Gruppe der BOS positiven Patienten zählen alle Studienteilnehmer mit einem persistierenden FEV1 Abfall $\geq 20\%$ von der Baseline (sprich alle Patienten in den BOS Stadien 1 bis 3). Der BOS negativen Gruppe gehören dementsprechend die Teilnehmer in den Stadien 0 und 0-p an. Bei Einschluss fielen 37 Patienten in die BOS positive und 16 in die BOS negative Gruppe. Mittelwerte und Standardabweichungen können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman zeigt Zusammenhänge zwischen einzelnen Variablen auf, so etwa zwischen IL-6 und IL-8 ($r=0,556$; $p<0,0001$). Zu erwähnen bleibt darüber hinaus die Korrelation zwischen der RAGE Konzentration und dem Raucherstatus in py ($r=0,519$; $p=0,005$).

Biomarker	Gesamt (n=53)	BOS negative Gruppe (n=37)	BOS positive Gruppe (n=16)
IL 6 [pg/ml]	0,94 ± 1,15	0,96 ± 1,2	0,9 ± 1,05
IL 8 [pg/ml]	5,07 ± 5,21	5,41 ± 6,08	4,3 ± 2,14
TNF-α [pg/ml]	3,11 ± 1,96	3,25 ± 2,24	2,78 ± 1,06
RAGE [pg/ml]	1570,65 ± 742,42	1538,49 ± 641,95	1645,02 ± 955,67
LPS [EU/ml]	2,18 ± 3,07	2,32 ± 3,53	1,86 ± 1,61

Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichungen für die IL-6, IL-8, TNF-α, RAGE und LPS Konzentrationen. Der FEV1 Abfall $\geq 20\%$ von der Baseline stellt das Diagnosekriterium für ‚BOS positiv‘ dar.

4.4.2 Die BOS positiven und BOS negativen Patienten weisen keine signifikanten Unterschiede in ihren IL-6, IL-8, TNF-α, RAGE und LPS Konzentrationen auf

Bei Studieneinschluss wiesen die BOS positiven und BOS negativen Patienten keine statistisch signifikanten Unterschiede in ihren IL-6, IL-8, TNF-α, RAGE und LPS Konzentrationen auf. Es besteht ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den IL-6, IL-8, TNF-α, RAGE und LPS Konzentrationen und dem durchschnittlich 327 Tage nach Einschluss erneut evaluierten BOS Status. Somit findet sich keine Assoziation zwischen den Marker Konzentrationen und den BOS Stadien.

5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Biomarker zu identifizieren, die mit dem Auftreten von BOS assoziiert sind. Daher analysierten wir die Serum Proben von 37 Patienten mit und 16 ohne BOS Diagnose auf ihre IL-6, IL-8, RAGE, TNF- α und LPS Serum Konzentrationen hin. Weiterhin ging es um die Frage, inwieweit sich der Schweregrad der Lungenfunktionseinschränkung bzw. das BOS Stadium in den erreichten SGQR, CAT und MRC Scores wiederfindet.

Folgende Erkenntnisse wurden diesbezüglich gewonnen:

- I. Die IL-6, IL-8, RAGE, TNF- α und LPS Serum Konzentrationen korrelieren nicht mit dem BOS Status.
- II. Insgesamt erreichten die Patienten im BOS Stadium 3 die mit Abstand höchsten SGQR, CAT und MRC Scores. Für den SGQR belegt der Post-hoc Test hier die stärksten Gruppenunterschiede.
- III. Die BOS Stadien Verteilung unterliegt einer Dynamik. Während des Studienverlaufs zeichnete sich eine Verschiebung in Richtung der höheren Stadien ab.

Unter den im Zeitraum von ein bis drei und drei bis fünf Jahren nach Transplantation verstorbenen Patienten stellt BOS/OB mit 26,4% bzw. 30% jeweils die häufigste Todesursache dar [16]. Diese Zahlen und die Tatsache, dass BOS weiterhin als schwer therapierbar gilt, verdeutlichen die Tragweite der Diagnose für einen Patienten. In Anbetracht dessen wird weiterhin nach Biomarkern gesucht, die mit dem (zukünftigen) Auftreten von BOS assoziiert sind. Auf Basis deren Nachweises könnten Risikopatienten früher erkannt und einer spezifischen Behandlung zugeführt werden.

Im Folgenden wird zuerst auf die Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α eingegangen, anschließend auf LPS und RAGE.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der IL-6, IL-8 bzw. TNF- α Konzentration und dem BOS Status hergestellt werden. Auch Bharat et. al. verglichen die Konzentrationen verschiedener Zytokine, darunter IL-6, IL-8 und TNF- α , zwischen einer Gruppe BOS positiver und einer BOS negativer Patienten. Im Rahmen der angesprochenen Studie wurden zunächst 31 Paare aus jeweils einem Partner mit und einem ohne BOS Diagnose gebildet. Als Diagnosekriterium galt (wie auch in unserer Studie) der FEV1 Abfall $\geq 20\%$ von der Baseline. Evaluiert wurden die Biomarker Konzentrationen für beide Partner jeweils fünf Mal. Die Zeitspanne von der Transplantation bis zur Diagnosestellung beim BOS positiven Partner wurde in vier Abschnitte aufgeteilt. Die Evaluation der Biomarker Konzentrationen erfolgte in der Mitte eines jeden Abschnitts. Eine fünfte Probe entnahm man nach der Diagnosestellung. Für den BOS negativen Partner galt dasselbe Zeitschema. Aus den Einzelmessungen wurden für beide Gruppen fünf Mittelwerte gebildet. Anschließend erfolgte ein Vergleich der Biomarker Konzentrationen zwischen den Gruppen. Wie auch in der vorliegenden Arbeit fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den IL-6, IL-8 und TNF- α Konzentrationen [10].

Vielfach bestimmt werden Biomarkern darüber hinaus in der BALF. Signifikant erhöhte IL-6 und IL-8 Konzentrationen wies man sowohl in der bronchialen als auch alveolären Fraktion von OB Patienten (vs. stabile Patienten) nach [79].

