

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Methodenvergleich zum Nachweis von
'Anti-Neutrophil-Cytoplasmic Antibodies' (ANCA)
und klinische Relevanz der ANCA bei Patienten mit
chronischen Erkrankungen unter besonderer
Berücksichtigung autoimmuner Lebererkrankungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Maren Sy
aus
Reutlingen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Stern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1-1
2	Patienten und Methodik	2-1
2.1	Patienten und Kontrollen	2-1
2.2	Material und Methoden	2-8
2.2.1	Granulozytenpräparation	2-8
2.2.2	Immunfluoreszenztest (IFL)	2-9
2.2.3	ELISA	2-11
2.2.4	Western Blot	2-14
2.2.5	Proteinbestimmung	2-19
2.3	Statistische Datenanalyse	2-20
3	Ergebnisse	3-1
3.1	Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis	3-1
3.1.1	Einfluß der Granulozytenherkunft auf das Testergebnis:	3-1
3.1.2	Einfluß der Fixierungsmethode auf das Testergebnis	3-3
3.1.3	Konstanz der Testergebnisse bei zweifacher Untersuchung:	3-13
3.2	Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest	3-16
3.2.1	Auftreten von ANCA bei verschiedenen Patientengruppen	3-17
3.2.2	Zusammenhang zwischen ANCA und laborchemischen und serologischen Parametern	3-25
3.2.3	Zusammenfassung der Laborbefunde	3-39
3.3	Nachweis von ANCA mit dem ELISA	3-40
3.4	Antigenidentifizierung im Western Blot	3-44
4	Diskussion	4-1
4.1	Faktoren, die den Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest beeinflussen.	4-1
4.1.1	Einfluß der Granulozytenherkunft auf den Nachweis von ANCA	4-1
4.1.2	Einfluß der Fixierungsmethode auf den Nachweis von ANCA	4-2
4.2	Prävalenz von ANCA und Assoziation mit Laborparametern und Antikörpern	4-6
4.2.1	Prävalenz von ANCA bei Detektion im indirekten Immunfluoreszenztest	4-6
4.2.2	Zusammenhang zwischen ANCA und Laborparametern	4-8
4.2.3	Zusammenhang zwischen ANCA und Serum-Immunglobulinen	4-9
4.2.4	Zusammenhang zwischen ANCA und anderen Autoantikörpern:	4-11

Inhaltsverzeichnis	Seite
4.3 Detektion von AK gegen Neutrophile Granulozyten mit dem ELISA	4-12
4.4 Identifikation spezifischer Determinanten im Western Blot	4-15
4.5 Schlussfolgerungen	4-17
5 Zusammenfassung	5-1
6 Literaturverzeichnis	6-1

Abkürzungen

AIH:	Autoimmune Hepatitis
AK:	Antikörper
ANCA :	Anti-Neutrophil-cytoplasmic Antikörper
ANNA:	Anti-Neutrophil-nuclear-Antikörper
APS:	Antiphospholipid Syndrom
BPI:	bactericidal/permeability increasing Protein
cANCA:	zytoplasmatische ANCA
CU:	Colitis ulcerosa
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Hep C :	Hepatitis C
IFL:	Immunfluoreszenztest
kD:	kilo Dalton
LZ:	Leberzirrhose
MPO:	Myeloperoxidase
M Weg.:	M. Wegener
pANCA:	perinukleäre ANCA
PBC:	Primär biliäre Zirrhose
PR3:	Proteinase 3
PSC:	Primär sklerosierende Cholangitis
Vask.:	Vaskulitis

1 Einleitung

Die erste Beschreibung von IgG Antikörpern gegen zytoplasmatische Bestandteile neutrophiler Granulozyten (ANCA) bei Patienten mit M. Wegener und systemischer Vaskulitis stammt von Davies et. al. aus dem Jahre 1982 [19]. 1985 erkannten Van der Woude et. al. die hohe diagnostische Spezifität von ANCA für den M. Wegener und die Korrelation der Antikörpertiter mit dem Krankheitsverlauf [97].

Auf dem ersten internationalen ANCA Workshop 1988 wurde ein Standardverfahren zur Detektion von ANCA mit dem indirekten Immunfluoreszenztest festgelegt, bei dem Ethanol fixierte Granulozyten verwendet werden [65, 95]. Dieses Verfahren wurde von der EEC/BCR-Gruppe der ANCA-Teststandardisierung bestätigt [35]. Definiert sind ANCA als Antikörper gegen neutrophile zytoplasmatische Antigene [65].

Mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (IFL) lassen sich zwei Arten von ANCA nachweisen, die klassischen zytoplasmatischen ANCA (cANCA) und die ANCA, die ein perinukleäres Muster im Immunfluoreszenztest aufweisen (pANCA).

Klassische zytoplasmatische ANCA (cANCA)

Die klassischen ANCA (cANCA) produzieren an Ethanol fixierten Granulozyten eine zytoplasmatische granuläre Färbung mit zentraler oder interlobulärer Akzentuierung der Fluoreszenz [96, 65].

cANCA sind sensitive Marker für den M. Wegener [97], eine granulomatöse Vaskulitis, bei der sie in ca. 90% der Fälle vorkommen. Sie sind gegen Proteinase 3 gerichtet.

Bei der Proteinase 3 (PR3) handelt es sich um eine 29 kD Serin-Protease, die in den azurophilen Granula der Neutrophilen Granulozyten und in den peroxidase-positiven Lysosomen der Monozyten vorkommt [31, 53, 48, 9]. Die PR3 wird bei entzündlichen Vorgängen zusammen mit anderen Granulabestandteilen und Sauerstoffradikalen freigesetzt und zerstört Kollagen, Proteoglykane und andere Bindegewebe [94]. Zusätzlich verfügt die PR3 über eine nicht-proteolytische antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien und Pilze [27]. Physiologischerweise wird die PR3 durch α 1-Antitrypsin inhibiert [41]. Zirkulierende PR3 findet man in Seren von Patienten mit M. Wegener und Polyarteriitis nodosa, in niedrigeren Konzentrationen auch bei Gesunden [39].

pANCA (klassische pANCA)

Die zweite Form der im IFL nachweisbaren ANCA zeigen an Alkohol fixierten Neutrophilen Granulozyten ein perinukleäres Fluoreszenzmuster (pANCA). Sie treten bei Patienten mit rapid progressiver Glomerulonephritis und mikroskopischer Polyangiitis auf [24]. Aber auch bei vielen nicht vaskulitischen Erkrankungen lassen sich pANCA im IFL nachweisen, beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa und M. Crohn), PSC, AIH, rheumatoider Arthritis, Malignomen und Infektionen [25].

Die im Zusammenhang mit vaskulitischen Erkrankungen auftretenden pANCA richten sich vor allem gegen Myeloperoxidase (MPO). Dabei handelt es sich bei dem perinukleären Muster der ANCA um ein "Artefakt" das durch die Fixierung der Granulozyten mit Alkohol entsteht [93].

Die MPO ist wie die PR3 in den azurophilen Granula der Neutrophilen Granulozyten und den Lysosomen der Monozyten lokalisiert. Sie liegt als kovalent gebundenes Dimer mit einem Molekulargewicht von 140 kD vor [93].

Die MPO katalysiert die H_2O_2 -vermittelte Peroxidation des Chloridions zu Hypochlorsäure die effektiv phagozytierte Bakterien und Viren abtötet [38]. Zusätzlich inaktiviert die MPO Proteinaseinhibitoren wie α_1 -Antitrypsin und spielt so im Rahmen von entzündlichen Geschehen eine Rolle [92]. Inaktiviert wird die MPO durch Coeruloplasmin [73].

Die MPO ist stark kationisch. Werden Granulozyten mit Ethanol fixiert, kommt es zur Zerstörung der Granula und die MPO bewegt sich zum negativ geladenen Zellkern [93]. Durch diesen Vorgang entsteht das perinukleäre Muster der ANCA.

Andere Antikörper bei systemischen Vaskulitiden, die im IFL mit alkoholfixierten Granulozyten ein perinukleäres Muster hervorrufen sind Elastase und Cathepsin G [30, 31, 24].

pANCA bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, PSC, autoimmuner Hepatitis (atypische pANCA)

pANCA, die im Rahmen nicht-vaskulitischer Erkrankungen auftreten, sind nicht gegen PR3 oder MPO gerichtet [25, 3, 75]. Die Identität der Antigene, gegen die sich pANCA bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, PSC oder AIH richten, ist bis heute nicht geklärt. Antikörper gegen Cathepsin G wurden bei pANCA positiven Patienten mit PSC oder Colitis ulcerosa in 0-64 % der Fälle gefunden [49, 22, 20], Lactoferrin-Antikörper bei 22-50 % [58, 52, 22].

Andere Studien zeigten Antikörper gegen Katalase und α -Enolase bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, PSC, AIH und PBC [68, 56, 1, 67].

Diese Antigene konnten von anderen Autoren jedoch nur bei einem kleinen Teil der pANCA positiven Patienten nachgewiesen werden (Elastase-, Cathepsin G-, Lactoferrin-AK) [101, 36] oder sind auch in den meisten anderen eukaryonten Zellen vorhanden (Katalase, α -Enolase) [84].

Anti-Neutrophil-nuclear-Antikörper (ANNA):

Sobajima et. al. beschrieben bei pANCA positiven Patienten mit Colitis ulcerosa "high mobility group non-histon chromosomal" Proteine (HMG1 und HMG2), die pANCA-Antigene darstellen [78]. Diese Proteine sind zwar antinukleäre Proteine [18], kommen aber auch in größeren Mengen im Zytoplasma vor [21, 8].

Auch Histon H1 wurde als Antigen für pANCA bei Colitis ulcerosa bezeichnet [32].

Jedoch sind weder die HMG1/2 Proteine noch das Histon H1 spezifisch für neutrophile Granulozyten, so dass die Hypothese formuliert wurde, bestimmte Epitope dieser Proteine seien nur in neutrophilen Granulozyten zugänglich für Antikörper [15, 16].

Die 1986 von Chapman et. al. beschriebenen Antikörper gegen proliferierende Gallengänge [10] wurden später als Antikörper gegen Neutrophile Granulozyten identifiziert [77, 75], und das Antigen wurde von Snook et. al. 1989 in den Kernen von gewebständigen Neutrophilen Granulozyten der Periportalfelder lokalisiert [77].

Auch Billing und Terjung zeigten, dass ANCA bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und hepatobiliären Erkrankungen nicht mit zytoplasmatischen Strukturen reagieren [5, 83].

2000 charakterisierten Terjung et. al. das Fluoreszenzmuster atypischer pANCA als breiten inhomogenen Saum in der Kernperipherie mit multiplen intranukleären fluo-

reszierenden Foci. [84]. Dabei korrespondieren diese intranukleären Foci mit Invaginationen der Kernhülle [83, 26].

Es wurde ein 50 kD Kernhüllenprotein myeloider Zellen identifiziert, das von 92 % der pANCA bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, PSC und AIH erkannt wurde. cANCA und klassische pANCA gegen MPO reagierten nicht mit diesem Protein [84].

Daraus leiteten Terjung et. al. die Forderung ab, atypische pANCA künftig als Anti-Neutrophil-nuclear-Antikörper (ANNA) zu bezeichnen [84].

Bactericidal/permeability-increasing Protein (BPI):

1991 beschrieben Falk et. al. Patienten mit Vaskulitis, deren Seren ein antimikrobielles 57 kD Protein im Western Blot erkennen [23].

Zaho et. al. identifizierten bei 45 % der anti-PR3 und anti-MPO negativen Vaskulitispatienten ein 55 kD Protein als Antigen [101]. Dieses Protein ist bekannt als Bactericidal/permeability-increasing Protein (BPI), und es konnte gezeigt werden, dass es mit dem von Falk et. al. beschriebenen Antigen für pANCA identisch ist [101].

BPI ist ein Bestandteil der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten. Es ist ein membranassoziiertes zytotoxisches Protein, das nur in myeloiden Zellen vorkommt. Seine starke Toxizität richtet sich ausschließlich gegen Gram-negative Bakterien und ist in der Affinität des BPI zu den Lipopolysacchariden der äußeren Hülle Gram-negativer Bakterien begründet [91]. Da diese Lipopolysaccharide einen wichtigen Teil der freien Endotoxine der Bakterien darstellen, wird BPI auch als Endotoxin neutralisierendes Protein bezeichnet [55].

Durch Blockierung der Lipopolysaccharid-neutralisierenden Wirkung könnten BPI-Antikörper die Ursache für vaskuläre Schäden durch nicht neutralisierte Lipopolysaccharide darstellen und auf diesem Weg eine Vaskulitis auslösen [101].

Eine andere Rolle schrieben Stoffel et. al. dem BPI zu. Sie gingen wie Monk et. al. [50] von der Annahme aus, dass Mikroorganismen bei der Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und assoziierten Erkrankungen einen entscheidenden Anteil haben [80]. Im ELISA und Western Blot mit rekombinantem BPI (rBPI) als Antigen identifizierten sie rBPI als Hauptantigen der ANCA bei PSC (44 % der pANCA sind BPI-ANCA) und überwiegendes Antigen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Colitis ulcerosa: 38 % der pANCA, M. Crohn: 25 %

der pANCA sind BPI-ANCA). Im Gegensatz dazu fanden sich BPI-ANCA nur bei 7 % der ANCA assoziierten Vaskulitiden und 6 % der cANCA positiven Seren [80].

Die 3lingensona Is-Universität Lebererklinik Nürnberg
BPI-ANCA auch bei Vaskulitispatienten, die Anti-PR3- und anti-MPO-negativ waren, bei 45 % der Fälle sahen [101], und eine starke Assoziation von BPI-ANCA mit cANCA positiven Patienten beschrieben [23].

Diese Unterschiede sahen Stoffel et. al. durch möglicherweise unterschiedliche Reinheit der verwendeten BPI-Antigene bedingt, da die anderen Studien mit nativem BPI durchgeführt wurden.

BPI wird durch Elastase gespalten. [33]. Da durch Ethanolfixierung Neutrophiler Granulozyten deren Granulamembranen zerstört werden [24], könnten die freiwerdenden Serinproteasen die Antigenität des BPI zerstören. Dies wird als Ursache in Betracht gezogen, für die Beobachtung, dass BPI-ANCA kein definiertes Muster im IFL hervorrufen [80].

Die von Stoffel et. al. formulierte Hypothese geht davon aus, dass BPI-ANCA die Endotoxin-neutralisierende Wirkung des BPI vermindern und dadurch zu einem Überangebot bakterieller Antigene führen. Dadurch würde die Annahme einer Infektion im Rahmen der Immunpathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und PSC gestützt.

Kolonbakterien als Auslöser der ANCA:

Auch Cohavy et.al. gingen von einem großen Einfluß von Umweltfaktoren auf die entzündlichen Prozesse im Rahmen der Colitis ulcerosa aus [14]. Sie stützten diese Annahme auf die Variation der Penetranz dieser Erkrankung und demographische und epidemiologische Besonderheiten [70, 85].

Diese Gruppe hatte schon früher Histon H1 als Autoantigen der pANCA bei Colitis ulcerosa beschrieben [32] und identifizierte im Immunoblot zwei Bakterien-Spezies, die Proteine besitzen, die mit pANCA kreuzreagieren: E. coli und Bacterioides caccae.

Das E. coli-Protein wurde als Außenmembranprotein OmpC identifiziert. Erhöhte IgG anti-OmpC-Level wurden bei Colitis ulcerosa Patienten gefunden [14]. Daraus leiteten Cohavy et. al. ab, dass Kolonbakterien das Ziel der erkankungsassoziierten Immunantwort seien.

ANCA als genetischer Marker:

Verschiedene Studien beschrieben eine familiäre Häufung der PSC [62], chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [51, 56] und des Auftretens von pANCA [76].

Die Untersuchung europäischer, kalifornischer und kanadischer Populationen ergab, dass 16-25 % der Familienangehörigen von Colitis ulcerosa Patienten ebenfalls pANCA hatten [74, 76]. Dagegen wurden in einer französischen Population bei keinem einzigen Angehörigen von Colitis-Patienten pANCA nachgewiesen [66]. Technische Ursachen wurden dabei durch Serenaustausch ausgeschlossen [74].

Eine Studie mit homozygoten und heterozygoten Zwillingen ergab eine erhöhte Konkordanzrate für Colitis ulcerosa bei Homozygoten [88].

Es bestehen auch Assoziationen zwischen dem Auftreten von HLA-Antigenen und Colitis ulcerosa (HLA-DR2) [87], PSC (HLA-B8 und -DR w52a) [11, 60], M. Crohn (HLA Dr1 und -DQw5) [87] und pANCA (HLA-DR2) [98].

Diese Faktoren lassen nach Seibold et. al. die Induktion von pANCA durch die Umgebung als unwahrscheinlich erscheinen [74].

Zielsetzung der Arbeit

Bei dieser Fülle verschiedener Hypothesen über Auslöser und pathogenetische Rolle der pANCA bei hepatobiliären und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gibt es auch widersprüchliche Angaben über die Prävalenz von pANCA bei diesen Erkrankungen und die Abhängigkeit dieser Angaben von den verschiedenen Nachweismethoden für ANCA.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, verschiedene Methoden zur Detektion von ANCA miteinander zu vergleichen und ihren Einfluß auf das Untersuchungsergebnis zu erfassen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob bei der Durchführung des indirekten Immunfluoreszenztestes zum Nachweis von ANCA die Auswahl des Granulozytenspenders und die Fixierungsmethode der Granulozyten einen Einfluß auf das Untersuchungsergebnis des Testes haben.

Im nächsten Schritt wurde durch Untersuchung von Patientenkollektiven mit einer definierten Methode im indirekten Immunfluoreszenztest die Prävalenz von ANCA bei verschiedenen Erkrankungen analysiert und überprüft, ob zwischen dem Auftreten von ANCA und anderen serologischen Markern eine Assoziation besteht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Patientenseren mit einem Neutrophil-fixed-ELISA untersucht, um zu sehen, ob dieses Verfahren zum Nachweis von ANCA im Rahmen der Diagnostik sinnvoll ist.

Anschließend wurde versucht, mit Hilfe des dem Western Blots spezifische Determinanten, mit denen ANCA reagieren, zu identifizieren.

2 Patienten und Methodik

2.1 Patienten und Kontrollen

Zum Nachweis von Anti-Neutrophil-Cytoplasmic-Antikörpern (ANCA) wurden insgesamt 515 Patientenserum untersucht (Tabelle 1).

Altersverteilung	n	min Alter	max Alter	mittleres Alter
Gesamtkollektiv	515	0	94	46
weiblich	340	0	94	47
männlich	175	1	79	45
PSC	39	19	75	40
weiblich	21	19	75	42
männlich	18	19	64	37
C. ulcerosa	50	6	63	36
weiblich	24	6	57	31
männlich	26	12	63	40
M. Crohn	39	12	62	35
weiblich	23	12	62	36
männlich	16	13	51	35
Autoimmune Hepatitis	116	12	81	48
weiblich	88	12	81	49
männlich	28	14	70	44
PBC	117	14	94	57
weiblich	94	14	94	56
männlich	23	31	78	59
toxische LZ	49	29	71	53
weiblich	25	29	70	54
männlich	24	35	71	51
kryptogene LZ	20	28	82	60
weiblich	13	38	82	64
männlich	7	28	72	52
Hepatitis C	36	27	67	44
weiblich	13	31	64	46
männlich	23	27	67	43
Antiphos. Syndrom	67	0	73	33
weiblich	51	0	72	34
männlich	16	6	73	31
M. Wegener	7	27	79	54
weiblich	5	27	66	48
männlich	2	61	79	70
Vaskulitis	18	1	79	52
weiblich	10	22	72	51

Tab. 1: Diagnose und Altersverteilung der auf ANCA untersuchten Patienten, n = Patientenzahl

Bei den Patienten lagen verschiedene Erkrankungen vor.

Primär sclerosierende Cholangitis (n=39) gesichert durch den Nachweis typischer Gallengangsunregelmäßigkeiten in der ERCP.

Colitis ulcerosa (n=50) gesichert durch Rektumbiopsien, die Kryptenabszesse, Schleimhautatrophien und Epitheldysplasien zeigten.

M. Crohn: (n=39) nachgewiesen durch Biopsien aus befallenen Darmabschnitten mit dem Nachweis von Epitheloidzellgranulomen, Lymphknotenhyperplasien und Ulcera mit transmuraler Entzündungsreaktion.

Autoimmune Hepatitis (n=116) bestätigt durch den Nachweis spezifischer Autoantikörper, eine Erhöhung des Serum IgG sowie den histologischen Nachweis einer portalen Hepatitis. Bei der Autoimmunen Hepatitis wurden in Abhängigkeit der auftretenden Autoantikörper vier Subtypen unterschieden (nach Klein und Berg [42]).

Typ 1a: Antinukleäre AK (ANA), mit oder ohne Anti-Aktin AK (68 Patienten)

Typ 1b: Anti-Aktin AK, ohne ANA (30 Patienten)

Typ 2: Anti-Leber-Nieren-Mikrosomen AK (Anti-LKM) (4 Patienten)

Typ 3: Anti-Leber-Pankreas AK (Anti-LP) (14 Patienten)

Primär biliäre Zirrhose (n=117) gesichert durch den Nachweis spezifischer antimitochondrialer Autoantikörper (AMA) und von Gallengangsdestruktionen und Granulomen in der Leberhistologie.
Von den 117 Patienten mit PBC waren bei 102 AMA in der immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung nachweisbar, 15 zeigten keine AMA. Das Vorkommen spezifischer Anti-M2 und Anti-M4 AK im ELISA bei den beiden Patientengruppen zeigen die Tabellen 2 und 3.

AMA pos (102)	Anti-M4 pos (76)	Anti-M4 neg (26)
Anti-M2 pos (97)	75	22
Anti-M2 neg (5)	1	4

Tab. 2: Patienten mit PBC, die im IFL antimitochondriale AK (AMA) zeigten.
Vorkommen von spezifischen Anti-M2 und Anti-M4 AK.
Patientenanzahl in ()

AMA neg (15)	Anti-M4 pos (8)	Anti-M4 neg (7)
Anti-M2 pos (12)	8	4
Anti-M2 neg (3)	0	3

Tab. 3: Patienten mit PBC, die im IFL keine antimitochondrialen AK (AMA) zeigten.
Vorkommen von spezifischen Anti-M2 und Anti-M4 AK.
Patientenanzahl in ()

Insgesamt gab es nur drei Patienten, bei denen sowohl im Immunfluoreszenztest keine AMA, als auch im ELISA keine Anti-M2 oder Anti-M4 AK nachweisbar waren.

Betrachtet man diese Patienten genauer, so zeigen sich folgende Ergebnisse, die zur Diagnose der PBC geführt haben:

Bei einem Patienten ließ sich im Western Blot eine M2-spezifische Bande bei 51 kD nachweisen.

Ein Patient zeigte in der Leberhistologie ein für die PBC typisches Bild einer chronischen, nicht eitrigen destruierenden Cholangitis, mit teilweise ausgeprägter Cholestase. Im Immunfluoreszenztest an Hep2 Zellkulturen waren, neben Antinukleären AK (ANA), Anti-Centromer-AK stark positiv, wie dies häufig bei einer AMA negativen, ANA positiven PBC der Fall ist.

Bei einem weiteren Patienten lag eine Überlappung mit einer Autoimmunen Hepatitis (AIH) Typ 1a vor. Die Diagnose der PBC stützte sich auf stark erhöhte Cholestaseparameter, wie sie bei einer AIH unüblich sind, sowie auf den Nachweis von Anti-Centromer-AK, zusätzlich zu den auch im Rahmen der AIH auftretenden ANA.

Die Zuordnung der Patienten mit PBC zu Früh- oder Spätformen der Erkrankung erfolgte anhand der Bilirubinwerte. Eine Frühform wurde bei einem Gesamtbilirubin kleiner oder gleich

1,1 mg/dl angenommen. Bei einem Gesamtbilirubin größer 1,1 mg/dl lag eine Spätform vor.

Die Beurteilung der immunologischen Aktivität der PBC erfolgte anhand des Nachweises von Anti-M4 AK, die typischerweise bei aktiven, rasch progredienten Formen der PBC auftreten.

Toxische Leberzirrhose (n=49)	Nachweis durch die typische Anamnese mit gesichertem Alkoholabusus oder die Einnahme anderer hepatotoxischer Substanzen, sowie spezifische Veränderungen in der Leberhistologie mit Fettleberzirrhose, Mallory-bodies und entzündlich infiltrierte Portalfeldern. Auch das Vorkommen von Histon H2B AK wurde als typisch für die toxische Leberzirrhose gewertet.
Kryptogene Leberzirrhose (n=20)	Ausschlussdiagnose bei Fehlen aller bekannten Ursachen einer Leberzirrhose. Insbesondere kein Nachweis von Autoantikörpern sowie eine negative Virusserologie. Kein Anhalt für toxische Einflüsse.
Hepatitis C (n=36)	Anti-HCV AK positiv und Nachweis von HCV-RNA in der PCR.
Antiphospholipid Syndrom (n=67)	Nachgewiesen durch Antiphospholipid-AK im ELISA und das Vorhandensein typischer Symptome, wie thromboembolische Prozesse, habituelle Aborte, Thrombozytopenien, Vasculopathien.
M. Wegener (n=7)	Gesichert durch Histologiegewinnung mit Nachweis einer granulomatösen Vaskulitis und den Nachweis von cANCA im Immunfluoreszenztest. In dieser Studie waren cANCA bei allen sieben Patienten mit M. Wegener nachweisbar.

Vaskulitis
(n=18)

Die Diagnosen wurden gestellt durch typische histologische Veränderungen in den betroffenen Organen und das Vorhandensein klinischer Symptome, wie Arthralgien, unklares Fieber, Schlaganfälle bei Hirngefäßbeteiligung sowie eine ausgeprägte Entzündungskonstellation. Genaue Zuordnungen zu definierten Vaskulitiden konnten im Einzelnen nicht vorgenommen werden. Bei zehn der Patienten waren pANCA nachweisbar, ein Patient hatte cANCA.

475 Patienten waren von einer Erkrankung betroffen, bei 40 Patienten lagen Überlappungssyndrome zwischen zwei oder drei Erkrankungen vor (Tabellen 3-13). Die Diagnosen der einzelnen Patienten waren, soweit möglich, klinisch und histologisch gesichert.

Seren und klinische Daten der Patienten wurden uns freundlicherweise von zahlreichen Kollegen aus verschiedenen Kliniken in Deutschland zur Verfügung gestellt.

Seren von gesunden Blutspendern (n=9) dienten als Negativkontrollen.

Die zum Nachweis von ANCA benötigten Granulozyten wurden von elf gesunden Blutspendern (S1-S11) gewonnen.

Die Seren und Granulozytenpräparate wurden bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2 Patienten und Methodik

2.1 Patienten und Kontrollen

PSC	n	n gesamt
allein	24	24
+ CU	4	15
+ M.Crohn	2	
+ AIH	7	
+AIH+ CU	1	
+ AIH + krtypt. LZ	1	
		39

Tab. 4: Darstellung der Patienten mit PSC und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

CU	n	n gesamt	
allein	39	39	
+ PBC	2	11	
+ AP Syndrom	1		
+ PSC	4		
+ AIH	3		
+ AIH + PSC	1		
			50

Tab. 5: Darstellung der Patienten mit CU und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

AIH Typen	n	
AIH 1a	68	
AIH 1b	30	
AIH 2	4	
AIH 3	14	
gesamt	116	
AIH	n	n gesamt
allein	93	93
+ APS	1	23
+ CU	3	
+ Hep. C	2	
+ krtypt. LZ	1	
+ PBC	6	
+ PBC + Hep C	1	
+ PSC	7	
+PSC+CU	1	
+ PSC + krtypt. LZ	1	

Tab. 7: Vorkommen der verschiedenen Typen der AIH, Darstellung der Patienten mit AIH und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

M Crohn	n	n gesamt
allein	37	37
+ PSC	2	2
		39

Tab. 6: Darstellung der Patienten mit M. Crohn und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

M. Wegener	n	n gesamt
allein	7	7
		7

Tab. 8: Darstellung der Patienten mit M. Wegener und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

PBC	n	n gesamt
allein	102	102
+ AIH	6	
+ AIH + Hep. C	1	
+ AP Syndrom	1	
+ C. ulcerosa	2	
+ Hep. C	1	
+ krypt. LZ	4	15
		117

Tab. 9: Darstellung der Patienten mit PBC und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

AP Syndrom	n	n gesamt
allein	62	62
+ AIH	1	
+ C. ulcerosa	1	
+ krypt. LZ	1	
+ PBC	1	
+ Vaskulitis	1	5
		67

Tab. 12: Darstellung der Patienten mit APS und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

kryptogene LZ	n	n gesamt
allein	13	13
+ AIH	1	
+ APS	1	
+ PBC	4	
+ PSC + AIH	1	7
		20

Tab. 10: Darstellung der Patienten mit kryptogener LZ und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

Hepatitis C	n	n gesamt
allein	32	32
+ AIH	2	
+ PBC	1	
+ PBC + AIH	1	4
		36

Tab. 13: Darstellung der Patienten mit Hepatitis C und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

toxische LZ	n	n gesamt
allein	49	49
		49

Tab. 11: Darstellung der Patienten mit toxischer LZ, n = Patientenzahl

Vaskulitis	n	n gesamt
allein	17	17
+ AP Syndrom	1	1
		18

Tab. 14: Darstellung der Patienten mit Vaskulitis und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Granulozytenpräparation

Material und Reagenzien:

Geräte:

Zentrifuge Rotixa A (Hettich); Shaker (Bachofer); Sonifier B12 (Branson Sonic Power).

