

Aus dem Zentrum für Innere Medizin II der Universitätsmedizin Rostock

Sektion Nephrologie

Prof. Dr. med. Steffen Mitzner

**Bedeutung der cf-DNA/NETs und des sCD163 als diagnostische Parameter
ANCA-assoziiierter Kleingefäßvaskulitiden**



Inauguraldissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

vorgelegt von:

Daniel Mocosch

aus Rostock

Rostock, im März 2022

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00004461

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Gutachter:

Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Universitätsmedizin Rostock, Sektion Nephrologie

Prof. Dr. med. Michael Walter, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Klinische Chemie

Prof. Dr. med. Marion Haubitz, Klinikum Fulda, Medizinische Klinik III

Jahr der Einreichung: 2022

Jahr der Verteidigung: 2023

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

Glossar	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Zusammenfassung.....	V
Abstract	VII
1 Einleitung	1
1.1 ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden.....	1
1.1.1 Charakteristika.....	1
1.1.2 Epidemiologie, Einflussfaktoren und Nierenbeteiligung.....	3
1.1.3 Therapie.....	4
1.1.4 ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden und NETs	6
1.2 Neutrophil Extrazellular Traps	8
1.2.1 Neutrophile Granulozyten	8
1.2.2 Neutrophil Extrazellular Traps: Ein neuer Player des angeborenen Immunsystems	8
1.2.3 NET-bedingte Gewebe- und Organschäden	12
1.2.4 NETs und Autoimmunität.....	16
1.2.5 NETs und systemischer Lupus erythematoses	17
1.2.6 cf-DNA/NETs als potentieller klinischer Parameter	20
1.3 Soluble (löslicher) CD163	21
2 Zielstellung.....	26
3 Material und Methoden	27
3.1 Methode zur Bestimmung der cf-DNA/NETs	27
3.2 Methode zur Bestimmung des sCD163	31
3.3 Labordiagnostik und Krankheitsaktivitätsindices	34
3.3.1 Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in der Version 3	34
3.3.2 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K).....	34
3.3.3 European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM).....	35
3.4 Datenbank und statistische Auswertung	35

4	Ergebnisse	37
4.1	Studienpopulation.....	37
4.1.1	Klinische Chemie	41
	Differentialblutbild.....	41
	C-reaktives Protein (CRP).....	44
	Retentionsparameter und glomeruläre Filtrationsrate	44
	Urindiagnostik (Teststreifen und Sediment)	47
	HbA1c	48
	Autoantikörper und Krankheitsaktivität.....	49
4.2	Studienparameter (cf-DNA/NETs und sCD163).....	51
4.3	Korrelationsanalysen	53
4.4	Studienparameter in Abhängigkeit der Nierenfunktion	56
4.5	Vergleich hohe und niedrige Krankheitsaktivität im BVAS	59
4.6	Vergleich progredienter und stabiler Verlauf der GPA	64
4.7	Vergleich Aufnahme und Entlassung bei Neudiagnose oder Rezidiv der GPA	69
4.8	Einfluss einer Cyclophosphamidtherapie	74
4.9	Einfluss einer Plasmaaustauschtherapie	79
5	Diskussion	81
5.1	cf-DNA/NETs - ein Parameter zur Aktivitätsbestimmung von AAVs?	81
5.2	cf-DNA/NETs - ein Parameter zur Verlaufsbeurteilung von AAVs?.....	88
5.3	cf-DNA/NETs - nur Biomarker oder auch therapeutisches Target?.....	92
5.4	cf-DNA/NETs und ANCA-assoziierte nekrotisierende Glomerulonephritis.....	101
5.5	Zellfreie plasmatische DNA - neutrophilen Ursprungs?.....	104
5.6	sCD163	106
5.7	Schlussfolgerungen: cf-DNA/NETs - eine sinnvolle Ergänzung zu den ANCAs	114
6	Thesen	118
7	Literaturverzeichnis.....	120
8	Lebenslauf	137
9	Konferenzbeiträge	139
10	Eidesstattliche Erklärung.....	140
11	Danksagung.....	141

12	Anhang	142
	Abbildungsverzeichnis des Anhangs.....	142
	Tabellenverzeichnis des Anhangs	143
12.1	Allgemeiner Teil.....	146
12.2	Anhang I – Auswertung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses	161
12.3	Anhang II – Vergleich hohe und niedrige Krankheitsaktivität der GPA	184
12.4	Anhang III – Vergleich progredienter und stabiler Verlauf der GPA.....	189
12.5	Anhang IV – Vergleich Aufnahme und Entlassung bei Neudiagnose bzw. Rezidiv der GPA	194
12.6	Anhang V – Einfluss einer Cyclophosphamidtherapie	199
12.7	Anhang VI – Einfluss einer Plasmaaustauschtherapie.....	201

Glossar

AAV	ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden
ACPA	anti-citrullinated protein antibodies
ACR	American College of Rheumatology
AH+/-DM	Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus
AH+/-DM_eGFR ≥ 60	Patienten der AH+/-DM-Gruppe mit keiner bzw. nur einer leichtgradigen Einschränkung der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel
AH+/-DM_eGFR < 60	Patienten der AH+/-DM-Gruppe mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel
ANA	antinukleäre Antikörper
ANCA	anti-neutrophile cytoplasmatische Antikörper
anti-MPO-Ak	anti-Myeloperoxidase-Antikörper
anti-PR3-Ak	anti-Proteinase 3-Antikörper
AUC	area under the curve
BAFF	B-cell activating factor
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BMI	Body-Mass-Index
BPI	bactericidal/permeability increasing protein
bTh	boviner Thymus
BSA	bovine serum albumin
BVAS	Birmingham Vasculitis Activity Score
BVAS ≤ 5	GPA-Patienten mit einer Krankheitsaktivität von maximal 5 Punkten im BVAS
BVAS ≥ 6	GPA-Patienten mit einer Krankheitsaktivität von mindestens 6 Punkten im BVAS
CD	Cluster of Differentiation
cf-DNA	cell free deoxyribonucleic acid (zellfreie Desoxyribonukleinsäure)
cf-DNA/NETs	cell free deoxyribonucleic acid of neutrophil extracellular traps
cf-DNA/NETs_bTh	cf-DNA/NETs - boviner Thymus Messreihe
cf-DNA/NETs_hPI	cf-DNA/NETs - humane Plazenta Messreihe
CT	Computertomographie
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DAMPs	Damage associated molecular patterns
DGRh	Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measurement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR (MDRD)	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate ermittelt nach der MDRD-Formel
EGPA	eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis
ERA-EDTA	European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association
ESKD	end-stage kidney disease
EULAR	European League Against Rheumatism
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EUVAS	European Vasculitis Society
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
GF	Gesichtsfeld
eGFR	abgeschätzte glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierende Faktor
GP	gesunde Probanden
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
GPA_eGFR ≥ 60	Patienten der GPA-Gruppe mit keiner bzw. nur einer leichtgradigen Einschränkung der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel
GPA_eGFR < 60	Patienten der GPA-Gruppe mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel
GPA_proгредиert	GPA-Patienten mit einer progredienten Krankheitsaktivität
GPA_stabil	GPA-Patienten mit einer stabilen Krankheitsaktivität
Hb	Hämoglobin
Hk	Hämatokrit
HLA	human leukocyte antigen

HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HNO-Bereich/Trakt	Hals-Nasen-Ohren-Bereich/Trakt
hPI	humane Plazenta
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HST	Harnstoff
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
INF	Interferon
ISN	International Society of Nephrology
ISN/RPS	International Society of Nephrology/Renal Pathology Society
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
KSR	Klinikum Südstadt Rostock
KW-Test	Kruskal-Wallis-Test
LPS	Lipopolysaccharide
mAK	monoklonaler Antikörper
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPA	mikroskopische Polyangiitis
MPO	Myeloperoxidase
MTX	Methotrexat
n	Anzahl
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NE	neutrophile Elastase
NETs	Neutrophil Extrazellular Traps
p	Irrtumswahrscheinlichkeit des entsprechenden statistischen Tests
PAD4	Peptidyl-arginine-deiminase 4
PBS	phosphate-buffered saline
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PR3	Proteinase 3
PTH	Parathormon
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RPGN	rapid-progressive-Glomerulonephritis
RR	Blutdruck (entsprechend der Methode nach Riva-Rocci)
RR_diastolisch	diastolische Blutdruckwerte
RR_map	arterieller Mitteldruck
RR_systolisch	systolische Blutdruckwerte
r_s	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
sCD163	soluble (löslicher) Cluster of Differentiation 163
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI-2K	Systemic Lupus Erythematosis Disease Activity Index 2000
SP_eGFR ≥ 60	alle Probanden der gesamten Studienpopulation mit keiner bzw. nur einer leichtgradigen Einschränkung der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel
SP_eGFR < 60	alle Probanden der gesamten Studienpopulation mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel
STBM	syncytiotrophoblastäre Mikropartikel
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TMB	3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRALI	Transfusion-related acute lung injury
TWEAK	Tumor necrosis factor- α like weak inducer of the apoptosis
UNI	Universitätsmedizin Rostock
VDI	Vasculitis Damage Index
WHO	World Health Organization

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 – NET-Ablagerungen in den glomerulären Kapillaren einer AAV-assoziierten GN	7
Abbildung 1.2 – Neutrophil Extrazellular Traps (NETs).....	9
Abbildung 1.3 – Elektronenmikroskopische Darstellung der NETs mit Umhüllung von <i>Shigella flexneri</i>	10
Abbildung 1.4 – Signaltransduktionswege verschiedener Stimuli der NETosis	11
Abbildung 1.5 – Potentielle Kaskade einer NET-vermittelten Autoimmunreaktion.....	16
Abbildung 1.6 – Freisetzung von sCD163	22
Abbildung 3.1 – Herstellung einer Standard-DNA-Verdünnungsreihe zur Bestimmung der cf-DNA/NETs.....	28
Abbildung 3.2 – Aufteilung der 96-well Platte zur Bestimmung der cf-DNA/NETs	29
Abbildung 3.3 – Ermittlung der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen	30
Abbildung 3.4 – Herstellung der sCD163-Standard-Verdünnungsreihe.....	32
Abbildung 3.5 – Standardverdünnungskurve für den sCD163	33
Abbildung 4.1 – Altersverteilung der Studiengruppen	37
Abbildung 4.2 – Verteilung des Hämoglobins.....	41
Abbildung 4.3 – Verteilung der Leukozyten.....	41
Abbildung 4.4 – Verteilung der neutrophilen Granulozyten (%).....	42
Abbildung 4.5 – Verteilung der Lymphozyten (%)	43
Abbildung 4.6 – Verteilung des C-reaktiven Proteins	44
Abbildung 4.7 – Verteilung des Serumcreatinins	45
Abbildung 4.8 – Verteilung der geschätzten glomerulären Filtrationsrate ermittelt nach der MDRD-Formel.....	45
Abbildung 4.9 – Verteilung des Serumharnstoffs.....	46
Abbildung 4.10 – Verteilung der Proteinurie im Urinteststreifen	48
Abbildung 4.11 – Verteilung des HbA1c.....	48
Abbildung 4.12 – Verteilung der cf-DNA/NETs humane Plazenta	51
Abbildung 4.13 – Verteilung der cf-DNA/NETs boviner Thymus.....	51
Abbildung 4.14 – Verteilung des sCD163	52
Abbildung 4.15 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: cf-DNA/NETs humane Plazenta.....	62
Abbildung 4.16 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: cf-DNA/NETs boviner Thymus	63
Abbildung 4.17 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: sCD163.....	63
Abbildung 4.18 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: cf-DNA/NETs humane Plazenta	67
Abbildung 4.19 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: cf-DNA/NETs boviner Thymus	68
Abbildung 4.20 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: sCD163.....	68
Abbildung 4.21 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: cf-DNA/NETs humane Plazenta.....	72
Abbildung 4.22 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: cf-DNA/NETs boviner Thymus.....	73
Abbildung 4.23 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: sCD163	73
Abbildung 4.24 – Subanalyse Cyclophosphamid: cf-DNA/NETs humane Plazenta	77
Abbildung 4.25 – Subanalyse Cyclophosphamid: cf-DNA/NETs boviner Thymus	78
Abbildung 4.26 – Subanalyse Cyclophosphamid: sCD163	78
Abbildung 4.27 – Plasmatische cf-DNA/NETs-Konzentrationen unter einer Plasmaaustauschtherapie	80
Abbildung 4.28 – Plasmatische sCD163-Konzentrationen unter einer Plasmaaustauschtherapie	80
Abbildung 5.1 – Darstellung der Pathogenese ANCA-assoziiierter Kleingefäßvaskulitiden	93
Abbildung 5.2 – Renales Überleben entsprechend des histologischen Phänotyps der RPGN Typ III	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 – Gegenüberstellung der Charakteristika von GPA und MPA.....	2
Tabelle 1.2 – Stadieneinteilung der ANCA-assoziierten Vaskulitis	4
Tabelle 1.3 – Phänotypisierung der Makrophagen.....	22
Tabelle 4.1 – Allgemeine Kennzahlen der Studienpopulation.....	38
Tabelle 4.2 – ausgewählte Begleiterkrankungen und Risikofaktoren	38
Tabelle 4.3 – statistische Kennwerte der Autoantikörper und der Krankheitsaktivitätsindices	49
Tabelle 4.4 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einer Granulomatose mit Polyangiitis (GPA).....	53
Tabelle 4.5 – Korrelationen der Autoantikörper der GPA-Patienten mit der Krankheitsaktivität im BVAS.....	54
Tabelle 4.6 – Einteilung der Studienpopulation nach der eGFR ermittelt mit der MDRD-Formel	56
Tabelle 4.7 – Subanalyse Nierenfunktion: Retentionsparameter, eGFR und Studienparameter nach Einteilung der Studienpopulation entsprechend der berechneten glomerulären Filtrationsrate.....	56
Tabelle 4.8 – Subanalyse Nierenfunktion: Retentionsparameter, eGFR und Studienparameter nach Einteilung der Patienten mit einer GPA entsprechend der berechneten glomerulären Filtrationsrate	57
Tabelle 4.9 – Subanalyse Nierenfunktion: Retentionsparameter, eGFR und Studienparameter nach Einteilung der AH+/-DM-Gruppe entsprechend der berechneten glomerulären Filtrationsrate	58
Tabelle 4.10 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Differentialblutbild und CRP.....	59
Tabelle 4.11 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Retentionsparameter, eGFR und Proteinurie	60
Tabelle 4.12 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen.....	61
Tabelle 4.13 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment.....	61
Tabelle 4.14 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS.....	61
Tabelle 4.15 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Studienparameter	62
Tabelle 4.16 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Blutbild und CRP	65
Tabelle 4.17 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Retentionsparameter, eGFR und Proteinurie	65
Tabelle 4.18 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen	65
Tabelle 4.19 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment	66
Tabelle 4.20 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS	66
Tabelle 4.21 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Studienparameter.....	67
Tabelle 4.22 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Differentialblutbild und CRP	69
Tabelle 4.23 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Retentionsparameter, eGFR und Proteinurie	70
Tabelle 4.24 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen.....	70
Tabelle 4.25 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment	70
Tabelle 4.26 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS	71
Tabelle 4.27 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Studienparameter	72
Tabelle 4.28 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Differentialblutbild und CRP	74
Tabelle 4.29 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Retentionsparameter, eGFR und Proteinurie.....	75
Tabelle 4.30 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen	75
Tabelle 4.31 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment	76
Tabelle 4.32 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS	76
Tabelle 4.33 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Studienparameter.....	76
Tabelle 4.34 – statistische Kennzahlen vor und nach Plasmaaustauschtherapie.....	79
Tabelle 4.35 – Vergleich der Nierenfunktion vor Plasmaaustauschtherapie und zum Zeitpunkt der Entlassung	80

Zusammenfassung

Hintergrund: Die Mortalität und Morbidität von Patienten mit ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden (AAV) – der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und der mikroskopischen Polyangiitis (MPA) – konnten in den letzten Jahrzehnten durch den Einsatz immunsuppressiver Medikamente wie Cyclophosphamid und Rituximab deutlich gesenkt werden. Dennoch sind sie weiterhin gegenüber der Normalbevölkerung signifikant erhöht. Neben der Klinik und speziellen Scores kommen auch paraklinische Parameter zur Einschätzung der Krankheitsaktivität der AAVs zur Anwendung. Hierbei spielen insbesondere die anti-neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper (ANCA), die in bis zu 90% der AAV-Patienten nachweisbar sind, im klinischen Alltag eine Rolle. Diese korrelieren jedoch nicht immer zuverlässig mit der Krankheitsaktivität und sind nur in einem Teil der Fälle zur Vorhersage eines Rezidivs der Grunderkrankung geeignet.

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation neuer paraklinischer Parameter zur Einschätzung der Krankheitsaktivität von AAVs. In den letzten fünfzehn Jahren konnte mit den Neutrophil Extrazellulär Traps (NETs) ein neuer Player des angeborenen Immunsystems identifiziert werden. Diese mit den Zielantigenen der ANCA – Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO) – bestückten Netze werden von neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum freigesetzt und spielen für die Pathogenese der AAVs eine zentrale Rolle, u.a. wurde eine Beteiligung bei der Entwicklung der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis nachgewiesen. Des Weiteren stand das Transmembranprotein CD163 (Cluster of Differentiation 163), das auf Makrophagen und Monozyten exprimiert wird, im Fokus. Die im Rahmen inflammatorischer Prozesse abgespaltene extrazelluläre Domäne, der sCD163 (soluble CD163), ist ein Marker vermehrter Makrophagenaktivität und tritt insbesondere beim Makrophagenaktivierungssyndrom, aber auch bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) in erhöhten Plasmakonzentrationen auf.

Methodik: Die Plasmakonzentrationen der NETs bzw. der zellfreien DNA (cf-DNA/NETs) wurden durch Interkalierung mit dem fluoreszierenden Farbstoff Picogreen bestimmt. Dabei kamen zwei Standards – humane Plazenta (hPl) und boviner Thymus (bTh) – zum Einsatz. Die Quantifizierung des sCD163 erfolgte durch einen Sandwich-ELISA. Es wurden Korrelationsanalysen mit Routinelaborparametern (u.a. großes Blutbild, CRP, Retentionsparameter), den ANCA und der Krankheitsaktivität im BVAS durchgeführt. Insgesamt konnten 79 Probanden in die Studie eingeschlossen werden, von denen 25 an einer AAV (20 Patienten mit einer GPA, 5 Patienten mit einer MPA) erkrankt waren. In Subanalysen der GPA wurde die Eignung der Studienparameter zur Diskriminierung der Krankheitsaktivität (hoch - BVAS ≥ 6 vs. niedrig - BVAS ≤ 5) bzw. des Krankheitsverlaufes (progredient vs. stabil) sowie die Eignung als Verlaufsparemeter im Rahmen einer stationären Behandlung und unter therapeutischer Intervention (Cyclophosphamid und Plasmaaustausch) untersucht. Als Kontrollgruppen wurden 17 gesunde Probanden (GP), 15 Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz vaskulärer Genese und einer in den meisten Fällen zusätzlichen diabetischen Nephropathie (AH+/-DM) (nicht-autoimmunologisch) sowie 22 Patienten mit einem SLE (autoimmunologisch) rekrutiert.

Ergebnisse: Die cf-DNA/NETs der GPA-Patienten waren in beiden Messreihen (hPl und bTh) signifikant höher gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM). Dies galt nicht für die sehr kleine Gruppe der MPA. Die Plasmakonzentrationen des sCD163 der AAV-Patienten unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppen. Im Falle der GPA-Gruppe bestanden für alle drei Studienparameter (cf-DNA/NETs_hPl, cf-DNA/NETs_bTh, sCD163) signifikante Korrelationen u.a. mit den ANCA (+), der Krankheitsak-

tivität im BVAS (+), dem CRP (+), dem Serumcreatinin (+), der eGFR nach der MDRD-Methode (-) und dem Ausmaß der Proteinurie (+) bzw. Erythrozyturie (+). Für die cf-DNA/NETs (hPI und bTh) bestanden des Weiteren bei den Patienten mit einer GPA signifikante Korrelationen mit dem relativen Anteil der Neutrophilen an der Gesamtleukozytenzahl (+). In den Subanalysen der GPA-Gruppe stellten sich die cf-DNA/NETs in beiden Messreihen (hPI und bTh) als geeignete Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität sowie des Krankheitsverlaufes dar. Im Rahmen einer stationären Behandlung sowie unter einer Plasmaaustauschtherapie kam es zu einem signifikanten Abfall der cf-DNA/NETs. Nach Cyclophosphamid-Pulstherapie trat zumindest ein tendenzieller Abfall der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen auf. Im Falle des sCD163 stellten sich die Ergebnisse der GPA-Subanalysen inkonsistent dar (signifikanter Unterschied zwischen GPA-Patienten mit hoher vs. niedriger Krankheitsaktivität sowie vor und nach stationärer Behandlung, aber keine Unterschiede zwischen progredientem vs. stabilem Verlauf der GPA, kein Abfall der Plasmakonzentrationen unter Cyclophosphamid oder Plasmaaustausch). Die Höhe der Studienparameter scheint von der Nierenfunktion unabhängig zu sein.

Schlussfolgerung: Im Gegensatz zum sCD163 scheinen die cf-DNA/NETs ein geeigneter Parameter zur Einschätzung der Krankheitsaktivität der GPA zu sein und könnten zur Beurteilung des Verlaufs der Grunderkrankung sowie der Wirkung therapeutischer Interventionen (Cyclophosphamid, Plasmaaustausch) eingesetzt werden.

Abstract

Background: The mortality and morbidity rates of patients with ANCA-associated vasculitis (AAV), i.e. granulomatosis with polyangiitis (GPA) and microscopic polyangiitis (MPA), has been significantly reduced by means of immunosuppressive drugs such as cyclophosphamide and rituximab. Nonetheless, they continue to be considerably higher than in the general population. In addition to clinical parameters and specific scores, paraclinical parameters are used for evaluating the disease activity of AAV. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), which can be detected in up to 90% of patients with AAV, are particularly relevant in current clinical practice. However, these ANCA do not always reliably correlate with the disease activity and are merely in some cases appropriate parameters for predicting a relapse of the underlying disease.

The goal of this project was the evaluation of alternative paraclinical parameters for the assessment of the disease activity of AAV. In the past 15 years, neutrophil extracellular traps (NETs) have been identified as important elements of the innate immune system. These web-like structures are equipped with specific antigens of the ANCA, i.e. proteinase 3 (PR3) and myeloperoxidase (MPO). They are released by neutrophil granulocytes into the extracellular space and have a crucial role in the pathogenesis of AAV. For instance, their contribution to the development of ANCA-associated glomerulonephritis has been shown. Much attention has also been given to the transmembrane protein CD 163 (cluster of differentiation 163), which is expressed in macrophages and monocytes. The extracellular domain sCD163 (soluble CD163), split off following inflammatory processes, is an indicator of increased activity of macrophages. It frequently occurs in increased plasma concentrations with the macrophage activation syndrome, but also with rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus (SLE).

Methods: The plasma concentrations of NETs respectively cell-free DNA (cf-DNA/NETs) were determined by intercalation with the fluorescent dye Picogreen. DNA from human placenta (hPI) and bovine thymus (bTh) served as benchmarks. Sandwich ELISA was used for quantifying the sCD163. Correlational analyses were conducted with standard laboratory parameters (such as the complete blood count, CRP, creatinine and urea), with the ANCA and with the disease activity according to the BVAS. 79 probands were included in the study, among which 25 had been diagnosed with AAV (20 patients with GPA, five patients with MPA). The adequacy of the study parameters for differentiating the disease activity (high: BVAS \geq 6 vs low: BVAS \leq 5) and the course of the disease (progressive vs stable) was examined in subanalyses of GPA. In addition their adequacy as parameters during the course of an inpatient treatment and accordingly therapeutic interventions (cyclophosphamide and plasma exchange) was analysed. The control groups included 17 healthy subjects (GP), 15 patients with chronic renal failure (AH+/-DM), caused by arterial hypertension and in most cases also by diabetic nephropathy, (non-autoimmune) and 22 patients with SLE (autoimmune).