Infolge der Unterteilung von CLAD in BOS, RAS und NRAD wird die BALF vermehrt auf Phänotyp spezifische Marker hin untersucht. Verleden et al. analysierten die Spülflüssigkeit von 20 RAS Patienten, 20 BOS Patienten mit Neutrophilie, 17 BOS Patienten ohne Neutrophilie und 20 stabilen Patienten auf verschiedene Zytokine hin. Den RAS und BOS Patienten wurden die Proben bei Diagnosestellung entnommen, den stabilen Patienten im Rahmen der Routine Follow-ups. In der BALF der RAS Patienten wiesen die Autoren signifikant höhere IL-6 Werte nach als in der der BOS Patienten mit Neutrophilie ($p < 0,05$), ohne Neutrophilie ($p < 0,01$) und in der stabiler Empfänger ($p < 0,001$). Für die RAS Patienten scheint hier ein Zusammenhang zwischen der Höhe der IL-6 Konzentration und der Überlebenszeit zu bestehen (HR 2,27; KI 1,15–4,49; $p = 0,018$). Auch die IL-8 Konzentration der RAS Patienten (vs. stabile Empfänger und vs. BOS Patienten ohne Neutrophilie) war signifikant erhöht ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$). Die BALF der BOS Patienten mit Neutrophilie enthielt eine signifikant höhere IL-8 Konzentration als die stabiler Empfänger ($p < 0,001$). Wie auch in vorherigen Studien differierten die Biomarker Konzentrationen zwischen den BOS

Patienten ohne Neutrophilie und den stabilen Patienten nicht auf statistisch signifikantem Niveau. Die Autoren schlussfolgern, dass hier Gewebeproben auf ihre Protein Expressionsmuster hin untersucht werden sollten. Für TNF- α zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen [96].

Auch Berastegui et al. analysierten die BALF von stabilen, BOS und RAS Patienten auf IL-6 und TNF- α hin. Statistisch signifikante Unterschiede in den IL-6 Konzentrationen fanden sich hier allerdings nicht. Bezüglich TNF- α kommt die Studie zum selben Ergebnis [8]. Diagnostiziert wurde RAS in beiden Studien anhand ähnlicher Kriterien (aktuell existieren keine standardisierten Diagnosekriterien), ein Ausschluss von Patienten mit ARC erfolgte nur in letzterer genannter Studie.

Saito et al. setzen wesentlich früher an. Retrospektiv untersuchten sie Gewebeproben aus den Spenderlungen von 50 BOS, 21 RAS und 38 nicht CLAD Patienten auf ihre IL-6, IL-8 und TNF- α Expressionsmuster hin. Entnommen und eingelagert wurden die Biopsien unmittelbar vor Transplantation. Die Spenderlungen späterer BOS Patienten exprimierten IL-6 in einem stärkeren Maß als die späterer RAS ($p=0,025$) bzw. nicht CLAD Patienten ($p=0,011$). Die Cox Regressionsanalyse legt hier einen Zusammenhang zwischen hohen IL-6 Expressionsmustern in der Spenderlung und der späteren BOS Entwicklung nahe (HR 4,98; KI 2,42-10,2; $p<0,001$). Bezüglich IL-8 und TNF- α zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass hohe IL-6 mRNA Expressionsmuster in der Spenderlung eher mit einer zukünftigen BOS, nicht aber RAS Entwicklung, einhergehen [74].

Auch die Beteiligung der angeborenen Immunantwort an der CLAD Genese gerät immer mehr in den Fokus. Die angeborene Immunantwort basiert auf der Erkennung Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs) und damage-associated molecular patterns (DAMPs) durch Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) [86]. Die TLRs gehören zur Familie der PRRs, in der Lunge wird TLR4 durch Alveolarmakrophagen und Epithelien exprimiert. Exogene und endogene Liganden, darunter LPS [67] und HA [87], binden an TLR4. Die Stimulation der TLRs führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, welche weitere Immunzellen (darunter Lymphozyten) aktivieren. Bestimmte Varianten des TLR4 Rezeptors gehen mit einer abgeschwächten Immunantwort auf Pathogene, wie LPS, einher. Transplantat Empfänger, die einen solchen Polymorphismus tragen, profitieren. Bei ihnen tritt die akute Abstoßungsreaktion seltener und in abgeschwächter Form auf [67]. Neben

TLR4 moduliert der CD14 Rezeptor die Immunantwort auf LPS. Dabei wird der CD14 TT Genotyp mit einem schlechteren Outcome nach Transplantation in Verbindung gebracht. Palmer et al. geben die BOS Inzidenz unter TT Genotyp Patienten mit 52% an, die unter CC bzw. CT Genotyp Patienten hingegen mit 31% ($p=0,008$). Im Serum der TT Genotyp Patienten (vs. CC bzw. CT Genotyp) wiesen die Autoren zudem signifikant erhöhte sCD14, IFN- γ und TNF- α Konzentrationen nach [68].

BOS entwickeln können nicht nur lungen- sondern auch knochenmarktransplantierte Patienten. Vor diesem Hintergrund transplantierten Garantziotis et al. Mäusen Knochenmark und setzten die Tiere anschließend LPS Aerosolen aus. Drei Tage nach der letzten LPS Behandlung erfolgte eine histologische Aufarbeitung der Mäuselungen. In denen der allogenen transplantierten mit LPS behandelten Tiere fand man hierbei typische OB und LB Anzeichen. In den Lungen der nicht LPS ausgesetzten allogenen transplantierten Tiere und in denen der LPS ausgesetzten syngen transplantierten Tiere konnte man diese Veränderungen nicht nachvollziehen. Einigen Mäusen wurde zudem Knochenmark TLR4 defizienter Spender transplantiert. Die mit dem Mark TLR4 defizienter Spender (vs. Spender ohne TLR4 Defekt) transplantierten Mäuse wiesen einen geringeren pulmonalen Entzündungsgrad auf. Als möglichen therapeutischen Zielpunkt verweisen die Autoren daher auf den TLR4 Signalweg [31].

Weitere Arbeiten, in deren Kontext LPS Bestimmungen im Serum oder in der BALF lungentransplantierten Patienten vorgenommen wurden, liegen uns nicht vor.

