

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Noduläre regenerative Hyperplasie (NRH) der Leber –**

**Manifestation eines organspezifischen  
Antiphospholipidsyndroms?**

**INAUGURAL DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**SANDRA JEANNETTE GOLLER**

**aus Plauen (Vogtland)**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Klein
2. Berichterstatter: Professor Dr. K.-P. Maier

Meiner Familie, Ralf, Gisela und Kristin Goller,  
sowie meiner Oma, Frau Gertrud Zimmer (†), gewidmet

## Abkürzungsverzeichnis

1/c	Kehrwert der Konzentration
aCL	Anticardiolipin-Antikörper
AIH	Autoimmune Hepatitiden
AK	Antikörper
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
Anti-LKM	Antikörper gegen Leber-Nieren-Mikrosomen
Anti-LP	Leber-Pankreas-Antikörper
Anti-SLA	Antikörper gegen „soluble liver“-Antigen
APA	Antiphospholipid-Antikörper
aPL	Antiphospholipidantikörper
APS	Antiphospholipidsyndrom
BiCa	Bicarbonat
BSA	bovine serum Albumin (Albumin aus Rinderserum)
CL	Cardiolipin
Diff	Differenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
E	Optische Dichte des Grenzwertes
FCS	fetal calf serum (Kälberserum)
FMS	Fibromyalgiesyndrom
IgA	Immunglobulin Klasse A
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M
JRA	juvenile rheumatoide Arthritis
KO	Kontrolle
LA	Lupus Antikoagulans
LW	Leerwert
M	Mittelwert
n	Patientenzahl
NRH	Noduläre regenerative Hyperplasie
nRNP	anti-Ribonukleinprotein
NS	Normalseren
OD	Optische Dichte
PAPS	Primäres Antiphospholipidsyndrom
Pat.	Patienten
PBC	Primäre Biliäre Cirrhose

PBS	phosphate buffered saline
Phos	Phosphatidylserin
PSC	Primär-Sklerosierende Cholangitis
RIA	Radioimmunoassay
SCL	Sclerodermie
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur
β2-GP1	β2-Glykoprotein1
S	Standardabweichung
Vs	versus
ZNS	Zentralnervensystem

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Historischer Überblick.....	1
1.2 Definition.....	2
1.3 Klinische Merkmale des APS.....	3
1.4 Antiphospholipid-Antikörper .....	10
1.4.1. Anticardiolipin-Antikörper .....	12
1.4.2. Anti- $\beta$ 2-Glykoprotein1-Antikörper .....	13
1.4.3. Lupus Antikoagulans .....	15
1.4.4. Pathogenese.....	17
1.5 Antikörper-Nachweis.....	19
1.6 Therapie .....	20
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	22
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Patientenkollektive .....	23
2.2 Kontrollkollektiv.....	26
2.3 Methoden .....	26
2.3.1. Allgemeine Vorbemerkungen.....	26
2.3.2. Testprinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay .....	28
2.3.3. Testablauf und Testauswertung .....	28
2.3.4. Varelisa Testkit .....	34
2.3.5. Hiss-Testkit .....	36
2.4 Material.....	38
2.4.1. Antigene und Antikörper .....	38
2.4.2. Chemikalien .....	39
2.4.3. Geräte.....	40
2.5 Statistik .....	41
3. Ergebnisse .....	42
3.1. Methodik.....	42
3.1.1. Vergleich der Mikrotiterplatten und Puffersysteme .....	42
3.1.2. Serumverdünnungen für andere Antigene .....	53
3.1.3. APA-positive Seren von Patienten mit APS.....	58
3.1.4. Definition des „Normalbereichs“ .....	64
3.1.5. Definition von positiven Seren als Standardseren .....	64
3.1.6. Vergleich FCS vs. BSA .....	66

3.1.7. Vergleich Testkits und Standardtest .....	67
3.2. Verschiedene Kontrollkollektive .....	69
3.3. Noduläre regenerative Hyperplasie .....	76
4. Diskussion.....	80
4.1 Methoden .....	80
4.2 Klinische Aspekte .....	86
5. Zusammenfassung .....	94
6. Literaturverzeichnis .....	95
7. Danksagung .....	104
8. Lebenslauf.....	105

## 1. Einleitung

---

### 1.1 Historischer Überblick

Die Geschichte der Antiphospholipid-Antikörper (aPL) reicht bis 1906 zurück, als Wassermann einen Komplementbindungstest zum Nachweis von „Reagin“ im Serum von Syphilis-Kranken vorstellte. Als verantwortliches Antigen für diese Reaktion wurde 1941 von Pangborn Cardiolipin beschrieben, ein negativ geladenes Phospholipid (64). Conley und Hartmann beobachteten 1952, daß Personen mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) falsch positive Tests für Syphilis aufwiesen. Gleichzeitig wurde bei diesen SLE-Patienten ein bisher unbekannter Inhibitor der Blutgerinnung beschrieben, der Lupus-Antikoagulans (LA) genannt wurde (18,20). Da das Vorkommen des LA nicht auf Patienten mit SLE beschränkt ist und häufiger mit einer Thrombose- als mit einer Blutungsneigung kombiniert ist, ist die Bezeichnung Lupus-Antikoagulans eher irreführend. Aus historischen Gründen wurde sie jedoch beibehalten(10).

Ein auffälliges Zusammentreffen von rezidivierenden Spontanaborten bzw. intrauterinem Fruchttod und LA wurde erstmals 1975 von Nilsson u. Mitarb. beschrieben (59).

Thiagarajan et al. konnte 1980 mittels eines monoklonalen IgM mit LA-Aktivität zeigen, daß die LA-Aktivität durch Antikörper gegen negativ geladene Phospholipide bedingt ist (78). Der direkte Nachweis der Anti-Cardiolipin-Antikörper (aCL) gelang Harris u. Mitarb. 1983 durch die Entwicklung eines Radioimmunoassay und wenig später eines ELISA (28,47).

Der Begriff „Antiphospholipid-Syndrom“ wurde 1985 von Hughes geprägt für die Kombination von Thrombophilie, Thrombozytopenie bzw. Abortneigung mit dem Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern (30).

In den letzten Jahren wurde jedoch zunehmend deutlich, daß weitere Antikörperspezifitäten beim Antiphospholipidsyndrom eine Rolle spielen, nämlich vor allem Antikörper gegen  $\beta$ 2-Glykoprotein1 und Phosphatidylserin.



## 1.2 Definition

Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) wird heute definiert als eine Erkrankung mit venösen oder arteriellen Thrombosen, Spontanaborten oder Thrombozytopenie und dem wiederholten Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern (aPL). Als weitere Symptome können fakultativ auftreten Livedo reticularis, Endokarditis, pulmonale Hypertonie, hämolytische Anämie und Nierenmanifestation der Grunderkrankung (3,4,6,37,56,67).

Definitionskriterien wurden 1990 von Harris erarbeitet und werden zusammengefasst in Tabelle 1 dargestellt (29).

### Tabelle 1. Definitionskriterien des APS

#### **Sicheres APS:**

2 oder mehr klinische Symptome\*

+ aCL > (x + 5 s) und/oder LA

#### **Wahrscheinliches APS:**

1 klinisches Symptom\*

+ aCL > (x + 5s)

oder

2 klinische Symptome\*

+ (x + 2s) ≤ aCL ≤ (x + 5s)

\* Thrombose, Thrombozytopenie, Abort

s: Standardabweichung; x: Mittelwert

aCL: Anticardiolipin-Antikörper

LA: Lupus Antikoagulans

Man unterscheidet ein sekundäres APS, bei einer Assoziation mit weiteren Autoimmunerkrankungen, vorzugsweise dem Lupus erythematoses, und ein primäres APS (PAPS) ohne Grunderkrankung.

Ein organspezifisches APS kann sich an Herz, Niere, ZNS, Leber und an den Gefäßen entwickeln.

Eine weitere Variante ist das sogenannte aPL-negative APS, welches die klinische Manifestation des APS ohne die entsprechenden Antikörper aufweist. Ob hier die aPL zum Zeitpunkt der Untersuchung nur nicht nachweisbar sind oder andere Mechanismen diskutiert werden müssen, ist gegenwärtig offen (25).

Die Bezeichnung „katastrophales Antiphospholipid-Syndrom“ beschreibt das klinische Bild eines akuten Zusammenbruchs mit respiratorischer Insuffizienz, Multiorganversagen und schwerer Thrombozytopenie assoziiert mit Antiphospholipid-Antikörpern. Glücklicherweise kommt es selten vor, doch wird es möglicherweise zu selten diagnostiziert (83).

### 1.3 Klinische Merkmale des APS

Das APS ist mit einer Vielzahl klinischer Manifestationen assoziiert und betrifft multiple Organsysteme. Obwohl der allgemeine pathophysiologische Mechanismus der Organschädigung die thrombotische Microangiopathie zu sein scheint, gibt es andere klinische Manifestationen, welche dadurch nicht hinreichend erklärt werden. Ein Beispiel hierfür sind die Herzklappenveränderungen.

Die vielfältigen Organmanifestationen durch Antiphospholipidantikörper und ihre klinischen Folgen sind in Tabelle 2 wiedergegeben (3,4,25,37,42,68).

Tabelle 2

Vaskuläre Manifestationen	Venöse Thrombosen, v.a. tiefe oder oberflächliche Gefäße der unteren Extremität, kompliziert durch Lungenembolien Okklusionen der Axillarvenen, Vena cava inferior u.a. Arterielle Thrombosen, v.a. Zerebralarterien
Kardiovaskuläre Manifestationen	Herzklappenerkrankungen Akute Gefäßverschlüsse, Koronararterienverschlüsse Intrakardiale Thromben Perikarderguß Thrombotische Diathese Kardiomyopathie Myokardinfarkt ( 0-7% ) Koronare Mikroangiopathie Aseptische Vegetationen der Herzklappen Nichtinfektiöse thrombotische Endokarditis <u>Ursache:</u> thrombotische Mikroangiopathie führt zu arteriellen und venösen Thrombosen; aCL-IgG lagern sich in den subendothelialen Schichten der Herzklappen ab
Neurologische Manifestationen	Ischämischer Insult (achtmal höheres Schlaganfallrisiko) Fokale zerebrale Ischämien, Transitorisch ischämische Attacken (TIA) Gefäßverschluß durch Embolie (Herz, v.a. Mitralklappenveränderungen) Epilepsie Bewegungsstörungen, Chorea

Migräne

Transverse Myelopathie

Guillain-Barre-Syndrom

Rückenmarkinfarkt, Querschnittsmyelitis

Sneddon-Syndrom

Demenz (Multiinfarktgeschehen)

Organisches Psychosyndrom, Psychosen

Ursache: Hypertension, Infektionen, zerebrale Ischämie und Vaskulitis sind in die multifaktorielle Ätiologie verwickelt

Okuläre Manifestationen

Amaurosis fugax

Ischämische Optikusneuropathie

Retinalarterienverschuß

Ursache: vasookklusive, thromboembolische Erkrankung des visuellen Systems

Pulmonale Manifestationen

Lungenembolie durch tiefe Venenthrombose

Pulmonale Hypertension

Intraalveoläre Lungenhaemorrhagie

Ursache: meist makrovaskuläre Thrombosen als Teil eines systemischen hyperkoagulativen Zustandes

Renale Manifestationen

Intrarenale Thrombosen

Systemische Hypertension, Renaler Hypertonus

Proteinurie, Hämaturie

Progressives Nierenversagen

Glomeruläre Kapillarthrombosen

Nierenvenenthrombosen, Nierenarterienstenose

Nephrotisches Syndrom (thrombotische Mikroangiopathie)

Adrenale Manifestationen (Nebennieren)	Nebennierenunterfunktion durch: Verschluß der Nebennierenvenen führt zu Drüsen- ödem, Kompression der arteriellen Blutversorgung, Nebenniereninfarkte Nebennierenversagen Morbus Addison
Hepatische & gastrointestinale Manifestationen	Budd-Chiari-Syndrom Hepatomegalie, Aszites Leberinfarkte Zentrale und sublobuläre Venenverschlüsse Hepatozelluläre Nekrose, Fibrose Primäre portale Hypertension Thrombose der Mesenterialgefäße Gefäßverschlüsse ebenso in Milz und Pankreas <u>Ursache:</u> strukturelle und funktionelle Obstruktion des venösen Blutflusses führt zur hepatischen Venenschlußkrankheit, meist bei generalisierter Thrombophilie
Dermatologische Manifestationen	Livedo reticularis (diagnostisches Kriterium) Nekrotische Hautulzera, oberflächliche Haut- nekrosen Digitale Gangrän Endarteriitis obliterans Oberflächliche Thrombophlebitiden <u>Ursache:</u> nichtentzündliche Thrombose der kleinen Arterien und Venen innerhalb der Dermis und des subkutanen Fettgewebes (37% der Patienten mit Hautläsionen entwickeln Multisystemthrombosen)

Knöcherner Manifestationen	Avaskuläre Nekrose der Knochen (AVN), gelenknah
Schwangerschaft und Geburt betreffende Manifestationen	Rezidivierende Spontanaborte Fehl- oder Frühgeburt, intrauteriner Fruchttod (LA) Präeklampsie Chorea gravidarum Chronische uteroplazentare Vaskulitis Multifaktorielle Endorganschädigung (Plazenta) <u>Ursache:</u> bei Patienten mit aPL besteht ein prothrombotischer Zustand, der durch einige „Trigger“ zu einem klinischen Ereignis führen kann; solche Trigger sind u.a. chirurgische Eingriffe, Hormonpräparate und Schwangerschaft Folgen sind Plazentagefäßverschlüsse und Infarkte
Hämatologische Manifestationen	Thrombozytopenie Idiopathische, thrombozytopenische Purpura Hämolytische Anämie (selten)

Antiphospholipid-Antikörper treten nicht nur beim APS und PAPS auf, sondern lassen sich zunehmend auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen nachweisen. Eine Übersicht hierzu liefert Tabelle 3 (24,25).

Tabelle 3. Erkrankungen mit Antiphospholipid-Antikörpern

Erkrankung	aPL in %
-----	
Autoimmunerkrankungen	
SLE	17-61
primäres APS	100
chronische Polyarthrit	8-49
juvenile chronische Arthritis	53
Arthritis psoriatica	11-28
primäres Sjögren-Syndrom	11-44
progressive Systemsklerose	7-15
Dermato-Polymyositis	6-33
Polymyalgia rheumatica	27
diverse Vaskulitiden (z.B. Arteriitis temporalis)	47
idiopathische thrombozytopenische Purpura	30
zerebrale Ischämien bei jungen Erwachsenen	18-46
zerebrale Ischämien aller Altersgruppen	7-9
Myokardinfarkt bei jungen Erwachsenen	21
Rezidivierende Aborte	4-7
chronische Dialyse	30-48
Gesunde	0-7,5
-----	

Eine Thrombose vorwiegend kleiner Gefäße, begünstigt bzw. bedingt durch das Vorhandensein von Antiphospholipidantikörpern, findet sich in der Pathogenese vieler verschiedener Erkrankungen. Eine zusammenfassende Darstellung liefert Tabelle 4 (2).

Tabelle 4. Gesicherte Assoziationen mit Thrombosen

1 Hepatisch	Budd-Chiari-Syndrom Leberinfarkte Hepatomegalie und Zunahme der Enzymaktivität Noduläre regenerative Hyperplasie
2 Adrenal	Hypoadrenalismus Morbus Addison
3 Pulmonal	Thromboembolische pulmonale Hypertension
4 Zerebral	Sneddon`s Syndrom Multiinfarkt-Demenz Lupus-Enzephalopathie
5 Kardial	Akute und chronische Kardiomyopathie Segmentale ventrikuläre Dysfunktion Herzklappenfehler Zerebrale Thromboembolien Pseudoinfektiose Endokarditis Klappenobstruktionen
6 Renal	Thrombotische Mikroangiopathie Renalarterienverschluß oder –thrombose

Die autoimmune Hepatitis (AIH) definiert eine Subgruppe chron. Lebererkrankungen unklarer Ätiologie. Für die Diagnose der AIH sind in erster Linie die Antikörper gegen Kerne (ANA), glatte Muskulatur (SMA), Leber-Nieren-Mikrosomen (anti-LKM), das Leber-Pankreas-(Anti-LP) und das „soluble liver“ Antigen (Anti-SLA) von Bedeutung. Die Primär-biliäre Zirrhose bzw. chronische nicht eitrig destruirende Cholangitis ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der kleinen und mittleren Gallengänge. Laborchemisch findet sich eine mäßige bis starke Erhöhung der alkalischen Phosphatase bei normalerweise nur gering erhöhten Transaminasen. In den meisten Fällen sind die IgM-Globuline pathologisch. Serologisch ist eine Reihe von Autoantikörpern



nachweisbar. Die größte diagnostische Bedeutung kommt den antimitochondrialen Antikörpern (AMA) zu. Im Gegensatz zur PBC und der autoimmunen Hepatitis tritt die PSC überwiegend beim männlichen Geschlecht und im jüngeren Alter auf. Ca. 70% der Patienten haben gleichzeitig eine Colitis ulcerosa. Eine starke Erhöhung der alkalischen Phosphatase ist typisch, die Bilirubinwerte sind schwankend. Verschiedene Autoantikörper wurden bei der PSC beschrieben. Die größte klinische/diagnostische Relevanz kommt den Antikörpern gegen Granulozyten zu. Diese können mit Hilfe unterschiedlicher Methoden nachgewiesen werden. Am gebräuchlichsten ist der Immunfluoreszenztest an Granulozyten (eines gesunden Spenders), wo sie eine perinukleäre Fluoreszenz zeigen (pANCA). (40)

Bei diesen Lebererkrankungen und auch bei der nodulären regenerativen Hyperplasie (NRH) der Leber, welche Folge einer Zirkulationsstörung in der Leber ist und auch im Gefolge einer hepatoportalen Sklerose entsteht mit multifaktorieller Ätiologie (persönliche Mitteilung Prof. Bianchi), lassen sich Antiphospholipidantikörper nachweisen (40, 37,71,72). Als Ursache werden u.a. Thrombosen der kleinen, aber auch großen Gefäßen der Leber, z.B. der Vena cava inferior, gesehen, aber auch eine vaskulitische Genese wird diskutiert (25,37).

#### 1.4 Antiphospholipid-Antikörper

Autoantikörper können in Folge eines Gewebeunterganges entstehen als Antwort auf die Freisetzung eines Zielantigens, das normalerweise nicht in Kontakt mit den immunvermittelnden Zellen tritt. So werden von diesen apoptotischen Zellen u.a. Phospholipide exprimiert. Sie können ebenfalls stimuliert werden nach veränderter Expression von Zelloberflächenproteinen aufgrund externer Stimuli oder der Translokation von intrazellulären Antigenen an die Zelloberfläche (37).

Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung von Antiphospholipid-Antikörpern zählen exogenes Östrogen, Infektionen wie zum Beispiel HIV (aCL) und Parvovirus B19 ( $\beta$ 2-GP1), sowie Medikamente, z.B. Procainamide, Phenothiazine (46,56,65).

Die Fähigkeit des einzelnen Wirtes mit den spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexen umzugehen prädisponiert zur Organ- und Gewebeschädigung. All diese Faktoren spielen eine Rolle um einen pathogenen Mechanismus für die Erzeugung von Autoantikörpern im APS anzuregen (37).

Im Rahmen von Infektionen kann es zur Stimulation natürlicher Autoantikörper kommen (s.u.).

Antiphospholipid-Antikörper (aPL) gehören zu einer heterogenen Familie von Autoantikörpern mit Spezifität gegen eine Vielzahl von Phospholipidbindungsproteinen, Phospholipidmolekülen und Phospholipid-Protein-Komplexen. Viele Phospholipidbindungsproteine sind in das APS verwickelt, wie  $\beta$ 2-Glykoprotein 1, Prothrombin, Protein C, Protein S, Kininogene, Thrombomodulin und Annexin V (37).

Antiphospholipid-Antikörper können in zwei Gruppen unterteilt werden, entsprechend ihrer Assoziation mit autoimmunen oder infektiösen (alloimmunen) Erkrankungen. Autoimmune Antikörper werden in Solid-Phase-Immunoassays mit anorganischen Phospholipiden, wie Cardiolipin, als Antigen bestimmt. Sie sind allgemein gegen das Phospholipidbindungsprotein  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 gerichtet, welches als Cofaktor bei der Bindung von Antikörpern an Cardiolipin dient, nicht gegen das Phospholipidmolekül selbst. Diese Antikörper erkennen das  $\beta$ 2-Glykoprotein 1, gebunden an eine negativ geladene Oberfläche.

Alloimmune Antikörper kommen bei chronischen Infektionen wie Malaria, Syphilis, Lepra, Tuberkulose und Parvo-Virus-Infektionen vor. Diese Antikörper binden nicht  $\beta$ 2-Glykoprotein 1, sondern sind gegen anionische Phospholipide gerichtet, welche mit  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 um die Bindung der Antikörper konkurrieren (1,32).

Antiphospholipid-Antikörper werden als natürliche Antikörper auch in der Normalbevölkerung gefunden. In einem Kollektiv aus 499 Blutspendern lag die Prävalenz von LA-Antikörpern bei 8% und von Anticardiolipin-Antikörpern bei 4,6% (IgG), 4,6% (IgM) und 5,6% (polyvalente) (76). LA-Antikörper fanden sich vorwiegend in Seren junger Frauen. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Antikörpertiter und dem Alter (bis 50 Jahre) bzw. dem Geschlecht ließ sich in einer weiteren Studie nicht nachweisen (35). Manoussakis et al zeigt, daß die Prävalenz der Antiphospholipid-

Antikörper in einer älteren Population ansteigen kann (49). Unter der Verwendung eines polyklonalen aCL-Assays (IgG + IgM) stellten Fields et al bei gesunden Probanden in 12% der Fälle erhöhte Seruntiter fest (21).

#### 1.4.1 Anticardiolipin-Antikörper

Anticardiolipin-Antikörper (aCL) sind Immunglobuline, die mit negativ geladenen Phospholipiden reagieren. Die Bestimmung der aCL erfolgt durch RIA oder ELISA, wobei Cardiolipin als Antigen der festen Phase verwendet wird (53).

Die Anwesenheit dieser Autoantikörper wird mit der Entwicklung von arteriellen und venösen Thrombosephänomenen, Thrombozytopenie, Fehlgeburten und Herzklappenerkrankungen assoziiert, besonders bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Die exakten Mechanismen, wie einige aCL Thrombosen oder andere klinische Manifestationen hervorrufen, sind unklar (69).

In den letzten Jahren wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, daß ein 50 kD Serum-Cofaktor für Anticardiolipin-Antikörper, die beim SLE vorkommen, erforderlich ist, um an Polystyrolplatten beschichtet mit Cardiolipin zu binden. Dieser Cofaktor wurde identifiziert als  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 (Apolipoprotein H), durch das Auffinden einer NH-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Proteins und durch das Klonen und Sequenzieren der cDNA (52,55).

Zwei verschiedene Typen von Anticardiolipin-Antikörpern müssen nun unterschieden werden, Serum-Cofaktor abhängige und Serum-Cofaktor unabhängige Antikörper. Bei Patienten mit Infektionskrankheiten wie Syphilis, Malaria, Hepatitis A, Tuberkulose oder infektiöser Mononukleose, können aCL nachgewiesen werden, die direkt mit Cardiolipin ohne  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 reagieren.

Anticardiolipin-Antikörper, die bei SLE und anderen autoimmunen Erkrankungen vorkommen, sind nicht gegen Cardiolipin direkt gerichtet, sondern die Bindung des aCL erfordert die Präsenz von  $\beta$ 2-Glykoprotein 1. Diese Cofaktor abhängigen Antikörper werden mit einem Thromboserisiko assoziiert (16).

Es existieren verschiedene Hypothesen über das Bindungsverhalten von Cardiolipin-Antikörpern, Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein1: 1) aCL erkennen einen  $\beta$ 2-GP1-Cardiolipin Komplex, 2) erst durch Komplexbildung zwischen  $\beta$ 2-GP1 und Cardiolipin wird ein kryptisches Epitop exprimiert, 3) das Epitop für aCL erscheint auf der nativen Struktur von  $\beta$ 2-GP1. Matsuura et al schließt aus seinen Untersuchungen, daß beim APS die aCL eine modifizierte Form des  $\beta$ 2-Glykoprotein1 erkennen, welche erst durch die Adsorption des Proteins an eine polyoxygenierte Oberfläche entsteht (53,9).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Anticardiolipin-Antikörper mit einem Phospholipid- $\beta$ 2-Glykoprotein1-Komplex reagieren und in zwei Gruppen unterteilt werden können: aCL-Typ A (Cofaktor-abhängig) hemmen phospholipidabhängige Gerinnungsprozesse, aCL-Typ B (Cofaktor-unabhängig) besitzen keine Gerinnungsaktivität (25).

#### 1.4.2 Anti- $\beta$ 2-Glykoprotein1-Antikörper

Ursprünglich dachte man aPL wären einzig gegen Phospholipide gerichtet, doch heute weiß man, daß aCL als Cofaktor  $\beta$ 2-GP1 benötigen.

Das Plasmaprotein  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 ( $\beta$ 2-GP1) wurde erstmals 1961 beschrieben (73). Es ist assoziiert mit verschiedenen Lipoproteinfraktionen im Plasma und wird auch als Apolipoprotein H bezeichnet (43).  $\beta$ 2-GP1 ist ein einkettiges Polypeptid aus 326 Aminosäuren, die in fünf Domänen arrangiert sind, wobei die 5. Domäne eine phospholipidbindende Region besitzt. Es hat ein Molekulargewicht von 50 kDa und ist hochgradig glykosyliert (48).  $\beta$ 2-GP1 ist ein Mitglied der „complement control protein repeat (CCP)“ oder „short consensus repeat (SCR)“ Superfamilie (69). Die SCR kommt in Proteinen vor, die in die Regulation des Komplementsystems eingreifen, wie zum Beispiel C4b-bindendes Protein und Faktor H, und in einigen Nicht-Komplement-Proteinen, wie zum Beispiel der Selektin-Familie und Faktor XIII. Obwohl die ersten vier der fünf Domänen des  $\beta$ 2-Glykoprotein 1 typische Beispiele der SSC-Familie sind, ist die fünfte Domäne durch eine zusätzliche Disulfidbrücke und ein langes c-terminales Ende verändert (36). Auf der Oberfläche dieser fünften Domäne findet man eine hoch positiv

geladene Sequenz (Lysin-reiches Segment), welche die Bindung von  $\beta$ 2-GP1 an negativ geladene Oberflächen, wie anionische Phospholipide, erklären würde (37). Durch die Substitution eines Lysinrestes durch einen Aspartatrest wurde die Bindung von  $\beta$ 2-GP1 an anionische Phospholipide um beinahe 50% reduziert (74). Verwendet man monoklonale Antikörper aus APS-Patienten, so erkennen diese lineare Epitope im C-terminalen Ende der 5. Domäne des  $\beta$ 2-Glykoprotein 1. In einem anderen Test wurde polyklonale humane Anti- $\beta$ 2-Glykoprotein1-Antikörper als Antigen  $\beta$ 2-GP1 und nur die 5. Domäne des  $\beta$ 2-GP1 angeboten. Die polyklonalen Antikörper haben sich direkt an die 5. Domäne gebunden, wodurch dosisabhängig eine Bindung an das gesamte  $\beta$ 2-Glykoprotein 1-Molekül verhindert werden konnte (84). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das antigene Epitop für eine Antikörperbindung die 5. Domäne ist (37). Es stellte sich heraus, daß  $\beta$ 2-GP1 für autoimmune Antikörper unbedingt erforderlich ist, um an einen Cardiolipin-ELISA zu binden. Es wird sogar vermutet, daß die anti- $\beta$ 2-Glykoprotein1-Aktivität ein verlässlicherer Indikator für das APS ist als Anticardiolipin-Antikörper (1,14,19,70).

$\beta$ 2-GP1 wurde in relativ hohen Konzentrationen von  $4\mu\text{M}$  in Plasma oder Serum gefunden und scheint, basierend auf in vitro Experimente, in der Gerinnungskaskade eine Rolle als natürliches Antikoagulum zu spielen. Durch seine Bindung an negativ geladene Oberflächen verhindert es die Kontaktphase der Gerinnungsaktivierung im Plasma, sowie die Aktivität des Prothrombinasekomplexes möglicherweise durch das Verdrängen von Gerinnungsfaktoren von den Phospholipidoberflächen (77). Dies führte zu der Theorie, daß Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper, wie sie beim APS gefunden werden, (durch Bindung des  $\beta$ 2-GP1) den natürlichen gerinnungsfördernden-gerinnungshemmenden Hämostase-Mechanismus beeinflussen, was zu einer gerinnungsfördernden Tendenz und klinisch zu Thrombosen und Atherosklerose führt (37,70). In ersten klinischen Studien zeigten sich bei 36% der SLE-Patienten Anti- $\beta$ 2-GP1-Antikörper (81). Wurden diese Antikörper gemeinsam mit LA-Antikörpern gefunden, bestand eine starke Assoziation mit Thrombosen (37).

### 1.4.3 Lupus Antikoagulans

Plasmaproteine, die phospholipidabhängige Blutgerinnungstests *in vitro* verlängern, wurden das erste Mal 1952 in Patienten mit SLE beschrieben (18). Der Zusatz von 50% normalem Plasma zum Testplasma korrigiert die Verlängerung nicht. Dies ist das wichtigste Merkmal, denn es unterscheidet das Lupus Antikoagulans vom Mangel an Gerinnungsfaktoren, bei dem der Zusatz von normalem Plasma die Gerinnungszeitveränderung korrigiert (83).

Als „Lupus Antikoagulans“ (LA) wurden Antiphospholipid-Antikörper bezeichnet, die die Koagulationszeit von phospholipidabhängigen Gerinnungstests verlängern. Lupus Antikoagulans (LA) ist ein IgG oder IgM Antikörper, der mit negativ geladenen Phospholipiden reagiert und häufig mit venösen und arteriellen Thrombosen assoziiert ist. Basierend auf dieser Definition können LA-Antikörper eine heterogene Gruppe von Antigenen erkennen. Tatsächlich besitzen einige Gruppen von Anticardiolipin - Antikörpern auch LA-Aktivität (11,66,77). Wie bereits oben betont, ist aber die Bezeichnung LA irreführend, da das LA häufiger mit einer Thrombose- als mit einer Blutungsneigung kombiniert ist und mehr als die Hälfte der Personen mit LA gar nicht an einem Lupus erkrankt sind (25).

Neuere Untersuchungen lassen vermuten, daß LA-Antikörper tatsächlich das Zusammentreffen von enzymatisch-gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Komplexen auf Phospholipidoberflächen stören. Die Folge sind klinisch vaskuläre Komplikationen, vorwiegend Thrombosen aber auch haemorrhagische Diathesen. Eine mögliche Ursache dafür ist das Vorhandensein von Antiprothrombin-Antikörpern mit hoher Affinität, welche mit Prothrombin Komplexe bilden und dadurch ein Entfernen von Immunkomplexen durch das retikuloendotheliale System bewirken. Dies verursacht einen Zustand von funktioneller Hypoprothrombinämie und Blutungen (37).

Es konnte gezeigt werden, daß LA mit humanem Prothrombin direkt an phospholipidfreien, hochgradigbindenden ELISA-Platten, mit phospholipidgebundenem Prothrombin und mit Phospholipiden allein reagieren kann (37).

LA-Antikörper haben auch verschiedene Wirkungen auf Protein C. Einige Untersucher fanden eine signifikante Hemmung der Aktivierungsrate des Protein C durch Thrombin

auf Endothelzellen verursacht durch gereinigtes LA IgG (15,37), während andere Untersucher dies nicht bestätigen konnten (37,38,61).

Durch IgG-Antikörper gegen negativ geladene Phospholipid-Protein-Komplexe von Protein C und Protein S verhindern LA-Antikörper die Inaktivierung des Faktor Va durch Protein C (62).

Die gegenwärtigen Kriterien zur Diagnose von LA-Antikörpern sind:

1. Verlängerung von mindestens einem phospholipidabhängigen Gerinnungstest.
  2. Nachweis der Hemmungsaktivität gezeigt durch die Wirkung des Patientenserums bei zugemischtem normalem Plasma.
  3. Nachweis, daß die Hemmungsaktivität abhängig ist von Phospholipiden, durch Zugabe oder Veränderung der Phospholipide, Thrombozyten oder Thrombozytenvesikel in dem Testsystem, das ursprünglich verwendet wurde.
  4. LA's müssen sorgfältig von anderen Koagulopathien unterschieden werden.
- (37)

Als Antiphospholipid-Antikörper wird eine Gruppe verschiedener Antikörper-Untergruppen bezeichnet. Jede dieser Untergruppen reagiert auf verschiedene Weisen und setzt an unterschiedlichen Punkten im Gerinnungssystem an. Eine Übersicht hierzu liefert Tabelle 5 (25).

*Tabelle 5. Klassifikation der Antiphospholipid-Antikörper*

Antikörper	Wirkungsweise
LA	hemmt phospholipidabhängige Gerinnungsprozesse
aCL	reagieren mit einem Phospholipid-β2-GP1-Komplex 2 Subgruppen: aCL-Typ A: hemmen phospholipidabhängige Gerinnungsprozesse aCL-Typ B: ohne Gerinnungsaktivität
Anti-β2-GP1-Antikörper	reagieren mit β2-GP1 (löslich) und hemmen phospholipidabhängige Gerinnungsprozesse
Anti-Protein S-Antikörper	reagieren mit Protein S und aktiviertem Protein C nach
Anti-Protein C-Antikörper	Bindung an negativ geladene Phospholipide
„wahre“ aPL	reagieren mit negativ geladenen Phospholipiden und hemmen phospholipidabhängige Gerinnungsprozesse ohne Cofaktor
andere aPL ?	?

#### 1.4.4 Pathogenese

Im Gegensatz zu den meisten Autoantikörpern bei systemischen Autoimmunerkrankungen scheint den Antiphospholipid-Autoantikörpern eine pathogenetische Bedeutung zuzukommen. Isoliert man z.B. Antiphospholipid-Antikörper aus Patienten und injiziert sie in Tiere, so verursachen sie dort ein Antiphospholipid-Syndrom (83).