Proteinase-Inhibitor:

4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonylfluorid, Hydrochlorid Pefabloc SC PLUS (Boehringer Mannheim).

Chemikalien und Reagenzien:

Hank's BAL salt solution (Gibco); Heparin-Natrium (Braun); Aqua dest; Triton x-100 (Serva).

Medien:

Nim-Medium (Paesel).

Durchführung:

Granulozytenpräparation:

Das von gesunden Blutspendern frisch gewonnene Vollblut wurde mit 2500 IE Heparin pro 50 ml versetzt.

In 10 ml-Röhrchen wurden je 4 ml Nim-Medium mit 4 °C gegeben und mit 5 ml Blut überschichtet. Anschließend wurde für 30 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der plasma- und lymphozytenhaltige Überstand wurde verworfen, die granulozytenhaltige Fraktion mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in neue 10 ml-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zum Waschen der Granulozyten mit Hank's solution aufgefüllt und 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen. Zum Lysieren der im Pellet verbliebenen Erythrozyten wurden in jedes Röhrchen 2 ml Aqua dest. gegeben, das Pellet darin resuspendiert und für 3 min stehengelassen. Anschließend wurden die Granulozyten noch zweimal wie oben mit Hank's solution gewaschen.

Für die verschiedenen immun-chemischen Versuche wurden die Granulozyten in unterschiedlicher Weise weiterverwendet. Für den Immunfluoreszenztest wurde die frische Granulozytensuspension eingesetzt.

Für die Durchführung der ELISAs wurden die Granulozyten in Hank's solution aufgenommen und aliquotiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die als Antigen für den Western Blot verwendeten Granulozyten wurden mit 10ml Hank's solution aufgenommen und mit 50 μl Proteinase-Inhibitor auf 1ml Suspension versetzt. Anschließend wurde zum Aufschließen der Zellen auf Eis drei mal für 15 Sekunden beschallt. Alternativ wurden die Granulozyten mit Triton aufgeschlossen oder unbehandelt gelassen. Die Proben wurden aliquotiert bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.2 Immunfluoreszenztest (IFL)

Material und Reagenzien:

Geräte:

Shaker (Bühler); Brutschrank (Heraeus); Pipetten 10 μl , 100 μl (Eppendorf); Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

Zellkonzentrat:

Granulozytensuspension (s.Kapitel 2.1.1)

Antiseren:

Fluorescein- bzw. Rhodamin-konjugierte Anti-Human IgG- und IgM-Antikörper der Ziege (beide: Dianova, Hamburg).

Chemikalien und Reagenzien:

Methanol, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, di-Natriumhydrogenphosphat, (alle: Merck)

Medien:

RPMI 1640 Medium dutch Modification without L-Glutamine (Gibco)

Phosphatgepufferte Saline (PBS):	0,05	Mol	KH_2PO_4
	0,75	Mol	NaCl
	0,31	Mol	Na_2HPO_4
	5000	ml	H_2O

Farbstofflösung:	350	μl	Rhodamin
	350	μl	Fluorescein
	25	ml	PBS-Puffer

Durchführung:

Herstellung Granulozyten-beschichteter Objektträger:

Die Herstellung der Objektträger erfolgte nach der im Immunpathologischen Labor etablierten Methode. Die aus 50 ml Vollblut unter Verwendung von NIM-Medium (Paesel) gewonnene Granulozytensuspension wurde mit 30 ml RPMI-Medium aufgenommen und gut vermischt. Mit einer Pasteurpipette wurden von der Suspension je 20 μl pro Feld auf die Objektträger aufgebracht. Nach Inkubation für zwei Stunden im feuchten Brutschrank bei 37 °C erfolgte die Fixation mit Methanol mit –70 °C für 5 min. Alternativ wurden die Granulozyten mit Methanol mit +4 °C, Ethanol mit –70 °C und Formaldehyd mit Raumtemperatur fixiert.

Anschließend wurden die Objektträger an der Luft getrocknet und bei –70 °C gelagert.

Immunfluoreszenzmikroskopie (IFL):

Die Objektträger wurden pro Feld mit Serum in einer Verdünnung von 1:10 (50 μl PBS-Puffer und 5 μl Serum) beschichtet. Nach Inkubation für 30 min wurden die Objektträger drei mal in PBS-Puffer gewaschen.

Zur Färbung wurden auf jedes Feld ca. 100 μl Fluorescein- bzw. Rhodamin-konjugierte Antikörper gegeben, 30 min inkubiert und drei mal mit PBS-Puffer gewaschen.

Nach Belegen der Objektträger mit Deckgläsern waren diese bereit zur Auswertung, die von jeweils zwei unabhängigen Personen durchgeführt wurde.

Die Bewertung der Fluoreszenz erfolgte nach folgendem Schema:

pANCA:	schwach positiv:	Titer 1:10- 1:20
	positiv:	Titer 1:30- 1:40
	stark positiv:	Titer >1:55
cANCA:	schwach positiv:	Titer 1:20- 1:40
	positiv:	Titer 1:80- 1:130
	stark positiv:	Titer >1:280

Die im Rahmen der Routinediagnostik verwendeten Objektträger zum Nachweis von ANCA wurden auf die selbe Weise wie oben beschrieben hergestellt.

Die Ergebnisse über den Nachweis anderer AK (antinukleäre AK, AK gegen glatte Muskulatur, AK gegen Aktin, Antimitochondriale AK, AK gegen Leber-Nieren-Mikrosomen, Antiendotheliale AK, AK gegen Sinusoide, Antisarkolemmale AK, Ak gegen Schilddrüse, AK gegen Parietalzellen, AK gegen Fibrillen) wurden im Rahmen der Routinediagnostik erzielt. Dafür wurden Immunfluoreszenztests an Gefrierschnitten von Rattenorganen durchgeführt.

Der Nachweis der PBC-spezifischen Anti-M2 und Anti-M4 Antikörper erfolgte in der Routinediagnostik mittels ELISA.

2.2.3 ELISA

Material und Reagenzien:

Antigen:

Granulozytensuspension (s. Kapitel 2.2.1)

Peroxidase konjugierte Antikörper:

Anti-Human-IgG, Anti-Human-IgM, Anti-Human-IgG F(ab')₂ Fragment (alle: DAKO Dänemark).

Chemikalien und Reagenzien:

Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, tri-Natriumhydrogencitrat, Citronensäure,

Schwefelsäure 25 %, Hydrogen Peroxid 30 % (alle: Merck); Bovine Serum Albumin Fraktion x (PAA Austria); o-Phenylendiamin; Triton x-100 (Serva).

Medien:

Phosphatgepufferte Saline (PBS): 0,05 Mol KH_2PO_4
0,75 Mol NaCl
0,31 Mol Na_2HPO_4
5000 ml H_2O

Serumverdünnungspuffer: 0,3 % BSA
0,1 % Triton
1000 ml H_2O

Bicarbonatpuffer (0,2 M, pH 9,6): 0,32 Mol Na_2CO_3
0,68 Mol NaHCO_3
5000 ml H_2O

Waschpuffer 1: 0,5 % BSA
5000 ml PBS-Puffer

Waschpuffer 2: 0,5 % BSA
0,2 % Triton
5000 ml PBS-Puffer

Citratpuffer (0,1 M, pH5,0): 41,18 g $\text{Na}_3\text{citrat} \times 1\text{H}_2\text{O}$
12,6 g Citronensäure $\times \text{H}_2\text{O}$
2000 ml H_2O

Substratlösung:	100	ml	Citratpuffer
	0,05	%	o-Phenylendiamin
	0,1%	H ₂ O ₂	
Abstopplösung:	25	%	H ₂ SO ₄

Durchführung:

Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA):

Die Bestimmung von Antikörpern gegen zytoplasmatische Bestandteile neutrophiler Granulozyten erfolgte in Anlehnung an die von Duerr et. al. beschriebene Methode [20].

Zunächst wurde das Antigen mit Bicarbonatpuffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Microtiterplatten wurden pro well mit 100 µg der Antigenverdünnung beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Seren wurden mit Serumverdünnungspuffer im Verhältnis 1:1000 verdünnt.

Die antigenbeschichteten Platten wurden drei mal mit Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend 15 min in diesem stehengelassen, um freie Bindungsstellen der Platten mit BSA zu blockieren.

Pro well wurden 100 µl Serumverdünnung pipettiert. Nach Inkubation für 90 min wurden die Platten drei mal mit Waschpuffer 2 gewaschen.

Nach Verdünnung der Peroxidase konjugierten Antikörper mit Waschpuffer 2 (IgG und IgA 1:3000, IgM 1:2000) wurden die Platten mit 100 µl pro well beschichtet und 60 min inkubiert. Nach drei maligem Waschen der Platten mit Waschpuffer 2 wurden je 150 µl Substratlösung zugegeben um die Peroxidasereaktion zu starten und nach 10 bis 30 min mit H₂SO₄ abgestoppt. Die Extinktionsmessung mit dem ELISA-Reader erfolgte bei 495 nm gegen den Leerwert.

Für alle Seren wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, deren Mittelwert für die weitere Auswertung verwendet wurde. Pro Platte wurden elf Kontrollseren mitgeführt, aus deren Messwerten Eichkurven zur Standardisierung der auf verschiedenen Platten gemessenen Ergebnisse erstellt wurden.

2.2.4 Western Blot

Material und Reagenzien:

Antigen:

Granulozytensuspension (s. Kapitel 2.2.1).

Peroxidase konjugierte Antikörper:

Anti-Human IgG, Anti-Human-IgM (beide: Dako Dänemark).

Molekulargewichtsmarker:

SDS-PAGE standards Low Range (Bio RAD).

Chemikalien und Reagenzien:

Acrylamidstammlösung rotiphorese Gel 40, Glycin, Glycerin 87 % (alle: Roth); Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Fluka); Trizma Base (Tris), 3-Amino-9-Ethylcarbazol (beide: Sigma); Salzsäure 32 %, Bromphenolblau, Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, di-Natriumhydrogenphosphat, Tween 20, Essigsäure 100 %, Natrium-Acetat, Hydrogen Peroxid 30 %, Essigsäure 7 % (alle: Merck); Ammonium persulfate (APS), N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Temed), Dimethylformamid (alle: Serva); Dithiothreitol (DTT); Bovine Serum Albumin Fraction x (BSA) (PAA Austria).

Medien:

Trenngel 10 %:	5	ml	Acrylamid-40
	5	ml	1,5 M Tris-HCL, pH 8,9
	10	ml	H ₂ O
	100	µl	SDS 20 %
	200	µl	APS 10 %
	15	µl	Temed

Sammelgel 4 %:	1	ml	Acrylamid-40
	2,5	ml	0,5 M Tris-HCL, pH 6,9
	6,5	ml	H ₂ O
	50	µl	SDS 20 %

	100	µl	APS 10 %
	7,5	µl	Temed
Standard-Probenpuffer 4x konz.:	225	mM	Tris-HCL, pH 6,9
	8	%	SDS
	6	%	Glyzerin
	40	mM	DTT
	0,04	%	Bromphenolblau
Nativ-Probenpuffer 4x konz.:	225	mM	0,5 M Tris-HCL pH 6,9
	8	%	SDS 20 %
	6	%	Glyzerin 87 %
	0,04	%	Bromphenolblau 1 %
Elektrophoresepuffer, pH 8,3:	25	mM	Tris
	200	mM	Glyzin
	0,05	%	SDS
ad	1000	ml	H ₂ O
Transferpuffer, pH 8,3:	25	mM	Tris
	194	mM	Glycin
	0,05	%	SDS
	20	%	Methanol
ad	1000	ml	H ₂ O
Phosphatgepufferte Saline (PBS):	0,05	Mol	KH ₂ PO ₄
	0,75	Mol	NaCl
	0,31	Mol	Na ₂ HPO ₄
	5000	ml	H ₂ O
BSA-PBS-Puffer:	1000	ml	H ₂ O
	3	%	BSA

Waschpuffer:	1000	ml	H ₂ O
	0,1	%	Tween 20
	0,1	%	BSA
50 mM Acetat-Puffer, pH 5,0:	75	ml	H ₂ O
	9,87	%	0,2 N Essigsäure
	23,47	%	0,2 M Na-Acetat
Substratlösung:	42,1	%	3-Amino-9-Ethylcarbazol
	5,3	%	Dimethylformamid
	95	ml	Acetat-Puffer
	0,052	%	H ₂ O ₂ 30 %
Abstopplösung:	7	%	Essigsäure

Durchführung:

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der von Lämmli [45] etablierten Methode durchgeführt. Die Elektrophoresegele wurden zwischen zwei Glasplatten in einer abgedichteten Gießkammer hergestellt, indem zunächst das 10 %ige Trenngel, anschließend das 4 %ige Sammelgel zwischen die Glasplatten gegossen wurde. Die Gele wurden zum Polymerisieren über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Die als Antigen eingesetzte Granulozytensuspension wurde auf die in Kapitel 2.2.1 beschriebene Weise hergestellt und entweder frisch oder nach Lagerung bei -20 °C verwendet.

Für die Elektrophorese wurden die Antigenproben mit 4 fach konzentriertem Probenpuffer für 4min im Wasserbad erhitzt. Alternativ wurde nativer Probenpuffer verwendet und auf das Erhitzen verzichtet. Die Antigenkonzentration betrug zwischen 0,8 und 30 µg/µl.

In den mit Elektrophoresepuffer (pH 8,3) gefüllten Elektrophoresetank wurden die Gelplatten eingesetzt und mit 17-20 µl des Antigengemisches pro Geltasche beladen. Für

die spätere Molekulargewichtsbestimmung wurden in eine Tasche 10 µl einer Mischung aus MG-Marker und Standard-Probenpuffer im Verhältnis 1:10 gegeben.

Die Elektrophorese erfolgte bei 190 V für ca. 45 min und wurde beendet, wenn die Frontbande 0,5 cm vor dem Gelende verlief.

Immunoblot:

Der Transfer der Antigene auf die Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membran erfolgte nach der Methode von Towbin et al. [86] und Burnette [7]. Gel und PVDF-Membran wurden in Transferpuffer luftblasenfrei zwischen Filterpapier und Schwämme geschichtet und in einer Halterung befestigt. Der Transfer wurde in der Transferkammer unter Eiskühlung bei 100 V über eine Stunde durchgeführt.

Proteinfärbung:

Zur Überprüfung der Transferqualität wurde bei einigen Sheets eine Proteinfärbung mit Poinceau S Solution durchgeführt. Die Sheets wurden für ca. 10 min in die Lösung gelegt und anschließend mit aqua dest. abgespült.

Antikörperinkubation und Detektion:

Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran bei Raumtemperatur über Nacht in BSA-PBS-Puffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren.

Die für die Immunreaktion vorgesehenen Seren wurden im Verhältnis 1:50 mit dem 3 %-BSA-PBS-Puffer verdünnt und zu den PVDF-Sheets gegeben. Nach 45 min Inkubation wurden die Sheets 7 mal gewaschen und anschließend für 30 min mit den 1:200 mit Waschpuffer verdünnten Anti-Human IgG und-IgM-Antikörpern versetzt. Zum Abschluß wurde wieder 7 mal gewaschen.

Zur Detektion wurden die Sheets in der Substratlösung für 15-20 min inkubiert bis eine Färbung der Proteinbanden eintrat. 7 %ige Essigsäure diente zum Abstoppen der Lösung.

Festlegung der Molekulargewichte:

Bei der Durchführung des Western Blots wurde ein Molekulargewichtsmarker mitverwendet. Die so identifizierten Molekulargewichte und die zugehörigen Streckenentfernungen standen in annähernd logarithmischem Zusammenhang und wurden in ein entsprechendes Diagramm eingetragen (Abbildung 1). Aus diesem Diagramm konnten die übrigen Molekulargewichte abgelesen werden.

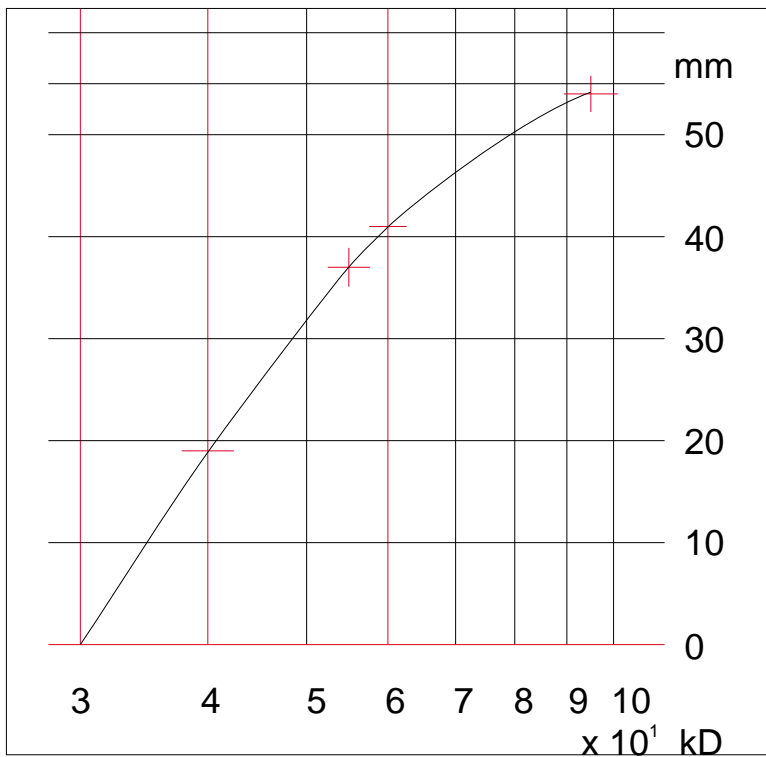


Abb. 1: Diagramm zur Feststellung der Molekulargewichte von im Western Blot dargestellten Determinanten

2.2.5 Proteinbestimmung

Reagenz: BIOQUANT Protein (Merck)

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Bradford [6].

Zu 200 µl Reagenzlösung wurden je 10 µl Probe gegeben. Nach zwei min wurde die Extinktion bei 595 nm gegen einen Probenleerwert gemessen. Nach Erstellen einer Kalibrationskurve mit BSA, in den Konzentrationen 0,1-1 mg/ml, konnten die Proteinkonzentrationen berechnet werden (Abbildung 2).

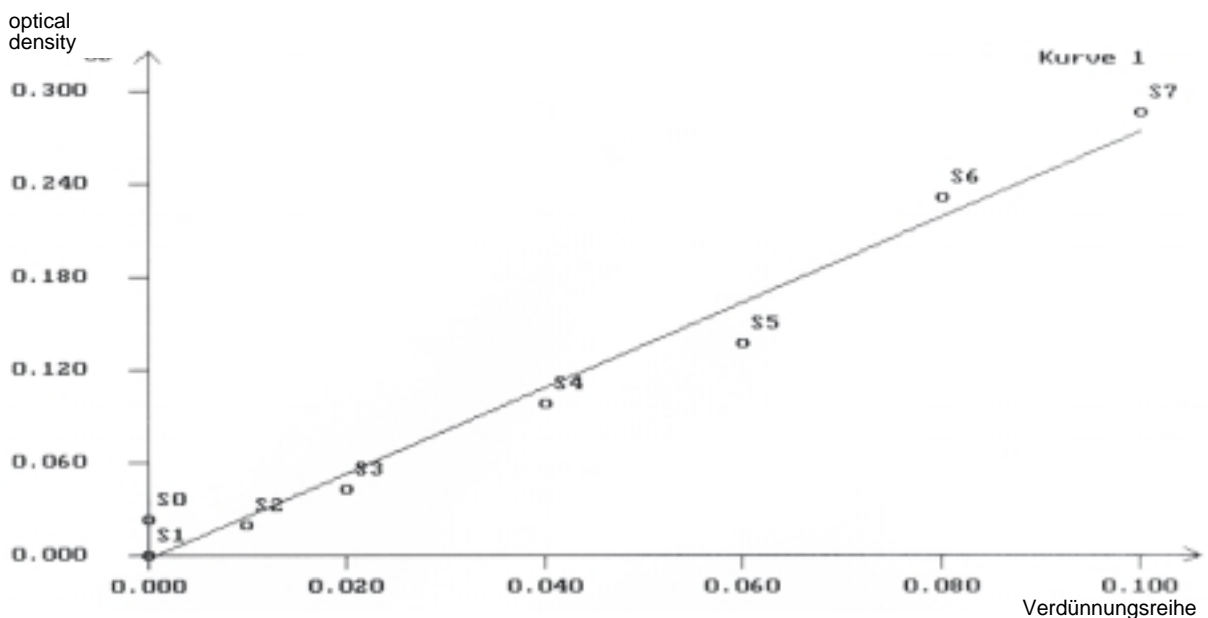


Abb. 2: Kalibrationsdiagramm zur Berechnung von Proteinkonzentrationen nach der Bradford Methode

2.3 Statistische Datenanalyse

Die statistische Datenanalyse wurde mit Unterstützung von Herrn Dr. med. Blumenstock vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung unter Verwendung des Programms JMP (3.1.5) durchgeführt

In der Regel konnte bei den Daten nicht von einer Normalverteilung und Varianzhomogenität ausgegangen werden, so dass für die Auswertung nichtparametrische Verfahren eingesetzt wurden.

Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Zum Vergleich mehrerer Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Bei Annahme der globalen Alternativhypothese wurden im Sinne des Abschlußtestprinzips nachgeschoben Zwei-Stichproben-Vergleiche mit dem U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon) durchgeführt

Die Beurteilung der Übereinstimmungen zwischen verschiedenen Ergebnissen wurde mit der Bestimmung von Cohen's Kappa vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

Es wurde untersucht, ob die Ergebnisse des Immunfluoreszenztests mit neutrophilen Granulozyten zum Nachweis von ANCA von der Herkunft, das heißt dem Spender der Granulozyten, und der Methode ihrer Fixierung auf den Objektträgern beinflusst werden.

Auch die Konsistenz der Ergebnisse bei zweifacher Durchführung des Immunfluoreszenztests mit Granulozyten vom gleichen Spender und identischer Fixierungsmethode wurde untersucht.

3.1.1 Einfluß der Granulozytenherkunft auf das Testergebnis:

Es wurden Granulozyten von elf gesunden Blutspendern gewonnen und zum Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest verwendet. Die Fixierung der Granulozyten erfolgte in allen Fällen mit Methanol bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für fünf Minuten.

Untersucht wurden 30 Seren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen, die zuvor im Rahmen der Routinediagnostik als ANCA positiv oder negativ eingestuft worden waren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 15 dargestellt. Der ursprünglich in der Routinediagnostik definierte ANCA Status der Patienten wurde durch die Mehrheit der Ergebnisse bestätigt. Patienten mit PBC wurden unabhängig von den auftretenden cANCA Mustern als ANCA negativ eingestuft, da dieses Muster nicht durch ANCA, sondern wahrscheinlich durch antimitochondriale AK (AMA) hervorgerufen wird.

Die Granulozyten aller Spender reagierten mit pANCA von Patienten mit PSC, Vasculitis und Autoimmuner Hepatitis. Außer von Spender zwei und neun reagierten alle Spendergranulozyten mit wenigstens einem cANCA positiven M.Wegener-Serum. Alle Spendergranulozyten bis auf Spender sieben reagierten mindesten einmal mit einem PBC-Serum und produzierten ein cANCA Muster.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

Tabelle 16 zeigt, wie häufig die Abweichungen vom ANCA Status in Abhängigkeit von den verwendeten Spendergranulozyten auftraten. Die Anzahl der Abweichungen schwankte dabei je nach Spender zwischen drei und neun von 30 Untersuchungen. Die besten und konstantesten Ergebnisse wurden mit Spender sechs und zehn erzielt (drei und fünf Abweichungen von 30 Untersuchungen).

Nr.	Diagnose	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	neg.	c	p	ANCA Status
1	AIH		p					p		p	p	p	6		5	neg.
2	AIH	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p			11	p
3	AIH				p				p		p		8		3	neg.
4	AIH	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p			11	p
5	AIH	p	p	p	p	p				p	p		4		7	p
6	AIH												11			neg.
7	AIH								p		p		9		2	neg.
8	AIH								p				10		1	neg.
9	AIH	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p			11	p
10	AIH						p						10		1	neg.
11	M Weg.			c		c		c					8	3		neg.
12	M Weg.	c		c		c	c	c	c		c	c	3	8		c
13	M Weg.				c		c	c			c	c	6	5		c
14	M Weg.			c		c	c				c	c	6	5		c
15	PBC					c							10	1		neg.
16	PBC	c		c	c	c	c		c		c	c	3	8		neg.
17	PBC			c									10	1		neg.
18	PBC				p	c							9	1	1	neg.
19	PBC	c	c	c	p				c	c		c	4	6	1	neg.
20	PSC	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p			11	p
21	PSC	p	p	p	p		p	p	p	p	p	p	1		10	p
22	PSC			p	p	p	p	p	p	p	p		3		8	p
23	PSC			p	p		p		p	p	p		5		6	p
24	PSC	p	p	p	p	p	p		p	p	p	p	1		10	p
25	Vaskulitis												11			neg.
26	Vaskulitis	p											10		1	neg.
27	Vaskulitis				p	p							9		2	neg.
28	Vaskulitis	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p	p			11	p
29	Vaskulitis			p	p	p	p		p	p			5		6	p
30	Vaskulitis	p	p		p		p	p	p		p	p	3		8	p

Tab. 15 Ergebnisse der ANCA-Bestimmung im indirekten Immunfluoreszenztest mit Granulozytenpräparationen von 11 verschiedenen Blutspendern, S1-11 = Spender 1- Spender 11. ANCA Status definiert im Rahmen der Routinediagnostik. neg., c., p.geben die Anzahl der verschiedenen Granulozytenspender wieder, die ein Serum als ANCA negativ, cANCA oder pANCA positiv eingeschätzt haben. Leere Felder entsprechen einem ANCA negativen Befund

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzerggebnis

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
AIH n=10	0	1	0	1	0	2	2	3	1	3	2
M. Weg. n=4	2	3	2	2	2	0	2	2	3	0	0
PBC n=5	2	1	3	3	3	1	0	2	1	1	2
PSC n=5	2	2	0	0	2	0	2	0	0	0	2
Vaskulitis n=6	2	1	1	1	2	0	1	0	1	1	1
gesamt n=30	8	9	6	7	9	3	7	7	6	5	7

Tab. 16 Häufigkeit der Abweichungen vom definierten ANCA Status bei den verschiedenen Patientengruppen in Abhängigkeit vom Granulozytenspender, S1-S11 = Spender 1- Spender 11, n = Anzahl der untersuchten Patienten

3.1.2 Einfluß der Fixierungsmethode auf das Testergebnis

Der Vergleich der unterschiedlichen Fixierungsmethoden wurde mit Granulozyten von Spender sechs und Spender zehn durchgeführt, welche die konsistentesten Ergebnisse in der vorhergehenden Untersuchung gezeigt hatten.

Zur Beurteilung der Qualität der verschiedenen Fixierungsmethoden im Hinblick auf Richtigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die Daten als Kappa-Statistik ausgewertet [1]. Dafür wurden die Ergebnisse, die im Immunfluoreszenztest mit Granulozyten von Spender sechs und zehn festgestellt wurden, auf Übereinstimmungen überprüft.

Die Stärke der Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen wird durch Cohen's kappa (κ) ausgedrückt. Die Beurteilung von κ erfolgte nach der Einteilung von Sachs [6] (Tabelle 17). Da sich Cohen's kappa nicht berechnen läßt, wenn in der Tabelle eine ganze Spalte oder Zeile keine Werte enthält, wurde zusätzlich der Übereinstimmungskoeffizient angegeben. Dieser Quotient ist jedoch im Gegensatz zu Cohen's kappa nicht zufallsbereinigt [1].

Geht man davon aus, daß die Übereinstimmung zwischen Spender sechs und zehn sehr groß ist (Tabelle 23: $\kappa = 0,94$), müssen Abweichungen in den Ergebnissen bei Verwendung anderer Fixierungsmethoden auf die Methode zurückgeführt werden. So kann Cohen's kappa als Maß zur Beurteilung der Fixierungsmethoden verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

Cohen's kappa (κ)	Übereinstimmung
<0.10	keine
0.11-0.40	schwache
0.41-0.60	deutliche
0.61-0.80	starke
0.81-1.00	beinahe vollständige

Tab. 17 Beurteilung der Kappa-Statistik, Stärke der Übereinstimmungen nach Sachs [6]

Die Ergebnisse der ANCA Bestimmung im indirekten Immunfluoreszenztest mit Granulozyten von Spender sechs und Spender zehn unter Anwendung vier verschiedener Fixationsmethoden sind in Tabelle 18 dargestellt. Dabei erkennt man im linken Teil der Tabelle die mit den verschiedenen Granulozytenpräparaten gewonnenen Ergebnisse für die einzelnen Seren. Im rechten Tabellenteil wurden die Häufigkeiten von cANCA und pANCA positiven und ANCA negativen Befunden summiert und mit dem in der Routinediagnostik festgelegten ANCA Status verglichen.