Zu den DAMPs, die durch PRRs wie RAGE erkannt werden [37], zählen verschiedene S100 Subtypen und HMGB1. Saito et al. analysierten die BALF von 18 BOS, 10 RAS und 25 nicht CLAD Patienten auf ebendiese DAMPs und ihren Decoy-Rezeptor sRAGE hin. Hinsichtlich der sRAGE Konzentrationen zeigten sich dabei keine wesentlichen Gruppenunterschiede ($p=0,174$). Die DAMP Konzentrationen hingegen differierten auf statistisch signifikantem Niveau. Die Autoren nehmen an, dass sRAGE durch Proteolyse abgebaut oder durch hochregulierte RAGE Liganden (wie S100 und HMGB1) gebunden werden könnte. Folglich seien keine erhöhten Konzentrationen nachweisbar. Weiterhin verweisen Saito et al. auf die Option einer therapeutischen sRAGE Gabe. Die RAGE Liganden würden durch den Decoy-Rezeptor sRAGE gebunden, dem funktionellen RAGE Rezeptor hingegen stünden weniger Liganden zur Verfügung [75]. Nachfolgende Signalkaskaden und insbesondere NF- κ B würden folglich nicht aktiviert [37].

Im Mausmodell zumindest schwächte die Gabe von rekombinantem sRAGE die LPS induzierte NF- κ B Aktivierung, Produktion proinflammatorischer Zytokine und Infiltration durch Neutrophile Granulozyten ab [107].

Shah et al. analysierten sechs und 24 Stunden nach Transplantation entnommene Blutproben auf sRAGE hin. Eine postoperativ erhöhte Plasma Konzentration bringen die Autoren mit der BOS Entwicklung in Verbindung [80].

Die vorliegende Studie sieht hingegen keinen Zusammenhang zwischen der RAGE Serum Konzentration und dem BOS Status. Allerdings wurden die Proben hier durchschnittlich 1802 ± 1569 Tage nach Transplantation entnommen.

Insgesamt gestaltet sich die Studienlage durchaus kontrovers. Während einige Arbeiten eine Assoziation zwischen Biomarkern und CLAD belegt, widerlegen andere diese.

Der zweite Teil der Diskussion widmet sich der Frage, inwieweit SGQR, CAT bzw. MRC klinisch relevante Daten unter Lungentransplantierten liefern. So lautete die Hypothese, steigenden BOS Stadien zugeordnete Patienten erfuhren eher Einschränkungen in ihrer Lebensqualität bzw. ihren Alltagsaktivitäten und erreichten dementsprechend höhere Scores. Weitere Studien, die die Anwendung von SGQR, CAT und MRC in ebendiesem Kollektiv untersuchen, liegen uns nicht vor.

Entgegen der Erwartung erzielten Patienten mit reduzierter Lungenfunktion nicht zwangsläufig höhere Scores. Zwar erreichten die Patienten im BOS Stadium 3 die mit Abstand höchsten SGQR, CAT und MRC Ergebnisse. Zwischen den BOS Stadien 0 und 1 unterscheiden sich die SGQR Mittelwerte ($20,66 \pm 16,09$ vs. $20,39 \pm 16,21$) allerdings nur minimal, obwohl die durchschnittliche FEV1 in % des Solls erheblich schwankt ($79,19 \pm 15,84$ vs. $65,71 \pm 19,65$). Mit dem CAT Score verhält es sich ebenso. Die mittlere Punktzahl beträgt hier $6,62 \pm 3,77$ (BOS Stadium 0) bzw. $6,54 \pm 4,96$ (BOS Stadium 1). Die Lungenfunktionseinschränkung schlägt sich an dieser Stelle somit nur unwesentlich in den SGQR und CAT Scores nieder. Weiterhin erreichten die Patienten im BOS Stadium 0-p geringere SGQR Scores als die Patienten im Stadium 0. Dies gilt im Übrigen auch für CAT und MRC. Beachtung finden sollte hier jedoch Fallzahl. 32 Patienten im Stadium 0 bearbeiteten das SGQR, jeweils 34 CAT und MRC. In den Stadien 0-p und 1 liegt die Zahl bei $n=11$ bzw. $n=13$. Passendere Ergebnisse unter Lungentransplantierten könnte man eventuell durch eine Modifikation bzw. Anpassung der Items erreichen, wie sie beim SGQR-C

[61] vorgenommen wurde. Auch das SGQR-I [105] gewichtet verschiedene Items anders als die Originalversion.

Insgesamt liegt der SGQR Mittelwert des Studienkollektivs mit $21,65 \pm 18,4$ deutlich über dem der Allgemeinbevölkerung. Letztere untersuchten Ferrer et al. hinsichtlich ihrer SGQR Scores. Für 533 Männer und 329 Frauen im Alter von 39 bis 69 Jahre geben sie Mittelwerte von 8,6 bzw. 8,23 an [25].

Die stärkste Korrelation unter den Lungentransplantierten findet sich zwischen SGQR und CAT ($r=0,76$, $p<0,0001$). Ursprünglich entwickelt und in zahlreichen Studien validiert wurde der CAT allerdings für COPD Patienten [50], [38].

Unter 716 COPDlern mit einer durchschnittlichen FEV1 in % des Solls von $82,3 \pm 19,3$ lag die Korrelation zwischen SGQR und CAT bei $r=0,84$ ($p<0,0001$). Die Patienten im GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) Stadium 1 ($n=401$) erreichten durchschnittlich $5,8 \pm 5,0$ Punkte im CAT, die den GOLD Stadien 2 ($n=274$) und 3+ ($n=41$) zugeordneten $9,6 \pm 6,7$ bzw. $16,1 \pm 10,0$ [39].

Der CAT Score steigt mit dem Schweregrad des GOLD Stadiums an. Die Autoren schlussfolgern, dass der CAT nicht nur unter Patienten mit symptomatischer COPD, sondern auch unter solchen mit milder Obstruktion angewandt werden kann [39].

Mit dem Schweregrad des BOS Stadiums steigt der CAT Score hingegen nicht kontinuierlich an.