Der Lupus Antikoagulans-Effekt wird vermutlich durch aPL verursacht, die gegen immobilisiertes oder phospholipidgebundenes Prothrombin gerichtet sind. Dieses



Phänomen könnte analog dem der Antikörper gegen  $\beta 2$ -GP1 sein, wobei die Antikörper an ein kryptisches Epitop binden, welches durch die Bindung von Prothrombin an Phospholipide enthüllt wird. Einige Patienten zeigen eine Hypoprothrombinämie und stärken damit die Hypothese, daß aPL Prothrombin in vivo binden. Es konnte gezeigt werden, daß einige Antikörper hemmende Effekte auf physiologische gerinnungshemmende Abläufe haben, wie die Protein C und S-Bahn. Andere haben prothrombotische Effekte auf Endothelzell-Oberflächenproteine wie Heparansulfate und Tissue Faktor, sowie die Produktion von Thromboxan. Einige erhöhen die Reaktivität von Thrombozyten (83).

Der exakte Mechanismus, durch welchen aPL und ihre Wirkung auf  $\beta 2$ -GP1 Thrombosen verursachen, bleibt unklar.

$\beta 2$ -GP1-abhängige Anticardiolipin-Antikörper können die Funktion des  $\beta 2$ -GP1 in vivo beeinflussen.  $\beta 2$ -GP1 hemmt das intrinsische System der Gerinnung, die ADP-vermittelte Thrombozytenaggregation und die Prothrombinase-Aktivität von aktivierten Thrombozyten. Es könnte somit eine wichtige Funktion des  $\beta 2$ -GP1 in vivo sein, die Hyperkoagulation zu vermindern, um einen Komplex mit anionischen Phospholipiden wie dem Cardiolipin zu bilden, das auf Plasmamembranen von verletzten oder aktivierten Endothelzellen präsentiert wird. Dadurch könnte das Vorhandensein von  $\beta 2$ -GP1-abhängigen aCL mit Thrombosen assoziiert sein (33).

$\beta 2$ -GP1 bindet an negativ geladene Oberflächen und verhindert die Kontaktphase der Gerinnungsaktivierung im Plasma, sowie die Aktivität des Prothrombinasekomplexes möglicherweise durch das Verdrängen von Gerinnungsfaktoren von den Phospholipidoberflächen. Anti- $\beta 2$ -GP1-Antikörper können das Anhäufen von  $\beta 2$ -GP1-Molekülen auf der Oberfläche von Phospholipiden beschleunigen und erhöhen dadurch die gerinnungshemmende Aktivität des  $\beta 2$ -GP1. Das Paradoxe der in vitro gerinnungshemmenden Aktivität der  $\beta 2$ -GP1-Antikörper und ihre Relation mit zunehmenden thromboembolischen Ereignissen in vivo ist unklar (77).

## 1.5 Antikörper-Nachweis

Der Nachweis von aPL als Antikörper gegen negativ geladene Phospholipide erfolgt immunologisch im ELISA. Der Nachweis der verschiedenen Immunglobulin-Subtypen IgG, IgM und IgA erscheint nicht unwichtig, wenngleich die größte klinische Bedeutung dem aPL-IgG zukommt (25). Als Zielantigen wird neben Cardiolipin zunehmend  $\beta$ 2-Glykoprotein1 verwendet. Dabei dient  $\beta$ 2-GP1 auch zur Unterscheidung zwischen „autoimmunen“ aCL und „wahren“ aCL, da letztere  $\beta$ 2-GP1 nicht zur Bindung an Cardiolipin benötigen. Der Gebrauch dieser neuen  $\beta$ 2-GP1 Immunoassays könnte aufgrund seiner verbesserten Spezifität die konventionellen aCL Immunoassays verdrängen, da er jedoch sehr kostenintensiv ist, wird er sie nicht ersetzen (37).

Der Nachweis der aPL als LA erfolgt mit Hilfe von Gerinnungstests. Als Screeningtest zum Nachweis des LA hat sich die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (PTT) durchgesetzt. Alternativ können „Kaolin Clotting Time“ (KCT) und „diluted Russell Viper Venom Time“ (dRVVT) angewendet werden. Die Untersuchung mit zwei Screeningtests ist in fraglichen Fällen sinnvoll. Die verlängerten Gerinnungszeiten bei Vorliegen des LA werden im Plasmatauschversuch durch Zusatz von Normalplasma nicht normalisiert. Der Plättchen-Neutralisationstest kann als Bestätigungstest eingesetzt werden (11,25).

Bei der Suche nach aPL sollten sowohl Gerinnungsteste als auch ELISA-Methoden zum Nachweis von aPL-IgG-, aPL-IgM- und wahrscheinlich auch aPL-IgA-Antikörpern durchgeführt werden, da LA und aPL sowohl einzeln als auch kombiniert vorkommen können (25).

Der Nachweis von Antikörpern gegen Thromboplastin, einer Antigenmischung der einzelnen Subgruppen der Antiphospholipidantikörper, erfolgt meist über einen Standard-Elisa. Der ELISA kann unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt werden. So variieren die Serumverdünnungskonzentrationen ebenso wie die Antigen- und Antikörperkonzentrationen. Eine entscheidende Rolle spielt im Hinblick auf das Vorhandensein des Serum-Cofaktors die Auswahl des Verdünnungspuffers. Hier

unterscheidet man vor allem zwischen BSA und FCS, wobei letzteres reich an Serum-Cofaktor ist. Bei diesem Serum-Cofaktor handelt es sich um  $\beta$ 2-Glykoprotein1, welches bei einem Standard-Elisa zum Nachweis von Cardiolipin-Antikörpern zur Unterscheidung von autoimmunen und natürlich vorkommenden aCL-AK dient. Lediglich autoimmune aCL-AK benötigen zur direkten Bindung an Cardiolipin diesen Serum-Cofaktor (9,37).

Einen allgemeinen Konsens hinsichtlich der geeigneten Methode zum Nachweis der verschiedenen Antiphospholipid-Antikörper gibt es jedoch in der Literatur nicht. Auch die kommerziell erhältlichen Testkits zum Nachweis von Antikörpern gegen Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glykoprotein1 variieren stark hinsichtlich ihrer Aussagekraft.

## 1.6 Therapie

Die optimale Therapie der Patienten mit APS ist nicht unumstritten, da größere Therapiestudien fehlen (25). Prinzipiell gilt jedoch, daß die Antikoagulation Therapie der Wahl ist, während Immunsuppressiva meist ineffektiv und daher nicht indiziert sind (es sei denn, das APS ist mit einer anderen Erkrankung, z.B. einer Kollagenose, assoziiert).

Bei Patienten mit aPL, aber ohne ein thrombotisches Ereignis, ist es wichtig, Risikofaktoren für eine Thrombose (z.B. Rauchen, Hormonpräparate) zu reduzieren oder zu entfernen. Eine regelmäßige Überwachung und niedrig dosiertes Aspirin (75-100mg/Tag) dienen der Thrombose-Prophylaxe, welche besonders zu Zeiten von haemostatischem Stress, wie sie chirurgische Eingriffe und Schwangerschaft darstellen, erfolgen sollte (83).

In den letzten Jahren konnte festgestellt werden, daß bei Patienten mit APS und früheren Thrombosen ein ernsthaftes Risiko für wiederholte Thrombosen besteht. In der größten retrospektiven Studie dazu, wurde bei 147 Patienten mit mindestens einer Thrombose eine Rate von 69% für wiederkehrende Thrombosen gefunden (39).

Patienten mit akuten Gefäßverschlüssen können bei Fehlen von Kontraindikationen einer Fibrinolyse zugeführt werden. Eine suffiziente Dauerantikoagulation mit Cumarin-derivaten ist jedoch nach der ersten stattgehabten Phlebothrombose erforderlich. Rethrombosen entstehen oft innerhalb des ersten Jahres nach Absetzen der Antikoagulation (25).

Hochdosiertes Warfarin (Cumarin-Derivat; INR >3) zeigte sich als effektivste Prophylaxe gegen zukünftige Thrombosen und entspricht den momentanen Therapieempfehlungen. Einige Patienten mit einem hohen Thromboserisiko erhalten ferner Azetylsalicylsäure, obwohl unklar ist, ob es das Thromboserisiko weiter senkt ohne das Risiko einer Blutung in unakzeptabel hohe Bereiche ansteigen zu lassen (31,39,46,68,83).

Vor allem bei Patienten, bei denen die kleinen Gefäße betroffen sind (z.B. okuläres Antiphospholipidsyndrom) scheint Azetylsalicylsäure (100mg/die) sinnvoll zu sein (44).

Die Behandlung des APS während der Schwangerschaft muß sehr individuell erfolgen. Das Senken des Risikos für Fehlgeburten ist Thema vieler Diskussionen. Eine Behandlungsmöglichkeit ist die tägliche Gabe von 75-100 mg Aspirin während der gesamten Schwangerschaft. Mit intensiver Monitor-Überwachung des Fetus und der Geburt konnte so die Säuglingsüberlebensrate von 19% auf 70% gesteigert werden (83).

Auch die Gabe von Immunglobulinen scheint einen positiven Effekt zu haben (25,50,51).

Eine Schwangerschaft erhöht das Thromboserisiko, aber Warfarin birgt die Gefahr von fetalen Mißbildungen. Deshalb werden Frauen mit früheren Thrombosen von Warfarin auf niedermolekulares Heparin umgestellt (83).

Von besonderer Bedeutung ist das gleichzeitige Auftreten von Thrombozytopenie und Thrombose, da bei eventuell simultaner Therapie mit Azathioprin (für die Thrombozytopenie) und Warfarin Interaktionen zu beachten sind. Beim Absetzen von Azathioprin verstärkt sich der antikoagulatorische Effekt von Warfarin und es kann zur Blutung kommen.

Beim „katastrophalen APS“ sind Fibrinolyse und Plasmapherese versucht worden (25).

### 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Bestimmung von Antiphospholipid-Antikörpern wird im Immunpathologischen Labor der Medizinischen Klinik unter Verwendung eines Phospholipid/Protein-Gemisches (Thromboplastin) bereits seit mehreren Jahren durchgeführt. Dabei zeigte sich - in Übereinstimmung mit analogen Berichten in der Literatur - daß aPL bei einer Reihe von unklaren Prozessen nachweisbar sind, bei denen die kleinsten Gefäße betroffen sind (z.B. Amaurosis fugax, Raynaud-Syndrom, Tinnitus etc.).

Interessant war auch die Beobachtung, daß aPL bei unklaren chronischen Lebererkrankungen nachweisbar waren, bei denen virale und klassische autoimmune Prozesse ausgeschlossen werden konnten. Histologisch fand sich bei diesen Patienten häufig eine noduläre regenerative Hyperplasie (NRH) der Leber, als deren Ursache in der Literatur immer wieder eine Vaskulitis diskutiert wurde (5,71).

Die vorgelegte Arbeit hat daher drei Schwerpunkte:

1. Die Etablierung von Methoden zum Nachweis von Antiphospholipid-Antikörpern und ihrer Subspezifitäten sowie der Vergleich dieser Methoden hinsichtlich ihrer Sensitivität, Spezifität und klinischen Relevanz anhand definierter Patientenkollektive.
2. Die Analyse a) der Spezifität von Antiphospholipid-Antikörpern für unklare vaskuläre Prozesse und b) der Untergruppen von aPL und ihrer Immunglobulinklassen bei diesen Erkrankungen.
3. Die Analyse der Bedeutung von Antiphospholipid-Antikörpern und ihrer Subspezifitäten bei chronischen Lebererkrankungen unter besonderer Berücksichtigung der NRH.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektive**

In dieser Studie wurden 15 Kollektive mit jeweils 24 bis 200 Patienten auf Antiphospholipid-Antikörper getestet. Die Seren wurden aus der Universitätsklinik Tübingen, aber auch aus vielen anderen deutschen Kliniken, in das Immunpathologische Labor Prof. Berg / Prof. Dr. R. Klein der Universitätsklinik Tübingen gesendet.

Es wurden Seren von 41 Patienten mit Lupus erythematodes getestet, 11 Männer und 30 Frauen (Alter 13-77 Jahre, mittleres Alter 42 Jahre ). Diese Patienten wurden ausgewählt anhand der entsprechenden Klinik, wie z.B. Schmetterlingserythem, Hautläsionen, Photosensibilität und Arthritis, sowie aufgrund immunologisch nachweisbarer Antikörper gegen Doppelstrang-DNA und Kerne.

Morbus Sharp hatten 38 Patienten, 10 Männer und 28 Frauen (Alter 11-88 Jahre, mittleres Alter 46 Jh.). Die Auswahl erfolgte anhand klinischer Merkmale, wie Raynaud-Symptomatik, Hautveränderungen, Arthritis etc., und immunologisch durch Nachweis von Antikörpern gegen nRNP (anti-Ribonukleinprotein).

102 Patienten litten unter einer Sklerodermie. Zwanzig Patienten hatten Antikörper gegen Scl-70 (2 Männer und 18 Frauen, Bereich 17-80 Jahre, mittleres Alter 54 Jh.), 41 Patienten hatten Antikörper gegen Nukleoli ( 7 Männer und 34 Frauen, Alter 15-95 Jahre, mittleres Alter 49 Jh.) und 41 Patienten hatten Antikörper gegen Zentromere ( 5 Männer und 36 Frauen, Bereich 16-79 Jahre, mittleres Alter 55 Jh.).

Ferner wurden Seren von 42 Patienten mit Morbus Sjögren analysiert, 4 Männer und 38 Frauen (Bereich 14-79 Jahre, mittleres Alter 54 Jh.). Die Auswahl erfolgte anhand erhöhter IgG-Spiegel und dem Nachweis von präzipitierenden Antikörpern gegen La, einem 48-kD-Phosphoprotein verbunden mit einem RNA-Polymerase-3-Transkript, bzw. gegen La und Ro, einem Antigen verbunden mit fünf verschiedenen zytoplasmatischen Ribonukleinsäuren.

Aus dem Gebiet der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde wurden 122 Patientenserum getestet, die aus der HNO-Klinik Tübingen stammten, 65 Männer und 57 Frauen (Bereich 2-80

Jh., mittleres Alter 46 Jh.), davon 41 mit Tinnitus, 40 mit Hörsturz und 41 mit Innenohrschwerhörigkeit. Die Auswahl erfolgte anhand der dem jeweiligen HNO-ärztlichen Krankheitsbild entsprechenden klinischen Beschwerden.

Weiterhin wurden 41 Seren von Patienten aus der Augenklinik Tübingen mit Uveitis auf aPL untersucht, davon 16 Männer und 25 Frauen (Bereich 13-79 Jahre, mittleres Alter 40 Jh.).

Da bei der Entstehung einer Epilepsie die Antiphospholipid-Antikörper eventuell eine Rolle spielen, wurden 41 Seren von Epilepsie-Patienten aus der neurologischen Klinik Tübingen getestet. Das Kollektiv setzte sich aus 18 Männern und 22 Frauen zusammen (Alter 19-71 Jahre, mittleres Alter 40 Jh.).

Ferner wurden 41 Patientenserum mit habituellen Aborten untersucht. Das Kollektiv bestand aus Frauen mit mindestens zwei Aborte (Alter 26-43 Jahre, mittleres Alter 34 Jh.).

Ein weiteres wichtiges Kollektiv sind Patienten mit einem primären Antiphospholipid-Syndrom (PAPS). Unter 63 getesteten Patientenserum waren 15 Männer und 48 Frauen (Alter 5-99 Jahre, mittleres Alter 43 Jh.). Die Auswahl dieser Patienten erfolgte durch Nachweis der Antiphospholipid-Antikörper und anhand der klinischen Symptomatik, wie thromboembolische Ereignisse, Vaskulitiden, Thrombozytopenien u.a..

Zusätzlich wurden 42 Patientenserum mit Fibromyalgie-Syndrom (FMS) in die Untersuchungen eingeschlossen, 9 Männer und 33 Frauen (Alter 23-69 Jahre, mittleres Alter 45 Jh.). Die Auswahl der Seren erfolgte anhand klinischer und immunologischer Kriterien, wie z. B. positive Antikörper gegen Serotonin, Ganglioside, ZNS und/oder Thromboplastin.

Aus der Universitätsklinik Köln erhielten wir Seren von 100 Müttern (Alter 20-47 Jahre) mit Neugeborenen, die im Vergleich zu ihrem Gestationsalter untergewichtig waren („small for date“-Babies). Durch eine Untersuchung auf Antiphospholipid-Antikörper wollte man der Vermutung nachgehen, dass bei sog. „small for date“-Neugeborenen thromboembolische Ereignisse in der Plazenta eine Rolle spielen. Ebenfalls aus Köln

wurden uns die Seren von 100 Kontrollen geschickt. Dieses Kontrollkollektiv bestand aus Frauen (Alter 22-48 Jahre, mittleres Alter 34 Jh.) mit entsprechend dem Gestationsalter normalgewichtigen Neugeborenen.

Die Universitätskinderklinik Hamburg stellte uns Seren von Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen zur Verfügung, die im Immunpathologischen Labor Prof. Berg auf Antikörper untersucht worden sind. Die Krankheitsbilder setzen sich zusammen aus juveniler rheumatoider Arthritis (JRA), Spondyloarthritis, psoriatische Arthritis, SLE, Polyarteriitis nodosa, systemische Sklerodermie u.a.. Insgesamt wurden 189 Patientenseren auf Antiphospholipid-Antikörper untersucht, davon waren 73 Jungen und 116 Mädchen (Range 1-21 Jahre, mittleres Alter 10 Jh.).

Aus dem Bereich der autoimmunen Lebererkrankungen wurden insgesamt vier Kollektive analysiert: 71 Patientenseren mit serologisch gesicherter primär-biliärer Cirrhose (PBC, 10 Männer und 61 Frauen, Alter 43-82 Jahre, mittleres Alter 57 Jh.), 40 Patientenseren mit autoimmunen Hepatitiden (AIH, 8 Männer und 32 Frauen, Alter 8-82 Jahre, mittleres Alter 49 Jh.), 27 Patientenseren mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC, 17 Männer und 10 Frauen, Alter 15-78 Jahre, mittleres Alter 44 Jh.), sowie 24 Patientenseren mit nodulärer regenerativer Hyperplasie (NRH; histologisch gesichert durch Prof. Bianchi, Freiburg; 8 Männer und 16 Frauen, Alter 27-77 Jahre, mittleres Alter 52 Jh.). Die Diagnose der autoimmunen Lebererkrankungen stützte sich auf den Nachweis spezifischer Autoantikörper und entsprechende histologische Veränderungen. Seren sowie klinische und laborchemische Befunde wurden uns freundlicherweise von Kollegen aus verschiedenen Kliniken in Deutschland zur Verfügung gestellt.

Einen zusammenfassenden Überblick über die genannten untersuchten Kollektive bietet Tabelle 6.



Tabelle 6: Übersicht Kollektive

<b>Patienten mit</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Männer</b>	<b>Frauen</b>
Lupus erythematodes	41	11	30
Morbus Sharp	38	10	28
Sklerodermie	102	14	88
Morbus Sjögren	42	4	38
Tinnitus, Hörsturz, Innenohrschwerhörigkeit	122	65	57
Uveitis	41	16	25
Epilepsie	41	18	22
PBC	71	10	61
AIH	40	8	32
PSC	27	17	10
NRH	24	8	16
habituellen Aborten	41	0	41
APS	63	15	48
FMS	42	9	33
Mütter mit "small for date" Neugeborenen	200	0	200
Kinder mit versch. rheumatische Erkr.	189	73	116

## 2.2 Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 40 gesunden Blutspendern (Alter 19-63 Jahre). 24 der Blutspender waren Frauen (60%) und 16 Männer (40%).

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Allgemeine Vorbemerkungen

Im Immunpathologischen Labor Prof. Berg / Prof. Dr. R. Klein wurden die eingesendeten Patientenserum in Portionen (von 5 ml) aufgeteilt und erhielten eine laborinterne Identifikationsnummer. Nach Durchlaufen der Wochenroutine des Labors wurden die Seren bei -20°C eingefroren. Vor Beginn eines Tests wurden die entsprechenden Seren bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank bei -4°C aufgetaut und anschließend unter identischen Versuchsbedingungen getestet, wobei grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Bei allen Kollektiven wurden IgG-, IgM- und IgA-Antikörper bestimmt gegen:

- Thromboplastin 1 (Firma Sigma)
- Thromboplastin 2 (Firma Baxter)
- Cardiolipin (Firma Sigma)
- $\beta$ 2-Glykoprotein 1 (Firma Calbiochem)
- Phosphatidylserin (Firma Sigma)

Bevor die Patientenkollektive untersucht werden konnten, wurden die Antikörper- und Antigenkonzentrationen in mehreren Verdünnungsreihen bestimmt. Für vier aus der Wochenroutine bekannte Patientenserum (ein negatives, ein schwach positives und zwei positive Seren) erfolgte die Serumverdünnung in jeweils acht Verdünnungsschritten 1:25, 1:50, 1:100...usw. Für Thromboplastin1,  $\beta$ 2-Glykoprotein1 und Phosphatidylserin als Antigen wurden sowohl Polysorp- als auch Maxisorp-Mikrotiterplatten getestet. Alle weiteren Antigene wurden anschließend unter gleichen Bedingungen auf Polysorp-Mikrotiterplatten getestet. Als Verdünnungspuffer wurden in der ersten Testreihe mit Thromboplastin1 im Vergleich PBS und Bicarbonatpuffer (BICA) eingesetzt, die weiteren Verdünnungsreihen erfolgten mit PBS-Verdünnungspuffer.

Die so erzielten Ergebnisse wurden nochmals anhand von acht bekannten APS-Patienten überprüft, indem alle fünf Antigene mit PBS-Verdünnungspuffer auf Maxi- und Polysorp-Mikrotiterplatten getestet wurden.

Hierbei konnten die Serumverdünnungen 1:800 für IgG und IgM, sowie 1:400 für IgA mit PBS-Verdünnungspuffer auf Polysorp-Mikrotiterplatten als optimalste Untersuchungsbedingungen bestätigt werden. Die Wahl der Antigenkonzentration richtete sich nach den Testerfahrungen der Wochenroutine im Immunpatholog. Labor Tübingen. So wurden Thromboplastin1 und 2 mit 50 $\mu$ l/10ml,  $\beta$ 2-Glykoprotein1 mit 0,5 $\mu$ g/10ml, Cardiolipin mit 50 $\mu$ g/10ml und Phosphatidylserin mit 50mg/10ml eingesetzt.

### 2.3.2 Testprinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-kompetitiver Test mit Antigen-beschichteten Platten verwendet, auch indirekter ELISA und Sandwich-ELISA genannt. Beim Vergleich der Nunc-ImmunoPlate-Mikrotiterplatten der Sorte Polysorp und Maxisorp schnitten die Polysorp-Platten aufgrund der geringeren Background-Absorption besser ab.

Die Mikrotiterplatten werden zunächst mit Antigen beschichtet. Nach Abwaschen des Überschusses an freiem Antigen wird die Probe (primärer Antikörper) hinzugefügt. Es bilden sich Immunkomplexe aus dem Proben-Antikörper und dem fixierten Antigen. Durch anschließendes Waschen werden ungebundene Antikörper entfernt. Der gebundene Antikörper wird durch Zugabe eines enzymmarkierten Antikörpers (sekundärer Antikörper), der spezifisch für den gebundenen Antikörper ist, nachgewiesen. Nach Zugabe eines Substrates kann die Antigen-Antikörper-Reaktion über eine Farbreaktion quantifiziert werden.

Die Laufzeit der enzymatischen Reaktion orientierte sich an den Sollwerten der Optischen Dichten von Kontrollseren.

### 2.3.3 Testablauf und Testauswertung

Im Standard-Elisa kann als Serumverdünnungspuffer neben dem allgemein verwendeten BSA auch FCS benutzt werden, in diesem Fall spricht man von einem modifizierten Elisa. FCS ist reichhaltig an  $\beta$ 2-Glykoprotein1, welches autoimmunen aCL als Cofaktor dient. Durch den Zusatz von FCS können neben reinen Cardiolipin-Antikörpern auch AK nachgewiesen werden, die an einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-GP1 binden. Diese Antikörper bezeichnet man als sog. Cofaktor-abhängige Cardiolipin-AK.

#### Testablauf mit BSA

**1. Tag:**           • Antigen-Beschichtung

Thromboplastin 1: 50 $\mu$ l / 10 ml PBS-Puffer

Thromboplastin 2: 50 $\mu$ l / 10 ml PBS-Puffer

Cardiolipin : 20 $\mu$ l / 10 ml PBS-Puffer

$\beta$ 2-Glykoprotein1: 50 $\mu$ l / 10 ml PBS-Puffer

Phosphatidylserin: 5 $\mu$ l / 10 ml PBS-Puffer

Es wurden 3 Platten pro Antigen beschichtet (IgG, IgM und IgA) mit jeweils 100 $\mu$ l pro well. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte über Nacht bei -4°C.

- Verdünnen der Serumproben

Zuerst erfolgte eine 1:50 Verdünnung mit dem Dilutor, welcher 10 $\mu$ l Serum mit 500 $\mu$ l Serumverdünnungspuffer in Eppendorf-Hütchen mischte.

Die Seren für die IgG- und IgM-Antikörperbestimmung wurden im Verhältnis 1:800 mit Serumverdünnungspuffer verdünnt. Dazu wurden 50 $\mu$ l verdünntes Serum aus den Eppendorf-Hütchen in 800 $\mu$ l Serumverdünnungspuffer (1:16) in Deepwell-Platten pipettiert, wodurch die erwünschte Endverdünnung von 1:800 entstand.

Die Seren für die Bestimmung der IgA-Antikörper wurden im Verhältnis 1: 400 verdünnt. Aus den Eppendorf-Hütchen wurden 100 $\mu$ l verdünntes Serum in 800 $\mu$ l Serumverdünnungspuffer (1:8) in Deepwell-Platten pipettiert. Man erhielt die gewünschte Endverdünnung von 1:400.

Ab dem zweiten Verdünnungsschritt erfolgte für die IgG, IgM und IgA-Antikörperbestimmung eine Doppeltestung der Seren.

Die in Deepwell-Platten verdünnten Seren wurden über Nacht im Kühlschrank bei -4°C gelagert.

## **2. Tag:**

- Waschen der Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten und Blockierung freier Bindungsstellen

Überflüssiges Antigen wird durch dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatten mit Waschpuffer 1 entfernt. Nach dem dritten Waschgang lässt man die Platten getränkt in Waschpuffer 1 zur Blockierung freier

Bindungsstellen ca. 15 Minuten stehen und anschließend werden die Platten auf Tork<sup>®</sup>-Tüchern ausgeklopft.

- Inkubation mit Serumproben

Auf die Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten werden 100µl verdünntes Serum pro Vertiefung aufgetragen. Danach inkubieren die Platten 90 Minuten bei Raumtemperatur.

- Waschen und Blockierung freier Bindungsstellen

Ungebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung 2 entfernt. Um freie Bindungsstellen zu blockieren lässt man die Platten 15 Minuten mit Waschlösung 2 bedeckt stehen.

Anschließend werden die Platten auf Tork<sup>®</sup>-Tüchern ausgeklopft.

- Antikörperherstellung

Folgende Antikörperkonzentrationen werden verwendet:

- 3,3µl IgG (Peroxydase-konjugiert) auf 10 ml Waschlösung 2

- 5µl IgM (Peroxydase-konjugiert) auf 10 ml Waschlösung 2

- 3µl IgA (Peroxydase-konjugiert) auf 10 ml Waschlösung 2

- Antikörperbeschichtung

In die Mikrotiterplatten werden 100µl Antikörperlösung pro Vertiefung pipettiert. Bei Raumtemperatur lässt man die Platten 60 Minuten inkubieren.

- Waschen und Blockierung freier Bindungsstellen

Nach der Inkubationszeit werden die Mikrotiterplatten dreimal mit Waschlösung 2 gewaschen und danach 15 Minuten mit Waschlösung 2 gefüllt stehen gelassen, um freie Bindungsstellen zu blockieren.

Anschließend werden die Platten auf Tork<sup>®</sup>-Tüchern ausgeklopft.

- Substratherstellung

Pro Platte werden 15 ml Citratpuffer in einen mit Aluminiumfolie vor Licht geschützten Erlenmeyerkolben gefüllt. Man wiegt 1 mg Substrat (1,2-Benzoldiamin-Dihydrochlorid, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemie GmbH) pro 2 ml Citratpuffer ab und löst dieses im Erlenmeyerkolben auf. Kurz vor Beginn des Pipettierens gibt man als Katalysator 33µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 100

ml Citratpuffer hinzu.

In jede Platte werden 150µl Substrat pro Vertiefung pipettiert.

- Inkubieren und Abstoppen

Nach Zugabe des Substrates werden die Mikrotiterplatten über Nacht im Kühlschrank gelagert und am nächsten Tag wird die Reaktion mit 50µl 25%-iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung pro Vertiefung abgestoppt.

- Messen

Die Optischen Dichten werden bei 450 nm (Referenzfilter 620 nm) über das SLT-Programm mit dem Reader gemessen und gespeichert.

### Testauswertung mit BSA

Für jede Serumprobe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und anschließend wurden die errechneten Wertepaare gemittelt. Von jedem Meßwert wurde der Leerwert subtrahiert. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden zwei Vertiefungen anstatt mit Serumproben lediglich mit Serumverdünnungspuffer inkubiert. Als Standard der optischen Dichte dienten in vorhergehenden Versuchen positiv reagierende Serumproben.

Hatten diese einen über mehrere Versuche gemittelten Wert erreicht, konnte die Substratreaktion abgestoppt werden.

Als Negativkontrolle dienten zwei Serumproben des Kontrollkollektivs. Zuvor wurden nicht mit Antigen beschichtete Platten mit Serumproben und Standards getestet (sowie mit Antigen beschichtete Platten ohne Serumproben und Standards), um die „Background“-Absorption der Platten abzuschätzen.

Zur Bestimmung der Grenzen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Optischen Dichten (OD) des Kontrollkollektivs errechnet. Als schwach positiv (Grenzfälle) für das Vorkommen von Antikörpern wurden Patientenseren mit OD`s ab dem Mittelwert + 2 SD (+) definiert, während Seren mit OD`s über dem Mittelwert + 3 SD als positiv + gewertet wurden. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die ermittelten Grenzwerte für die jeweiligen Antikörperfraktionen und ihre Immunglobulinklassen. Die

Optische Dichte des Grenzwertes (E) wurde durch Subtraktion der Leerwert-OD von der OD der Serumprobe ermittelt.

*Tabelle 7*

Bei  $\Delta E = E_{\text{probe}} - E_{\text{leerwert}}$  wurden die Optischen Dichten wie folgt graduiert:

Antikörper gegen:		$\Delta E$	$\Delta E$
Thromboplastin 1	IgG	> 0,115 (+)	> 0,135 +
	IgM	> 0,140 (+)	> 0,170 +
	IgA	> 0,045 (+)	> 0,055 +
Thromboplastin 2	IgG	> 0,100 (+)	> 0,120 +
	IgM	> 0,190 (+)	> 0,230 +
	IgA	> 0,030 (+)	> 0,040 +
Cardiolipin	IgG	> 0,040 (+)	> 0,050 +
	IgM	> 0,065 (+)	> 0,080 +
	IgA	> 0,015 (+)	> 0,020 +
$\beta$ 2-Glykoprotein 1	IgG	> 0,095 (+)	> 0,115 +
	IgM	> 0,200 (+)	> 0,250 +
	IgA	> 0,035 (+)	> 0,045 +
Phosphatidylserin	IgG	> 0,095 (+)	> 0,115 +
	IgM	> 0,170 (+)	> 0,205 +
	IgA	> 0,010 (+)	> 0,015 +

Testablauf mit FCS

- 1. Tag:**
- Antigen-Beschichtung
- Cardiolipin : 20 $\mu$ l / 10 ml PBS-Puffer

β2-Glykoprotein1: 50µl / 10 ml PBS-Puffer

Es wurden 3 Platten pro Antigen beschichtet (IgG, IgM und IgA) mit jeweils 100µl pro well. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte über Nacht bei -4°C.

- Verdünnen der Serumproben

Zum Verdünnen der Serumproben wurde ein FCS-haltiger Puffer verwendet (Serumverdünnungspuffer<sub>FCS</sub>). Im übrigen erfolgte die Schrittfolge identisch zum BSA-Test.

**2. Tag:**

- Waschen der Antigen-beschichteten Mikrotiterplatten und Blockierung freier Bindungsstellen

Überflüssiges Antigen wird durch dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatten mit 150µl Waschpuffer<sub>FCS</sub> 1 pro Vertiefung entfernt. Nach dem dritten Waschgang lässt man die Platten gefüllt mit PBS-Puffer ca. 30 Minuten stehen (zur Blockierung freier Bindungsstellen) und anschließend werden die Platten auf Tork®-Tüchern ausgeklopft.

- Inkubation mit Serumproben

Ab diesem Schritt erfolgte ein zum BSA-Test identisches Vorgehen.

### Testauswertung mit FCS

Das Vorgehen beim modifizierten Elisa mit FCS entspricht dem Vorgehen beim BSA-Test (siehe oben).

Auch beim Test mit FCS wurde für jede Serumprobe eine Doppelbestimmung durchgeführt und anschließend die errechneten Wertepaare gemittelt. Von jedem Meßwert wurde der Leerwert subtrahiert. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden zwei Vertiefungen statt mit Serumproben lediglich mit Serumverdünnungspuffer<sub>FCS</sub> inkubiert.



Zur Bestimmung der Grenzen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Optischen Dichten (OD) des Kontrollkollektivs<sub>FCS</sub> errechnet. Als schwach positiv (Grenzfälle) für das Vorkommen von Antikörpern wurden Patientenser n mit OD`s ab dem Mittelwert + 2 SD definiert, während Seren mit OD`s über dem Mittelwert + 3 SD als positiv gewertet wurden.

*Tabelle 8*

Bei  $\Delta E = E_{\text{probe}} - E_{\text{leerwert}}$  wurden die Optischen Dichten wie folgt graduiert:

		$\Delta E$	$\Delta E$
Anti-Cardiolipin-AK	IgG	> 0,045 (+)	> 0,055 +
	IgM	> 0,065 (+)	> 0,080 +
	IgA	> 0,025 (+)	> 0,035 +
Anti- $\beta$ 2-Glykoprotein1-AK	IgG	> 0,095 (+)	> 0,115 +
	IgM	> 0,220 (+)	> 0,265 +
	IgA	> 0,035 (+)	> 0,045 +

Als Antikörper"einheiten" wurden die OD mit Tausend multipliziert und als ODx1000 angegeben.