Results: In both test series (hPI and bTh), the level of cf-DNA/NETs among the patients with GPA was significantly higher than in the non-autoimmunological control groups (GP, AH+/-DM). This was not true for the very small group of MPA patients. The plasma concentrations of the sCD163 among the patients with AAV did not differ from those in the control groups. In the GPA group, there were significant correlations of all three study parameters (cf-DNA/NETs_hPI, cf-DNA/NETs_bTh, sCD163) with, among others, ANCA (+), disease activity according to the BVAS (+), CRP (+), creatinine (+), eGFR (-) and the degree of proteinuria (+) and haematuria (+) respectively. Additionally in case of the cf-DNA/NETs (hPI and bTh) there were significant

correlations with the percentage of the neutrophils (+). Following the GPA subanalyses, in both test series (hPI and bTh) the cf-DNA/NETs were adequate parameters for assessing the disease activity and the course of the disease. There was a significant decrease of cf-DNA/NETs as a result of inpatient treatment and plasma exchange therapy. After treatment with cyclophosphamide there was at least a partial decrease in the cf-DNA/NETs plasma concentrations. In the case of the sCD163, the results of the GPA subanalyses are inconclusive. There was a significant difference between GPA patients with high vs low disease activity as well as before and after inpatient treatment, but no differences between a progressive vs stable course of GPA and no decrease in the plasma concentrations following treatment with cyclophosphamide or plasma exchange. The level of the study parameters appears not to depend on renal function.

Conclusion: In contrast to the sCD163, the cf-DNA/NETs seem to be an adequate parameter for assessing the disease activity of GPA and can be employed in evaluating the course of the underlying disease and the effects of therapeutic interventions (cyclophosphamide, plasma exchange).

1 Einleitung

1.1 ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden

Die ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden (AAV) sind Systemerkrankungen, die entsprechend der Nomenklatur der International Chapel Hill Consensus Conference von 2012 vornehmlich die kleinsten Gefäße (intraparenchymale Arterien, Arteriolen, Kapillaren und Venolen) und zum Teil auch mittlere Arterien und Venen betreffen. Zu den AAVs, bei denen es zu keiner bzw. nur geringen Immunglobulinablagerung (pauciimmun) in den Gefäßwänden kommt, gehören die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, früher Morbus Wegener), die mikroskopische Polyangiitis (MPA) und die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA, früher Churg-Strauss-Syndrom) [1]. Bei der EGPA treten in etwa der Hälfte der Fälle p-ANCAs bzw. anti-Myeloperoxidase-Antikörper auf [2, 3]. Neben der Assoziation mit einem Asthma ist eine nekrotisierende Vaskulitis charakteristisch, die multiple Organsysteme befallen kann. Die pulmonale Beteiligung spielt jedoch am häufigsten eine Rolle. Im Gegensatz zur GPA und MPA tritt eine renale Manifestation seltener auf. Meistens dominieren dann leichtere Verlaufsformen. Histopathologisch lässt sich neben granulomatösen Veränderungen typischerweise auch eine eosinophile Gewebeeinfiltration nachweisen. Im Differentialblutbild liegt in der Regel eine deutliche Erhöhung der Eosinophilen von mehr als 10% bzw. $> 1000/\mu\text{l}$ vor [3]. Da im Gegensatz zur GPA und MPA bei der EGPA die Eosinophilen und nicht die neutrophilen Granulozyten eine tragende Rolle in der Pathogenese der Grunderkrankung spielen, wird die EGPA im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet. In der Folge wird unter dem Begriff der AAV nur auf die Krankheitsentitäten GPA und MPA Bezug genommen.

1.1.1 Charakteristika

Die für die klinische Praxis wesentlichen anti-neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper (ANCAs) sind gegen die Myeloperoxidase (MPO) und die Proteinase 3 (PR3), beides Bestandteile der primären Granula neutrophiler Granulozyten, gerichtet. Im Rahmen des indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT, Screeningmethode auf ANCAs) treten durch die Freisetzung der Antigene aus den Granula im Zuge der Ethanolfixierung typische Fluoreszenzmuster auf. Die PR3, die hauptsächlich mit dem Krankheitsbild der GPA assoziiert ist, reichert sich v.a. im Zytoplasma an (cANCA). Demgegenüber lagert sich die positiv geladene MPO an die negativ geladene Kernmembran mit dem Resultat eines perinukleären Fluoreszenzmusters (pANCA). Die MPO ist eher mit dem Krankheitsbild der MPA vergesellschaftet. Der gleichzeitige Nachweis von PR3- und MPO-ANCAs ist extrem selten und am ehesten mit Medikamenten-induzierten Vaskulitiden assoziiert (z.B. Kokain, das durch Levamisol gestreckt wurde) [4].

Charakteristika der GPA sind granulomatöse entzündliche Veränderungen, die insbesondere den oberen und unteren Respirationstrakt betreffen, und nekrotisierende vaskulitische Veränderungen, die sich oftmals in Form einer Glomerulonephritis manifestieren. Im Gegensatz zur GPA treten bei der MPA keine granulomatösen Veränderungen auf. Häufig kommt es im Rahmen der typischen nekrotisierenden Vaskulitis zu einer Glomerulonephritis und einer pulmonalen Kapillaritis [1]. Potentiell kann bei beiden Krankheitsentitäten jedes Organsystem betroffen sein. Manifestationen im Hals-Nasen-Ohren (HNO)-Bereich, wie eine borkige Rhinitis oder eine Otitis media, kommen bei der MPA so gut wie nie vor und treten typischerweise bei der GPA auf [5]. Tabelle 1.1 stellt die charakteristischen klinischen Manifestationen der GPA und MPA gegenüber.

Eine histologische Sicherung ist wünschenswert, bei Vorliegen einer typischen klinischen Symptomatik aber nicht immer notwendig. Nasale oder sinoidale Biopsien haben eine geringe Sensitivität von weniger als 40% und

zeigen histologisch oftmals nur unspezifische (chronisch-entzündliche) Veränderungen. Renale Biopsien (Nachweis einer pauciimmun nekrotisierenden Glomerulonephritis, Halbmondbildung) und Probeentnahmen aus radiologisch auffälligen pulmonalen Manifestationen sind mit einer höheren Sensitivität, aber auch mit einem gesteigertem Risiko für Komplikationen vergesellschaftet. Neben der Diagnosesicherung kann die Auswertung von glomerulären Veränderungen auch zur Prognoseeinschätzung und der Wahl des Therapieregimes eine entscheidende Rolle spielen [5, 6]. Im Rahmen eines Rezidivs und auch nach remissionsinduzierender Therapie ist initial eine ausführliche Evaluation der Krankheitsaktivität und der Organbeteiligung(en) der Grunderkrankung durchzuführen. Dies beinhaltet neben der körperlichen Untersuchung und Bestimmung von Laborparametern (u.a. Differentialblutbild, CRP, ANCAs durch IIFT und ELISA, Retentionsparameter) auch die apparative Diagnostik (Röntgen-Thorax, Bodyplethysmographie mit Bestimmung der Diffusionskapazität, Abdomensonographie, Elektrokardiogramm, Echokardiographie, kraniale Magnetresonanztomographie (MRT), röntgenologische oder CT- bzw. MRT-morphologische Beurteilung der Orbitae und Nasennebenhöhlen), die entsprechend der sich präsentierenden Symptomatik zu ergänzen ist (z.B. neurophysiologische Untersuchungen, Gastroskopie, Koloskopie). Mit Hilfe von etablierten Scores können die Krankheitsaktivität (Birmingham Vasculitis Activity Score in aktueller Version 3 [BVAS]), die -ausdehnung (Disease Extent Index [DEI]) sowie chronische sowohl krankheits- als auch therapieassoziierte Schäden (Vasculitis Damage Index [VDI]) erfasst werden [6].

Tabelle 1.1 – Gegenüberstellung der Charakteristika von Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und mikroskopischer Polyangiitis (MPA), modifiziert nach [4, 5, 7]

	Granulomatose mit Polyangiitis	Mikroskopische Polyangiitis
Allgemeinsymptome	70-100%; Fieber, Arthral-/Myalgien, Fatigue	55-80%; Fieber, Arthral-/Myalgien, Fatigue
dermatologische Manifestationen	palpable Purpura (10 - 50%), leukozytoklastische Vaskulitis, ggf. nekrotisierende granulomatöse Entzündung	palpable Purpura (35 - 60%), leukozytoklastische Vaskulitis, kein Nachweis von Granulomen
ophthalmologische Manifestationen	Skleritis, Episkleritis, Uveitis, Pseudotumor orbitae	selten Skleritis, Episkleritis oder Uveitis
Manifestationen des Hals-Nasen-Ohren-Traktes	häufig (50 - 95%), borkige Rhinitis, Deformation/Perforation der Nasenseidewand und Sattelnase, chronische Sinusitis, Otitis media, Hörverschlechterung bis hin zum -verlust, ggf. granulomatöse Veränderungen	selten (2 - 30%), keine destruktiven oder granulomatösen Veränderungen
pulmonale Manifestationen	häufig (60 - 80%), alveoläre Hämorrhagien (Milchglastrübung im Rö-Thorax/CT), Infiltrate, Rundherde/noduläre Veränderungen, Kavernen, bronchiale oder subglottische Stenosen	häufig (60 - 80%), alveoläre Hämorrhagien (Milchglastrübung im Rö-Thorax/CT), Infiltrate
renale Manifestationen	häufig (60 - 80%), nekrotisierende intra- und extrakapilläre Glomerulonephritis (pauci-immun Glomerulonephritis), selten granulomatöse Veränderungen	sehr häufig (80%), nekrotisierende intra- und extrakapilläre Glomerulonephritis (pauci-immun Glomerulonephritis)
gastrointestinale Manifestationen	Kolitis, Darmischämie, gastrointestinale Blutungen	Kolitis, Darmischämie, gastrointestinale Blutungen
Manifestationen des Nervensystems	Mononeuritis multiplex (25%), Pachymeningitis	Mononeuritis multiplex (35%)
weitere Manifestationen	venöse Thrombosen (7 - 8%), selten Herzklappenveränderungen	venöse Thrombosen (7 - 8%)
Histologie	nekrotisierende Vaskulitis der kleinen Gefäße, Granulome (nicht immer nachweisbar)	nekrotisierende Vaskulitis der kleinen Gefäße, keine granulomatösen Veränderungen
ANCAs	in 90 - 95% nachweisbar, hauptsächlich PR3-ANCA (75% PR3-ANCA, 20% MPO-ANCA); ältere Daten: c-ANCA 64% und anti-PR3-Ak 66% bzw. p-ANCA 21% und anti-MPO-Ak 24% [8]	in 60-90% nachweisbar, gewöhnlich MPO-ANCA (60% MPO-ANCA; 30% PR3-ANCA) ältere Daten: p-ANCA 58% und anti-MPO-Ak 58% bzw. c-ANCA 23% und anti-PR3-Ak 26% [8]
Rezidivrate	höher	niedriger

1.1.2 Epidemiologie, Einflussfaktoren und Nierenbeteiligung

Die Häufigkeit des Auftretens der GPA und MPA unterliegt geographischen und ethnischen Schwankungen. Während in Nordeuropa, Australien, dem mittleren Osten, der Türkei und dem indischen Subkontinent die GPA die vorherrschende Krankheitsentität ist, dominiert in Japan und China die MPA [9–11]. Gegenüber nordeuropäischen ANCA-assoziierten Vaskulitispatienten werden in Japan und China in etwa 60 bzw. 7 mal häufiger anti-MPO-Antikörper nachgewiesen. Bei kaukasischen Amerikanern treten beide Krankheitsentitäten in einer annähernd ähnlichen Häufigkeit auf [10]. In Südeuropa kommt tendenziell die MPA häufiger vor [10, 11]. Bei farbigen Menschen scheint die GPA im Vergleich zu kaukasischen Europäern deutlich seltener aufzutreten. Bei ihnen manifestieren sich schwerere granulomatöse Veränderungen signifikant häufiger und die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs ist gegenüber den weißen Europäern deutlich verkürzt [12]. Die Inzidenz der AAVs beträgt in Europa 13 - 20/Millionen Einwohner, die Prävalenz 46 - 184/Millionen Einwohner. Männer und Frauen sind – mit einer leichten Betonung des männlichen Geschlechts – in etwa in gleichenmaßen betroffen. Ältere Menschen erkranken eher an einer AAV, das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen 55 und 74 Jahren [9, 11]. In Norddeutschland wurde die Prävalenz der GPA mit 98/Millionen Einwohner und die der MPA mit 28/Millionen Einwohner ermittelt. Die Inzidenz beträgt 8/Millionen Einwohner/Jahr für die GPA bzw. 2 - 3/Millionen Einwohner/Jahr für die MPA [6, 13].

Es bestehen genetische Risikofaktoren, die eine strenge Assoziation mit der Antigenspezifität der ANCAs, nicht jedoch mit den Krankheitsentitäten GPA oder MPA, zeigen. Anti-Proteinase 3-ANCAs sind mit HLA-DP und den Genen PRTN3 bzw. SERPINA1 assoziiert, die für die Serinprotease Proteinase 3 bzw. dessen Inhibitor α 1-Antitrypsin kodieren. Die anti-Myeloperoxidase-ANCAs zeigen eine Assoziation mit HLA-DQ. Trotz der genetischen Unterschiede, die in klinischen Studien ggf. eine stärkere Trennung der beiden Krankheitsentitäten bei der Analyse notwendig macht, bestehen diverse überlappende klinische Phänomene. Die beiden Zielantigene der ANCAs sind sowohl in den neutrophilen Granula, in Neutrophil Extrazellular Traps (NETs) als auch bei apoptotischen Neutrophilen zu finden und wirken über die selben Pathomechanismen proinflammatorisch [14]. Der Methylierungsstatus der für die Autoantigene kodierenden Genabschnitte MPO und PRTN3 hat einen Einfluss auf die Genexpression und ist ein Prediktor für das Risiko eines Rezidivs. Im Gegensatz zur Remission liegt im Status der erhöhten Krankheitsaktivität eine reduzierte DNA-Methylierung dieser Genabschnitte vor, die mit einer erhöhten Transkriptionsrate korreliert. Des Weiteren war das Risiko des Auftretens von Rezidiven bei AAV-Patienten in Remission unabhängig vom ANCA-Serotyp bei Patienten mit einer vermehrten DNA-Methylierung im Bereich der Promotorregion des PRTN3-Gens um 4,55-fach niedriger als bei einem verminderten Methylierungsstatus [15].

Kontrovers diskutiert wird der Zusammenhang zwischen der Exposition mit Quarzstaub (u.a. nach Erdbeben) und einem erhöhten Risiko hinsichtlich der Entwicklung und Schwere von ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden [2]. Rauchen erhöht das Rezidivrisiko der Grunderkrankung. Dabei korreliert die Höhe des gesteigerten Risikos mit der Anzahl der pack years [16]. Eine chronische Besiedelung der Nasenschleimhaut mit *Staphylococcus aureus* als ein Risikofaktor für das Auftreten von Rezidiven der GPA wird in der Literatur unterschiedlich bewertet und spielt ggf. eine untergeordnete Rolle [17–19].

Die Mortalität der Patienten mit einer AAV ist trotz der diagnostischen und therapeutischen Fortschritte in den letzten Jahrzehnten weiterhin gegenüber der der Normalbevölkerung erhöht. Das 1, 2, 5 und 10-Jahresüberleben beträgt zwischen 87 - 88%, 82 - 85%, 70 - 78% und 55% [20, 21]. Insbesondere eine renale, gastrointestinale

oder kardiovaskuläre Beteiligung der Grunderkrankung bei Erstdiagnose ist mit einem höheren Mortalitätsrisiko behaftet [20]. Eine schwere Einschränkung der Nierenfunktion mit einem Creatinin > 500 µmol/l bzw. der Notwendigkeit einer Dialysetherapie ist mit einer schlechten Prognose hinsichtlich des Überlebens und der Verbesserung der Nierenfunktion vergesellschaftet [22]. Eine renale Beteiligung der AAV tritt bei über 75% der Patienten auf [4]. Histologisch stellt sich in der Regel eine nekrotisierende intra- und extrakapilläre Glomerulonephritis ohne immunhistologisch nachweisbare Immunglobulinablagerungen (pauci-immune Glomerulonephritis) dar. Eine rasch verlaufende Form der Glomerulonephritis, die sogenannte rapid-progressive-Glomerulonephritis (RPGN), ist neben einer in kurzer Zeit entstehende Nierenfunktionseinschränkung mit Nachweis eines nephritischen Urinsediments (dysmorphe Erythrozyten (u.a. Akanthozyten) als Hinweis auf eine glomeruläre Hämaturie, Erythrozytenzylinder, Proteinurie gewöhnlich < 3,5 g/d) histologisch durch extrakapilläre halbmondförmige Proliferationen im Bowman-Kapselraum gekennzeichnet. Die Halbmondbildung kommt durch Proliferation glomerulärer Epithelzellen und durch Risse in der Basalmembran in den Bowman-Kapselraum eingewanderte hämatopoetische Zellen und Fibroblasten zustande. Die Dimension der von den vaskulitischen Veränderungen betroffenen Glomeruli, der Umfang der Halbmondbildung und ein ggf. bereits erfolgter sklerotischer Umbau besitzen einen prognostischen Wert hinsichtlich des renalen Überlebens. Durch eine frühzeitige Therapie können sich die zellulären Halbmonde zurückbilden, ansonsten erfolgt zunächst eine fibrozelluläre und schließlich irreversible fibröse Umwandlung [7].

1.1.3 Therapie

In Abhängigkeit des Ausmaßes des Befalls, des Schweregrades der Beeinträchtigung von Organfunktionen und des Vorhandenseins von ANCAs hat die European Vasculitis Society (EUVAS) eine Stadieneinteilung entwickelt (siehe Tabelle 1.2) [23], die für die Auswahl der medikamentösen Therapie entsprechend der aktuellen deutschen Leitlinie eine Rolle spielt [6].

Tabelle 1.2 – Stadieneinteilung der ANCA-assoziierten Vaskulitis entsprechend der deutschen S1-Leitlinie nach Empfehlungen der European Vasculitis Society (EUVAS) [6, 23]

klinische Subgruppe	systemische Vaskulitis außerhalb von HNO-Trakt und Lunge	Organfunktion bedroht	andere Definitionen	Serumcreatinin
Lokalisiert	nein	nein	keine konstitutionellen Symptome, ANCA oft negativ	< 120 µmol/l
Frühsystemisch	ja	nein	konstitutionelle Symptome, ANCA positiv oder negativ	< 120 µmol/l
Generalisiert	ja	ja	ANCA positiv	< 500 µmol/l
Schwer	ja	Organversagen	ANCA positiv	≥ 500 µmol/l
Refraktär	ja	ja	refraktär auf Standardtherapie	jedes

Die remissionsinduzierende Therapie ANCA-assoziiierter Vaskulitiden richtet sich nach der Krankheitsaktivität. Liegt ein frühsystemisches Stadium ohne Beeinträchtigung einer Organfunktion vor, wird zur Einleitung der Remission die Kombination aus Glucocorticoiden mit Methotrexat (0,3 mg/kg Körpergewicht (KG)/Woche, max. 25 mg) empfohlen [6, 24]. Im Falle einer generalisierten Verlaufsform der Vaskulitis mit Beeinträchtigung(en) von Organfunktion(en) bzw. einer schweren Verlaufsform mit Organversagen ist eine Kombinationstherapie aus Glukokortikoiden (1 mg/kg/ KG Prednisolonäquivalent pro Tag, max. 80 mg/d) und Cyclophosphamid etabliert [6, 24]. Aufgrund der deutlich niedrigeren Kumulativedosis erfolgt heutzutage der bevorzugte Einsatz der intravenösen Cyclophosphamid-Pulstherapie (15 mg/kg KG alle 2-3 Wochen, insgesamt 6 bis 10 Gaben) gegenüber der täglichen oralen Cyclophosphamidapplikation (2 mg/kg KG/d) [25]. Beide Therapieregime sind zur Remissionsinduktion geeignet und die Verbesserungen der Nierenfunktion fallen auf einem ähnlichen Ni-

veau aus [26]. Unter der Cyclophosphamid-Pulstherapie tritt zwar häufiger ein Rezidiv der Grundkrankheit im Vergleich zur täglichen oralen Therapie auf, Unterschiede hinsichtlich des Überlebens bzw. eine erhöhte Morbidität oder Mortalität bestehen jedoch nicht. Auch konnte kein Unterschied für die langfristige Entwicklung der Nierenfunktion beobachtet werden [27]. In einer aktuelleren klinischen Datenerhebung außerhalb eines Studienprotokolls bestand kein signifikanter Unterschied für das Auftreten eines Rezidivs der Vaskulitis in Abhängigkeit vom Cyclophosphamidregime [28]. Die geringere Cyclophosphamidkumulativedosis der Pulstherapie senkt das Risiko für Leukopenien und Infektionen [26, 28, 29] sowie möglicher Langzeitschäden wie Infertilität und maligne Erkrankungen, insbesondere Blasenkarzinomen, Leukämien, nicht-melanotischer Hautkrebs [4, 9, 25]. Ein erhöhtes Auftreten einer hämorrhagischen Cystitis bzw. von Urothelkarzinomen wird durch den Cyclophosphamidmetaboliten Acrolein verursacht. Zur Risikoreduktion der urotoxischen Nebenwirkungen sollte eine ausreichende Hydratationsbehandlung und die Einnahme von MESNA (Natrium-2-mercaptoethansulfonat), das durch Bindung an Acrolein dessen toxische Wirkung aufs Urothel unterbindet, erfolgen [9, 30].

In den letzten zehn Jahren etablierte sich Rituximab in der Therapie ANCA-assoziiierter Vaskulitiden und wird aktuell von den europäischen und deutschen Leitlinien neben dem Cyclophosphamid in Kombination mit Steroiden zur Remissionsinduktion bei Erstdiagnose bzw. im Rezidiv mit Organ- oder lebensbedrohlichen Verläufen empfohlen [6, 24]. Der zu den Biologika gehörende zytotoxisch wirkende anti-CD20 monoklonale Antikörper führt zu einer B-Zelldepletion. In der Folge kommt es durch eine reduzierte Antikörperproduktion und eine verminderte MHC II-abhängige Antigenpräsentation an T-Helferzellen zu einer Beeinträchtigung sowohl des humoralen als auch des zellulären Immunsystems [31]. In zwei großen randomisierten Studien (RAVE, RITUXVAS) stellte sich die Remissionsinduktion mit Rituximab ebenso effektiv dar wie unter Cyclophosphamid [32, 33]. Im Falle einer Rezidivbehandlung der Grunderkrankung scheint Rituximab sogar einen Vorteil zu besitzen [32, 34]. Unterschiede hinsichtlich des Überlebens und der Häufigkeit des Auftretens von Rezidiven zwischen den beiden Therapieregimen wurden in Langzeitanalysen nicht beobachtet [34–36]. Für Patienten mit einer Nierenbeteiligung konnten vergleichbare Daten für eine Verbesserung der Nierenfunktion und das renale Überleben beobachtet werden [35, 36]. Vorteilhaft ist die mutmaßlich fehlende Beeinträchtigung der Infertilität unter Rituximab gegenüber Cyclophosphamid, so dass Rituximab im reproduktionsfähigen Alter bevorzugt eingesetzt werden sollte [5, 6, 24].