Die durchschnittliche FEV1 in % des Solls der Lungentransplantierten liegt mit $71,35 \pm 22,12$ ca. 10 Prozentpunkte unter der des eben beschriebenen COPD Kollektivs. Im CAT erzielten die COPDler dennoch einen höheren Mittelwert ($7,8 \pm 6,6$ vs. $7,04 \pm 5,32$).

Interessanterweise erreichten lungentransplantierte Patienten im BOS Stadium 3 mit durchschnittlich $12,5 \pm 8,73$ Punkten geringere CAT Scores als die COPD Patienten im GOLD Stadium 3+ ($16,1 \pm 10,0$). Per Definition beträgt die FEV1 im GOLD Stadium 3 $<50\%$ des Sollwerts, im BOS Stadium 3 $\leq 50\%$ der Baseline.

Ihren Dyspnoe Grad auf der MRC Skala gaben die Patienten im BOS Stadium 1 durchschnittlich höher an als die im Stadium 0. Bei den SGQR und CAT Scores verhält es sich genau umgekehrt. Unter Patienten mit respiratorischen Erkrankungen findet die MRC Skala eine breite Anwendung, ein Vorteil liegt zweifelsfrei in ihrer kurzen Bearbeitungszeit und einfachen Verständlichkeit. Das zeigte sich auch im Studienkollektiv. Das Ausfüllen der MRC Skala fiel den Patienten wesentlich leichter als das des SGQRs mit seiner Fülle an Fragen.

Insgesamt bearbeiteten zu wenige Patienten im BOS Stadium 2 (n=2) SGQR, CAT und MRC, als dass die Ergebnisse als repräsentativ gewertet werden könnten.

Zum Ende der Datenerhebung hin fielen deutlich mehr Patienten in höhere BOS Stadien als noch zu Anfang. Insgesamt verschlechterte sich die Lungenfunktion während des Follow-ups. Der individuelle Verlauf variiert allerdings stark. Während einige Patienten über Jahre hinweg stabile Werte aufweisen, entwickeln andere schnell Funktionsverluste.

Für die Studie ergeben sich einige Limitationen. Zunächst einmal verteilen sich die Patienten sehr inhomogen auf die einzelnen BOS Stadien, wodurch die Fallzahlen erheblich schwanken. Die Tatsache, dass ein Teil der Biomarker Messungen immer noch aussteht, wirkt sich ebenfalls nicht förderlich auf die Aussagekraft der Studie aus. Weiterhin wurden die Patienten nach dem BOS Schema klassifiziert, der RAS und NRAD Phänotyp blieben außen vor. Allerdings sollte die RAS Klassifikation nur für bilateral transplantierte Patienten angewendet werden, somit hätten sich eine noch geringere Fallzahlen ergeben.

Schlussfolgerung: Während des Follow-ups nimmt die Lungenfunktion insgesamt betrachtet ab. Die BOS Patienten und die stabilen Transplantatempfänger weisen keine wesentlichen Unterschiede in ihren IL-6, IL-8, TNF- α , RAGE und LPS Serum Konzentrationen auf. Insgesamt erreichten die Patienten im BOS Stadium 3 die höchsten SGQR, CAT und MRC Scores.

6. Danksagung

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. Dr. Bals für die gute Betreuung und die Bereitstellung des Themas bzw. der erforderlichen Forschungsmaterialien. Großer Dank gilt weiterhin Frau Isabel Gregulitz, gemeinsam haben wir die Patienten in die Studie eingeschlossen. Bedanken möchte ich mich außerdem beim Team der Ambulanz, insbesondere Frau Prof. Dr. Heinrike Wilkens, Frau Dr. Angelika Krill und Schwester Birgit. Die Arbeit in der Ambulanz war sehr angenehm, bei Problemen fand ich hier tatkräftige Unterstützung. Mein Dank gilt ebenso Frau Dipl.-Inform. Med. Monika Flaig für die Zusammenstellung der Daten und die geduldige Einweisung in diverse Computerprogramme. Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Seibert, den restlichen Mitarbeitern des Studiensekretariats und bei Frau Dipl. Biol. Bettina Weingard. Auch hier fand ich immer Unterstützung. Ein großes Dankeschön gilt auch den Mitarbeitern des Forschungslabors der Pneumologie. Frau Victoria Weinhold, Frau Eva Papatsanis und Herr Dr. Christian Herr führten die Bestimmungen der Biomarker durch und wiesen mich geduldig in die Messmethodik ein. Last but not least danke ich meiner Familie für die große Unterstützung während des kompletten Studiums.

7. Literaturverzeichnis

1. Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, Frei R, Garbani M, Globinska A, Hess L, Huitema C, Kubo T, Komlosi Z, Konieczna P, Kovacs N, Kucuksezer UC, Meyer N, Morita H, Olzhausen J, O'Mahony L, Pezer M, Prati M, Rebane A, Rhyner C, Rinaldi A, Sokolowska M, Stanic B, Sugita K, Treis A, van de Veen W, Wanke K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Wirz OF, Zakzuk JS, Akdis CA (2016) Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138:984–1010
2. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, Oates JA, Peck CC, Schooley RT, Spilker BA, Woodcock J, Zeger SL (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 69:89–95
3. Badri L, Murray S, Liu LX, Walker NM, Flint A, Wadhwa A, Chan KM, Toews GB, Pinsky DJ, Martinez FJ, Lama VN (2011) Mesenchymal stromal cells in bronchoalveolar lavage as predictors of bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183:1062–1070
4. Bang FB (1953) The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots. *Biological Bulletin* 105:447–448
5. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF, Strieter RM (2001) Critical role for the MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 108:547–556
6. Benzmira M, Calligaro GL, Glanville AR (2017) Acute rejection. *Journal of Thoracic Disease* 9:5440–5457
7. Berastegui C, Román J, Monforte V, Bravo C, López-Meseguer M, Montero MA, Culebras M, Gómez-Ollés S, Román A (2013) Biomarkers of pulmonary rejection. *Transplantation Proceedings* 45:3163–3169
8. Berastegui C, Gómez-Ollés S, Sánchez-Vidaurre S, Culebras M, Monforte V, López-Meseguer M, Bravo C, Ramon M-A, Romero L, Sole J, Cruz M-J, Román A (2017) BALF cytokines in different phenotypes of chronic lung allograft dysfunction in lung transplant patients. *Clinical Transplantation* 31:1–8
9. Bestall JC, Paul EA, Garrod R, Garnham R, Jones PW, Wedzicha JA (1999) Usefulness of the Medical Research Council (MRC) dyspnoea scale as a measure of disability in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 54:581–586
10. Bharat A, Narayanan K, Street T, Fields RC, Steward N, Aloush A, Meyers B, Schuessler R, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T (2007) Early Posttransplant Inflammation Promotes the Development of Alloimmunity and Chronic Human Lung Allograft Rejection. *Transplantation* 83:150–158
11. Borthwick LA, Parker SM, Brougham KA, Johnson GE, Gorowiec MR, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ (2009) Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and airway remodelling after human lung transplantation. *Thorax* 64:770–777
12. Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR, Brodlie M, Johnson GE, Ward C, Lordan JL, Corris PA, Kirby JA, Fisher AJ (2010) Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair. *American Journal of Transplantation* 10:498–509
13. Budding K, Van de Graaf EA, Kardol-Hoefnagel T, Kwakkel-van Erp JM, Luijk