#### 2.3.4 Varelisa Testkits

Dieser industrielle Testkit der Firma Pharmacia & Upjohn dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung von IgG-, IgM- und IgA- $\beta$ 2-Glykoprotein1-Antikörpern und -Cardiolipin-Antikörpern in humanem Serum oder Plasma.

Alle erforderlichen Materialien und Chemikalien sind dem Test beigelegt und stammen somit von der Firma Pharmacia & Upjohn.

### **Assaydurchführung:**

1. Vor dem ersten Reaktionsschritt werden alle Kavitäten einmal mit Waschpuffer gewaschen. Dazu pipettiert man 300µl Waschpuffer in jede Kavität und lässt ihn 1 Minute einwirken. Anschließend wird der Waschpuffer ausgeschüttet und die Platten auf Tork<sup>®</sup>-Tüchern ausgeklopft.
2. Die Serumproben werden im Verhältnis 1:101 mit Probenpuffer verdünnt (5µl Serum + 500µl Probenpuffer)
3. Jeweils 100µl der Standards, der Positivkontrolle, der Negativkontrolle und der verdünnten Proben werden in die entsprechenden Kavitäten pipettiert. Nun lässt man die Platten bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubieren.
4. Nach Entfernen der Reagenzien aus den Kavitäten werden die Platten dreimal gewaschen (analog Punkt 1.).
5. In jede Kavität pipettiert man nun 100µl Konjugat und lässt die Platten erneut 30 Minuten inkubieren.
6. Nach Entfernen der Reagenzien aus den Kavitäten werden die Platten dreimal gewaschen (analog Punkt 1.).
7. Es werden 100µl Substrat in jede Kavität pipettiert. Die Platten müssen 10 Minuten im Dunkeln inkubieren.
8. Abschließend beendet man die Substratreaktion mit 50µl Stopplösung pro Kavität.
9. Nach leichtem Schütteln der Mikrotiterplatte können die Optischen Dichten innerhalb von 30 Minuten mit einem Photometer bei 450 nm bestimmt werden.

### **Interpretation:**

Die Mittelwerte aller Doppelbestimmungen einschließlich des Reagenzienleerwertes werden bestimmt. Der Mittelwert des Reagenzienleerwertes wird von allen anderen Ergebnissen subtrahiert.

Für die Bewertung der Patientenseren werden folgende Normalbereiche vorgeschlagen:

• Anti-β2-Glykoprotein1-AK (IgG/M/A)	negativ	< 10 U/ml
	grenzwertig	10-15 U/ml
	positiv	> 15 U/ml
• Anti-Cardiolipin-AK IgG	negativ	< 12 GPL-U/ml
	grenzwertig	12-18 GPL-U/ml
	positiv	> 18 GPL-U/ml
Anti-Cardiolipin-AK IgM	negativ	< 6 MPL-U/ml
	grenzwertig	6-10 MPL-U/ml
	positiv	> 10 MPL-U/ml
Anti-Cardiolipin-AK IgA	negativ	< 10 APL-U/ml
	grenzwertig	10-15 APL-U/ml
	positiv	> 15 APL-U/ml

### 2.3.5 Hiss-Testkits (Quanta-Lite™)

Ein weiterer kommerzieller Testkit zur quantitativen Bestimmung von IgG-, IgM- und IgA-Cardiolipin- und β2-Glykoprotein1-Antikörpern ist dieser Enzym-Immunoassay der Firma Hiss Diagnostics GmbH.

Alle erforderlichen Materialien und Chemikalien sind dem Test beigelegt und stammen somit von der Firma Hiss Diagnostics GmbH.

#### **Testvorbereitung:**

1. Unter Verwendung des negativen Kontrollserums wird mit dem Kalibrator als Stocklösung eine Serie von fünf Doppelverdünnungen (1:2, 1:4, etc.) hergestellt, um dann eine 6-Punkte Standardkurve zu erstellen.
2. Die Patientenserum werden mit dem Probenverdünner im Verhältnis 1:101 verdünnt (5µl Serum + 500µl Probenverdünner)

**Testdurchführung:**

1. Es werden je 100µl der sechs vorbereiteten Standards, Kontrollen, der verdünnten Patientenproben und des Reagenzienleerwertes (Probenverdünner) in die entsprechenden Kavitäten pipettiert.
2. Bei Raumtemperatur inkubieren die abgedeckten Platten 30 Minuten.
3. Nach Ausschütten der Platten werden sie dreimal mit PBS-Waschpuffer gefüllt und anschließend auf Tork<sup>®</sup>-Tüchern ausgeklopft.
4. In jede Kavität werden 100µl des HRP Konjugates pipettiert.
5. Es folgen 30 Minuten Inkubation, wie in 2. beschrieben.
6. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit PBS-Waschpuffer werden sie anschließend wieder ausgeklopft.
7. Die Platten werden mit 100µl TMB-Chromogen pro well gefüllt und inkubieren im Dunkeln weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Die Reaktion wird mit 100µl Stopplösung pro well beendet.
9. Innerhalb einer Stunde werden die Optischen Dichten bei 450 nm gemessen (Referenzfilter 620 nm).

**Interpretation:**

Die Mittelwerte aller Doppelbestimmungen einschließlich des Reagenzienleerwertes werden bestimmt. Der Mittelwert des Reagenzienleerwertes wird von allen anderen Ergebnissen subtrahiert.

Folgende Bewertung wird vom Testhersteller empfohlen:

Anti-β2-Glykoprotein1-AK (IgG/M/A)	negativ	< 20 U/ml
	positiv	> 20 U/ml
Anti-Cardiolipin-AK IgG	schwach positiv	10-20 GPL-U/ml
	moderat positiv	20-80 GPL-U/ml
	hoch positiv	> 80 GPL-U/ml

Anti-Cardiolipin-AK IgM	schwach positiv	10-20 MPL-U/ml
	moderat positiv	20-80 MPL-U/ml
	hoch positiv	> 80 MPL-U/ml
Anti-Cardiolipin-AK IgA	negativ	< 12 APL-U/ml
	grenzwertig	12-15 APL-U/ml
	positiv	> 15 APL-U/ml

## 2.4 Material

### 2.4.1 Antigene und Antikörper

<b>Thromboplastin</b> (1) with Calcium	Sigma Diagnostics, St. Louis USA
<b>Innovin™</b> (Thromboplastin 2), Dade®	Baxter Diagnostics Inc., Deerfield USA
<b>Cardiolipin</b> (Diphosphatidylglyzerol), 25 mg	Sigma (from bovine heart), St. Louis USA
<b>β2-Glykoprotein 1</b> , human plasma, 100µg	Calbiochem®-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA
<b>L-α-Phosphatidyl-L-Serine</b> , 100 mg	Sigma (from bovine brain), St. Louis USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Human <b>IgG</b> (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove USA (Vertreiber: dianova, Hamburg)
<b>IgM</b> , Fc5u Fragment, specific	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove USA (Vertreiber: dianova, Hamburg)
<b>IgA</b> , alpha chain specific	Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove USA (Vertreiber: dianova, Hamburg)

<b>Varelisa Enzyme Immunoassay</b> , $\beta$ 2-Glycoprotein1 (IgG/M/A) Antibodies, Cardiolipin (IgG/M/A) Antibodies	Pharmacia & Upjohn Diagnostics GmbH & Co. KG, Freiburg, Dtl.
<b>Quanta Lite™</b> IgG/M/A (HRP), Anticardiolipin Antikörper, $\beta$ 2-Glycoprotein1-AK	Hiss Diagnostics GmbH, Freiburg Deutschland

#### 2.4.2 Chemikalien

**Albumin (BSA)**, Fraktion V, from bovine serum, Boehringer Mannheim GmbH

**Fetal Calf Serum (FCS)**, Seromed<sup>®</sup>, Biochrom KG, Berlin

**1,2-Benzoldiamin-Dihydrochlorid** (o-Phenylenediamine Dihydrochloride),  $C_6H_8N_2 \times 2HCl$ , 25g, Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Chemie GmbH, Deisenhofen

**Citronensäure-Monohydrat**,  $C_6H_8O_7 \times H_2O$ , Merck, Darmstadt

**Dinatriumphosphat**,  $Na_2HPO_4$ , Merck, Darmstadt

**Kaliumdihydrogenphosphat**,  $KH_2PO_4$ , Merck, Darmstadt

**Natriumcarbonat**,  $Na_2CO_3$ , Merck, Darmstadt

**Natriumchlorid**,  $NaCl$ , Merck, Darmstadt

**Natriumhydrogencarbonat**,  $NaHCO_3$ , Merck, Darmstadt

**PBS-Puffer**, eigene Herstellung [(6,81g  $KH_2PO_4$  + 43,83g  $NaCl$  + 44,49g  $Na_2HPO_4$ ) + 5000 ml  $H_2O$ ], 60mM, pH 7,4

**Perhydrol<sup>®</sup>**, 30%  $H_2O_2$  z.A., ISO, Merck, Darmstadt

**Schwefelsäure**,  $H_2SO_4$  25%, Merck, Darmstadt

**Serumverdünnungspuffer**, eigene Herstellung (2000 ml PBS-Puffer + 1,5 ml Triton + 1,5 Spatel BSA)

**Serumverdünnungspuffer<sub>FCS</sub>**, eigene Herstellung (Mischung aus PBS-Puffer und FCS im Verhältnis 10:1, meist 126 ml PBS + 14 ml FCS)

**tri-Natrium-Citrat-Dihydrat**,  $C_6H_5Na_3O_7 \times 2H_2O$ , Merck, Darmstadt

**Triton<sup>®</sup>**, X-100, 500g, Serva, Boehringer Ingelheim, Bioproducts Partnership Heidelberg

**Bicarbonatpuffer**, [(33,9g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 1600 ml H<sub>2</sub>O) + (57,12g NaHCO<sub>3</sub> + 3400 ml H<sub>2</sub>O)], 0,2M, pH 9,6

**Citratpuffer**, [(82,36g Na<sub>3</sub>Citrat + 2800 ml H<sub>2</sub>O) + ( 25,2g Zitronen-säure-1-hydrat + 1200 ml H<sub>2</sub>O)], 0,1M, pH 5,0

**Puffer:**

**Waschpuffer 1**, eigene Herstellung (5000 ml PBS-Puffer + 25 mg BSA)

**Waschpuffer 2**, eigene Herstellung (5000 ml PBS-Puffer + 25 mg BSA + 10 ml Triton)

**Waschpuffer<sub>FCS</sub> 1**, eigene Herstellung (Mischung aus PBS-Puffer und FCS im Verhältnis 10:1, meist 252 ml PBS + 28 ml FCS)

**2.4.3 Geräte**

**Feinwaage**, Mettler H20T, Mettler-Waagen GmbH, Gießen

**Glaskolben**, Schott, Duran

**Magnetrührer**, Ikamag<sup>®</sup> RCT, IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH&CoKG, Staufen im Breisgau

**Mikrotiterplatten**, Nunc-Immuno Plate, F 96 Polysorp, Nunc, Denmark

**Photometer** „Rainbow“, SLT, Labinstruments GmbH, Salzburg, Österreich mit **Computerprogramm SLT**, Easybase

**Pipetten Biohit**, Proline Electronic, 1200µl 8-Kanal und 250µl 12-Kanal

**Pipetten Eppendorf**, gelb 10µl-100µl (Nr. 191623), blau 50µl-250µl (Nr. 178307), blau 200µl-1000µl (Nr. 300838)

**Pipettenspitzen Biohit**, Proline<sup>®</sup> Tip, 300µl und 1200µl, Helsinki, Finnland

**Vortex-Genie**, WINN B.V., Leck, Holland

**Schüttler**, IKA<sup>®</sup>-Schüttler MTS 4, IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen im Breisgau

**Dilutor**, Microlab<sup>®</sup> 500 series, Hamilton, Reno, Nevada

**Waage** Typ BABA 200, Sartorius AG Göttingen (MC1- Laboratory LC 820)

## 2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte im Institut für medizinische Datenverarbeitung der Universität Tübingen mit dem JMP-Programm am SAS-Computer. Das  $\alpha$ -Signifikanzniveau wurde generell auf 0,05 festgelegt. Die Signifikanz der einzelnen Paare wurde unter Berücksichtigung der multiplen Teste des Tukey-Kramer-HSD ermittelt.



### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1. Methodik**

##### **3.1.1 Vergleich der Mikrotiterplatten und Puffersysteme**

Im Immunpathologischen Labor der Medizinischen Klinik Tübingen werden in der Routinetestung der Seren ausschließlich Maxisorp-Mikrotiterplatten der Sorte Nunc-Immuno Plate verwendet. Für den ELISA bietet die Firma Nunc zusätzlich Polysorp-Mikrotiterplatten an, die besonders geeignet sind zum Nachweis von AK gegen Lipide und Lipoproteine. Die erste Aufgabe bestand darin, den Unterschied dieser beiden Plattenarten zu testen.

Gleichzeitig sollte getestet werden, welches Puffersystem als Antigen- bzw. Beschichtungspuffer die optimale Grundlage für den ELISA liefert. Hierzu standen PBS-Puffer (60 mM, pH 7,4) und Bicarbonatpuffer (BICA; 0,2M, pH 9,6) zur Auswahl.

In jeweils acht Verdünnungsschritten wurden vier Seren auf Antikörper gegen Thromboplastin getestet, ein negatives Serum (1), ein schwach positives (2) und zwei positive Seren (3,4).

Das Antigen Thromboplastin wurde mit 50µl auf 10ml Puffer eingesetzt. Die Serumverdünnung erfolgte in den Schritten 1:25, 1:50, 1:100 usw..

Für jede Plattensorte erfolgte eine Bestimmung für Antigen mit Puffer PBS und BICA, sowie eine Bestimmung nur mit Puffer ohne Antigen. Für jede Platte wurde aus den Ergebnissen mit und ohne Antigen die Differenz gebildet, wodurch zusätzlich die Reaktion des Antigens mit der Platte beurteilt werden konnte.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 1 zusammengefasst.

## Abbildung 1

Zeichenerklärung:

APA : Thromboplastin 1, Antigen

BICA : Bicarbonatpuffer, Verdünnungspuffer

PBS : PBS-Puffer, Verdünnungspuffer

DIFF : Differenz zwischen den Ergebnissen Plattenbeschichtung mit Antigen/Puffer und nur Puffer (Antigen/Puffer- Puffer)

1 : Maxisorp-Mikrotiterplatten, Nunc

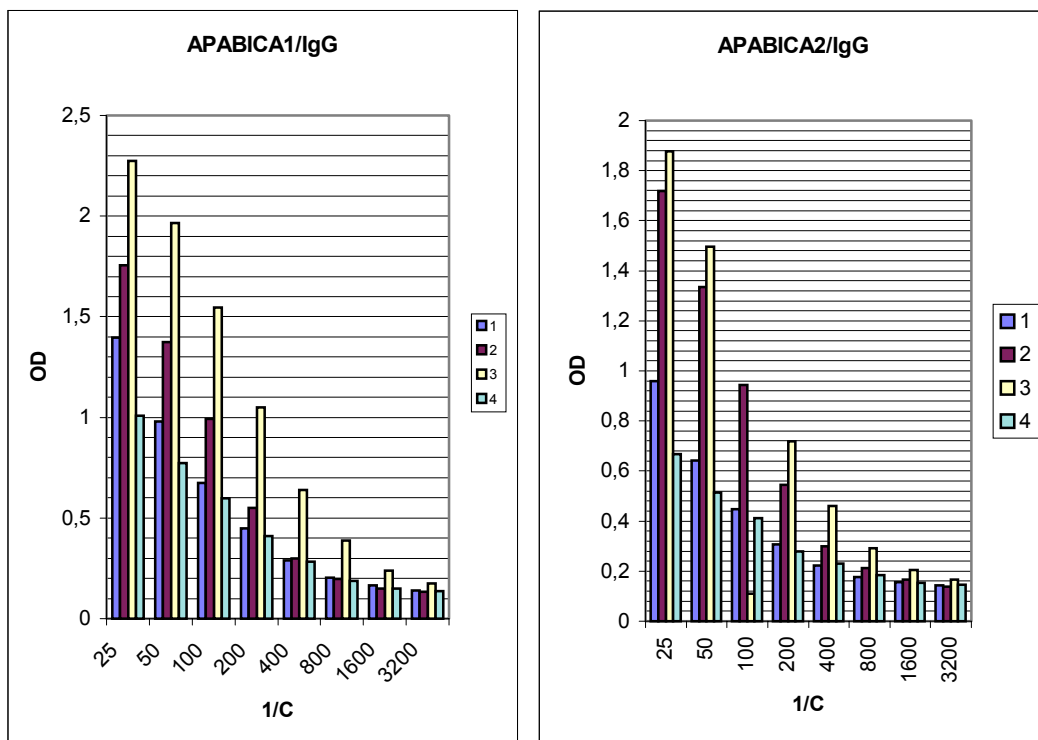
2 : Polysorp-Mikrotiterplatten, Nunc

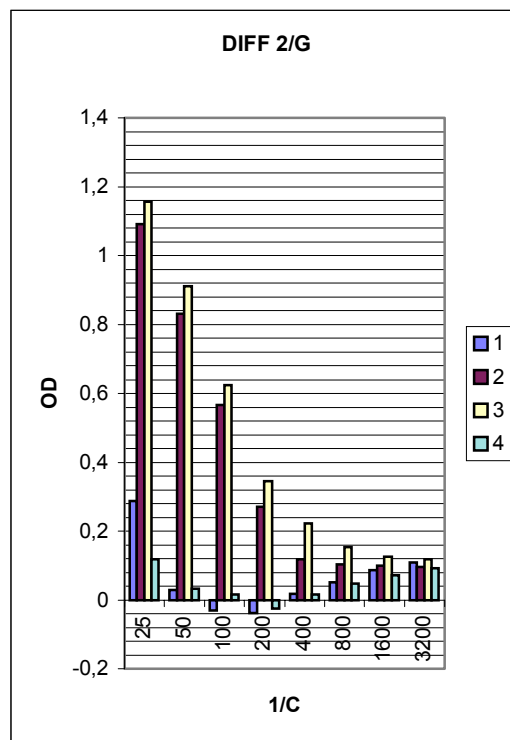
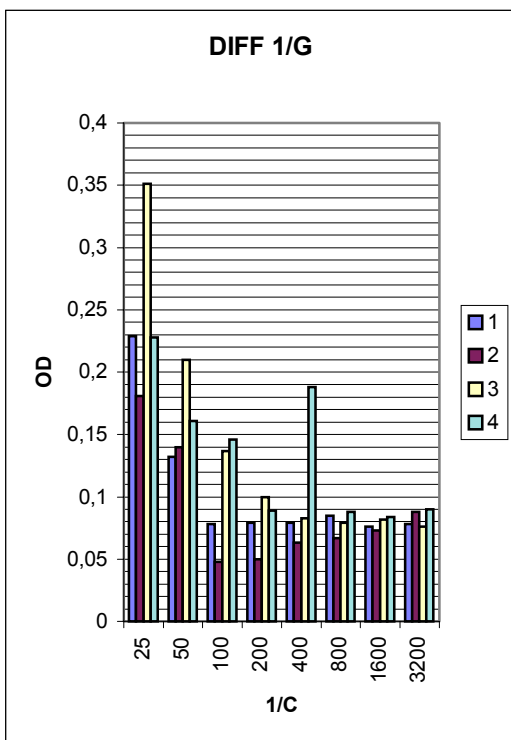
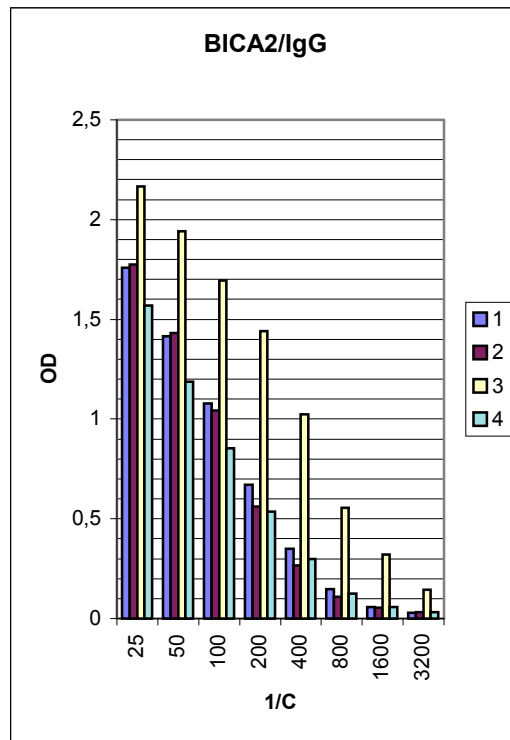
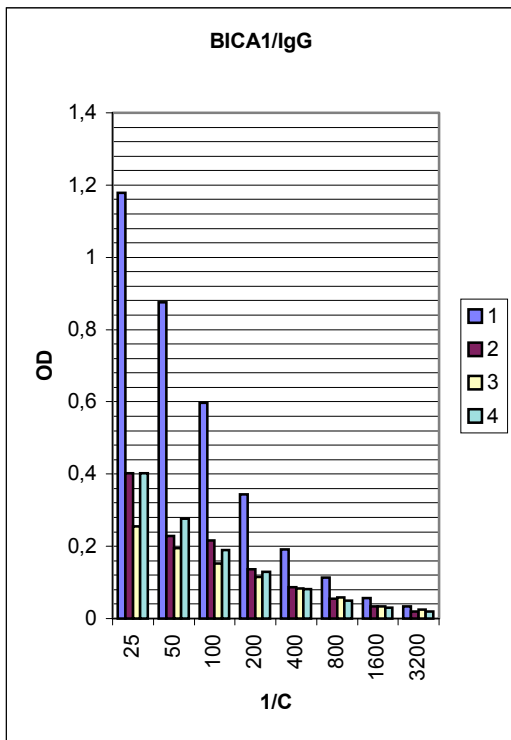
1/c: Serumverdünnung

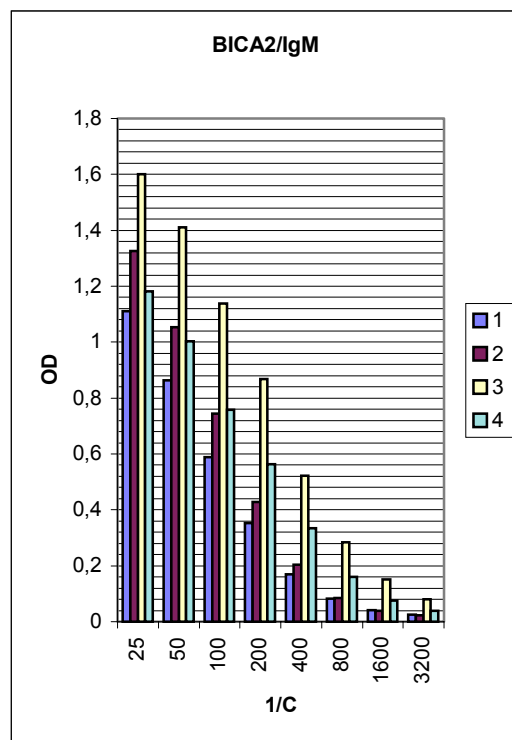
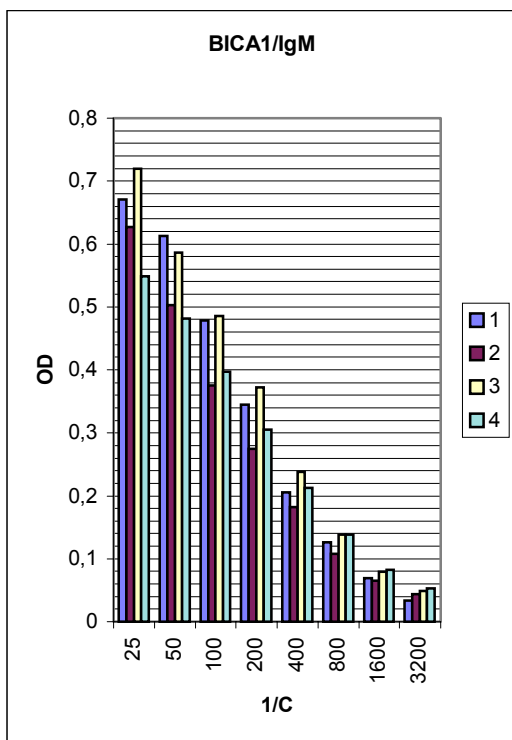
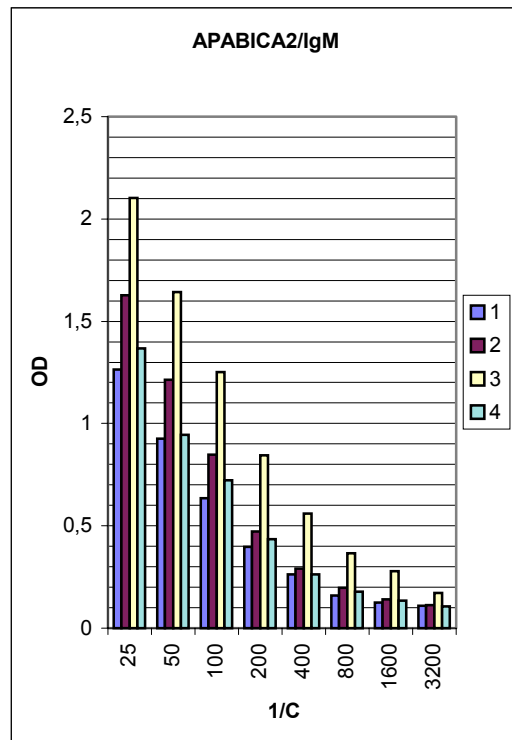
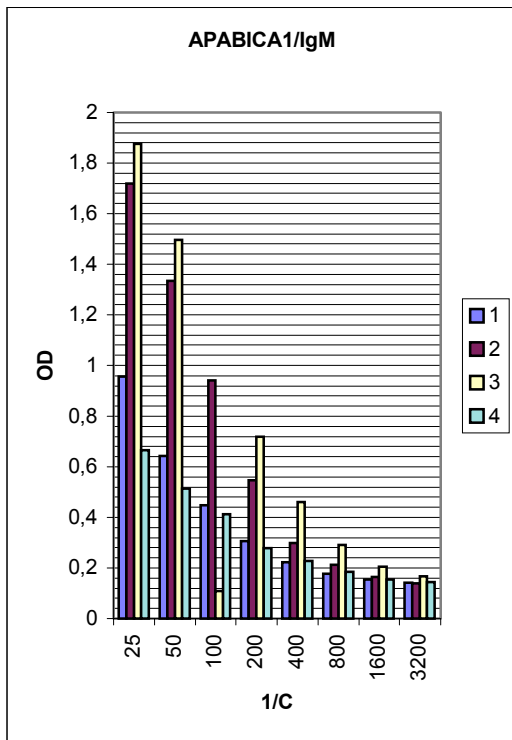
IgG/M/A: Immunglobulinklassen der Antikörper

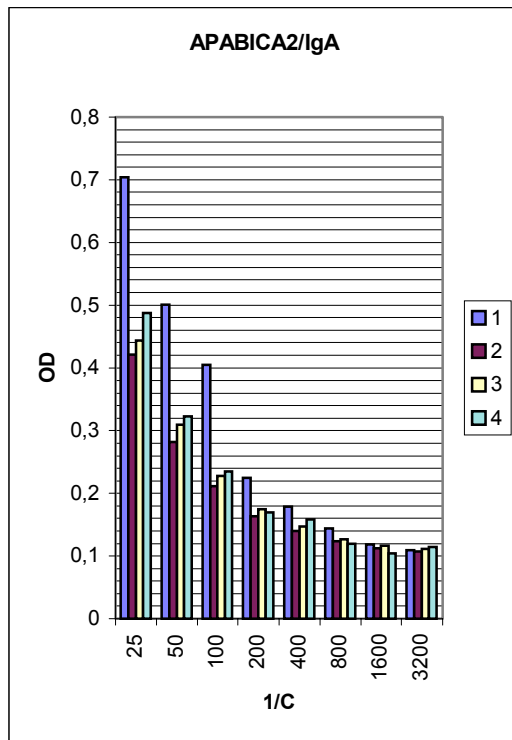
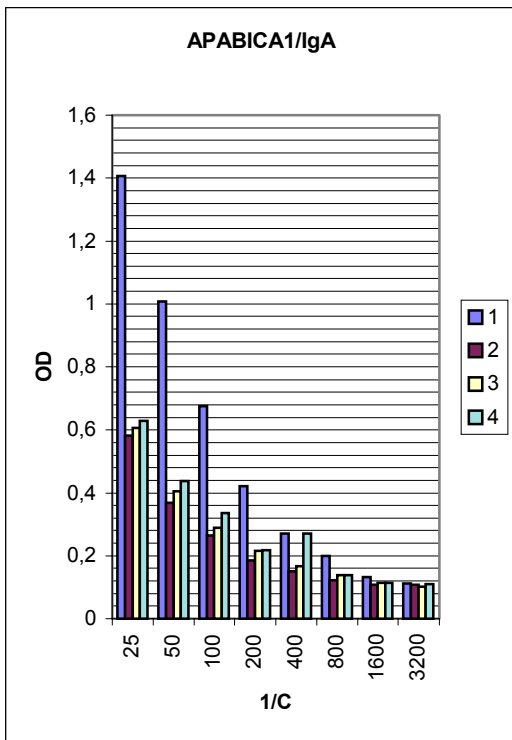
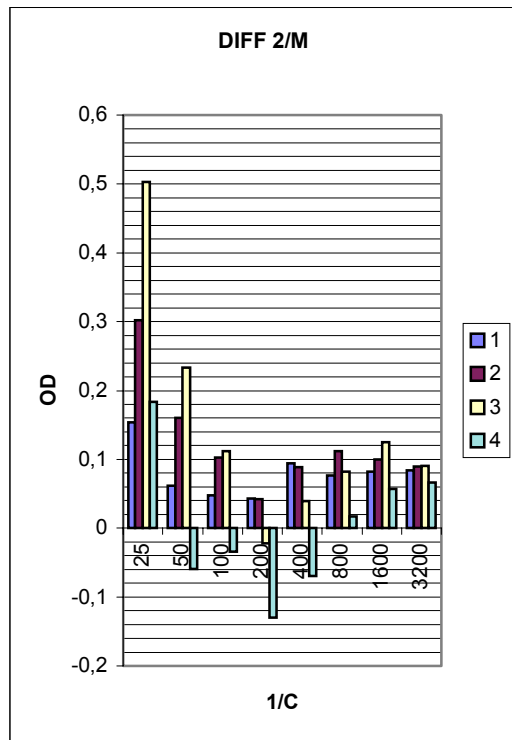
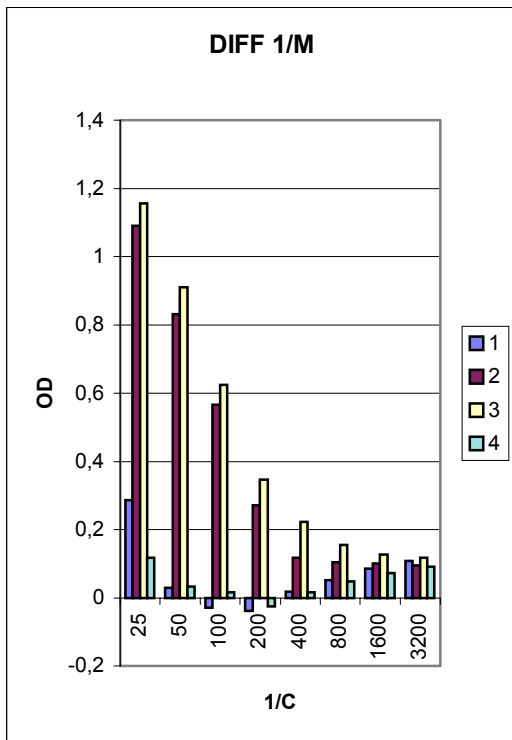
Seren 1-4: negatives Serum (1), schwach positives Serum (2), positive Seren (3,4)

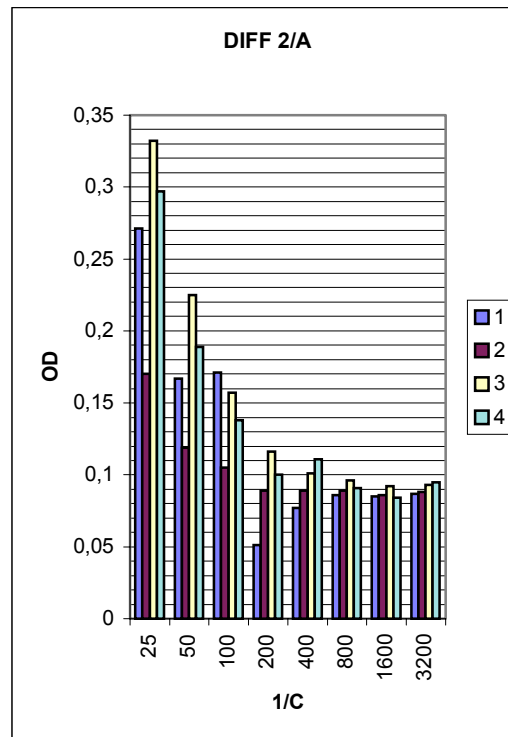
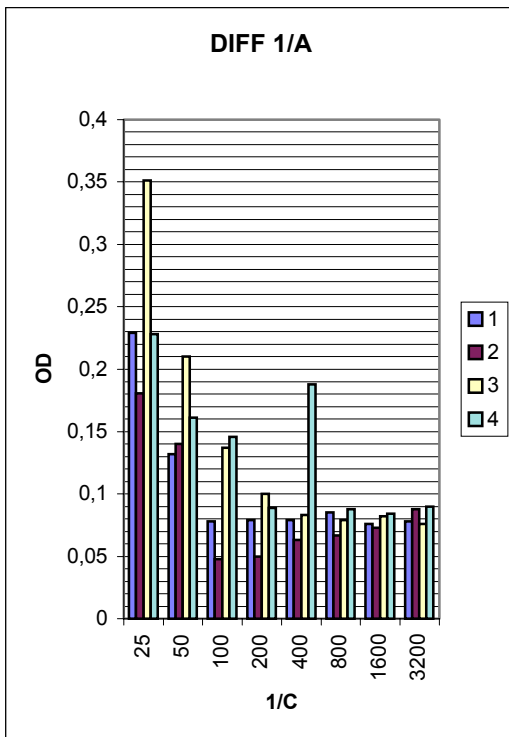
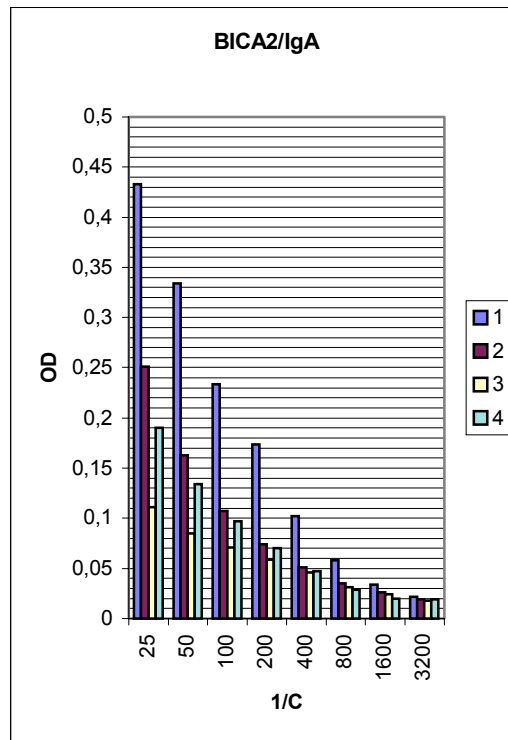
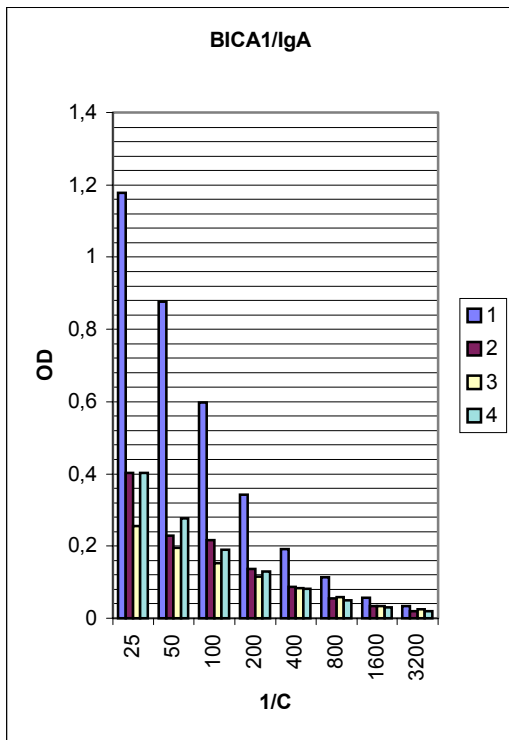
OD: optische Dichte als Maßeinheit der Antikörpertiter