Mittel der ersten Wahl zur Erhaltungstherapie nach erreichter Remission sind Azathioprin und Methotrexat (MTX) [6]. Beide Medikamente lieferten hinsichtlich des Auftretens unerwünschter Ereignisse (u.a. auch schwere Infektionen, maligne Erkrankungen), des Rezidivrisikos sowie der Rezidivraten, des 10-Jahresüberlebens, des Schweregrades im VDI, der Dynamik der Nierenfunktion und Entwicklung einer Dialysepflicht in den Studien vergleichbare Ergebnisse [37, 38]. Da MTX hauptsächlich renal eliminiert wird, ist die Gabe bei höhergradigen Nierenfunktionseinschränkungen kontraindiziert. In diesen Fällen sollte Azathioprin bevorzugt verordnet werden [39]. Der Einsatz von Rituximab in der Erhaltungstherapie erwies sich als vielversprechend. Unter Rituximab traten in einem Beobachtungszeitraum von 28 Monaten weniger Rezidive auf als unter Azathioprin [40]. Rituximab wird in der deutschen Leitlinie als Alternative bei Unverträglichkeit/Kontraindikation bzw. Therapieversagen von Azathioprin oder MTX empfohlen [6]. Die optimale Dauer einer remissionserhaltenden Therapie ist nicht bekannt. Sie sollte mindestens für zwei Jahre durchgeführt werden [6, 24].

Im Rahmen einer Induktionstherapie mit Cyclophosphamid oder Rituximab bzw. bei Prednisolondosen ab 10 mg/d wird zur Prophylaxe einer *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie die supportive Gabe von Cotrimoxazol 480

mg/d bzw. 960 mg 3x/Woche empfohlen [41]. Demgegenüber wird der Benefit einer Cotrimoxazoltherapie zur Beeinflussung der Krankheitsaktivität bei einer GPA in der Literatur kontrovers diskutiert. Im Falle einer lokalisierten Form der GPA mit ausschließlichem Befall des Hals-Nasen-Ohren-Traktes ohne Nachweis einer systemischen Vaskulitis zeigte sich ein gutes Ansprechen auf eine initiale Cotrimoxazoltherapie von 2x 960 mg/d [41]. Die deutsche Leitlinie empfiehlt Cotrimoxazol nur zur Remissionserhaltung bei einer lokalisierten Manifestation der GPA (Hals-Nasen-Ohren-Trakt und Atemwege) als Alternative zu einer immunsuppressiven Therapie [6].

Risikofaktoren für das vermehrte Auftreten eines Rezidivs der Grundkrankheit sind Antikörper gegen PR3 [27, 34, 38, 42], frühere Rezidive in der Anamnese, die Krankheitsentität der GPA [34] und das Vorliegen von HLA-DPB1*04:01 (DPB4), insbesondere in der homozygoten Form [43]. In einer post hoc - Analyse der RAVE-Studie erreichten Anti-PR3-Ak positive Patienten unter Rituximab signifikant häufiger und eine länger anhaltende komplette Remission als unter der Kombination Cyclophosphamid und Azathioprin. Für die Krankheitsentität der GPA stellte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Therapieregimen dar [42]. Ein initial deutlich erhöhtes Serumcreatinin mindert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Rezidivs. In einer retrospektiven Langzeitanalyse sank das Risiko für den jeweiligen Anstieg des Serumcreatinins von 10 $\mu\text{mol/l}$ um jeweils 1% [38].

Neben Infektionen spielt eine erhöhte Aktivität der Vaskulitis als Todesursache innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung eine entscheidende Rolle [20, 21]. Haupttodesursachen von Patienten mit einer AAV in verschiedenen Langzeitanalysen waren Infektionen [28, 44–46], kardiovaskuläre Ereignisse und maligne Erkrankungen [20, 21, 45].

1.1.4 ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden und NETs

Die ANCAs, die den Immunglobulinen der Klasse G zugeordnet werden, spielen in der Pathogenese der ANCA-assoziierten Vaskulitiden eine tragende Rolle [2, 4]. Eigentlich sind die Antigene MPO und PR3 in den primären Granula vor dem Immunsystem abgeschottet. Nach Degranulation werden sie in der Regel durch deren Inhibitoren Coeruloplasmin (MPO) und α_1 -Antitrypsin (PR3) zügig entsorgt [4]. Autoreaktive B-Zellen von AAV-Patienten produzieren TLR9-vermittelt ANCAs als Reaktion auf bakterielle oder virale hypomethylierte Einzelstrang-DNA [47]. Im Rahmen von Infektionen oder entzündlichen Prozessen erfolgt durch Lipopolysaccharide (LPS), dem Komplementfaktor C5a oder inflammatorischen Zytokinen (u.a. TNF- α , IL-1) das sogenannte Priming (eine Art Sensibilisierung) neutrophiler Granulozyten. Dabei kommt es zur Translokation der neutrophilen Antigene PR3 und MPO aus den primären Granula auf die Zelloberfläche. In der Folge binden ANCAs mit ihren Fab-Abschnitten an die nun freiliegenden Antigene. Die Fc-Region der Immunglobuline der Klasse G bindet gleichzeitig an den Fc γ -Rezeptor der Neutrophilen und führt so zu deren Aktivierung. Diese bewirkt zum einen die Degranulation von proteolytischen Enzymen sowie reaktiver Sauerstoffverbindungen, eine vermehrte Zytokinproduktion und die Bindung der Neutrophilen ans Gefäßendothel durch Freisetzung von Adhäsionsmolekülen. Zum anderen bilden die aktivierten Neutrophilen sogenannte Neutrophil Extrazellulär Traps (NETs), die synergistisch zu den aufgezählten Mechanismen zu einer Alteration des Gefäßendothels führen und an der Pathogenese der vaskulitischen Gewebe- und Organveränderungen beteiligt sind [2, 4, 7].

2009 stellten Kessenbrock et al. in Nierenbiopsien von Patienten mit renaler Beteiligung einer AAV NET-Bestandteile in unmittelbarer Nachbarschaft zu Infiltraten neutrophiler Granulozyten in betroffenen Glomeruli und

Tubuli dar [48]. In der Folge wurden NET-Bestandteile bzw. NETs in glomerulären Läsionen einer MPO-ANCA-assoziierten Glomerulonephritis vom fokalen Typ [49] und einer RPGN vom pauci-immun Typ nachgewiesen [50]. NETs konnten auch in der Nasenschleimhaut von Vaskulitispatienten [51] gesehen werden und neutrophile Granulozyten, die aus der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit einer aktiven Verlaufsform der Vaskulitis isoliert wurden, exprimierten nach in vitro-Stimulation NETs [51]. Sowohl in venösen [50] als auch in arteriellen Thromben [52] gelang der Nachweis von NETs. Die Inzidenz für venöse thrombotische Ereignisse ist bei Patienten mit einer ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitis sowohl in Remission (1,0/100 Personenjahre) als auch im Rahmen der aktiven Verlaufsform der Grunderkrankung (6,7 - 7,0/100 Personenjahre) höher als in der Normalbevölkerung (0,3/100 Personenjahre) und bei anderen rheumatischen Erkrankungen (systemischer Lupus erythematodes, rheumatoide Arthritis) [53–55]. Im Hinblick auf das Vorhandensein klassischer Risikofaktoren von thromboembolischen Ereignissen (u.a. Immobilisation, Trauma, Operationen, maligne Erkrankungen, Schwangerschaft, orale Kontrazeption, Übergewicht) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Vaskulitispatienten mit und ohne Auftreten eines Vaskulitis-assoziierten venothrombembolischen Ereignisses bestimmt werden [54]. Die Genese für eine erhöhte Thromboseneigung bei Vaskulitispatienten, insbesondere im aktivem Verlaufsstadium der Grunderkrankung, ist nicht abschließend geklärt. NETs spielen in der Pathogenese von Thrombosen eine Rolle [56, 57] und stellen so möglicherweise den fehlenden Link zur erhöhten Thromboseneigung bei Patienten mit einer ANCA-assoziierten Vaskulitis dar [50].

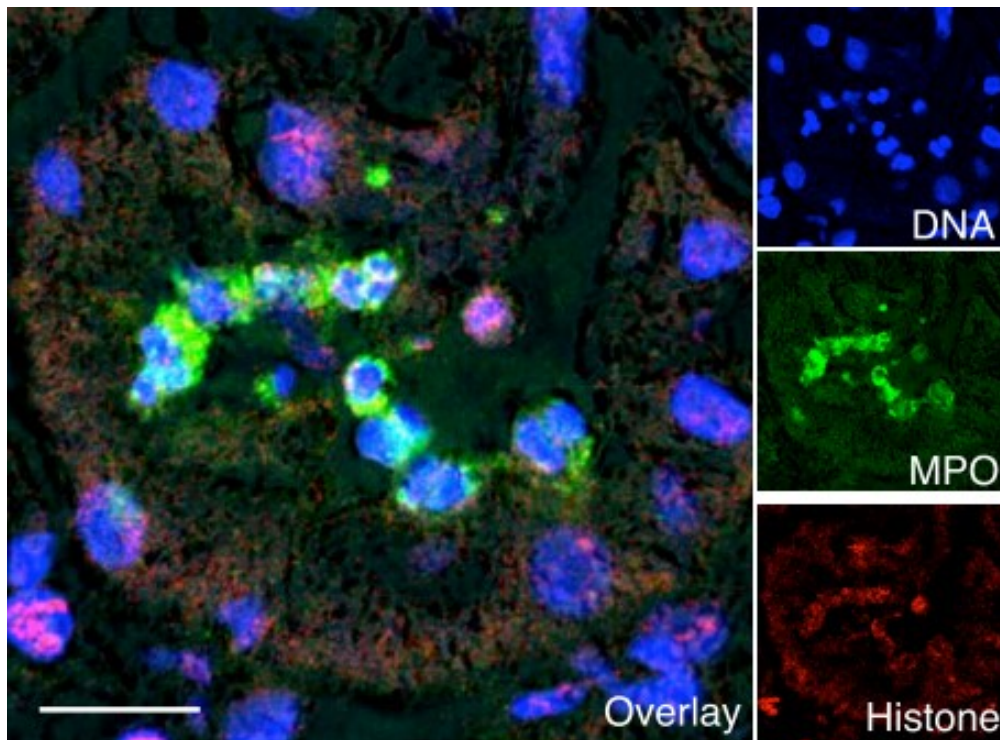


Abbildung 1.1 – NET-Ablagerungen in den glomerulären Kapillaren einer AAV-assoziierten Glomerulonephritis [48]
Immunhistochemisch Nachweis einer extrazellulären Kolokalisation der NET-Bestandteile DNA (blau), MPO (grün) und Histone (rot)

1.2 Neutrophil Extrazellular Traps

1.2.1 Neutrophile Granulozyten

Die zu den Akteuren des angeborenen Immunsystems zählenden polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten machen im Regelfall mehr als die Hälfte (50 - 70%) der im menschlichen Blut vorhandenen kernhaltigen Zellen aus und fungieren als vorderste Verteidigungslinie gegenüber invasiven Mikroorganismen, insbesondere Bakterien und Pilzen [58]. Entsprechend der Namensgebung sind sie durch lichtmikroskopisch sichtbare zytoplasmatische Granula charakterisiert, die diverse Enzyme und antimikrobielle Substanzen enthalten [59]. Man unterscheidet drei Arten von Granula mit unterschiedlichen Inhaltsstoffen: primäre „azurophile“ Granula (u.a. Myeloperoxidase, neutrophile Elastase), sekundäre „spezifische“ Granula (u.a. Lactoferrin, MMP-8, Pentraxin-3) und tertiäre Granula (u.a. Gelatinase, MMP-9) [60]. Die neutrophilen Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark über mehrere Stufen (Myeloblast – Promyelozyt – unreifer und reifer Myelozyt – Metamyelozyt – Stabkerniger – Segmentkerniger) aus einer Progenitorzelle, die auch für die Entstehung der Monozyten eine Rolle spielt. Die Proliferations- und Differenzierungsvorgänge nehmen ungefähr acht Tage in Anspruch [59]. In etwa $1 - 2 \cdot 10^{11}$ Neutrophile entstehen pro Tag im Knochenmark [60]. Lediglich der kleinste Anteil von 2 - 3% der Neutrophilen des Organismus befindet sich im Blut, 7% sind im Interstitium lokalisiert, der Rest ist als Reserve im Knochenmark vorrätig. Durch Infektionen oder medikamentös bedingt - u.a. durch Steroide - kommt es zu einer vermehrten Ausschwemmung Neutrophiler in die Zirkulation und Migration ins Gewebe. Im Blutstrom, in dem sich die Neutrophilen mit einer Halbwertszeit von ca. 6 bis 7 Stunden befinden, unterscheidet man einen zirkulierenden Pool ohne Bezug zum Endothel von einem marginalen Pool mit einem durch Selektine vermittelten Kontakt zum Gefäßendothel. Es kommt zum typischen „Rollen“ (englisch „rolling“) der Neutrophilen auf dem Endothel. Dieser Prozess läuft insbesondere in den postkapillären Venolen der Systemzirkulation ab. Im Rahmen von Infektionen vergrößert sich der marginale Pool. Vermittelt durch Chemotaxine (u.a. IL-8, Komplementprodukt C5a, Bakterienstoffe) kommt es zunächst durch Bindung von Integrinen (u.a. LFA-1, Mac-1 und CR3) der Neutrophilen an interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und ICAM-2) des Endothels zu einer festen Bindung. Anschließend erfolgt mit Hilfe des Adhäsionsmoleküls PECAM 1 (CD31), das auf Neutrophilen und Endothelzellen exprimiert wird, die Transmigration der neutrophilen Granulozyten zwischen benachbarten Endothelzellen ins Gewebe. Dieser Vorgang wird als Diapedese bezeichnet. Im Gewebe migrieren die neutrophilen Granulozyten entsprechend dem Chemokingefälle an den Ort der Entzündung [3].

1.2.2 Neutrophil Extrazellular Traps: Ein neuer Player des angeborenen Immunsystems

Neben der schon vor mehr als über 100 Jahren von Élie Metchnikoff beschriebenen Phagozytose [61] zur intrazellulären Abtötung von pathogenen Mikroorganismen, Eindämmung von Infektionen und Beseitigung von nekrotischem Material war bisher nur die Freisetzung von Granulabestandteilen (u.a. Bactericidal permeability-increasing Protein (BPI), Defensine, Cathelicidine) in den Extrazellulärraum als antimikrobieller Mechanismus neutrophiler Granulozyten bekannt [62, 63]. Brinkmann et al. beschrieben im Jahre 2004 erstmals eine weitere Möglichkeit der neutrophilen Granulozyten zur Abwehr von Mikroorganismen. Aktivierte Neutrophile können extrazelluläre Netze bilden, sogenannte „Neutrophil Extracellular Traps“ (NETs), die Virulenzfaktoren unschädlich machen, Mikroorganismen extrazellulär binden oder töten können [64, 65]. Anfänglich steht die Phagozytose im Vordergrund, bei der es nach Aufnahme der Mikroorganismen in das Phagosom durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (O_2^{2-} , H_2O_2 und HOCl) und der Einwirkung antimikrobiell wirkender Granulabestandteile (u.a. Lysozyme, verschiedene Proteasen, Phospholipase, BPI, Defensine, Cathelicidine) nach Formierung

des Phagolysosomes zu einer Destruktion der Mikroorganismen kommt [63, 65, 66]. Nach Aktivierung der Neutrophilen nimmt im Verlauf die Phagozytosekapazität ab und mit Entstehung der ersten NETs stellen diese nun den Hauptmechanismus der Abwehr dar. Die Phagozytose rückt in den Hintergrund [65].

Die Bildung der NETs bietet mehrere Vorteile. Durch die NETs kommt es zu einer signifikanten Vergrößerung der Oberfläche [67]. Mit einer bis zu 10 bis 15-fach größeren Ausdehnung im Vergleich zu einzelnen Neutro-

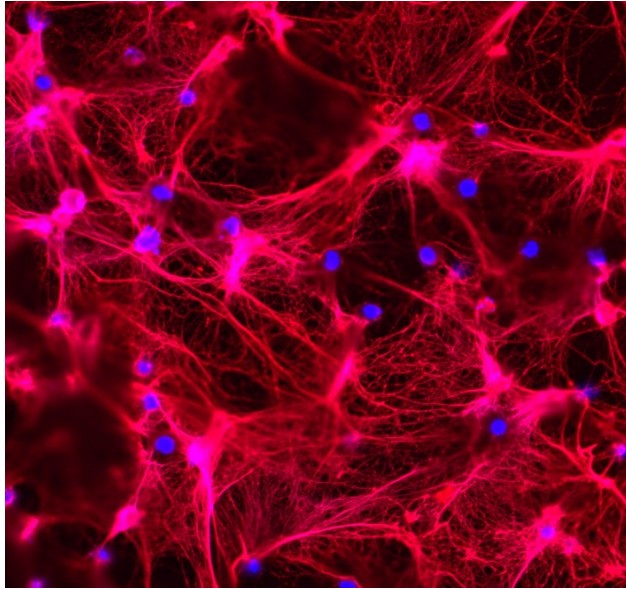


Abbildung 1.2 – Neutrophil Extrazellular Traps (NETs) [71]
Immunfluoreszenz Darstellung einer NET-Bildung.

philen [66] erhöhen sie die Angriffsfläche und binden mehr Mikroorganismen, als einzelne Neutrophile phagozytieren können [62, 68]. Sie sind in der Lage sperrige Partikel, die aufgrund ihrer Größe nicht phagozytiert werden können, wie z.B. Pilzhypen, einzudämmen sowie zu zerstören und spielen so bei der Beherrschung von Infektionen mit *Candida* oder *Aspergillus* Spezies eine entscheidende Rolle [69, 70]. Im Gegensatz zur neutrophilen Degranulation werden bei der NETosis neben antimikrobiell wirkenden Enzymen und Peptiden auch die zytotoxisch wirkenden Histone in den Extrazellulärraum freigesetzt. Die aggressiven Substanzen sind in NETs lokal gebunden und hoch konzentriert, um eine effektive synergistische antimikrobielle Aktivi-

tät auszuüben. Andererseits wird mutmaßlich durch die lokale Bindung dieser potentiell gewebschädigenden Substanzen im Regelfall ein Kollateralschaden auf den Organismus eingedämmt [62, 64].

NETs sind in der Lage neben grampositiven (u.a. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, Gruppe A-Streptokokken), gramnegativen (u.a. *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, Yersinien, *Haemophilus influenzae*) sowie atypischen Bakterien (u.a. *Mycobacterium tuberculosis*) auch Pilze (u.a. *Candida albicans*, Aspergillen), Parasiten (u.a. Leishmanien, *Toxoplasma gondii*) und Viren (u.a. HIV-1) wirkungsvoll zu bekämpfen. Dabei sind nicht nur die Mikroorganismen an sich ein adäquater Stimulus, sondern auch deren Bestandteile wie LPS bzw. N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) oder das antiphagozytär wirkende Zellwandprotein M1 von *Streptococcus pyogenes* [62, 66, 72]. Histone sind aufgrund ihrer sehr effizienten bakteriziden Wirkung ein Eckpfeiler der NET-vermittelten antibakteriellen Wirkung [69]. Im Gegensatz dazu beruht die antifungale Wirkung nicht auf den Histonen, sondern wird durch Granulabestandteile, insbesondere dem zytosolischen Protein Calprotectin, vermittelt [69, 73]. Nicht alle Erreger, wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis*, werden von den NETs getötet, aber zumindest effektiv an der weiteren Ausbreitung gehindert. Einige Mikroorganismen haben Strategien entwickelt, um sich dem Zugriff der NETs zu entziehen. Zum einen reduzieren Pneumokokken die Bindungsfähigkeit an die NETs mit Hilfe einer Polysaccharidkapsel. Zum anderen verfügen beispielsweise einige Pneumokokken und Gruppe A Streptokokken-Spezies über die genetische Information zur DNasen Bildung, die zur Zerstörung der NETs führen, so dass deren Infektion letztlich deutlich invasiver abläuft [62]. Neben Mikroorganismen können auch kleinste Mikropartikel wie das proinflammatorische plazentare syncytiotrophoblastäre Mikropartikel (< 200 nm) eingehüllt werden [74].

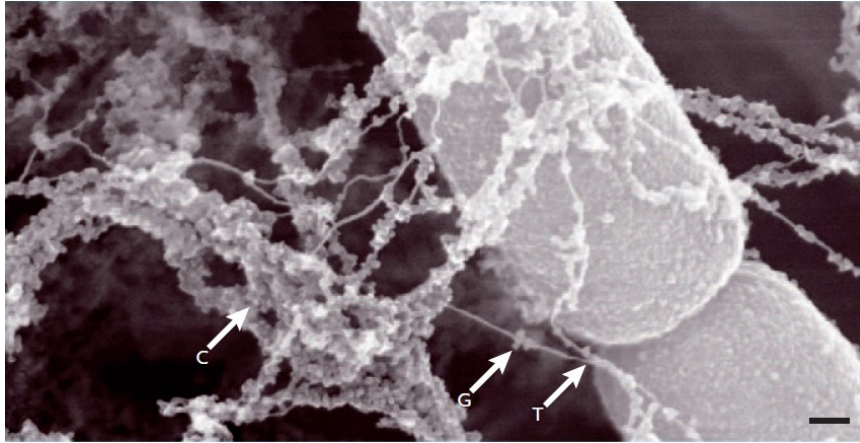


Abbildung 1.3 – Elektronenmikroskopische Darstellung der NETs mit Umhüllung von *Shigella flexneri* [63]

(T: einzelne Nukleosomenfäden; G: globuläre Proteinkomplexe; C: Zusammenlagerung zu größeren bzw. dickeren Strängen)

Stimulusabhängig kommt es bereits nach einer Stunde zur Bildung von NETs [75]. Drei bis vier Stunden nach der Stimulation ist in der Regel ein Großteil der NET-Bildung abgelaufen [65, 76]. Der Vorgang der NET-Formierung (als NETosis bezeichnet [77]) ist eine Form des aktiven Zelltodes, der sich in morphologischen und molekularen Aspekten von

der Apoptose und Nekrose unterscheidet [65]. Die flexiblen, nicht von einer Membran begrenzten Netze, setzen sich elektronenmikroskopisch aus feinen Nukleosomenfäden von 15 bis 17 nm Durchmesser sowie kugligen Proteinkomplexen mit einem Durchmesser von 25 bis 28 nm zusammen, die zu größeren Strängen von bis zu 50 nm komplexiert sein können [64, 69, 74]. Die Zusammensetzung der NETs ist vom Aufbau her, auch interindividuell, ähnlich und reproduzierbar [73]. Das Grundgerüst der NETs bilden die Chromatinfäden aus den Zellkernen der neutrophilen Granulozyten. Neben den Histonen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) sind diese mit Proteinen aus den primären (u.a. neutrophile Elastase, Cathepsin G, Myeloperoxidase, Proteinase 3, Azurocidin, α -Defensine 1 und 3, BPI), sekundären (u.a. Lactoferrin, Lysozym C) sowie tertiären (u.a. Gelatinase) Granula und einigen wenigen zytoplasmatischen Proteinen (u.a. Actin, Myosin-9, Catalase, Calprotectin, Alpha-Enolase, Transketolase) der Neutrophilen bespickt. Granulabestandteile konnten dem Bereich der elektronenmikroskopisch globulären Komplexen zugeordnet werden [64, 73]. Mit ca. 70% stellen die Histone H2A, H2B, H3 und H4 den größten Anteil der NET gebundenen Proteine dar. Im Gegensatz zum Zellkern unstimulierter Neutrophiler kommt es im Rahmen der NETosis zu einer Modifikation mit einer Reduktion der molaren Masse der Histone sowie einer relativen Abnahme des Anteils an H3 und H4. Die extranukleären Proteine, deren quantitativ am häufigsten auftretender Vertreter die neutrophile Elastase ist, scheinen keiner Änderung zu unterliegen [73].