- BD, Oudijk E-JD, Van Kessel DA, Grutters JC, Hack CE, Otten HG (2016) Soluble CD59 is a novel biomarker for the prediction of obstructive chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *Scientific Reports* 6:1–7
14. Budding K, Rossato M, Van de Graaf EA, Kwakkel-van Erp JM, Radstake TRDJ, Otten HG (2017) Serum miRNAs as potential biomarkers for the bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplant Immunology* 42:1–4
15. Cameli P, Bargagli E, Fossi A, Bennett D, Voltolini L, Refini RM, Gotti G, Rottoli P (2015) Exhaled nitric oxide and carbon monoxide in lung transplanted. *Respiratory Medicine* 109:1224–1229
16. Chambers DC, Yusen RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Rossano JW, Stehlik J (2017) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-fourth adult lung and heart-lung transplantation report—2017; focus theme: allograft ischemic time. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 36:1047–1059
17. Christie JD, Shah C V, Kawut SM, Mangalmurti N, Lederer DJ, Sonett JR, Ahya VN, Palmer SM, Wille K, Lama V, Shah PD, Shah A, Weinacker A, Deutschman CS, Kohl BA, Demissie E, Bellamy S, Ware LB (2009) Plasma levels of receptor for advanced glycation end products, blood transfusion, and risk of primary graft dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180:1010–1015
18. Cooper JD, Billingham M, Egan T, Hertz MI, Higenbottam T, Lynch J, Mauer J, Paradis I, Patterson GA, Smith C, Trulock EP, Vreim C, Yousem S (1993) A working formulation for the standardization of nomenclature and for clinical staging of chronic dysfunction in lung allografts. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 12:713–716
19. D'Ovidio F, Mura M, Tsang M, Waddell TK, Hutcheon MA, Singer LG, Hadjiliadis D, Chaparro C, Gutierrez C, Pierre A, Darling G, Liu M, Keshavjee S (2005) Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129:1144–1152
20. Danger R, Royer P-J, Reboulleau D, Durand E, Loy J, Tissot A, Lacoste P, Roux A, Reynaud-Gaubert M, Gomez C, Kessler R, Mussot S, Dromer C, Brugière O, Mornex J-F, Guillemain R, Dahan M, Knoop C, Botturi K, Foureau A, Pison C, Koutsokera A, Nicod LP, Brouard S, Magnan A (2018) Blood gene expression predicts bronchiolitis obliterans syndrome. *Frontiers in Immunology* 8:1–11
21. Daud SA, Yusen RD, Meyers BF, Chakinala MM, Walter MJ, Aloush AA, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR (2007) Impact of Immediate Primary Lung Allograft Dysfunction on Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175:507–513
22. De Jong PA, Vos R, Verleden GM, Vanaudenaerde BM, Verschakelen JA (2011) Thin-section Computed Tomography findings before and after azithromycin treatment of neutrophilic reversible lung allograft dysfunction. *European Radiology* 21:2466–2474
23. Estenne M, Maurer JR, Boehler A, Egan JJ, Frost A, Hertz M, Mallory GB, Snell GI, Yousem S, Barr M, Chaparro C, Corris P, Doyle R, Glanville A, Klepetko W, McNeil K, Orens J, Singer L, Trulock E, Waddell T, Waltz D, Zamora M (2002) Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: an update of the diagnostic criteria. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 21:297–310