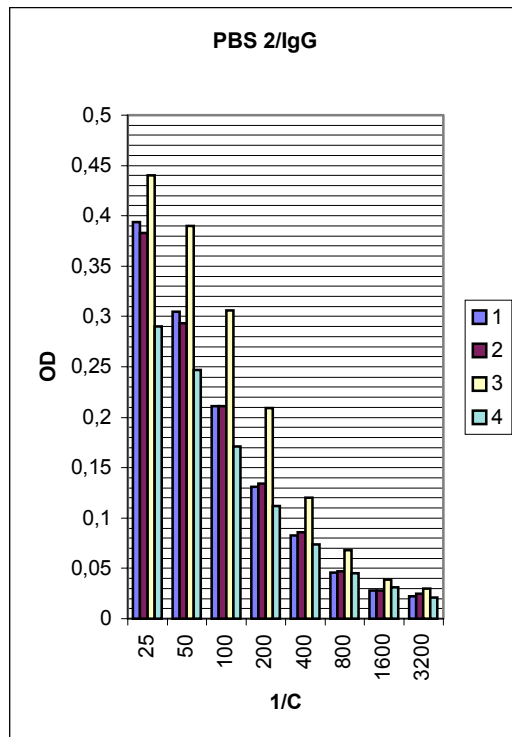
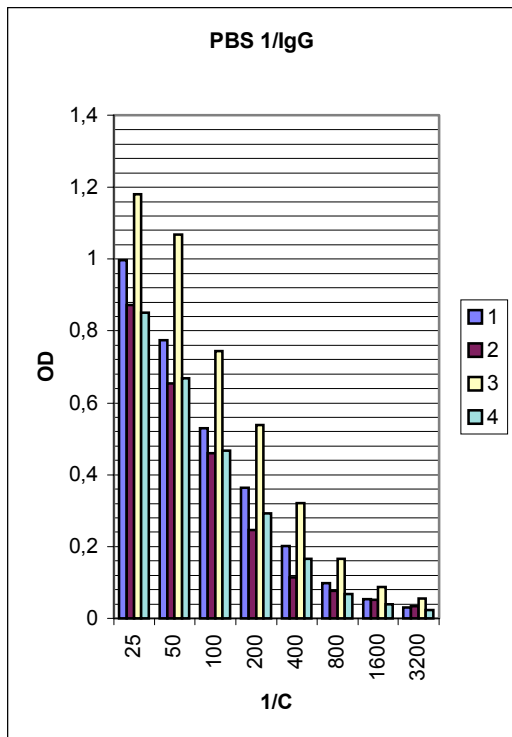
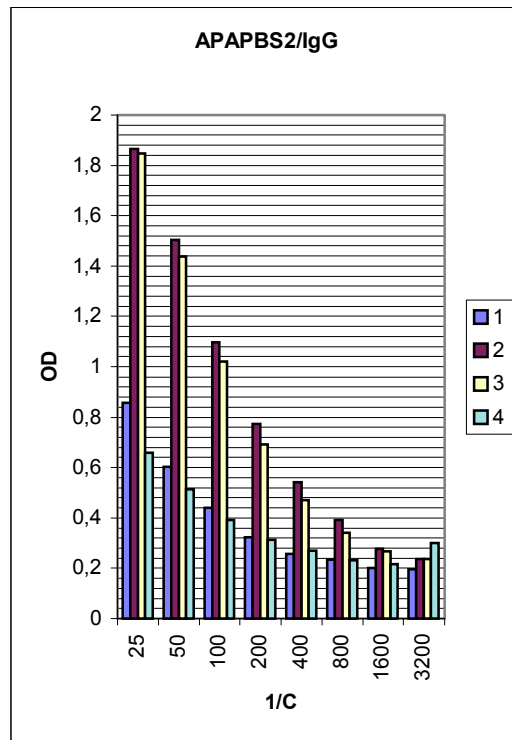
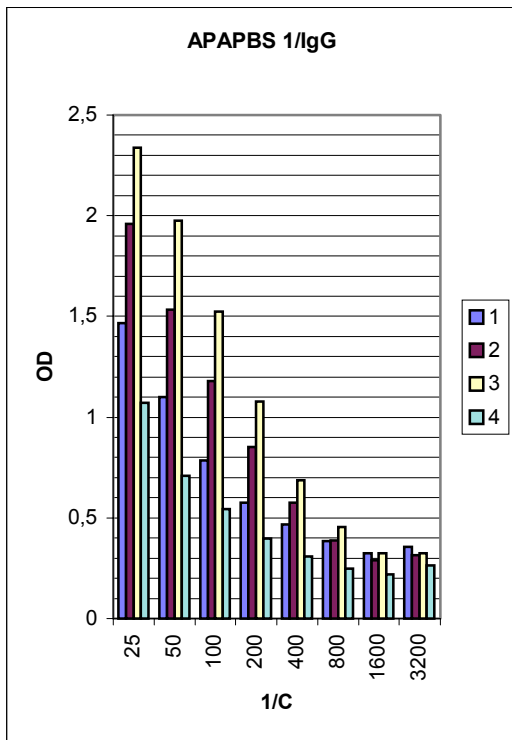


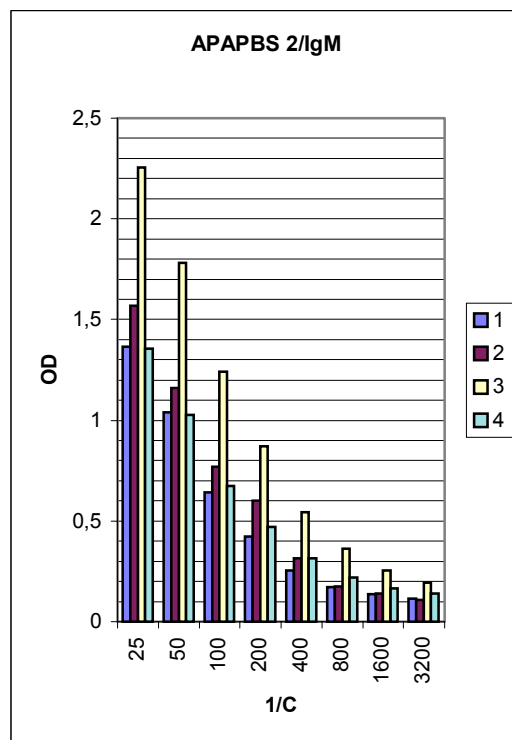
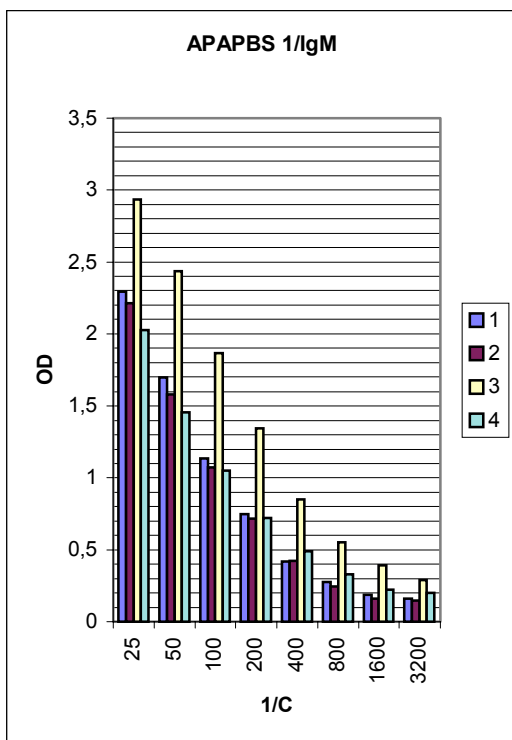
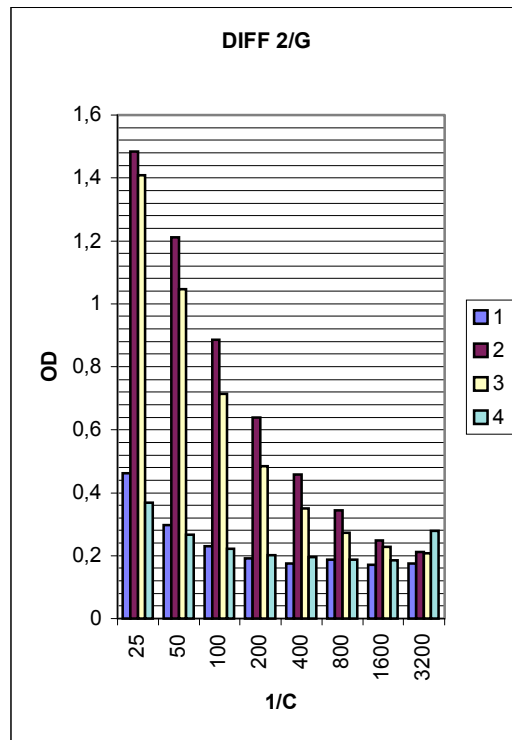
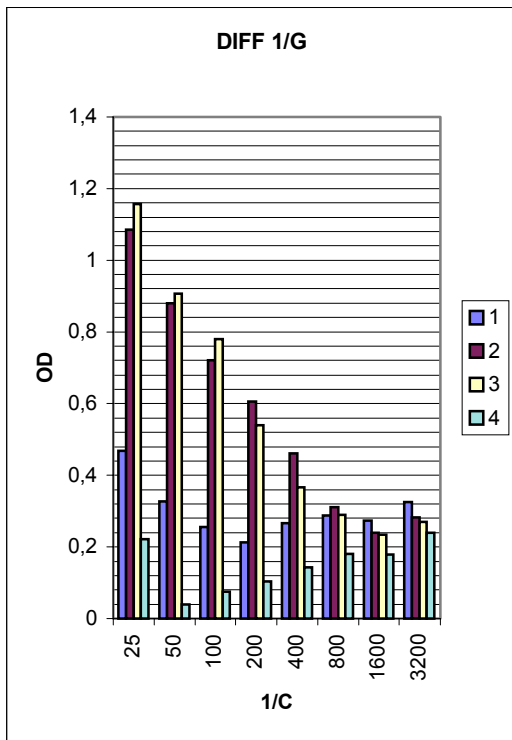




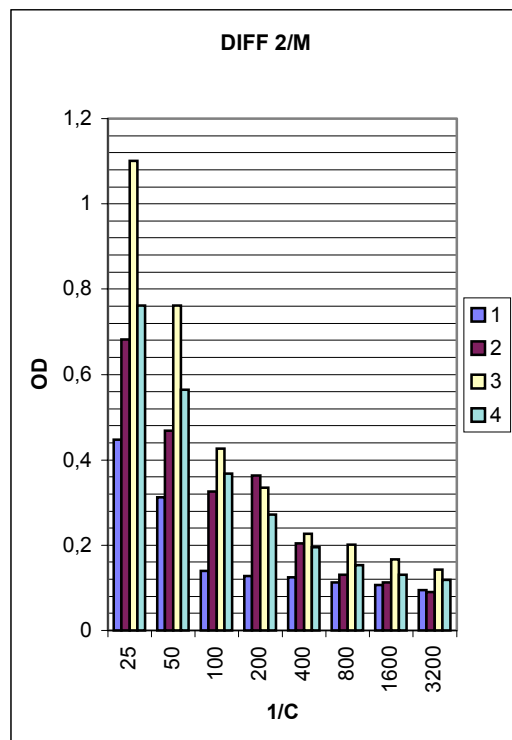
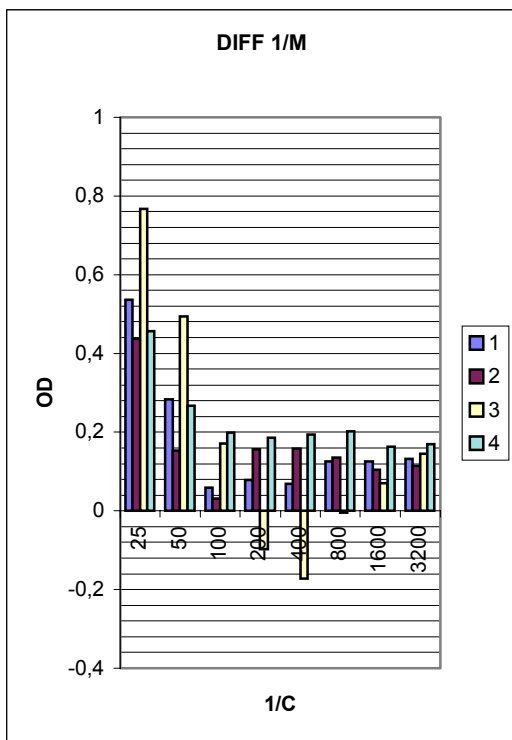
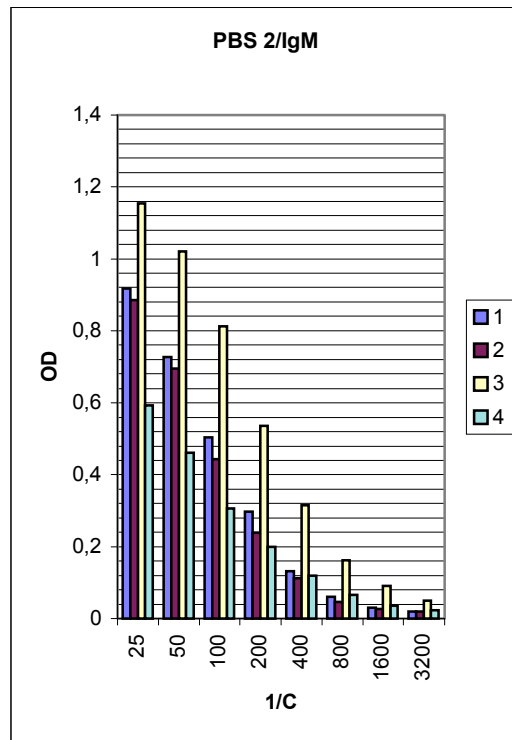
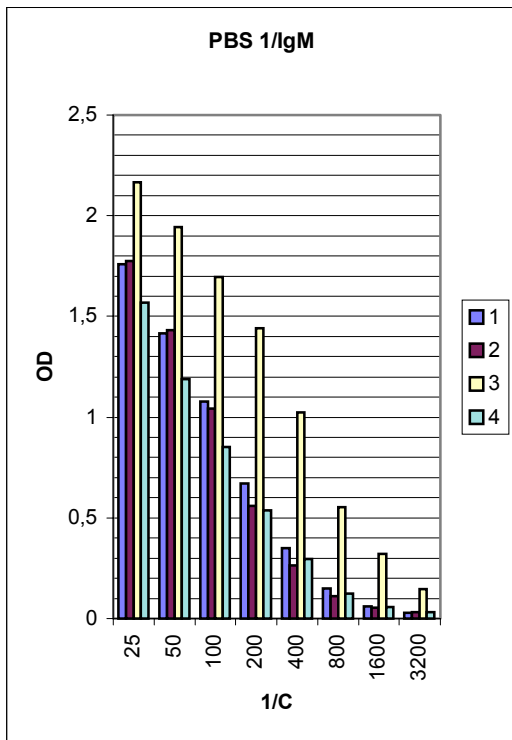


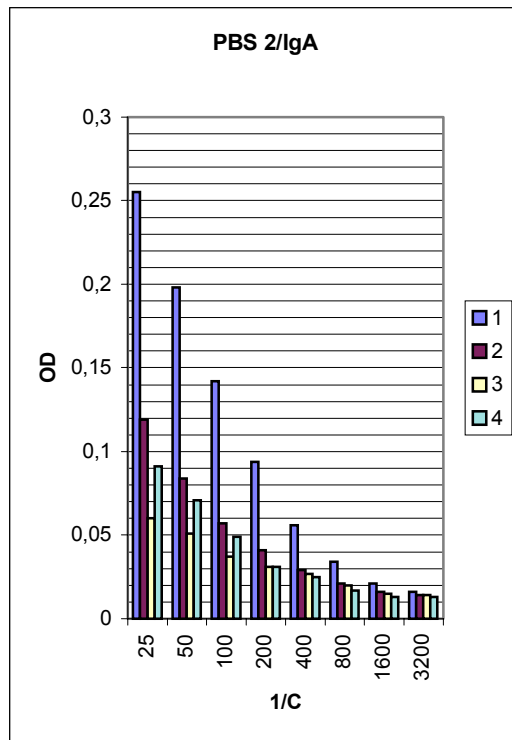
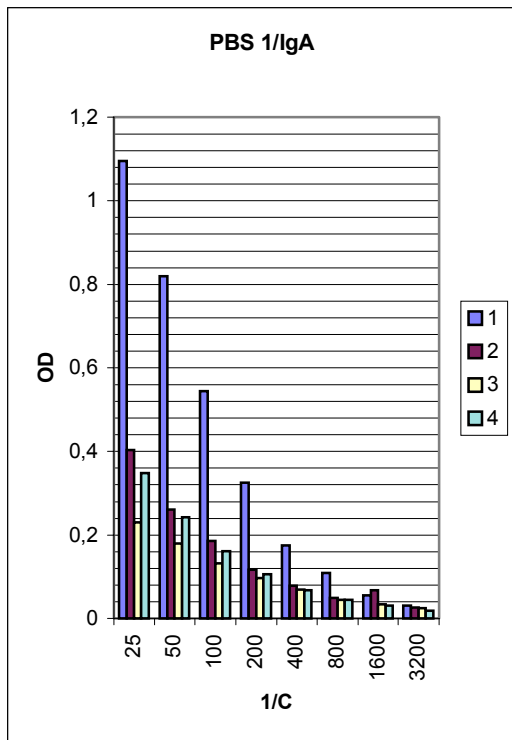
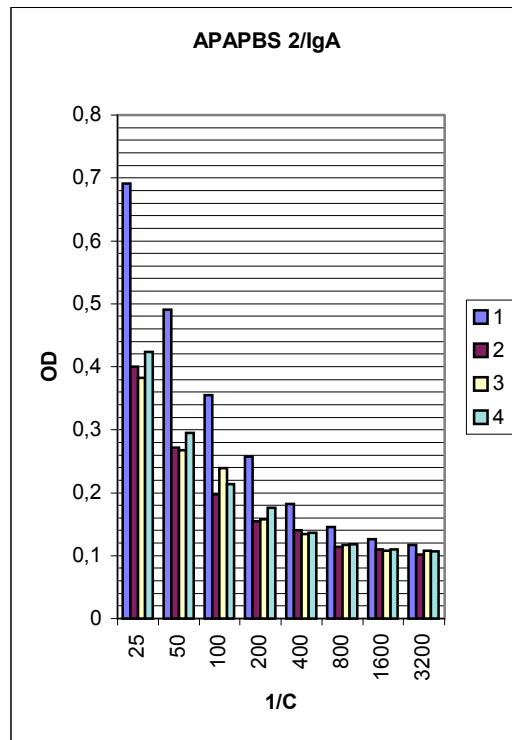
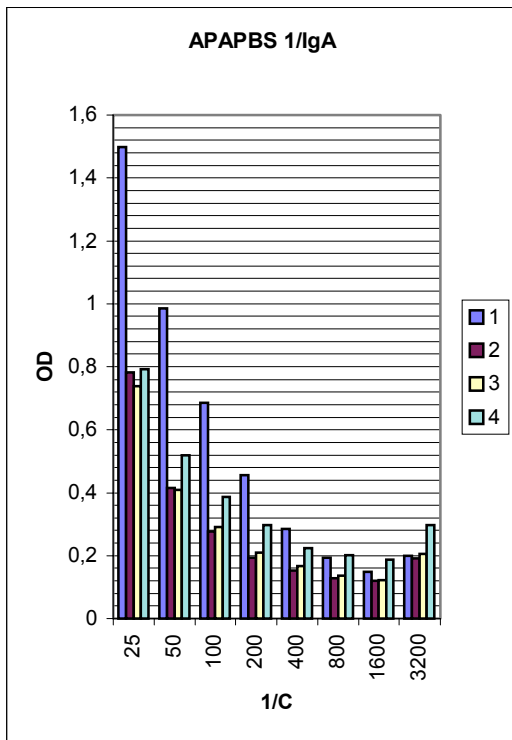


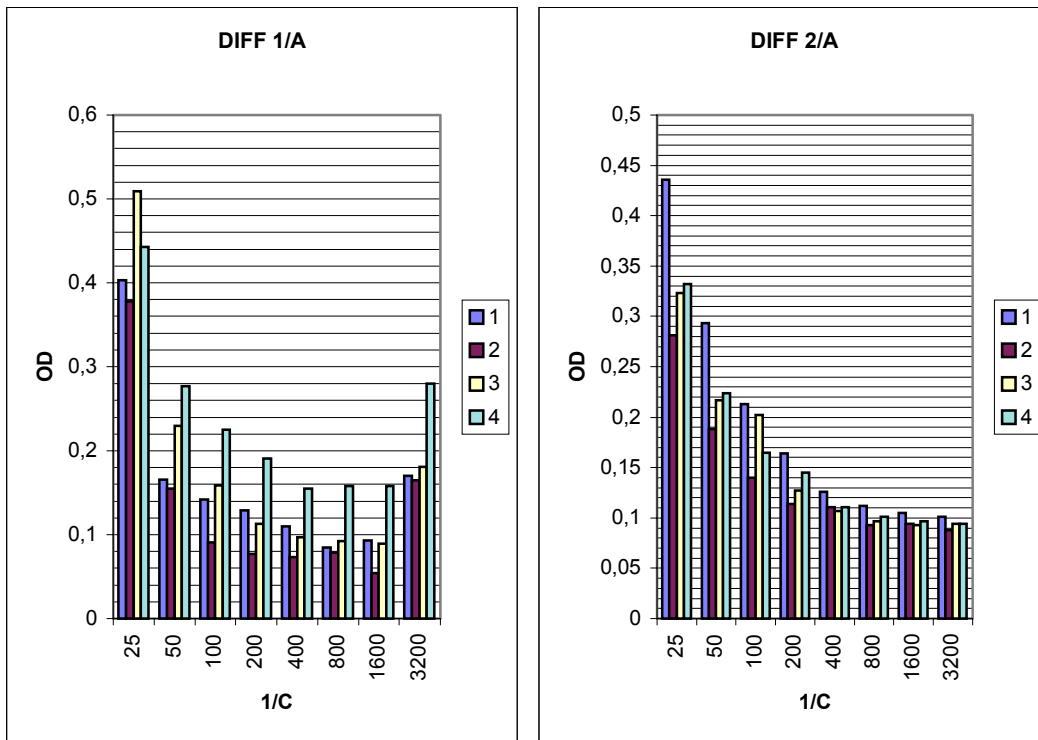












Da Mikrotiterplatten der Sorte Polysorp eine geringere „Background“-Reaktion als Maxisorp-Mikrotiterplatten bei sonst vergleichbaren Ergebnissen aufwiesen, wurden die weiteren Tests mit Polysorp-Mikrotiterplatten durchgeführt.

Als Beschichtungspuffer ergab PBS bessere Ergebnisse als Bicarbonatpuffer, da bei geringerer unspezifischer Reaktion der Patientenserum mit der Platte höhere spezifische Titer erzielt werden konnten.

Für Thromboplastin1 konnte bei den Immunglobulinklassen IgG und IgM die beste Differenzierung der einzelnen Seren, entsprechend ihrer bereits zuvor ermittelten Antikörperkonzentrationen und ohne hohe „Background“-absorption der Mikrotiterplatte, bei einer Serumverdünnung von 1:800 erzielt werden. Für Immunglobuline der Klasse IgA zeigte sich dies bei einer Serumverdünnung von 1:400.

### 3.1.2 Serumverdünnungen für andere Antigene

Es sollte nun überprüft werden, ob die für Thromboplastin1 bestimmten Serumkonzentrationen auch bei den anderen vier Antigenen angewendet werden konnten.

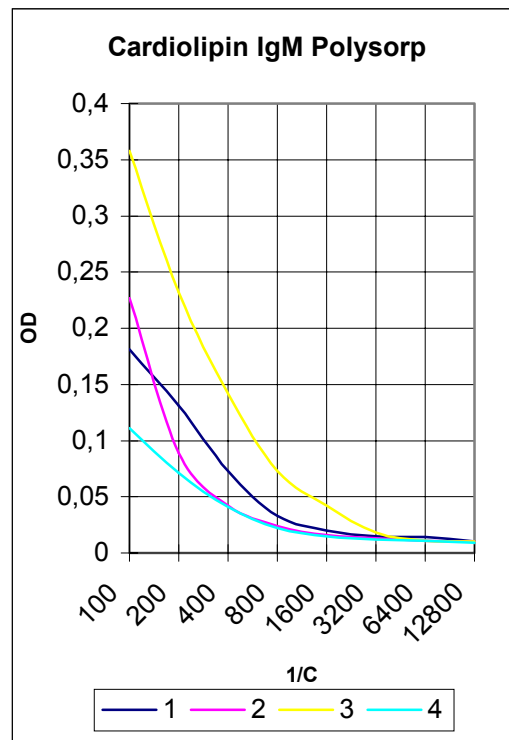
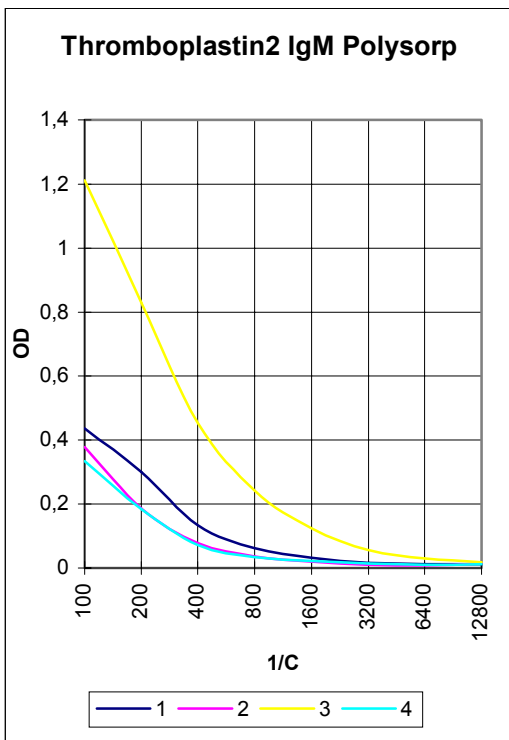
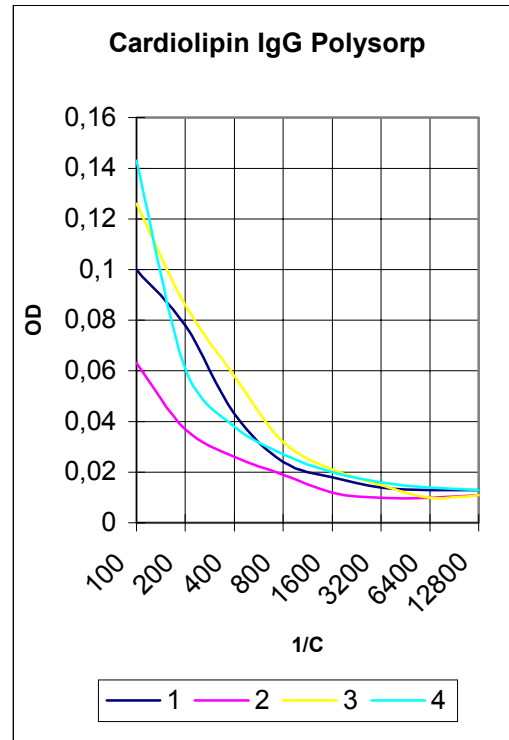
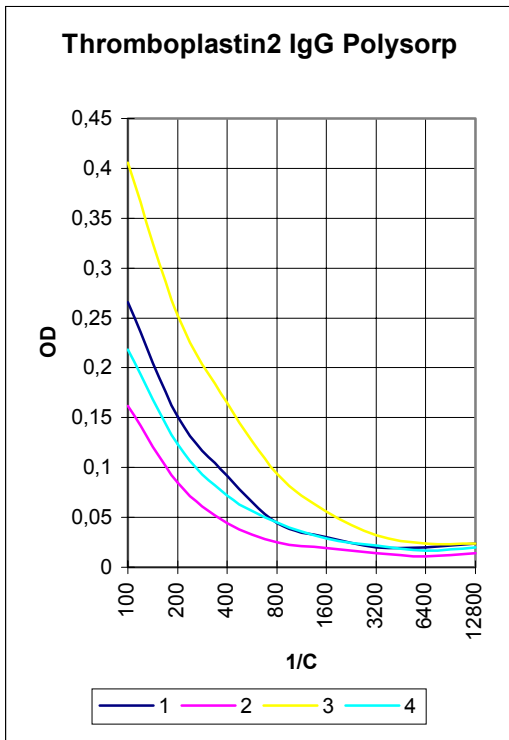
Dazu wurden ebenfalls Verdünnungsreihen erstellt mit den Verdünnungsschritten 1:100, 1:200...,1:12800 (1/C). Es wurden die gleichen vier Seren wie beim Test mit Thromboplastin1 verwendet (1-4). Als Puffer diente PBS. Die Antigene wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

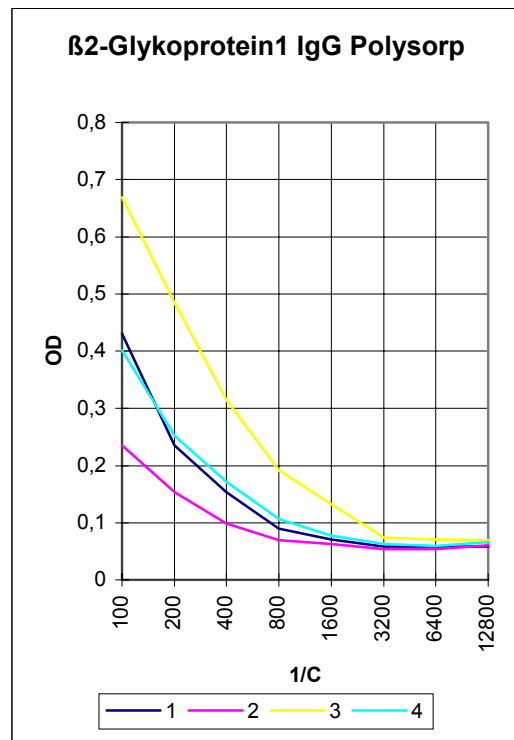
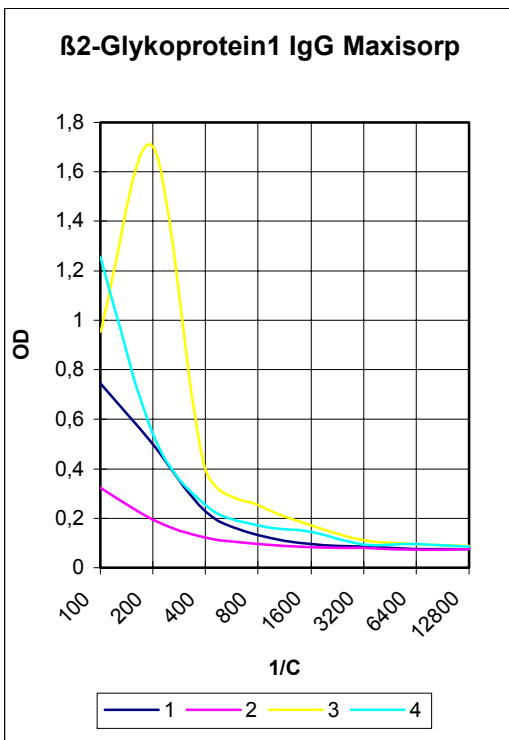
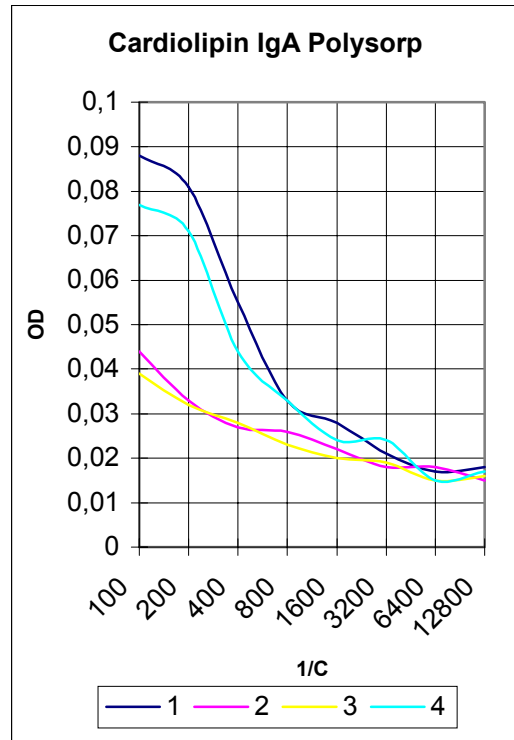
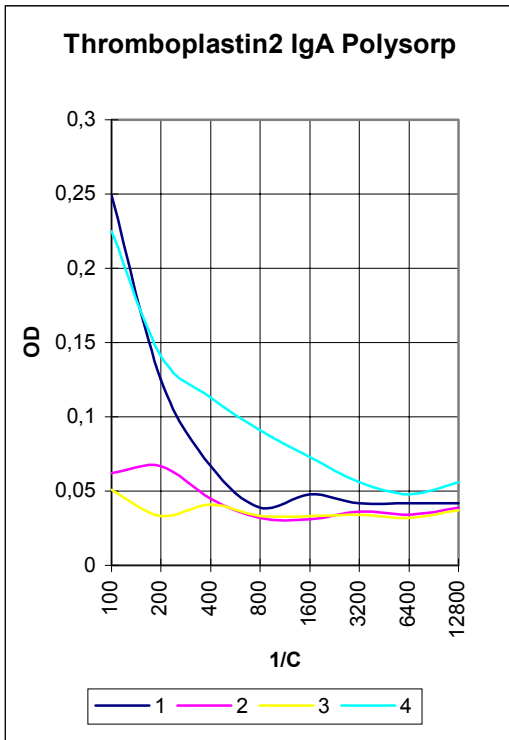
Thromboplastin2	50µl / 10ml
β2-Glykoprotein1	0,5µg / 10ml
Cardiolipin	50µg / 10ml
Phosphatidylserin	50µg / 10ml