Bei der Auswertung dieser Tabelle erkennt man, dass sich die ANCA bei PSC, Autoimmuner Hepatitis und Vaskulitis in Bezug auf die verschiedenen Fixierungsmethoden ähnlich verhalten. Sie sind resistent gegenüber Methanol und Ethanol, ergeben jedoch bei Fixierung mit Formaldehyd ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster. Die cANCA bei M. Wegener und PBC verhalten sich dagegen unterschiedlich. Während die cANCA bei M. Wegener resist gegenüber den einzelnen Fixierungsmethoden sind, treten sie bei der PBC nur bei einzelnen Methoden auf.

Vergleicht man das Verhalten der ANCA bei PBC und PSC, erkennt man, dass sich die Antikörper nicht nur hinsichtlich ihres Fluoreszenzmusters unterscheiden, sondern auch bezüglich ihrer Resistenz gegenüber den einzelnen Fixierungsmethoden.

Die Tabelle 19 zeigt, wie häufig die Abweichungen vom ANCA Status in Abhängigkeit von der verwendeten Fixierungsmethode auftraten.

In Tabelle 20 ist dargestellt, welche Arten der Abweichungen bei Verwendung der unterschiedlichen Fixierungsmethoden überwogen.

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

Nr.	Diagnose	S6 F1	S6 F2	S6 F3	S6 F4	S10 F1	S10 F2	S10 F3	S10 F4				ANCA Status
										neg	c	p	
1	AIH	p	p	p	c	p			c	2	2	4	neg.
2	AIH	p	p	p		p	p	p	p	1		7	p
3	AIH				c				c	6	2		neg.
4	AIH	p	p	p	c	p	p	p	c		2	6	p
5	AIH	p	p	p		p			c	3	1	4	p
6	AIH									8			neg.
7	AIH					p				7		1	neg.
8	AIH				c					7	1		neg.
9	AIH	p	p	p	c	p	p	p	c		2	6	p
10	AIH				c					7	1		neg.
11	M Weg.				c					7	1		neg.
13	M Weg.	c	c	c	c	c	c		c	1	7		c
14	M Weg.	c	c	c		c			c	3	5		c
15	PBC									8			neg.
16	PBC	c				c				6	2		neg.
17	PBC				c					7	1		neg.
18	PBC				c					7	1		neg.
19	PBC				c					7	1		neg.
20	PSC	p	p	p	c	p	p	p	c		2	6	p
21	PSC	p	p		c	p	p	p	c		2	5	p
22	PSC	p			c	p	p		c	3	2	3	p
23	PSC	p	p		c	p			c	3	2	3	p
24	PSC	p				p	p	p		4		4	p
25	Vaskulitis									8			neg.
26	Vaskulitis									8			neg.
27	Vaskulitis									8			neg.
28	Vaskulitis	p	p	p	c	p	p	p	c		2	6	p
29	Vaskulitis	p			c	p		p	c	3	2	3	p

Tab. 18 Ergebnisse der ANCA-Bestimmung im indirekten Immunfluoreszenztest mit Granulozyten von zwei Spendern, die mit verschiedenen Methoden fixiert wurden,
S6 = Spender 6, S10 = Spender 10, F1 = Fixierung mit Methanol +4 °C, F2 = Fixierung mit Methanol -70 °C, F3 = Fixierung mit Ethanol -70 °C, F4 = Fixierung mit Formaldehyd bei Raumtemperatur, neg. = ANCA negativ, c = cANCA, p = pANCA

Anzahl von nachgewiesenen cANCA und pANCA :

Die Tabellen 21 und 22 zeigen, wie häufig ANCA nachgewiesen wurden bei Verwendung von Granulozyten von Spender sechs und zehn, die mit den verschiedenen Methoden fixiert wurden.

Dabei fällt auf, dass im Vergleich zu den Ergebnissen, die mit Methanol -70 °C -fixier-

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

ten Granulozyten erzielt wurden, die Fixierung mit Formaldehyd vermehrt zu cANCA Mustern führte (Methanol -70 °C: 11 %, Formaldehyd: 46-61 %).

Die Fixierung mit Ethanol und Methanol +4 °C ergab dagegen gehäuft ANCA negative Ergebnisse (Methanol -70 °C: 43-46 %, Methanol +4 °C: 57-68 %, Ethanol: 68-71 %).

	S6 F1	S10 F1	S6 F2	S10 F2	S6 F3	S10 F3	S6 F4	S10 F4
AIH n=10	1	2	1	1	1	1	8	5
M. Weg. n=3	0	0	0	1	0	2	2	0
PBCn=5	1	1	0	0	0	0	3	0
PSC n=5	0	0	2	1	4	2	5	5
Vaskulitis n=5	0	0	1	1	1	0	2	2
gesamt n=28	2	3	4	4	6	5	20	12

Tab. 19 Häufigkeit der Abweichungen vom definierten ANCA Status bei den verschiedenen Patientengruppen in Abhängigkeit von der Fixierungsmethode, S6 = Spender 6, S10 = Spender 10, F1 = Fixierung mit Methanol -70 °C, F2 = Fixierung mit Methanol +4 °C, F3 = Fixierung mit Ethanol -70 °C, F4 = Fixierung

	p als c	neg. als c	p als neg.	c als neg.	neg. als p
Methanol -70°C		2			3
Methanol +4°C			6	1	1
Ethanol -70°C			8	2	1
Formaldehyd	17	10	4	1	

Tab. 20 Art der Abweichungen vom definierten ANCA Status in Abhängigkeit von der Fixierungsmethode, neg. = ANCA negativ, c = cANCA, p = pANCA

Spender 6	F1		F2		F3		F4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
negativ	13	46	16	57	19	68	11	39
cANCA	3	11	2	7	2	7	17	61
pANCA	12	43	10	36	7	25	0	0

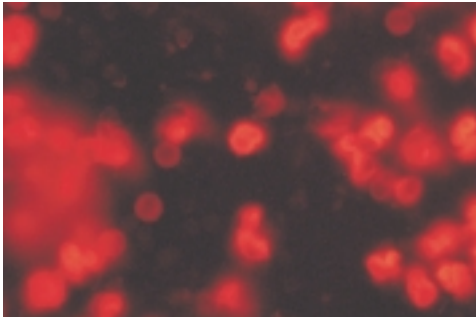
Tab. 21 Nachweis von ANCA mit unterschiedlich fixierten Granulozyten von Spender 6, F1 = Fixierung mit Methanol -70 °C, F2 = Fixierung mit Methanol +4 °C, F3 = Fixierung mit Ethanol -70 °C, F4 = Fixierung mit Formaldehyd, n = Anzahl der Fälle, % = Angaben in Prozent

Spender 10	F1		F2		F3		F4	
	n	%	n	%	n	%	n	%
negativ	12	43	19	68	20	71	14	50
cANCA	3	11	1	4	0	0	13	46
pANCA	13	46	8	29	8	29	1	4

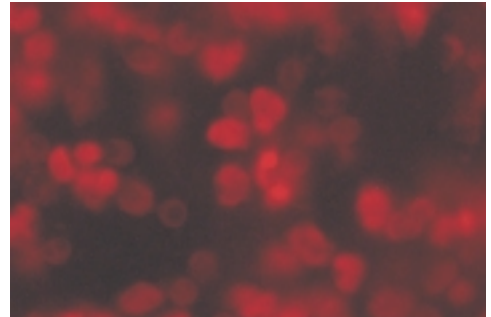
Tab. 22 Nachweis von ANCA mit unterschiedlich fixierten Granulozyten von Spender 10, F1 = Fixierung mit Methanol -70 °C, F2 = Fixierung mit Methanol +4 °C, F3 = Fixierung mit Ethanol -70 °C, F4 = Fixierung mit Formaldehyd, n = Anzahl der Fälle, % = Angaben in Prozent

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

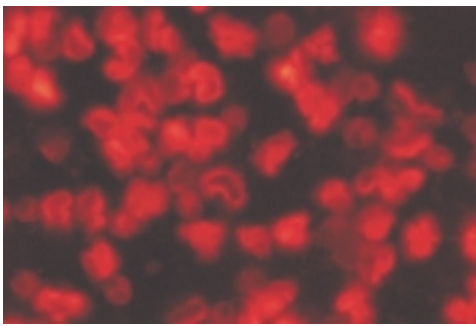
Ergebnisse mit dem IFL bei Verwendung unterschiedlich fixierter Granulozytenpräparate



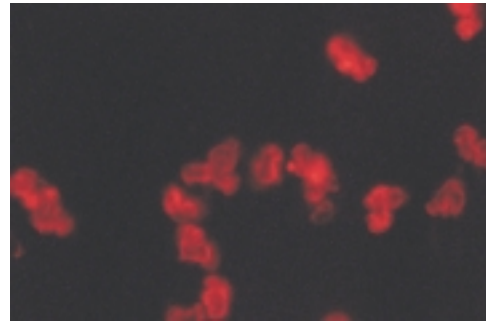
Granulozytenfixierung: Methanol -70 °C
PSC pANCA positiv



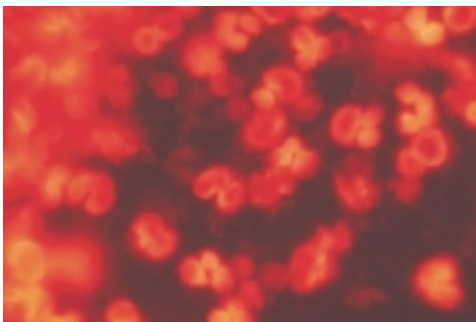
Granulozytenfixierung: Methanol -70 °C
Colitis ulcerosa pANCA positiv



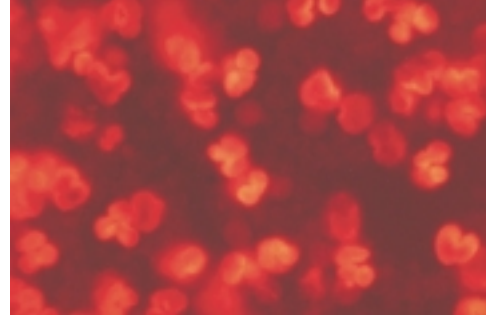
Granulozytenfixierung: Methanol +4 °C
PSC pANCA positiv



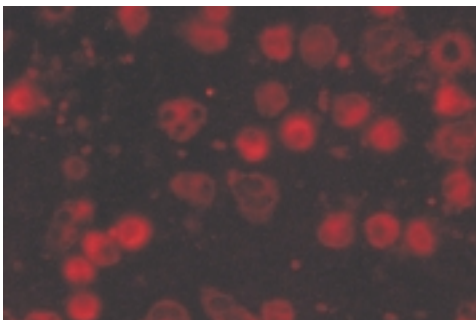
Granulozytenfixierung: Methanol +4 °C
Colitis ulcerosa pANCA positiv



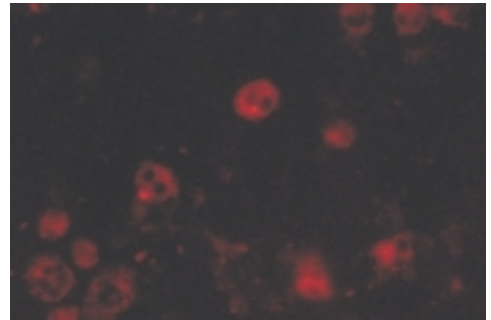
Granulozytenfixierung: Ethanol -70 °C
PSC pANCA positiv



Granulozytenfixierung: Ethanol -70 °C
Colitis ulcerosa pANCA positiv



Granulozytenfixierung: Formaldehyd Raumt
PSC pANCA positiv

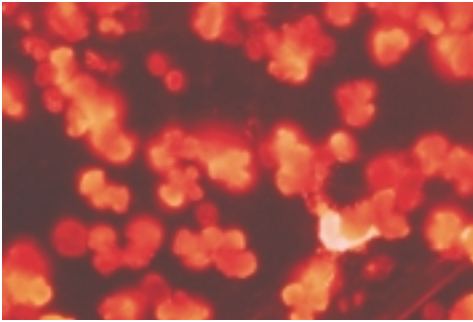


Granulozytenfixierung: Formaldehyd Raumt
Colitis ulcerosa pANCA positiv

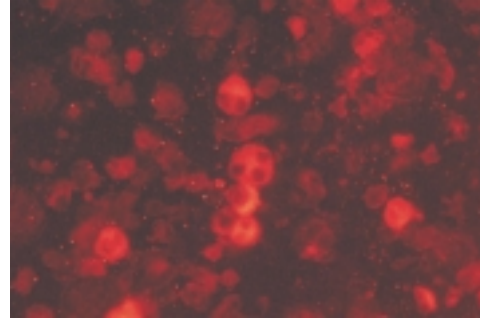
Abb. 3: Immunfluoreszenztest mit unterschiedlich fixierten Granulozytenpräparaten

3 Ergebnisse

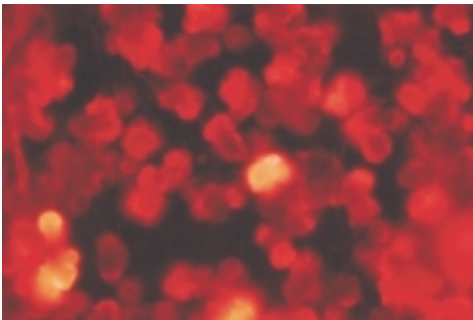
3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis



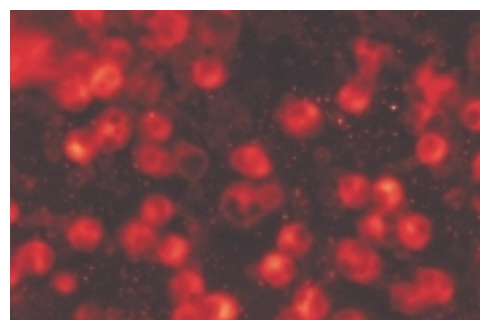
Granulozytenfixierung: Methanol -70 °C
Vaskulitis pANCA positiv



Granulozytenfixierung: Methanol -70 °C
M. Wegener cANCA positiv



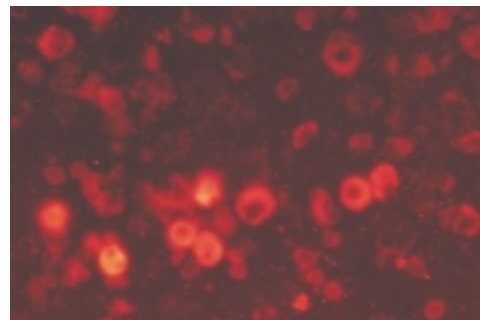
Granulozytenfixierung: Methanol +4 °C
Vaskulitis pANCA positiv



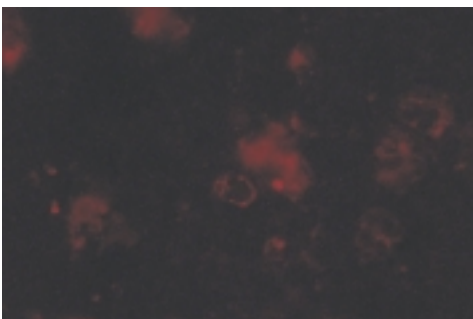
Granulozytenfixierung: Methanol +4 °C
M. Wegener cANCA positiv



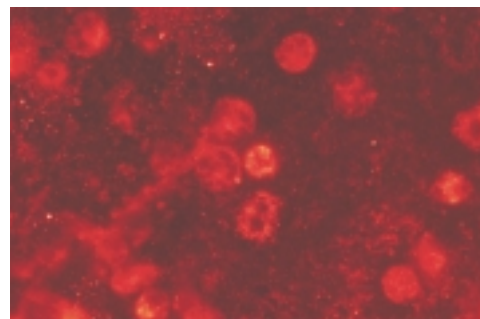
Granulozytenfixierung: Ethanol -70 °C
Vaskulitis pANCA positiv



Granulozytenfixierung: Ethanol -70 °C
M. Wegener cANCA positiv



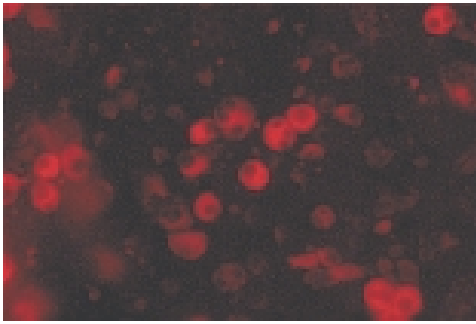
Granulozytenfixierung: Formaldehyd Raumt.
Vaskulitis pANCA positiv



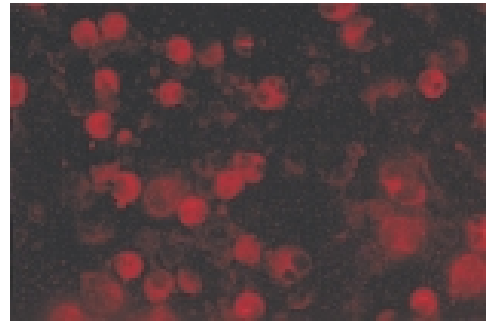
Granulozytenfixierung: Formaldehyd Raumt.
M. Wegener cANCA positiv

Abb. 4: Immunfluoreszenztest mit unterschiedlich fixierten Granulozytenpräparaten

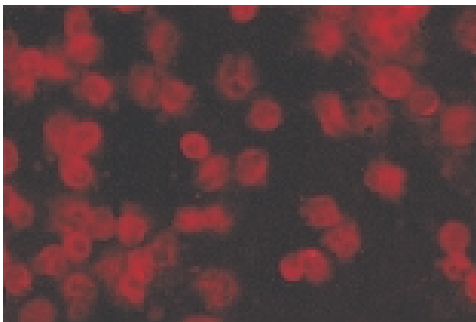
3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis



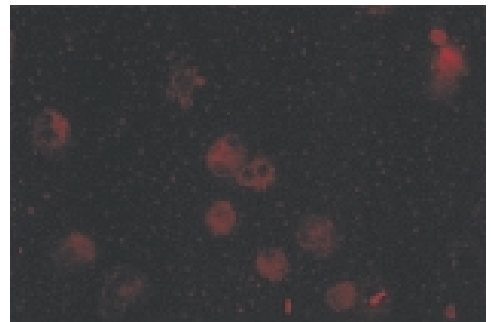
Granulozytenfixierung: Methanol -70 °C
PBC cANCA positiv



Granulozytenfixierung: Ethanol -70 °C
PBC cANCA positiv



Granulozytenfixierung: Methanol +4 °C
PBC cANCA positiv



Granulozytenfixierung: Formaldehyd Raumt
PBC cANCA positiv

Abb. 5: Immunfluoreszenztest mit unterschiedlich fixierten Granulozytenpräparaten

Granulozytenfixierung mit Methanol bei -70 °C:

Die gute Übereinstimmung mit dem ANCA Status (zwei und drei Abweichungen) bei Fixierung der Granulozyten mit Methanol bei -70 °C ist dadurch bedingt, dass zur Festlegung des ANCA Status die Granulozyten mit der selben Fixierungsmethode behandelt wurden. Doch unter Ausschluß der Fixierungsmethode mit Formaldehyd ergab auch die Betrachtung der ANCA Ergebnisse, die mit verschiedenen Fixierungsmethoden gewonnen wurden, in der Regel denselben ANCA-Status.

Tabelle 23 zeigt eine fast vollständige Übereinstimmung zwischen Spender sechs und zehn ($\kappa = 0,94$) und damit eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Verwendung Methanol -70 °C-fixierter Granulozyten.

Methanol -70 °C		Spender 6		
		negativ	cANCA	pANCA
Spender 10	negativ	12	0	0
	cANCA	0	3	0
	pANCA	1	0	12
k = 0,94, Übereinstimmungskoeffizient = 96,4 %				

Tab. 23 Übereinstimmung der Ergebnisse von Spender 6 und 10 bei Fixierung der Granulozyten mit Methanol -70 °C, ■ = Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchungen

Granulozytenfixierung mit Formaldehyd bei Raumtemperatur:

Bei einer Granulozytenfixierung mit Formaldehyd wurden nahezu alle Seren mit pANCA falsch beurteilt, wobei sich vor allem ein cANCA Muster zeigte (17 von 22 pANCA positiven), seltener wurden die Seren als ANCA negativ eingestuft (vier von 22 pANCA positiven).

Aber auch ANCA negative Seren zeigten unter Verwendung Formaldehyd fixierter Präparate häufig ein cANCA Muster (zehn von 30 ANCA negativen).

Die schlechte Übereinstimmung in den Ergebnissen spiegelt sich in der Kappa-Statistik wieder, die mit einem nicht berechenbaren κ und einem Übereinstimmungskoeffizient von 67,9 % die Inkonsistenz der Ergebnisse belegt (Tabelle 24).

Formald. Raumtemp.		Spender 6		
		negativ	cANCA	pANCA
Spender 10	negativ	8	6	0
	cANCA	2	11	0
	pANCA	1	0	0
κ nicht berechenbar, Übereinstimmungskoeffizient = 67,9%				

Tab. 24 Übereinstimmung der Ergebnisse von Spender6 und 10 bei Fixierung der Granulozyten mit Formaldehyd, ■ = Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchungen

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

Granulozytenfixierung mit Ethanol bei -70 °C und Methanol +4 °C:

Nach einer Granulozytenfixierung mit Ethanol bei -70 °C wurden zehn Seren falsch als ANCA negativ eingestuft (acht von 22 pANCA, zwei von vier cANCA).

In geringerem Umfang war dies auch bei einer Granulozytenfixierung mit Methanol bei +4 °C zu beobachten (sechs von 22 pANCA positiven, eines von vier cANCA positiven).

Bei einem ANCA negativen Serum eines Patienten mit AIH zeigte sich sowohl bei Verwendung Ethanol fixierter Granulozyten, als auch bei Methanol +4 °C ein pANCA Muster.

Die Kappa-Statistik für die Fixierungsmethode mit Methanol +4 °C zeigt mit $\kappa=0,65$ einen für diagnostische Verfahren ungenügenden Wert (Tabelle 25).

Der Übereinstimmungskoeffizient von 75,0 % für die Fixierungsmethode mit Ethanol -70 °C macht bei nicht berechenbarem Cohen's Kappa die noch geringere Konstanz der Ergebnisse deutlich (Tabelle 26).

Methanol +4°C		Spender 6		
		negativ	cANCA	pANCA
Spender 10	negativ	15	1	3
	cANCA	0	1	0
	pANCA	1	0	7

$\kappa = 0,65$, Übereinstimmungskoeffizient = 82,1 %

Tab. 25 Übereinstimmung der Ergebnisse von Spender 6 und 10 bei Fixierung der Granulozyten mit Methanol +4 °C, ■ = Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchungen

Ethanol -70°C		Spender 6		
		negativ	cANCA	pANCA
Spender 10	negativ	16	2	2
	cANCA	0	0	0
	pANCA	3	0	5

κ nicht berechenbar, Übereinstimmungskoeffizient = 75,0 %

Tab. 26 Übereinstimmung der Ergebnisse von Spender 6 und 10 bei Fixierung der Granulozyten mit Ethanol -70 °C, ■ = Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchungen

3.1.3 Konstanz der Testergebnisse bei zweifacher Untersuchung:

Zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen im Immunfluoreszenztest wurden Ergebnisse von zwei Untersuchungstagen miteinander verglichen.

Es wurden jeweils Granulozyten von Spender sechs und Spender zehn verwendet, die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen wurden.

Zeitpunkt A: 13.08.99

Zeitpunkt B: 05.10.99

Fixiert wurden die Granulozyten zu jedem Zeitpunkt mit Methanol bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Tabellen 27 und 28 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung.

Bei beiden Granulozytenspendern ergaben sich Unterschiede im Vergleich der zwei Untersuchungstage.

Drei Abweichungen zwischen den Ergebnissen der beiden Untersuchungstage traten bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis auf. Eine Abweichung bestand bei einem Vaskulitispatienten.

Die Tabellen 27 und 30 zeigen die Kappa-Statistiken für Spender sechs und zehn zur Untersuchung der Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen von Zeitpunkt A und B. Dabei zeigt sich bei beiden Spendern eine beinahe vollständige Übereinstimmung (nach Sachs [69]) zwischen beiden Untersuchungszeitpunkten (jeweils $\kappa=0,88$).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass sowohl die Art der Fixierung der Granulozyten, als auch die Auswahl eines geeigneten Spenders für die Validität der Untersuchungen von größter Bedeutung sind. Dabei ist zu erwähnen, dass ca. fünf bis zehn Spender getestet werden müssen, um eine geeignete Granulozytenfraktion zu finden.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

	Spender 6	Spender 10
AIH n=10	2	1
M. Wegener n=3	0	0
PBC n=5	0	0
PSC n=5	0	0
Vaskulitis n=5	0	1
gesamt n=28	6	5

Tab. 27 Anzahl der Abweichungen vom ANCA Ergebnis zwischen den zwei Untersuchungstagen bei den Patientengruppen, n = Anzahl der untersuchten Patienten

Nr.	Diagnose	S6 A	S6 B	S10 A	S10 B
1	AIH		p	p	p
2	AIH	p	p	p	p
3	AIH			p	
4	AIH	p	p	p	p
5	AIH		p	p	p
6	AIH				
7	AIH			p	p
8	AIH				
9	AIH	p	p	p	p
10	AIH				
11	M Weg.				
13	M Weg.	c	c	c	c
14	M Weg.	c	c	c	c
15	PBC				
16	PBC	c	c	c	c
17	PBC				
18	PBC				
19	PBC				
20	PSC	p	p	p	p
21	PSC	p	p	p	p
22	PSC	p	p	p	p
23	PSC	p	p	p	p
24	PSC	p	p	p	p
25	Vaskulitis				
26	Vaskulitis				
27	Vaskulitis				
28	Vaskulitis	p	p	p	p
29	Vaskulitis	p	p		p

Tab. 28 Ergebnisse der ANCA-Bestimmung im indirekten IFL mit Granulozyten, die an verschiedenen Tagen gewonnen wurden, S6 = Spender 6, S10 = Spender 10, A = Zeitpunkt A, B = Zeitpunkt B, ■ = Seren die an den beiden Untersuchungstagen abweichende Ergebnisse zeigten

3.1 Einfluß der Granulozytenpräparate auf das Immunfluoreszenzergebnis

Spender 6		Zeitpunkt A		
		negativ	cANCA	pANCA
Zeitpunkt B	negativ	13	0	0
	cANCA	0	3	0
	pANCA	2	0	10

$\kappa = 0,88$, Übereinstimmungskoeffizient: 92,9 %

Tab. 29 Übereinstimmung der Ergebnisse mit Granulozyten von Spender 6, die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen wurden, ■ = Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchungen

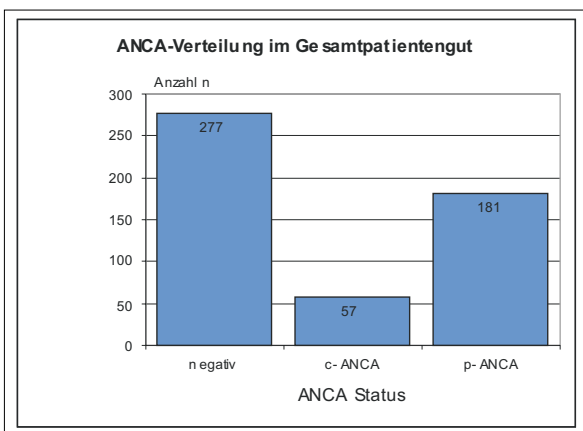
Spender 10		Zeitpunkt A		
		negativ	cANCA	pANCA
Zeitpunkt B	negativ	11	0	1
	cANCA	0	3	0
	pANCA	1	0	12

$\kappa = 0,88$, Übereinstimmungskoeffizient: 92,9 %

Tab. 30 Übereinstimmung der Ergebnisse mit Granulozyten von Spender 10, die zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen wurden, ■ = Übereinstimmungen zwischen beiden Untersuchungen

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

Insgesamt 515 Seren von Patienten mit verschiedenen hepatologischen und anderen Erkrankungen wurden mit dem Immunfluoreszenztest auf das Vorhandensein von ANCA untersucht. Dabei wurden ausschließlich Granulozyten von Spender zehn verwendet, die mit Methanol bei -70 °C fixiert waren.



Von den 515 Seren waren 181 Seren pANCA positiv, 57 zeigten ein cANCA Muster und 277 Seren waren negativ für ANCA (Abbildungen 6-8).