Neben mikrobiellen Stimuli können auch humorale Botenstoffe (z.B. IL-8, TNF- α), verschiedene Immunkomplexe und Antikörper (u.a. anti-LL37, anti-HNA-3a, ANCA) die NET-Bildung auslösen [60, 72]. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), das dem intrazellulären Signalmolekül Diacylglycerol ähnelt, ist ein potenter Aktivator der Proteinkinase C und wird im Rahmen von experimentellen Studien häufig als Stimulator der NETosis eingesetzt [60]. Die Quantität der NET-Produktion variiert mit dem jeweiligen Stimulus. In vitro Experimente zeigten dass der kombinierte Einsatz mehrerer potenter Stimuli, im Vergleich zu der isolierten Stimulation mit dem jeweiligen Agens, zu einer verminderten NET-Bildung führt [72]. Andererseits beschrieben andere Arbeiten die Notwendigkeit der Aktivierung mehrerer Rezeptoren zur Auslösung einer effektiven NETosis [60]. Abbildung 1.4 vermittelt vereinfacht einen Eindruck über einige Signaltransduktionswege, die im Rahmen der NETosis stimulusabhängig ablaufen. Die NETosis ist abhängig von der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (O_2^- , H_2O_2 , HOCl) durch die NADPH-Oxidase und nachgeschalteter Enzyme, wie der Superoxiddismutase und Myeloperoxidase [60, 65]. Durch die Aktivierung Mitogen-activated protein kinases, wie ERK, mittels des Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionsweges oder der JNK (c-Jun N-terminal kinases, Auslösung durch LPS via

TLR 4-Rezeptor) kommt es vermittelt durch Phosphorylierung einzelner Untereinheiten zur Aggregation des NADPH-Oxidase-Komplexes an der vakouären Membran [60, 78, 79]. Reaktive Sauerstoffverbindungen vermitteln MPO-getriggert die Translokation der neutrophilen Elastase (NE) aus den primären Granula in den Zellkern. Dort erfolgt unter Einwirkung der beiden Enzyme die Dekondensation des Chromatins [80]. Die Chromatindekondensation wird des Weiteren durch eine Veränderung der Histonstruktur, bei der es durch die Desaminierung des positiv geladenen Arginin zum neutralgeladenen Citrullin neben der Entstehung einer Ketongruppe zur Veränderung der Polarität kommt, gefördert. Diese posttranslationale Modifikation, in der Literatur auch als Citrullination bezeichnet, wird durch das Enzym Peptidyl-arginine-deiminase 4 (PAD4) vermittelt [60, 80]. Die Acetylierung von Histonen beeinflusst durch den Wegfall positiver Ladungen die Interaktion mit der negativ geladenen DNA, fördert somit die Chromatindekondensation und folglich die NET-Formierung [78].

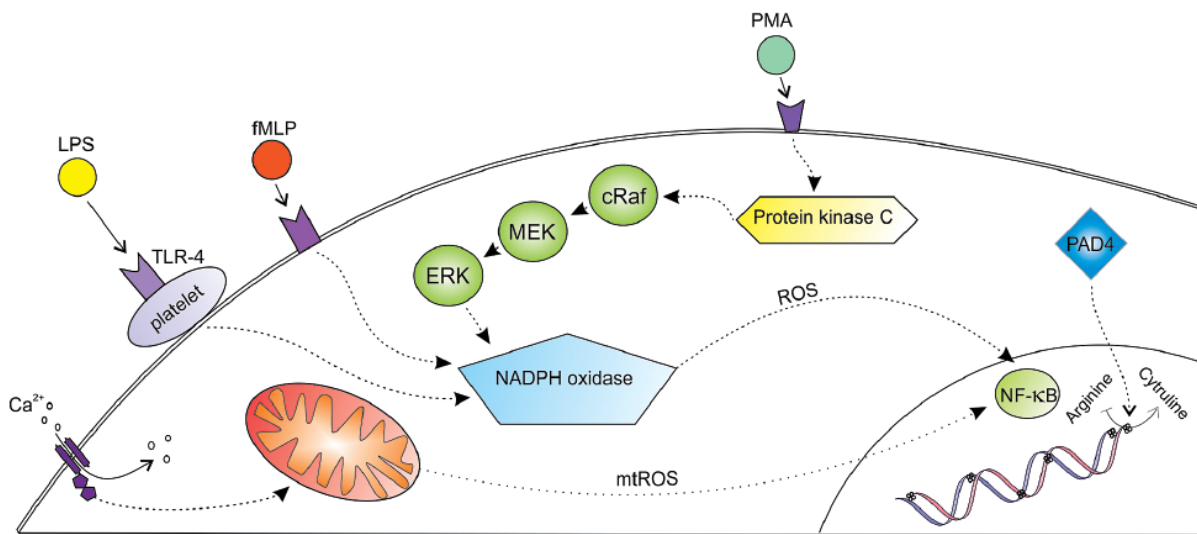


Abbildung 1.4 – Signaltransduktionswege verschiedener Stimuli der NETosis [72]

Durch Aktivierung der Proteinkinase C kommt es vermittelt über den Raf-MEK-ERK-Signaltransduktionsweg durch Phosphorylierung der p47^{phox}-Untereinheit der NADPH-Oxidase durch ERK (gehört zur Gruppe der Mitogen-activated protein kinases) zur Aggregation der NADPH-Oxidase und Produktion von ROS [60, 79]. Neben anderen NADPH-Oxidase abhängigen Signaltransduktionswegen, u.a. durch Bakterienbestandteile wie fMLP und LPS ausgelöst, kann die NETosis auch NADPH-Oxidase unabhängig unter Beteiligung eines intrazellulären Calciumeinstromes und mitochondrialer ROS-Produktion ausgelöst werden.

Des Weiteren gibt es einen NADPH-Oxidase unabhängigen Signaltransduktionsweg der NET-Bildung durch Beteiligung eines intrazellulären Calciumeinstromes, der u.a. durch die Induktoren Homocystein, IL-6, LPS, Ionomycin und Nikotin ausgelöst wird und mittels einer mitochondrialen Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen die NET-Bildung stimuliert [72, 80, 81]. Folgereaktionen reaktiver Sauerstoffverbindungen sorgen durch Quervernetzung von Proteinen für eine verbesserte Beschaffenheit der Netze [80]. Alkalische pH-Werte fördern sowohl die NADPH-Oxidase-abhängige als auch NADPH-Oxidase-unabhängige NET-Bildung. Zum einen liegen die pH-Optima der an der NET-Formierung beteiligten Enzyme PAD4 und NE im alkalischen Bereich, zum anderen ist die Produktion von ROS bei höheren pH-Werten erhöht [78].

Das intrazelluläre Management der NE scheint ein Einflussfaktor auf die Art der Pathogenabwehr zu sein. Kleine Mikroorganismen werden phagozytiert und die NE im Phagolysosom gebunden. Bei größeren Mikroorganismen bzw. Ansammlungen kleinerer Mikroorganismen, die einer Phagozytose nicht zugänglich sind, sowie bei einer Beeinträchtigung der Phagozytose durch z.B. Erreger-spezifische Virulenzmechanismen erfolgt neben der be-

schriebenen MPO-getriggerten Translokation der NE aus den primären Granula in den Zellkern auch eine Verschiebung ins Zytoplasma, mit der Folge einer Zersetzung des Zytoskeletts und Hemmung der Phagozytose [80].

Neben der klassischen NETosis gibt es weitere Stimulus-abhängige Varianten der NET-Formierung. Yousefi et al. bewiesen nach Priming neutrophiler Granulozyten mit GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) und anschließender Stimulierung mit C5a oder LPS die ROS-abhängige Bildung von NETs mit DNA mitochondrialen nicht nukleären Ursprungs durch weiterhin vitale Zellen [82]. Nach Stimulation mit Staph. aureus wurde neben der klassischen Form der NETosis (mit einem Maximum der NET-Entstehung nach 3 bis 4 Stunden und dem lytischen Untergang der Neutrophilen) noch eine im Vorfeld ablaufende ROS-unabhängige schnelle Form der NET-Bildung beschrieben, bei der es bereits nach fünf Minuten zur NET-Formierung kommt. Nach Separation der inneren und äußeren Kernmembranen lösen sich kleine mit nukleärer DNA gefüllte Vesikel ab, die in den Extrazellulärraum freigesetzt werden und rupturieren. Durch Verschmelzung mit Bestandteilen der neutrophilen Granula, die ebenfalls in den Extrazellulärraum freigesetzt werden, kommt es zur Konstitution der NETs. Die Integrität der neutrophilen Plasmamembran bleibt bei dieser frühen Formierung der NETs intakt. Die DNA entspricht hauptsächlich nukleären - in geringem Ausmaß auch mitochondrialen - Ursprungs [76]. Die antimikrobielle Aktivität ist im Vergleich zu den NETs der klassischen NETosis durch einen geringen Proteasenbesatz – u.a. der neutrophilen Elastase und Myeloperoxidase – jedoch herabgesetzt [76, 83]. Der verbliebene kernlose neutrophile Granulozyt ist weiterhin zur Phagozytose u.a. von Mikroorganismen befähigt [80]. Allein die unterschiedliche Struktur von LPS verschiedener gramnegativer Bakterien bzw. sogar von Serotypen eines Bakterienstammes führt in Abhängigkeit des Umgebungsmilieus (Serum vs. Gewebe) und einer möglichen Plättcheninteraktion via TLR4 und P-Selectin zu einer differenzierten Auslösung einer „vitalen“ NET-Bildung oder der klassischen NETosis mit Untergang des neutrophilen Granulozyten [83].

Der Abbau der NETs erfolgt durch ein Zusammenspiel von Serum-DNase I und Makrophagen. Die hauptsächlich im Pankreas und den Nieren produzierte calciumabhängige Serum-DNase I zerlegt das DNA-Grundgerüst der NETs. Die NET-Bestandteile werden anschließend von Makrophagen durch einen aktiven Prozess mittels Endophagozytose und lysosomaler Degradation beseitigt [84, 85].

1.2.3 NET-bedingte Gewebe- und Organschäden

Schon früh nach der Entdeckung der NETs durch Brinkmann et al. [64] wurde deutlich, dass NETs nicht nur bei der Abwehr von Mikroorganismen eine Rolle spielen, sondern auch an der Pathogenese nicht infektiöser Prozesse im Organismus beteiligt sind. Erste Hinweise darauf ergaben Untersuchungen von Patientinnen mit Präeklampsie, einer Gestose, die durch einen hohen Blutdruck und Proteinurie gekennzeichnet ist. Die bei Präeklampsie vermehrt in der Plazenta freigesetzten syncytiotrophoblastären Mikropartikel (STBM) und IL-8 stimulieren Neutrophile zur NET-Formierung [74]. Im Gegensatz zu gesunden Plazenten mit nur wenigen NETs, verursacht durch physiologisch moderate STBM Mengen bei einer normalen Schwangerschaft, war der intervillöse Raum in Plazenten bei Präeklampsie komplett mit NETs ausgefüllt [74]. Die NETs könnten durch Behinderung der Zirkulation im intervillösen Raum neben den maternalen Spiralarterien zur reduzierten plazentaren Perfusion beitragen. Gupta et al. beschrieben einen Circulus vitiosus, bei dem durch inadäquat modifizierte Spiralarterien eine initiale Hypoxie und dadurch bedingtem oxidativen Stress Neutrophile zur NET-Bildung stimuliert werden, die wiederum durch Beeinträchtigung der Zirkulation die Hypoxie verstärken. Weitere Neutrophile strömen nach der ischämiegetriggerten Freisetzung von STBM und IL-8 aus Synzytiotrophoblastzellen in den intervillösen

Raum (aus dem maternalen Blut) in die Plazenta und werden zur NETosis angeregt [86, 87]. Im Plasma von Patientinnen mit Präeklampsie wurden erhöhte Werte maternaler und fetaler zellfreier DNA (cf-DNA) gemessen, deren Level mit der Schwere der Erkrankung korrespondierte [88]. Für die fetale DNA-Erhöhung werden Plazentaschäden verantwortlich gemacht [89]. Die Quelle der maternalen DNA, die den weitaus größten Anteil der cf-DNA ausmacht [88], scheint unklar zu sein. Die massive NET-Bildung im intervillösen Raum könnte durch Ausschwemmung in die maternale Zirkulation die erhöhten cf-DNA-Konzentrationen erklären [87]. Signifikant erhöhte Elastase-Konzentrationen im Plasma von Müttern mit Präeklampsie untermauern die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten im Rahmen dieses Krankheitsbildes [90]. Neben Patientinnen mit Präeklampsie konnten auch bei Schwangeren mit einem SLE signifikant höhere Mengen an neutrophilen Granulozyten und NETs im intervillösen Raum der Plazenta nachgewiesen werden (im Vergleich zu Plazenten einer gesunden Kontrollgruppe). Des Weiteren wurde bei den Probanden mit Präeklampsie bzw. einem SLE eine höhere Ratio NETs/totale Anzahl der neutrophilen Granulozyten bestimmt, ein Beleg für die gesteigerte NET-Bildung im Rahmen dieser Krankheitsbilder [91]. Histopathologisch korrespondierte die vermehrte NET-Infiltration mit einer flächenförmigen Nekrose der Dezidua, einer Vaskulitis dezidualer Gefäße, Hämorrhagien der maternalen-fetalen Oberfläche und einer fetalen nicht-okklusiven thrombotischen Vaskulopathie [91].

Im Mausmodell bildeten neutrophile Granulozyten sowohl von Tieren mit soliden Tumoren als auch mit einer myeloproliferativen Neoplasie im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten tumorfreier Mäuse nach Stimulierung quantitativ signifikant mehr NETs. Möglicherweise mit einigen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises vergleichbar, scheint im Rahmen von malignen Erkrankungen ein Milieu vorzuherrschen, das die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur NETosis steigert [92]. Ebenso wie bei den Vaskulitiden gibt es Hinweise darauf, dass NETs einen Faktor hinsichtlich der erhöhten Koagulabilität und der Entstehung von Thrombosen bei malignen Erkrankungen darstellen [92]. Neutrophile Granulozyten sind die hauptsächlich an der Bildung von venösen Thromben beteiligte Leukozytensubklasse [93]. Durch die endotheliale Freisetzung von Von-Willebrand-Faktor und P-Selectin vermittelt, kommt es zur Aggregation und Aktivierung von Neutrophilen und Thrombozyten [80]. NETs bilden ein Grundgerüst zur Anlagerung, Aktivierung (u.a. durch Histone H3 und H4) und Aggregation von Plättchen (Plättchenthrombus) sowie zur späteren Einlagerung von Erythrozyten (Gerinnungsthrombus). Sie unterstützen die lokale Konzentrierung von Proteinen der Gerinnungskaskade (Fibrinogen, Fibronectin, Von-Willebrand-Faktor, Faktor XII) [56, 57, 93]. Tierexperimentell konnten zwei Tage nach Induktion einer tiefen Beinvenenthrombose erhöhte plasmatische DNA-Konzentrationen gemessen werden [56]. Die initiierte NET-Bildung wird durch die Interaktion aktivierter Thrombozyten via High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) weiter befördert [80]. NETs vermitteln eine Stärkung prokoagulatorischer Prozesse. Die Bindung von Fibrinogen an die extrazelluläre DNA nimmt zu [67]. Durch lokale Konzentration der Faktoren der extrinsischen (Tissue factor [51]) sowie intrinsischen Gerinnungskaskade (Faktor XII) und deren Aktivierung [80, 93] wird die Thrombinbildung gefördert [94]. Gleichzeitig erfolgt durch die neutrophilen Elastase-getriggerte Degradation des Tissue factor pathway inhibitors (TFPI) eine Hemmung antikoagulatorischer Prozesse [80].

LPS stimulieren die Migration von Thrombozyten und Neutrophile in die periphere Organzirkulation, wie den pulmonalen Kapillaren und Lebersinusoiden [68, 95]. Über den Toll-like receptor 4 (TLR4), der als eine Art „Messfühler“ für systemische Infektionen fungiert, werden die Plättchen bei hohen LPS-Plasmakonzentrationen, wie sie bei schweren Septitiden mit gramnegativen Bakterien auftreten, aktiviert und stimulieren die an der Endothelwand adhärenenten neutrophilen Granulozyten zur NETosis. Die in kurzer Zeit gebildeten NETs vergrößern

die antibakterielle Oberfläche und können einen Großteil der zirkulierenden Bakterien effektiv binden [95]. Neben TLR4, der etwa für die Hälfte der Plättchen-Neutrophilen-Interaktion verantwortlich zu sein scheint, spielen auch der TLR2 [95] und der thrombozytäre Protease-aktivierte Rezeptor 1 (PAR1), aktiviert durch Thrombin bzw. TRAP (Thrombin receptor-activating peptide) [96], bei der Plättchen-induzierten NETosis eine Rolle. Die NET-Bildung kann jedoch auch Kollateralschäden des Endothels und angrenzender Gewebe verursachen [68, 95]. Dies könnte eine Ursache für das Auftreten eines (Multi-)Organversagens im Rahmen schwerer Septitiden sein. Die in den NETs hochkonzentriert vorliegenden proteolytisch wirkenden Enzyme spielen dabei mutmaßlich genauso wie der nach NET-Formierung beobachtete reduzierte Blutfluss in kleinen Gefäßen, wie den Lebersinusoiden, mit dem Resultat einer möglichen Gewebehypoxie eine Rolle [95].

Im Rahmen einer Transfusions-assoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI) kommt es durch die Plättchen-Neutrophilen-Interaktion und konsekutiver NET-Bildung in der pulmonalen Mikrozirkulation, die innerhalb von Minuten einsetzen kann, zu einer Permeabilitätssteigerung der pulmonalen Endothelzellen und zur Ausbildung eines Lungenödems [96]. Möglicherweise tragen die aufgeführten Mechanismen bedingt durch die Plättchen-induzierte NETosis, die hauptsächlich in den kleinsten Gefäßen wie Lebersinusoiden, nicht aber in größeren Gefäßen auftritt [68, 95], auch zu renalen Läsionen im Rahmen ANCA-assoziiierter Kleingefäßvaskulitiden bei. Durch PMA oder TNF- α aktivierte Endothelzellen setzen u.a. IL-8 frei, das eine Induktion der NETosis bewirkt. Somit können auch durch die direkte Interaktion von Endothel und neutrophilen Granulozyten Endothelschäden auftreten [97].

Neben einer TRALI sind NETs auch an der Pathogenese eines infektiös-induzierten Lungenversagens beteiligt. Histopathologisch wurden NETs im betroffenen Lungengewebe eines durch LPS-induzierten akuten Lungenversagens nachgewiesen. Immunhistochemisch stellte sich citrulliniertes Histon H3 signifikant häufiger dar. Neben den NET-bedingten Gewebeschäden konnte auch ein Anstieg an Entzündungsmediatoren (IL-6, TNF- α) sowie eine erhöhte NET-DNA-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage bestimmt werden [98]. Histopathologische Veränderungen (Alveolarschäden, interstitielle Entzündung, Bronchiolitis, Hämorrhagien und pulmonale Ödeme) einhergehend mit einer Akkumulation von NETs im geschädigten Gewebe sowie einer Okklusion von Bronchiolen und einer paraklinischen Hypoxämie wurden auch im Rahmen eines Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) durch eine Influenzainfektion beobachtet [99]. Das Ausmaß der pulmonalen Epithelschädigung durch NETs ist konzentrationsabhängig [100].

Ein entscheidender Beitrag zur Endothel- und Gewebeschädigung wird durch die in den NETs enthaltenen Histone verursacht, deren zytotoxischer Effekt konzentrationsabhängig ist [100]. Insbesondere die Histone H3 und H4 besitzen eine zytotoxische Wirkung. Im Mausmodell kam es nach Injektion einer sublethalen Dosis von Histonen zu einem Sepsis-ähnlichen Bild. Histologisch stellten sich eine Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der alveolären Mikrozirkulation, Plättchen- und fibrinreiche Mikrothromben, vakuolierte Endothel- und pulmonale Epithelzellen, intraalveoläre Hämorrhagien und Fibrinablagerungen sowie eine Anreicherung von Fibrin und Kollagen innerhalb der interalveolären Septen dar [101]. Aktiviertes Protein C wirkt durch Spaltung der Histone protektiv hinsichtlich einer Gewebeschädigung und senkt die Mortalität [100, 101]. Innerhalb der NETs scheinen die Histone vor der proteolytischen Wirkung des aktivierten Protein C geschützt zu sein, da eine Behandlung mit aktiviertem Protein C keinen Einfluss auf den zytotoxischen Effekt der NETs hatte [100].

Extrazelluläre Histone stimulieren über einen TLR2 und insbesondere TLR4 abhängigen Signalweg die Bildung von Zytokinen (TNF- α , IL-6 und IL-10). Dieser Prozess wird durch die Anwesenheit freier DNA noch verstärkt [102]. Histone sind in NETs an das DNA-Grundgerüst gebunden. Diese Interaktion könnte eine prolongierte

Zytokinstimulation bedingen. Extrazelluläre Histone sind mitverantwortlich für die Entwicklung eines SIRS (Systemic Inflammatory Response-Syndrome) und eines Multiorganversagens bei Patienten mit einem akuten Leberversagen [103]. Im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionsschadens von Hepatozyten – z.B. bei Lebertransplantationen bzw. -resektionen oder im hypovolämischen Schock – kommt es zur Freisetzung von nukleären DAMPs (Damage associated molecular patterns) insbesondere HMGB1, Histonen und IL-33 in den Extrazellulärraum und zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lebersinusoide [75, 104]. HMGB1 und extrazelluläre Histone stimulieren Neutrophile zur NETosis über einen TLR4 und TLR9 abhängigen Signaltransduktionsweg [104]. IL-33, das im Rahmen einer Hypoxämie hauptsächlich von Endothelzellen der Lebersinusoide freigesetzt wird, vermittelt über den neutrophilen ST2 (suppression of tumorigenicity 2) - Membranrezeptor eine verstärkte NET-Bildung [75]. Die Formierung der NETs führt zu einer Exazerbation der Leberschädigung mit dem histologischen Nachweis perizentraler hepatozellulärer Nekrosen und schwerer sinusoidaler Dilatation, einhergehend mit einem paraklinischen Anstieg der Alanin-Aminotransferase (ALAT) im Serum. Die NETs wirken zum einen direkt hepatotoxisch, zum anderen stimulieren sie u.a. Kupffer-Stern-Zellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-6 und TNF- α) [75, 104].

Auch im Rahmen einer akuten Pankreatitis konnten neben der Infiltration neutrophiler Granulozyten NETs im geschädigten Pankreasgewebe, einhergehend mit erhöhten Plasmakonzentrationen an cf-DNA und proinflammatorischer Zytokine (IL-6, HMGB1, CXCL2 (C-X-C motif chemokine ligand 2) und MMP-9), nachgewiesen werden. NETs tragen einen entscheidenden Anteil an den histopathologischen Veränderungen des Pankreasgewebes, wie Leukozyteninfiltration, ödematöse Schwellung und Auftreten von Hämorrhagien, bei und spielen bei der Entwicklung einer pulmonalen Beteiligung im Rahmen der akuten Pankreatitis eine Rolle. Ein direkter zytotoxischer Effekt wird u.a. durch die Histone der NETs vermittelt, die durch Aktivierung von Trypsin in den Azinuszellen auch eine indirekte Schädigung des Pankreasgewebes vermitteln. Interessanterweise scheinen die NETs an der Rekrutierung und Aktivierung weiterer neutrophiler Granulozyten im Rahmen der akuten Pankreatitis beteiligt zu sein, so dass der proinflammatorische Prozess unterhalten wird. Dies wird u.a. durch eine vermehrte lokale Produktion des Chemokins CXCL2 und eine Hochregulation des neutrophilen Adhisionsmoleküls Mac-1 (Macrophage-1 antigen), das die Akkumulation neutrophiler Granulozyten im entzündlichen Gewebe unterstützt, vermittelt [105].

Neben den Histonen wird ein moderater Beitrag zum zytotoxischen Effekt der NETs durch das (antimikrobiell wirkende) Enzym Myeloperoxidase (MPO), das die Konversion von Wasserstoffperoxid zu Hypochloridsäure bewirkt, vermittelt [100]. NETs können zum einen durch Interaktion mit C1q die klassische Komplementkaskade aktivieren [106], zum anderen sind sie auch an der Auslösung des alternativen Komplementweges u.a. im Rahmen von ANCA-positiven Vaskulitiden beteiligt und enthalten die Komplementfaktoren des Membranangriffskomplexes (C5b, C6, C7, C8 und C9) [78].