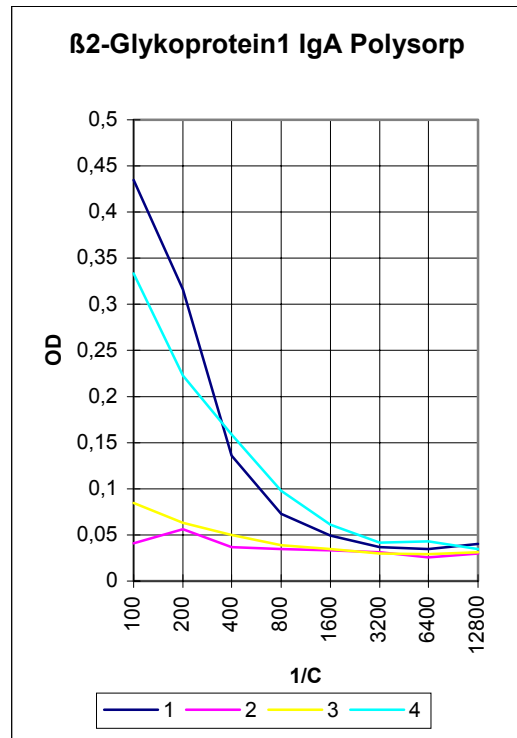
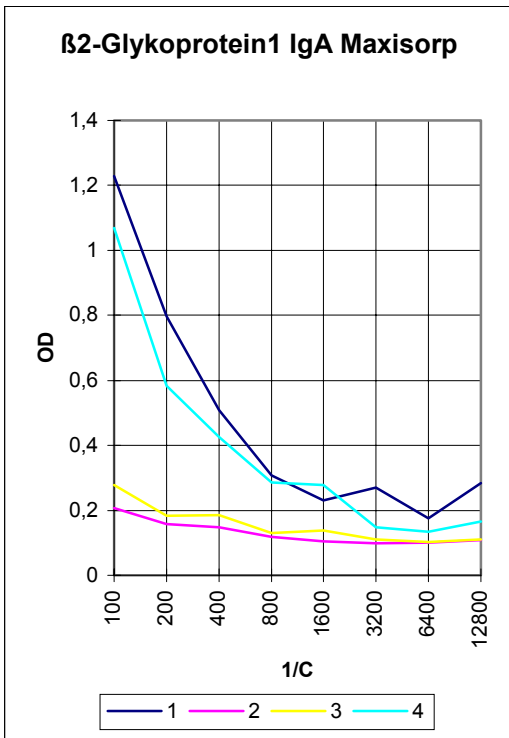
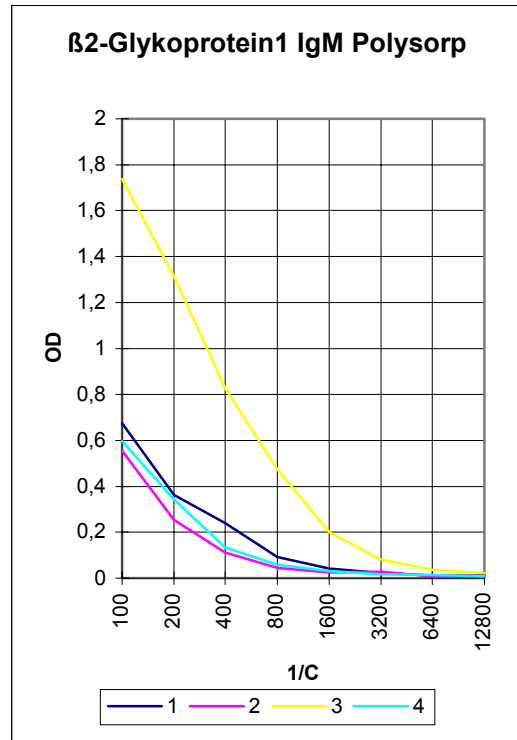
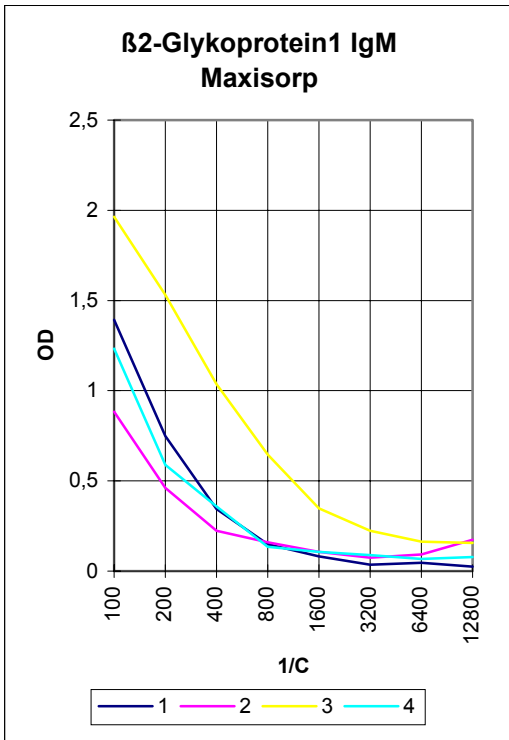
Die Antigene Thromboplastin2 und Cardiolipin wurden auf Polysorp-Mikrotiterplatten getestet, die Antigene β2-Glykoprotein1 und Phosphatidylserin auf Maxisorp- und Polysorp-Mikrotiterplatten. Jedes Antigen wurde auf die Antikörperklassen IgG, IgM und IgA getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

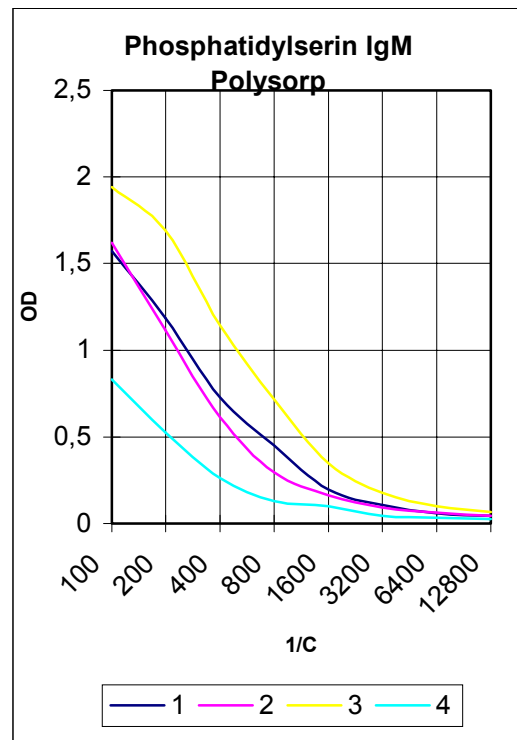
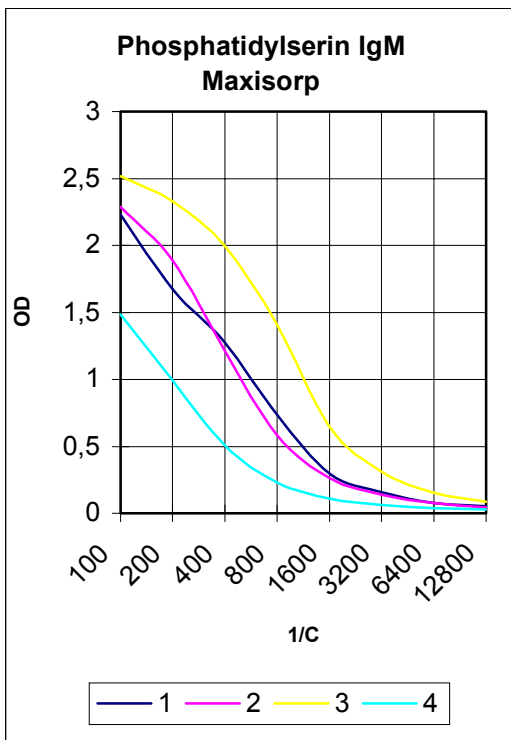
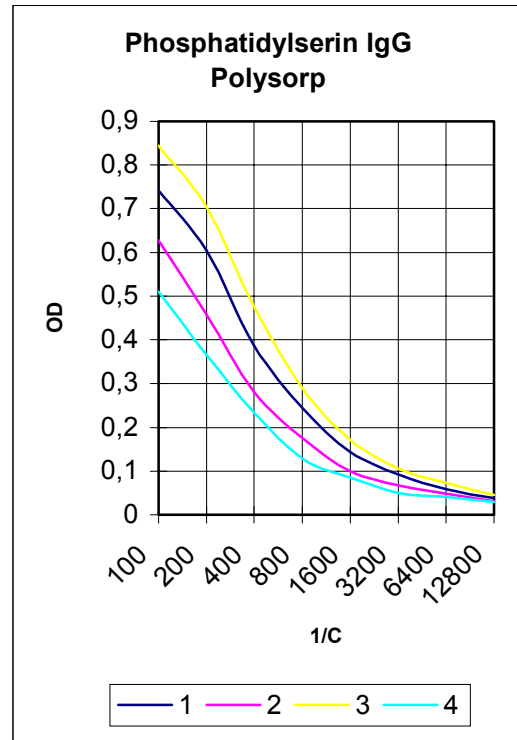
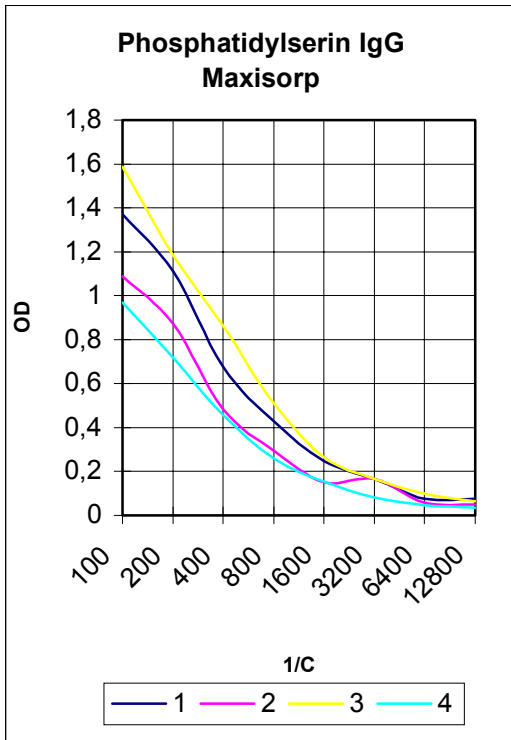
#### Abbildung 2

Legende: Antigene: Thromboplastin2 (Firma Baxter), Cardiolipin (Firma Sigma), β2-Glykoprotein1 (Firma Callbiochem), Phosphatidylserin (Firma Sigma)  
Antikörper: Antikörper der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, Firma Jackson Immuno Research  
Mikrotiterplatten: Maxisorp, Firma Nunc; Polysorp, Firma Nunc  
OD: Optische Dichte als Maßeinheit der Antikörpertiter  
1/C: Serumverdünnungskonzentration  
1,2,3,4: Seren 1-4; negatives Serum (1), schwach positives Serum (2), positive Seren (3,4)

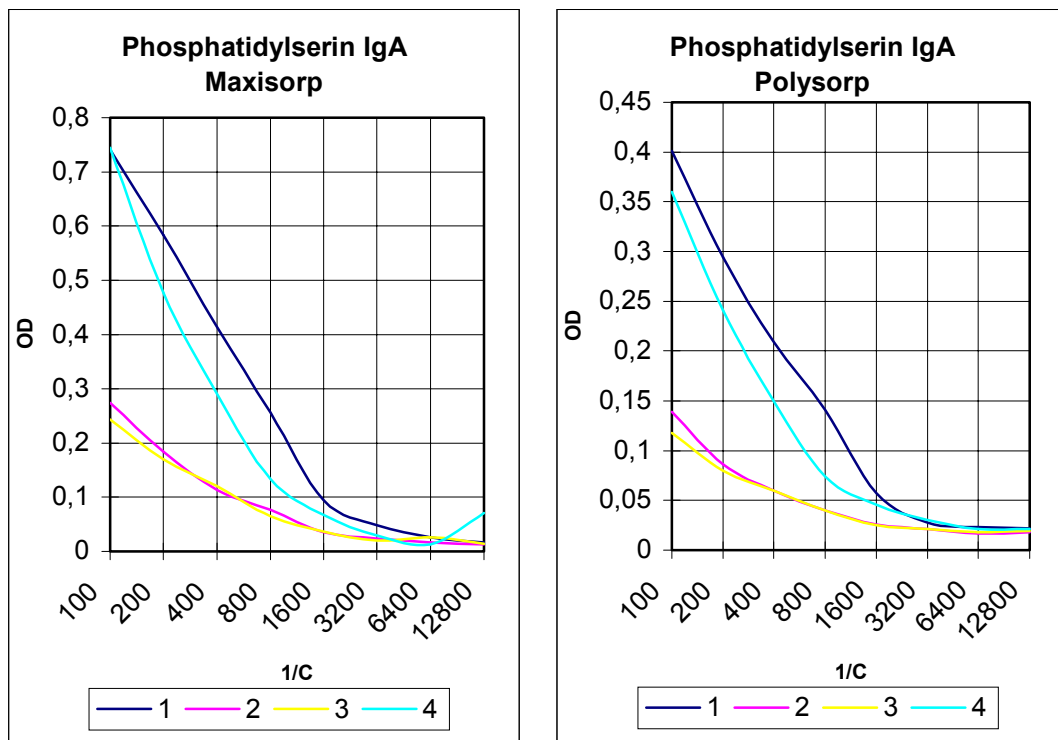












Es konnte gezeigt werden, dass auch für die Antigene Thromboplastin2, Cardiolpin,  $\beta$ 2-Glykoprotein1 und Phosphatidylserin die optimale Serumverdünnung bei 1:800 für Immunglobuline der Klasse IgG und IgM, sowie bei 1:400 für Immunglobuline der Klasse IgA lag. Bei einer Serumverdünnung von 1:1600 war der Ak-Nachweis nur gering, bei Serumverdünnungen größer 1:400 waren die Ergebnisse deutlich unspezifischer.

### 3.1.3 APA-positive Seren von Patienten mit APS

Die in den Vorversuchen erzielten Ergebnisse wurden nochmals mit Seren von acht Patienten mit Antiphospholipidsyndrom überprüft.

Alle fünf Antigene wurden auf Maxisorp- und Polysorp-Mikrotiterplatten getestet. Als Puffer diente PBS, die Antigene wurden in den oben bereits eingesetzten Konzentrationen verwendet (Phosphatidylserin 5 $\mu$ l/ 10ml). Die Serumverdünnungen betragen 1:800 für IgG und IgM, 1:400 für IgA.

Als Negativ-Kontrolle dienten drei Seren von gesunden Probanden.

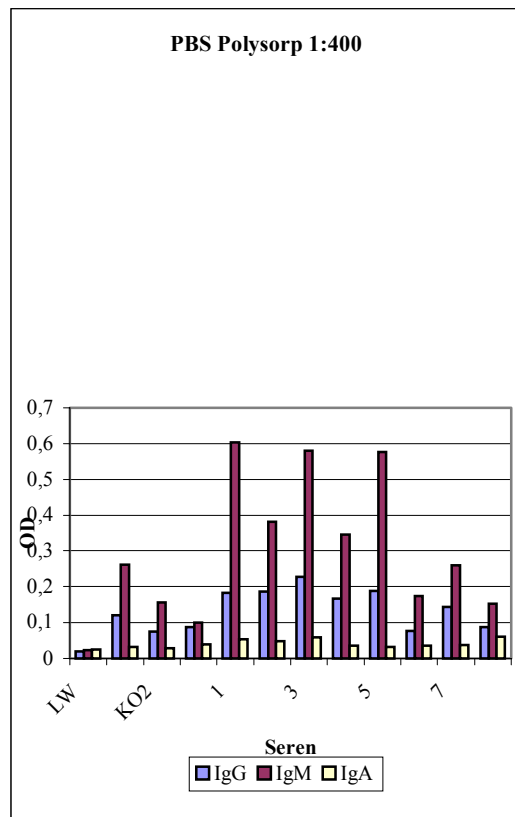
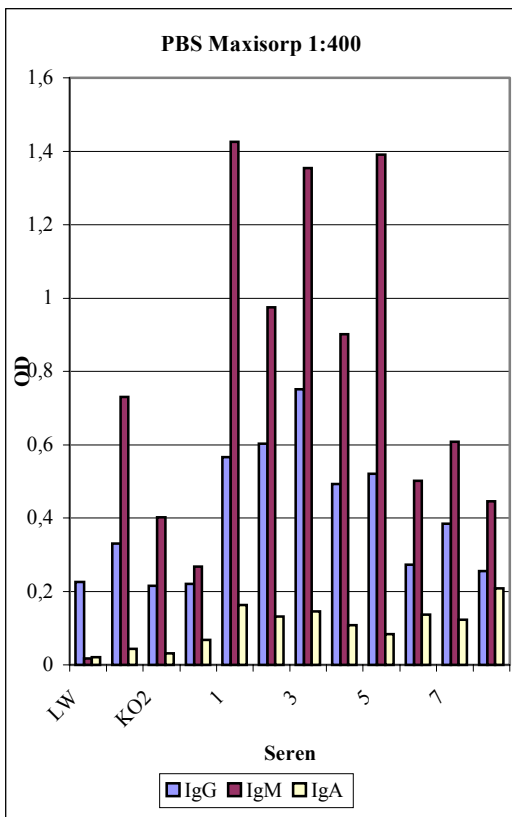
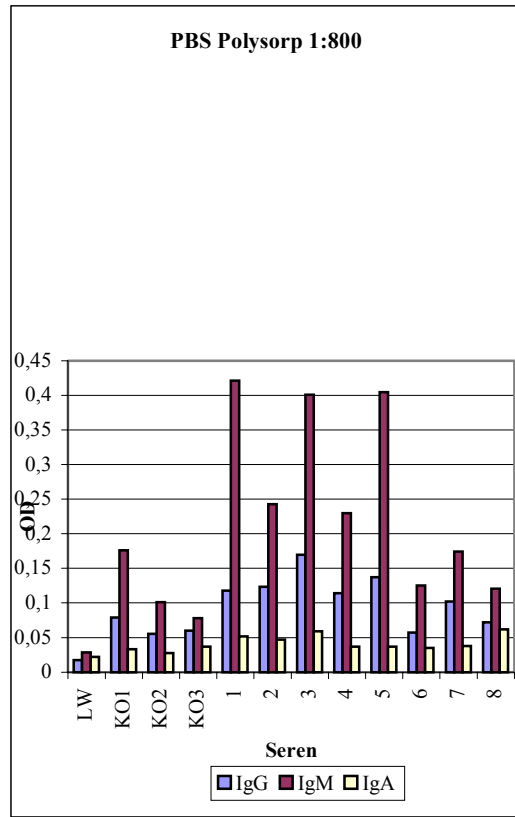
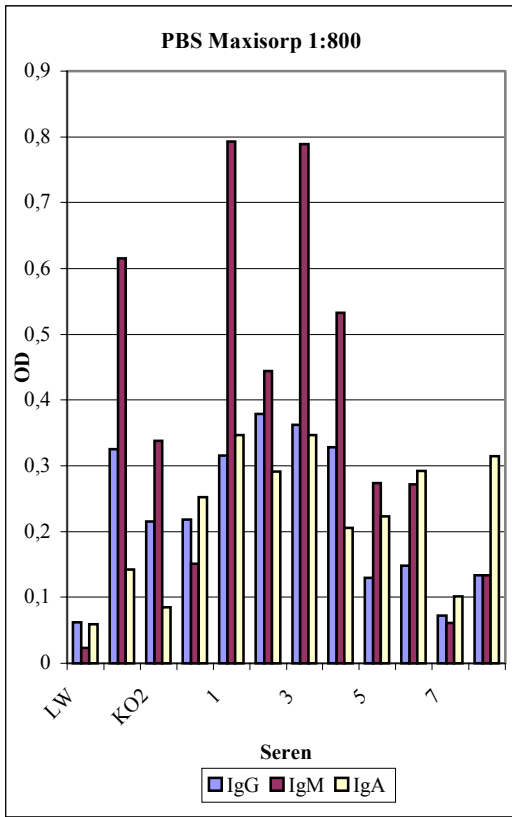
Für das Antigen Phosphatidylserin erfolgte mit PBS-Verdünnungspuffer eine zusätzliche Testung der positiven Seren von Patienten mit klinischen Symptomen auf Maxisorp- und Polysorp-Mikrotiterplatten mit den Serumverdünnungen 1:400 für IgG, IgM und IgA.

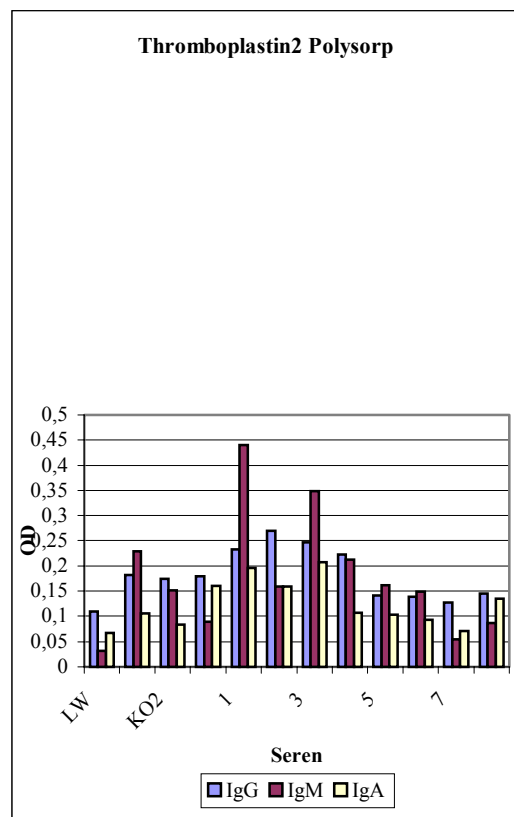
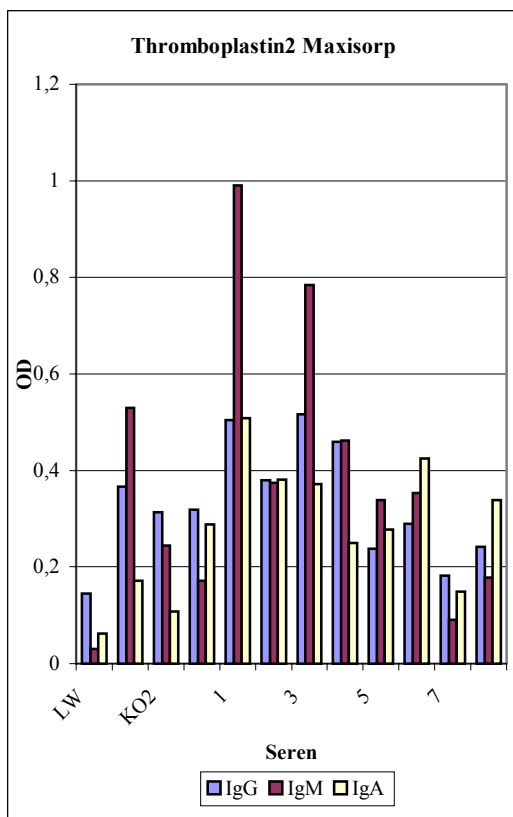
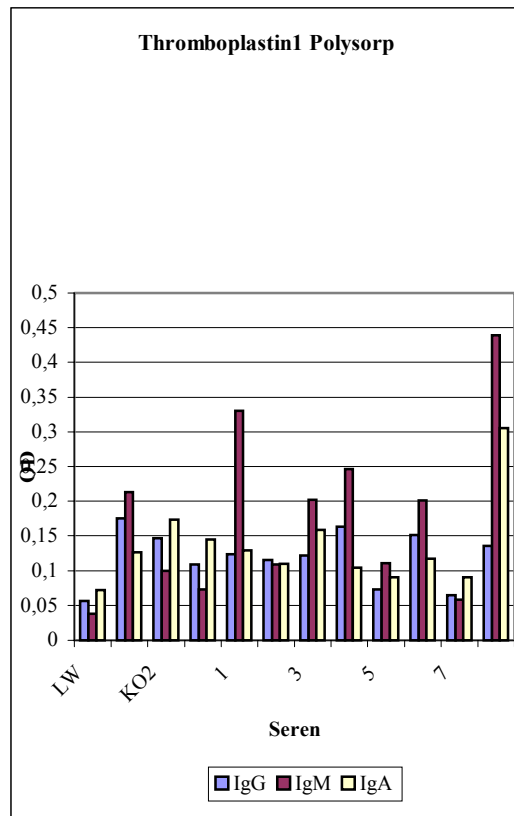
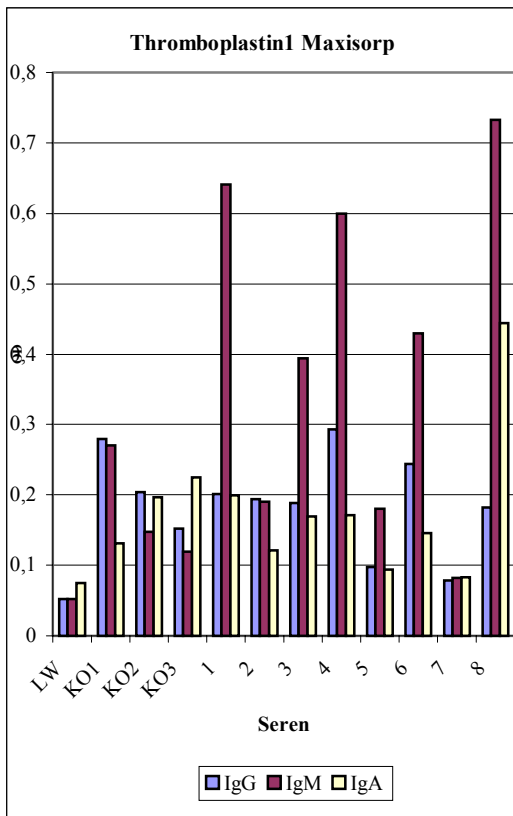
Ebenso wurden Platten nur mit PBS und PBS/BSA beschichtet, um die Eigenreaktion der Platten und der Puffer mit den Platten zu testen.

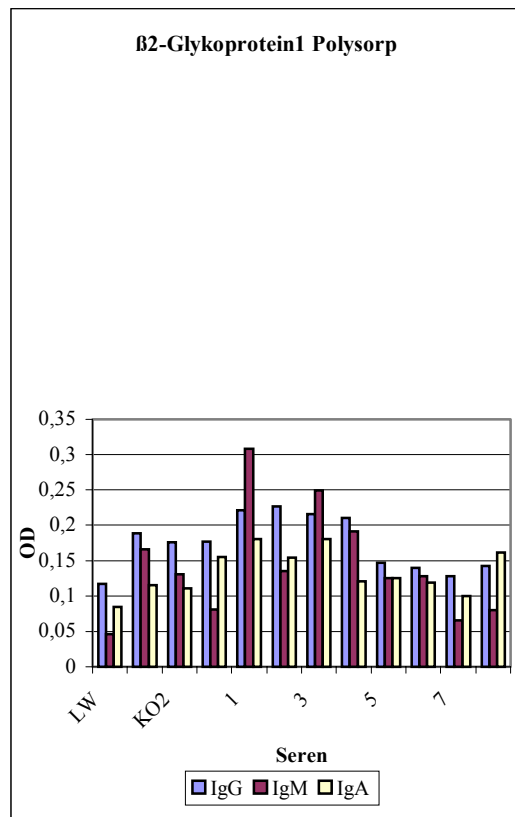
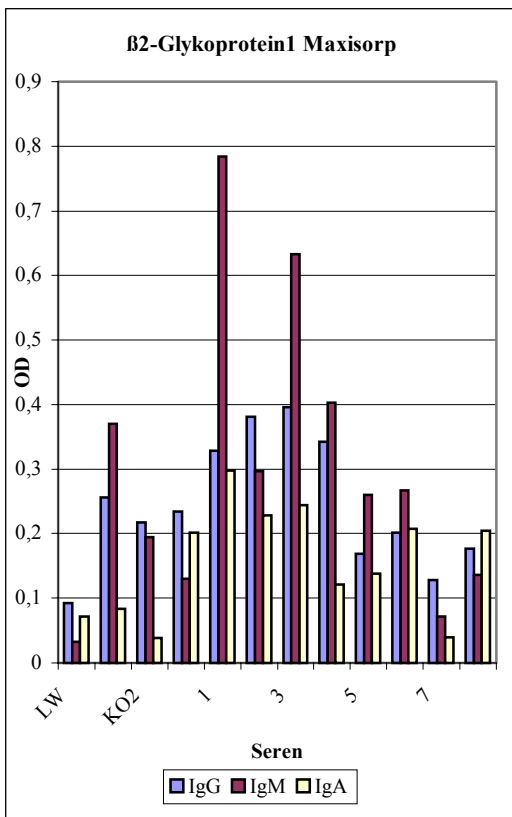
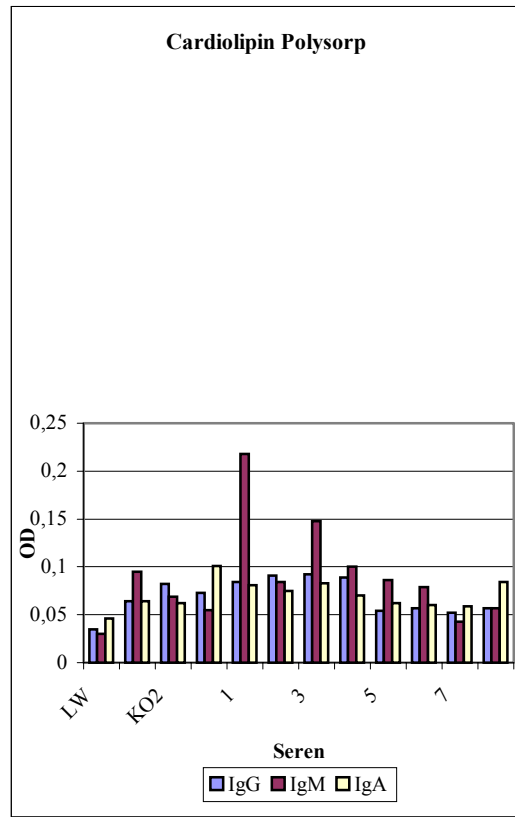
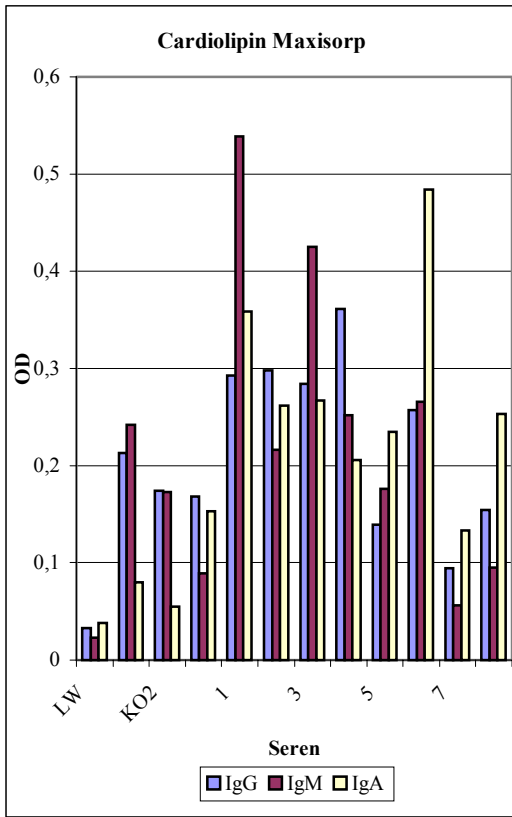
Die Ergebnisse werden in Abbildung 3 wiedergegeben.