Abb. 6: Auftreten von cANCA und pANCA im Gesamtpatientengut (n=515)

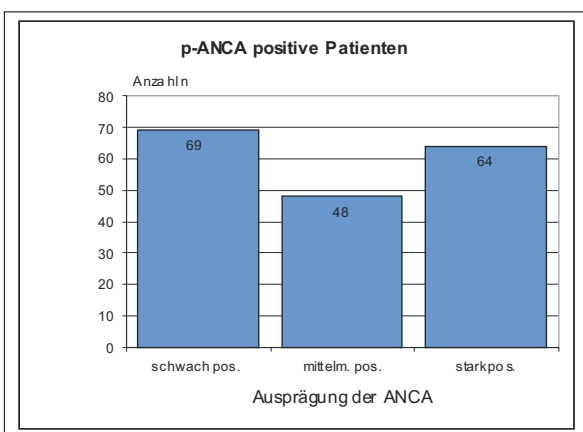


Abb. 7: Darstellung der ANCA-Ausprägungen bei den pANCA positiven Patienten (n=181)

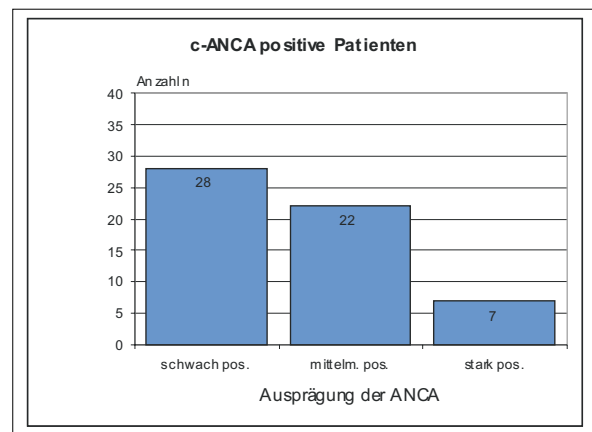


Abb. 8: Darstellung der ANCA-Ausprägungen bei den cANCA positiven Patienten (n=57)

3.2.1 Auftreten von ANCA bei verschiedenen Patientengruppen

Nachfolgend wird differenziert das Auftreten von ANCA bei den verschiedenen Patientengruppen beschrieben.

PSC:

Von den 39 PSC Patienten waren 32 (82 %) pANCA positiv, ein Patient hatte cANCA, sechs Patienten waren ANCA-negativ (Tabelle 31). Bei fünf (13 %) der 39 Patienten war die PSC mit einer Colitis ulcerosa assoziiert, bei weiteren sieben Patienten mit anderen Erkrankungen. Von den sechs ANCA negativen Patienten hatten zwei eine Überlappung mit einer AIH. Die Diagnose der PSC wurde auch bei den ANCA negativen Patienten durch einen eindeutigen Befund in der ERCP gestellt. Bei fünf dieser Patienten waren früher pANCA nachweisbar gewesen, zusätzlich bestand eine ausgeprägte Cholestasekonstellation. Bei zwei der Patienten lag zusätzlich eine PSC-typische Leberhistologie vor.

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
PSC allein	24	20	83	1	19
+ C. ulcerosa	4	4	100		4
+ M.Crohn	2	2	100		2
+ AIH	7	5	71		5
+AIH+ CU	1	1	100		1
+ AIH + krypt. LZ	1	1	100		1
n gesamt	39	33	85	1	32

Tab. 31 ANCA Verteilung bei den Patienten mit PSC und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl, ANCA pos= Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos%= ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

Primär biliäre Zirrhose:

Es wurden 117 Patienten mit PBC untersucht. Davon waren 65 (56 %) Patienten ANCA negativ, bei 45 (38 %) fand sich ein AK-Muster vom cANCA-Typ, welches je-

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
PBC allein	102	44	43	43	1
+ AIH	6	3	50	1	2
+ AIH+ Hep. C	1	1	100		1
+ AP Syndrom	1		0		
+ C. ulcerosa	2	2	100		2
+ Hep. C	1		0		
+ krypt. LZ	4	2	50	1	1
n gesamt	117	52	44	45	7

doch wahrscheinlich durch die mitochondriale Fluoreszenz bedingt ist. Sieben (6 %) der PBC Patienten zeigten ANCA mit perinukleärem Muster. Bei sechs der sieben pANCA positiven Patienten lag eine Überlappung mit anderen Erkrankungen vor. Von den 65 ANCA negativen war dies bei sieben, von den 45 cANCA positiven bei zwei Patienten der Fall (Tabelle 32).

Tab. 32 ANCA Verteilung bei den Patienten mit PBC und Überlappungssyndromen, n = Patientenanzahl, ANCA pos= Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos%= ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

In Tabelle 33 ist die Assoziation von cANCA bei Patienten mit PBC mit dem Erkrankungsstadium und mit dem Auftreten von AMA-Subspezifitäten dargestellt. Dabei fällt auf, dass sich bei Patienten im Spätstadium signifikant häufiger cANCA nachweisen lassen (63%), als bei Patienten im Frühstadium (38%) ($p=0,0492$). In Bezug auf den Nachweis von Anti-M2 oder Anti-M4 AK ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten im Früh- und Spätstadium.

Patienten	Frühstad. (%)	Spätstad. (%)	A-M2 pos (%)	A-M4 pos (%)	Summe
cANCA	25 (38)	15 (63)	42 (43)	34 (45)	43 (42)
pANCA	1 (2)	0 (0)	1 (1)	1 (1)	1 (1)
ANCA neg	39 (60)	9 (37)	54 (56)	41 (54)	58 (57)
gesamt	65 (100)	24 (100)	97 (100)	76 (100)	102 (100)

Tab. 33 Darstellung der Assoziation der ANCA mit dem Stadium der PBC und dem Auftreten von AMA-Subspezifitäten. Patienten mit Überlappungssyndromen wurden ausgeschlossen. Das Frühstadium ist definiert durch Gesamtbilirubinwerte $\leq 1,1$ mg/dl, das Spätstadium durch Gesamtbilirubinwert $> 1,1$ mg/dl. A-M2 pos = Anzahl der Patienten bei denen Anti-M2 AK nachweisbar waren, A-M4 pos = Anzahl der Patienten bei denen Anti-M4 AK nachweisbar waren. Signifikanzprüfung Früh/ Spätstadium für cANCA/ ANCA neg. $p=0,0492$ (knapp signifikant), für Anti-M2 positiv und negativ $p=0,2034$ (nicht signifikant), für Anti-M4 AK positiv und negativ $p=0,0949$ (nicht signifikant).

Autoimmune Hepatitis:

116 Patienten mit AIH wurden untersucht (Tabelle 34). Bei 82 (71 %) ließen sich pANCA, bei vier (3 %) cANCA feststellen. 30 Patienten waren negativ für ANCA. Dabei lagen bei einigen Patienten Überlappungssyndrome vor: 14 der pANCA positiven, zwei der cANCA positiven Patienten und sieben der ANCA negativen Patienten hatten Überlappungssyndrome.

Tabelle 35 zeigt die Häufigkeit der ANCA bei den verschiedenen Subgruppen der AIH. Dabei fällt auf, dass pANCA deutlich häufiger bei der AIH der Subgruppen 1a und 3 auftreten (80 %, 86 %), als bei der AIH Typ 1b oder Typ 2 (57 % und 50 %).

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
AIH allein	93	70	75	2	68
+ AP Syndrom	1	0	0		
+ CU	3	3	100		3
+ Hep. C	2	1	50		1
+ krypt. LZ	1	1	100	1	
+ PBC	6	3	50	1	2
+ PBC + Hep C	1	1	100		1
+ PSC	7	5	71		5
+PSC+CU	1	1	100		1
+ PSC+krypt. LZ	1	1	100		1
n gesamt	116	86	74	4	82

Tab. 34 ANCA Verteilung bei den Patienten mit AIH und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl, ANCA pos= Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos%= ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

	ANCA ges. (%)	pANCA (%)	cANCA (%)	ANCA neg (%)
AIH 1a (n=49)	41 (83)	39 (80)	2 (4)	8(16)
AIH 1b (n=28)	16 (57)	16 (57)	0	12 (43)
AIH2 (n=2)	1 (50)	1 (50)	0	1 (50)
AIH3 (n=14)	12 (86)	12 (86)	0	2 (14)

Tab. 35 Häufigkeit von ANCA bei den verschiedenen Subgruppen der AIH. Patienten mit Überlappungssyndromen wurden ausgeschlossen. ANCA ges. = Gesamtzahl der ANCA positiven Seren, pANCA und cANCA = Anzahl der Seren mit pANCA oder cANCA, ANCA neg = Anzahl der Seren, bei denen keine ANCA nachweisbar waren. Prozentangaben in Klammern. n = Patientenzahl

Hepatitis C:

Es wurden 36 Hepatitis C Patienten auf ANCA untersucht (Tabelle 36).

31 Patienten waren ANCA negativ. Bei fünf Patienten (14 %) fanden sich pANCA. Da-

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
Hep. C allein	32	3	9		3
+ AIH	2	1	50		1
+ PBC	1		0		
+ PBC + AIH	1	1	100		1
n gesamt	36	5	14		5

bei lagen bei jeweils zwei Pa-
tienten Überlappungssyndrome
vor, wobei bei den zwei pANCA
positiven Patienten eine Über-
lappung mit einer AIH bestand.

Tab. 36 ANCA Verteilung bei den Patienten mit Hepatitis C und
Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl, ANCA pos =
Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% =
ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Kryptogene Leberzirrhose:

Von den 20 Patienten mit krypt. LZ waren bei 15 (75 %) keine ANCA nachweisbar.

Zwei Patienten zeigten ein cANCA Muster, drei Patienten ein pANCA Muster (Tabelle

37). Dabei lagen bei beiden cANCA positiven Patienten und bei zwei der pANCA po-

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
krypt. LZ allein	13	1			1
+ AIH	1	1		1	
+ AP Syndrom	1				
+ PBC	4	2		1	1
+ PSC + AIH	1	1			1
n gesamt	20	5		2	3

sitiven Überlappungen mit Er-
krankungen vor, die mit dem
Auftreten von ANCA assoziiert
sind. Eine Überlappung lag
auch bei drei der ANCA negati-
ven Patienten vor.

Tab. 37 ANCA Verteilung bei den Patienten mit kryptogener LZ und
Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl, ANCA pos =
Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% =
ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Toxische Leberzirrhose:

49 Patienten mit toxischer Leberzirrhose wurden untersucht (Tabelle 38). Davon waren 47 Patienten negativ für ANCA. Bei zwei Patienten (4 %) fanden sich pANCA.

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
tox. LZ	49	2	4		2

Tab. 38 ANCA Verteilung bei den Patienten mit toxischer LZ und Überlappungssyndromen, n = Patientenanzahl, ANCA pos = Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% = ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Colitis ulcerosa:

32 der 50 Colitis ulcerosa Patienten (64 %) zeigten ein pANCA Muster im Immunfluoreszenztest. 18 Patienten waren negativ für ANCA (Tabelle 39).

Dabei bestand bei einem der 28 ANCA negativen (4 %) und bei zehn der 32 pANCA positiven Patienten (31 %) ein Überlappungssyndrom mit anderen Erkrankungen. Alle vier Patienten mit einer Überlappung zwischen Colitis ulcerosa und PSC hatten pANCA.

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
K. ulcerosa allein	39	22	56		22
+ PBC	2	2	100		2
+ AP Syndrom	1		0		
+ PSC	4	4	100		4
+ AIH	3	3	100		3
+ AIH + PSC	1	1	100		1
n gesamt	50	32	64		32

Tab. 39 ANCA Verteilung bei den Patienten mit C. ulcerosa und Überlappungssyndromen, n = Patientenanzahl, ANCA pos = Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% = ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Morbus Crohn:

Bei 34 der 39 M. Crohn Patienten (87 %) ließen sich pANCA nachweisen. Fünf Patienten waren ANCA negativ. Bei zwei der pANCA positiven Patienten lag eine Überlappung mit einer PSC vor (Tabelle 40).

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
M. Crohn allein	37	32	86		32
+ PSC	2	2	100		2
n gesamt	39	34	87		34

Tab. 40 ANCA Verteilung bei den Patienten mit M. Crohn und Überlappungssyndromen, n = Patientenzahl, ANCA pos = Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% = ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Morbus Wegener:

Von den sieben M. Wegener Patienten waren alle cANCA positiv. Es bestand bei keinem Patienten eine Überlappung mit anderen Erkrankungen (Tabelle 41).

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
M. Wegener	7	7	100	7	

Tab. 41 ANCA Verteilung bei den Patienten mit M. Wegener, n = Patientenzahl, ANCA pos = Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% = ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Vaskulitis:

Von den 18 Patienten mit verschiedenen Vaskulitiden waren sieben ANCA negativ. Ein Patient hatte cANCA, bei zehn Patienten fanden sich pANCA (56 %).

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
Vaskulitis allein	17	10	59	1	9
+ AP Syndrom	1	1	100		1
n gesamt	18	11	61	1	10

Bei einem pANCA positiven Patienten lag eine Überlappung mit einem Antiphospholipid Syndrom vor (Tabelle 42).

Tab. 42 ANCA Verteilung bei den Patienten mit Vaskulitis und Überlappungssyndromen, n = Patientenanzahl, ANCA pos = Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% = ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

Antiphospholipid Syndrom:

Von den 67 untersuchten Patienten waren 66 ANCA negativ. Bei einem Patienten waren pANCA nachweisbar (Tabelle 43).

	n gesamt	ANCA pos	ANCA pos%	cANCA	pANCA
APS allein	62		0		
+ AIH	1		0		
+ CU	1		0		
+ krypt. LZ	1		0		
+ PBC	1		0		
+ Vaskulitis	1	1	100		1
n gesamt	67	1	1		1

Bei dem pANCA positiven Patienten lag eine Überlappung mit einer Vaskulitis vor. Auch vier der ANCA negativen Fälle hatten eine zweite Erkrankung.

Tab. 43 ANCA Verteilung bei den Patienten mit AP Syndrom und Überlappungssyndromen, n = Patientenanzahl, ANCA pos = Anzahl der ANCA positiven Patienten, ANCA pos% = ANCA positive Patienten in Prozent von der Gesamtzahl

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

Eine zusammenfassende Übersicht über die Häufigkeiten von ANCA bei den untersuchten Erkrankungen gibt Tabelle 44. Patienten mit Überlappungssyndromen wurden für die folgenden Untersuchungen ausgeschlossen.

Diagnose	Anzahl Patienten	ANCA positiv %		
		gesamt	pANCA	cANCA
PSC	24	83	79	4
PBC	102	53	1	42
AIH	93	75	73	2
Hep C	32	9	9	0
kryptogene LZ	13	8	8	0
toxische LZ	49	4	4	0
Colitis ulcerosa	39	56	56	0
M. Crohn	37	92	92	0
M. Wegener	7	100	0	100
Vaskulitis	17	59	53	7
AP Syndrom	62	0	0	0

Tab. 44 Häufigkeit von ANCA bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen (Ausschluß von Überlappungssyndromen). Gesamt= Häufigkeit der pANCA oder cANCA positiven Patienten in Prozent, pANCA= Häufigkeit pANCA positiver Patienten in Prozent, cANCA= Häufigkeit cANCA positiver Patienten in Prozent

3.2.2 Zusammenhang zwischen ANCA und laborchemischen und serologischen Parametern

Im Folgenden wurde der Zusammenhang zwischen dem Nachweis von ANCA im Immunfluoreszenztest und verschiedenen Faktoren untersucht.

Laborparameter:

Die zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen verschiedenen Laborparametern und dem Auftreten von ANCA ausgewerteten Patientenzahlen sind in Tabelle 45 dargestellt.)

Die laborchemischen Parameter Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Gammaglutamyltransferase (GGT), das Gesamtbilirubin sowie die Serum-Gammaglobuline wurden bei verschiedenen Lebererkrankungen (PSC, PBC, Autoimmune Hepatitis, kryptogene und toxische Leberzirrhose) untersucht und in Beziehung zum ANCA-Status gebracht (Tabelle 48). Die Tabellen 46-50 zeigen den Vergleich der Leberwerte aufgeschlüsselt nach einzelnen Erkrankungen. Aufgrund der teilweise sehr kleinen Fallzahlen lassen sich jedoch keine statistisch gesicherten Aussagen innerhalb der einzelnen Erkrankungsgruppen treffen, so dass eine Analyse des Gesamtpatientengutes durchgeführt wurde.

	GOT	GPT	γ -GT	Bili ges	γ -Glob
PSC	14	16	18	13	6
AIH	71	73	70	64	41
PBC	94	96	96	89	51
krypt LZ	12	12	12	11	6
tox LZ	38	39	41	38	29

Tab. 45 Anzahl der untersuchten Patienten mit Lebererkrankungen für die verschiedenen Laborparameter (Ausschluss von Überlappungssyndromen)

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

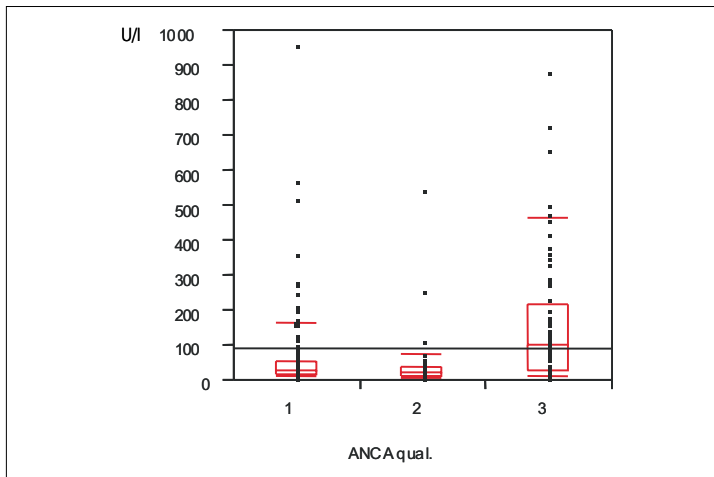


Abb. 10: Vergleich der GOT-Werte (in U/l) zwischen ANCA positiven und negativen Patienten, 1 = ANCA negativ, 2 = cANCA, 3 = pANCA Normbereich der GOT: bis 19 U/l

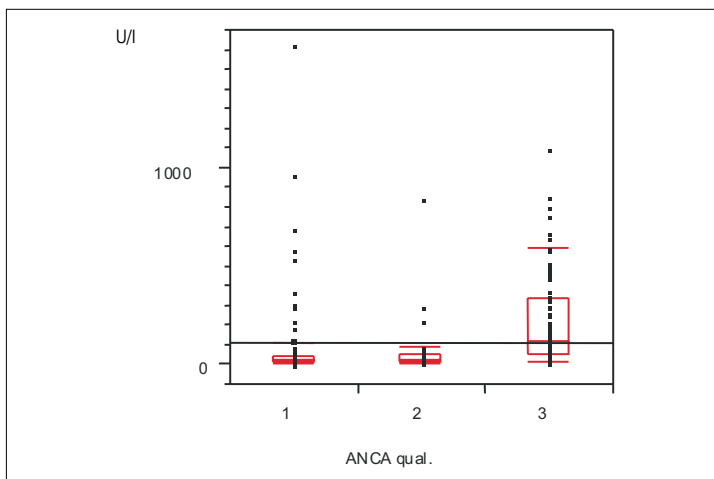


Abb. 11: Vergleich der GPT-Werte (in U/l) zwischen ANCA positiven und negativen Patienten, 1 = ANCA negativ, 2 = cANCA, 3 = pANCA Normbereich der GPT: bis 23 U/L

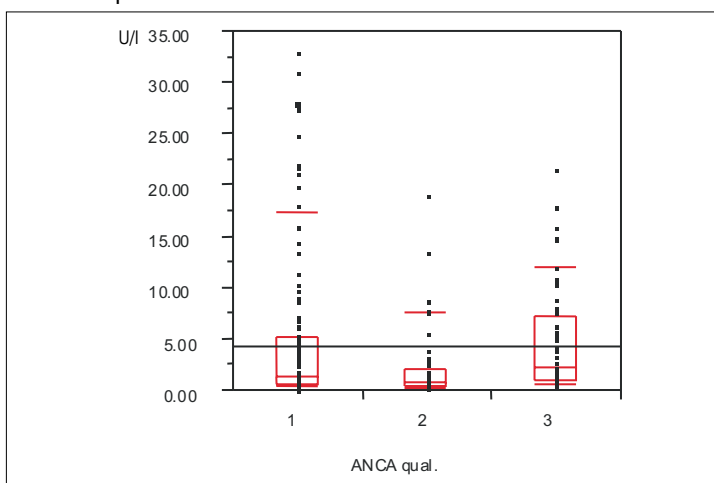


Abb. 12: Vergleich der Gesamtbilirubin-Werte (in mg/dl) zwischen ANCA positiven und negativen Patienten, 1 = ANCA negativ, 2 = cANCA, 3 = pANCA Normbereich des Gesamtbilirubin.: bis 1,1 mg/dl

Die Werte der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen ($p < 0,0001$), wobei die pANCA positiven Patienten höhere Werte aufwiesen als cANCA positive und ANCA negative Patienten (Abbildungen 10 und 11, Tabellen 46 und 47).

Auch bei den Werten des Gesamtbilirubins zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den ANCA positiven und negativen Patienten ($p = 0,0004$) (Abbildung 12, Tabelle 48), allerdings waren diese Unterschiede von geringerem Ausmaß als bei GOT und GPT.

Keine signifikanten Unterschiede ließen sich für die Gamma-glutamyltransferase (GGT) ($p = 0,1392$) und die Gesamt-Serumgammaglobuline feststellen ($p = 0,1368$) (Tabellen 49 und 50).

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

GOT	n	ANCA negative			cANCA			pANCA		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max
PSC	3-0-11	21	27	45	-	-	-	10	28	349
PBC	53-40-1	7	18	275	8	23,8	111	64	64	64
AIH	18-2-51	7	31	960	257	401,5	546	10	114	880
krypt LZ	11-0-1	7	33	250	-	-	-	501	501	501
tox LZ	37-0-1	15	38	284	-	-	-	169	169	169

Tab. 46 Vergleich der GOT-Werte zwischen ANCA positiven und negativen Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, n = Anzahl der untersuchten Patienten mit ANCA negativem- cANCA positivem- pANCA positivem Befund, Normbereich der GOT: bis 19 U/l (Ausschluss von Überlappungssyndromen)

GPT	n	ANCA negative			cANCA			pANCA		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max
PSC	3-0-13	48	60	98	-	-	-	7	58	332
PBC	54-41-1	5	24	369	6	29	291	112	112	112
AIH	18-2-53	1	57,5	1630	226	533	840	13	158	1100
krypt LZ	11-0-1	6	20	60	-	-	-	468	468	468
tox LZ	38-0-1	7	24,5	583	-	-	-	87	87	87

Tab. 47 Vergleich der GPT-Werte zwischen ANCA positiven und negativen Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, n = Anzahl der untersuchten Patienten mit ANCA negativem- cANCA positivem- pANCA positivem Befund, Normbereich der GPT: bis 23 U/l (Ausschluss von Überlappungssyndromen)

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

Bili ges	n	ANCA negative			cANCA			pANCA		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max
PSC	2-0-11	0,6	0,6	0,6	-	-	-	0,56	1	18
PBC *	48-40-1	0,1	0,755	18,2	0,2	0,75	13,5	1,06	1,06	1,06
AIH	17-2-45	0,5	1,6	33	4	11,51	19,02	0,4	2,84	21,7
krypt LZ	10-0-1	0,7	7,34	31	-	-	-	14,8	14,8	14,8
tox LZ	36-0-2	0,4	4,4	28	-	-	-	1,8	3,46	5,12

Tab. 48 Vergleich der Gesamtbilirubin-Werte zwischen ANCA positiven und negativen Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, n = Anzahl der untersuchten Patienten mit ANCA negativem- cANCA positivem- pANCA positivem Befund, Normbereich des Gesamtbilirubin.: bis 1,1 mg/dl (Ausschluss von Überlappungssyndromen)

*: der Median der Bilirubinwerte liegt in dieser Darstellung bei den ANCA neg Patienten höher, als bei den cANCA positiven Patienten. Dies ist nur ein scheinbarer Widerspruch zu den Ergebnissen von Tab. 33 und entsteht durch die deutlich größere absolute Zahl von Patienten mit einer Frühform der PBC (65 im Vergleich zu 24 Patienten mit einer Spätform). Dadurch überwiegen bei den cANCA positiven Patienten diejenigen mit einer Frühform, obwohl die cANCA relativ gesehen signifikant häufiger bei den Patienten mit einer Spätform der PBC auftreten (63% zu 38% bei denjenigen mit Frühform).

γ -GT	n	ANCA negative			cANCA			pANCA		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max
PSC	4-1-13	72	206,5	978	120	120	120	9	62	532
PBC	54-41-1	7	108,5	3860	6	126	942	253	253	253
AIH	18-2-50	3	110,5	275	92	95,5	99	14	94	963
krypt LZ	11-0-1	33	75	1069	-	-	-	83	83	83
tox LZ	39-0-2	15	114	506	-	-	-	90	90,5	91

Tab. 49 Vergleich der γ -GT-Werte zwischen ANCA positiven und negativen Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, n = Anzahl der untersuchten Patienten mit ANCA negativem- cANCA positivem- pANCA positivem Befund, Normbereich der γ -GT: 5-25 U/l (Ausschluss von Überlappungssyndromen)

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

γ -Glob	n	ANCA negative			cANCA			pANCA		
		Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max
PSC	2-0-4	1,16	1,26	1,33	-	-	-	13,4	16,4	25
PBC	29-21-1	10	18,5	71	10,25	22,3	35,4	32,1	32,1	32,1
AIH	9-2-30	15	27,7	116	31	34,5	38	12	31,1	253
krypt LZ	5-0-1	25,2	36,4	40,2	-	-	-	29,1	29,1	29,1
tox LZ	29-0-0	19,4	33	60,1	-	-	-	-	-	-

Tab. 50 Vergleich der γ -Globulin-Werte zwischen ANCA positiven und negativen Patienten mit verschiedenen Erkrankungen, n = Anzahl der untersuchten Patienten mit ANCA negativem- cANCA positivem- pANCA positivem Befund, Normbereich der γ -Glob: 11-22 % (Ausschluss von Überlappungssyndromen)

Die Tabellen 51-53 zeigen die Auswertung der Laborwerte von Patienten mit Lebererkrankungen (siehe Tab. 46-48), bei denen signifikante Unterschiede zwischen den ANCA-Gruppen bestanden, mit dem U-Test. Danach ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den cANCA positiven und ANCA negativen Patienten bei GOT und GPT. Kein signifikanter Unterschied zwischen den pANCA positiven und ANCA negativen besteht beim Gesamtbilirubin.

Vergleicht man die Laborparameter bei den ANCA positiven und negativen Patienten bei PBC und Autoimmuner Hepatitis, zeigen sich -möglicherweise aufgrund zu kleiner Fallzahlen- keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 54 und 55).

GOT	
Unterschiede zwischen	p
cANCA - pANCA - ANCA neg.	<0,0001
pANCA - ANCA neg.	<0,0001
pANCA - cANCA	0,0001
cANCA - ANCA neg.	n.s. (0,3883)

Tab. 51 Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen den GOT-Werten bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen mit Lebererkrankungen, n.s. = nicht signifikant

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

GPT		
Unterschiede zwischen		p
cANCA - pANCA - ANCA neg.		<0,0001
	pANCA - ANCA neg.	<0,0001
	pANCA - cANCA	<0,0001
	cANCA - ANCA neg.	n.s. (0,4961)

Tab. 52 Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen den GPT-Werten bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen mit Lebererkrankungen, n.s. = nicht signifikant

Gesamtbilirubin		
Unterschiede zwischen		p
cANCA - pANCA - ANCA neg.		0,0017
	pANCA - ANCA neg.	n.s. (0,0546)
	pANCA - cANCA	<0,0001
	cANCA - ANCA neg.	0,0289

Tab. 53 Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen den Gesamtbilirubin-Werten bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen mit Lebererkrankungen, n.s. = nicht signifikant

PBC	Anzahl	cANCA Median	ANCA neg Median	p
GOT	40-53	23,5	18	0,2111
GPT	41-54	29	24	0,3956
γ-GT	41-54	126	108,5	0,2426
ges. Bili.	40-48	0,75	0,755	0,5511

Tab. 54 Vergleich von Laborwerten bei cANCA positiven und ANCA negativen Patienten mit PBC (Ausschluss von Überlappungssyndromen).

AIH	Anzahl	cANCA Median	ANCA neg Median	p
GOT	51-18	114	31	0,1895
GPT	53-18	158	57,5	0,1353
γ-GT	50-18	94	110,5	0,8240
ges. Bili.	45-17	2,84	1,6	0,1400

Tab. 55 Vergleich von Laborwerten bei pANCA positiven und ANCA negativen Patienten mit Autoimmuner Hepatitis (Ausschluss von Überlappungssyndromen).

Serum-Immunglobuline:

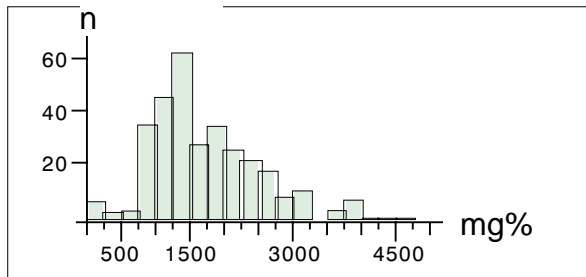


Abb. 13: Verteilung der IgG (in mg/dl) im Gesamtpatientenkollektiv, n = Anzahl der Patienten

Die Serum-Immunglobuline wurden bei verschiedenen Erkrankungen untersucht. Die Verteilungen der Serumglobulinwerte zeigen die Abbildungen 13 bis 15. Die Tabellen 57, 59 und 61 zeigen die Auswertung der Immunglobulingruppen in Bezug auf den ANCA Status der Patienten.