1.2.4 NETs und Autoimmunität

Durch die NETs kommt es zu einer lokalen Konzentration diverser neutrophiler Proteine (u.a. neutrophile Elastase, Proteinase 3 und Myeloperoxidase), angeheftet an ein DNA/Histon-Grundgerüst. Einhergehend mit der NETosis erfolgt somit auch die Freisetzung dieser potentiellen Antigene in den Extrazellulärraum, so dass diese nicht mehr durch zelluläre Strukturen vor den Akteuren des adaptiven Immunsystems geschützt sind [107, 108]. Die Integrität der NETs kann bis zu mehrere Tage bestehen bleiben [80]. Ein zeitnaher regelrechter Abbau der NETs scheint für die Aufrechterhaltung der Gewebemhomöostase und zur Verhinderung der Präsentation von Autoantikörpern eine wichtige Rolle zu spielen [84]. Das in den NETs enthaltene kationische antimikrobiell wirkende Peptid LL37 kann durch direkte elektrostatische Interaktion mit den anionisch geladenen humanen Nukleinsäuren zu strukturellen Veränderungen dieser führen und somit körpereigene DNA in einen TLR9 Aktivator von plasmatischen dendritischen Zellen sowie körpereigene RNA in TLR7- bzw. TLR8-Aktivatoren von plasmatischen und myeloischen dendritischen Zellen umwandeln. In der Folge werden durch eine vermehrte $\text{INF-}\alpha$ -Produktion (via TLR9 und TLR7 plasmatischer dendritischer Zellen) sowie Reifung von myeloischen dendritischen Zellen (via TLR8 myeloischer dendritischer Zellen und $\text{INF-}\alpha$ -Einfluss) CD4^+ T-Lymphozyten stimuliert und eine Autoimmunreaktion ausgelöst [107, 109–111]. Durch Zytokinproduktion (u.a. IL-2) der stimulierten CD4^+ T-Lymphozyten kommt es zu deren Proliferation. Die Interaktion dieser autoreaktiven T-Helfer-Lymphozyten mit naiven B-Zellen führt zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen, die lösliche Antikörper mit hoher Antigen-Affinität produzieren und sezernieren [59].

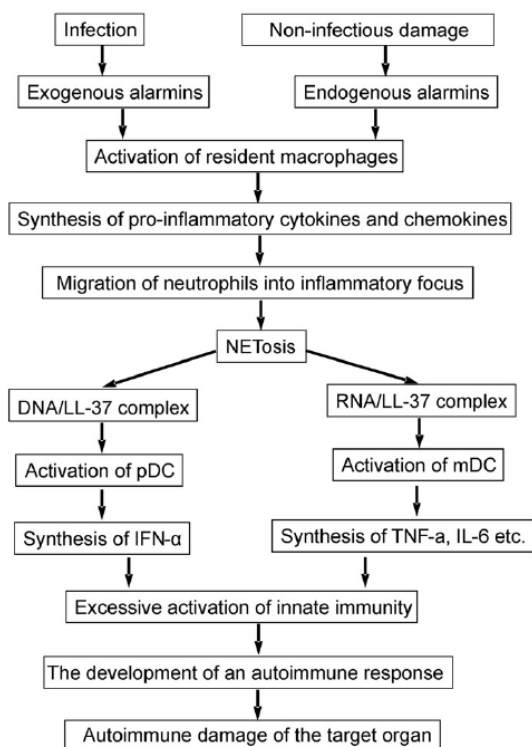


Abbildung 1.5 – Potentielle Kaskade einer NET-vermittelten Autoimmunreaktion [112]

Abbildung 1.5 vermittelt einen schematischen Überblick über eine mit der NETosis einhergehende potentiell kollateral auftretende Entwicklung einer Autoimmunreaktion.

Im Rahmen der NETosis kommt es vermittelt durch die PAD4 zu einer Modifikation der in den NETs enthaltenen Histonen H3 und H4 mit in der Folge veränderten kovalenten Bindungseigenschaften. Argininanteile werden in Citrullin umgewandelt, ein Mechanismus, der bei der Apoptose von Neutrophilen nicht auftritt. Die veränderten nukleären Antigene werden im Zuge der NETosis in den Extrazellulärraum freigesetzt und können als potenzielle Autoantigene, ggf. in Interaktion mit mikrobiellen Strukturen, eine Stimulierung des adaptiven Immunsystems und im weiteren Verlauf eine Autoimmunreaktion auslösen [113–115]. Seren von Probanden mit Felty's Syndrom reagierten vorzugsweise mit citrullinierten Histonen von aktivierten neutrophilen Granulozyten und NETs [115]. ACPAs (anti-citrullinated protein antibodies) in Seren von Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis binden an das citrullinierte-Histon H4 von NETs, eine Interaktion mit unmodifiziertem Histon H4 erfolgt nicht [114].

Wang et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen der β -Zellautoimmunität und einer erhöhten NETosis bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1. Es wurden erhöhte Plasmakonzentrationen und Enzymaktivitäten an neutrophiler Elastase und Proteinase 3 nachgewiesen. Gleichzeitig war die Plasmakonzentration an frei zirkulierenden MPO-DNA-Komplexen signifikant erhöht und korrelierte positiv mit der Plasmakonzentration der jeweiligen Serinprotease. Das galt insbesondere bei Patienten mit einer Krankheitsdauer des Diabetes von weniger als einem Jahr seit Diagnosestellung. Bei diesen Patienten konnte ebenfalls eine verminderte Anzahl an neutrophilen Granulozyten bestimmt werden, so dass die erhöhte Plasmakonzentration und -aktivität der Serinproteasen, die mit der Titerhöhe an β -Zellautoantikörpern (Glutamatdecarboxylase-Antikörper (GADA) und Antikörper gegen die Tyrosinphosphatase 2 (IA2A)) korrelierten, neben einer Reduktion an α 1-Antitrypsin (einem Inhibitor der Serinproteasen) u.a. einer erhöhten NETosis zugeschrieben wurde [116].

Medikamenten- bzw. Drogen-induzierte Vaskulitiden beruhen ebenfalls auf einer Beeinträchtigung der immunologischen Toleranz. Kokain bzw. Levamisol – ein Anthelminthikum, das in der Mehrzahl der Fälle als Streckungsmittel dem Kokain beigemischt wird – stimulieren sowohl die NET-Bildung als auch die Freisetzung von B-Zell aktivierenden Faktoren (TNF-Familie). Es kommt zur Bildung von ANCAs, die im Gegensatz zu den ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden hauptsächlich gegen die neutrophile Elastase gerichtet sind und ihrerseits im Rahmen eines chronischen Abusus eine vermehrte NETosis bedingen und zur Ausbildung von vaskulitischen Veränderungen beitragen können [117]. Unter dem Einfluss des Thyreostatikums Propylthiouracil kommt es zur Bildung von NETs mit einer abweichenden Konformation, die eine höhere Stabilität gegenüber dem Abbau durch die DNase I aufweisen und im Tiermodell die Bildung von ANCAs gegen die Myeloperoxidase induzierten sowie pulmonale vaskulitische Veränderungen bzw. eine pauci-immune Glomerulonephritis auslösten [118].

1.2.5 NETs und systemischer Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung multifaktorieller Genese. Inflammatorische Prozesse, die durch eine Dysregulation des Immunsystems, bei der es u.a. zur Bildung von Autoantikörpern und Immunkomplexen (an extrazelluläre RNA oder DNA gebundene Autoantikörper) mit konsekutiver Auslösung u.a. des Komplementsystems und zellulärer Entzündungsmechanismen kommt, können in nahezu jedem Gewebe und Organsystem auftreten [3, 7, 119]. Inzidenz und Prävalenz variieren in Abhängigkeit der ethnischen Herkunft. Bei Kaukasiern tritt der SLE vergleichsweise seltener und mit weniger schwerem Verlauf auf [120]. In Nordeuropa beträgt die Inzidenz 4-5/100000 Einwohner/Jahr [106]. Frauen erkranken an einem SLE 10 bis 15-mal häufiger als Männer. Männer neigen dagegen zu einem protahierten Verlauf. Der SLE kann in jedem Alter auftreten, im Durchschnitt manifestiert er sich zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr [120]. Neben leichteren Manifestationen wie Arthralgien, Myalgien, nicht-erosive Polyarthritiden und Hauterscheinungen (z.B. Schmetterlingserythem, Fotosensitivität, Raynaud-Phänomen) kann es zu schwerwiegenden Organbeteiligungen von ZNS (Psychose, Epilepsie, Myelopathie), Lunge (Lupuspneumonitis), Herz (Myokarditis, Libman-Sacks-Endokarditis) und Nieren (Lupusnephritis mit rasch progressivem Verlauf) kommen [3, 7].

Der SLE ist durch das Auftreten einer Vielzahl von Autoantikörpern, die teils schon Jahre vor den ersten klinischen Manifestationen nachweisbar sein können, gegen diverse Antigenstrukturen (u.a. nukleäre, zytoplasmatische, membranäre und phospholipid-assoziierte Antigene, Endothelzellen, Plasmaproteine, neuronale Strukturen) gekennzeichnet [121]. Die antinukleären Antikörper (ANA), die bei 98% der SLE-Patienten auftreten (bester

Screening-Test) [3] und ein Element der ACR-Kriterien zur Diagnosebestimmung des SLE darstellen [122, 123], sind neben den anti-dsDNA-Ak (Prävalenz 70%, hohe Titer sind SLE-spezifisch) [3] in der Klinik am gebräuchlichsten. Nicht alle Autoantikörper sind spezifisch für den SLE, sondern kommen zum Teil auch bei anderen Autoimmunprozessen vor. Von den ca. 180 identifizierten Autoantikörpern korrelieren einige (z.B. Antikörper gegen dsDNA, C1-Inhibitor, Endothelzellen, Nukleosomen) mit der Krankheitsaktivität. Ein Großteil ist mit dem Auftreten spezifischer Krankheitsmanifestationen assoziiert (z.B. Anti-Ro(SS-A)-Ak mit dem neonatalen Lupus und kongenitalem AV-Block; AK gegen Phospholipide, β_2 -Glycoprotein 1 und Cardiolipin mit einem erhöhten Risiko für thrombotische Ereignisse und Aborten; Anti-ribosomal-P-Protein mit der Lupusnephritis und Cerebritis) [121].

Die Pathogenese des SLE ist komplex und kann hier nur ansatzweise dargestellt werden. Einige Autoren sprechen beim SLE wegen seiner Heterogenität von einem Syndrom, das auf unterschiedlichste Weise ausgelöst werden kann [124]. Durch ein Zusammenwirken von epi- bzw. genetischer Prädisposition (u.a. Gene mit Einfluss auf die Lymphozytenfunktion, der Beseitigung apoptotischer Zellreste und Immunkomplexen, der Interferon-vermittelten angeborenen Immunität), Umwelt- (UV-Strahlung, Silikatstaub) und Risikofaktoren (u.a. weibliches Geschlecht, Rauchen, EBV-Infektion, orale Kontrazeptiva und Hormonersatztherapie) kommt es zu einer Dysregulation des Immunsystems [3, 120]. Durch eine bspw. durch UV-Strahlung getriggerte erhöhte Apoptoserate und einer verminderten Fähigkeit zur Beseitigung von Zellresten, u.a. durch Phagozytose, DNasen sowie RNasen, sind nukleäre Strukturen dem Immunsystem im Extrazellulärraum längere Zeit ausgesetzt. Hierbei kann es zum einen zur Antigenmodifikation kommen, zum anderen tritt beim SLE ein Verlust epigenetischer Mechanismen zum Schutz eigener DNA und RNA auf [124]. Posttranskriptionale epigenetische Modifikationen der DNA führen beim SLE u.a. zu einer Hypomethylierung der DNA [3]. Dendritische Zellen und Makrophagen werden TLR7- und TLR9-vermittelt aktiviert (normalerweise durch virale Nukleinsäuren). Es kommt zur Produktion von Interferonen und Zytokinen, die zur Stimulierung autoreaktiver T-Zellen führen. Diese fördern eine Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen und Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen [124]. Durch Genpolymorphismen lymphozytärer Signalwege ist die Stimulationsschwelle antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten beim SLE herabgesetzt. Die Aktivität regulatorischer und entzündungshemmender CD4- und CD8-positiver T-Zellen ist reduziert. Dies ist u.a. durch eine unzureichende Produktion von IL-2 und Transforming-Growth-Factor (TGF) durch T- und natürliche Killerzellen bedingt [3]. $\text{INF-}\alpha$ verursacht auch die typischen Allgemeinsymptome (Fieber, Müdigkeit, Arthralgien und Myalgien), ähnlich einem viralen Infekt. T-Gedächtniszellen und langlebende Plasmazellen persistieren ein Leben lang. Infektionen und Traumata können eine Reaktivierung der Grunderkrankung durch eine Expansion dieser autoreaktiven Lymphozyten auslösen [124]. Autoantikörper- und Immunkomplex-vermittelt kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems. Letztlich folgt im Zusammenspiel mit weiteren zellulären Effektorzellen des Immunsystems, u.a. Monozyten/Makrophagen, eine Gewebeschädigung, die vor allem einen fibrotischen oder sklerotischen Umbau zahlreicher Organe verursachen kann (u.a. Niere, Lunge, Gefäßbett des Gehirns) [3].

Die Medikation mit dem Antimalariamittel Hydroxychloroquin wird prinzipiell für alle Patienten mit einem SLE empfohlen. Glucocorticoide werden im Rahmen einer erhöhten Aktivität zur schnellen Symptomkontrolle eingesetzt, sollten im Verlauf jedoch auf niedrige Dosen (unterhalb der Cushingschwelle) reduziert bzw. ausgeschlichen werden. Ist eine weitere Therapieeskalation notwendig, zur Einsparung von Steroiden oder zur Reduktion des Rezidivrisikos, kommen die Immunsuppressiva MTX, Azathioprin und Mycophenolat-Mofetil in Betracht. Aza-

thioprin ist v.a. bei Kinderwunsch wegen der fehlenden Teratogenität zu empfehlen. Bei fehlender renaler Manifestation und weiterhin nicht kontrollierter Krankheitsaktivität kann Belimumab, ein Antikörper gegen den B-Lymphozyten-stimulierenden Faktor (BAFF: B-cell activating factor), eingesetzt werden. Cyclophosphamid kommt bei einem schweren (therapierefraktären) Krankheitsverlauf und insbesondere bei renaler bzw. kardiopulmonaler Organbeteiligung zur Anwendung [125].

Mit der Entdeckung der NETs [64] eröffnete sich im Hinblick auf die Entstehung der Autoantikörper ein weiterer Aspekt der komplexen Pathogenese des SLE. Die in den NETs enthaltenen Komplexe aus DNA und granulären neutrophilen Proteinen wie LL37, Lysozym oder Lactoferrin verursachen eine TLR9-vermittelte Aktivierung von B-Gedächtniszellen und die Auslösung einer polyklonalen Antikörperproduktion bei Patienten mit einem SLE. Des Weiteren erfolgt durch die Interaktion mit dem B-Zell-Rezeptor eine Aktivierung autoreaktiver B-Zellen und die Produktion NET-spezifischer Autoantikörper, bspw. gegen LL37 [119]. In Seren von SLE-Patienten konnten neben erhöhten NET-Markern (cf-DNA, MPO-Aktivität, MPO-Ak), die mit der Höhe an anti-dsDNA-Ak korrelierten, auch signifikant höhere Konzentrationen an BAFF gemessen werden. In Kombination mit den NETs unterstützt BAFF die Reifung und Differenzierung autoreaktiver B-Zellen [126]. Trotz erhöhter DNase I-Konzentrationen weisen Patienten mit einem SLE erhöhte plasmatische cf-DNA-Konzentrationen auf, deren Fähigkeit zum NET-Abbau ist vermindert [126]. Hakkim et al. beobachteten einen Zusammenhang zwischen einem gestörten Abbau der NETs, hohen anti-NET- bzw. anti-dsDNA-Ak-Titern und dem gehäuften Auftreten einer Lupusnephritis [84]. Seren einer Subpopulation von SLE Patienten besaßen im Vergleich zu Seren anderer SLE Patienten und gesunder Probanden eine verminderte Fähigkeit NETs zu degradieren. Als Ursache des verminderten NET-Abbaus wurden Inhibitoren der DNase I bzw. Antikörper, die die NETs vor dem Zugriff der Nuklease schützen, verantwortlich gemacht. Interessanterweise entwickelten Probanden mit einer defizitären NET-Degradation – unabhängig von deren Ursache – eher eine Lupusnephritis als SLE Probanden mit einem effizienten Abbau der NETs [84]. Dass die Fähigkeit von Lupuspatienten, die NETs zu degradieren nicht nur individuell unterschiedlich sein kann, sondern zum Teil auch mit der Krankheitsaktivität variiert, zeigte eine Studie von Leffler et al. [106]. Vor allem im Zustand der erhöhten Aktivität der Grundkrankheit weisen ca. ein Drittel (29%) der Patienten mit einem SLE einen defizitären NET-Abbau auf, im Gegensatz zur Remission mit nur 12%. Der Großteil mit defizitärem Abbau bei erhöhter Aktivität zeigte unter Remission einen normalen NET-Abbau. Patienten, die schon unter Remission die NETs nur schlecht degradierten, bauten bis auf einzelne Ausnahmen auch bei erhöhter Krankheitsaktivität die NETs nur mangelhaft ab [106].

Bei Leffler et al. korrelierte neben der Pleuritis eine renale Manifestation der Kollagenose, insbesondere die Lupusnephritis Typ IV nach der WHO-Klassifikation, mit einem defizitären NET-Abbau [106]. Andere Arbeitsgruppen fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der eingeschränkten NET-Degradation bzw. der Höhe der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentration und einem bestimmten Typ der Lupusnephritis [84, 127]. Die Proteinurie, ein Manifestationskriterium sowohl der akuten als auch der chronischen Glomerulonephritis, trat vor, während und nach der Phase der verminderten NET-Clearance signifikant häufiger bei SLE-Patienten mit einem verminderten NET-Abbau auf. Zelluläre Zylinder, als Hinweis auf eine aktive Verlaufsform der Lupusnephritis, konnten demgegenüber nur zum Zeitpunkt der defizitären NET-Degradation signifikant häufiger im Urinsediment bestimmt werden [128]. Probanden, die die NETs regelrecht degradierten, zeigten eine Assoziation mit leichteren Krankheitsmanifestationen wie Arthritiden und einem Exanthem [106].

1.2.6 cf-DNA/NETs als potentieller klinischer Parameter

Bereits 1948 wurde das Vorhandensein von extrazellulärer DNA im menschlichen Plasma, sogenannte cell-free DNA (cf-DNA), beschrieben [129]. Seit der Entdeckung der NETs durch Brinkmann et al. [64] hat es diverse Studien gegeben, cf-DNA von neutrophilen Granulozyten (cf-DNA/NETs) zu quantifizieren und als potentiellen klinischen Parameter einzusetzen. Die Bestimmung der cf-DNA/NETs könnte bei der Differenzierung einer septischen Arthritis von einer aktivierten Arthrose bzw. einer nicht-infektiös bedingten Arthritis eingesetzt werden. Die Konzentration der cf-DNA/NETs in der Synovialflüssigkeit stellte sich bei der septischen Arthritis im Gegensatz zu den anderen beiden Krankheitsbildern signifikant erhöht dar. Des Weiteren wies der Parameter im Vergleich zur Standardlabordiagnostik (Leukozyten und CRP im Serum, Leukozyten im Gelenkpunktat) eine hohe Sensitivität bzw. Spezifität für die Diagnose der septischen Arthritis auf [130].

Die Bestimmung der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentration ist möglicherweise auch als prognostischer Marker zur Risikostratifizierung von posttraumatischer Sepsis und Organversagen von Nutzen [131]. Polytraumapatienten mit initial deutlich erhöhten cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen, die im Verlauf nur langsam fielen und nach ca. einer Woche einen erneuten Peak aufwiesen, hatten eine deutlich höhere Letalität. Deren cf-DNA/NETs-Kinetik wies einen hohen positiven prädiktiven Wert für die Entwicklung einer schweren Sepsis und Multiorganversagen auf. Dagegen gingen durchgehend niedrigere cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen mit einem negativen prädiktiven Wert von 100% für Multiorganversagen und Tod einher [131]. Eine zweite Studie bestätigte die Kinetik der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen mit einem erneuten Anstieg im Rahmen der Entwicklung einer postraumatischen Sepsis. Schon in der frühen Phase des septischen Krankheitsbildes konnten signifikant höhere cf-DNA/NETs-Konzentrationen im Vergleich zu Traumapatienten, die im Verlauf keine Sepsis entwickelten, und gesunden Probanden bestimmt werden [132].

Hinweise auf einen weiteren Einsatz von cf-DNA/NETs als prädiktiven Wert hinsichtlich der Mortalität zeigten sich im Rahmen einer Studie von Verbrennungsoptionen, die an mindestens 25% der Körperoberfläche Verbrennungen 2. Grades aufwiesen. Im Plasma von Patienten, die innerhalb eines Monats an den Folgen ihrer Verletzungen verstarben, wurden an den Tagen 1 und 3 nach stationärer Aufnahme signifikant höhere cf-DNA/NETs-Konzentrationen gemessen, als im Plasma von Patienten, die den ersten Monat überlebten [133].

Im Rahmen eines akuten Lungenversagens stellt sich ebenfalls ein Anstieg der cf-DNA/NETs-Konzentration im Plasma dar [96]. Erhöhte Plasmakonzentrationen von NET-Bestandteilen konnten auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen u.a. dem SLE [126, 127] und der rheumatoiden Arthritis [134] gesehen werden. Die Plasmakonzentration an cf-DNA/NETs bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis ist im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höher. Insbesondere zur Abgrenzung von ACPA-negativen Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis und Patienten, deren Beschwerden nicht durch einen inflammatorischen Prozeß bedingt sind, könnte die Höhe der Plasmakonzentration an cf-DNA/NETs eine tragende Rolle spielen. Sowohl ACPA-negative als auch Rheumafaktor negative Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis hatten höhere cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen als die entsprechenden positiven Pendanten. Andererseits konnten bei Probanden mit deutlich erhöhten ACPA-Titern, im Vergleich zu Probanden mit einer nur moderaten Titererhöhung, auch signifikant höhere Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs gemessen werden [134].