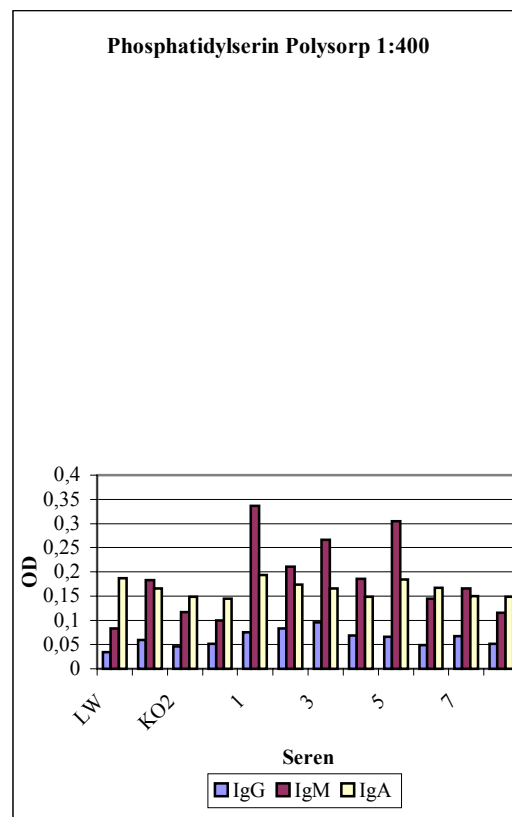
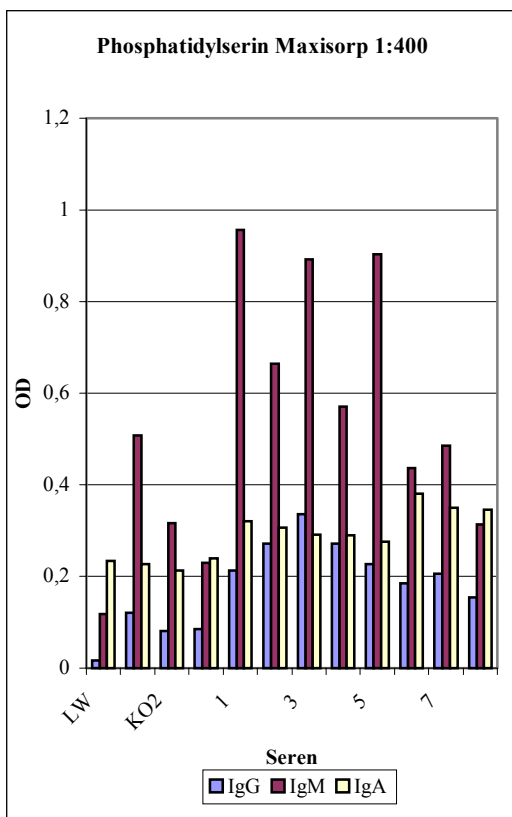
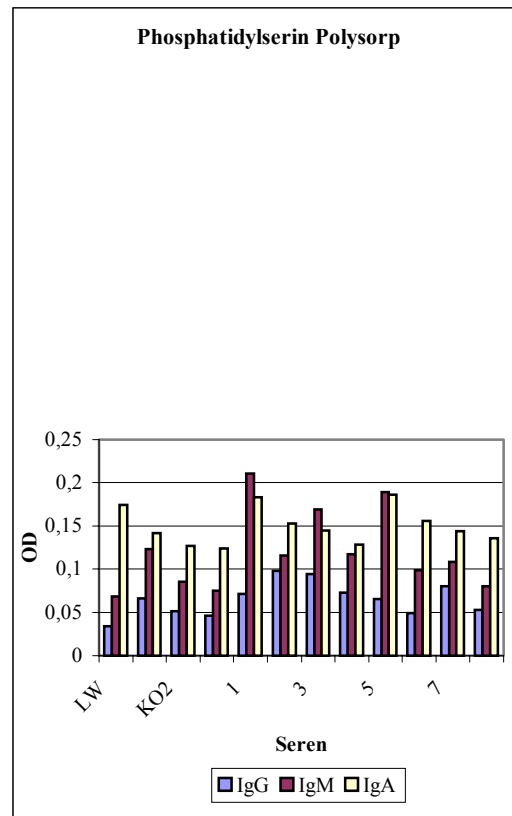
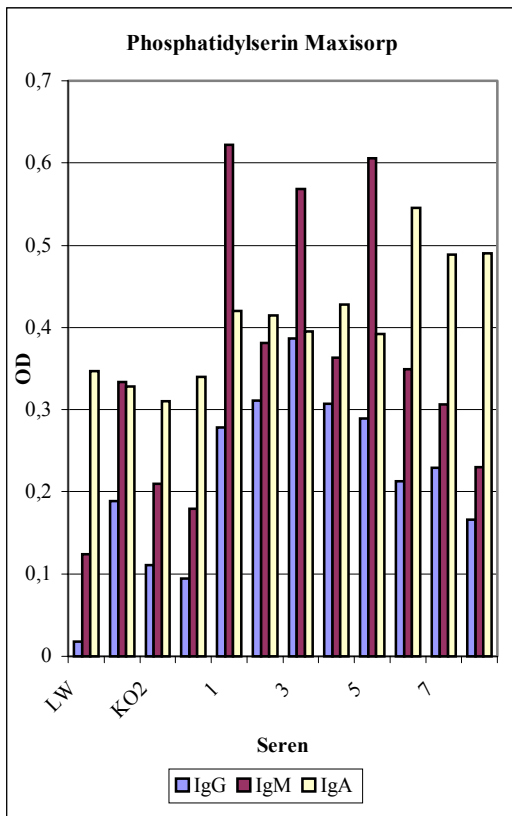
### Abbildung 3

Legende:           PBS: Verdünnungspuffer  
                      Maxisorp/Polysorp: Mikrotiterplatten der Firma Nunc  
                      1:800, 1:400: Serumverdünnung  
                      OD: optische Dichte als Maßeinheit der Antikörpertiter  
                      Seren: Patientenseren 1-8  
                      LW: Leerwert, Kavität ohne Serumzusatz  
                      KO: Kontrollseren, bekannte positive Seren  
                      Antigene: Thromboplastin1 (Firma Sigma), Thromboplastin2 (Firma Baxter),  
                      Cardiolipin (Firma Sigma),  $\beta$ 2-Glykoprotein1 (Firma Callbiochem), Phosphatidylserin  
                      (Firma Sigma)  
                      Antikörper: Antikörper der Immunglobulinklassen IgG, IgM, IgA, Firma Jackson  
                      Immuno Research









Es bestätigten sich die bereits ermittelten Serumverdünnungen von 1:800 für IgG und IgM, sowie 1:400 für IgA als optimal auf Polysorp-Mikrotiterplatten. Anhand obiger Abbildungen zeigt sich bei der direkten Gegenüberstellung von Maxi- und Polysorp-Mikroplatten die deutlich geringere Hintergrundreaktion („Background“-Reaktion) der Polysorpplatten bei gleichzeitig vorhandener Spezifität für positive Seren. Somit konnten die Material-Voruntersuchungen abgeschlossen werden. Für alle folgenden Testreihen wurden Serumverdünnungen von 1:800 für IgG/IgM und 1:400 für IgA auf Polysorp-Mikrotiterplatten verwendet.

#### 3.1.4 Definition des „Normalbereichs“

Alle Antigene wurden gelöst in PBS auf Polysorp-Mikrotiterplatten an 40 Blutspendern getestet. Anhand dieser Ergebnisse (optische Dichte x 1000) wurden Mittelwert  $m$  und Standardabweichung  $s$  bestimmt.

Aus diesen Werten wurden als Grenzwerte ermittelt:

$m+2s$	als schwach positiv
$m+3s$	als positiv

Tabelle 9 gibt die so berechneten Grenzwerte für alle Antikörperfraktionen und ihre Immunglobulinklassen wieder. Anhand dieser Grenzwerte wurden alle Messwerte in negativ, schwach positiv und positiv unterteilt.

#### 3.1.5 Definition von positiven Seren als Standardseren

38 Seren, die sich bereits in einem Routinetest als APA positiv erwiesen hatten, sowie vier negative Kontrollseren von Blutspendern, eine IgA-Kontrolle und 2 Patienten aus den vorangegangenen Tests wurden gegen die fünf Antigene (an Polysorp-Platten gebunden) getestet.

Vier Seren hatten hohe IgG-, IgM - oder IgA -Antikörpertiter gegen die fünf Antigene, sodaß sie in den folgenden Testreihen als Positivkontrollen dienten (Seren: 226017(Pat.3), 233638(KO9), 253954(KO20), 282191(KO35)).

Über mehrere Testreihen hinweg wurden die Werte dieser Seren gemittelt, um zuverlässige Titer (Odx1000) zur Bestimmung des Abstopzeitpunktes zu erhalten. Diese Titer der Kontrollseren werden für alle Antikörpergruppen und Immunglobulinklassen in Tabelle 10 als optische Dichte x1000 wiedergegeben. Die gemittelten Antikörpertiter dieser positiven Kontrollseren dienten in allen folgenden Testreihen zur Festlegung des Abstopzeitpunktes.

Tabelle 9. Antikörpergrenzwerte

<u>Antigen</u>	<u>m+2s</u>	<u>m+3s</u>
Thromboplastin1- IgG	109	130
IgM	165	204
IgA	27	33
Thromboplastin2- IgG	99	127
IgM	221	271
IgA	14	18
Cardiolipin- IgG	65	80
IgM	111	136
IgA	1	13
β2-Glykoprotein1- IgG	138	169
IgM	172	216
IgA	34	48
Phosphatidylserin- IgG	121	149
IgM	236	293
IgA	34	42

Legende:

m: Mittelwert

s: Standardabweichung

IgG/M/A: Immunglobuline der Klasse G/M/A



*Tabelle 10: Optische Dichte(ODx1000) der Kontrollseren*

	Titer der Kontrollseren in ODx1000			Pat. 3
	KO 20	KO 35	KO 9	
APA 1-IgG	167	154	35	122
APA 1-IgM	317	271	921	197
APA 1-IgA	50	28	501	50
APA 2-IgG	136	135	72	113
APA 2-IgM	385	317	188	288
APA 2-IgA	54	31	18	38
CL -IgG	41	40	25	31
CL -IgM	107	104	65	76
CL -IgA	25	11	13	22
β2 -IgG	133	117	74	115
β2 -IgM	31	26	149	289
β2 -IgA	52	25	14	34
Phos -IgG	98	81	44	71
Phos -IgM	224	188	104	157
Phos -IgA	34	11	5	18

Legende:

APA1: Thromboplastin1 der Firma Sigma; APA2: Thromboplastin2 der Firma Baxter

CL: Cardiolipin; β2: β2-Glykoprotein1; Phos: Phosphatidylserin

IgG/M/A: Immunglobuline der Klasse IgG/M/A

KO: Kontrollserum; Pat.: Patientenserum

### 3.1.6 Vergleich FCS vs. BSA

An ausgewählten Seren der Kollektive Antiphospholipidsyndrom (APS, n=8), Noduläre Regenerative Hyperplasie (NRH, n=24) und Primäre Biliäre Zirrhose (PBC, n=17) erfolgten Testserien sowohl mit FCS, als auch mit BSA als Verdünnungspuffer. Einige Autoren weisen darauf hin, dass die Präsenz eines Cofaktors, welcher dem β2-Glycoprotein1 entspricht, wesentlich für die Bindung des aCL an das Antigen ist(9,16,32,36,37,53,63,84). FCS, d.h. fetales Kälberserum, ist im Gegensatz zu BSA sehr reich an β2-Glykoprotein1.

Eine vergleichende Darstellung der Anzahl positiver Seren und deren prozentualer Anteil bietet Tabelle 11. Für die Immunglobulinklassen IgM und IgG lässt sich mit FCS

als Cofaktor im Verdünnungspuffer in den Kollektiven APS, PBC und NRH ein deutlich höherer Anteil Antikörper-positiver Seren nachweisen als mit BSA als Verdünnungspuffer.

*Tabelle 11: Vergleich FCS - BSA*

Kollektiv	Anzahl positiver Seren (prozentualer Anteil)					
	FCS	BSA	FCS	BSA	FCS	BSA
Cardiolipin	IgG		IgM		IgA	
APS n=8	5 (63%)	3 (38%)	5 (63%)	1 (13%)	2 (25%)	3 (38%)
NRH n=24	7 (29%)	2 (8%)	6 (25%)	3 (13%)	7 (29%)	5 (21%)
PBC n=17	0 (0%)	0 (0%)	5 (29%)	2 (12%)	0 (0%)	8 (47%)
β2-Glykoprot.	IgG		IgM		IgA	
APS n=8	0 (0%)	2 (25%)	2 (25%)	3 (38%)	0 (0%)	1 (13%)
NRH n=24	9 (45%)	0 (0%)	3 (15%)	4 (17%)	9 (45%)	8 (33%)
PBC n=17	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (12%)	0 (0%)	2 (12%)

Legende:

APS: Antiphospholipidsyndrom

NRH: Noduläre regenerative Hyperplasie

PBC: Primär biliäre Cirrhose

FCS: fetal calf serum

BSA: bovine serum albumin

IgG/M/A: Immunglobuline der Klassen IgG/M/A

β2-Glykoprotein1 und Cardiolipin als Antigene

### 3.1.7 Vergleich Testkits und Standardtest

Da in der Literatur auch vermehrt kommerzielle Testkits erwähnt werden, haben wir unseren Standardtest mit zwei verschiedenen Testkits verglichen. Die hierbei getesteten Seren ausgewählter Kollektive lieferten in allen drei Verfahren ähnliche Ergebnisse. Beim Nachweis von Cardiolipin-Antikörpern zeigten sich für Immunglobuline der Klasse IgA im Standardtest durchgehend höhere Serumtiter als in den kommerziellen Testsystemen. Da im Standardtest häufig unspezifische Titererhöhungen der IgA-Antikörper auftraten, scheinen die kommerziellen Testkits hier überlegen bzw. spezifischer zu sein. Für Antikörper der Immunglobulinklasse IgG und IgM konnten, wie in Tabelle 12 dargestellt, überwiegend vergleichbare Serumtiter nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Vergleich mit Testkits

<b>Cardiolipin-Antikörper</b>						
	<u>Diagnose</u>					
	<u>NS n=12</u>	<u>APS n=20</u>	<u>LE n=5</u>	<u>PBC n=7</u>	<u>AIH n=6</u>	<u>NRH n=22</u>
<b>IgG</b>						
Standard	1 (8%)	9 (45%)	2 (40%)	1 (14%)	3 (50%)	1 von 16 (6%)
Varelisa	2 (17%)	5 (25%)	3 (60%)	0 (0%)	3 (50%)	4 (18%)
Hiss	2 (17%)	2 (10%)	3 (60%)	1 (14%)	5 (83%)	6 (27%)
<b>IgM</b>						
Standard	1 (8%)	1 (5%)	3 (60%)	3 (43%)	3 (50%)	2 von 16 (13%)
Varelisa	1 (8%)	3 (15%)	2 (40%)	1 (14%)	1 (17%)	4 (18%)
Hiss	0 (0%)	6 (30%)	3 (60%)	4 (57%)	2 (33%)	6 (27%)
<b>IgA</b>						
Standard	1 (8%)	13 (65%)	2 (40%)	5 (71%)	4 (67%)	7 von 16 (44%)
Varelisa	1 (8%)	3 (15%)	1 (20%)	0 (0%)	1 (17%)	2 (9%)
Hiss	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	1 (5%)
<b>β2-Glykoprotein1 - Antikörper</b>						
	<u>Diagnose</u>					
	<u>NS n=12</u>	<u>APS n=20</u>	<u>LE n=5</u>	<u>PBC n=7</u>	<u>AIH n=6</u>	<u>NRH n=22</u>
<b>IgG</b>						
Standard	1 (8%)	6 (30%)	2 (40%)	3 (43%)	1 (17%)	4 (18%)
Varelisa	7 (58%)	4 (20%)	2 (40%)	0 (0%)	4 (67%)	3 (14%)
Hiss	0 (0%)	1 (5%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (9%)
<b>IgM</b>						
Standard	3 (25%)	5 (25%)	1 (20%)	3 (43%)	1 (17%)	1 (5%)
Varelisa	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (17%)	3 (14%)
Hiss	0 (0%)	1 (5%)	1 (20%)	1 (14%)	0 (0%)	3 (14%)
<b>IgA</b>						
Standard	0 (0%)	1 (5%)	4 (80%)	1 (14%)	4 (67%)	6 (27%)
Varelisa	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14%)	0 (0%)	1 (5%)
Hiss	5 (42%)	2 (10%)	2 (40%)	1 (14%)	2 (33%)	3 (14%)

Legende:

APS: Antiphospholipidsyndrom

LE: Lupus erythematodes

PBC: Primär biliäre Cirrhose

NS: Normalseren

AIH: autoimmune Hepatitis

NRH: noduläre regenerative Hyperplasie

n: Patientenzahl

Standard: hausinterner Elisa; Varelisa, Hiss: industrielle Testkits

### 3.2. Verschiedene Kontrollkollektive

#### A) Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom und habituellen Aborten

Es wurden Seren von 63 Patienten mit Antiphospholipid-Syndrom (APS) und 41 Patienten mit habituellen Aborten auf die fünf Antigene gegen Phospholipide getestet. Die Auswahl erfolgte anhand klinischer Daten und früherer Laborergebnisse.

In beiden Kollektiven ließen sich erhöhte Antikörpertiter gegen Thromboplastin, hier vermehrt gegen Thromboplastin1 der Firma Sigma, und  $\beta$ 2-Glykoprotein1 nachweisen. So konnten beim APS zu 90% Thromboplastin1-AK, zu 67% Cardiolipin-AK und zu 21%  $\beta$ 2-Glykoprotein1-AK nachgewiesen werden. Im Kollektiv der habituellen Aborte waren 24-42% Thromboplastin1-AK positiv, 49% Cardiolipin-AK und 32%  $\beta$ 2-Glykoprotein1. Bei den Immunglobulinklassen überwogen IgM-AK gefolgt von IgG-AK. Die Untersuchungsergebnisse (Titer in ODx1000) und Antikörperhäufigkeiten (in %) sind in der folgenden Tabelle 13 zusammengefasst.

*Tabelle 13: APS und habituelle Aborte*

Antikörper		Titer(ODx1000) – Mittelwerte (AK in %)			
		APS n=63		habituelle Aborte n=41	
<u>APA 1</u>	AK gesamt		90%		24%
	IgG	104	(40%)	76	(12%)
	IgM	227*	(71%)	110	(19%)
	IgA	75*	(49%)	26	(7%)
<u>APA 2</u>	AK gesamt		41%		42%
	IgG	72*	(21%)	83	(32%)
	IgM	130*	(18%)	153	(29%)
	IgA	30	(41%)	21	(17%)
<u>CL</u>	AK gesamt		67%		49%
	IgG	30*	(24%)	36	(29%)
	IgM	37*	(6%)	60	(34%)
	IgA	20	(65%)	12	(22%)
<u><math>\beta</math>2-GP 1</u>	AK gesamt		21%		32%
	IgG	76	(25%)	80	(24%)
	IgM	138*	(18%)	122	(15%)
	IgA	20*	(6%)	14	(7%)
<u>Phos</u>	AK gesamt		51%		22%
	IgG	34*	(2%)	57	(5%)
	IgM	76*	(11%)	79	(2%)
	IgA	14*	(43%)	10	(22%)

Legende:

APS: Antiphospholipidsyndrom

APA1: Thromboplastin1 der Firma Sigma

APA2: Thromboplastin2 der Firma Baxter

CL: Cardiolipin

$\beta$ 2-GP1:  $\beta$ 2-Glykoprotein1

Phos: Phosphatidylserin

AK: Antikörper, IgG/M/A: Immunglobulinklassen IgG/M/A

n: Patientenzahl, OD: optische Dichte

Signifikant unterschiedlich sind alle mit \*-markierten Mittelwerte. Somit liegen zwischen den Kollektiven APS und habituelle Aborte keine signifikanten Unterschiede für APA1-IgG, APA2-IgA, CL-IgA und  $\beta$ 2-GP1-IgG vor.

B) Rheumatische Erkrankungen

In dieser Gruppe wurden Seren von insgesamt 413 Patienten mit entzündlichen Kollagenosen getestet und einer Gruppe mit 189 Patienten mit entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, wie Spondyloarthritis, oligo/poly-JRA, psoriatische Arthritis und Polyarthritis nodosa und 43 Patienten mit nicht-entzündlichem Weichteilrheumatismus (FMS) gegenübergestellt. Für Patienten mit Sklerodermie wurden anhand früherer Laboruntersuchungen drei Gruppen gebildet: 20 Patienten mit Scl 70-Antikörpern (1), 42 Patienten mit anti-Nukleoli-Antikörpern (2), 41 Patienten mit anti-Centromer-Antikörpern (3). Für alle Patientenserum gilt, dass sich erhöhte Antikörpertiter vor allem der Immunglobulinklasse IgM nachweisen lassen. Wie bereits aus der Literatur bekannt, zeigen sich besonders hohe AK-Titer bei den entzündlichen Kollagenosen Lupus erythematosus, M. Sharp und M. Sjögren. Aber der Vergleich mit den nicht-entzündlichen Erkrankungen in Tabelle 14 zeigt, dass auch hier erhöhte Antikörpertiter, ebenso vorwiegend der IgM-Klasse nachweisbar sind. Die folgende Tabelle 14 zeigt die ermittelten Antikörpertiter im Vergleich. Für die Antikörper APA1-IgM, APA2-IgG, APA2-IgM, APA2-IgA, CL-IgA,  $\beta$ 2-GP1-IgM und Phos-IgM besteht ein signifikanter Unterschied der Wertepaare von FMS gegenüber Rheuma und LE. Für

CL-IgG, CL-IgM, Phos-IgG und Phos-IgA besteht ein signifikanter Unterschied zwischen FMS und LE, für  $\beta$ 2-Gp1-IgG zwischen FMS und Rheuma.

*Tabelle 14: Kollagenosen/ rheumat. Erkrankungen - ODx1000*

Antikörper	Titer(ODx1000)		Mb. Sharp	Sjögren	SCL 1	SCL 2	SCL 3	Rheuma	FMS
	LE	- Mittelwerte							
	n=41		n=38	n=42	n=20	n=42	n=41	n=189	n=42
APA 1	IgG	147	124	*133	60	93	*100	84	100
#	IgM	168	140	*109	*77	117	*128	116	*165
	IgA	*66	31	35	17	28	*36	*22	*27
APA 2									
#	IgG	*62	*35	36	*71	*54	*49	51	*74
#	IgM	*145	110	*78	*111	*166	126	*105	*127
#	IgA	20	*23	19	21	*19	*20	*15	*19
CL									
	IgG	25	*28	14	18	*17	*16	18	20
	IgM	50	23	*26	*40	30	28	*36	*44
#	IgA	13	*12	11	17	*19	*9	*8	*2
$\beta$ 2-GP 1									
	IgG	*59	*42	*35	59	*46	49	42	76
#	IgM	101	73	*50	*83	103	91	*98	*110
	IgA	*21	*13	15	14	*14	20	*10	*10
Phos									
	IgG	*43	*39	*30	18	28	*31	*35	*57
#	IgM	*59	47	*37	*42	*60	*60	*62	*75
	IgA	9	14	*10	8	7	18	7	13

Legende:

LE: Lupus erythematoses

Morbus Sharp, Morbus Sjögren, Rheumatische Erkrankungen

SCL: Sklerodermie 1,2,3 (siehe Text oben)

FMS: Fibromyalgiesyndrom

APA1: Thromboplastin1 der Firma Sigma

APA2: Thromboplastin2 der Firma Baxter

CL: Cardiolipin

$\beta$ 2-GP1:  $\beta$ 2-Glykoprotein1

Phos: Phosphatidylserin

Alle mit \*-markierten Werte sind zum Kollektiv APS signifikant unterschiedlich. Im Vergleich entzündliche / nicht-entzündliche Erkrankungen wurden Wertepaare der

Kollektive FMS, LE und Rheuma verglichen. Signifikant unterschiedliche Wertepaare wurden in der Spalte der Antikörper mit # markiert.

Die positiven Antikörpertiter zeigen einen hohen Anteil von AK gegen Thromboplastin 1 (25-83%), dicht gefolgt von AK gegen Cardiolipin (31-75%). In allen Gruppen handelt es sich vorwiegend um IgM-AK, dicht dahinter liegen die IgG-AK. Vereinzelt vorkommende, deutlich erhöhte AK-Titer der IgA-Klasse, besonders bei sehr niedrigem IgG und IgM-Titer, lassen einen Artefakt vermuten. Abschließend lassen sich keine signifikanten Unterschiede der AK-Vorkommen zwischen entzündlichen Kollagenosen und nicht-entzündlichen rheumat. Erkrankungen bzw. FMS nachweisen. Die Häufigkeiten der Antikörper werden in untenstehender Tabelle 15 dargestellt. Diese zeigt den prozentualen Anteil der AK gesamt und aufgeschlüsselt nach Immunglobulinklassen.

*Tabelle 15: Kollagenosen / Rheumat. Erkrankungen - proz. AK-Anteil*

AK		pos. AK in % bei Patientengruppen mit							
		LE	Sharp	Sjög	Sc1 1	Sc1 2	Sc1 3	Rheu	FMS
		n=41	n=38	n=42	n=20	n=42	n=41	n=189	n=42
APA 1	ges.	83%	55%	55%	25%	41%	61%	50%	67%
	IgG	59	34	43	5	19	39	22	31
	IgM	59	42	19	10	31	29	35	57
	IgA	66	21	14	10	21	37	14	14
APA 2	ges.	37%	32%	17%	25%	43%	39%	20%	50%
	IgG	12	5	0	15	7	5	2	29
	IgM	22	5	7	5	33	17	4	14
	IgA	17	26	10	20	31	24	17	29
CL	ges.	39%	40%	31%	75%	55%	34%	33%	31%
	IgG	5	21	0	0	3	7	12	14
	IgM	20	5	5	10	5	10	8	17
	IgA	20	32	26	70	55	27	23	0
ß2-GP	ges.	24%	13%	2%	20%	21%	32%	12%	36%
	IgG	7	11	0	20	7	7	3	33
	IgM	5	3	0	10	10	12	6	5
	IgA	17	11	2	0	14	22	6	0
Phos	ges.	27%	37%	10%	10%	19%	61%	20%	45%
	IgG	0	0	0	5	2	0	0	7
	IgM	0	3	0	0	5	2	1	0
	IgA	27	37	10	5	7	61	20	40

### C) Erkrankungen kleiner Gefäße

Bei Patienten mit Tinnitus, Uveitis, Hörsturz und Innenohrschaden wird ein Zusammenhang mit Antiphospholipid-Antikörpern im Sinne einer Vaskulitis diskutiert. Die unten stehende Tabelle 16 zeigt die Serumtiter (ODx1000) und Häufigkeit der Antiphospholipidantikörper (in %). Auch hier überwiegen Antikörper gegen Thromboplastin1 der Firma Sigma (39-59%), gefolgt von Cardiolipin-AK (12-51%). Es ließen sich erneut einzelne deutlich überhöhte, am ehesten artefizielle, Antikörpertiter für Immunglobuline der Klasse IgA nachweisen.

### D) Epilepsie

In dieser Gruppe von 41 Patientenseren mit klinisch gesicherter Epilepsie konnten keine signifikanten Titerdifferenzen gegenüber der Gruppe der Erkrankungen der kleinen Gefäße (s.o.) nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den Seren des Normalkollektivs (Blutspender) zeigten sich jedoch erhöhte Titerwerte bei Antikörpern gegen Thromboplastin (44%) und Cardiolipin (61%). Bei den Immunglobulinklassen überwiegen die IgM-Antikörper, dicht gefolgt von den IgG-Antikörpern.

Tabelle 16 liefert die Gegenüberstellung der Erkrankungen der kleinen Gefäße und der Epilepsie-Seren. Sie zeigt sowohl die optischen Dichten (ODx1000) als auch den prozentualen Anteil der AK-positiven Seren im Vergleich.



Tabelle 16: Vaskulitis / Epilepsie

Antikörper		Titer Mittelwerte	in ODx1000			
		(und pos.Seren	in % )			
		Tinnitus	Uveitis	Hörsturz	IOS	Epilepsie
		n=41	n=41	n=40	n=41	n=41
<u>APA 1</u>	Ges.	51%	59%	50%	39%	44%
	IgG	95 (32%)	87 (24%)	75 (17%)	*65 (10%)	*101 (32%)
	IgM	*129 (39%)	143 (39%)	137 (36%)	106 (24%)	*130 (32%)
	IgA	*21 (2%)	35 (29%)	40 (31%)	*27 (24%)	*33 (20%)
<u>APA 2</u>	Ges.	46%	29%	12%	42%	44%
	IgG	51 (7%)	*63 (7%)	50 (5%)	63 (7%)	*78 (22%)
	IgM	*97 (5%)	*129 (12%)	110 (10%)	*107 (10%)	*175 (34%)
	IgA	*30 (42%)	23 (17%)	*11 (0%)	*24 (32%)	19 (17%)
<u>CL</u>	Ges.	12%	51%	36%	39%	61%
	IgG	26 (10%)	30 (17%)	24 (12%)	*25 (10%)	*28 (12%)
	IgM	34 (5%)	*43 (10)	*40 (14%)	*52 (22%)	*50 (24%)
	IgA	*3 (0%)	12 (42%)	9 (26%)	*11 (27%)	15 (54%)
<u>β2-GP 1</u>	Ges.	2%	12%	21%	2%	29%
	IgG	43 (2%)	*53 (5%)	55 (21%)	*37 (0%)	58 (10%)
	IgM	74 (2%)	*108 (7%)	85 (5%)	52 (0%)	*159 (27%)
	IgA	*2 (0%)	*12 (2%)	13 (0%)	13 (2%)	*15 (7%)
<u>Phos</u>	Ges.	22%	42%	12%	24%	49%
	IgG	*22 (0%)	*45 (2%)	*38 (0%)	*49 (2%)	*50 (5%)
	IgM	*39 (0%)	*67 (5%)	*49 (0%)	*76 (5%)	*83 (5%)
	IgA	10 (22%)	13 (39%)	7 (12%)	10 (22%)	*15 (49%)

Alle mit \*-markierten Werte sind zum Kollektiv APS signifikant unterschiedlich.

#### F) „small for date“-Mütter aus Köln und Kontrollen

In der Gruppe der Köln-Patienten werden Seren von Müttern mit untergewichtigen Neugeborenen (sog. „small for date“-Kinder) und Seren von Müttern mit Neugeborenen normalen Gewichts (Kontrollseren) gegenübergestellt. Tabelle 17 zeigt neben den AK-Titern (ODx1000) auch die prozentualen Anteile positiver Seren. Es zeigte sich beim Vergleich von Köln Patienten und Kontrollen für APA1-IgG, APA2-IgA, CL-IgM, β2-GP1-IgG/M/A und Phos-IgG/M/A ein signifikanter Unterschied der Wertepaare.

#### E) Chronische Lebererkrankungen

Aus dem Spektrum der chronischen Lebererkrankungen wurden insgesamt 138 Seren von PBC, PSC und AIH getestet und die Ergebnisse in Tabelle 18 gegenübergestellt. Im Kollektiv der AIH ließen sich die höchsten Antikörpertiterwerte nachweisen, gefolgt von

den AK-Titern der PBC-Seren. Die Tabelle 18 zeigt neben den Optischen Dichten (ODx1000) auch den Anteil der pos. Seren im jeweiligen Kollektiv. In der Gruppe der AIH ließ sich mit 81% der höchste Anteil an Thromboplastin-AK nachweisen, überwiegend hier die Immunglobuline der Klasse IgG und IgM. Wie in Tabelle 18 zusammengefasst, zeigen sich mit dem Thromboplastingemisch der Firma Sigma höhere Antikörpertiter als auch ein höherer Anteil positiver Seren im Vergleich zum Thromboplastingemisch der Firma Baxter (56-81% vs 31-51%). Demgegenüber liegen die prozentualen Anteile der positiven Seren für Cardiolipin,  $\beta$ 2-GP1 und Phosphatidylserin in einem ähnlichen Bereich um 30% bei PBC und PSC, um 50% bei AIH. Auffällig ist bei allen drei Kollektiven ein erhöhter Anteil der Immunglobulinklasse IgA. Die Mittelwerte der chron. Lebererkrankungen wurden statistisch sowohl mit APS als auch mit NRH verglichen. Mit Ausnahme von einzelnen Wertepaaren liegen größtenteils keine signifikanten Unterschiede zu den Mittelwerten des NRH-Kollektivs vor.

*Tabelle 17: Köln-Patienten und Kontrollen*

Antikörper	Immunglobulin- klassen	Titer(Odx1000) – Mittelwerte / (Pos. Seren in %)	
		Köln Patienten n=100	Köln Kontrollen n=100
<u>APA 1</u>	Ges.	36%	49%
	IgG *	65 (7%)	61 (4%)
	IgM	*106 (23%)	141 (41%)
	IgA	*29 (19%)	30 (14%)
<u>APA 2</u>	Ges.	25%	36%
	IgG	53 (3%)	68 (8%)
	IgM	*99 (8%)	150 (19%)
	IgA *	22 (21%)	22 (26%)
<u>CL</u>	Ges.	40%	27%
	IgG	22 (15%)	20 (2%)
	IgM *	*36 (8%)	42 (17%)
	IgA	12 (27%)	9 (21%)
<u><math>\beta</math>2-GP 1</u>	Ges.	11%	28%
	IgG *	*43 (2%)	44 (7%)
	IgM *	*76 (3%)	103 (5%)
	IgA *	20 (9%)	21 (22%)
<u>Phos</u>	Ges.	35%	39%
	IgG *	*36 (1%)	44 (5%)
	IgM *	*62 (3%)	83 (5%)
	IgA *	*14 (35%)	9 (36%)

Wertepaare mit einem signifikanten Unterschied zwischen Köln Patienten und Kontrollen wurden in der Spalte Immunglobuline mit einem \* markiert. Zusätzlich wurden die jeweiligen Mittelwerte mit den Mittelwerten des APS-Kollektivs verglichen. Hierbei wurden signifikant unterschiedliche Werte mit einem # markiert.