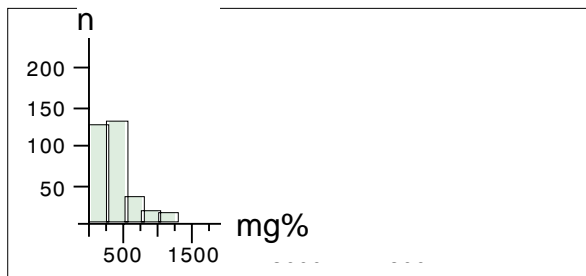


Abb. 14: Verteilung der IgA (in mg/dl) im Gesamtpatientenkollektiv, n = Anzahl der Patienten

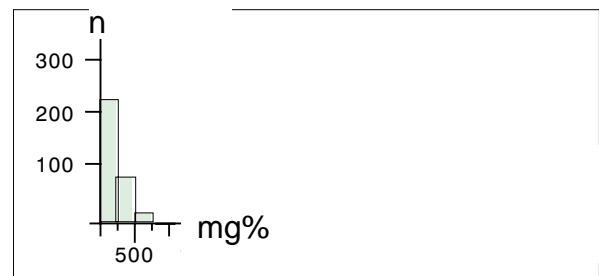


Abb. 15: Verteilung der IgM (in mg/dl) im Gesamtpatientenkollektiv, n = Anzahl der Patienten

Immunglobulin G:

Der Normbereich des IgG war mit 800-1800 mg/dl definiert.

Die Höhe des IgG zeigte signifikante Unterschiede zwischen ANCA positiven und negativen Patientengruppen ($p=0,0014$), wobei die höchsten Werte bei den Patienten mit pANCA auftraten (Abbildung zehn). Die Tabelle 56 zeigt die Auswertung der IgG-Werte mit dem U-Test. Danach ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den cANCA positiven und ANCA negativen Patientengruppen. Betrachtet man die einzelnen Patientenkollektive, ergibt sich ein differenziertes Bild (Tabelle 57). Die IgG-Durchschnittswerte bei den Patienten mit PSC, Colitis ulcerosa oder M. Crohn lagen unabhängig vom ANCA Status im Normbereich.

Bei der Patientengruppe mit Autoimmuner Hepatitis lagen die IgG Werte bei den ANCA positiven Patienten (um 2400 mg/dl) deutlich über den an der oberen Normgrenze liegenden Werten der ANCA negativen Patienten.

Auch die PBC Patienten zeigten deutlich erhöhte IgG Werte, wenn gleichzeitig pANCA vorlagen. Dabei lag bei fünf der sieben pANCA positiven PBC Patienten eine Überlappung mit einer anderen Erkrankung vor, die mit dem Auftreten von pANCA assoziiert ist (AIH, Colitis ulcerosa).

Die an kryptogener Leberzirrhose erkrankten Patienten zeigten unabhängig vom Auftreten von ANCA erhöhte IgG Werte um 2000-2200 mg/dl.

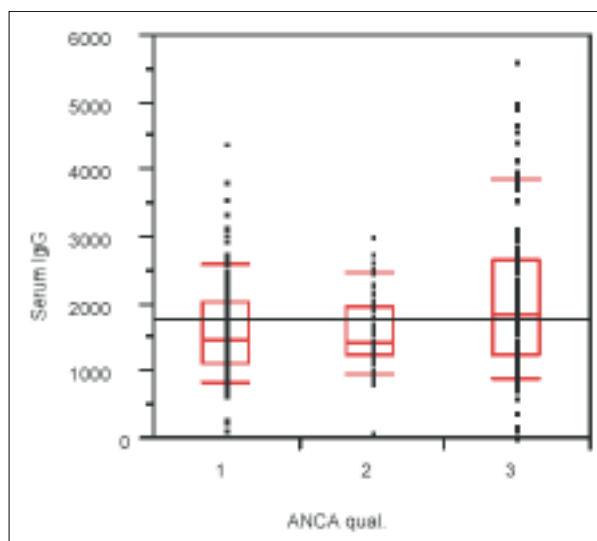


Abb. 16: Vergleich der IgG-Werte (in mg/dl) zwischen den ANCA positiven und negativen Patienten, 1 = ANCA negativ, 2 = cANCA, 3 = pANCA

Die Patienten mit toxischer Leberzirrhose waren zum größten Teil ANCA negativ und zeigten IgG Werte um 2000 mg/dl. Mit 5630 mg/dl wies einer der zwei pANCA positiven Patienten ein stark erhöhtes IgG auf; es war allerdings kein Überlappungssyndrom beschrieben.

IgG		
Unterschiede zwischen		p
cANCA - pANCA - ANCA neg.		0.0014
	pANCA - ANCA neg.	0.0007
	pANCA - cANCA	0.0155
	cANCA - ANCA neg.	n.s. (0.8510)

Tab. 56 Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen den IgG-Werten bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen, n.s. = nicht signifikant

IgG	n (neg-c-p)	ANCA negativ			cANCA			pANCA		
		Min	Med.	Max	Min	Med.	Max	Min	Med.	Max
Gesamtk.	353	144	1460	4400	103	1430	3010	31	1840	5630
PSC	37 (6-1-30)	640	1365	2590	973	973	973	31	1410	3740
C. ulc.	26 (5-0-21)	918	1000	1040				139	1260	3920
M. Crohn	17 (3-0-14)	803	943	1150				384	894.5	1630
AIH	116 (30-4-82)	269	1820	3830	2040	2465	3010	31	2435	5020
PBC	115 (64-44-7)	269	1325	2690	103	1425	2630	1150	2350	4600
krypt. LZ	20 (15-2-3)	144	2020	4400	2150	2225	2300	1820	2100	2560
tox. LZ	48 (46-0-2)	157	1970	3600				989	3309.5	5630

Tab. 57 Vergleich der IgG Werte bei ANCA positiven und negativen Patientengruppen, Angaben in mg/ml, n = Patientenanzahl, in Klammern: ANCA negative, cANCA- und pANCA positive Patientenanzahlen. IgG- Normbereich: 800-1800 mg/ml. Gesamtkollektiv: $p=0.0014$, ■ = Median über den Normbereich erhöht

Immunglobulin A:

Der Normbereich für die IgA lag bei 93-445 mg/dl.

Betrachtet man das Gesamtpatientenkollektiv, lagen die IgA Werte bei ANCA positiven und negativen Patienten im Normbereich (Abbildung 17), wobei sich trotzdem signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergaben ($p=0,0016$). Tabelle 58 zeigt die Auswertung der IgA-Werte mit dem U-Test. Danach ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den cANCA und pANCA positiven Patientengruppen. Nur grenzwertig signifikant waren die Unterschiede zwischen den cANCA positiven und ANCA negativen Patienten. So ergab sich ausschließlich ein ausgeprägter signifikanter Unterschied zwischen den pANCA positiven und ANCA negativen Gruppen mit einem p-Wert von 0,0006.

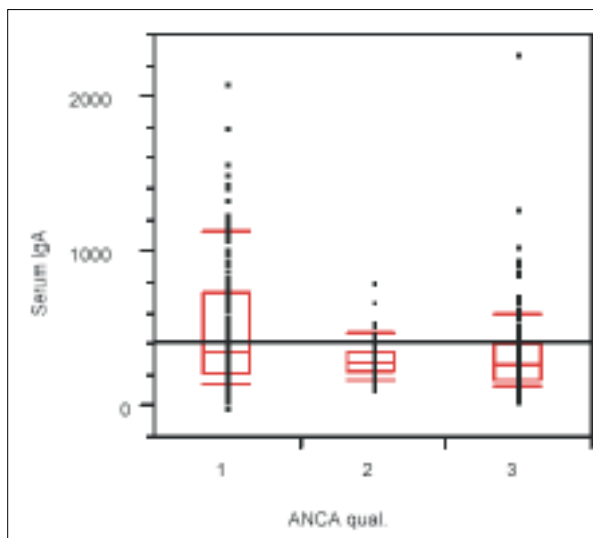


Abb. 17: Vergleich der IgA-Werte (in mg/dl) zwischen den ANCA positiven und negativen Patienten, 1 = ANCA negativ, 2 = cANCA, 3 = pANCA

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

Die Auswertung der einzelnen Patientengruppen ergab, dass die durchschnittlichen IgA Werte nur bei den Patienten mit toxischer und kryptogener Leberzirrhose erhöht waren (um 650-750 mg/dl). Aufgrund der sehr kleinen Fallzahlen von ANCA positiven Patienten ließen sich keine Unterschiede zwischen den ANCA Gruppen erkennen (Tabelle 59).

IgA	
Unterschiede zwischen	p
cANCA - pANCA - ANCA neg.	0.0016
pANCA - ANCA neg.	0.0006
pANCA - cANCA	n.s. (0.6187)
cANCA - ANCA neg.	0.0439

Tab. 58 Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen den IgA-Werten bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen, n.s. = nicht signifikant

IgA	n (neg-c-p)	ANCA negativ			cANCA			pANCA		
		Min	Med.	Max	Min	Med.	Max	Min	Med.	Max
Gesamtk.	353	0	359	2090	121	283	810	41	279	2280
PSC	37 (6-1-30)	108	230.5	742	327	327	327	84	255	1290
C. ulc.	26 (5-0-21)	136	223	407				51	226	383
M. Crohn	17 (3-0-14)	207	258	281				106	262.5	728
AIH	116 (30-4-82)	0	262.5	742	246	288	810	41	300.5	952
PBC	115 (64-44-7)	34	242	848	121	264.5	682	95	344	910
krypt. LZ	20 (15-2-3)	382	776	1455	682	746	810	615	641	910
tox. LZ	48 (46-0-2)	116	972.5	2090				1040	1660	2280

Tab. 59 Vergleich der IgA Werte bei ANCA positiven und negativen Patientengruppen, Angaben in mg/ml, n = Patientenzahl, in Klammern: ANCA negative, cANCA- und pANCA positive Patientenzahlen. IgA-Normbereich: 93-445 mg/ml. Gesamtkollektiv: p=0.0016, ■ =Median über den Normbereich erhöht

Immunglobulin M:

Für die IgM betrug der Normbereich 65-280 mg/dl.

Zwischen den ANCA positiven und negativen Gruppen bestanden signifikante Unterschiede zwischen den IgM-Werten ($p < 0,001$). Dabei lagen die Werte der cANCA positiven Patienten um 290 mg/dl, die ANCA negativen lagen im oberen, die pANCA positiven im mittleren Normbereich.

Die Auswertung nach Wilcoxon (Tabelle 60) zeigt, dass sowohl zwischen den pANCA positiven Patienten und den ANCA negativen, wie auch zwischen den pANCA positiven und cANCA positiven signifikante Unterschiede bestanden (jeweils $p < 0,0001$). Die Unterschiede zwischen cANCA positiven und ANCA negativen Patienten waren

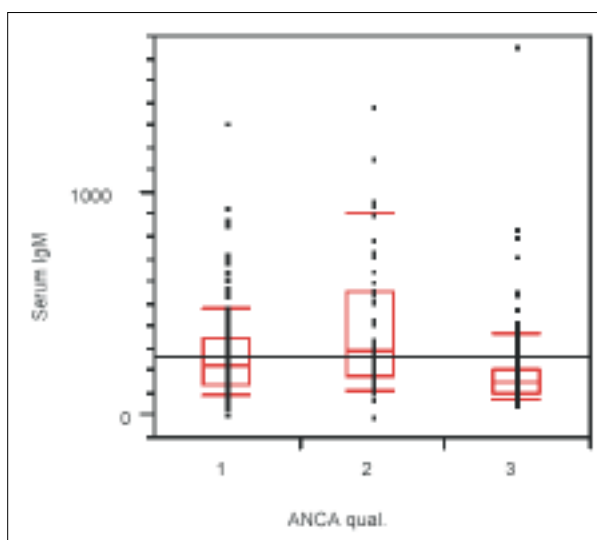


Abb. 18: Vergleich der IgM-Werte (in mg/dl) zwischen den ANCA positiven und negativen Patienten, 1 = ANCA negativ, 2 = cANCA, 3 = pANCA

weniger stark ausgeprägt ($p = 0,0113$). Von den einzelnen Patientengruppen zeigten ausschließlich die cANCA positiven Patienten mit PBC und kryptogener Leberzirrhose erhöhte IgM Werte (Tabelle 61). Bei den zwei Patienten mit kryptogener Leberzirrhose lagen Überlappungen vor; jeweils mit einer PBC und einer Autoimmunen Hepatitis.

IgM		
Unterschiede zwischen		p
cANCA - pANCA - ANCA neg.		<0.0001
	pANCA - ANCA neg.	<0.0001
	pANCA - cANCA	<0.0001
	cANCA - ANCA neg.	0.0113

Tab. 60 Darstellung der signifikanten Unterschiede zwischen den IgM-Werten bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen, n.s. = nicht signifikant

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

IgM	n (neg-c-p)	ANCA negativ			cANCA			pANCA		
		Min	Med.	Max	Min	Med.	Max	Min	Med.	Max
Gesamtk.	353	11	226	1320	0	293	1390	56	153	1660
PSC	37 (6-1-30)	11	105.5	175	193	193	193	63	129.5	255
C. ulc.	26 (5-0-21)	81	108	248				77	153	381
M. Crohn	17 (3-0-14)	96	107	142				59	111	399
AIH	116 (30-4-82)	38	176	1320	160	174.5	728	56	165.5	1660
PBC	115 (64-44-7)	35	279	1320	0	318	1390	91	263	1660
krypt. LZ	20 (15-2-3)	88	212	700	172	542	912	76	91	143
tox. LZ	48 (46-0-2)	60	241.5	936				77	190.5	304

Tab. 61 Vergleich der IgM Werte bei ANCA positiven und negativen Patientengruppen, Angaben in mg/ml, n = Patientenanzahl, in Klammern: ANCA negative, cANCA- und pANCA positive Patientenzahlen. IgM-Normbereich: 65-280 mg/ml. Gesamtkollektiv: p=0.0016, ■ =Median über den Normbereich erhöht

IgG und IgM bei PBC und Autoimmuner Hepatitis:

Vergleicht man die Werte für IgG und IgM bei ANCA positiven und negativen Patienten mit PBC und Autoimmuner Hepatitis, so zeigt sich, dass sowohl die cANCA positiven PBC Patienten wie auch die pANCA positiven Patienten mit AIH signifikant höhere IgG-Werte aufweisen, als die ANCA negativen Patienten. Bei den IgM ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (Tab. 62 und 63).

PBC	Anzahl	cANCA Median	ANCA neg Median	p
IgG	42-57	1420	1300	0,0328
IgM	42-57	314	291	0,5591

Tab. 62 Vergleich von Laborwerten bei pANCA positiven und ANCA negativen Patienten mit Autoimmuner Hepatitis (Ausschluss von Überlappungssyndromen).

AIH	Anzahl	cANCA Median	ANCA neg Median	p
IgG	68-23	3390	1860	0,0001
IgM	68-23	165	17	0,7771

Tab. 63 Vergleich von Laborwerten bei pANCA positiven und ANCA negativen Patienten mit Autoimmuner Hepatitis (Ausschluss von Überlappungssyndromen).

Andere Autoantikörper bei den Patientengruppen:

Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ANCA und anderen Autoantikörpern bei den verschiedenen Patientengruppen.

Autoantikörper bei unterschiedlichen Patientengruppen:

Die Tabellen 64 und 65 zeigen, wie häufig die einzelnen Autoantikörper bei den verschiedenen Patientengruppen auftraten.

Es wurde im Weiteren untersucht, inwiefern das Auftreten der Autoantikörper mit dem ANCA Status der Patienten in Zusammenhang steht.

Die Häufigkeiten der zur Typisierung der Patienten mit Autoimmuner Hepatitis verwendeten Antikörper (antinukleäre AK, Anti-Aktin AK, Anti-Leber-Nieren-Mikrosomen AK, Leber-Pankreas/soluble liver antigen AK) sind in Tabelle 62 dargestellt.

	ANA %(n)	SMA %(n)	Aktin %(n)	AMA %(n)	LKM %(n)	AEA %(n)
PSC n=39	56 (22)	74 (29)	10 (4)	**3 (1)	0 (0)	0 (0)
PBC n=117	28 (33)	60 (70)	10 (12)	87 (102)	****1 (1)	9 (11)
AIH n=116 *	66 (76)	93 (108)	51 (59)	9 (10)	3 (4)	3 (3)
Hep. C n=36	6 (2)	8 (3)	6 (2)	3 (1)	3 (1)	3 (1)
krypt. LZ n=20	45 (9)	55 (11)	5 (1)	20 (4)	0 (0)	10 (2)
tox. LZ n=49	51 (25)	63 (31)	0 (0)	0 (0)	0(0)	18 (9)
CU n=50	48 (24)	50 (25)	4 (2)	2 (1)	***4 (2)	8 (4)
M. Crohn n=39	31 (12)	38 (15)	3 (1)	0 (0)	0 (0)	15 (6)
M. Weg. n=7	14 (1)	57 (4)	100 (7)	0 (0)	0 (0)	14 (1)
Vaskulitis n=18	39 (7)	39 (7)	11 (2)	0 (0)	0 (0)	5 (1)
APS n=67	39 (26)	43 (29)	3 (2)	3 (2)	0 (0)	24 (16)

Tab. 64 Auftreten von Antikörpern bei den Patientengruppen, % = Angaben in Prozent, n = Anzahl der Patienten, die kumulativen Werte überschreiten die Gesamtzahlen durch Mehrfachnennung bei Überlappungssyndromen, ANA = Antinukleäre AK, SMA = AK gegen glatte Muskulatur, Aktin = AK gegen Aktin, AMA = Antimitochondriale AK, LKM = AK gegen Leber-Nieren-Mikrosomen, AEA = Antiendotheliale AK
 *von den Patienten mit AIH hatten 68 eine AIH Typ 1a mit Nachweis von ANA/SMA, 30 Patienten eine AIH Typ 1b (Nachweis von Anti-Aktin AK), 4 Patienten eine AIH Typ 2 (Anti-LKM AK) und 14 Patienten eine AIH Typ 3 (Anti-LP/SLA positiv). **PSC gesichert mittels ERCP, atypische cANCA nachweisbar, keine PBC spez Determinanten im Western Blot. ***ein Patient mit Überlappungssyndrom mit einer AIH Typ 2, ein Patient mit PSC und CU, kein Hinweis auf AIH. ****ein Patient mit Überlappungssyndrom mit einer AIH Typ 2

3 Ergebnisse

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

	Sinusoide %(n)	ASA %(n)	SD %(n)	Parietal %(n)	Fibrillen %(n)
PSC n=39	15 (6)	21 (8)	21 (8)	41 (16)	21 (8)
CU n=50	32 (16)	36 (18)	24 (12)	50 (25)	12 (6)
M. Crohn n=39	38 (15)	49 (19)	21 (8)	49 (19)	2 (1)
AIH n=116	15 (17)	3 (3)	36 (42)	33 (38)	33 (38)
M. Weg. n=7	29 (2)	14 (1)	71 (5)	47 (4)	0 (0)
Vaskulitis n=18	28 (5)	22 (4)	39 (7)	22 (4)	28 (5)
PBC n=117	15 (18)	11 (13)	7 (8)	9 (10)	8 (9)
krypt. LZ n=20	25 (5)	35 (7)	35 (7)	35 (7)	20 (4)
tox. LZ n=49	37 (18)	31 (15)	31 (15)	57 (28)	29 (14)
Hep. C n=36	0 (0)	0 (0)	3 (1)	6 (2)	6 (2)
APS n=67	28 (19)	33 (22)	29 (26)	37 (25)	25 (17)

Tab. 66 Fortsetzung von Tabelle 57 Sinusoide = AK gegen Lebersinusoide, ASA = Antisarkolemmale AK, SD = AK gegen Schilddrüse, Parietal = AK gegen Parietalzellen, Fibrillen = AK gegen Fibrillen
 *von den Patienten mit AIH hatten 68 eine AIH Typ 1a mit Nachweis von ANA/SMA, 30 Patienten eine AIH Typ 1b (Nachweis von Anti-Aktin AK), 4 Patienten eine AIH Typ 2 (Anti-LKM AK) und 14 Patienten eine AIH Typ 3 (Anti-LP/SLA positiv).

	AIH 1a n=68	AIH 1b n=30	AIH 2 n=4	AIH 3 n=14
ANA	64	3	1	8
Anti-Aktin	42	30	0	4
LKM	0	0	4	0
LP/SLA	0	0	0	14

Tab. 65 Auftreten von Antinukleären AK (ANA), Anti-Aktin AK, AK gegen Leber-Nieren-Mikrosomen (LKM) und Anti-Leber-Pankreas/soluble liver antigen AK (LP/SLA) bei den verschiedenen Typen der Autoimmunen Hepatitis, n = Anzahl der Patienten

Die Tabelle 67 zeigt, für welche AK sich signifikante Unterschiede in der Verteilung zwischen den ANCA positiven und negativen Patienten ergaben.

Antinukleäre AK, AK gegen glatte Muskulatur und Anti-Aktin AK traten am häufigsten bei den pANCA positiven Patienten auf. Auch AK gegen Parietalzellen und Fibrillen waren bei dieser Gruppe am häufigsten.

Dagegen waren Antimitochondriale AK in überwiegender Anzahl bei den Patienten zu finden, die im Immunfluoreszenztest ein cANCA Muster zeigten.

Für die übrigen Autoantikörper ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen ANCA positiven und negativen Patienten finden.

Aufgrund der teilweise kleinen Stichproben war eine valide statistische Auswertung der Antikörperverteilungen in den einzelnen Patientengruppen nicht möglich.

3.2 Nachweis von ANCA mit dem Immunfluoreszenztest

	ANCA neg n=277	cANCA n=57	pANCA n=181	p
ANA % (n)	35 (98)	23 (13)	54 (98)	<0.0001
SMA % (n)	50 (138)	56 (32)	70 (127)	<0.0001
Aktin % (n)	9 (26)	9 (5)	24 (43)	<0.0001
AMA % (n)	22 (62)	74 (42)	4 (8)	<0.0001
LKM % (n)	1 (2)	0 (0)	2 (4)	0.1978
AEA % (n)	12 (33)	11 (6)	7 (12)	0.1619
Sinusoide % (n)	21 (59)	26 (15)	23 (42)	0.6903
ASA % (n)	24 (66)	16 (9)	18 (32)	0.1712

Tab. 67 Unterschiede im Auftreten von Autoantikörpern bei den ANCA positiven und negativen Patientengruppen, Angaben in Prozent, in Klammern absolute Zahlen, n = Anzahl der Patienten, ANA = Antinukleäre AK, SMA = AK gegen glatte Muskulatur, Aktin = AK gegen Aktin, AMA = Antimitochondriale Ak, LKM = AK gegen Leber-Nieren-Mikrosomen, AEA = Antiendotheliale AK, Sinusoide = AK gegen Lebersinusoide, ASA = Antisarkolemmale AK, SD = AK gegen Schilddrüse, Parietal = AK gegen Parietalzellen, Fibrillen = AK gegen Fibrillen

3.2.3 Zusammenfassung der Laborbefunde

1. pANCA traten vor allem bei Patienten mit PSC, Autoimmuner Hepatitis, Colitis ulcerosa, M. Crohn und Vaskulitiden auf. cANCA sind typisch für den M. Wegener, finden sich aber auch bei der PBC. Bei Patienten mit Hepatitis C, kryptogener oder toxischer Leberzirrhose traten selten ANCA auf.
2. Erhöhte GOT- und GPT-Werte fanden sich bei den pANCA positiven Patienten mit Lebererkrankungen. Bei der PBC zeigten Patienten mit erhöhtem Gesamtbilirubin Spiegel signifikant häufiger ein cANCA Muster (vgl. Tab.33).
3. Erhöhte Serum-IgG-Werte traten vor allem bei der Autoimmunen Hepatitis und kryptogenen Leberzirrhose auf. Die IgA-Spiegel waren bei der toxischen und kryptogenen Leberzirrhose erhöht. Signifikant über der Norm liegende IgM-Werte traten ausschließlich bei cANCA positiven PBC Patienten auf
4. pANCA waren vor allem mit antinukleären AK (ANA), AK gegen glatte Muskulatur (SMA) und Anti-Aktin AK assoziiert. cANCA traten -neben Patienten mit M. Wegener- vor allem bei Patienten mit AMA positiver PBC auf.

3.3 Nachweis von ANCA mit dem ELISA

Alle 515 Patienten wurden mit dem ELISA auf Anti-Neutrophil-Antikörper vom Typ IgG, IgG F(ab')₂ und IgM untersucht. Als Antigen wurde eine Suspension beschallter Neutrophiler Granulozyten verwendet. Die Granulozyten stammten ausschließlich von Spender zehn.

Die bei der Durchführung des ELISA verwendeten Kontrollseren stammten von jeweils einem pANCA und cANCA positiven Patienten und von neun ANCA negativen gesunden Blutspendern.

Normgrenzen:

Zur Festlegung der Normgrenzen wurden die Werte der ANCA negativen Kontrollen verwendet (Tabelle 68). Ein Ergebnis wurde als positiv bewertet, wenn der Wert folgender Formel entsprach:

$$\text{Wert} \geq M + 3 \times \sigma$$

M = Mittelwert der negativen Kontrollen, σ = Standardabweichung

Nach dieser Formel ergaben sich folgende Normgrenzen:

IgG positiv für $x \geq 0,0987$

IgG F(ab')₂ positiv für $x \geq 0,1025$

IgM positiv für $x \geq 0,2344$

	Mittelwert	σ	Normgrenze
IgG	0.0402	0.0195	0.0987
IgG F(ab') ₂	0.0353	0.0224	0.1025
IgM	0.0904	0.0480	0.2344

Tab. 68 Verwendete Mittelwerte und Standardabweichungen (σ) zur Berechnung der Normgrenzen für den ELISA

Nachweis der Immunglobulinklassen am Gesamtkollektiv:

Die Abbildungen 19-21 und Tabellen 69-71 zeigen die Ergebnisse des ELISA in bezug auf das Gesamt-Patientenkollektiv.

92 % der Patienten zeigten im ELISA Antikörper vom IgG Typ, IgG F(ab')₂ Antikörper waren bei 73 % nachweisbar. Antikörper vom Typ IgM hatten 55 % der Patienten.

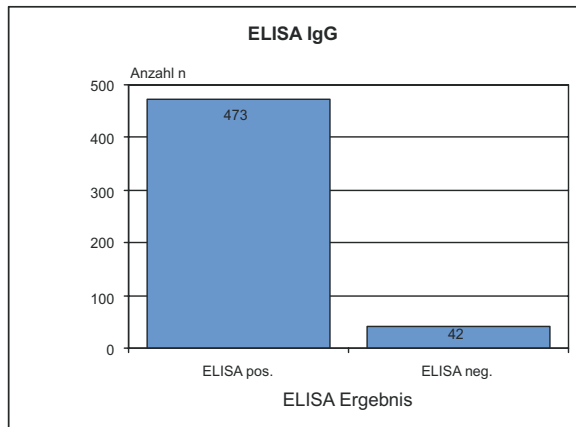


Abb. 19: Patienten im Gesamtkollektiv mit Nachweis von AK gegen Neutrophile Granulozyten vom IgG Typ im ELISA

ELISA IgG	Anzahl n	Prozent %
ELISA pos.	473	92
ELISA neg.	42	8
gesamt	515	100

Tab. 69 Patienten im Gesamtkollektiv mit Nachweis von AK gegen Neutrophile Granulozyten vom IgG Typ im ELISA

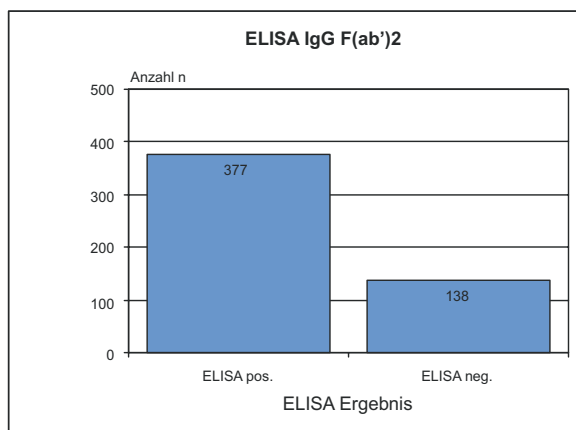


Abb. 20: Patienten im Gesamtkollektiv mit Nachweis von AK gegen Neutrophile Granulozyten vom Typ IgG F(ab')₂ im ELISA

	Anzahl n	Prozent %
ELISA pos.	377	73
ELISA neg.	138	27
gesamt	515	100

Tab. 70 Patienten im Gesamtkollektiv mit Nachweis von AK gegen Neutrophile Granulozyten vom Typ IgG F(ab')₂ im ELISA

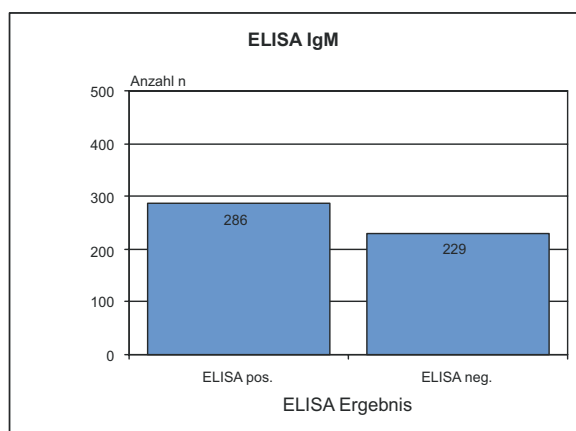


Abb. 21: Patienten im Gesamtkollektiv mit Nachweis von AK gegen Neutrophile Granulozyten vom IgM Typ im ELISA

	Anzahl n	Prozent %
ELISA pos.	286	56
ELISA neg.	229	44
gesamt	515	100

Tab. 71 Patienten im Gesamtkollektiv mit Nachweis von AK gegen Neutrophile Granulozyten vom IgM Typ im ELISA

Zusammenhang zwischen Diagnose und Immunglobulinklassen:

Es wurde untersucht, ob sich im Vergleich der einzelnen Patientengruppen Unterschiede im Auftreten der einzelnen Immunglobulinklassen ergaben.