1.3 Soluble (löslicher) CD163

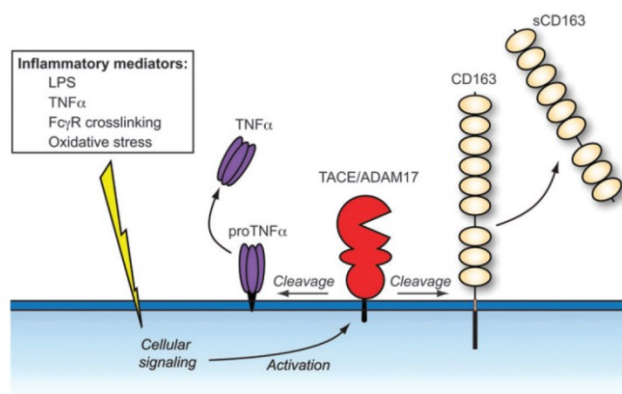
Der Cluster of Differentiation 163 (CD163) ist ein Typ 1 Transmembranprotein (130 kDa) aus der Familie der Scavenger-Rezeptoren, der hauptsächlich auf Makrophagen und in moderatem Umfang auch auf Monozyten exprimiert wird [135, 136]. Erstmals wurde er 1987 beschrieben [136]. Der extrazelluläre Anteil des CD163, der aus neun sich wiederholenden cystein-reichen Domänen der Klasse B Scavenger-Rezeptoren besteht, ist über eine Transmembrandomäne mit einem vergleichsweise kurzen zytoplasmatischen Rest verbunden [135]. Verschiedene Isoformen des Transmembranproteins unterscheiden sich in der Länge des zytoplasmatischen Anteils [136]. CD163 spielt eine wichtige Rolle im Hämoglobin/Eisen-Stoffwechsel. Im Rahmen einer Hämolyse wird freies Hämoglobin durch Haptoglobin gebunden. Der Haptoglobin-Hämoglobin-Komplex bindet mit hoher Affinität an CD163. Nach der endozytotischen Internalisierung des Komplexes erfolgt die lysosomale Degradation des Haptoglobins und des Proteinanteils des Hämoglobins. Der Häm-Anteil wird durch die Hämoxygenase-1 unter Gewinnung von Fe^{2+} und Freisetzung von Kohlenmonoxid in Billiverdin überführt und anschließend durch die Billiverdin-Reduktase in Billirubin umgewandelt [135]. Insbesondere phagozytierende Makrophagen der roten Milzpulpa, des Knochenmarks, der Lunge und der Leber (Kupffer-Stern-Zellen) besitzen eine hohe CD163-Ausstattung [135, 137]. CD163 spielt auch bei der terminalen Entwicklung von Erythroblasten im Rahmen der Erythropoese eine Rolle. Die Interaktion mit CD163 fördert das Wachstum und Überleben der Erythroblasten. Des Weiteren fungiert er als Sensor bakterieller Infektionen, bindet sowohl gram-positive als auch gram-negative Bakterien und fördert die lokale Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Monozyten (u.a. $\text{TNF-}\alpha$) [136]. Eine antiinflammatorische Wirkung wird v.a. auch durch die Metabolite des Hämoglobin-Recyclings vermittelt. Kohlenmonoxid (CO) inhibiert proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und $\text{TNF-}\alpha$. Billirubin, Billiverdin und Fe^{2+} (durch Stimulierung von Ferritin) wirken antioxidativ. Durch Bindung von TWEAK (Tumor necrosis factor- α like weak inducer of the apoptosis), einem Zytokin der $\text{TNF-}\alpha$ -Familie, unterbindet CD163 dessen biologische Funktion [135]. Die Expressierung von CD163 ist dynamisch. IL-6, IL-10, IL-12, CXCL10, Hämoglobin, Glucocorticoide und oxidativer Stress fördern die CD163-Expression. Demgegenüber führen $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$, CXCL4, IL-4 und GM-CSF zu einer Downregulation [135, 137]. LPS bewirken kurzfristig eine Downregulation des Rezeptors. Sie erhöhen jedoch im Intervall durch eine vermehrte Produktion von IL-6 und IL-10 via TLR4 die CD163-Expression [136].

Makrophagen mit einer erhöhten CD163-Ausstattung werden auch als „alternativ aktivierte Makrophagen“, sog. M2-Makrophagen, bezeichnet. Im Gegensatz zu den M1-Makrophagen, die klassischerweise durch $\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ oder LPS (führen zu einer CD163-Downregulation) aktiviert werden, proinflammatorische Zytokine (IL-12, $\text{TNF-}\alpha$) ausschütten, Antigene präsentieren und Pathogene phagozytieren, liegt der immunologische Schwerpunkt der M2-Makrophagen mehr im regulatorischen Bereich und der Begrenzung einer überschießenden Entzündungsreaktion zur Wiederherstellung der Homöostase [136–138]. Sie treten vermehrt u.a. bei chronischen Entzündungsprozessen sowie der abschwelenden Phase der akuten Inflammation auf [136, 139] und stimulieren regulatorische T-Zellen. Ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation ist gering [137]. Durch die Freisetzung des antiinflammatorisch-wirkenden IL-10 reduzieren sie den Anteil an M1-Makrophagen [137]. M2-Makrophagen sind an der Wundheilung und dem Remodelling beteiligt [139, 140]. Durch eine überschießende Aktivität spielen sie aber auch bei den pathogenetischen Vorgängen fibrotischer Umbauprozesse eine Rolle [138], u.a. durch die Sekretion von $\text{TGF-}\beta$ [140].

Tabelle 1.3 – Phänotypisierung der Makrophagen [137, 138, 141]

Makrophagenphänotyp	Stimuli	Funktion
M0-Makrophagen	-	nicht aktivierte Makrophagen
M1-Makrophagen	TNF- α , INF- γ , LPS	TH1-Immunantwort proinflammatorisch (IL-12, TNF- α), Antigenpräsentation, Phagozytose
M2-Makrophagen		v.a. TH2-Immunantwort
➤ M2a - Subtyp	IL-4, IL-13	Allergie, Fibrose, Parasitenabwehr
➤ M2b - Subtyp	Immunkomplexe, TLR/IL-1-Rezeptor-Aktivierung	Immunregulation
➤ M2c - Subtyp	IL-10	Phagozytose u.a. apoptotischer Zellen, Wundheilung, Matrix-Remodelling, antiinflammatorisch (IL-10, α 1-Antitrypsin, TGF- β)

Verhältnismäßig ist der überwiegende Teil an CD163 zellgebunden an der Membranoberfläche oder in Vesikeln im Rahmen des Rezeptor-Recyclings intrazellulär gespeichert. Als Reaktion auf oxidativen Stress, einer Vernetzung von Fc γ -Rezeptoren oder nach Stimulierung mit LPS bzw. TNF- α kommt es durch Aktivierung der ADAM17-Metalloproteinase (ADAM – „a disintegrin and metalloproteinase“) zu einer Abtrennung des extrazellulären Anteils des CD163-Transmembranrezeptors, so dass ein Teil des CD163 extrazellulär gelöst vorkommt [135]. Das lösliche (soluble) CD163-Molekül (kurz sCD163), das 94% der Sequenzen des CD163 enthält, ist ein Marker der M2-Makrophagen [135, 137]. Die physiologische Bedeutung des sCD163 ist letztlich nicht vollends geklärt. Durch die Haptoglobin-unabhängige Bindung von freiem Hämoglobin schützt es den Organismus vor dessen toxischer Wirkung. Im Komplex mit Immunglobulin-G kommt es Fc γ -Rezeptor-abhängig zunächst zur Internalisierung. Anschließend erfolgt die Metabolisierung des Hämoglobins u.a. mit der Bildung von Billiverdin und die Wiederverwertung des CD163-Rezeptors auf der Membranoberfläche [142]. sCD163 verhindert eine überschießende Immunantwort der Monozyten im Rahmen bakterieller Infektionen durch eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 [137]. Durch Anheftung an Bakterien wie Staph. aureus kann es deren Eliminierung fördern [135]. Neben sCD163 kommt es durch Sequenzanalogien im juxtamembranären Bereich auch zur Abspaltung von biologisch aktivem TNF- α durch die ADAM17-Metalloproteinase (früher TACE: TNF- α -cleaving enzyme) von der Oberfläche aktivierter Makrophagen. Im Rahmen von experimentellen Endotoxämien war sCD163 ein Surrogat-Parameter der plasmatischen TNF- α -Kinetik, mit dem Unterschied einer längeren Nachweisbarkeit aufgrund einer längeren Halbwertszeit von sCD163 [135, 137].



Im Rahmen inflammatorischer Prozesse kommt es durch die ADAM17-Metalloproteinase zur Abspaltung des extrazellulären Anteils des CD163 (sCD163) von der Monozyten- bzw. Makrophagenoberfläche. Durch dasselbe Enzym (früher auch als TACE (TNF- α -cleaving enzyme) bezeichnet) erfolgt aufgrund von Sequenzanalogien im juxtamembranären Bereich auch die Freisetzung von TNF- α .

Abbildung 1.6 – Freisetzung von sCD163 [135]

Erhöhte sCD163 Plasmakonzentrationen als Marker einer vermehrten Aktivierung der Makrophagen treten sowohl bei akuter als auch chronischer Inflammation auf. Die höchsten Konzentrationen wurden beim Makrophagenaktivierungssyndrom/Hämophagozytische Lymphohistiozytose gemessen [135]. Eine vermehrte Aktivierung des Monozyten/Makrophagensystems bei HIV-1 positiven Menschen ist trotz effizienter antiviraler Therapie mit Senkung der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze an weiterhin erhöhten systemischen sCD163-Konzentrationen ablesbar [143].

Im Rahmen eines fulminanten Leberversagens konnten deutlich erhöhte sCD163-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu einer akuten oder chronischen Hepatitis gemessen werden. Ein Abfall der sCD163-Plasmakonzentration war mit einer höheren Überlebensrate vergesellschaftet. Hohe sCD163-Konzentrationen korrelierten mit einer desolateren Gerinnungssituation [144]. Eine histologisch vermehrte Aktivität einer chronischen Hepatitis B spiegelt sich in erhöhten sCD163-Plasmakonzentrationen wieder, die mit dem Fibrosegrad korreliert. Unter einer antiviralen Therapie kommt es neben einer Abnahme der histologisch nachweisbaren Inflammation zu einer signifikanten Reduktion, sowohl des freien sCD163 als auch der hepatischen CD163-Expression [145]. Eine vermehrte Aktivität von Kupffer-Stern-Zellen bei Leberzirrhotikern lässt sich auch an deren im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöhten sCD163-Konzentrationen ablesen. Das Ausmaß des sCD163-Konzentrationsanstiegs spiegelte die Schwere der Zirrhose entsprechend dem Child-Pugh-Score wieder und korrelierte mit dem MELD-Scoring [146, 147]. Für die Stadien A und B der Child-Pugh-Klassifikation bestand ein Zusammenhang zwischen der Höhe des sCD163 und dem hepatovenösen Druckgradienten. Der sCD163 stellte einen positiven Prädiktor für eine klinisch relevante portale Hypertonie dar [146]. Der Durchmesser der V. portae und die Milzgröße von Zirrhosepatienten korrelierten mit der Höhe des sCD163. Patienten mit ausgeprägten Varizen bzw. der Notwendigkeit einer prophylaktischen Ligaturbehandlung und Zirrhotikern mit manifester oberer gastrointestinärer Blutung konnten gegenüber Zirrhosepatienten mit einem geringem Risikoprofil der portalen Hypertonie signifikant höhere plasmatische sCD163-Konzentrationen zugeordnet werden [148].

Eine vermehrte Aktivität der Makrophagen wurde auch im Rahmen von diversen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises beschrieben. Im komplexen Geschehen der rheumatoiden Arthritis sind Makrophagen einer der Hauptproduzenten intraartikulär freigesetzter proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von TNF- α . TNF- α ist entscheidend an der Entstehung der Synovialitis beteiligt. Es stimuliert u.a. die Rekrutierung von Leukozyten in die Synovialis, aktiviert synoviale Fibroblasten sowie Osteoklasten und fördert die Angiogenese. Der Einsatz von Biologika gegen TNF- α erwies sich als effektiv in der Therapie der rheumatoiden Arthritis [3]. Die parallele Freisetzung von TNF- α und sCD163 von der Makrophagenoberfläche durch die ADAM17-Metalloproteinase und deren unterschiedliche Kinetik sind bereits beschrieben worden. Die plasmatischen Konzentrationen an sCD163 waren bei Patienten mit einer Erstdiagnose der rheumatoiden Arthritis signifikant erhöht und korrelierten mit etablierten Krankheitsaktivitätsparametern. Unter Therapie kam es zu einem Abfall des sCD163 [149]. Das adulte Still-Syndrom ist eine Sonderform der rheumatoiden Arthritis, die durch ein hohes Serumferritin und negativen Befunden der üblichen Autoantikörper (Rheumafaktoren, Anti-CCP-Antikörper und ANA) charakterisiert ist [150]. Umso wichtiger sind weitere Biomarker, die die Krankheitsaktivität abbilden. Zum einen konnten signifikant erhöhte sCD163-Plasmakonzentrationen bei Patienten mit einem adulten Morbus Still gegenüber Gesunden bestimmt werden, die mit der Höhe des Serumferritins positiv korrelierten. Zum anderen ließen sich durch die Höhe des sCD163 auch Patienten mit einem aktiven adulten Still-Syndrom von Patienten mit einer erloschenen Aktivität differenzieren [151]. Auch bei der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis (M. Still im Kindesalter) korrelierten die sCD163-Plasmakonzentrationen mit der Krankheitsaktivität. Anhand

der Höhe des sCD163 ist eine Unterscheidung zwischen den Krankheitsstadien aktiv, abnehmende Aktivität und Remission (Normalisierung der sCD163-Plasmakonzentration) möglich [152].

Die systemische Sklerose, bei der ein fibrotischer Umbau des Gewebes von Haut und innerer Organe (z.B. Lungenfibrose) auftritt, ist histologisch neben der pathologisch vermehrten Ablagerung extrazellulärer Matrix (u.a. Kollagen) auch durch Gefäßveränderungen und eine Infiltration des betroffenen Gewebes durch aktivierte T-Lymphozyten und M2-Makrophagen gekennzeichnet [138, 153]. Sowohl bei Patienten mit einer limitierten als auch diffusen Manifestation der systemischen Fibrose wurden signifikant erhöhte sCD163-Plasmakonzentrationen bestimmt. Eine Differenzierung der beiden Manifestationsformen anhand der sCD163-Konzentrationen ist nicht möglich [140, 153, 154]. Patienten mit einer Lungenfibrose hatten in einer Arbeit signifikant höhere sCD163-Plasmakonzentrationen als deren Pendanten ohne eine pulmonale Manifestation [154]. Andere Arbeitsgruppen fanden zwischen den beiden Untergruppen keinen signifikanten Unterschied [140, 153]. Erhöhte sCD163-Konzentrationen waren jedoch mit erhöhten pulmonalarteriellen systolischen Drücken assoziiert [140].

Wie die systemische Sklerose wird auch der SLE den Kollagenosen zugeordnet [150]. Kutane Manifestationen des SLE sind durch ein signifikant erhöhtes Auftreten von M2-Makrophagen gekennzeichnet [155]. In betroffenen Hautarealen der palisadenförmigen neutrophilen und granulomatösen Dermatitis, die mit einem SLE assoziiert sein kann, treten ebenfalls hauptsächlich CD163-exprimierende M2-Makrophagen auf [156]. Zwischen dem Ausmaß der Infiltration durch Makrophagen und der pathologischen Klassifizierung der Lupusnephritis nach ISN/RPS (International Society of Nephrology/Renal Pathology Society) konnte ein Zusammenhang gesehen werden. Die Klasse IV der Lupusnephritis weist die höchste Infiltrationsdichte auf. Bei der Lupusnephritis Klasse V ist die Infiltration durch Makrophagen am geringsten ausgeprägt. CD163-exprimierende M2c-Makrophagen sind der vorherrschende Makrophagentyp. Die Anzahl der glomerulären und tubulointerstitiellen M2c-Makrophagen korrelieren mit der Aktivität der Lupusnephritis. Für die Anzahl der glomerulären M2c-Makrophagen besteht darüber hinaus auch ein schwacher Zusammenhang mit dem Ausmaß an glomerulären Proliferationen (Crescents) [157]. Zum einen enthalten Seren von SLE-Patienten höhere Zytokinkonzentrationen an IL-4, IL-10 und IL-13, die zu einer alternativen Aktivierung der Makrophagen führen [155]. Zum anderen sind deren sCD163-Serumkonzentrationen erhöht [155, 158]. SLE-Patienten mit einer höheren Krankheitsaktivität haben tendenziell höhere sCD163-Serumkonzentrationen [155].

Neutrophile Granulozyten sind die Hauptakteure und essentiell für die Auslösung der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis [159]. Allerdings sind neutrophile Granulozyten allein nicht ausreichend für eine schwere glomeruläre Schädigung. Im Mausmodell von AAV trat auch nach Depletion der Monozyten/Makrophagen-Zellreihe ein nephritisches Urinsediment auf. Histologisch konnte aber eine deutliche Reduktion an glomerulären Nekrosen und halbmondförmiger Kapselproliferate gesehen werden [160]. Insbesondere CD163-exprimierende Makrophagen sind an proliferativen Formen ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden und der Lupusnephritiden beteiligt. Die Anzahl von M2-Makrophagen in akuten tubulointerstitiellen Läsionen korreliert negativ mit der eGFR [161]. Monozyten und Makrophagen setzen Calprotectin frei (ein Marker akuter glomerulärer Läsionen), das durch eine protahierte Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen die Inflammation weiter befeuert. Es ist insbesondere auch in proliferativen Veränderungen nachweisbar [162]. In entzündlichen Veränderungen der Atemwege von GPA-Patienten ist der Anteil an M2-Makrophagen gegenüber den M1-Makrophagen signifikant erhöht. Im Einklang mit diesen Befunden konnte eine vermehrte TH2-Zellantwort, die mit M2-Makrophagen assoziiert ist, nachgewiesen werden. Eine TH1-vermittelte Immunantwort trat signifikant seltener auf und

steht mit M1-Makrophagen in Zusammenhang [139]. Makrophagen sind in die granulomatöse Entzündungsreaktion involviert und können u.a. in Form von Epitheloidzellen, mehrkernigen Riesenzellen und Schaumzellen in Erscheinung treten [139]. Dabei konnte ein vermehrtes Vorkommen von CD163-exprimierenden M2-Makrophagen in pulmonalen granulomatösen Läsionen von Patienten mit einer GPA nachgewiesen werden [163].

2 Zielstellung

Die Mortalität von Patienten mit ANCA-assoziierten Vaskulitiden ist trotz der Fortschritte der medikamentösen Therapien in den letzten Jahrzehnten gegenüber der Normalbevölkerung weiterhin signifikant erhöht [20, 21]. Neben der Optimierung und Entwicklung neuer, effektiverer und verträglicherer Therapeutika liegt ein Schwerpunkt auf der Erforschung von klinischen und paraklinischen Parametern zur Verbesserung der Verlaufsbeurteilung von Vaskulitispatienten. Aktuell ist zur Einschätzung der Krankheitsaktivität der BVAS in Version 3 ein etabliertes Instrument [164, 165]. Zur Dokumentation von chronischen vaskulitis- sowie therapieassoziierten Schäden wird der VDI empfohlen [6]. Im Rahmen der Verlaufsbeurteilung ANCA-assoziiierter Vaskulitiden kann die Differenzierung zwischen chronischen Schäden, sich aggravierenden bzw. erstmalig manifestierenden Vaskulitissphänomenen oder therapiebedingten Veränderungen schwierig sein, z.B. Polyneuropathie als Vaskulitismanifestation oder Schaden nach einer Cyclophosphamidtherapie. Des Weiteren ist die Unterscheidung eines möglichen Rezidivs der Grunderkrankung und eines bspw. infektiös-septischen Krankheitsbildes mit u.a. einer Verschlechterung der pulmonalen oder renalen Funktion klinisch nicht immer einfach zu treffen. So können radiologische Veränderungen wie pulmonale Infiltrate, Hämoptysen bzw. Hämorrhagien oder auch eine Protein- bzw. Hämaturie infektassoziiert sein. In der Gesamteinschätzung werden paraklinische Parameter, insbesondere die ANCA, hinzugezogen. Die ANCA-Titer korrelieren jedoch nicht immer zuverlässig mit dem klinischen Aktivitätsniveau der Grunderkrankung [166] und Anstiege der ANCA-Titer sind nur in einem Teil der Fälle – nicht im Allgemeinen – zur Vorhersage eines Rezidivs geeignet [34, 167], so dass eine Intensivierung der medikamentösen Therapie auf Grundlage der Antikörperdynamik teils nur das Risiko unerwünschter Wirkungen erhöht [167]. Andererseits besteht die Intention, einem Aufflammen der Grunderkrankung schon frühzeitig entgegenzusteuern. Welche therapeutischen Konsequenzen (watchful waiting oder Intensivierung der immunsuppressiven Therapie) zieht man aus dem Anstieg der Antikörper ohne bzw. bei ggf. noch nicht deutlich auftretenden klinischen Vaskulitiszeichen? Aufgrund der hohen Rezidivgefahr von ca. 50% von ANCA-assoziierten Vaskulitiden [22] besteht die Notwendigkeit, weitere Biomarker zur Verlaufsbeurteilung zu finden. Andererseits ist die optimale Dauer der Durchführung einer remissionserhaltenden Therapie unklar [22]. Neue Biomarker könnten zur besseren Einschätzung der Krankheitsaktivität beitragen, um Anhaltspunkte für die Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie zu sammeln und Therapie-assoziierte Schäden zu minimieren.

Ziel dieser Promotionsarbeit ist die Evaluation der plasmatischen Konzentrationen an cf-DNA/NETs bzw. des sCD163 als Parameter zur Aktivitäts- und Verlaufsbestimmung von ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Einleitend wurde für beide Parameter bereits dargelegt, dass sie nicht nur bei infektiösen Prozessen, sondern auch im Rahmen nicht-infektiöser inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle spielen. Als autoimmunologische Kontrollgruppe dient der SLE, für den in Abhängigkeit der Krankheitsaktivität unterschiedlich hohe Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs bzw. eine differenzierte Fähigkeit zum NET-Abbau beschrieben wurde [84, 106, 127]. Erhöhte sCD163-Serumkonzentrationen wurden bei Patienten mit einem SLE ebenfalls bestimmt [155, 158, 168]. Neben der Ermittlung der Höhe der Parameter, u.a. im Rahmen der Erstdiagnose bzw. im Falle eines Rezidivs der Grunderkrankung, erfolgt eine vergleichende Betrachtung zwischen einer hohen ($BVAS \geq 6$) bzw. niedrigen ($BVAS \leq 5$) Krankheitsaktivität. Des Weiteren wird der Einfluss einer Nierenfunktionseinschränkung sowie therapeutischer Interventionen (Plasmaaustausch und Remissionsinduktion mit Cyclophosphamid) auf die Höhe bzw. Kinetik der Parameter untersucht.

3 Material und Methoden

Die Studie wurde der Ethikkommission der Universität Rostock angezeigt. Das positive Votum erhielt die Registriernummer A 2009 51 (siehe Anhang 12.1.1). Alle Probanden wurden umfassend aufgeklärt und willigten schriftlich entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission der Universität Rostock zur Teilnahme an der Studie ein. Nichtvolljährige Patienten wurden aus Altersgründen bzw. Patienten mit einer HBV-, HCV- oder HIV-Infektion aus Sicherheitsgründen von der Studie ausgeschlossen. Alle Probanden mit einer GPA erfüllten mindestens 2 Kriterien der ACR-Kriterien der GPA [169] (siehe Tabelle 12.1 im Anhang). Bei allen SLE - Probanden traten anamnestisch mindestens vier ACR-Kriterien des SLE auf [122, 123] (siehe Tabelle 12.2 im Anhang).

Die Rekrutierung der Probanden und die Probensammlung erfolgten im Zeitraum vom 16.11.2009 bis zum 28.11.2011 in den Fachambulanzen und Stationen der Sektion Nephrologie der Universitätsmedizin Rostock bzw. der Abteilung Rheumatologie des Klinikum Südstadt Rostock. Die Probanden der gesunden Kontrollgruppe wurden aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum Rostock und der Verwaltung der Universitätsmedizin Rostock rekrutiert.

Die Bestimmung der Studienparameter, weiterer Routinelaborparameter und der Krankheitsaktivitätsindices (siehe Abschnitt 3.3) erfolgten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses und im Verlauf, für den Fall des Auftretens eines Rezidivs der Grunderkrankung, im Rahmen einer stationären Behandlung sowie therapeutischer Interventionen (Cyclophosphamid-Pulstherapie, Plasmaaustausch).

Als Studienproben wurde EDTA-Blut (S-Monovetten[®] EDTA-K, 2,6 ml) innerhalb von zwei Stunden nach Entnahme bei 1500 U/min. für 15 Minuten zentrifugiert (Eppendorf[®] Centrifuge 5810 R), das Plasma in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert (Pipette Eppendorf Reference[®] 100 - 1000 µl, Pipettenspitzen Eppendorf Biopur[®] 1000 µl) und tiefgefroren bei -80°C gelagert (Kryo Aufbewahrungsboxen mit Deckel von neoLab[®]). EDTA komplexiert Ca²⁺ sowie Mg²⁺, inhibiert so indirekt die humane DNase I [170] und verhindert den Abbau von zellfreier DNA nach Probeentnahme [171, 172]. Der Vorgang der Zentrifugation hat keinen substantiellen Einfluss auf die cf-DNA-Werte im Plasma [127]. Serum-Röhrchen waren zur Probengewinnung nicht empfohlen, da im Rahmen des clotting Prozesses DNA aus den Leukozyten freigesetzt werden könnte und so fälschlicherweise höhere cf-DNA-Werte bestimmt werden [172, 173]. sCD163 ist sehr beständig. Im Vollblut unter Raumtemperatur ist es für 24 h und im abzentrifugierten Plasma bei Temperaturen unter -20°C für Jahre stabil [174].