Tabelle 18: Chron. Lebererkrankungen

Antikörper	Immunglobulin- klassen	Titer(Odx1000) – (pos.Seren in %)		Mittelwerte	
		PBC n=71	PSC n=27	AIH n=40	
<u>APA 1</u>	Ges.	75%	56%	81%	
	IgG	117 (45%)	*107 (33%)	*153 (63%)	
	IgM	145# (45%)	*114 (33%)	*152 (54%)	
	IgA	49 (49%)	*41 (41%)	40 (42%)	
<u>APA 2</u>	Ges.	31%	33%	51%	
	IgG	62# (7%)	57 (4%)	*69 (15%)	
	IgM	*119 (14%)	*104 (7%)	*149# (22%)	
	IgA	22 (24%)	23 (33%)	30 (46%)	
<u>CL</u>	Ges.	32%	30%	59%	
	IgG	*24 (4%)	*16 (7%)	*29# (15%)	
	IgM	*45 (11%)	*32 (0%)	*50# (24%)	
	IgA	13 (27%)	9 (26%)	14 (49%)	
<u>ß2-GP 1</u>	Ges.	30%	19%	46%	
	IgG	*57# (21%)	65 (15%)	*47 (5%)	
	IgM	96 (10%)	90 (4%)	*103 (10%)	
	IgA	21 (14%)	*17 (4%)	31 (44%)	
<u>Phos</u>	Ges.	44%	30%	54%	
	IgG	*46# (3%)	*40 (4%)	*53 (5%)	
	IgM	*60 (1%)	*41 (4%)	*88# (7%)	
	IgA	15# (44%)	10 (26%)	*16# (49%)	

Alle mit \* - markierten Werte zeigen einen signifikanten Unterschied gegenüber APS, alle mit # - markierten Werte weisen auf einen signifikanten Unterschied zu NRH auf.

### 3.3. Noduläre regenerative Hyperplasie

Die Gruppe der Patienten mit nodulärer regenerativer Hyperplasie (NRH) wurde ausgewählt durch die histologischen Ergebnisse von Prof. Dr. Bianchi (Freiburg/Hofstetten). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass ausschließlich

Patienten mit einer gesicherten NRH in das Kollektiv aufgenommen wurden. Die nachfolgende Tabelle 19 stellt die Ergebnisse der einzelnen Testtage (erster Versuch am 3.8.98, 2. Versuch am 9.11.98 und abschließend alle Seren gemeinsam) und bei Patienten mit NRH sowie histologisch gesicherter NRH mit und ohne histolog. Zeichen einer PBC dar. Die höchsten AK-Titer ließen sich mit Thromboplastin I als Antigen und allgemein bei allen Antikörperspezifitäten für die Immunglobulinklasse IgM nachweisen. Ebenso spiegelt sich in den Ergebnissen die Problematik der Mehrfachtestung wider. Durch das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Seren scheinen Antikörper zerstört zu werden, was durch die im Verlauf abfallenden Titermittelwerte (ODx1000), besonders bei Thromboplastin, zum Ausdruck kommt.

*Tabelle 19: NRH – ODx1000*

Antikörper		Titer(ODx1000)-				
		Mittelwerte				
		NRH				
		03.08.1998	09.11.1998	alle Seren	NRH ohne PBC	NRH mit PBC
		n=16	n=16	n=24	n=20	n=4
APA1	IgG	103	74	110	134	216
	IgM	182	154	*87	180	124
	IgA	38	50	32	52	55
APA2	IgG	98	67	48	60	31
	IgM	146	146	*74	94	53
	IgA	28	34	33	26	34
CL	IgG	22	31	26	27	29
	IgM	52	44	65	52	38
	IgA	8	16	11	13	21
β2-GP1	IgG	37	80	*50	64	84
	IgM	114	85	73	115	67
	IgA	33	29	21	25	26
Phos	IgG	43	72	*38	48	52
	IgM	72	69	*62	93	58
	IgA	8	10	6	13	13

Im statistischen Vergleich der Mittelwerte-Titer zwischen NRH und APS wurden signifikant unterschiedliche Werte mit \* markiert. Mit Ausnahme von APA1-IgM, APA2-IgM, β2-GP1-IgG und Phos-IgG/M zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zu den Mittelwerten des APS Kollektivs.

Einen Überblick über den prozentualen Anteil der Antikörper-positiven Seren liefert die folgende Tabelle 20. Sie zeigt die Häufigkeiten der Antikörper aller Immunglobulinklassen gesamt, sowie der Klassen im einzelnen für die fünf Antikörpergruppen (Thromboplastin 1, Thromboplastin 2, Cardiolipin,  $\beta$ -Glykoprotein1 und Phosphatidylserin). Besonders fällt neben dem hohen Anteil der Antikörper gegen Thromboplastin1 der Firma Sigma ein hoher Anteil an Antikörpern gegen  $\beta$ -Glykoprotein1 auf. Hier ist jedoch darauf zu verweisen, dass der hohe Nachweis an Antikörpern der Immunglobulinklasse IgA nur eingeschränkt zu bewerten ist, da sich diese AK als unspezifisch und instabil erwiesen haben.

*Tabelle 20: NRH – proz. Anteil der AK*

<b>Antikörper</b>		<b>pos. Seren</b>				
		<b>in %</b>				
		<b>NRH</b>				
		<b>03.08.1998</b>	<b>09.11.1998</b>	<b>alle Seren</b>	<b>NRH ohne PBC</b>	<b>NRH mit PBC</b>
		n=16	n=16	n=24	n=20	n=4
<u>APA1</u>	<u>ges.</u>	75%	63%	63%	40%	25%
	IgG	44%	13%	33%	20%	25%
	IgM	63%	50%	42%	5%	25%
	IgA	25%	31%	25%	15%	25%
<u>APA2</u>	<u>ges.</u>	75%	50%	54%	20%	25%
	IgG	56%	19%	42%	5%	25%
	IgM	25%	19%	17%	10%	0%
	IgA	56%	44%	42%	15%	25%
<u>CL</u>	<u>ges.</u>	31%	50%	33%	25%	100%
	IgG	13%	19%	13%	10%	25%
	IgM	19%	13%	13%	15%	0%
	IgA	19%	56%	21%	15%	100%
<u><math>\beta</math>2-GP1</u>	<u>ges.</u>	50%	38%	42%	15%	25%
	IgG	0%	25%	4%	0%	25%
	IgM	25%	6%	17%	5%	0%
	IgA	44%	38%	33%	10%	25%
<u>Phos</u>	<u>ges.</u>	44%	38%	33%	15%	75%
	IgG	0%	19%	0%	0%	0%
	IgM	6%	6%	4%	5%	0%
	IgA	38%	19%	29%	10%	75%

Ebenso wurden diese Seren mit dem Verdünnungspuffer FCS und kommerziellen Testkits getestet. Tabelle 21 zeigt die Gegenüberstellung der einzelnen Ergebnisse. Mit FCS als Verdünnungspuffer und somit unter Zugabe des Cofaktors  $\beta$ -Glykoprotein1

ließ sich der Anteil der positiven Seren für Cardiolipin-Antikörper fast verdoppeln (60% vs. 33%, siehe Tabelle oben). Die kommerziellen Testkits zeigten einen geringeren Anteil positiver Seren für den Nachweis von Cardiolipin-AK als auch für  $\beta$ -Glykoprotein1-AK (CL 22% bzw. 44% vs. 50%;  $\beta$ 2-GP1 18% vs 42%).

*Tabelle 21: NRH mit FCS und Testkits*

Antikörper		NRH			
		FCS 12/98 n=16	FCS 11/99 n=20	Varelisa n=22	Hiss n=22
CL	ges.	69,00%	60,00%	23,00%	41,00%
	IgG	25	50	18	27
	IgM	38	20	18	27
	IgA	44	0	9	5
$\beta$ 2-Glykopopr.	ges.			18,00%	18,00%
	IgG			14	9
	IgM			14	14
	IgA			5	14

Abschließend lässt sich im Vergleich der einzelnen Kollektive sagen, dass Patienten mit NRH vergleichbar erhöhte Serumtitere für Antiphospholipidantikörper wie Patienten mit chronischen Lebererkrankungen und APS aufweisen. Von entscheidender Bedeutung scheinen bei fast allen Kollektiven Antikörper gegen Thromboplastin und hier vorwiegend der Immunglobulinklasse IgM zu sein.

## **4. Diskussion**

### Antiphospholipidsyndrom

Das Antiphospholipidsyndrom ist ein komplexes Krankheitsbild, bei dessen Entstehung eine Vielzahl immunologischer Faktoren beteiligt sind und dessen Ursache noch immer nicht vollständig geklärt werden konnte. Es wurden verschiedene Untergruppen der Phospholipide identifiziert, zu ihnen zählen Cardiolipin,  $\beta$ 2-Glykoprotein1 und Phosphatidylserin. Ihre Bedeutung bei einzelnen klinischen Symptomen im Rahmen des APS wurde im Vergleich zu anderen autoimmunen Lebererkrankungen und Kollagenosen untersucht. Dabei konnten sowohl innerhalb der Antigene als auch unter den Immunglobulinisotypen unterschiedliche Häufigkeiten bei speziellen Krankheitsbildern gezeigt werden.

#### 4.1. Methoden

##### a) Problematik der Methoden im Vergleich

Es hat sich gezeigt, dass die Suche nach Antikörpern gegen Thromboplastin ein gutes Screeningverfahren für APA im Allgemeinen ist, da diese Antigenfraktion alle Hauptantigene, wie Cardiolipin,  $\beta$ 2-Glykoprotein1, Phosphatidylserin und andere nicht identifizierte Phospholipide und phospholipid-bindende Proteine, zu enthalten scheint.

Es gibt eine gute Korrelation insbesondere zwischen positiven Ergebnissen für Thromboplastin- und  $\beta$ 2-GP-Antikörper. Im Gegensatz dazu können Cardiolipin-AK gelegentlich fehlen, wenn Thromboplastin als Antigen verwendet wird. Ursächlich hierfür ist eine niedrige Cardiolipinkonzentration in dieser Fraktion. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit für das separate Testen der verschiedenen APA-Untergruppen zum Nachweis von APA in einer bestimmten Erkrankung (1,41).

Im immunpathologischen Labor der Med. Klinik Tübingen werden für den ELISA Maxisorp-Mikrotiterplatten verwendet. Die Firma Nunc bietet zusätzlich Polysorp-Mikrotiterplatten an. Maxisorp-Mikrotiterplatten haben eine hohe Affinität zu

Molekülen mit gemischten hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Polysorp-Mikrotiterplatten sind weniger polar als Maxisorp-Mikrotiterplatten und haben eine Affinität zu mehr hydrophoben Molekülen. Dadurch eignen sie sich besonders zum Nachweis von Antikörpern gegen Lipide und Lipoproteine. Im direkten Vergleich beider Plattensysteme in verschiedenen Testreihen zeigten die Polysorp-Mikrotiterplatten eine deutlich geringere Backgroundreaktion bei sonst vergleichbaren Testergebnissen.

Als Beschichtungspuffer wurden PBS und Bicarbonatpuffer gegenübergestellt. Es zeigte sich mit PBS als Beschichtungspuffer in mehreren Testreihen ein höherer spezifischer Titer der Patientenseren bei geringerer unspezifischer Reaktion.

Ausgewählte Seren der Kollektive APS, PBC und NRH dienten zum Vergleich des BSA- gegenüber dem FCS-Serumverdünnungspuffers. Es erfolgte eine Testung auf Cardiolipin- und  $\beta$ 2-Glykoprotein1-AK vom IgG, IgM und IgA-Typ. Mit dem FCS-Verdünnungspuffer ließen sich gegenüber dem BSA-Verdünnungspuffer bei den Cardiolipin-AK höhere Werte vor allem bei den IgG- und IgM-Antikörperklassen nachweisen.

#### b) Korrelation mit der Klinik

Für die getesteten Patientenkollektive wurden Seren verwendet, welche von Kliniken aus ganz Deutschland zur Antikörpertestung in das Immunpathologische Labor Tübingen gesendet wurden. Unter Angabe klinischer und patientenbezogener Daten wurden diese registriert und in der wöchentlichen Routinetestung untersucht. Anschließend wurden sie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Kühlschränken gelagert.

Die beste Korrelation zwischen Klinik und Testergebnis zeigte die Thromboplastin1-Antigenmischung der Firma Sigma. Dies wird besonders in der Gruppe der Kollagenosen deutlich. So konnten z.B. im Patientenkollektiv Lupus erythematoses bei 83% der Erkrankten Antikörper gegen Thromboplastin der Firma Sigma nachgewiesen werden (37% Positive bei APA der Firma Baxter). Im Kollektiv des Antiphospholipidsyndroms ließen sich sogar in 90% der Fälle Antikörper gegen Thromboplastin der Firma Sigma nachweisen (41% Positive bei APA der Firma Baxter).



Wie bereits eingangs schon erwähnt handelt es sich bei Thromboplastin um eine Mischung aus verschiedenen Antigenen, wie Cardiolipin,  $\beta$ 2-Glykoprotein1 und Phosphatidylserin, sowie nicht identifizierten Phospholipiden und phospholipidbindenden Proteinen. Somit wird deutlich, dass sich diese Antigenmischung sehr gut für den Einsatz in Screeningverfahren eignet. Da jedoch ein Mangel an Spezifität besteht, ergibt sich konsequenterweise die Notwendigkeit weiterer Tests unter Verwendung von Antigen-Einzelkomponenten. Aufgrund der höheren Kosten für diese Einzelkomponenten empfiehlt sich zunächst ein Screeningtest mit Thromboplastin (Antigengemisch) und im Anschluß daran als „Bestätigungstest“ zur weiteren Differenzierung die Testung auf Einzelkomponenten.

#### c) Faktoren, die den Nachweis von APA beeinflussen

Ein Problem ist die Fluktuation der Antikörper im Verlauf. Grundsätzlich muß man zwei Hauptgruppen von Antiphospholipidantikörpern unterscheiden. Sie werden entsprechend ihrer Assoziation zu autoimmunen oder infektiösen Konditionen klassifiziert. Autoimmune Antikörper sind im allgemeinen gegen das phospholipidbindende Protein  $\beta$ 2-Glycoprotein1 gerichtet. Alloimmune Antiphospholipidantikörper werden bei chronischen Infektionen wie Malaria, Syphilis, Lepra, Tuberkulose und Parvovirusinfektionen gefunden. Diese binden nicht an das  $\beta$ 2-Glykoprotein1 direkt, sondern sind gegen einen Komplex aus anionischen Phospholipiden und  $\beta$ 2-Glykoprotein1 gerichtet (37).

Autoimmune Antikörper (APA) zeigen häufig innerhalb eines akuten Krankheitsschubes keine erhöhten Seruntiter, da z. Bsp. eine Bindung von Antikörpern an bestimmte Targetstrukturen erfolgt. Der fehlende Nachweis dieser Antikörper schließt eine Autoimmunerkrankung also nicht aus. Zur Sicherung der Diagnose sind mehrere Antikörperkontrollen im Verlauf, d.h. während und außerhalb eines akuten Krankheitsschubes notwendig. Es wird auch ein sogenanntes APA-negatives APS beschrieben, das die klinischen Manifestationen des APS ohne die entsprechenden Antikörper aufweist (25,68).

APA sind ohne sichere diagnostische Bedeutung in unterschiedlicher Häufigkeit auch bei chron. Polyarthritiden, juveniler rheumatoider Arthritis, Sklerodermie, Sjögren-

Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis und Morbus Behcet beschrieben worden. Ferner treten sie gehäuft, meist ohne klinisches Korrelat, nach der Einnahme bestimmter Medikamente auf. Bemerkenswert ist ihr häufiges Vorkommen bei gesunden älteren Probanden (in 51% der Fälle bei einem mittleren Alter von 81Jh) sowie der passagere Nachweis bei akuten Infektionen, besonders bei AIDS-Patienten (27,56).

Im Rahmen unserer Testreihen wurden einige Patientenserum mehrfach untersucht. Dabei zeigte sich bei gleichen Testbedingungen ein mit der Anzahl der Untersuchungen abnehmender Serumtitertiter (Ergebnisse nicht dargestellt). Als Ursache werden Veränderungen, evtl. sogar eine Zerstörung der Antikörper durch das wiederholte Auftauen und Einfrieren gesehen.

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Höhe der Antikörpertiter ist der in den Testserien verwendete Antigen- und Beschichtungspuffer. Zur Antigenbeschichtung wurde von uns ein PBS-Verdünnungspuffer eingesetzt und zur Serumverdünnung ein mit BSA und Triton gemischter PBS-Puffer. Als Waschpuffer 1&2 dienten ebenfalls mit BSA versetzte PBS-Puffer (Waschpuffer2 zusätzlich plus Triton). In einer gesonderten Kontrollreihe wurden ausgewählte Seren mit einem mit FCS angereicherten Puffer auf Cardiolipin- und  $\beta$ 2-Glykoprotein1-AK getestet (FCS- Puffer für CL und  $\beta$ 2GP1 zur Verdünnung der Serumproben). Hintergrund hierfür war das im FCS reichlich vorhandene  $\beta$ 2-Glykoprotein1, welches bei Autoimmunerkrankungen in der Reaktion zwischen Cardiolipin und Cardiolipin-Antikörpern als Cofaktor dient.

Ordi et al untersuchten 1992 Anticardiolipin-AK und ihre Abhängigkeit von einem Serum-Cofaktor. Dabei stellten sie einem Standard-ELISA, unter der Verwendung von FCS im Blockungs- und Serumverdünnungspuffer, einen modifizierten ELISA, unter der Verwendung von BSA statt FCS, gegenüber. Er vermutete, dass durch die Bindung von Cardiolipin-Antikörpern an einen Cardiolipin-Cofaktor-Komplex ein Mangel des Cofaktors im Serum entsteht. Dadurch kommt es zu einem Mangel in der physiologischen Hemmung der Gerinnung, insbesondere im intrinsischen Gerinnungspfad, ebenso wie zu einer Zunahme der Plättchenaggregation. Bei Patienten mit Syphilis führt das Fehlen des Cofaktors zu einem Anstieg der Cardiolipin-Antikörper-Aktivität. Dies könnte durch einen Epitop-Block auf dem an den Cofaktor gebundenen Cardiolipin-Antigen erklärt werden, da in Abwesenheit des Cofaktors mehr freie Bindungsstellen für Cardiolipin-Antikörper zur Verfügung stehen (63).

Für den Serum-Cofaktor, welcher als  $\beta$ 2-Glykoprotein1 identifiziert wurde, wurden verschiedene physiologische Funktionen beschrieben: Hemmung des intrinsischen Gerinnungspfad, der Adenosin-Diphosphat(ADP)-vermittelten Plättchenaggregation und der Prothrombinaseaktivität der aktivierten Plättchen. Desweiteren wurde ein heterogenes Verhalten von Cardiolipin-Antikörpern gegenüber  $\beta$ 2-GP1 beschrieben. Man weiß, dass 2 unterschiedliche Typen der CL-AK existieren:  $\beta$ 2-GP1 abhängige und  $\beta$ 2-GP1 unabhängige CL-AK. Ihn et al schrieb den ersten Report über die Bestimmung von Cardiolipin-AK durch einen ELISA unter der Verwendung von gereinigtem  $\beta$ 2-GP1. In früheren Berichten über die Bestimmung von Cardiolipin-AK variierten die Prävalenzen der aCL sehr stark, was in den unterschiedlich verwendeten Menge an FCS (welches unterschiedliche Mengen an  $\beta$ 2-GP1 enthält) begründet ist (33).

Wir untersuchten Patientenseren der Kollektive APS (n=8), NRH (n=24) und PBC (n=17) im Standard-ELISA unter der Verwendung von FCS im Vergleich zur Verwendung von BSA. Dabei konnten im FCS-ELISA signifikant mehr Cardiolipin-AK vom IgG und IgM-Typ nachgewiesen werden. Daraus kann gefolgert werden, dass durch den Zusatz von FCS neben reinen Cardiolipin-AK auch Antikörper nachgewiesen werden, die an einen Komplex aus Cardiolipin und  $\beta$ 2-GP1 binden, also sog. Cofaktor-abh. Cardiolipin-AK.

In den Voruntersuchungen konnte durch das Gegenüberstellen von Poly- und Maxisorpmikrotiterplatten, sowie Bicarbonat- und PBS-Puffer gezeigt werden, dass eine höhere Spezifität (genauere Testergebnisse, d.h. höhere positive Titer bei geringerer Backgroundreaktion) durch die Verwendung von Polysorpmikrotiterplatten und PBS-Puffer zur Serum- und Antigenverdünnung erzielt werden konnte.

Desweiteren wurden 4 bekannte Seren mit unterschiedlichem Antikörpergehalt in absteigender Konzentration von 25 bis 3200facher Verdünnung getestet. Dabei war für die AK-Isotypen IgG und IgM die beste Differenzierung der einzelnen Seren entsprechend ihrer bekannten hohen Antikörperkonzentrationen ohne hohe Nebenreaktionen bei einer Serumverdünnung von 1:800 zu sehen. Für Antikörper der Klasse IgA zeigte sich dies bei einer Serumverdünnung von 1:400, so dass für alle weiteren Tests diese Serumverdünnungen verwendet wurden.

Bezüglich der Antigen-Konzentrationen wurden die in den bereits hausinternen Testverfahren etablierten Konzentrationen eingesetzt.

Von den drei Antikörperisotypen IgG, IgM und IgA wurden die IgA-AK am stärksten durch äußere Faktoren (Inkubationstemperatur, Luftfeuchtigkeit etc.) beeinflusst. Bei mehrfachen Testreihen mit einem Patientenserum zeigten sich insbesondere die IgA-Antikörper rückläufig, sodass von einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Auftauen und Einfrieren auszugehen ist. (Ergebnisse nicht dargestellt)

d) Festlegen von Normwerten anhand Kontrollen,  
Diskussion positiver Befunde

Als Kontrollgruppe wurden 40 Seren von gesunden Blutspendern untersucht (Alter 19-63, 40% Männer, 60% Frauen). Bei 5% dieser Seren ließen sich Antiphospholipidantikörper nachweisen. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über das Vorkommen von Antiphospholipidantikörpern in der gesunden Bevölkerung. Dabei reichen die Zahlen von 4%-8% (25,37). Deutlich positive Befunde in den Testreihen mit Normalseren wurden zur Bestimmung der Normwerte nicht mit einbezogen. Der Nachweis von Antiphospholipid-AK lässt sich zum einen durch die bereits zuvor erwähnte geringe Rate positiver AK-Titer in der Normalbevölkerung erklären, in Einzelfällen müsste jedoch auch an die spätere Entwicklung einer Autoimmunerkrankung (Kollagenose oder APS) gedacht werden. Hier würden prospektive Untersuchungen Aufschluß geben.

e) Vergleich mit anderen Publikationen

Antiphospholipid-Antikörper werden heute als Antikörper gegen negativ geladene Phospholipide immunologisch im ELISA nachgewiesen (6,8,37,46).

Im Jahre 1983 entwickelte Harris et al einen solid-phase immunoassay und später einen ELISA zum direkten Nachweis cardiolipin-bindender Antikörper (29,47). Aufgrund der Feststellung, dass Cardiolipin die antigene Komponente der serologischen Syphiliteste ist, wurde dieser Assay entwickelt, um die Detektionssensitivität für Anticardiolipinantikörper bei Patienten mit SLE zu verbessern.

Seither werden verschiedenste Variationen dieses ursprünglichen ELISA eingesetzt, in zunehmendem Maße auch industrielle ELISA-Testkits. Übereinstimmend werden meist

PBS- und BSA-Puffer zur Antigenverdünnung, p-Nitrophenylphosphat als Substrat, anti-human IgG, M und A, sowie abschließend eine Optische Dichte von 405nm verwendet. Die Seren werden auf Mikrotiterplatten in Doppelbestimmung getestet (57). In der Vielzahl der Literatur lassen sich jedoch beliebig weitere Varianten des Standard-ELISA finden. In den letzten Jahren wurde ein heterogenes Verhalten von Anticardiolipin-AK gegenüber  $\beta$ 2-Glycoprotein1 beobachtet. Heute weiß man, dass  $\beta$ 2-Glycoprotein1 abhängige und  $\beta$ 2-Glycoprotein1 unabhängige Anticardiolipinantikörper existieren. Aufgrund dieser Tatsache wurde bei der Bestimmung von Cardiolipin-Antikörpern als weiterer Puffer FCS (fetal calf serum), welches  $\beta$ 2-Glycoprotein1 enthält, eingesetzt (23,33,63). In zunehmendem Maße steigt die Zahl der Standard-ELISA- Teste, welche  $\beta$ 2-GP1 zur Unterscheidung von autoimmunen aCL-AK und natürlich vorkommenden aCL-AK, die zur direkten Bindung an Cardiolipin kein  $\beta$ 2-GP1 benötigen, einsetzen. Kandiah et al mutmaßt, dass diese neuen  $\beta$ 2-GP-Immunoassays aufgrund ihrer verbesserten Spezifität die konventionellen aCL-Immunoassay verdrängen könnten. Sie werden sie jedoch aufgrund ihrer relativ hohen Kosten nicht vollständig ersetzen (37).

1995 untersuchte Cabiedes et al 94 Patienten mit SLE auf Antikörper gegen  $\beta$ 2-Glycoprotein1 mittels Elisa, dot blot und Western blot. 35 von 39 SLE-Patienten (90%) mit klinischen Manifestationen eines APS hatten  $\beta$ 2-GP1-Antikörper und alle 35 Patienten wiesen vaskuläre Manifestationen auf. Das APS scheint also stark mit dem Vorkommen von  $\beta$ 2-GP1-Antikörpern assoziiert zu sein und diese AK wiederum mit dem Auftreten vaskulärer Komplikationen (13).

#### 4.2 Klinische Aspekte

##### a) Bestätigung bekannter Befunde (Validität des Testes)

Das APS definiert sich neben den bereits im Vorfeld genannten klinischen Faktoren auch über das Vorhandensein von Antiphospholipid-AK, in der Literatur meist von Anticardiolipin-AK. Wir haben 63 Patienten mit klinischen Hinweisen auf APS getestet und konnten bei 90% Thromboplastin-AK, bei 67% Anticardiolipin-AK und bei 21%  $\beta$ 2-GP1-AK nachweisen.

Bei 41 untersuchten Patienten mit einem Lupus erythematoses ließen sich in 83% Antiphospholipidantikörper, 39% Anticardiolipin-AK und 24%  $\beta$ 2-GP1-AK nachweisen.

Diese Ergebnisse korrelieren sowohl mit den klinischen Symptomen der Patienten als auch mit der Fachliteratur. Hier reichen die Nachweis-Angaben von 100% für Antiphospholipid-AK beim PAPS, ca. 70% für Cardiolipin-AK bei APS/SLE und 17-61% für Antiphospholipid-AK beim SLE (25,68). In einer 1994 durchgeführten Testreihe waren von 102 SLE-Patienten 48% aPL positiv, davon zeigten wiederum 46% Anticardiolipinantikörper (24).

In dem 1998 veröffentlichten Update der APA konnten bei Patienten mit klinischen Manifestationen eines APS in einer Metaanalyse in 89%  $\beta$ 2-GP1-AK nachgewiesen werden (65).

In der ersten klinischen Studie, welche die Rolle von  $\beta$ 2-Glykoprotein1-Antikörpern bei der Thromboseentstehung untersuchte, zeigten 36% der SLE-Patienten  $\beta$ 2-Glykoprotein1-Antikörper (81). In einer 1997 durchgeführten Studie von Guerin et al. zeigten von 29 Patienten mit APS 100% signifikant erhöhte Antikörpertiter für  $\beta$ 2-Glykoprotein1-AK (median = 91AU). Dagegen wurden bei 20 Patienten mit SLE nur bei 5% erhöhte Antikörpertiter für  $\beta$ 2-GP1-AK beobachtet (median = 4AU). Anticardiolipin-Antikörper ließen sich bei 100% der Patienten mit APS und bei 30% der Patienten mit SLE nachweisen (26). Ebenfalls 1997 konnten Font et al. bei 92 Patienten mit SLE in 35% Thromboplastin-Antikörper nachweisen (14% IgG, 14% IgM, 7% IgG und IgM) (22).

#### b) rheumatische Erkrankungen

Von der Universitätskinderklinik Hamburg erhielten wir klinische Daten und Seren von 189 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, u.a. rheumatische und psoriatische Arthritis, Spondylarthritis, JRA und Polyarthritits nodosa. Es zeigten sich in 50% positive Antikörpertiter gegen Thromboplastin und in 33% gegen Cardiolipin. Dies entspricht den bisher veröffentlichten Daten. In der Literatur finden sich Angaben für den Nachweis von APA zwischen 8-49% bei chron. Polyarthritits, 53% bei juveniler chron. Arthritis und 11-28% bei Arthritis psoriatica (25). Guerin et al konnte 1997 in

einem ELISA zeigen, dass Patienten mit positivem Rheumafaktor erhöhte Antikörpertiter gegen Cardiolipin haben, jedoch keine Antikörper gegen  $\beta$ 2-Glykoprotein1 nachweisbar waren (26). Gromnica-Ihle wies bei 134 Patienten mit chronischer Polyarthritits in 19% aPL nach, es handelte sich immer um aCL (24).

c) Erkrankungen bei denen vaskuläre Prozesse diskutiert werden:

Tinnitus etc, habituelle Aborte, Mütter mit „small for date“- Babies

Das APS wird neben dem Vorkommen von Antiphospholipidantikörpern durch die klinischen Symptome Thrombozytopenie, Thrombose und rezidivierende Aborte definiert.

Wir untersuchten daher 41 Patienten mit habituellen Aborten, 49% hatten Cardiolipin-Antikörper, davon 29% IgG-aCL, 34% IgM-aCL und 22% IgA-aCL. Thromboplastin-AK zeigten sich bei 24% und  $\beta$ 2-Glykoprotein-AK bei 32% der Patienten. 1994 untersuchten Gromnica-Ihle und Franz 102 Patienten mit SLE auf das Auftreten von Thrombosen und Aborten in Abhängigkeit zum Vorhandensein von Antiphospholipidantikörpern. Unter 89 Patienten waren 19 mit habituellen Aborten, davon 68% mit positiven aPL. Interessant ist die Tatsache, dass alle Patientinnen mit Fehlgeburten im 3. Trimenon aPL aufwiesen. Venöse und/oder arterielle Thrombosen traten bei 34 Patienten auf, wovon bei 76% aPL nachweisbar waren. Der Zusammenhang zwischen Thrombosen und Abort erklärt sich dadurch, dass die Abortneigung der Patientinnen mit einer Plazentainfarzierung durch Thrombosen in Verbindung gebracht wird (24).

Matzner et al untersuchte 352 Frauen mit habituellen Aborten mittels eines ELISA auf Antiphospholipidantikörper. 59,1% hatten IgM- oder IgG-Antikörper gegen einen der 6 untersuchten Phospholipide. In der Kontrollgruppe fanden sich lediglich bei 4,6% Antiphospholipidantikörper (54). In einer Studie von Marzusch et al wird vermutet, dass Phosphatidylserin-AK insbesondere vom IgM-Typ, als Inhibitoren der Plazentaformung wirken und somit habituelle Aborte mitbedingen können. Von den untersuchten 38 Patientinnen hatten 37 (97%) aPL vom IgM-Typ (51).

Obwohl die Debatte noch anhält, ob der Nachweis von aPL eine aktuelle Voraussage eines Schwangerschaftsabbruches (Fehlgeburt) darstellt, stimmen die meisten Autoren

zu, dass deren Detektion bei schwangeren Patientinnen einen Risikofaktor darstellt. Demnach scheint es möglich, dass der potentiell nachteilige Einfluß dieser Antikörper im Bereich der mütterlichen die Plazenta versorgenden Gefäße wirksam wird. Jedoch können Antiphospholipidantikörper auch in normalen und erfolgreichen Schwangerschaften vorkommen.

Prospektive Untersuchungen bei SLE-Patientinnen zeigen, dass die Abortrate in 59% der Fälle mit Anticardiolipin-Antikörpern erhöht war (Kontrollen 5%). Es ist jedoch zu bedenken, dass die klinisch fassbaren Symptome nur gering mit der Titerhöhe der Anticardiolipin-Antikörper korrelieren. Wahrscheinlich ist den IgG Antikörpern eine höhere Pathogenität zuzumessen als Antikörpern der IgM-Klasse (27).

In einer Zusammenfassung über das Antiphospholipidsyndrom von Gromnica-Ihle finden sich bei rezidivierenden Aborten ohne Grunderkrankung (z.B. SLE) in 5-7% APA. Während bei Patientinnen mit SLE und hohen Titern von aCL-IgG die Wahrscheinlichkeit eines Spontanabortes groß ist - es werden in der Literatur Angaben von 50-85% gemacht - scheint das Risiko einer Schwangerschaftskomplikation in Normalkollektiven mit oder ohne positive APA nicht wesentlich different zu sein. Für die Schwangerschaftskomplikationen werden Plazentagefäßverschlüsse und Infarkte verantwortlich gemacht. Doch nicht in allen Fällen ließen sich in der Plazenta diese Veränderungen nachweisen, sodass weitere Mechanismen diskutiert werden (25).

Mit diesem Hintergrund haben wir 100 Seren von Müttern mit untergewichtigen Neugeborenen, sog. „small for date-babies“, auf Antiphospholipidantikörper untersucht. Es ließen sich in 36% Thromboplastin-Antikörper, davon 23% vom IgM-Typ, und in 40% Cardiolipinantikörper nachweisen.

Als Kontrollkollektiv dienten 100 Seren von Müttern mit normalgewichtigen Neugeborenen. Hier war die Inzidenz der Antiphospholipidantikörper mit 10 bis 15% deutlich niedriger. Signifikant höhere Titermittelwerte ließen sich jedoch in der Gruppe der Köln-Patienten nicht nachweisen.

Der Nachweis dieser Antikörper könnte bei Müttern mit untergewichtigen Neugeborenen als Hinweis dienen, dass im Bereich der Plazentagefäße vaskuläre Prozesse ablaufen, sei es thrombotischer oder vaskulitisch/entzündlicher Natur, welche über eine Minderdurchblutung der Plazentagefäße zu einer Minderversorgung des Fetus führen. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch unklar.



Zu den zumindest teilweise vaskulitisch bedingten Erkrankungen gehören wahrscheinlich auch Epilepsie, Tinnitus, Innenohrschwerhörigkeit, Hörsturz und Uveitis. Wir untersuchten insgesamt die Seren von 204 Patienten auf Antiphospholipidantikörper. Im Kollektiv der Tinnituspatienten (41 Pat.) zeigten sich bei 51% Thromboplastinantikörper, im Kollektiv der Hörsturzpatienten (40 Pat.) bei 50% Thromboplastinantikörper und 36% Cardiolipinantikörper. Bei 41 Patienten mit Uveitis ließen sich bei 59% Thromboplastinantikörper und 51% Cardiolipinantikörper nachweisen. Im Kollektiv der Innenohrerkrankungen (41 Pat.) wurden bei 39% Thromboplastinantikörper und bei 39% Cardiolipinantikörper nachgewiesen. Zusätzlich untersuchten wir die Seren von 41 an Epilepsie leidenden Patienten, hier zeigten sich bei 44% Thromboplastinantikörper, bei 61% Cardiolipinantikörper und bei 29%  $\beta$ -Glykoproteinantikörper. Durch den Nachweis der Antiphospholipidantikörper wird als Ursache dieser Erkrankungen zum einen eine Vaskulitis, zum anderen arterielle Gefäßverschlüsse diskutiert.