24. Fagan KA, Mcmurtry IF, Rodman DM (2001) Role of endothelin-1 in lung disease. *Respiratory Research* 2:90–101
25. Ferrer M, Villasante C, Alonso J, Sobradillo V, Gabriel R, Vilagut G, Masa JF, Viejo JL, Jiménez-Ruiz CA, Miravittles M (2002) Interpretation of quality of life scores from the St George's Respiratory Questionnaire. *European Respiratory Journal* 19:405–413
26. Fisichella PM, Davis CS, Lowery E, Ramirez L, Gamelli RL, Kovacs EJ (2013) Aspiration, localized pulmonary inflammation, and predictors of early-onset bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Journal of the American College of Surgeons* 217:90–100
27. Fletcher CM (1952) The clinical diagnosis of pulmonary emphysema- an experimental study. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 45:577–584
28. Fletcher CM, Elmes PC, Fairbairn AS, Wood CH (1959) The significance of respiratory symptoms and the diagnosis of chronic bronchitis in a working population. *British Medical Journal* 2:257–266
29. Fritz G (2011) RAGE: A single receptor fits multiple ligands. *Trends in Biochemical Sciences* 36:625–632
30. Gabbay E, Walters EH, Orsida B, Whitford H, Ward C, Kotsimbos TC, Snell GI, Williams TJ (2000) Post-lung transplant bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) is characterized by increased exhaled nitric oxide levels and epithelial inducible nitric oxide synthase. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162:
31. Garantziotis S, Palmer SM, Snyder LD, Ganous T, Chen BJ, Wang T, Cook DN, Schwartz DA (2007) Alloimmune Lung Injury by Local Innate Immune Activation Through Inhaled Lipopolysaccharide. *Transplantation* 84:1012–1019
32. Gauthier JM, Hachem RR, Kreisel D (2016) Update on chronic lung allograft dysfunction. *Current Transplantation Reports* 3:185–191
33. Gerhardt SG, McDyer JF, Girgis RE, Conte J V., Yang SC, Orens JB (2003) Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 168:121–125
34. Gottlieb J, Szangolies J, Koehnlein T, Golpon H, Simon A, Welte T (2008) Long-term azithromycin for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation* 85:36–41
35. Gottlieb J, Smits J, Schramm R, Langer F, Buhl R, Witt C, Strueber M, Reichenspurner H (2017) Lungentransplantation in Deutschland nach Einführung des Lung Allocation Score. *Deutsches Ärzteblatt* 114:179–185
36. Greer M, Dierich M, De Wall C, Suhling H, Rademacher J, Welte T, Haverich A, Warnecke G, Ivanyi P, Buchholz S, Gottlieb J, Fuehner T (2013) Phenotyping established chronic lung allograft dysfunction predicts extracorporeal photopheresis response in lung transplant patients. *American Journal of Transplantation* 13:911–918
37. Guo WA, Knight PR, Raghavendran K (2012) The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Medicine* 38:1588–1598
38. Gupta N, Pinto LM, Morogan A, Bourbeau J (2014) The COPD assessment test: a systematic review. *European Respiratory Journal* 44:873–884
39. Gupta N, Pinto L, Benedetti A, Li PZ, Tan WC, Aaron SD, Chapman KR, FitzGerald JM, Hernandez P, Marciniuk DD, Maltais F, O'Donnell DE, Sin D, Walker BL, Bourbeau J (2016) The COPD Assessment Test: Can It

- Discriminate Across COPD Subpopulations? *Chest* 150:1069–1079
40. Hachem RR, Tiriveedhi V, Patterson GA, Aloush A, Trulock EP, Mohanakumar T (2012) Antibodies to K- α 1 tubulin and collagen V are associated with chronic rejection after lung transplantation. *American Journal of Transplantation* 12:2164–2171
 41. Hall DJ, Baz M, Daniels MJ, Staples ED, Klodell CT, Moldawer LL, Beaver TM (2012) Immediate postoperative inflammatory response predicts long-term outcome in lung-transplant recipients. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery* 15:603–607
 42. Hardy JD, Webb WR, Dalton ML, Walker GR (1963) Lung homotransplantation in man. *JAMA* 186:1065–1074
 43. Hartert M, Senbaklavaci Ö, Gohrbandt B, Fischer BM, Buhl R, Vahl C-F (2014) Lungentransplantation – Therapieoption bei Lungenerkrankungen im Endstadium. *Deutsches Ärzteblatt* 111:107–116
 44. Heijink IH, Rozeveld D, Van Der Heide S, Van Der Bij W, Bischoff R, Van Oosterhout AJ, Van Der Toorn M (2015) Metalloproteinase profiling in lung transplant recipients with good outcome and bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 99:1946–1952
 45. Hütter BO (2003) SGQR-St. Georges Respiratory Questionnaire. Hogrefe, Göttingen
 46. Iwanaga S (2007) Biochemical principle of limulus test for detecting bacterial endotoxins. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 83:110–119
 47. Jaksch P, Taghavi S, Klepetko W, Salama M (2014) Pretransplant serum human chitinase-like glycoprotein YKL-40 concentrations independently predict bronchiolitis obliterans development in lung transplant recipients. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 148:273–281
 48. Jones PW, Quirk FH, Baveystock CM (1991) The St George's Respiratory Questionnaire. *Respiratory Medicine* 85:25–31
 49. Jones PW, Quirk FH, Baveystock CM, Littlejohns P (1992) A self-complete measure of health status for chronic airflow limitation. *American Review of Respiratory Disease* 145:1321–1327
 50. Jones PW, Harding G, Berry P, Wiklund I, Chen W-H, Leidy NK (2009) Development and first validation of the COPD Assessment Test. *European Respiratory Journal* 34:648–654
 51. Jonigk D, Izykowski N, Rische J, Braubach P, Kühnel M, Warnecke G, Lippmann T, Kreipe H, Haverich A, Welte T, Gottlieb J, Laenger F (2015) Molecular profiling in lung biopsies of human pulmonary allografts to predict chronic lung allograft dysfunction. *The American Journal of Pathology* 185:3178–3188
 52. Kennedy VE, Todd JL, Palmer SM (2013) Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose, and understand bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Transplantation* 13:552–561
 53. Knollmann FD, Ewert R (2001) Bronchiolitis obliterans nach Lungentransplantation. *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 15:124–125
 54. Korthagen NM, Van Moorsel CHM, Barlo NP, Ruven HJT, Kruit A, Heron M, Van den Bosch JMM, Grutters JC (2011) Serum and BALF YKL-40 levels are predictors of survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Medicine* 105:106–113
 55. Levine DJ, Glanville AR, Aboyoun C, Belperio J, Benden C, Berry GJ, Hachem R, Hayes D, Neil D, Reinsmoen NL, Snyder LD, Sweet S, Tyan D, Verleden G,