Um eine genauere Interpretation zu ermöglichen, wurden ausschließlich die Patienten betrachtet, bei denen kein Überlappungssyndrom mehrerer Erkrankungen vorlag (n=475).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 72 dargestellt.

Es fiel auf, dass bei allen Patientengruppen die AK vom IgG Typ am stärksten und die AK vom IgM Typ am geringsten vertreten waren.

IgG lagen in den unterschiedlichen Patientengruppen bei 60-100 % der Fälle vor, IgG F(ab')₂ bei 38-94 %. IgM fanden sich bei 19-78 % der Patienten.

Diagnose	n	Anzahl (%) positive Patienten		
		IgG	IgG F(ab') ₂	IgM
PSC	24	22 (92)	19 (79)	11 (46)
Colitis ulcerosa	39	29 (74)	24 (62)	3 (21)
M. Crohn	37	23 (62)	14 (38)	7 (19)
PBC	102	96 (94)	64 (63)	61 (60)
AIH	93	92 (99)	81 (87)	68 (73)
Hepatitis C	32	32 (100)	16 (50)	6 (19)
toxische LZ	49	49 (100)	45 (92)	38 (78)
kryptogene LZ	13	12 (92)	10 (77)	6 (46)
Vaskulitis	17	17 (100)	16 (94)	8 (47)
M. Wegener	7	6 (96)	5 (71)	3 (43)
Ap Syndrom	62	56 (90)	47 (76)	48 (77)

Tab. 72 Vorkommen von AK verschiedener Immunglobulin-Typen gegen Neutrophile Granulozyten bei verschiedenen Patientengruppen, n= Anzahl der getesteten Patienten

Zusammenhang zwischen ANCA im IFL und dem Nachweis von Antikörpern gegen Neutrophile Granulozyten verschiedener Immunglobulin-Typen im ELISA:

Im folgenden wurde untersucht, ob sich beim Nachweis der Immunglobulinklassen Unterschiede zwischen den ANCA positiven und negativen Patienten ergaben (Tabelle 73).

Dabei zeigte sich, dass ausschließlich bei den IgM ein signifikanter Unterschied zwischen den ANCA negativen, sowie den c- und p-ANCA positiven Patienten bestand ($p=0,0363$).

In die differenzierte Untersuchung der Patientengruppen wurden nur die Patienten ohne Überlappungssyndrom einbezogen.

Dabei ergaben sich in den einzelnen Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen ANCA positiven und negativen Patienten im Auftreten der verschiedenen Immunglobulinklassen (nicht dargestellt).

IFL-Muster	n	Anzahl (%) positive Patienten		
		IgG	IgG F(ab') ₂	IgM
pANCA	181	163 (90)	144 (80)	87 (48)
cANCA	57	55 (96)	40 (70)	32 (56)
ANCA negativ	277	255 (92)	193 (70)	167 (60)

Tab. 73 Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Nachweis von AK vom Typ IgG, IgG F(ab')₂ und IgM im ELISA und dem Auftreten von ANCA im Immunfluoreszenztest, n= Anzahl der getesteten Patienten

3.4 Antigenidentifizierung im Western Blot

Zur Untersuchung der Frage, ob sich die Target-Antigene der ANCA als spezifische Determinanten im Western Blot identifizieren lassen, wurden 56 Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen untersucht.

Das Antigen wurde in allen Fällen von Spender zehn gewonnen und entweder unbehandelt, mit Ultraschall oder mit Triton behandelt verwendet. Als Auftragspuffer wurden ein Standard- (denaturierender) und ein Nativ- Probenpuffer eingesetzt. Der Vergleich der Methoden zeigte, dass die Verwendung von beschallten Granulozyten und Standard-Probenpuffer die besten Ergebnisse erzielte. Für alle weiteren Untersuchungen wurde deshalb diese Methode verwendet.

Tabellen 74-82 geben Auskunft über Auftreten und Molekulargewicht der nachgewiesenen Determinanten.

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
37	AIH 1a	p+++		1				1						
38	AIH 1a	p+++		1										
39	AIH1b	p+++		1				1	1	1	1		1	1
40	AIH 2	p++		1			1		1	1				
41	AIH 3	p+++		1										
	gesamt: 5			5			1	2	2	2	1		1	1

Tab. 74 Darstellung der verschiedenen Determinanten, mit denen Seren von Patienten mit Autoimmuner Hepatitis im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten.

Nr.	Diagnose	ANA	SMA	Aktin	dsDNA	Fibrillen	LKM	Parietalz	SD
37	AIH 1a	pos	pos	pos		pos			
38	AIH 1a	pos	pos		pos				
39	AIH 1b	pos	pos	pos		pos		pos	pos
40	AIH 2		pos			pos	pos	pos	pos
41	AIH 3	pos	pos						
	gesamt: 5	4	5	2	1	3	1	2	2

Tab. 75 Darstellung der verschiedenen Autoantikörper, die bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis im Immunfluoreszenztest nachweisbar waren.

3.4 Antigenidentifizierung im Western Blot

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
7	CU	p++			1			1		1			1	
8	CU	p+++						1					1	
9	CU	p++				1			1	1			1	
10	CU	p+++				1			1	1			1	
11	CU	p++							1	1			1	
12	CU	p++		1		1								
13	CU	p++				1	1			1				
	gesamt: 7			1	1	4	1	2	3	5			5	
14	CU	neg			1	1		1		1			1	
15	CU	neg			1	1				1				
16	CU	neg				1			1	1			1	
17	CU	neg												
18	CU	neg												
	gesamt: 5				2	3		1	1	3			2	

Tab. 76 Darstellung der verschiedenen Determinanten mit denen Seren von Patienten mit Colitis ulcerosa im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
19	PSC	p+++							1	1				
20	PSC	p+++		1		1			1	1	1		1	
21	PSC	p+++				1			1	1			1	
22	PSC	p++	1			1			1	1	1		1	
23	PSC	p+++				1			1	1			1	
24	PSC	p+++				1			1	1			1	
	gesamt: 6		1	1		5			6	6	2		5	
25	PSC	neg				1							1	
26	PSC	neg			1	1			1	1			1	1
27	PSC	neg			1	1			1	1			1	
28	PSC	neg				1			1	1			1	
29	PSC	neg				1			1	1			1	
	gesamt: 5		1		2	5			4	4			5	1

Tab. 77 Darstellung der verschiedenen Determinanten, mit denen Seren von Patienten mit PSC im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

3 Ergebnisse

3.4 Antigenidentifizierung im Western Blot

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
42	PBC	neg						1						
43	PBC	neg						1						
44	PBC	neg						1						
45	PBC	neg						1						
46	PBC	neg												
	gesamt: 5							4						

Tab. 78 Darstellung der verschiedenen Determinanten, mit denen Seren von Patienten mit PBC im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
47	tox LZ	neg						1						1
48	tox LZ	neg						1						1
49	tox LZ	neg						1			1			1
50	tox LZ	neg						1						1
51	tox LZ	neg						1						1
	gesamt: 5							5			1			5

Tab. 79 Darstellung der verschiedenen Determinanten, mit denen Seren von Patienten mit toxischer Leberzirrhose im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
52	Hep. C	neg												
53	Hep. C	neg												
54	Hep. C	neg						1						
55	Hep. C	neg						1						
56	Hep. C	neg						1						
	gesamt: 5							3						

Tab. 80 Darstellung der verschiedenen Determinanten, mit denen Seren von Patienten mit Hepatitis C im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
30	M Weg.	c++						1						1
31	M Weg.	c+						1						
32	M Weg.	c+						1						
33	M Weg.	c+++						1						
34	M Weg.	c+++						1						
35	M Weg.	c++						1						
36	M Weg.	c+						1						
gesamt: 7								7					1	1

Tab. 81 Darstellung der verschiedenen Determinanten mit denen Seren von Patienten mit M. Wegener im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

Nr.	Diagnose	ANCA	30kD	32kD	34kD	35kD	40kD	42kD	55kD	60kD	65kD	70kD	95kD	100kD
1	Normals.	neg							1	1				1
2	Normals.	neg								1		1		
3	Normals.	neg								1		1		
4	Normals.	neg							1	1				1
5	Normals.	neg							1	1				1
6	Normals.	neg								1		1		
gesamt (6)									3	6		3		3

Tab. 82 Darstellung der verschiedenen Determinanten, mit denen Seren gesunder Blutspender im Western Blot mit beschallten Granulozyten reagierten

Spezifische Determinanten:

Die Determinante bei 35 kD war ausschließlich bei Patienten mit PSC und Colitis ulcerosa nachweisbar, und zwar sowohl bei pANCA positiven (neun von 13) als auch bei ANCA negativen (acht von zehn) Patienten.

Die bei 95 kD nachweisbare Determinante war unabhängig vom ANCA Status bei zehn von elf PSC-Patienten und sieben von zwölf Patienten mit Colitis ulcerosa vorhanden. Sie war auch bei einem p-ANCA positiven Patienten mit Autoimmuner Hepatitis zu finden.

Unspezifische Determinanten:

Bei verschiedenen Erkrankungen fanden sich unspezifische Determinanten bei 30 kD (n=eins), 34 kD (n=fünf), 40 kD (n=zwei), 65 kD (n=vier) und 70 kD (n=drei).

Eine unspezifische Determinante bei 42 kD war vor allem bei M. Wegener (sieben von sieben), PBC (vier von fünf) und toxischer Leberzirrhose (fünf von fünf) nachweisbar. In geringerem Umfang fand sie sich bei Hepatitis C (drei von fünf), Autoimmuner Hepatitis (zwei von fünf) und Colitis ulcerosa (drei von zwölf). Bei Seren von Patienten mit PSC und von gesunden Blutspendern war diese Bande nicht nachweisbar.

Eine Determinante bei 100 kD fand sich bei allen fünf untersuchten Patienten mit toxischer Leberzirrhose und bei je einem Patienten mit PSC und Autoimmuner Hepatitis. Allerdings war sie auch bei drei von sechs gesunden Blutspendern nachweisbar.

Determinanten bei 55 kD und 60 kD waren bei zehn von elf Patienten mit PSC und vier bis acht von zwölf Patienten mit Colitis ulcerosa zu finden. Außerdem traten sie bei einem Patienten mit Autoimmuner Hepatitis und bei drei bis sechs von sechs gesunden Blutspendern auf.

Zusammenfassung der Westernblot-Befunde:

1. Die Determinanten bei 35 und 95 kD zeigten eine hohe Spezifität für die PSC und Colitis ulcerosa.
2. Eine Determinante bei 32 kD war fast ausschließlich bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis nachweisbar, unabhängig vom sonstigen Antikörperstatus.
3. Bei Patienten mit PBC, Hepatitis C und toxischer Leberzirrhose, aber auch mit M. Wegener - nicht dagegen mit PSC - fand sich häufig eine Determinante bei 42 kD; bei Patienten mit toxischer Leberzirrhose zusätzlich eine Reaktion mit einem Protein bei 100 kD.

4. Weitere Determinanten bei 30, 34, 40, 55, 60, 65 und 70 kD traten in unterschiedlicher Häufigkeit innerhalb der verschiedenen Patientengruppen auf und sind als unspezifisch zu bewerten.

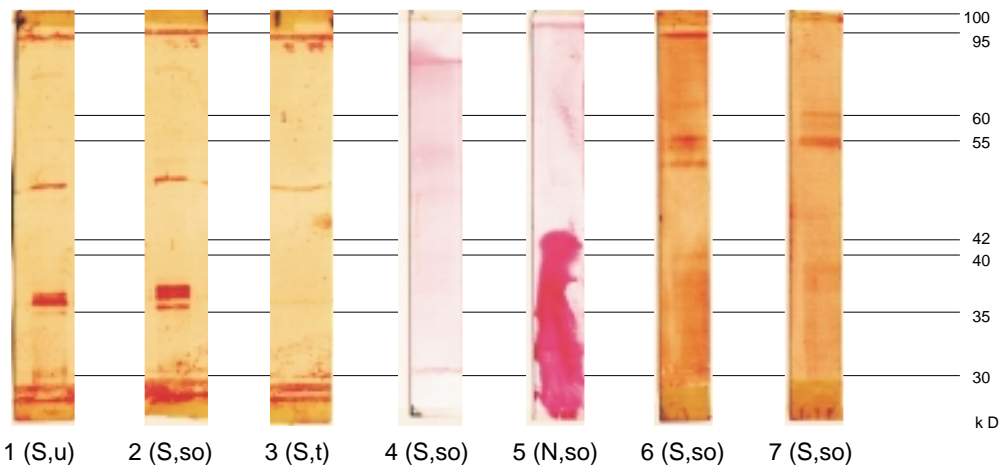


Abb. 22: Western Blot Untersuchung verschiedener Patientenseren, S = Auftragspuffer Standard, N = Auftragspuffer Nativ, u = Antigen unbehandelt, so = Antigen mit ultraschall behandelt, t = Antigen mit Triton behandelt, 1, 2, 3 = CU pANCA pos., 4,5 = Sheets mit Proteinfärbung, 6, 7 = gesunde Kontrollen ANCA neg.,

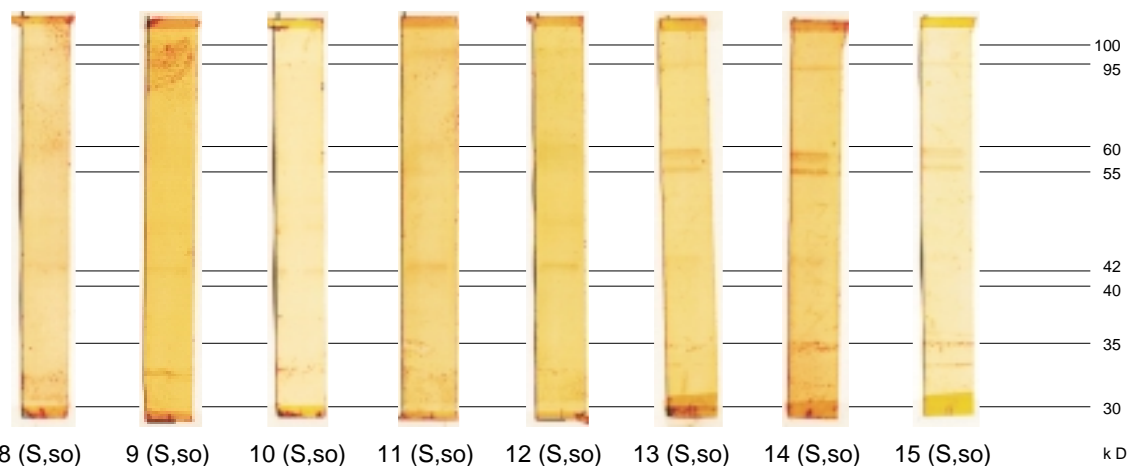


Abb. 23: Fortsetzung Abbildung 16, 8 = M. Wegener cANCA pos., 9 = Autoimmune Hepatitis pANCA pos., 10 = PBC ANCA neg., 11 = tox. Leberzirrhose ANCA neg., 12 = Hepatitis C ANCA neg., 13 = CU pANCA pos., 14 = PSC pANCA pos., 15 = PSC pANCA neg.

4 Diskussion

Der Nachweis von ANCA wird vor allem in der Diagnostik des M. Wegener und anderer Vaskulitiden eingesetzt, wo sie einen hohen diagnostischen Wert haben [97, 65, 30, 31, 24]. Aber auch bei anderen Erkrankungen, wie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der PSC oder Autoimmunen Hepatitis, lassen sich ANCA nachweisen [47, 75, 20, 77].

4.1 Faktoren, die den Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest beeinflussen.

4.1.1 Einfluß der Granulozytenherkunft auf den Nachweis von ANCA

Ein Problem beim Nachweis von ANCA mit dem indirekten Immunfluoreszenztest (IFL) liegt in der Notwendigkeit zur Gewinnung der Granulozyten von Blutspendern . Dies erschwert eine einheitliche Standardisierung der Tests, da in Abhängigkeit vom Granulozytenspender die Ergebnisse unterschiedlich sind [4, 72, 24, 43]. Berg et. al. führen die Variabilität der Ergebnisse auf eine unterschiedlich starke Expression der ANCA-abhängigen Antigene auf den Neutrophilen Granulozyten zurück [4]. Weiter berichten sie von einem starken Verlust der Antigenität durch Einfrieren und Auftauen der Granulozytenpräparate.

Zur Untersuchung obengenannter Sachverhalte wurden in dieser Studie Granulozytenpräparate von elf verschiedenen Spendern miteinander verglichen. Alle Präparate wurden mit Methanol bei -70 °C fixiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. 30 Seren von Patienten mit PSC, Vaskulitis, M. Wegener, Autoimmuner Hepatitis und PBC wurden mit Granulozytenpräparaten aller Spender auf ANCA untersucht. Dabei traten je nach verwendetem Spender bei 10-30 % der untersuchten Seren Abweichungen vom ursprünglich definierten ANCA Status auf. Die Abweichungen waren nicht an bestimmte Diagnosen gebunden, sie traten bei allen Erkrankungen auf. Dies unterstützt die von Berg et. al. dargestellte Beobachtung der Variabilität der Antigenexpression [3].

4 Diskussion

4.1 Faktoren, die den Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest beeinflussen.

Der Vergleich von Granulozytenpräparaten vom selben Spender, die an verschiedenen Tagen hergestellt wurden, sollte die Frage klären, ob die Antigenexpression auf den Granulozyten zeitlichen Schwankungen unterworfen ist.

Dafür wurden von zwei Spendern Granulozytenpräparate an zwei je sechs Wochen auseinanderliegenden Tagen hergestellt.

Bei beiden Spendern zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den Untersuchungsergebnissen beider Präparate ($\kappa = 0,88$). Dies lässt auf eine geringe intraindividuelle Schwankung der Antigenexpression auf Neutrophilen Granulozyten schließen.

4.1.2 Einfluß der Fixierungsmethode auf den Nachweis von ANCA

Der Nachweis von ANCA im IFL bei verschiedenen Patientengruppen hat zu zahlreichen Versuchen geführt, durch unterschiedliche Fixierungsmethoden der Granulozyten bessere und differenziertere Möglichkeiten zur Detektion von ANCA zu schaffen. Dabei ergaben sich vielfältige und teilweise widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die diagnostische Validität und Aussagekraft der einzelnen Methoden.

In dieser Studie wurden vier unterschiedliche Methoden zur Fixierung von Granulozyten für den IFL verglichen, die in der Literatur häufig verwendet werden; eine Fixierung mit Methanol bei -70 °C und $+4\text{ °C}$, sowie eine Fixierung mit Ethanol bei -70 °C und eine Fixierung mit Formaldehyd bei Raumtemperatur.

Es wurden Granulozytenpräparate zwei verschiedener Spender mit den vier unterschiedlichen Fixierungsmethoden hergestellt. 28 Seren von Patienten mit PSC, Vasculitis, M. Wegener, Autoimmuner Hepatitis und PBC wurden mit diesen unterschiedlichen Präparaten auf ANCA untersucht.

Methanol -70 °C

Beim Vergleich der Untersuchungsergebnisse, die mit Methanol -70 °C fixierten Granulozyten gewonnen wurden, ergaben sich zwei bis drei Abweichungen vom definierten ANCA Status. Auch die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der zwei Spender war mit $96,4\%$ ($\kappa = 0,94$) sehr hoch.

Dabei handelte es sich bei den Abweichungen dreimal um ein pANCA Muster bei ANCA negativen Autoimmuner Hepatitis und zweimal um ein cANCA Muster bei

4.1 Faktoren, die den Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest beeinflussen.

PBC. Bei allen Patienten mit Vaskulitis und pANCA (die meist der Myeloperoxidase entsprechen) war dieses pANCA-Muster auch nach Fixierung mit Methanol $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nachweisbar. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den von Rao et. al. veröffentlichten Darstellungen, nach denen ein MPO-assoziiertes pANCA Muster bei Verwendung Methanol fixierter Granulozyten in der großen Mehrzahl der Fälle negativ wird [63].

Auch die von Rao et. al. beschriebene signifikante Verminderung der Bindung von PR3-ANCA an Methanol fixierte Granulozyten [63] ließ sich nicht bestätigen. Alle vier M.Wegener assoziierten cANCA Muster ließen sich mit Methanol $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixierten Granulozyten nachweisen.

Methanol +4 °C

Vergleicht man die Ergebnisse, die mit Methanol +4 °C fixierten Granulozyten gewonnen wurden, zeigt sich, dass die Übereinstimmung zwischen den beiden Untersuchungsgängen mit einem Quotienten von 82,1 % ($\kappa=0,65$) wesentlich geringer ist als bei Fixierung der Granulozyten bei Methanol $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dabei kommen die Abweichungen vom definierten ANCA Status vor allem durch falsch negative Ergebnisse zustande (sechs falsch negative pANCA Seren, ein falsch negatives cANCA Serum), das heißt, mit dieser Methode werden möglicherweise einige Patienten mit PSC oder Vaskulitis nicht erfasst.

Die Temperatur scheint also eine entscheidende Rolle für das Fixierungsergebnis zu spielen.

Ethanol $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Als Standardmethode für die Granulozytenbehandlung zur Detektion von ANCA gilt die Fixierung mit Ethanol [95, 35, 65].

In der vorliegenden Studie wurden Granulozyten mit Ethanol bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Die Ergebnisse zeigen, dass mit dieser Fixierung ein großer Teil der Seren falsch negativ getestet wurde (30 % falsch negative, davon acht falsch negative pANCA Seren, zwei falsch negative cANCA Seren).

Auch die Untersuchung der Übereinstimmungen zwischen den beiden Untersuchungsgängen zeigte mit einem Übereinstimmungsquotient von 75 % (κ nicht berechenbar), ein für diagnostische Verfahren nicht ausreichendes Ergebnis.

4.1 Faktoren, die den Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest beeinflussen.

Die von Rao et.al. beschriebene Beobachtung, dass MPO-pANCA und pANCA bei PSC im IFL an Ethanol fixierten Granulozyten nicht zu unterscheiden sind [63], konnte bestätigt werden. Die pANCA Muster bei PSC und Vaskulitis Seren waren wie bei der Fixierung mit Methanol -70 °C vergleichbar. Ethanol fixierte Granulozyten scheinen sich also nicht zur Differenzierung dieser Erkrankungen zu eignen.

So kann man aufgrund der deutlich besseren Ergebnisse bei Verwendung Methanol -70 °C fixierter Granulozyten, von einer Überlegenheit dieser Methode zum Nachweis von ANCA ausgehen.

Formaldehyd Raumtemperatur

Viele Arbeitsgruppen haben in der Vergangenheit den Einfluß einer Granulozytenfixierung mit Formaldehyd auf den Nachweis von ANCA untersucht. Dabei kam es zur Darstellung teils widersprüchlicher Beschreibungen, hinsichtlich Auswirkung und Nutzen dieser Methode.

Vernetzende Reagentien wie Formaldehyd führen zur Bildung intermolekularer Brücken, vor allem zwischen freien Aminogruppen. Dadurch kommt es zur Entstehung eines Netzwerkes miteinander verbundener Antigene [37].

Verschiedene Autoren beschrieben, dass dieser Vorgang dazu führt, dass ein an Alkohol fixierten Granulozyten nachgewiesenes pANCA Muster, bei Verwendung Formaldehyd fixierter Granulozyten, in ein cANCA Muster transformiert wird [63, 24, 13, 46]. Unterschiedliche Auffassungen bestanden jedoch über die Spezifität dieser Transformation für verschiedene Erkrankungen und die Konsistenz der Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen.

Rao et. al. berichteten, dass pANCA bei Vaskulitis an Formalin fixierten Granulozyten ein cANCA Muster zeigen, während Colitis ulcerosa assoziierte pANCA negativ werden [63]. Cambridge et. al. fanden keine Veränderung Vaskulitis assoziierter pANCA bei Verwendung Formalin fixierter Präparate [24]. Auch Yang fand unabhängig von der Fixierungsmethode (Ethanol, Formaldehyd, Aceton) bei Colitis ulcerosa und Vaskulitis ein pANCA Muster [99] und leitete daraus ab, dass das pANCA Muster kein Artefakt einer Alkohol Fixierung sei, wie es Wieslander et. al. beschrieben [93].

Im Gegensatz dazu berichtet Chowdhury et. al. von einer Konversion der pANCA zu cANCA, unabhängig davon, ob es sich um MPO-pANCA oder andere pANCA-Spezifitäten handelt [13].

4.1 Faktoren, die den Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest beeinflussen.

Er und andere beschrieben auch, dass eine Fixierung mit Formalin zu einer verstärkten Autofluoreszenz führt, und es durch die unspezifische Farbstoffbindung zu einer erhöhten Rate an falsch positiven Proben kommt [13, 44].

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass die Formaldehydfixierung inkonsistente und unterschiedliche Ergebnisse bringt und keinen Beitrag zur Differenzierung verschiedener pANCA Muster leistet [63, 46, 79, 13].

In der vorliegenden Studie wurden Granulozyten mit Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Die Ergebnisse zeigen, dass in 17 Fällen pANCA in ein cANCA Muster konvertiert wurden. Dieses Phänomen war unabhängig von der Diagnose bei allen Patientengruppen zu beobachten. Nur bei einem pANCA positiven Serum eines Patienten mit Autoimmuner Hepatitis zeigte sich an den formaldehydfixierten Granulozyten ein pANCA Muster.

Auch kam es bei zehn Patienten mit verschiedenen Erkrankungen zu einem falsch positiven Ergebnis durch Neuauftreten eines cANCA Musters.

Diese Beobachtungen stehen damit in Übereinstimmung mit den von Chowdhury et. al. und La Cour et. al. veröffentlichten Daten [13, 44]. Nicht bestätigt werden konnten dagegen die von Yang vorgelegten Beobachtungen, dass bei Vaskulitis auch an formaldehydfixierten Granulozyten ein pANCA Muster auftritt [99].

Weiterhin zeigte sich in dieser Studie, wie auch bei Chowdhury et. al. und La Cour et. al., dass bei den formaldehydfixierten Granulozyten eine verstärkte Autofluoreszenz auftritt, die die Beurteilung von ANCA Mustern deutlich erschwert.

Bei der Untersuchung der Übereinstimmungen zwischen den beiden Untersuchungsgängen zeigten sich stark inkonsistente Ergebnisse, die sich in einem Übereinstimmungsquotienten von 67,9 % (κ nicht berechenbar) ausdrücken.

Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht verschiedener Autoren, die einer Formaldehydfixierung keinen Informationsgewinn zusprechen [63, 46, 79, 13].

4.2 Prävalenz von ANCA und Assoziation mit Laborparametern und Antikörpern

4.2.1 Prävalenz von ANCA bei Detektion im indirekten Immunfluoreszenztest

Viele Studien haben sich mit dem Nachweis von ANCA und deren Prävalenz und Spezifität bei unterschiedlichen Erkrankungen beschäftigt.

Während die gegen Proteinase 3 gerichteten cANCA bei M. Wegener ein sensitiver und spezifischer Marker (Sensitivität: 90 % [17, 54, 90], Spezifität: 96-99,5 % [64, 63]) für das Vorliegen dieser Erkrankung sind, gibt es in Bezug auf die pANCA widersprüchliche Daten. Diese Spezifität der cANCA für den M. Wegener konnten wir auch in unserer Studie belegen. Lediglich bei Patienten mit PBC war eine zytoplasmatische Fluoreszenz an Granulozyten häufig zu beobachten (42 %), wobei diese aber wahrscheinlich durch die in den Seren der Patienten nachweisbaren antimitochondrialen Antikörper bedingt ist.

In dieser Studie wurden elf Erkrankungen mit dem indirekten Immunfluoreszenztest auf das Vorhandensein von ANCA untersucht. Die hier dargestellten Daten beziehen sich nur auf die Patienten, bei denen keine Überlappung mehrerer Erkrankungen vorlag. In Tabelle 83 sind die Daten zusammen mit den Angaben verschiedener Autoren zur Prävalenz von pANCA dargestellt.