In einer prospektiven Studie von Patienten mit fokaler cerebraler Ischämie ohne eine zugrundeliegende Autoimmunerkrankung, wiesen erhöhte IgG-Anticardiolipinantikörpertiter in einem Standard-ELISA ( $< 14\text{GPL units}$ ) auf ein doppelt erhöhtes Risiko für ein späteres thromboocclusives Ereignis (peripher oder zentral) oder gar Tod hin. Begrenzte cerebrovasculäre histopathologische Daten lassen vermuten, dass die Gefäßabnormalitäten beim Antiphospholipidsyndrom durch eine vermehrte Bildung von Fibrinthromben in kleinen und mittleren Gefäßen ohne das Vorhandensein einer Vaskulitis entstehen. Die Ätiologie der Epilepsie hingegen ist multifaktoriell, obwohl diese ein bekanntes klinisches Erscheinungsbild bei SLE-Patienten ist. Bluthochdruck, Infektionen, cerebrale Ischämie und Vaskulitis sind alle in die Entstehung der Epilepsie mitverwickelt. Die Epilepsie, als eine der ersten neurologischen Ereignisse bei SLE-Patienten, wurde assoziiert mit einem erhöhten Vorkommen von Antiphospholipidantikörpern. Verrot et al fand in einer Studie mit 163 Epilepsiepatienten in 19% erhöhte IgG-Anticardiolipinantikörper ohne dass auch nur einer dieser Patienten irgendein klinisches Ereignis hatte, welches ein APS vermuten lassen würde (37,80).

Antiphospholipidantikörper könnten auch mit thromboembolischen Erkrankungen im Bereich der Sehbahn assoziiert sein. In einer Studie über Patienten mit

cerebrovaskulärer Erkrankung und APS hatten 19% klinische Merkmale von Amaurosis fugax, ischämische Opticusneuropathie und Retinalarterienverschluss (44,45).

#### d) Lebererkrankungen

Über das Vorkommen von Antiphospholipidantikörpern bei Lebererkrankungen ist bisher nicht viel bekannt und es finden sich nur wenige Angaben in der Literatur. In ihrem 1998 veröffentlichten Einblick in das APS beschreiben Kandiah et al hepatische Manifestationen beim APS durch eine strukturelle und funktionelle Obstruktion des venösen Blutflusses in der Leber, welche z. Bsp. zum Budd-Chiari-Syndrom führen kann. Im Zusammenhang mit den Antiphospholipidantikörpern läßt sich dies als Folge einer Thrombose in den Lebervenen sehen, welche sich bis in die Vena cava inferior ausdehnt. Eine hepatische Venenverschlusskrankheit, die über den Verschuß zentraler und sublobulärer Venen zur Hepatomegalie und zu Aszites führt, ist mit dem Vorkommen von Antiphospholipidantikörpern assoziiert. Hierbei führt der Venenverschluß zum hepatisch-sinusoidalen Blutstau, hepatozellulärer Nekrose und schließlich zur Zirrhose. Die hepatische Infarzierung ist meist mit einer systemischen Thrombophilie vergesellschaftet (37).

Nach Asherson et al ist das Budd-Chiari-Syndrom, entstehend durch den Verschluß von Lebervenen, die allgemein am häufigsten vorkommende Komplikation. In einer Studie konnte bei 9 von 11 Budd-Chiari-Syndrom-Patienten ein klassisches primäres APS diagnostiziert werden. Ebenso wurden durch einige Autoren Thrombosen und Infarkte im Bereich der arteriellen Lebergefäße beschrieben. Der histopathologische Nachweis kleiner Gefäßverschlüsse wurde belegt und könnte eine Hepatomegalie und erhöhte Enzymaktivitäten erklären, wie sie bei APS-Patienten unabhängig von Infektionen, Blutstau, degenerativen oder metabolischen Ursachen gesehen wurden (2). Laut Williams und Hunt wurden Antiphospholipidantikörper als ein Hauptgrund für die Entstehung eines Budd-Chiari-Syndroms angesehen. (83)

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt gibt es für den Nachweis von Antiphospholipidantikörpern bei NRH nur wenige Fallbeispiele in der Literatur. Aber es ist bekannt, dass sich die NRH im Rahmen von Vaskulitiden manifestieren kann. Ruiz

et al berichteten als erste über den Zusammenhang von NRH der Leber und Antiphospholipid-Antikörpern bei sieben Patienten mit rheumatischen Erkrankungen, drei Patienten mit SLE und einem Patient mit PAPS. Bei 6 der sieben Patienten ließen sich Antiphospholipid-Antikörper nachweisen, Anticardiolipin-Antikörper waren bei allen Patienten mit SLE vorhanden (71). NRH und membranöse Nephropathien zeigten in einer Studie mit 88 SLE-Patienten eine Assoziation mit dem Vorhandensein von Antiphospholipid-Antikörpern (72).

Wir haben in Zusammenarbeit mit Prof. Bianchi aus Basel 16 Patienten mit NRH auf Antiphospholipidantikörper untersucht. Bei 75% ließen sich Thromboplastinantikörper, vorwiegend vom IgM-Typ (62,5%), nachweisen, bei 31% Cardiolipinantikörper, bei 50%  $\beta$ 2-Glykoproteinantikörper und bei 40% Antiphosphatidylantikörper. Zu einem späteren Zeitpunkt wurden diese und weitere Seren erneut nach einer genaueren histologischen Untersuchung und Einteilung getestet. Dabei zeigten sich bei 20 Patienten mit histologisch gesicherter NRH (ohne andere Lebererkrankungen) in 40% der Fälle Thromboplastin-Antikörper, bei 25% Cardiolipin-Antikörper und bei jeweils 15%  $\beta$ 2-Glykoprotein- und Phosphatidylserin-Antikörper.

Wir konnten somit in dieser Studie zeigen, dass es eine enge Assoziation zwischen NRH der Leber und dem Auftreten von Antiphospholipidantikörpern gibt, insbesondere zu den Cardiolipin-Antikörpern.

Wenn man also davon ausgeht, dass Gefäßveränderungen als eine Ursache für die Entstehung der NRH angesehen werden, ist besonders das Auftreten von Cardiolipin-Antikörpern interessant, da diese typischerweise bei entzündlichen und nicht-entzündlichen Gefäßerkrankungen bei Patienten mit SLE oder PAPS auftreten. Desweiteren wurden diese Antikörper bei Vasculitiden im Bereich des ZNS, der Niere oder am Herz beschrieben, sodass eine Form der NRH als ein „organspezifisches APS der Leber“ interpretiert werden könnte (5,71,72).

Weiter unklar bleibt die Wirkungsweise der Cardiolipin-Antikörper bei der NRH. Es können sowohl Mikroembolien als auch Vasculitiden der kleinen Gefäße eine Rolle spielen.

Als Kontrolle untersuchten wir 71 Patienten mit primärer biliärer Zirrhose (PBC). Interessant war, dass sich bei 75% Thromboplastinantikörper und bei 30%  $\beta$ -Glykoproteinantikörper nachweisen ließen. In einer Gruppe von 27 Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis (PSC) zeigten 56% Thromboplastinantikörper und lediglich 18%  $\beta$ -Glykoproteinantikörper. Diesen vorwiegend die Gallewege betreffenden Lebererkrankungen wurde eine Gruppe mit 40 Patienten mit autoimmuner Hepatitis (AIH) zur Seite gestellt. Dabei konnten bei 81% Thromboplastinantikörper nachgewiesen werden. Es zeigten sich auch erhöhte Titer für Cardiolipinantikörper (59%),  $\beta$ -Glykoproteinantikörper (46%) und Phosphatidylserinantikörper (54%), diese resultieren jedoch vorwiegend aus erhöhten Titern der IgA-Antikörper, welche sich als besonders störanfällig und unzuverlässig erwiesen hatten.

Vergleicht man diese Ergebnisse, lassen sich bei NRH vor allem erhöhte Titer für Thromboplastin-Antikörper (63-75%) und Cardiolipin-AK (31-50%) nachweisen, davon 13-19% IgG-aCL und 13-19% IgM-aCL. Dagegen scheint diese Gruppe weniger mit  $\beta$ -Glykoprotein1- und Phospholipid-Antikörpern der Klasse IgG und IgM zu reagieren (0-25%). In der Gruppe der autoimmunen Lebererkrankungen zeigen sich die höchsten Antikörpertiter ebenfalls gegen Thromboplastin (56-81%). Auffällig sind jedoch erhöhte AK-Titer gegen  $\beta$ -Glykoprotein1 (19-46%), davon 5-21% IgG-AK und 4-10% IgM-AK. Die Antikörpertiter für Cardiolipin lagen zwischen 30% und 59%, wenn man isoliert die Immunglobulinklassen IgG und IgM betrachtet bei 4-15% IgG-aCL und 0-24% IgM-aCL.

In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es interessant, dass auch bei Patienten mit PBC histologisch hyperplastisch regenerative Knoten und vasculäre Veränderungen (Vasculitis) beobachtet werden (7,12,17,34,58,60,75,79,82). Bei vielen Patienten mit PBC lässt sich histologisch eine NRH nachweisen (persönliche Mitteilung Prof. Bianchi). Somit könnte man aus dieser hohen Assoziation von Antikörpern gegen Phospholipide mit autoimmunen Lebererkrankungen folgern, dass der Nachweis dieser Antikörper bei Lebererkrankungen, in welchen typische autoimmune Phänomene ausgeschlossen worden, trotz allem ein Indikator für einen autoimmunen Prozeß ist.

## **5. Zusammenfassung**

Wir haben in dieser Studie gezeigt, dass der Nachweis von Thromboplastin-Antikörpern mittels eines ELISA bei bestimmten definierten Erkrankungen als guter Screening-Test für Antiphospholipidantikörper im Allgemeinen dient, da diese Antigenfraktion alle Hauptantigene wie Cardiolipin,  $\beta$ 2-Glykoprotein, Phosphatidylserin und andere nicht identifizierte Phospholipide und Phospholipid-bindende Proteine enthält. Eine gute Korrelation zeigte sich insbesondere bei positiven Ergebnissen für Antikörper gegen Thromboplastin und  $\beta$ 2-Glykoprotein1. Im Gegensatz dazu werden Anticardiolipin-Antikörper in einigen Fällen vermisst, wenn Thromboplastin als Antigen eingesetzt wird, z.B. wenn sie nur mit niedrigen Serumtitern vorhanden sind. Dies könnte in der geringen Konzentration von Cardiolipin in dieser Antigenfraktion begründet sein. Aus diesem Grund ist für eine gründliche Nachweisanalyse für Antiphospholipidantikörper bei einer bestimmten Erkrankung das Testen auf verschiedene APA-Subtypen unerlässlich.

Von Patienten mit Antiphospholipidantikörpern ohne eine Lebererkrankung wissen wir, dass es eine gute Korrelation zwischen Cardiolipin-Antikörpern, dem Lupus-Antikoagulant und schweren klinischen Symptomen wie Thrombosen/Embolien und Spontanaborte gibt. Bei Patienten mit leichten klinischen Symptomen des APS wie Raynaud Syndrom, Amaurosis fugax, Hörsturz oder Tinnitus dominieren dagegen Antikörper gegen  $\beta$ 2-Glykoprotein1.

Ferner zeigen die vorgelegten Befunde, dass der Nachweis von Thromboplastin-AK, besonders von Cardiolipinantikörpern, bei einer unbekanntem Lebererkrankung auf eine noduläre regenerative Hyperplasie (NRH) der Leber oder einen allgemeinen vaskulären Prozess hindeuten kann. Zum anderen kann der AK-Nachweis bei einer NRH helfen eine Subgruppe von Patienten mit chronischer Leberfunktionsstörung zu identifizieren, bei der ein „organspezifisches Antiphospholipidsyndrom“ in der Pathogenese beteiligt sein könnte. Hier wird es prospektiv von Interesse sein, ob diese Patienten von einer antikoagulierenden Therapie profitieren.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. *Alarcon-Segovia D., Cabral A.R. (1996)*  
The antiphospholipid / Cofactor syndromes  
Journal of Rheumatol ; 23:8, 1319-1322
2. *Asherson R.A., Cervera R. (1992)*  
The antiphospholipid syndrome. a syndrome in evolution  
Annals of the Rheumatic diseases 51, 147-150
3. *Asherson R.A., Kant K.S. (1993)*  
Antiphospholipid antibodies and the kidney  
Journal of Rheumatology, 20:8; 1268-1272
4. *Asherson R.A., Cervera R. (1995)*  
Review: Antiphospholipid antibodies and the lung  
Journal of Rheumatol, 22: 62-6
5. *Arana, E., Marti-Boumati, L., Martinez, V., Hoyos, M., Montes, H. (1997)*  
Portal vein absence and nodular regenerative hyperplasia of the liver with giant inferior mesenteric vein  
Abdom. Imaging 22: 506-508
6. *Berard M., Chantome R., Marcelli A., Boffa M.(1996)*  
Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies. 1.Association with thrombosis and vascular cutaneous disease  
Journal of Rheumatol; 23: 1369-74
7. *Bernuau, D., Feldmann, G., Degott, C., Gisselbrecht, C. (1981)*  
Ultrastructural lesions of bile ducts in primary biliary cirrhosis. A comparison with the lesions observed in graft versus host disease  
Hum Pathol 12: 782-793
8. *Boffa M., Berard M., Sugi T., McIntyre J.A. (1996)*  
Antiphosphatidylethanolamine antibodies as the only antiphospholipid antibodies detected by ELISA. / 2. Kininogen reactivity  
Journal of Rheumatol; 23: 1375-9
9. *Borchman D., Harris E.N., Pierangeli S.S., Lamba O.P. (1995)*  
Interactions and molecular structure of cardiolipin and  $\beta$ 2-Glycoprotein I  
Clin.Exp.Immunol; 102: 373-378
10. *Bowie, W.E.F., Thompson, J.H., Pascuzzi, C.A., Owen, G.A. (1963)*  
Thrombosis in systemic lupus erythematoses despite circulating anticoagulants  
J. Clin. Invest. 62: 416-430

11. *Branch D.W., Rote N.S., Scott J.R. (1986)*  
The demonstration of Lupus Antikoagulant by an Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay  
*Clinical Immunology and Immunopathology* 39, 298 - 307
12. *Buffet, C., Sinico, M., Adda, G., Fabre, M., Roge, J., Pelletier, G., Martin, E., Etienne, J.P. (1991)*  
Nodular regenerative hyperplasia and primary biliary cirrhosis  
*Gastroenterol Clin Biol* 15: 856-858
13. *Cabiedes J., Cabral A.R., Alarcon-Segovia D. (1995)*  
Clinical Manifestations of the antiphospholipid syndrom in patients with systemic lupus erythematoses , Associate more strongly with anti- $\beta$ 2-Glycoprotein1 than with antiphospholipid antibodies  
*Journal of Rheumatol* ; 22: 1899-906
14. *Cabral A.R., Cabiedes J., Alarcon-Segovia D. (1995)*  
Antibodies to phospholipid-free  $\beta$ 2-Glycoprotein1 in patients with primary antiphospholipid syndrome  
*Journal of Rheumatol*, 22: 1894-8
15. *Carion, R., Tobelem, G., Belucci, S., Soria, J., Maclouf, J., Caen, J. (1988)*  
Effect of Lupus Anticoagulant on antithrombogenic properties of endothelial cells: Inhibition of thrombomodulin-dependent protein C activation  
*Thromb. Haemostasis* 60: 54-58
16. *Chamley L.W., McKay E.J., Pattison N.S. (1991)*  
Cofactor dependent and cofactor independent anticardiolipin antibodies  
*Thrombosis research* 61; 291-299
17. *Colina, F., Pinedo, F., Solis, J.A., Moreno, D., Nevado, M. (1992)*  
Nodular regenerative hyperplasia of the liver in early histological stages of primary biliary cirrhosis  
*Gastroenterology* 102: 1319-1324
18. *Conley, C.L., Hartmann, R.C. (1952)*  
A hemorrhagic disorder caused by circulating anticoagulant in patients with disseminated lupus erythematoses  
*J. Clin. Invest.* 31: 621-622
19. *El-Kadi, H. S., Keil, L. B., DeBari, V. A. (1995)*  
Analytical and Clinical Relationships between human IgG Autoantibodies to  $\beta$ 2-Glycoprotein1 and Anticardiolipin-Antibodies  
*J. Rheumatol.* 22: 2233-2237

20. *Feinstein, D.I., Rapaport, S.I. (1972)*  
Acquired inhibitors of blood coagulation in five patients  
Prog. Hemost. Thromb. 1: 75-95
21. *Fields, R. A., Toubbeh, H., Searles, R. P., Bankhurst, A. D. (1989)*  
The prevalence of anticardiolipin antibodies in a healthy elderly population and its association with antinuclear antibodies  
J. Rheumatol. 16: 623-625
22. *Font, J., Lopez-Soto, A., Cervera, R., Casals, F.J., Reverter, J.C., Munoz, F.J., Miret, C., Bove, A., Ordinas, A., Ingelmo, M. (1997)*  
Antibodies to thromboplastin in systemic lupus erythematosus: isotype distribution and clinical significance in a series of 92 patients  
Thrombosis research, Vol. 86 No.1: 37-48
23. *Gharavi A.E., Harris E.N., Asherson R.A., Hughes G.R.V (1987)*  
Anticardiolipin-Antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity  
Annals of the Rheumatic Diseases 46,1-6
24. *Gromnica-Ihle, E., Franz, J. (1994)*  
Klinische Relevanz der Antiphospholipid-Antikörper in der Rheumatologie  
Z. ärztl. Fortbild. 88: 525-529
25. *Gromnica-Ihle, E. (1996)*  
Das Antiphospholipid-Syndrom  
Akt. Rheumatol. 21: 106-113
26. *Guerin, J., Feighery, Y., Sim, R.B., Jackson, J. (1997)*  
Antibodies to  $\beta$ 2-glycoprotein 1- a specific marker for the antiphospholipid-syndrome  
Clin. Exp. Immunol 109: 304-309
27. *Habscheid W., Bauer P. (1992)*  
Diagnostik und klinische Bedeutung von Antiphospholipid-Antikörpern  
Dtsch. med. Wschr. 117, 549-554
28. *Harris, E.N., Gharavi, A.E., Moey, M.L. et al. (1983)*  
Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis  
in systemic lupus erythematoses  
The Lancet : 1211-1214
29. *Harris, E.N. (1990)*  
Overview: Antiphospholipid-Antibodies in the 90th and beyond. The 4th International Symposium on Antiphospholipid Antibodies.  
Sirmione 9.-11. April 1990



30. *Hughes, G.R.V. (1985)*  
The anticardiolipin syndrome  
*Clin. Exp. Rheumatol.* 3: 285-286
31. *Hughes G.R.V. (1993)*  
The antiphospholipid syndrome: ten years on  
*The Lancet*; Vol.342, 341-44
32. *Hunt, J.E., McNeil, H.P., Morgan, G.J., Cramer, R.M., Krilis, S.A. (1992)*  
A phospholipid- $\beta$ 2-glycoprotein1-complex is an antigen for anticardiolipin antibodies occurring in autoimmune disease but not with infection  
*Lupus* 1: 83-90
33. *Ihn H., Sato S., Fujimoto M., Kikuchi K., Igarashi A., Soma Y., Tamaki K., Takehara K. (1996)*  
Measurement of anticardiolipin antibodies by ELISA using  $\beta$ 2-Glycoprotein1 in systemic sclerosis  
*Clin. Exp. Immunol*; 105: 475-479
34. *James, S.P., Hoofnagle, J.H., Strober, W., Jones, E.A. (1983)*  
NIH conference: primary biliary cirrhosis: a model autoimmune disease  
*Ann Intern Med* 99: 500-512
35. *Jones J.V., Eastwood B.J., Jones E., James H., Mansour M. (1995)*  
Antiphospholipid antibodies in a healthy population. Methods for Estimating the distribution.  
*Journal of Rheumatol* , 22:55-61
36. *Kandiah, D. A., Krilis, S. A. (1994)*  
 $\beta$ 2-Glycoprotein1  
*Lupus* 3: 207-212
37. *Kandiah D.A., Sali A., Sheng Y., Victoria E.J., Marquis D.M., Coutts S.M., Krilis S.A. (1998)*  
Current insights into the „Antiphospholipid“ Syndrome: Clinical, immunological and molecular aspects  
*Advances of immunology* 70: 507-63
38. *Keeling, D. M., Wilson, A. J., Mackie, I. J., Isenberg, D. A., Machin, S. J. (1993)*  
Role of  $\beta$ 2-Glycoprotein1 and antiphospholipid antibodies in activation of protein C in vitro  
*J. Clin. Pathol.* 46: 908-911
39. *Khamashta M.A., Cuadrado M.J., Mujic F., Taub N.A., Hunt B.J., Hughes G.R.V. (1995)*  
The management of thrombosis in the antiphospholipid-antibody syndrome  
*The New England Journal of medicine*; Vol 332 : 993-1027

40. *Klein, R., Berg, P.A. (1993)*  
Autoantikörper bei chronischen Lebererkrankungen: klinische und diagnostische Relevanz  
Sonderdruck aus Klin. Lab. 9/93, 39: 611-626
41. *Klein, R., Goller, S., Bianchi, L. (2003)*  
Nodular regenerative hyperplasia (NRH) of the liver – a manifestation of „organ specific antiphospholipid syndrome“?  
Immunobiol. 207: 51-57
42. *Kurz R., Eder A., Buck J., Heinkelein J.(1997)*  
Mesenterialinfarkt bei primärem Antiphospholipid-Antikörper-Syndrom  
Z Gastroenterol, 35: 669-672
43. *Lee, N. S., Brewer, H. B., Osborne, J. C. J. (1983)*  
 $\beta$ 2-Glycoprotein1: Molecular properties of an unusual apolipoprotein, apolipoprotein H  
J. Biol. Chem. 258: 4765-4770
44. *Leo-Kottler, B., Klein, R., Berg, P.A., Zrenner, E. (1998)*  
Ocular symptoms in association with antiphospholipid antibodies  
Graefes's Arch Clin Exp Ophthalmol 236: 658-668
45. *Levine, S.R., Deegan, M.J., Futrell, N., Welch, K.M.A. (1990)*  
Cerebrovascular and neurologic disease associated with antiphospholipid antibodies: 48 cases  
Neurology 40: 1181-1189
46. *Lockshin M. D. (1993)*  
Which patients with antiphospholipid antibody should be treated and how?  
Rheumatic disease clinics of north america, Vol 19 Nr.1, 235 247
47. *Loizon, S., McCrea, J.O., Rudge, A.C., Reynolds, R., Boyle, C.C., Harris, E.N. (1985)*  
Measurement of anti-cardiolipin antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Standardization and quantitation of results  
Clin. Exp. Immunol. 62: 738-745
48. *Lozier, J., Takahashi, N., Putnam, F. W. (1984)*  
Complete amino acid sequence of human plasma  $\beta$ 2-Glycoprotein1  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3640-3644
49. *Manoussakis, M. N., Tzioufas, A. G., Silis, M. P., Pange, P. J. E., Goudevenos, J., Moutsopoulos, H.M. (1987)*  
High prevalence of anticardiolipin and other autoantibodies in a healthy elderly population  
Clin. Exp. Immunol. 69: 557-565

50. *Marzusch, K., Klein, R., Hornung, D., Neuer, A., Mayer, R., Dietl, J., Berg, P.A.* (1996a)  
Intravenös verabreichte Immunglobuline in der Behandlung von habituellen Aborten bei 49 Patientinnen mit Antikörpern gegen Phospholipide  
*Jatros Gyn* 12, 12:36-40
51. *Marzusch, K., Dietl, J., Klein, R., Hornung, D., Neuer, A., Berg, P.A.* (1996b)  
Recurrent first trimester spontaneous abortion associated with antiphospholipid antibodies: A pilot study of treatment with intravenous immunglobulin  
*Acta Obstet Gynecol Scand* 75: 922-926
52. *Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K., Suzuki, T., Sumida, T., Yasuda, T., Koike, T.* (1992)  
Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor  
*J. Immunol.* 148: 3885
53. *Matsuura, E., Igarashi, Y., Yasuda, T., Triplett, D. A., Koike, T.* (1994)  
Anticardiolipin antibodies recognize  $\beta$ 2-GP1 structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface  
*J. Exp. Med.*, Vol. 179: 457-462
54. *Matzner, W., Chong, P.X.G., Ching, W.* (1994)  
Characterization of antiphospholipid antibodies in women with recurrent spontaneous abortions  
*J Reprod Med* 39: 27-30
55. *McNeil H.P., Simpson R.J., Chesterman C.N., Krilis S.A.* (1990)  
Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation:  $\beta$ 2-Glycoprotein1 (apolipoprotein H)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4120
56. *McNeil H.P., Chesterman C.N., Krilis S.A.* (1991)  
Immunology and clinical importance of antiphospholipid antibodies  
*Advances in Immunology* Vol.49; 193-279
57. *Mierkel, P.A., Chang, Y., Pierangeli, S.S., Harris, E.N., Polisson, R.P.* (1999)  
Comparison between the standard anticardiolipin antibody test and a new phospholipid test in patients with connective tissue diseases  
*Journal of Rheumatol.* 26: 3, 591-596
58. *Nakanuma, Y., Ohta, G.* (1987)  
Nodular hyperplasia of the liver in primary biliary cirrhosis of early stages  
*Am J Gastroenterol* 82: 8-10
59. *Nilsson, I.M., Astedt, B., Hedner, V., Berezin, D.* (1975)  
Intrauterine death and circulating anticoagulant (antithromboplastin)  
*Acta. Med. Scand.* 197: 153-159

60. *Nonomura, A., Mizukami, Y., Matsubara, F., Kobayashi, K. (1991)*  
Clinicopathological study of lymphocyte attachment to endothelial cells (endothelialitis) in various liver diseases  
Liver 11: 78-88
  
61. *Oosting, J.D., Derksen, R.H. W.M., Hackeng, T.M., van Vliet, M., Preissner, K.T., Bouma, B. N., de Groot, P. G. (1991)*  
In-vitro studies of antiphospholipid antibodies and its cofactor,  $\beta$ 2-Glycoprotein1, show negligible effect on endothelial cell mediated protein C activation  
Thromb. Haemostasis 66: 666-671
  
62. *Oosting, J.D., Derksen, R.H., Bobbink, I. W., Hackeng, T. M., Bouma, B. N., de Groot, P. G. (1993)*  
Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: An explanation for their pathogenic mechanism?  
Blood 81: 2618-2625
  
63. *Ordi J., Selva A., Monegal F., Porcel J.M., Martinez-Costa X., Vilardell, M. (1993)*  
Anticardiolipin Antibodies and Dependence of a Serum Cofactor. A Mechanism of Thrombosis ( FCS-Test)  
Journal of Rheumatology; 20.8
  
64. *Pangborn, M.C. (1941)*  
A new serologically active phospholipid from beef heart  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48: 484-486
  
65. *Petri, M., MD, MPH (1998)*  
1998 update on antiphospholipid antibodies  
Current Opinion in Rheumatology 10: 426-430
  
66. *Quintarelli, C., Ferro, D., Valesini, G., Basili, S., Tassone, G., Violi, F. (1994)*  
Prevalence of Lupus Anticoagulant in patients with cirrhosis: relationship with  $\beta$ 2-Glycoprotein1 plasma levels  
J. Hepatol. 21: 1086-1091
  
67. *Rand J.H., Wu X.X., Andree H.A.M., Charles P.D., Lockwood J., Guller S., Scher J., Harpel P.C. (1997)*  
Pregnancy loss in the antiphospholipid-antibody syndrome - A possible thrombogenic mechanism  
New England Journal of Medicine, Vol 337 Nr3, 154-60
  
68. *Ravelli A., Caporali R., Montecucco C., Martini A. (1996)*  
The antiphospholipid syndrome in childhood  
Journal of Rheumatol ,23: 7,1121-1122

69. *Reid, K. B. M., Day, A. J. (1989)*  
Structure-function relationships of the complement components  
*Immunol. Today* 10: 177-180
70. *Roubey R.A.S., Pratt C.W., Buyon J.P., Winfield J.B. (1992)*  
Lupus Anticoagulant Activity of Autoimmune Antiphospholipid Antibodies is dependent upon  $\beta$ 2-Glycoprotein  
*J. Clin. Invest.* Vol 90, , 1100-1104
71. *Ruiz, F.P., Martinez, F.J.O., Mendoza, A.C.Z., Ruiz del Arbol, L., Caparros, A.M. (1991)*  
Nodular regenerative hyperplasia of the liver in rheumatic diseases : Report of seven cases and review of the literature  
*Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Vol. 21 No. 1: 47-54
72. *Ruiz, P.F., Mendoza, A.C.Z. (1998)*  
Nodular regenerative hyperplasia of the liver and antiphospholipid antibodies  
*J Clin Gastroenterol* 27(1, letter): 90-91
73. *Schultze, H. E., Heide, K., Haupt, H. (1961)*  
Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares  $\beta$ 2-Globulin des human serums  
*Naturwissenschaften* 48: 719-724
74. *Sheng, Y., Sali, A., Herzog, H., Lahnstein, J., Krilis, S. A. (1996)*  
Site-directed mutagenesis of recombinant human  $\beta$ 2-Glycoprotein1 identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anticardiolipin antibody activity  
*J. Immunol.* 157: 3744-3751
75. *Sherlock, S. (1987)*  
The syndrome of disappearing intrahepatic bile ducts  
*Lancet* 2: 493-496
76. *Shi, W., Krilis, S. A., Chong, B. H., Gordon, S., Chestermann, C. N. (1990)*  
Prevalence of lupus anticoagulant and anticardiolipin antibodies in a healthy population  
*Aust. N. Z. J. Med.* 20: 231-236
77. *Takeya, H., Mori, T., Gabazza, E. C., Kuroda, K., Deguchi, H., Matsuura, E., Ichikawa, K., Koike, T., Suzuki, K. (1997)*  
Anti- $\beta$ 2-Glycoprotein1 monoclonal antibodies with Lupus Anticoagulant-like activity enhance the  $\beta$ 2-Glycoprotein1 binding to phospholipids  
*J. Clin. Invest.*, Vol. 99, No. 9: 2260-2268

78. *Thiagarajan, P., Shapiro, S.S., DeMarco, L. (1980)*  
 Monoclonal immunoglobulin M coagulation inhibitor with phospholipid specificity: mechanism of a lupus anticoagulant  
*J. Clin. Invest. 66: 397-405*
79. *Thomas, H.C., Potter, B.J., Sherlock, S. (1977)*  
 Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease?  
*Lancet 2: 1261-1263*
80. *Verrot, D., San-Marco, M., Dravet, C., Genton, P., Disdire, P., Bolla, G., Harle, J.R., Reynaud, L., Weiller, P.J. (1997)*  
 Prevalence and significance of antinuclear and anticardiolipin antibodies in patients with epilepsy,  
*Am. J. Med. 103: 33-37*
81. *Viard, J. P., Amoura, Z., Bach, J. B. (1992)*  
 Association of anti- $\beta$ 2-Glycoprotein1-antibodies with lupus-type circulating anticoagulants and thrombosis in systemic lupus erythematoses  
*Am. J. Med. 93: 181-186*
82. *Vierling, J.M., Howell, C.D. (1990)*  
 Disappearing bile ducts: immunologic mechanism  
*Hosp Pract 25: 141-150*
83. *Williams, F. M. K., Hunt, B. J. (1998)*  
 The antiphospholipid syndrome and vascular surgery  
*Cardiovascular surgery, Vol. 6, No. 1: 10-16*
84. *Yang, C. D., Chen, S. L., Shen, N., Pei, J., Xue, F., Lu, Y., Gu, W., Bao, C. P. (1997)*  
 The fifth domain of  $\beta$ 2-Glycoprotein1 contains antigenic epitopes recognised by anti-cardiolipin antibodies derived from patients with the antiphospholipid syndrome  
*APLAR J. Rheumatol. 1: 96-100*

## Danksagung

- Frau Prof. Dr. med. R. Klein danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, die gute Zusammenarbeit im Immunpathologischen Labor und die hervorragende Betreuung. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.
- Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Immunpatholog. Labors bedanken, insbesondere bei Silke, Tanja und Susi, die mich nicht nur in die Geheimnisse und Abläufe des experimentellen Arbeitens eingewiesen haben, sondern auch stets für eine gute Stimmung und freundschaftliche Atmosphäre sorgten - ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.
- Herrn Prof. Dr. Bianchi danke ich für die Übersendung der histologischen Daten der NRH-Patienten.
- Herr Dr. Foldvari der Universitäts-Kinderklinik Hamburg übermittelte uns Seren und Daten von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen. Hierfür möchte ich mich bedanken.
- Herrn Dr. Querfeld der Humboldt-Universität Berlin, Abteilung Kindernephrologie der Charite Kinderklinik, danke ich für die Zusendung der Seren von Müttern mit untergewichtig geborenen Kindern sowie eines entsprechenden Kontrollkollektivs mit Seren von Müttern normalgewichtiger Kinder.
- Herrn Prof. Dr. Dietz vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung Tübingen danke ich für die statistische Auswertung der Daten.
- Meinen Eltern danke ich für Ihre hilfreiche Unterstützung.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten

Name:	Sandra Jeannette Goller
Geburtsdatum:	29.01.1975
Geburtsort:	Plauen
Familienstand:	ledig

### Schulbildung

1981 - 1989	Polytechnische Oberschule Plauen (DDR)
1989 - 1994	Fürstenberg-Gymnasium Donaueschingen
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

1995 - 2000	Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Studiengang Medizin
1997	Physikum
1998	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2000	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
12.11.2001	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

### Praktisches Jahr

2000 – 2001	Klinikum Konstanz, Innere Medizin und Wahlfach Radiologie St. Luke`s Hospital, Malta, Chirurgie
-------------	---

### Ärztin im Praktikum

2/2002-8/2003	Helios Klinik Müllheim, Innere Abteilung, Chefarzt Dr. Hoppe-Seyler
---------------	--

### Assistenzärztin

Seit 01.10.2003	Helios Klinik Müllheim, Innere Abteilung, Chefarzt Dr. Hoppe-Seyler
-----------------	--