- Westall G, Yusen RD, Zamora M, Zeevi A (2016) Antibody-mediated rejection of the lung: a consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 35:397–406
56. Lindsey JB, Cipollone F, Abdullah SM, McGuire DK (2009) Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications. *Diabetes and Vascular Disease Research* 6:7–14
 57. Mahler DA, Wells CK (1988) Evaluation of clinical methods for rating dyspnea. *Chest* 93:580–586
 58. Manali ED, Lyberopoulos P, Triantafillidou C, Kolilekas LF, Sotiropoulou C, Milic-Emili J, Roussos C, Papiris SA (2010) MRC chronic Dyspnea Scale: Relationships with cardiopulmonary exercise testing and 6-minute walk test in idiopathic pulmonary fibrosis patients: a prospective study. *BMC Pulmonary Medicine* 10:1–10
 59. Marshall SR (2006) Technology Insight: ECP for the treatment of GvHD - Can we offer selective immune control without generalized immunosuppression? *Nature Clinical Practice Oncology* 3:302–314
 60. Maselli D, Zatikyan N, Stephens B, Velez M, Burguete S, Keyt H, Levine S, Restrepo M, Levine D, Angel L (2017) The Role of Fraction of Exhaled Nitric Oxide in Allograft Dysfunction in Lung Transplant Recipients. *CHEST* 152:A1099
 61. Meguro M, Barley EA, Spencer S, Jones PW (2007) Development and validation of an improved, COPD-specific version of the St. George Respiratory Questionnaire. *CHEST* 132:456–463
 62. Meloni F, Solari N, Morosini M, Cascina A, Oggionni T, Bini F, Viganò M, Fietta AM (2011) Clinical and immunological evaluation of 12-month azithromycin therapy in chronic lung allograft rejection. *Clinical Transplantation* 25:381–389
 63. Meyer KC, Raghu G, Verleden GM, Corris PA, Aurora P, Wilson KC, Brozek J, Glanville AR (2014) An international ISHLT/ATS/ERS clinical practice guideline: diagnosis and management of bronchiolitis obliterans syndrome. *European Respiratory Journal* 44:1479–1503
 64. Nawrot TS, Vos R, Jacobs L, Verleden SE, Wauters S, Mertens V, Doms C, Hoet PH, Van Raemdonck DE, Faes C, Dupont LJ, Nemery B, Verleden GM, Vanaudenaerde BM (2011) The impact of traffic air pollution on bronchiolitis obliterans syndrome and mortality after lung transplantation. *Thorax* 66:748–754
 65. Neujahr DC, Perez SD, Mohammed A, Ulukpo O, Lawrence EC, Fernandez F, Pickens A, Force SD, Song M, Larsen CP, Kirk AD (2012) Cumulative exposure to gamma interferon-dependent chemokines CXCL9 and CXCL10 correlates with worse outcome after lung transplant. *American Journal of Transplantation* 12:438–446
 66. Ofek E, Sato M, Saito T, Wagnetz U, Roberts HC, Chaparro C, Waddell TK, Singer LG, Hutcheon MA, Keshavjee S, Hwang DM (2013) Restrictive allograft syndrome post lung transplantation is characterized by pleuroparenchymal fibroelastosis. *Modern Pathology* 26:350–356
 67. Palmer SM, Burch LH, Trindade AJ, Davis RD, Herczyk WF, Reinsmoen NL, Schwartz DA (2005) Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplant. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171:780–785
 68. Palmer SM, Klimecki W, Yu L, Reinsmoen NL, Snyder LD, Ganous TM, Burch L, Schwartz DA (2007) Genetic regulation of rejection and survival following human lung transplantation by the innate immune receptor CD14. *American*

- Journal of Transplantation 7:693–699
69. Raetz CRH, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry* 71:635–700
 70. Rezaia S, Amirmozaffari N, Tabarraei B, Jeddi-Tehrani M, Zarei O, Alizadeh R, Masjedian F, Zarnani AH (2011) Extraction , Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 3:3–9
 71. Riise GC, Ericson P, Bozinovski S, Yoshihara S, Anderson GP, Lindén A (2010) Increased net gelatinase but not serine protease activity in bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 29:800–807
 72. Roden AC, Aisner DL, Allen TC, Aubry MC, Barrios RJ, Beasley MB, Cagle PT, Capelozzi VL, Dacic S, Ge Y, Hariri LP, Lantuejoul S, Miller RA, Mino-Kenudson M, Moreira AL, Raparia K, Rekhtman N, Sholl L, Smith ML, Tsao MS, Vivero M, Yatabe Y, Yi ES (2017) Diagnosis of acute cellular rejection and antibody-mediated rejection on lung transplant biopsies: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 141:437–444
 73. Safavi S, Robinson DR, Soresi S, Carby M, Smith JD (2014) De novo donor HLA-specific antibodies predict development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 33:1273–1281
 74. Saito T, Takahashi H, Kaneda H, Binnie M, Azad S, Sato M, Waddell TK, Cypel M, Liu M, Keshavjee S (2013) Impact of cytokine expression in the pre-implanted donor lung on the development of chronic lung allograft dysfunction subtypes. *American Journal of Transplantation* 13:3192–3201
 75. Saito T, Liu M, Binnie M, Sato M, Hwang D, Azad S, Machuca TN, Zamel R, Waddell TK, Cypel M, Keshavjee S (2014) Distinct Expression Patterns of Alveolar “Alarmins” in Subtypes of Chronic Lung Allograft Dysfunction. *American Journal of Transplantation* 14:1425–1432
 76. Salama M, Jaksch P, Andrukhova O, Taghavi S, Klepetko W, Aharinejad S (2010) Endothelin-1 is a useful biomarker for early detection of bronchiolitis obliterans in lung transplant recipients. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 140:1422–1427
 77. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, Wagnetz D, Chaparro C, Singer LG, Hutcheon MA, Keshavjee S (2011) Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 30:735–742
 78. Sato M (2013) Chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation: the moving target. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery* 61:67–78
 79. Scholma J, Slebos D-J, Boezen HM, Van den Berg JWK, Van der Bij W, De Boer WJ, Koëter GH, Timens W, Kauffman HF, Postma DS (2000) Eosinophilic Granulocytes and Interleukin-6 Level in Bronchoalveolar Lavage Fluid Are Associated with the Development of Obliterative Bronchiolitis after Lung Transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162:2221–2225
 80. Shah RJ, Bellamy SL, Lee JC, Cantu E, Diamond JM, Mangalmurti N, Kawut SM, Ware LB, Christie JD (2013) Early plasma soluble Receptor for Advanced Glycation End Product levels are associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Transpalntation* 13:754–759
 81. Shaver CM, Ware LB (2017) Primary graft dysfunction: pathophysiology to