	A	[47]	[34]	[43]	[52]	[67]	[40]	[89]	[102]	[24]	[28]
PSC	79			80	79	49					
C. ulc	56	30	83	17							
M. Crohn	86	9	25	13			7	33			
PBC	1		30	13	28	15					
AIH	73		30	16	88	70			65		
Hep C	9	7				14					
tox LZ	4					6					
krypt LZ	8										
Vaskulit.	53									80	50

Tab. 83 Literaturübersicht: Prävalenz von pANCA bei verschiedenen Erkrankungen, A = aktuelle Studie, [47] = Lombardi et. al. 2000, [34] = Greenstein et. al. 1976, [43] = Klein et. al. 1991, [52] = Mulder et. al. 1993, [67] = Roozensaal et. al. 2000, [40] = Jamar-Leclerc et. al. 1997, [89] = Vasiliauskas et. al. 1996, [102] = Zauli et. al. 1997, [24] = Falk et. al. 1988 (Prävalenz bei pauciimmuner Rapid progressiver Glomerulonephritis), [28] = Gaskin 1991 (Prävalenz bei aktiver mikroskopischer Polyangiitis), Angaben in Prozent, leere Felder bedeuten, dass die Patientengruppen in diesen Studien nicht untersucht wurden.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit den Daten anderer Studien erkennt man zum Teil beachtliche Unterschiede in der pANCA Prävalenz bei bestimmten Erkrankungen. Die Prävalenz von 79 % bei PSC Seren stimmt mit den Ergebnissen von Klein et. al. (80 %) und Mulder et. al. (79 %) sehr gut überein [43, 52], während die Angaben von Roozendaal et. al. [67] mit 49 % doch deutlich niedriger liegen. Dies liegt möglicherweise daran, dass Roozendaal et. al. zur Fixierung der Granulozyten Ethanol verwendeten, das häufig zu falsch negativen Ergebnissen führt.

Die Prävalenz für pANCA bei Autoimmuner Hepatitis liegt mit 73 % jedoch genau im Bereich der von Roozendaal et. al. veröffentlichten Prävalenz von 70 % [67], auch die Angaben von Mulder et. al. (88 %) [52] und Zauli et. al. (65 %) [102] bewegen sich in der gleichen Größenordnung. Dagegen sind die Angaben von Klein et. al. mit 16 % [43] aber auch von Greenstein et. al. mit 30 % [34] deutlich niedriger. Die Unterschiede zu den von Klein veröffentlichten Ergebnissen können ihre Ursache in der unterschiedlichen Häufigkeit der Subgruppen der Autoimmunen Hepatitis haben, da in der vorliegenden Studie pANCA vor allem bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis Typ 1a (80 %) und 3 (86 %) auftraten. Beim Typ 2 waren sie in 50 % der Fälle nachweisbar, beim Typ 1b in 57 % der Fälle. Während in der vorliegenden Studie bei 85 % der Patienten der Typ 1a/b vorlag, war dies bei Klein et. al. nur bei 57 % der Fall. Dagegen hatten bei Klein et. al. 14 % der Patienten den Subtyp 3, bei uns hatten diesen nur 3 % der Patienten.

Die pANCA Prävalenz bei Colitis ulcerosa (56 %) bewegt sich etwa im Mittelfeld zwischen den Angaben der anderen Autoren, die eine Prävalenz von 17-83 % angeben.

Die Ergebnisse bei Patienten mit Hepatitis C (9 %) und toxischer Leberzirrhose (4 %) entsprechen denen anderer Autoren [47, 67]. Die pANCA Prävalenz bei kryptogener Leberzirrhose (8 %) ist vergleichbar mit der bei Vorliegen einer toxischen Leberzirrhose. Die Prävalenz bei Vaskulitis stimmt mit 53 % mit der von Gaskin et. al. [28] veröffentlichten Prävalenz bei Patienten mit aktiver mikroskopischer Polyangiitis (50 %) überein. Die Ergebnisse von Falk et. al. [24], die von Patienten mit pauciimmuner rapid progressiver Glomerulonephritis gewonnen wurden, liegen mit 80 % deutlich darüber. Die größten Unterschiede zwischen den pANCA Prävalenzen ergaben sich bei PBC und M. Crohn.

Die Prävalenz von 86 % bei M. Crohn weicht sehr deutlich von allen Angaben in der

Literatur ab, die sich zwischen 7-33 % bewegen [40, 47, 43, 34, 89].

Dagegen liegt die Prävalenz bei PBC mit 1 % stark unter den Zahlen anderer Auto-
ren, die zwischen 13-30 % schwanken [43, 67, 66, 34].

Als Ursache für diese teilweise ausgeprägten Unterschiede müssen, neben Differen-
zen in den Patientenpopulationen, vor allem Unterschiede bei der Durchführung des
Immunfluoreszenztests genannt werden, die angewandten Techniken können zwi-
schen den einzelnen Laboratorien beträchtlich variieren.

4.2.2 Zusammenhang zwischen ANCA und Laborparametern

Die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von ANCA und der
Veränderung von Leberfunktions- und Cholestaseparametern zeigte, dass pANCA
mit erhöhter GOT und GPT einhergehen, während das Gesamtbilirubin vor allem bei
cANCA positiven Patienten erhöht ist.

Zur Bewertung der erhöhten Gesamtbilirubinwerte bei Patienten mit cANCA muss
berücksichtigt werden, bei welchen Erkrankungen vorwiegend cANCA gefunden wur-
den. Von den 57 Patienten, die im Immunfluoreszenztest ein cANCA Muster zeigten,
hatten sieben einen M. Wegener. Bei der Mehrzahl handelte es sich um Patienten mit
PBC (45 Patienten). Weitere fünf Fälle verteilten sich auf verschiedene andere Pa-
tientengruppen.

Da die PBC als destruierende Erkrankung der intrahepatischen Gallenwege in Spät-
stadien mit einem Ikterus einhergeht [61], liegt die Erhöhung des Bilirubins bei den
cANCA positiven Patienten ausschließlich am Überwiegen der PBC Patienten. Die
untersuchten Patienten mit M. Wegener zeigten Bilirubinwerte die unter 1,1 mg/dl la-
gen.

Einen Zusammenhang zwischen erhöhter GOT und dem Auftreten von pANCA bei
PSC wurde auch von Snook et. al. beschrieben [77]. Roozendaal et. al. zeigten, dass
bei pANCA positiven PSC Patienten die Alkalische Phosphatase erhöht ist, konnten
jedoch keine Leberenzymerrhöhung bei pANCA positiven Patienten mit Autoimmuner
Hepatitis nachweisen [67]. Während Pokorny et. al. einen Zusammenhang zwischen

dem Auftreten von pANCA bei PSC und einem verstärkten Krankheitsprogress fanden [59], konnten Shanahan et. al. keinen Zusammenhang zwischen pANCA und Krankheitsaktivität bei pANCA positiven PSC Patienten herstellen [76].

Greenstein et. al. zeigten, dass 95 % der Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen pathologische Leberfunktionswerte haben [34]. Saxon et. al. fanden jedoch keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von pANCA bei M. Crohn und Colitis ulcerosa und einer verstärkten Krankheitsaktivität oder –ausdehnung [72].

Die deutlich erhöhten Werte von GOT und GPT bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis mit nachgewiesenen pANCA im Gegensatz zu ANCA negativen Patienten legen den Schluss nahe, dass das Auftreten von pANCA bei dieser Erkrankung mit einer verstärkten Leberbeteiligung am Krankheitsgeschehen einhergeht. Bei Patienten mit PSC konnten keine signifikanten Unterschiede der GOT, GPT und γ -GT Werte zwischen pANCA positiven und ANCA negativen Patienten nachgewiesen werden. Es konnten also die Ergebnisse von Snook et. al. und Roozendaal et. al. nicht bestätigt werden.

4.2.3 Zusammenhang zwischen ANCA und Serum-Immunglobulinen

Einige hepatobiliäre Erkrankungen gehen mit einer Erhöhung bestimmter Immunglobulin-Typen einher. Die Untersuchung der Immunglobulinspiegel bei verschiedenen Erkrankungen ergab differenzierte Ergebnisse.

Bei der Autoimmunen Hepatitis ist typischerweise das Immunglobulin G stark erhöht, während IgA und IgM im Normbereich bleiben [81]. Auch die Ergebnisse dieser Studie zeigen die selektive Erhöhung des IgG bei diesen Patienten. Dabei lagen die IgG Werte bei pANCA positiven Patienten (Median: 2435 mg/ml) deutlich über denen der ANCA negativen (Median: 1820 mg/ml). Die IgA und IgM lagen im Normbereich.

Bei Patienten mit PBC besteht meist eine Erhöhung der IgM [42]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Patienten mit einem cANCA Muster im Immunfluoreszenztest erhöhte IgM Werte hatten (Median: 318 mg/dl). Dieser Unterschied ist zwar nicht signifikant (was an den kleinen Fallzahlen liegen könnte), lässt jedoch einen gewissen Trend erkennen.

Das Auftreten eines cANCA Musters bei PBC ist durch Antimitochondriale Antikörper (AMA) bedingt, die ein von den echten cANCA nur schwer oder nicht zu unterscheidendes Muster ergeben (Kapitel 4.2.4). 87 % der PBC Patienten hatten AMA. Von diesen AMA positiven Patienten zeigten 40 % ein cANCA Muster.

Das Auftreten erhöhter IgM Werte vor allem bei den Patienten mit einem cANCA Muster lässt möglicherweise auf das Vorhandensein einer Subgruppe von PBC Patienten schließen. Diese Vermutung wird weiter durch die Tatsache erhärtet, dass von den Patienten im Spätstadium der PBC (Gesamtbilirubin größer 1,1mg/dl) signifikant mehr ein cANCA Muster im IFL zeigten (63%) als Patienten im Frühstadium (38%). Auch verhält sich das PBC-assoziierte ANCA-Antigen hinsichtlich seiner Resistenz gegenüber verschiedenen Fixierungsmethoden im IFL anders als die ANCA-Antigene bei M. Wegener oder PSC (tritt im Gegensatz zu diesen nicht bei Ethanol-fixierten Granulozyten auf) und scheint sich von diesen zu unterscheiden.

Die Untersuchung der Patienten auf das Vorhandensein von Anti-M4 Antikörpern, die vor allem bei aktiven Krankheitsverläufen nachweisbar sind [42], zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen cANCA positiven und ANCA negativen Patienten. Auch bei den Anti-M2 Antikörpern war kein signifikanter Unterschied zwischen ANCA positiven und negativen Patienten zu dokumentieren.

Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass es ein weiteres, von den Anti-M2 und -M4 Antikörpern verschiedenes Antigen/Antikörper-System geben muss, welches zu einem cANCA Muster im IFL führt und Patienten in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium diskriminiert.

Es werden weitere Studien nötig sein, um die genaue Antigenspezifität zu definieren und deren klinische Relevanz zu evaluieren.

Patienten mit kryptogener oder toxischer Leberzirrhose zeigten deutlich erhöhte IgA Spiegel. Dieses Ergebnis stimmt mit den Angaben von Klein et. al. überein, die eine IgA Erhöhung bei Patienten mit toxischer Leberzirrhose beschreiben [42]. Patienten mit kryptogener Leberzirrhose hatten zusätzlich deutlich erhöhte IgG Werte (Median 2020-2225 mg/ml). Im Gegensatz dazu lagen die IgG bei toxischer Leberzirrhose im Normbereich.

Dieser Unterschied zwischen den sonst schwer zu differenzierenden Erkrankungen könnte möglicherweise als differentialdiagnostischer Hinweis auf das Vorliegen einer

kryptogenen Leberzirrhose Verwendung finden.

Signifikante Unterschiede der Immunglobulinwerte zwischen ANCA negativen und ANCA positiven Patienten konnten nicht festgestellt werden, da bei diesen Erkrankungen nur vereinzelt ANCA nachweisbar waren.

Die PSC geht nach Chapman et. al. [12] mit einer Hypergammaglobulinämie mit oft unverhältnismäßiger Erhöhung der IgM einher. Diese Angaben konnten nicht bestätigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen keine Erhöhungen der durchschnittlichen Werte für IgG, IgA und IgM. Speziell die IgM lagen bei keinem einzigen PSC Patienten über der Normgrenze. Auch signifikante Unterschiede der Immunglobulinwerte zwischen ANCA negativen und ANCA positiven Patienten lagen nicht vor.

4.2.4 Zusammenhang zwischen ANCA und anderen Autoantikörpern:

Zur Untersuchung der Frage, ob ANCA mit anderen Autoantikörpern assoziiert sind, wurden bei allen untersuchten Patienten die routinemäßig nachgewiesenen Antikörper erfasst.

Die Ergebnisse zeigen, dass antinukleäre AK (ANA), AK gegen glatte Muskulatur (SMA) und SMA mit anti-Aktin Spezifität signifikant häufiger bei pANCA positiven Patienten auftreten als bei cANCA positiven oder ANCA negativen Patienten ($p < 0,0001$). ANA waren vor allem bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis (66 %) und PSC (56 %) nachweisbar. 48 % der Patienten mit Colitis ulcerosa hatten ANA, Patienten mit M. Crohn nur in 31 % der Fälle.

ANA waren nachweisbar bei 54 % der pANCA positiven Patienten, bei cANCA positiven und ANCA negativen war dies nur bei 23-35 % der Fall.

Chapman et. al. [12] und Zauli et. al. [103] konnten ANA nur bei 32-35 % der PSC Patienten nachweisen.

Shanahan et. al. [76] fanden keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ANCA und ANA bei Patienten mit PSC und Autoimmuner Hepatitis. Auch Targan et. al. [82] beschrieben bei Autoimmuner Hepatitis Typ1 keinen Zusammenhang zwischen ANCA und ANA-Titern. Dies steht im Widerspruch zu den vorliegenden Daten, die eine Assoziation zwischen beiden Parametern beschreiben.

SMA waren vor allem bei Autoimmuner Hepatitis zu finden (93 %). Aber auch bei Patienten mit PSC traten sie in 74 % der Fälle auf. Chapman et. al. [12] und Zauli et. al. [103] wiesen sie bei 16-67 % der PSC Patienten nach.

SMA waren bei 70 % der pANCA positiven Seren nachweisbar, sowie bei 50-56 % der cANCA positiven und ANCA negativen.

SMA mit anti-Aktin Spezifität traten vor allem bei Patienten mit Autoimmuner Hepatitis auf (51 %). Bei den anderen hepatobiliären Erkrankungen (PSC, PBC, kryptogene und toxische Leberzirrhose) waren sie nur in null bis 10 % der Fälle nachweisbar.

Dies korrespondiert auch mit dem Umstand, dass anti-Aktin AK signifikant häufiger bei pANCA positiven Patienten nachweisbar waren, da 71 % der 116 Patienten mit Autoimmuner Hepatitis pANCA hatten. Patienten mit Anti-Aktin Antikörpern hatten in 58 % der Fälle pANCA.

Antimitochondriale AK (AMA) waren vor allem bei PBC Patienten nachweisbar (87 %). Bei allen anderen untersuchten Erkrankungen kamen sie nur in 0-20% der Fälle vor. Bei Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Auftreten von ANCA und AMA ergab sich eine deutliche Assoziation zwischen cANCA und AMA. Die Analyse zeigt, dass 79 % der Patienten mit cANCA eine PBC hatten, 12 % der Patienten hatten einen M. Wegener.

AMA treten typischerweise bei der PBC auf [42, 29, 100] und können durch ihr cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster oft nicht von cANCA differenziert werden. So handelt es sich bei den, im Muster den cANCA vergleichbaren, Antikörpern bei der PBC um anti-mitochondriale Antikörper. Bei den sieben M. Wegener Patienten, von denen alle cANCA hatten, waren keine AMA nachweisbar.

4.3 Detektion von AK gegen Neutrophile Granulozyten mit dem ELISA

Ein ELISA zum Nachweis von AK gegen neutrophile Granulozyten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eingesetzt.

Duerr et. al. wendeten einen ELISA zur Detektion von AK vom IgG Typ an [20]. Damit wiesen sie antineutrophile Ak bei 79 % der Patienten mit Colitis ulcerosa oder PSC nach. Bei PBC oder chronischer Hepatitis C waren Antikörper gegen Granulozyten

nur in 63 % der Fälle nachweisbar. Bei Untersuchung der ELISA positiven Seren mit dem indirekten Immunfluoreszenztest zeigten 87 % der Colitis ulcerosa Patienten und 79 % der M. Crohn Patienten ein pANCA Muster. Bei den Fällen mit PBC und Hepatitis C trat kein pANCA Muster auf (0 %).

Daraus leiteten die Autoren die Vermutung ab, dass eine Kombination aus ELISA und IFL zwischen PSC und anderen chronisch entzündlichen Lebererkrankungen differenzieren könne.

Saxon et. al. konnten antineutrophile AK vom IgG Typ bei 84 % der Colitis ulcerosa und 20 % der M. Crohn Patienten nachweisen [72].

Bei Vasiliauskas et. al. waren im ELISA 55 % der M. Crohn Patienten positiv. Im IFL zeigten 55 % davon ein cANCA Muster, 47 % pANCA [89].

In der vorliegenden Studie wurden die Patientenserum im ELISA auf anti-Neutrophile AK verschiedener Klassen (IgG, IgG F(ab')₂, IgM) untersucht.

Es waren bei 92 % der PSC Patienten Ak vom Typ IgG nachweisbar, in Abweichung von 79 % bei Duerr et. al. [20].

Hingegen zeigten Seren von Colitis ulcerosa Patienten in 74 % der Fälle IgG AK; das entspricht den von Duerr gefundenen Werten, jedoch nicht denen von Saxon et. al., die AK bei 84 % nachwiesen.

Im Gegensatz zu Duerr et. al. konnten in der vorliegenden Arbeit IgG AK auch bei 94-100 % der PBC und Hepatitis C Patienten nachgewiesen werden. M. Crohn Patienten hatten diese AK in 62 % der Fälle. Insgesamt zeigten Patienten mit hepatobiliären Erkrankungen in 92-100 % der Fälle AK vom IgG Typ.

Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede im Nachweis von IgG AK gegen Neutrophile Granulozyten im ELISA zwischen IFL-ANCA positiven und negativen Patienten festgestellt werden.

So scheint die Differenzierung zwischen PSC und anderen hepatobiliären Erkrankungen, entgegen der Aussage von Duerr et. al., durch eine Kombination von IFL und ELISA nicht möglich zu sein.

Auch die von Vasiliauskas dargestellten Ergebnisse, nach denen M. Crohn Patienten, die ELISA positiv für IgG AK sind in 53 % der Fälle im IFL ein cANCA Muster zeigen konnte nicht nachvollzogen werden. In der vorliegenden Arbeit konnten bei keinem einzigen der 39 M. Crohn Patienten im IFL cANCA nachgewiesen werden.

Insgesamt scheint der Nachweis von IgG oder IgG F(ab')₂ gegen Neutrophile Granulozyten zu keinem Erkenntnisgewinn zu führen, da bei allen untersuchten Erkrankungen und unabhängig vom Vorliegen von c- oder pANCA der überwiegende Teil der Patienten im ELISA ein positives Ergebnis zeigte. Eine mögliche Erklärung für diesen Umstand könnte sein, dass Antikörper gegen Granulozyten zu den natürlichen Antikörpern gehören und auch bei Gesunden niedertitrig nachweisbar sind. Bei chronisch entzündlichen Prozessen werden diese Antikörper aktiviert und verstärkt synthetisiert. Da der ELISA ein deutlich sensitiveres Verfahren als der Immunfluoreszenztest ist, weist er wahrscheinlich häufiger diese natürlich vorkommenden Antikörper nach.

Bei Untersuchung der Patienten auf IgM Antikörper ließ sich ein schwach signifikanter Unterschied zwischen ANCA negativen und positiven Patienten feststellen. Mit $p = 0,0363$ ist dieser Unterschied aber zu klein, um zu verwertbaren Aussagen zu führen. Möglicherweise ließen sich bei Untersuchung größerer Patientengruppen eindeutigere Unterschiede bei einzelnen Erkrankungen feststellen.

4.4 Identifikation spezifischer Determinanten im Western Blot

Zur Identifikation von Target-Antigenen von ANCA wurden verschiedene Patientenserum im Western Blot untersucht. Schon andere Arbeitsgruppen berichteten von Determinanten, mit denen pANCA positive Seren reagierten.

1991 beschrieben Klein et. al. Determinanten mit 30, 40, 55, 60 und 95 kD, mit denen pANCA positive PSC Seren reagierten [43]. Die im Western Blot reagierenden Seren waren alle pANCA positiv. cANCA positive Seren von Patienten mit M. Wegener und pANCA positive Vaskulitiseren waren im Western Blot negativ. Allerdings reagierten auch Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen hepatobiliären Erkrankungen mit den Determinanten bei 60 und 55 kD. Klein et. al. vermuteten, dass ein gemeinsamer Antigenkomplex für pANCA bei PSC und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bestehe. Die für die Darmerkrankungen spezifische Komponente werde durch die SDS-Behandlung im Western Blot zerstört, so dass nur die PSC-Determinanten im Western Blot nachweisbar seien [43].

Auch Seibold et. al. berichteten von Determinanten bei 30, 40, 55, 60 und 95 kD, von denen eine oder mehrere mit 80 % der getesteten PSC Seren und einigen Seren von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen reagierten [75].

Die PSC-typischen Determinanten reagierten jedoch auch mit Seren anderer Erkrankungen, beispielsweise AIDS, Epstein-Barr-Virus- oder Cytomegalie-Virus-Infektion. Aber auch Seren von gesunden Blutspendern reagierten in 5 % der Fälle mit PSC-typischen Determinanten [4].

Auch in der vorliegenden Studie reagierten Seren mit Determinanten bei 30, 40, 55, 60 und 95 kD.

Nur ein PSC Serum reagierte mit der Determinante bei 30 kD, keines mit der Determinante bei 40 kD. Damit konnten die Ergebnisse von Klein und Seibold nicht bestätigt werden, die diese beiden Determinanten als typisch für PSC beschrieben [43, 75].

Eine Reaktion mit Determinanten bei 55 und 60 kD wurde bei zehn von elf PSC Patienten und einigen Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden. Damit wurde die 60 kD Determinante häufiger als bei Klein et. al. [43] erkannt. Die Determinanten bei 55 und 60 kD reagierten sowohl mit pANCA positiven als auch negativen Seren; bei Klein et. al. reagierten ausschließlich pANCA positive Seren im Western Blot.

Zaho et. al. beschrieben anti-MPO- und PR3-negative Vaskulitispatienten, die im Western Blot mit einer 55 kD Bande reagierten. Sie identifizierten dieses Antigen als Bactericidal/Permeability-Increasing Protein [101].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Determinante bei 95 kD spezifisch von PSC und Colitis ulcerosa Seren erkannt, unabhängig davon, ob diese pANCA positiv oder negativ waren. Nur ein pANCA positives Serum eines Patienten mit Autoimmuner Hepatitis reagierte auch mit dieser Determinante. Die Spezifität für PSC wird auch von Klein und Seibold beschrieben, allerdings reagierten dort nur pANCA positive Seren [43, 75].

Es konnte eine zweite, für PSC und Colitis ulcerosa spezifische Determinante bei 35 kD nachgewiesen werden. Mit ihr reagierten sowohl pANCA positive als auch negative Seren. Diese Determinante könnte auch den von anderen Autoren beschriebenen Determinanten bei 30 oder 40 kD entsprechen, denn Abweichungen von einigen Kilodalton sind häufig zu beobachten

Die beschriebenen Ergebnisse könnten, wie auch von Klein et. al. dargestellt, darauf hinweisen, dass bei PSC und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen die pANCA mit dem selben Antigenkomplex reagieren. Weiterhin müssen Antikörper gegen diese Antigene auch bei Patienten vorhanden sein, die im indirekten Immunfluoreszenztest kein pANCA Muster zeigen. Ob es sich bei den Antikörpern also um pANCA handelt, die im Immunfluoreszenztest an Methanol $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixierten Granulozyten eventuell nur teilweise erkannt werden, oder ob im Western Blot andere Antikörper mit den erwähnten Determinanten reagieren, müssen weitere Studien zeigen.

Andere Arbeitsgruppen berichteten von weiteren Determinanten, die von Patientenserum mit PSC, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder Vaskulitiden im Western Blot erkannt wurden. Bei Sobajima et. al. reagierten Colitis ulcerosa Seren mit einem 28 kD Antigen, das als high mobility group non-histon chromosomales Protein 1 und 2 (HMG1/2) identifiziert wurde [78].

Terjung et. al. identifizierten ein 50 kD Kernhüllenprotein, mit dem Seren von Patienten mit PSC, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Autoimmuner Hepatitis reagierten [84]. Auch bei Vaskulitiseren konnten Reaktionen mit bestimmten Determinanten gezeigt werden. M. Wegener Seren reagierten mit einer 29 kD Determinante, Vaskulitiden mit einer Bande bei 12 kD [48, 71].

All diese Determinanten konnten in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden.

Um Seren mit dem Western Blot auf Antikörper zu untersuchen, werden in den meisten Fällen beschallte Granulozyten als Antigen verwendet. Einige Autoren beschreiben eine Methode, bei der die Granulozyten nicht beschallt, sondern mit Triton X 100 behandelt werden. Mit dieser Methode sollen cANCA positive Seren von M. Wegener Patienten im Western Blot reagieren [43, 71].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei Behandlung der Granulozyten mit Triton X 100 die Proteine in der Elektrophorese nicht komplett aufgetrennt werden können (Abbildung 30). Es war mit dieser Methode nicht möglich, reproduzierbare Determinanten nachzuweisen. Dafür konnte bei Verwendung beschallter Granulozyten bei allen sieben cANCA positiven M. Wegener Seren eine Reaktion mit einer Determinante bei 42 kD nachgewiesen werden. Die 42 kD Bande reagierte auch mit PBC, toxischer Leberzirrhose und in geringerem Ausmaß auch mit Hepatitis C und autoimmuner Hepatitis. Es handelt sich also nicht um eine spezifische Determinante, die zu diagnostischen Zwecken verwendet werden könnte.

Unterschiedliche Behandlungsmethoden der Granulozyten können ein Grund für die abweichenden Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Autoren sein, denn sie können zur Freisetzung verschiedener Antigene führen. Schließlich können auch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Antigene zu einer Verminderung der Sensitivität des Testsystems führen.

4.5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von ANCA im indirekten Immunfluoreszenztest hinsichtlich Krankheitsspezifität und Sensitivität stark von der Auswahl des Granulozytenspenders und der verwendeten Fixierungsmethode beeinflusst wird. So müssen Granulozyten von ca. fünf bis zehn Spendern getestet werden, um eine geeignete Fraktion zu erhalten. Als zur Zeit beste Methode der Granulozytenfixierung kann die Verwendung von Methanol bei -70 °C eingeschätzt werden. Neben einer sorgfältigen Standardisierung der angewandten Methode kann in Zukunft aber auch der Einsatz Spender-unabhängiger Zellen, die zum Nachweis von ANCA geeignet sind, einen Beitrag zur Vereinheitlichung und besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Laboratorien beitragen. Terjung et. al. beschrieben 2000 die Anwendung von HL-60 und -32D Tumorzelllinien zum Nach-

weis von ANCA bei Vaskulitiden und atypischen pANCA bei PSC und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [84]. Die Vorteile solcher Tumorzelllinien liegen in leichter Handhabung und Vermehrung der Zellen, die eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse garantieren.

Besonders im Zusammenhang mit dem Auftreten von cANCA bei der PBC ergibt sich die Notwendigkeit weiterer Studien, um die von uns dargestellten Antikörper bei Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium genauer zu definieren und deren klinische Relevanz zu erfassen.

Dem ELISA mit fixierten Granulozyten konnte kein großer Nutzen zum Nachweis von ANCA oder zur Gewinnung diagnostischer Hinweise bei hepatobiliären oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zuerkannt werden. Inwiefern der ELISA zwischen verschiedenen Erkrankungen differenzieren kann muß in weiterführenden Studien mit größeren Patientengruppen untersucht werden.

Der Einsatz des Western Blot hingegen kann zur Identifizierung verschiedener Antigene von großem Nutzen sein. Untersuchungen an ausgedehnten Patientenkollektiven müssen die exakten Häufigkeiten der Reaktionen mit bestimmten Determinanten klären. Dadurch könnte auch die Identifizierung der Antigene, gegen die sich pANCA bei hepatobiliären und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen richten, ermöglicht werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Verfahren zum Nachweis von Anti-neutrophil-cytoplasmic Antikörpern angewendet und die Prävalenz von ANCA und ihre Assoziation mit anderen serologischen Markern bei verschiedenen Erkrankungen untersucht.

Dabei zeigte sich, dass bei Anwendung des indirekten Immunfluoreszenztests die Auswahl des Granulozytenspenders und der Granulozytenfixierungsmethode entscheidenden Einfluss auf Qualität und Reproduzierbarkeit der Testergebnisse nimmt.