3.1 Methode zur Bestimmung der cf-DNA/NETs

Zur quantitativen Messung der cf-DNA/NETs wurde das von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC (Brewer, Maine USA) in Zusammenarbeit mit LEUKOCARE BIOTECHNOLOGY AG (München, Deutschland) entwickelte cfDNA-Quant KIT verwendet. Die Intensität des im Assay verwendeten fluoreszierenden Farbstoffs Picogreen, der spezifisch an ds-DNA (Doppelstrang-DNA) bindet, ist ein Maß für die im Plasma enthaltene frei zirkulierende DNA [172]. Zur Kalibrierung wurden Standard-DNA Verdünnungsreihen humaner Plazenta (hPl) bzw. boviner Thymus (bTh) hergestellt. Die quantitative Bestimmung der cf-DNA/NETs der Proben erfolgt durch Vergleich der Fluoreszenzwerte (Emission) der Probenverdünnung mit den Fluoreszenzwerten (Emission) der Standard-DNA Verdünnungsreihe. Das verwendete Assay hat eine lineare Sensitivität im Bereich von 190 bis 9000 ng/ml cf-DNA im Plasma [172].

Verfahrensweisung zur Quantifizierung der cf-DNA (cfDNA-Quant KIT von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC (Brewer, Maine USA) [172, 175])

Vor Durchführung der Messungen mussten alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Die bei -80°C gelagerten Plasmaproben wurden mit Hilfe des Thermomixers (Eppendorf Thermomixer[®] 5436) unter leichtem Schütteln bei 28°C zügig aufgetaut. Zur quantitativen Bestimmung der cf-DNA/NETs im Probandenplasma erfolgte die Ansetzung zweier Standardkurven auf Basis humaner Plazenta-DNA ($50\ \mu\text{g}/\text{ml} = 50000\ \text{ng}/\text{ml}$, lyophilisiert mit EDTA & Tris buffer, pH 8,0) bzw. boviner Thymus-DNA ($50\ \mu\text{g}/\text{ml} = 50000\ \text{ng}/\text{ml}$, lyophilisiert mit EDTA & Tris buffer, pH 8,0). Für die Herstellung der Verdünnungsreihen wurde der 10x konzentrierte Standardverdünnungspuffer (5% BSA (bovine serum albumin) in 10x PBS (phosphate-buffered saline), pH 7,4) 1:10 mit Aqua bidest verdünnt.

$250\ \mu\text{l Standardpuffer (10x)} + 2,25\ \text{ml Aqua bidest} \rightarrow 2,5\ \text{ml Standardpuffer (1x)}$

Die jeweils schon im KIT in der Konzentration von $50000\ \text{ng}/\text{ml}$ enthaltenen DNA-Lösungen (humane Plazenta bzw. boviner Thymus) wurden nun mit dem 1-fach konzentrierten Standardverdünnungspuffer, der annähernd dem Proteingehalt des Plasmas entspricht, nach dem folgenden Schema in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen weiter verdünnt:

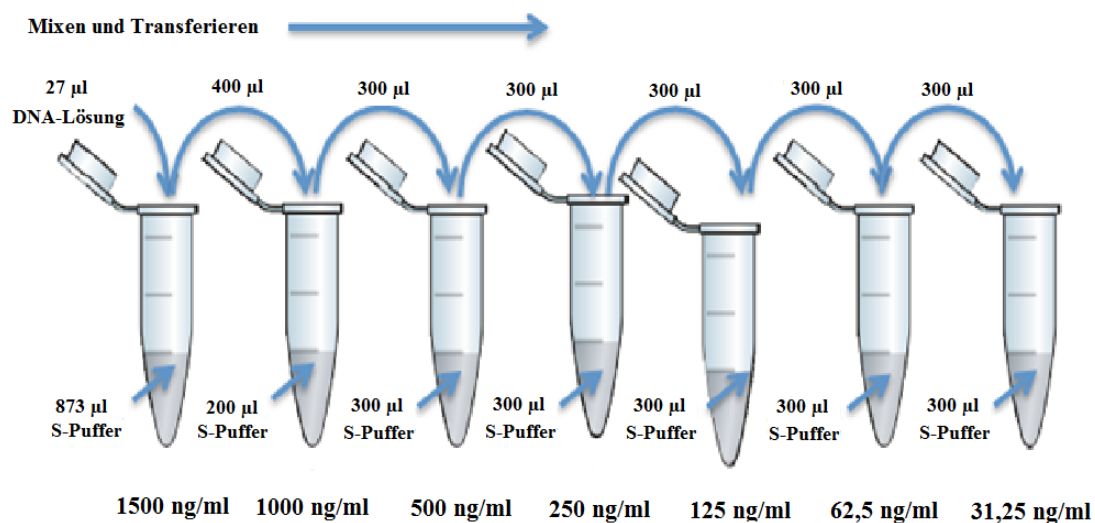


Abbildung 3.1 – Herstellung einer Standard-DNA-Verdünnungsreihe zur Bestimmung der cf-DNA/NETs
 Modifiziert nach TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC [172], DNA-Lösung (humane Plazenta bzw. boviner Thymus, $C = 50000\ \text{ng}/\text{ml}$), S-Puffer: Standardverdünnungspuffer 1-fach konzentriert.

Das Probandenplasma wurde nach dem Auftauen für 5 Minuten bei $5000\ \text{U}/\text{min}$. zentrifugiert (Eppendorf[®] Centrifuge 5417C) und danach 1:5 mit dem Probenverdünnungspuffer (1x, PBS) in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verdünnt:

$50\ \mu\text{l Plasma} + 200\ \mu\text{l Probenverdünnungspuffer (PBS)} \rightarrow 250\ \mu\text{l Probenverdünnung}$

Um die Validität des Tests bewerten zu können, wurde für jede Standard-DNA-Reihe eine „gespickte“ und eine „ungespickte“ Kontrolle mit Plasma eines Gesunden (Gewinnung durch Zentrifugation von EDTA-Blut) angesetzt. Für die „ungespickte“-Kontrolle erfolgte die 1:5 Verdünnung des gesunden Plasmas entsprechend der Vorbereitung der Probandenproben:

50 µl Plasma (Gesunder) + 200 µl Probenverdünnungspuffer (PBS) → 250 µl „ungespickte“ Kontrolle

Zur Herstellung der „gespickten“ Kontrolle wurden 6 µl mit der Konzentration von 50000 ng/ml des jeweiligen DNA-Standards (humane Plazenta bzw. boviner Thymus) in das gesunde Plasma pipettiert und anschließend 1:5 verdünnt:

6 µl DNA-Standard 50.000 ng/ml + 194 µl Plasma → 200 µl Lösung mit 1.500 ng DNA/ml

50 µl der Lösung + 200 µl Probenverdünnungspuffer (PBS) → 250 µl „gespickte“ Kontrolle

Nach Vorbereitung der Standard-DNA-Verdünnungsreihen, Studienprobenverdünnungen und „gespickten“ bzw. „ungespickten“ Kontrollen wurden jeweils 50 µl der einzelnen Lösungen in die entsprechenden Wells nach dem auf der Abbildung 3.2 dargestellten Schema auf eine 96 well Platte (unbeschichtet, Polystyrene) pipettiert. Jede Probe wurde doppelt bestimmt.

DNA Standard Conc. Ng/mL		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1500	A	Hu Placental Standard A-1500 ng/mL	Hu Placental Standard B-1500 ng/mL	CT-DNA Standard A-1500 ng/mL	CT-DNA Standard B-1500 ng/mL	CTRL CT-DNA Spike -A	1a	5a	9a	13a	17a	21a	25a
1000	B	Hu Placental Standard A-1000 ng/mL	Hu Placental Standard B-1000 ng/mL	CT-DNA Standard A-1000 ng/mL	CT-DNA Standard B-1000 ng/mL	CTRL CT-DNA Spike-B	1b	5b	9b	13b	17b	21b	25b
500	C	Hu Placental Standard A-500 ng/mL	Hu Placental Standard B-500 ng/mL	CT-DNA Standard A-500 ng/mL	CT-DNA Standard B-500 ng/mL	CTRL Unspiked-1a	2a	6a	10a	14a	18a	22a	26a
250	D	Hu Placental Standard A-250 ng/mL	Hu Placental Standard B-250 ng/mL	CT-DNA Standard A-250 ng/mL	CT-DNA Standard B-250 ng/mL	CTRL Unspiked-1b	2b	6b	10b	14b	18b	22b	26b
125	E	Hu Placental Standard A-125 ng/mL	Hu Placental Standard B-125 ng/mL	CT-DNA Standard A-125 ng/mL	CT-DNA Standard B-125 ng/mL	CTRL Hu Placental Spike A	3a	7a	11a	15a	19a	23a	27a
62.5	F	Hu Placental Standard A-62.5 ng/mL	Hu Placental Standard B-62.5 ng/mL	CT-DNA Standard A-62.5 ng/mL	CT-DNA Standard B-62.5 ng/mL	CTRL Hu Placental Spike B	3b	7b	11b	15b	19b	23b	27b
31.25	G	Hu Placental Standard A-31.25 ng/mL	Hu Placental Standard B-31.25 ng/mL	CT-DNA Standard A-31.25 ng/mL	CT-DNA Standard B-31.25 ng/mL	CTRL Unspiked	4a	8a	12a	16a	20a	24a	28a
0	H	Hu Placental Standard A-0.0 ng/mL	Hu Placental Standard B-0.0 ng/mL	CT-DNA Standard A-0.0 ng/mL	CT-DNA Standard B-0.0 ng/mL	CTRL Unspiked	4b	8b	12b	16b	20b	24b	28b

Abbildung 3.2 – Aufteilung der 96-well Platte zur Bestimmung der cf-DNA/NETs [175]

Standard-DNA-Verdünnungsreihen (humane Plazenta und boviner Thymus), Kontrollen und Proben wurden jeweils doppelt gemessen. (Hu Placental Standard = Standardverdünnungsreihe humane Plazenta, CT-DNA Standard = Standardverdünnungsreihe boviner Thymus, CTRL CT-DNA Spike = gespickte Kontrolle boviner Thymus-DNA, CTRL Hu Placental Spike = gespickte Kontrolle humane Plazenta-DNA, CTRL Unspiked = ungespickte Kontrolle)

Als letzter Schritt unmittelbar vor Durchführung des Assays erfolgte die 1:200 Verdünnung des fluoreszierenden Farbstoffs Picogreen™ (200x, lizenziert von Life Technologies, Eugene, Oregon, USA), der lichtempfindlich ist und immer im Dunkeln gelagert werden musste. Für die genaue Berechnung der zu verwendenden Volumina wurde das folgende Verfahren von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC herangezogen.

Kalkulation des benötigten Volumens der Picogreenverdünnung (1:200):

$$x \text{ wells} * 0,150 \text{ ml} * 1,1 = a \text{ ml Picogreen-Lösung 1:200}$$

Berechnung zur Herstellung der 1: 200 Dilution von Picogreen:

$$a \text{ ml} * 0,005 = b \text{ ml von } 200x \text{ Picogreen}$$

$$a \text{ ml (Picogreen 1:200)} - b \text{ ml (Picogreen 200x)} = c \text{ ml von Probenverdünnungspuffer (PBS)}$$

1: 200 Dilution von Picogreen herstellen:

$$b \text{ ml (Picogreen 200x)} + c \text{ ml Probenverdünnungspuffer (PBS)} = a \text{ ml 1:200 Picogreenlösung}$$

Für eine 96 well Platte ergeben sich folgende Volumina zur Herstellung der 1x konzentrierten Picogreen- verdünnung:

$$0,08 \text{ ml Picogreen 200x} + 15,76 \text{ ml Probenverdünnungspuffer (PBS)} \rightarrow 15,84 \text{ ml Picogreenlsg. 1:200}$$

Anschließend erfolgte mit Hilfe einer 8-Kanal-Pipette (Eppendorf Research® plus 30 - 300 µl) die Zugabe von jeweils 150 µl der 1:200 verdünnten Picogreenlösung in jedes Well. Nach 5-minütiger Inkubation im Dunkeln unter Raumtemperatur wurden die Fluoreszenzwerte bei einer Exzitation von 485 nm und einer Emission von 530 nm mit Hilfe des Fluoreszenzplattenreaders infinite M200 von Tecan gemessen und durch das Programm Tecan i-control (Version 1.9.17.0) in einer Microsoft Excel (2010er Version) - Tabelle ausgegeben. Durch Übertragung der Werte in eine von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC entwickelte Microsoft Excel-Applikation (cf-DNA-Quant Analysis Template) erfolgte die Berechnung der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentrationen in ng/ml, jeweils in Bezug auf den verwendeten Standard (humane Plazenta bzw. boviner Thymus).

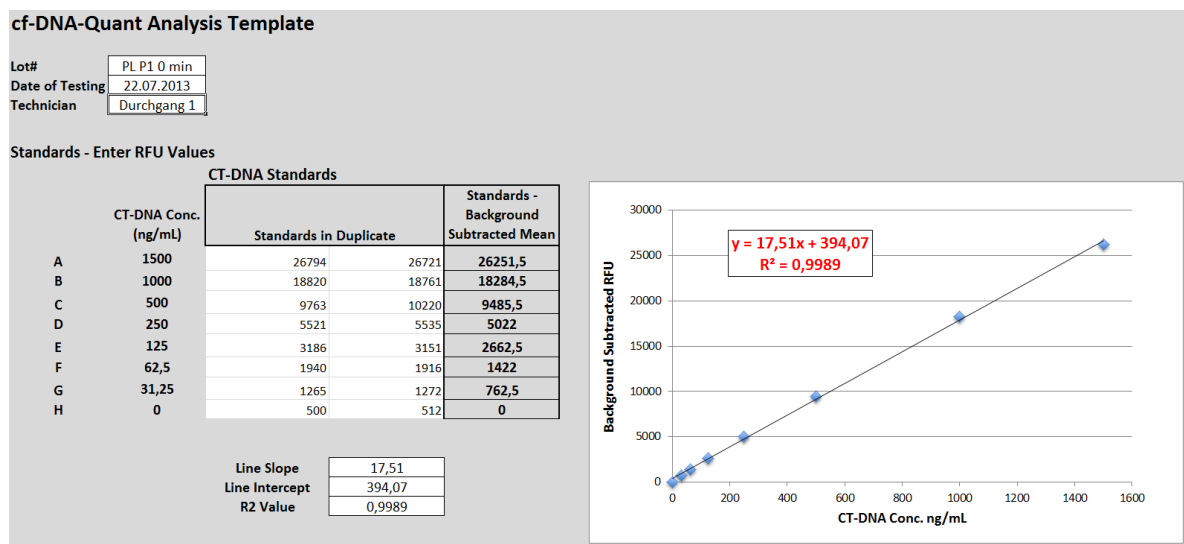


Abbildung 3.3 – Ermittlung der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen

Berechnung einer linearen Funktion aus den arithmetischen Mittelwerten der gemessenen Emissionen (abzüglich der natürlichen Emission, bestimmt bei einer Konzentration von 0 ng/ml DNA-Lösung) entsprechend den jeweiligen bekannten Konzentrationen der Standard-DNA Kurve. Ermittlung der DNA-Konzentrationen der Proben mit Hilfe der gemessenen Fluoreszenzwerte (Emissionen) in den Probenverdünnungen und an Hand der berechneten Funktion.

Begriffsdefinition:

Zur Bestimmung der NETs erfolgte die Messung von frei im Plasma vorkommender DNA, sogenannte cell-free DNA (cf-DNA), mit Hilfe des interkalierenden Farbstoffs Picogreen entsprechend der in Kapitel 3.1 beschriebenen Methodik. Aufgrund der exponierten Stellung der neutrophilen Granulozyten im Rahmen der zellulären Immunantwort, ihres zahlenmäßig größeren Auftretens im Vergleich zu den anderen an der Immunabwehr beteiligten Zellen und der engen pathogenetischen Verbindung der NETs mit der GPA und MPA, auf die u.a. in den Kapiteln 1.1.4 (ANCA-assoziierte Kleingefäßvaskulitiden und NETs) und 5.3 (cf-DNA/NETs - nur Biomarker oder auch therapeutisches Target?) eingegangen wird, wird in dieser Arbeit angenommen bzw. unterstellt, dass der überwiegende Teil der plasmatischen cf-DNA neutrophilen Ursprungs ist und die plasmatische Konzentration der NETs widerspiegelt. Eine ausführliche Diskussion erfolgt im Kapitel 5.5 (Zellfreie plasmatische DNA – neutrophilen Ursprungs?). Im Folgenden wird von den Ergebnissen der cf-DNA-Messungen als cf-DNA/NETs berichtet. Aus Platzgründen, insbesondere in Tabellen, erfolgt zum Teil auch nur die Nennung cf-DNA und der entsprechenden Messreihe (humane Plazenta bzw. boviner Thymus).

3.2 Methode zur Bestimmung des sCD163

Zur quantitativen Bestimmung von sCD163 wurde das von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC (Brewer, Maine USA) in Zusammenarbeit mit IQ Products (Groningen, Niederlande) entwickelte Macro163TM - KIT verwendet, das auf den Prinzipien eines Sandwich-ELISAs basiert. Zur Erstellung einer Standardkurve erfolgte die schrittweise Verdünnung einer bekannten Konzentration von rekombinantem CD163. Probandenplasma und CD163-Verdünnungsreihe wurden auf einer mit einem polyklonalen Antikörper gegen CD163 (1. Antikörper) beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Anschließend wurde ein biotinhaltiger monoklonaler Antikörper gegen CD163 (2. Antikörper) hinzugefügt, der von Streptavidin erkannt wurde, das kovalent mit HRP (Horseradishperoxidase, dt. Meerrettichperoxidase) gekoppelt war. Eine TMB-Lösung (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin, ein Chromogen) wurde als Substrat der Meerrettichperoxidase eingesetzt [176]. Nach Aktivierung durch die Peroxidase kam es zur Blaufärbung (Absorptionsmaximum bei 650 nm) des TMB, das sich nach Zugabe der schwefelhaltigen Stopp-Lösung gelb verfärbte (Absorptionsmaximum bei 450 nm). Nach Bestimmung der Extinktion und Generierung der sCD163-Standardverdünnungskurve erfolgte die Berechnung der sCD163-Konzentrationen im Probandenplasma. Das Detektionslevel des Assays liegt bei weniger als 0,23 ng/ml sCD163. Es zeigt eine lineare Sensitivität im Bereich von 0,9 bis 30 ng/ml [176].

Verfahrensanleitung zur Quantifizierung des sCD163 (Macro163TM - KIT von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC (Brewer, Maine USA) und IQ Products (Groningen, Niederlande) [176])

Vor Durchführung der Messungen wurden alle Reagenzien mit Ausnahme der TMB-Substratlösung (enthält < 0,02% w/w TMB), die bis zum Verbrauch bei 4°C lagerte, auf Raumtemperatur gebracht und der Wasch- (10x, enthält 0,01% Thiomersal (Thimerosal)) bzw. Verdünnungspuffer (10x, enthält 0,01% Thiomersal (Thimerosal)) 1:10 verdünnt.

40 ml Waschpuffer (10x) + 360 ml Aqua bidest → 400 ml Waschpufferlösung (1x)

6 ml Verdünnungspuffer (10x) + 54 ml Aqua bidest → 60 ml Verdünnungspufferlösung (1x)

Zur Herstellung der sCD163-Standard-Lösung in der Konzentration von 21,1 ng/ml erfolgte die Zugabe von 600 µl Verdünnungspuffer (1x) zum rekombinanten sCD163-Standard-Pulver. Nach 15 minütiger Inkubation wurde nach dem in der Abbildung 3.4 dargestellten Schema eine sCD163-Standard-Verdünnungsreihe hergestellt.

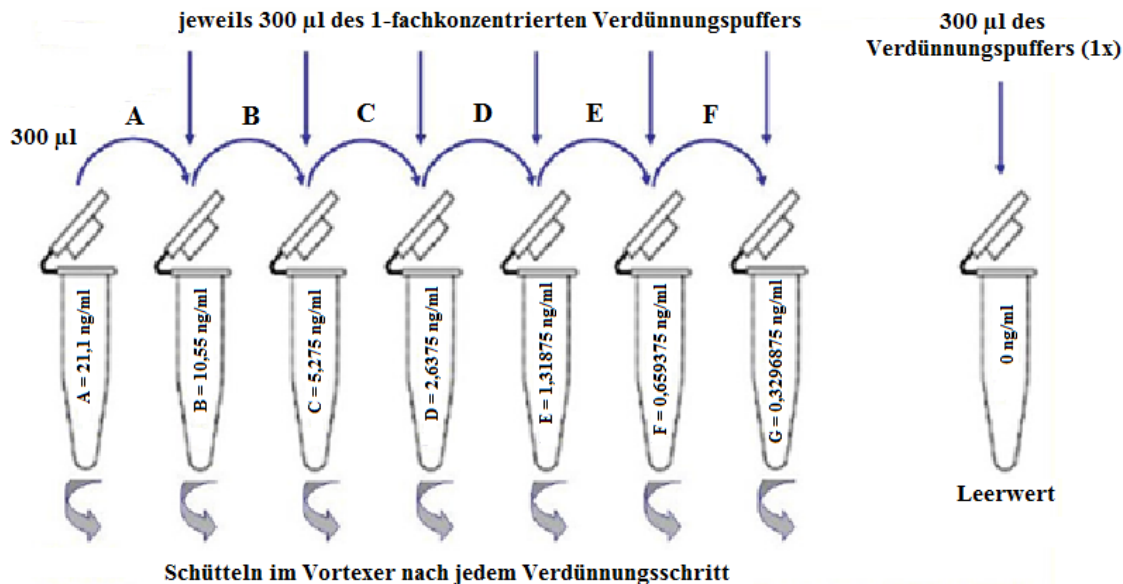


Abbildung 3.4 – Herstellung der sCD163-Standard-Verdünnungsreihe (modifiziert nach [176])

Die bei -80°C gelagerten Plasmaproben wurden mit Hilfe des Thermomixers (Eppendorf Thermomixer® 5436) unter leichtem Schütteln bei 28°C zügig aufgetaut, bei 5000 U/min. zentrifugiert (Eppendorf® Centrifuge 5417C) und anschließend in zwei Schritten 1:500 verdünnt.

10 µl Plasma + 490 µl Verdünnungspuffer (1x) → 500 µl Plasmalösung 1:50

50 µl der Plasmalösung 1:50 + 450 µl Verdünnungspuffer (1x) → 500 µl Plasmalösung 1:500

Jeweils 100 µl pro Well wurden von der sCD163-Standard-Verdünnungsreihe bzw. den Plasmalösungen (1:500) in Doppelbestimmung auf die 96-Well-Platte pipettiert und die bestückte 96-well Platte für 1 Minute auf dem Mikroplatten-Shaker (Heidolph Titramax 101) geschüttelt.

Nach Versiegelung erfolgte während der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur die Verdünnung des biotinhaltenen monoklonalen Antikörpers (mAK) gegen CD163 (200x, enthält 0,02% Natriumazid (NaN₃)).

120 µl mAK gegen CD163 (100x) + 11,88 ml Verdünnungspuffer (1x) → 12 ml mAK gegen CD163-Lsg. (1x)

Nach drei Waschdurchgängen mit jeweils 250 µl Waschpuffer (1x) pro Well wurden jeweils 100 µl der 1-fachkonzentrierten Lösung des biotinhaltenen monoklonalen Antikörpers gegen CD163 in jedes Well pipettiert. Nach Versiegelung erfolgte während der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur die Verdünnung der Streptavidin-HRP (Horseradishperoxidase, dt. Meerrettichperoxidase).