- guide new preventive therapies. *Expert Review of Respiratory Medicine* 11:119–128
82. Stewart S, Fishbein MC, Snell GI, Berry GJ, Boehler A, Burke MM, Glanville A, Gould FK, Magro C, Marboe CC, McNeil KD, Reed EF, Scott JP, Studer SM, Tazelaar HD, Wallwork JL, Westall G, Zamora MR, Zeevi A, Yousem SA (2007) Revision of the 1995 working formulation for the standardisation of nomenclature in the diagnosis of lung rejection. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 26:1229–1242
 83. Strüber M, Reichenspurner H (2011) Die Einführung des Lungenallokations-Scores für die Lungentransplantation in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt* 108:2424
 84. Suhling H, Dettmer S, Greer M, Fuehner T, Avsar M, Haverich A, Welte T, Gottlieb J (2016) Phenotyping chronic lung allograft dysfunction using body plethysmography and computed tomography. *American Journal of Transplantation* 16:3163–3170
 85. Tiriveedhi V, Banan B, Deepti S, Nataraju A, Hachem R, Trulock E, Alexander PG, Mohanakumar T (2014) Role of defensins in the pathogenesis of chronic lung allograft rejection. *Human Immunology* 75:370–377
 86. Todd JL, Palmer SM (2011) Bronchiolitis obliterans syndrome: The final frontier for lung transplantation. *Chest* 140:502–508
 87. Todd JL, Wang X, Sugimoto S, Kennedy VE, Zhang HL, Pavlisko EN, Kelly FL, Huang H, Kreisel D, Palmer SM, Gelman AE (2014) Hyaluronan contributes to bronchiolitis obliterans syndrome and stimulates lung allograft rejection through activation of innate immunity. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 189:556–566
 88. Vanaudenaerde BM, Meyts I, Vos R, Geudens N, De Wever W, Verbeken EK, Van Raemdonck DE, Dupont LJ, Verleden GM (2008) A dichotomy in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation revealed by azithromycin therapy. *European Respiratory Journal* 32:832–843
 89. Vanaudenaerde BM, De Vleeschauwer SI, Vos R, Meyts I, Bullens DM, Reynders V, Wuyts WA, Van Raemdonck DE, Dupont LJ, Verleden GM (2008) The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *American Journal of Transplantation* 8:1911–1920
 90. Verleden GM, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Van Raemdonck DE (2006) Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174:566–570
 91. Verleden GM, Vos R, Verleden SE, De Wever W, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Scheers H, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, Vanaudenaerde BM (2011) Survival determinants in lung transplant patients with chronic allograft dysfunction. *Transplantation* 92:703–708
 92. Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P (2014) A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 33:127–133
 93. Verleden GM, Vos R, Dupont L, Van Raemdonck DE, Vanaudenaerde BM, Verleden SE (2014) Are we near to an effective drug treatment for bronchiolitis obliterans? *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 15:2117–2120
 94. Verleden SE, Ruttens D, Vandermeulen E, Vaneylen A, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, Verleden GM, Vanaudenaerde BM, Vos R (2013) Bronchiolitis Obliterans Syndrome and Restrictive Allograft Syndrome: Do Risk Factors Differ ? *Transplantation* 95:1167–1172

95. Verleden SE, Ruttens D, Vandermeulen E, Van Raemdonck DE, Vanaudenaerde BM, Verleden GM, Vos R (2014) Elevated bronchoalveolar lavage eosinophilia correlates with poor outcome after lung transplantation. *Transplantation* 97:83–89
96. Verleden SE, Ruttens D, Vos R, Vandermeulen E, Moelants E, Mortier A, Van Raemdonck DE, Proost P, Schols D, Verleden GM, Vanaudenaerde BM (2015) Differential Cytokine, Chemokine and Growth Factor Expression in Phenotypes of Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Transplantation* 99:86–93
97. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM (2016) Advances in understanding bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *CHEST* 150:219–225
98. Verleden SE, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM (2017) Chronic lung allograft dysfunction phenotypes and treatment. *Journal of Thoracic Disease* 9:2650–2659
99. Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Van Raemdonck DE, Schoonis A, Nawrot TS, Dupont LJ, Verleden GM (2011) A randomised controlled trial of azithromycin to prevent chronic rejection after lung transplantation. *European Respiratory Journal* 37:164–172
100. Vos R, Verleden SE, Ruttens D, Vandermeulen E, Yserbyt J, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, De Raedt N, Gheysens O, De Jong PA, Verleden GM, Vanaudenaerde BM (2013) Pirfenidone: A potential new therapy for restrictive allograft syndrome? *American Journal of Transplantation* 13:3035–3040
101. Walker N, Badri L, Wettlaufer S, Flint A, Sajjan U, Krebsbach PH, Keshamouni VG, Peters-Golden M, Lama VN (2011) Resident tissue-specific mesenchymal progenitor cells contribute to fibrogenesis in human lung allografts. *American Journal of Pathology* 178:2461–2469
102. Weigt SS, DerHovanessian A, Wallace WD, Lynch JP, Belperio JA (2013) Bronchiolitis obliterans syndrome: the achilles' heel of lung transplantation. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* 34:336–351
103. Wilson CB, Jones PW, O'Leary CJ, Cole PJ, Wilson R (1997) Validation of the St. George's Respiratory Questionnaire in bronchiectasis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156:536–541
104. Xia C-Q, Campbell KA, Clare-Salzler MJ (2009) Extracorporeal photopheresis-induced immune tolerance: a focus on modulation of antigen-presenting cells and induction of regulatory T cells by apoptotic cells. *Current Opinion in Organ Transplantation* 14:338–343
105. Yorke J, Jones PW, Swigris JJ (2010) Development and validity testing of an IPF-specific version of the St George's Respiratory Questionnaire. *Thorax* 65:921–926
106. Yusen RD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Goldfarb SB, Levvey BJ, Lund LH, Meiser B, Stehlik J (2014) The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty- first Adult Lung and Heart – Lung Transplant Report — 2014; Focus Theme: Retransplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 33:1009–1024
107. Zhang H, Tasaka S, Shiraishi Y, Fukunaga K, Yamada W, Seki H, Ogawa Y, Miyamoto K, Nakano Y, Hasegawa N, Miyasho T, Maruyama I, Ishizaka A (2008) Role of soluble receptor for advanced glycation end products on endotoxin-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178:356–362