PANCA waren vor allem bei PSC, AIH, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Vaskulitiden nachweisbar. PANCA positive Patienten hatten stärker erhöhte Leberenzymparameter als cANCA positive oder ANCA negative Patienten, weiterhin traten vor allem bei ihnen ANA, SMA und SMA mit anti-Aktin-Spezifität auf.

Bei der PSC lag die pANCA Prävalenz bei 79 %, eine IgM Erhöhung konnte bei PSC Patienten nicht festgestellt werden.

Patienten mit Autoimmuner Hepatitis hatten in 73 % der Fälle pANCA; die selektive IgG Erhöhung war bei den pANCA positiven Patienten besonders ausgeprägt.

Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lagen bei 56-86 % pANCA vor. Die Immunglobulinspiegel waren nicht erhöht.

87 % der PBC Patienten hatten AMA, von denen 40 % im IFL ein cANCA Muster zeigten. Bei diesen Patienten mit cANCA Muster lagen IgM- und Gesamtbilirubinspiegel prozentual signifikant höher als bei den ANCA negativen. Anti-M4 Antikörper waren nicht häufiger nachweisbar. Es scheint daher bei der PBC ein weiteres, von den bisher beschriebenen Systemen verschiedenes Antigen/Antikörper-System zu geben, das zur Bildung von cANCA im IFL führt und Patienten in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien diskriminiert.

Dem ELISA mit fixierten Granulozyten konnte keine besondere Eignung zur Detektion von ANCA zugeschrieben werden. Unabhängig von der Erkrankung zeigte, vor allem beim Nachweis von IgG und IgG F(ab')₂, die überwiegende Mehrheit der Patienten - unabhängig vom ANCA-Befund im IFL - im ELISA ein positives Ergebnis. Aber

auch bei Untersuchung auf IgM Antikörper waren die Unterschiede zwischen ANCA positiven und negativen Patienten für ein diagnostisches Verfahren zu gering.

Bei der Untersuchung von Patientenserum mit dem Western Blot konnten zwei Determinanten bei 35 und 95 kD identifiziert werden, mit denen spezifisch Serum von PSC- und Colitis ulcerosa-Patienten reagieren. Dies weist auf das Vorliegen desselben Antigenkomplex bei PSC und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin und bestärkt die Hypothese, dass beiden Erkrankungen möglicherweise ein gemeinsamer pathogenetischer Mechanismus zugrunde liegt.

6 Literaturverzeichnis

- 1 **Akisawa, N.; Meada, T.; Iwasaki, S.; Onishi, S.**
»Identification of an autoantibody against α -enolase in primary biliary cirrhosis«
Journal of Hepatology (1997), 26, 845-851
- 2 **Altman, D., G.**
»Practical Statistics for Medical Research«
Chapman & Hall, London, Weinheim, New York (1992), 2, 403-404
- 3 **Bansi, D.; Chapman, R.; Flemming, K.**
»Antineutrophil cytoplasmic antibodies in chronic liver diseases: Prevalence, titre specificity and IgG subclass«
Journal of Hepatology (1996); 24, 581-586
- 4 **Berg, P.; Klein, R.**
»Reply«
Hepatology (1993); 18, 471-47
- 5 **Billing, P.; Tahir, S.; Calfin, B.; Gagne, G.; Cobb, L.; Targan, S.; Vidrich, A.:**
»Nuclear localisation of the antigen detected by ulcerative colitis-associated perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies«.
American Journal of Pathology (1995); 147, 979-987
- 6 **Bradford, M., M.**
»A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding«
Analytical Biochemistry (1976); 72, 248-254
- 7 **Burnette, W., N.**
»Westernblotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose radioiodinated proteins«
Analytical Biochemistry (1981); 112, 195-203
- 8 **Bustin, M.; Neihart, N., K.**
»Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells«
Cell (1979); 16, 181-189
- 9 **Campanelli, D.; Detmers, P., A.; Nathan, C., F.; Gabay, J., E.**
»Azurocidin and a homogenous serine protease from neutrophils: Differential antimicrobial and proteolytic properties«
Journal of Clinical Investigation (1990); 85, 904-915
- 10 **Chapman, R., W.; Cottone, M.; Selby, W. S.; Shepherd, H. A.; Sherlock, S.; Jewell, H.A.**
»Serum autoantibodies, ulcerative colitis and primary sclerosing cholangitis«
Gut (1986); 27, 86-91
- 11 **Chapman, R., W.; Varghese, Z.; Gaul, R.; Patel, G.; Kokinon, N.; Sherlock, S.**
»Association of primary sclerosing cholangitis with HLA-B8«
Gut (1983); 242, 38
- 12 **Chapman, R., W.; G.; Arborgh, B., H.; Rhodes, J., M.; Summerfield, J., A.; Dick, R.; Scheuer, P., J.; Sherlock, S.**
»Primary sclerosing cholangitis- review of its clinical features, cholangiography and hepatic histology«
Gut (1980); 21, 870-877
- 13 **Chowdhury, S. M. Z.; Broomhead, V.; Spickett, G. P.; Wilkinson, R.**
»Pitfalls of formalin fixation for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies«
Journal of Clinical Pathology (1999); 52, 475-477

- 14 **Cohavy, O.; Bruckner, D.; Gordon, L. K.; Misra, R.; Wei, B.; Eggena, M. E.; Targan, S. R.; Braun, J.**
»Colonic bacteria express an ulcerative colitis pANCA-related protein epitope«
Infection and Immunity (1999); 68, 1542-1548
- 15 **Cohavy, O.; Eggena, M., P.; Parseghian, M., H.; Hamkalo, B., A.; Targan, S., R.; Gordon, L., K.; Braun, J.**
»Histone H1, a candidate pANCA antigen in ulcerative colitis (abstr.)«
Gastroenterology (1997); 112, A951
- 16 **Cohavy, O.; Tayebali, A., B.; Phu, P., K.; Eggena, M., P.; Parseghian, M., H.; Hamkalo, B., A.; Targan, S., R.; Braun, J.**
»Characterisation of the p-ANCA core epitope in histone H1 C terminus (abstr.)«
Gastroenterology (1998); 114, A953
- 17 **Cohen Tervaert J., W. ; Woude, F., J., van der ; Fauci, A., S.; Ambrus, J., L.; Velosa, J.; Keane, W., F.; Meyers, S.; Giessen, M., van der; The, T., H., Hem, G., K., van der; Kallenberg, C., G., M.**
»Association between active Wegener's granulomatosis and cytoplasmic antibodies«
Archives of Internal Medicine (1989); 149, 2461-2465
- 18 **Craft, J.; Hardin, j., H.**
»Antinuclear antibodies«
In Textbook of Rheumatology, 4th edn.. Hrsg.: Kelly, W., N.; Harris, E., D.; Ruddy, S.; et. Al..
Philadelphia, W. B. Saunders Co. (1993), 164-187
- 19 **Davies, D., J.; Moran, J., E. ; Niall, J., F. ; Ryan, G., B. :**
»Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody : possible arbovirus aetiology ?«
British Medical Journal (1982); 285, 606
- 20 **Duerr, R., H.; Targan, S., R.; Landers, J.; Larusso, N., F.; Lindsay, K., L.; Wiesner, R., H.; Shanahan, F.**
»Neutrophil cytoplasmic antibodies: A link between primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis«
Gastroenterology (1991); 100, 1385-1391
- 21 **Einck, I.; Bustin, M.**
»The intracellular distribution and function of the high mobility group chromosomal proteins«
Experimental Cell Research (1985); 156, 295-310
- 22 **Ellerbroek, p., M.; Oudkerk Pool, M.; Ridwan, B., U.; Dolman, K., M.; Blomberg, B., M., E., von; Borne, A., E., G., von dem; Meuwissen, S., G., M.; Goldschmeding, R.**
»Neutrophil cytoplasmic antibodies (pANCA) in ulcerative colitis«
Journal of Clinical Pathology (1994); 47, 257-262
- 23 **Falk, J., R.; Becker, M.; Terrell, R.; Jennette, J., C.**
»Antigen specificity of p-ANCA and c-ANCA. The Third International Workshop on ANCA«
American Journal of Kidney Disease (1991); 18, 197 (abstract 6)
- 24 **Falk, R., J.; Jenette, J., C.**
»Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis«
New England Journal of Medicine (1988); 318, 1651-1657
- 25 **Franssen, C., F. M.; Stegman, C., A.; Kallenberg, G. M.; Gans, R., O. B.; De Jong, P., E.; Hoorntje, S., J.; Tervaert, J., W. C.**
»Antiproteinase 3- and antimyeloperoxidase- associated vasculitis«
Kidney International (2000); 57, 2195-2206
- 26 **Fricke, M.; Hollinshead, M.; White, N.; Vaux, D.:**
»Interphase nucleoli of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope«.
Journal of Cell Biology (1997); 136, 531-544

- 27 **Gabay, J., E.; Scott, R., W.; Campanelli, D.; Griffith, J.; Wilde, C.; Marra, M., N.; Seeger, M.; Nathan, C., F.**
»Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leucocytes«
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (1989); 86, 5610-5614
- 28 **Gaskin, G.; Savage, C., O., S.; Ryan, J., J.; Jones, S.; Rees, A., J.; Lockwood, C., M.; Pusey, C., D.**
»Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity during long-term follow-up of 70 patients with systemic vasculitis«
Nephrology, Dialysis, Transplantation (1991); 6, 689-694
- 29 **Gershwin, E., M.; Ansai, A., A.; Mackay, I., R.; Nakanuma, Y.; Nishio, A.; Rowley, M., J.; Coppel, R., L.**
»Primary biliary cirrhosis: An orchestrated immune response against epithelial cells«
Immunological Reviews (2000); 174, 210-225
- 30 **Goldschmeding, R.; Schoot, C., E.; Cohen, C., E.; Tervaert, J., W.; Mason, D., Y.; Borne, A., E., G., K., von dem; Kallenberg, C., G., M.**
»Autoantibodies against myeloid lysosoma enzymes: A novel class of autoantibodies associated with vasculitic syndromes (abstr.)«
Kidney International (1988); 34, 558-559
- 31 **Goldschmeding, R.; Schoot, C., E.; van der; ten Bokkel Huinick, D.; Hack, C., E.; Ende, M., E., van den; Kallenberg, C., G., M.; Borne, A., E., G., Kr., von dem:**
»Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils«
Journal of Clinical Investigation (1989), 84, 1577-1587
- 32 **Gordon, L., K.; Eggena, M.; Targen, S., R.; Braun, J.**
»Mast cells and neuroendocrine cytoplasmic autoantigen(s) detected by monoclonal pANCA antibodies«
Clinical Immunology (2000); 94, 42-50
- 33 **Gray, P., W.; Flaggs, G.; Leong, S., R.; Gumina, R., J.; Weiss, J.; Ooi, C., E.; Elsbach, P.:**
»Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and funktional correlations«.
Journal of Biological Chemistry (1989); 264, 9505-9509
- 34 **Greenstein, A., J.; Janowitz, H., D.; Sachar, D., B.**
»The extraintestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis«
Medicine (1976), 55, 401-409
- 35 **Hagen, E., C.; Andrassy, K.; Csernok, E.; Daha, M., R.; Gaskin, G.; Gross, W.; Lesavre, P.; Ludemann, J.; Pusey, C., D.; Rasmussen, N.**
»The value of indirect immunofluorescence and solid phase techniques for ANCA detection. A report on the first phase of an international co-operative study on the standardisation of ANCA assays«
Journal of Immunological Methods (1993); 159, 1-16
- 36 **Hauschild, S.; Schmitt, W., Csernok, E.:**
»ANCA in systemic vasculitides, collagen vascular diseases, rheumatic disorders and inflammatory bowel disease«.
In ANCA Associated Vasculitides. Hrsg.: Gross, W., L.. New York, Plenum Press (1993); 245-251
- 37 **Harlow, E.; Lane, D.**
»Cell staining«
In Antibodies: a Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory (1988); 359-420
- 38 **Harrison, J., E.; Schultz, J.**
»Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase«
Journal of Biological Chemistry (1976); 251, 1371-1374

- 39 **Henshaw, T., J., Malone, C., C.; Gabay, J., E., Williams, R., C. Jr.**
»Elevations of neutrophil proteinase 3 in serum of patients with Wegener's granulomatosis and polyarthritis nodosa«
Arthritis & Rheumatism (1994); 37, 104-112
- 40 **Jamar-Leclerc, N.; Reumaux, D. ; Duthilleul, P. ; Colombel, J., F.**
»Do p-ANCA define a clinical subgroup in patients with Crohn's disease?«
Gastroenterology (1997); 112, 1316-1317
- 41 **Kam, C., M.; Kerrigan, J., E.; Dolman, K., M.; Goldschmeding, R.; Borne, A., E., von dem; Powers, J., C.**
»Substrate and inhibitor studies on proteinase 3«
FEBS Letters (1992); 197, 119-123
- 42 **Klein, R.; Berg, P., A.**
»Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz«
Klinisches Labor (1993); 39, 611-626
- 43 **Klein, R.; Eisenburg, J.; Weber, P.; Seibold, F.; Berg, P., A.**
»Significance and specificity of antibodies to neutrophils detected by western blotting for the serological diagnosis of primary sclerosing cholangitis«
Hepatology (1991); 14, 1147-1152
- 44 **La Cour, B., B.; Wiik, A. ; Hoier-Madsen, M.; Baslund, B.**
»Clinical correlates and substrate specificity's of antibodies exhibiting neutrophil nuclear reactivity –a methodological study«
Journal of Immunological Methods (1995); 187, 287-295
- 45 **Laemli, U.**
»Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4«
Nature (1970); 227, 680-685
- 46 **Lee, S., S., Lawton, J., W., M.; Chak, W.**
»Distinction between antinuclear antibody and p-ANCA«
Journal of Clinical Pathology (1991); 44, 962-963
- 47 **Lombardi, G.; Annese, V.; Piepoli, A.; Bovio, P.; Latiano, A.; Napolitano, G.; Perri, F.; Conoscitore, P.; Andriulli, A.**
»Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease«
Diseases of the Colon and Rectum (2000); 43, 999-1007
- 48 **Lüdemann, J.; Utrecht, B.; Gross, W., L.:**
»Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme«
Journal of Experimental Medicine (1990); 171, 357-362
- 49 **Mercarelli, L., H.; Nusbaum, P.; Noel, L., H.**
»Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against cathepsin G in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis«
Clinical and Experimental Immunology (1992); 90, 79-84
- 50 **Monk, M.; Mendeloff, A., I., Siegel, C., I., Lilienfeld, A.**
»An epidemiological study of ulcerative colitis and regional enteritis among adults in Baltimore. Hospital incidence and prevalence«
Gastroenterology (1967); 53, 198-210
- 51 **Monsen, U.; Bernell, O.; Johansson, C.; Hellers, G.**
»Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease«
Scandinavian Journal of Gastroenterology (1991); 26, 302-306

- 52 **Mulder, A., L.; Horst, G.; Haagsma, E.; Limburg, P.; Kleinbenker, J.; Kallenberg, C.:**
»Prevalence and characterisation of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases«
Hepatology (1993); 17, 411-417
- 53 **Niles, J., M. ; McCluskey, R., T. ; Ahmad, M., F.; Arnaout, M., A:**
»Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase«
Blood (1989); 74, 1888-1893
- 54 **Nölle, B.; Specks, U.; Lüdemann, J., Rohrbach, M., S.; Deremee, R., A.; Gross, W., L.:**
»Anticytoplasmic antibodies: Their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis«
Annals of Internal Medicine (1989); 111, 28-40
- 55 **Ooi, C., E.; Weiss, J.; Doerfler, M., E., Elsbach, P.**
»Endotoxin-neutralizing properties of the 35 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils«
Journal of Experimental Medicine (1991); 174, 649-655
- 56 **Orholm, M.; Munkholm, P.; Langholz, E.; Nielsen, O., H.; Sorensen, T., I.; Binder, V.:**
»Familial occurrence of inflammatory bowel disease «
New England Journal of Medicine (1991), 324, 84-88
- 57 **Orth, T.; Kellner, R.; Diekmann, O.; Faust, J.; Meyer zum Büschenfelde, K., H.; Mayet, W., J.**
»Identification and characterisation of autoantibodies against catalase and a-enolase in patients with primary sclerosing cholangitis«
Clinical and Experimental Immunology (1998); 112, 507-515
- 58 **Peen, E.; Almer, S.; Bodemar, G.; Ryden, B., O.; Sjolín, C.; Tejle, K.; Skogh, T.**
»Anti-lactoferrin antibodies and other types of ANCA in ulcerative colitis, primary sclerosing cholangitis and Crohn's disease«
Gut (1993); 34, 56-62
- 59 **Pokorny, C., S.; Norton, I., D.; McCaughan, G., W.; Selby, W.:**
»Antineutrophil cytoplasmic antibody: A prognostic indicator in primary sclerosing cholangitis«
Journal of Gastroenterology and Hepatology (1994); 9, 40-44
- 60 **Porghazka, E., J.; Terasaki, P., I.; Park, M., S.; Goldstein, L., I.; Busuttill, R., W.:**
»Association of primary sclerosing cholangitis with HLA-DRw52s«
New England Journal of Medicine (1990), 322, 1842-1844
- 61 **Quaranta, S.; Van de Water, J.; Ishibashi, H.; Rosina, F.; Coppel, R.; Uibo, R.; Gershwin, E., M.**
»The immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis«
Hepato-Gastroenterology (1999); 46,3041-3047
- 62 **Quigley, E., M., M.; La Russo, N., F.; Ludwig, J.; Mac, Sween, R., N., M.; Birnie, G., G.; Watkinson, G.**
»Familial occurrence of primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis«
Gastroenterology (1983); 85, 1160-1165
- 63 **Rao, J., K.; Allen, N., B.; Feussner, J., R.; Weinberger, M.**
»A prospective study of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) and clinical criteria in diagnosing Wegener's granulomatosis «
Lancet (1995); 346, 926-931
- 64 **Rao, J., K.; Weinberger, M.; Oddone, E., Z.; Allen, N., B.; Landsman, P.**
»The role of antineutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener's granulomatosis. A literature review and meta-analysis«
Annals of Internal Medicine (1995); 123, 925-932

- 65 **Rasmussen, N.; Wiik, A.**
»Indirect immunofluorescence examination for IgG-ANCA in sera submitted for the 1st international workshop for IgG-ANCA, 1988«
Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (1989); 97 (Suppl. 6), 16-20
- 66 **Reumaux, D.; Colombel, J. F.; Delecourt, L.; Noel, L. H.; Cortot, H.; Duthilleul, P.**
»Antineutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in patients with ulcerative colitis (UC): influence of disease activity and family study«
Advances in Experimental Medicine and Biology (1993); 336, 515-518
- 67 **Rozenendaal, C.; Jong, M., A. de ; Berg, A., P. van den ; Wijk, R., T. van ; Limburg, P., C.; Kallenberg, C., G. M.**
»Clinical significance of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in autoimmune liver diseases«
Journal of Hepatology (2000); 32, 734-741
- 68 **Rozenendaal, C.; Zaho, M., H.; Horst, G.; Lockwood, C., M.; Keibeuker, J., H.; Limburg, P., C.**
»Catalase and α -enolase: Two novel granulocyte autoantigens in inflammatory bowel diseases«
Clinical and Experimental Immunology (1998); 112, 10-16
- 69 **Sachs, L.**
»Angewandte Statistik«
Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1992); 7
- 70 **Sartor, R., B.**
»The influence of normal microbiological flora on the development of chronic mucosal inflammation«
Research in Immunology (1997); 148, 567-576
- 71 **Savigne, J., A.; Gallicchio, M.; Georgiou, T.; Davies, D., J.**
»Diverse target antigens recognized by circulating antibodies in anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated renal vasculitides«
Clinical and Experimental Immunology (1990); 82, 238-243
- 72 **Saxon, A.; Shanahan, F.; Landers, C.; Ganz, T.; Targan, S.**
»A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease«
Journal of Allergy and Clinical Immunology (1990); 86, 202-210
- 73 **Segelmark, M.; Persson, B.; Hellmark, T., Wieslander, J.**
»Binding and inhibition of myelo-peroxidase (MPO): A major function of coeruleoplasmin?«
Clinical and Experimental Immunology (1997); 108, 167-174
- 74 **Seibold, F.; Slametschka, D.; Gregor, M.; Weber, P.**
»Neutrophil autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis«
Gastroenterology (1994); 107, 532-536
- 75 **Seibold, F.; Weber P.; Klein, R.; Berg, P. A.; Wiedmann, K. H:**
»Clinical significance of antibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis«
Gut (1992); 33, 657-662
- 76 **Shanahan, F.; Duerr, R.; Rotter, J.; Yang, H.; Sutherland, L.; McElree, C.; Landers, C.; J.; Targan, S., R.**
»Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: Familial aggregation and genetic heterogeneity«
Gastroenterology (1992); 103, 456-461
- 77 **Snook, J. A.; Chapman, R. W.; Flemming, K.; Jewell, D. P.**
»Anti-neutrophil nuclear antibody in ulcerative colitis, Crohn's disease and primary sclerosing cholangitis«
Clinical and Experimental Immunology (1989); 76, 30-33

- 78 **Sobajima, J.; Ozaki, S.; Osakada, F.; Uesugi, H.; Shirakawa, H.; Yoshida, M.; Nakao, K.**
»Novel autoantigens of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA) in ulcerative colitis: non-histone chromosomal proteins, HMG1 and HMG2«
Clinical and experimental immunology (1997); 107, 135-140
- 79 **Spickett, G., P., Broomhead, V.**
»Formalin fixation and patterns of antineutrophil cytoplasmic antibodies«
Journal of Clinical Pathology (1995); 48, 89-90
- 80 **Stoffel, M. P. Csernok, E.; Herzberg, C.; Johnston, T.; Carroll, S. F.; Gross, W. L.**
»Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) directed against bactericidal/ permeability increasing protein (BPI): a new seromarker for inflammatory bowel disease and associated disorders«
Clinical and experimental immunology (1996); 104, 54-59
- 81 **Strassburg, C., P.; Manns, M., P.**
»Autoimmunerkrankungen der Leber «
In Lebererkrankungen, Pathophysiologie-Diagnostik-Therapie. Hrsg.: Schmidt, E.; Schmidt, F., W.; Manns, M., P.. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (2000); 687-711
- 82 **Targan, S., R.; Landers, C.; Vidrich, A.; Czaja, A.t:**
»High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis«
Gastroenterology (1995); 108, 1159-1166
- 83 **Terjung, B.; Herzog, V.; Worman, H., j.; Gestmann, I.; Bauer, C.; Sauerbruch, T.; Spengler, U.:**
»Atypical antineutrophil cytoplasmic antibodies with perinuclear fluorescence in chronic inflammatory bowel diseases and hepatobiliary disorders colocalize with nuclear lamina proteins«.
Hepatology (1998), 28, 332-340
- 84 **Terjung, B.; Spengler, U.; Sauerbruch, T.; Worman, H., J.**
»Atypical p-ANCA in IBD and hepatobiliary disorders react with a 50-kilodalton nuclear envelope protein of neutrophils and myeloid cell lines«
Gastroenterology (2000); 119, 310-322
- 85 **Thompson, N., P.; Driscoll, R.; Ponder, R., E.; Wakefield, A., J.**
»Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study«
British Medical Journal (Clinical research edition) (1996); 312, 95-96
- 86 **Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.**
»Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications«
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA (1979); 76, 4350,5354
- 87 **Toyoda, H.; Wang, S., J.; Yang, H.**
»Distinct associations of hla class 2 genes with inflammatory bowel disease«
Gastroenterology (1993); 104, 741-748
- 88 **Tysk, C.; Lindberg, E.; Järnerot, G.; Floderus-Myrhed, B:**
»Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking«
Gut (1988); 29, 990-996
- 89 **Vasiliauskas, E.; A.; Plevy, S., E.; Landers, C., J.; Binder, S., W.; Ferguson, D., M.; Yang, H.; Rotter, J., I.; Vidrich, A.; Targan, S., R.**
»Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with Crohn's disease define a clinical subgroup«
Gastroenterology (1996); 110, 1810-1819

- 90 **Weber, M., F., A.; Andrassy, K.; Pullig, O.; Koderisch, J.; Netzer, K.**
»Antineutrophil cytoplasmic antibodies and antiglomerular basement membrane antibodies in Goodpasture's syndrome and in Wegener's granulomatosis«
Journal of the American Society of Nephrology (1992); 2, 1227-1234
- 91 **Weiss, J.; Olsson, I.**
»Cellular and subcellular localisation of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils«
Blood (1987); 69, 652-659
- 92 **Weiss, S., J.**
»Tissue destruction by neutrophils«
New England Journal of Medicine 1989); 320, 365-376
- 93 **Wieslander, J.; Wiik, A.**
»ANCA antigens: Myeloperoxidase«
in Manual of Biological Markers of Disease. Hrsg.: Venrooy, W., J., van; Maine, R., N..
Dordrecht, Kluwer Academic (1994); B7.2, 1-9
- 94 **Wieslander, J.; Wiik, A.**
»ANCA antigens: Proteinase 3«
in Manual of Biological Markers of Disease. Hrsg.: Venrooy, W., J., van; Maine, R., N..
Dordrecht, Kluwer Academic (1994); B7.1, 1-9
- 95 **Wiik, A.**
»Delineation of a standard procedure for indirekt immunfluorescence detection of ANCA«
Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (1989); 97 (Suppl 6), 12-13
- 96 **Wong, R. C. W.; Silvestrini, R. A.; Savige, J. A.; Fulcher, D. A.; Benson, E. M.**
»Diagnostic value of classical and atypical antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) immunfluorescence patterns«
Journal of Clinical Pathology (1999); 52, 124-128
- 97 **Woude, F., J., van der; Rasmussen, N.; Lobatto, S.; Wiik, A.; Permin, H.; Es, L., A., van; Giessen, M., van der; Hem, G., K., van der; The, T., H.**
»Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis«
Lancet (1985); 1, 425-429
- 98 **Yang, H.; Rotter, J., I.; Toyoda, H.; Landers, C.; Tyan, D.; McElree, C., K.; Targan, S., R.**
»Ulcerative colitis: A genetically heterogenous disorder defined by genetic (HLA class 2) and subclinical (antineutrophil cytoplasmic antibodies) markers«
Journal of Clinical Investigation (1993); 92, 1080-1084
- 99 **Yang, P.**
»Comparative evaluation of unfixed and fixed human neutrophils for determination of antineutrophil cytoplasmic antibodies by indirect immunfluorescence«
Journal of Clinical Pathology (1997); 50, 677-680
- 100 **Yeaman, S., J.; Kirby, J., A.; Jones, D., E. J.**
»Autoreactive responses to pyruvate dehydrogenase complex in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis«
Immunological Reviews (2000); 174, 283-249
- 101 **Zaho, M. H.; Jones, S. J.; Lockwood, C. M.**
»Bactericidal/ permeability-increasing protein (bpi) is an important antigen for anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (anca) in vasculitis«
Clinical and Experimental Immunology (1995); 99, 49-56

- 102 **Zauli, D.; Ghetti, S. , Grassi, A.; Descovich, C.; Cassani, F.; Ballardini, G.; Muratori, L.; Bianchi, F., B.**
»Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in type 1 and 2 autoimmune hepatitis«
Hepatology (1997); 25, 1105-1107
- 103 **Zauli, D.; Schrupf, E.; Grespi, C.; Cassani, F.; Fausa, O.; Aadland, E.**
» An autoantibody profile in primary sclerosing cholangitis «
Journal of Hepatology (1987); 5, 14

Danksagung

Frau Prof.Dr. med R. Klein möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre unermüdliche Geduld und liebe Unterstützung in allen Phasen der Arbeit besonders danken.

Frau S. Dumann und Frau Dr. H. Barth sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Immunpathologischen Labors danke ich für die Einweisung in diverse Methoden und für den Beistand bei den zahlreichen Herausforderungen.

Herrn Prof. Dr. H. K. Selbmann und Herrn Dr. G. Blumenstock vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung Tübingen danke ich für die ausführliche und freundliche Beratung bei allen statistischen Fragen und Problemen.

Herrn G. Sy gilt mein Dank für die, oft rund um die Uhr in Anspruch genommene Beratung in EDV-technischen Belangen. Frau C. Sy und Herrn W. Triebold danke ich für die gewissenhafte Durchsicht der Arbeit und viele Anregungen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank Herrn N. Bettache, ohne dessen stetige Unterstützung und Aufmunterung ich die Arbeit sicher nicht hätte fertigstellen können.

Lebenslauf

Name: Maren Sy

Geburtstag: 25.02.1975

Geburtsort: Reutlingen

1981-1985: Bästenhardt-Grundschule Mössingen

1985-1994: Quenstedt-Gymnasium Mössingen

1995-2001: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

14.3.1997: Ärztliche Vorprüfung

27.8.1998: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Februar 1999: Beginn der Dissertation im Immunpathologischen Labor der
Medizinischen Universitätsklinik Tübingen unter der Leitung
von Frau Prof. Dr. med. R. Klein

13.9.2000: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

21.11.2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1.4.2002 - 30.9.2003: ÄIP in der Medizinischen Klinik des Kreiskrankenhauses
Reutlingen unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. B. Braun

Ab 1.10.2003: Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik I
der Klinik am Eichert in Göppingen unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. med. H. Sigel