120 µl Streptavidin-HRP (100x) + 11,88 ml Verdünnungspuffer (1x) → 12 ml Streptavidin-HRP-Lsg. (1x)

Nach drei Waschdurchgängen mit jeweils 250 µl Waschpuffer (1x) pro Well wurden jeweils 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung in jedes Well pipettiert, die Platte versiegelt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte nach fünf weiteren Waschdurchgängen mit jeweils 250 µl Waschpuffer (1x) pro Well die Zugabe von jeweils 100 µl des lichtempfindlichen TMB pro Well (das erst kurz vor der Hinzugabe auf Raumtemperatur gebracht wurde) mit nachfolgender Versiegelung und fünfzehnminütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Umsetzung des TMB durch die Meerrettichperoxidase wurde durch die Zugabe von jeweils 100 µl der 0,2 molaren schwefelsäurehaltigen Stopplösung pro Well beendet.

Die Extinktion bei 450 nm wurde innerhalb einer Viertelstunde nach Beendigung der Peroxidase-reaktion mit dem Mikrotiterplattenleser BioTek EL808 gemessen. Mit Hilfe des Programms Gen5 1.11 von BioTek Instruments GmbH erfolgte die Generierung einer sCD163 - Standardverdünnungskurve (siehe Abbildung 3.5), mit deren Hilfe die Konzentration von sCD163 im Probandenplasma entsprechend der jeweils gemessenen Extinktion ermittelt werden konnte.

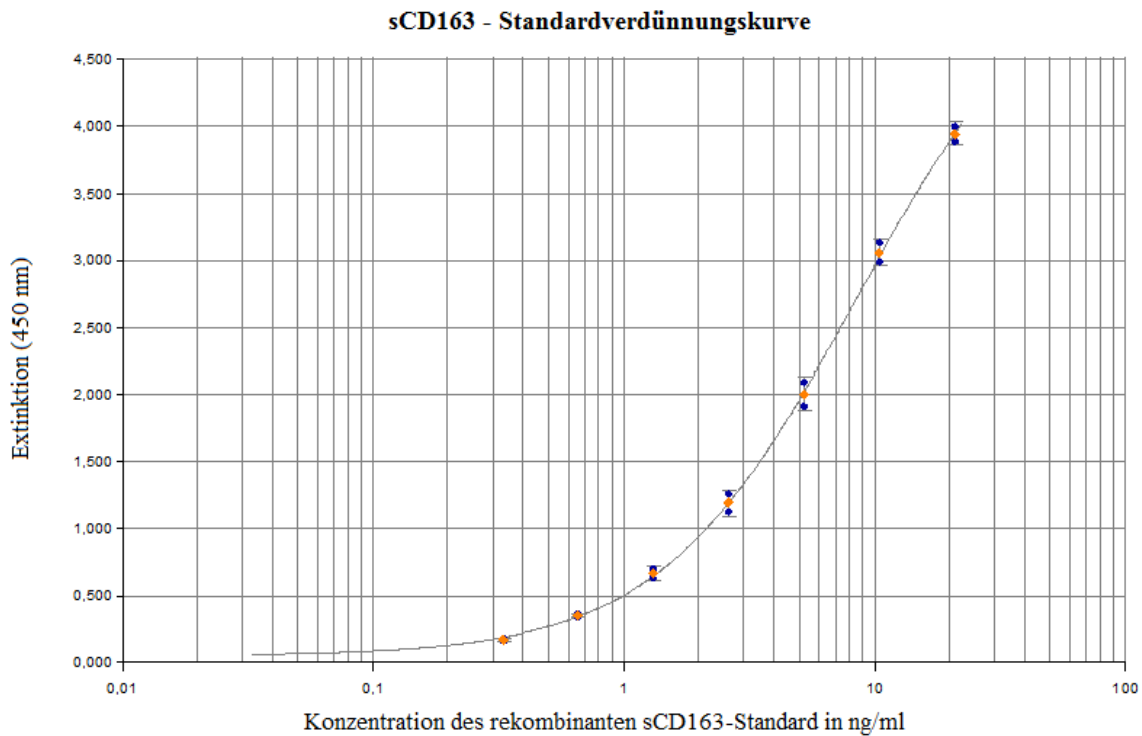


Abbildung 3.5 – Standardverdünnungskurve für den sCD163

3.3 Labordiagnostik und Krankheitsaktivitätsindices

Zusätzlich zu den Studienparametern erfolgte auch die Erfassung von in der klinischen Praxis etablierten Laborparametern. Neben den Parametern des großen Blutbildes, dem CRP, der Nierenfunktionsparameter (Serumcreatinin, -harnstoff, geschätzte (estimated) glomeruläre Filtrationsrate ermittelt mit der MDRD-Formel (eGFR (MDRD), zum Teil auch die endogene Creatinin-Clearance), der Urindiagnostik (Testsreifen und Urinsediment, zum Teil auch die Proteinurie im 24 Stunden-Sammelurin), des Zucker- (HbA1c) und Vitamin D - Haushalts (25-OH-Vitamin D, PTH) wurden im Falle der Autoimmunerkrankungen auch die autoimmunologischen Parameter (GPA: c-ANCA und PR3-Ak; MPA: p-ANCA und MPO-Ak; SLE: ANA, dsDNA-Ak und die Komplementfaktoren C3 sowie C4) bestimmt. Die Messmethodiken dieser routinemäßig bestimmten Laborparameter werden in Tabelle 12.3 des Anhangs zusammengefasst.

Klinische Symptome wurden durch einen eigens entwickelten Studienbogen (siehe Anhang 12.1.5.4) und einer Sichtung der Krankenakten zusammengetragen. Zur Korrelation der cf-DNA/NETs-Werte mit der Krankheitsaktivität erfolgte neben der Auswertung klinischer und paraklinischer Untersuchungsbefunde die Bestimmung etablierter Krankheitsaktivitätsindices.

3.3.1 Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in der Version 3

Ein anerkanntes Instrument zur Einschätzung der Krankheitsaktivität im Rahmen systemischer Vaskulitiden wie der GPA und der MPA ist der Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in der Version 3. In diesem Scoringssystem werden 56 Krankheitsmanifestationen, die im Rahmen einer Vaskulitis auftreten können, in insgesamt 9 Untergruppen entsprechend der jeweiligen Organbeteiligung aufgeführt. Für die einzelnen Krankheitsmanifestationen bzw. Organsysteme erfolgt, bezogen auf ihre klinische Relevanz, eine unterschiedliche Wichtung. Die maximale Punktzahl der Organsysteme ist unterschiedlich hoch begrenzt. Eine weitere Differenzierung in der Berechnung wird durch die Unterscheidung des Vorliegens eines stabilen bzw. progredienten Krankheitsverlaufes vorgenommen. Ist mindestens eine Krankheitsmanifestation neu aufgetreten oder hat sich diese verschlechtert, wird bis auf wenige Ausnahmen jedes einzelne Element bzw. die Untergruppe (Organsystem) mit einer höheren Punktzahl bewertet, so dass sich unterschiedliche Gesamtpunktzahlen für den Score ergeben (stabiler Krankheitsverlauf max. 33 Punkte, progredienter Krankheitsverlauf max. 63 Punkte). Die niedrigste Wertigkeit mit max. 2 bzw. 3 Punkten wird der Allgemeinsymptomatik (u.a. Muskel-/Gelenkschmerzen und Fieber), die höchste Wertigkeit der renalen Manifestation mit max. 6 bzw. 12 Punkten zugeschrieben. Ein Symptom darf nur in die Berechnung mit einbezogen werden, wenn es innerhalb der letzten vier Wochen aufgetreten und als klinische Manifestation einer aktiven Vaskulitis zu werten ist. Bestehen berechnete Annahmen einer anderen Genese (u.a. Medikamenten-induziert bzw. infektiös bedingt), darf keine Berücksichtigung erfolgen [164, 165]. Eine ausführliche Darstellung des BVAS in Version 3 ist dem Anhang zu entnehmen (siehe 12.1.5.1). Wenn in dieser Arbeit vom BVAS die Rede ist, handelt es sich stets um die hier beschriebene Version 3.

3.3.2 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K)

Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität im Rahmen des systemischen Lupus erythematosus wurde der Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K) [177], eine Modifizierung des Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), verwendet. Der originale SLEDAI wurde ursprünglich von einer Expertenkommission 1985 erarbeitet [178]. Mit dem SLEDAI ließ sich eine Veränderung der Krankheitsaktivität im Verlauf abbilden [179, 180] und er konnte sowohl von Spezialisten als auch von Ungeübten in der Bestimmung der Krankheitsaktivität zuverlässig eingesetzt werden [177, 181, 182]. In beiden Scores erfolgt

die Einschätzung der Krankheitsaktivität mit Hilfe von 24 Manifestationen, die im Rahmen der Grundkrankheit auftreten können und insgesamt 9 Organsystemen zugeordnet werden. Eine Krankheitsmanifestation wird berücksichtigt, wenn sie zum Zeitpunkt der Vorstellung oder an den vorangegangenen 10 Tagen aufgetreten ist. Entsprechend dem betroffenen Organsystem erfolgt eine unterschiedliche Wichtung der einzelnen Manifestationen. Beteiligungen des zentralen Nervensystems und Gefäßveränderungen werden mit jeweils 8 Punkten am höchsten, hämatologische Veränderungen und Allgemeinsymptome mit jeweils nur 1 Punkt am niedrigsten bewertet. Der Maximal-Score beträgt 105 Punkte [177, 178]. Eine ausführliche Auflistung des SLEDAI-2K ist dem Anhang zu entnehmen (siehe 12.1.5.2).

Im Gegensatz zum SLEDAI werden im SLEDAI-2K die Krankheitsmanifestationen Proteinurie, Erythrem, Alopezie und Schleimhautulzera nicht nur berücksichtigt, wenn sie erstmalig oder erneut aufgetreten sind bzw. im Rahmen der Proteinurie bei einer Verschlechterung um mindestens 500 mg/d, sondern als Ausdruck einer persistierenden aktiven Krankheitsaktivität auch dann gewertet, wenn die jeweilige Manifestation unverändert fortbesteht. Der SLEDAI-2K erzielte vergleichbare Werte hinsichtlich der Einschätzung der Krankheitsaktivität und deren Veränderung im Verlauf im Vergleich zum SLEDAI [177]. Dies konnte durch Auswertung von Daten von zwei größeren multizentrischen Studien bestätigt werden [183].

3.3.3 European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM)

Im Rahmen einer multizentrischen Studie, die die Daten von 704 SLE Patienten von 29 Zentren aus 14 europäischen Ländern ausgewertet hat, erfolgte die Entwicklung des European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM) [184]. Dieser Index zur Messung der Krankheitsaktivität beinhaltet 32 Manifestationskriterien (22 klinische und 10 paraklinische) des SLE, die insgesamt 10 Organsystemen und 2 paraklinischen Untergruppen (Blutsenkungsgeschwindigkeit, Komplementsystem) zugeordnet werden können. Die einzelnen Parameter werden unterschiedlich gewichtet. Allgemeinsymptome wie Fieber und Müdigkeit werden mit 0,5 Punkten, Myositis, intestinale und neuropsychiatrische Manifestationen mit jeweils 2 Punkten berücksichtigt. Der maximale Score wird auf 10 Punkte begrenzt [184–186]. Eine ausführliche Beschreibung des ECLAM ist dem Anhang zu entnehmen (siehe 12.1.5.3). Der ECLAM erwies sich auch in der retrospektiven Einschätzung der Krankheitsaktivität von Patienten mit einem SLE als zuverlässig und valide einsetzbarer Score [187].

3.4 Datenbank und statistische Auswertung

Die erhobenen Laborparameter und klinischen Parameter wurden ebenso wie die Begleit- und Vorerkrankungen zur weiteren Verarbeitung in eine eigens für die Studie entworfene Datenbank, die mit Microsoft[®] Access[®] 2010 entwickelt wurde, eingepflegt. Die für die statistische Auswertung relevanten Daten wurden herausgefiltert und in Tabellen des Formats von Microsoft[®] Excel[®] 2010 überführt.

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm IBM[®] SPSS[®] Statistics in der Version 22 durchgeführt. Da neben qualitativen Merkmalen eine Vielzahl von quantitativen Merkmalen ausgewertet wurden und diese in der Mehrzahl der Fälle nicht normalverteilt waren, erfolgte die Angabe der statistischen Kennzahlen Median, 1. Quartil (25. Quartil) und 3. Quartil (75. Quartil). Bei normalverteilten Werten sollte der Median sich nicht signifikant vom Mittelwert unterscheiden. Zur Differenzierung signifikanter Gruppenunterschiede kamen aufgrund der überwiegenden nicht normalverteilten Werte und der kleinen Stichprobenumfänge parameterfreie (nichtparametrische) Tests zur Anwendung [188]. Vorteile dieser Tests sind zum einen die Anwendbarkeit bei ordinalskaliertem Messniveau und zum anderen sind sie unempfindlicher gegenüber Ausreißern [188]. Zur Evaluation

eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Medianen unabhängiger Stichproben, den fünf Studiengruppen, wurde der Kruskal-Wallis-Test (KW-Test) angewendet. Selbst bei normalverteilten Werten besitzt der Kruskal-Wallis-Test eine Effizienz von 95% der Varianzanalyse [188]. Zur Untersuchung eines signifikanten Gruppenunterschiedes zwischen zwei unabhängigen Stichproben (Studiengruppen) wurde der Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) durchgeführt, der selbst bei normalverteilten Werten eine Effizienz von 95% des T-Tests besitzt [188]. Zur Korrelationsanalyse wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) verwendet. Von Vorteil gegenüber der Korrelation nach Pearson ist die Anwendbarkeit bei nicht normalverteilten und ordinalskalierten Merkmalen. Des Weiteren ist er unempfindlicher gegenüber Ausreißern [188].

Ein Zusammenhang wurde bei den Vergleichs- bzw. Korrelationsberechnungen bei einem p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) $< 0,05$ als signifikant betrachtet. Sehr signifikante bzw. hoch signifikante Zusammenhänge lagen bei p-Werten von $< 0,01$ bzw. $< 0,001$ vor [188]. Nach Feststellung eines signifikanten Unterschiedes für den untersuchten Parameter zwischen den fünf Studiengruppen im Kruskal-Wallis-Test, erfolgte zur weiteren Differenzierung der paarweise Vergleich zwischen den einzelnen Studiengruppen im Mann-Whitney-U-Test. Hier wurde eine α -Adjustierung vorgenommen mit einer Absenkung des geforderten Signifikanzniveaus auf $p^* < 0,005$ (entsprechend dem Signifikanzniveau $p^* < 0,05 / 10$ [Anzahl der möglichen Paarvergleiche der fünf Studiengruppen]). Im Rahmem der Subanalysen war teilweise auch eine α -Adjustierung notwendig. Das entsprechende Signifikanzniveau wurde durch Anpassung der obigen Formel entsprechend der Anzahl der möglichen Paarvergleiche berechnet. Der p^* -Wert steht für die Irrtumswahrscheinlichkeit nach angewandter α -Adjustierung.

Auch bei der statistischen Auswertung von verbundenen bzw. abhängigen Stichproben (zwei unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte einer Gruppe) wurde aufgrund des geringen Umfanges der Stichproben (< 20 Probanden), der teils nicht vorliegenden Normalverteilung der Werte und zur Auswertung von Merkmalen mit ordinalem Messniveau der parameterfreie Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser besitzt selbst bei normalverteilten Werten eine Effizienz von 95% des gepaarten T-Tests [188].

Zur Auswertung qualitativer Merkmale wurde für den Vergleich unabhängiger Stichproben (Studiengruppen) der Chi-Quadrat-Test (χ^2) unter Berücksichtigung des Likelihood-Quotienten, der insbesondere auch bei der Analyse kategorialer Daten Anwendung findet, angewendet [188]. Lag die Konstellation einer Vierfeldertafel (2x2 Tabelle) vor, wurde der Exakte Test nach Fisher durchgeführt, da dieser der genaueste Test ist, wenn nur kleine Stichprobenumfänge vorliegen und die Zellhäufigkeiten kleiner als fünf sind [188]. Für die Berechnung eines möglichen signifikanten Unterschiedes eines nominalskalierten (dichotomen) Merkmales zweier abhängiger Stichproben zu verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurde der McNemar-Test angewendet.

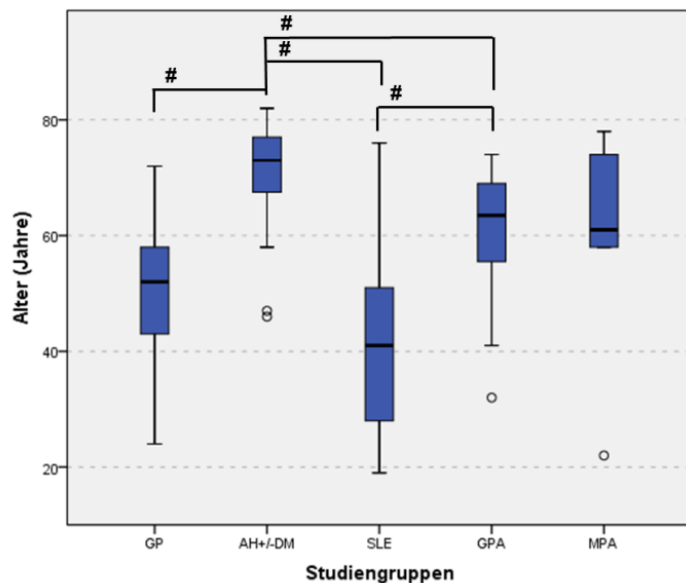
Für die Patienten mit einer renalen Beteiligung der GPA erfolgten für die Studienparameter Receiver-Operating-Characteristics (ROC) - Analysen im Hinblick auf das Auftreten einer Proteinurie, einer glomerulären Hämaturie bzw. der Kombination beider Pathologien. ROC - Analysen wurden auch in den Subanalysen der GPA - Gruppe für die Krankheitsaktivität und dem Krankheitsverlauf durchgeführt. Die Schwellenwerte (cut off) wurden durch Berechnung des höchsten Youden-Index ($J = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$) ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

Zur Untersuchung der plasmatischen cf-DNA/NETs bzw. des sCD163 als potentielle diagnostische Parameter ANCA-assoziiierter Kleingefäßvaskulitiden (AAV) wurden insgesamt 79 Probanden (62 Patienten und 17 Gesunde) in die Studie eingeschlossen. Diese verteilten sich auf die beiden Krankheitsentitäten der AAVs – Granulomatose mit Polyangiitis (GPA, ehemals Morbus Wegener, 20 Probanden, 25,3%) bzw. mikroskopische Polyangiitis (MPA, 5 Probanden, 6,3%) – sowie die Kontrollgruppen systemischer Lupus erythematoses (SLE, 22 Probanden, 27,8%), Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz vaskulärer Genese durch einen arteriellen Hypertonus, zum Teil in Kombination mit einer diabetischen Nephropathie (AH+/-DM, 15 Probanden, 19%), und gesunden Probanden ohne eine bekannte Einschränkung der Nierenfunktion (GP, 17 Probanden, 21,5%).

Tabelle 4.1 fasst die allgemeinen Kennzahlen der Studienpopulation zusammen. Von den 79 rekrutierten Probanden waren 69,6% weiblichen und 30,4% männlichen Geschlechts. Bis auf die Studiengruppe der AH+/-DM, die eine annähernd ausgeglichene Geschlechterverteilung aufwies, überwog bei den restlichen Studiengruppen das



weibliche Geschlecht. Dennoch unterschied sich die Verteilung des Geschlechts in den Studiengruppen nicht ($p = 0,182$ im Chi-Quadrat-Test). Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses betrug 56 Jahre im Median. Der jüngste Proband mit 19 Jahren kam aus der SLE-Gruppe, die insgesamt den niedrigsten Altersmedian mit 41 Jahren besaß. Sowohl der älteste Proband mit 82 Jahren als auch der höchste Altersmedian von 73 Jahren war der AH+/-DM-Gruppe zuzuordnen.

Abbildung 4.1 – Altersverteilung der Studiengruppen

Die Altersmediane unterschieden sich signifikant ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich im Mann-Whitney-U-Test bestand ein signifikanter Unterschied zwischen der AH+/-DM-Gruppe gegenüber den gesunden Probanden ($p^* < 0,001$), den Patienten mit einem SLE ($p^* < 0,001$) und einer GPA ($p^* = 0,003$). Des Weiteren sind die GPA-Patienten signifikant älter als die Patienten mit einem SLE ($p^* < 0,001$).

(#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

Tabelle 4.2 gibt einen Überblick über bekannte manifeste Erkrankungen und Risikofaktoren der Studienteilnehmer. Zum einen wird neben der arteriellen Hypertonie und dem Diabetes mellitus auf Diagnosen bzw. Risikofaktoren Bezug genommen, die mit diesen in der klinischen Praxis oftmals in Beziehung stehen. Zum anderen werden nephrologische Entitäten beleuchtet. Im Chi-Quadrat-Test bestanden signifikante Gruppenunterschiede bei den Erkrankungen arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Glomerulonephritis und chronische Pyelonephritis. Kein signifikanter Unterschied konnte für die koronare Herzkrankheit (KHK), dem Nikotinabusus und chronischen Harnwegsinfekten berechnet werden.

Tabelle 4.1 – Allgemeine Kennzahlen der Studienpopulation

Parameter	Gesamt	GP	AH+/-DM	SLE	GPA	MPA
Anzahl	79	17 (21,5%)	15 (19%)	22 (27,8%)	20 (25,3%)	5 (6,3%)
Geschlecht						
• männlich	24 (30,4%)	5 (29,4%)	7 (46,7%)	3 (13,6%)	8 (40%)	1 (20%)
• weiblich	55 (69,6%)	12 (70,6%)	8 (53,3%)	19 (86,4%)	12 (60%)	4 (80%)
Alter (Jahre)	56 (42 - 69)	52 (42 - 58,5)	73 (66 - 78)	41 (27,25 - 51,25)	63,5 (55,25 - 69)	61 (40 - 76)
Größe (cm)	168 (163 - 176)	169 (163 - 179)	170 (164 - 175)	168 (159,8 - 173,5)	169 (164 - 180)	164 (160 - 173)
Gewicht (kg)	74,5 (65,5 - 90,0)	67 (62,5 - 85,5)	82 (76,5 - 93)	70 (64,8 - 88,7)	78,9 (70 - 89,5)	77 (48,6 - 84,5)
BMI (kg/m²)	25,83 (24,15 - 29,05)	24,62 (22,22 - 26,57)	29,97 (25,22 - 34,58)	25,33 (23,10 - 29,90)	26,71 (24,85 - 28,01)	27,47 (18,96 - 28,81)
RR_systolisch (mmHg)	130 (120 - 140)	137 (129,5 - 143)	140 (122 - 160)	120 (110 - 130)	132 (112,5 - 140)	130 (121 - 146)
RR_diastolisch (mmHg)	80 (70 - 88)	88 (83,5 - 95,5)	72 (68 - 80)	80 (70 - 80)	80 (76,3 - 85)	74 (65 - 90)
RR_map (mmHg)	96,7 (89,3 - 103,3)	104,7 (100 - 109,5)	96,7 (86,7 - 102,7)	90 (85,8 - 96,7)	97,3 (88,4 - 103,8)	96,7 (85 - 105,3)

Im ersten Abschnitt sind die absoluten und in Klammern die prozentualen Zahlen angegeben. Im zweiten Abschnitt erfolgt die Angabe des Medians und in Klammern des 1. und 3. Quartils.

Tabelle 4.2 – ausgewählte Begleiterkrankungen und Risikofaktoren

	Gesamt	GP	AH+/-DM	SLE	GPA	MPA	p (χ ²)
Arterielle Hypertonie*	51 (64,6%)	5 (29,4% / 9,8%)	15 (100% / 29,4%)	13 (59,1% / 25,5%)	13 (65% / 25,5%)	5 (100% / 9,8%)	< 0,001
Diabetes mellitus*	14 (17,7%)	-	10 (66,7% / 71,4%)	3 (13,6% / 21,4%)	-	1 (20% / 7,1%)	< 0,001
Hyperlipidämie*	31 (39,2%)	3 (17,6% / 9,7%)	12 (80% / 38,7%)	4 (18,2% / 12,9%)	8 (40% / 25,8%)	4 (80% / 12,9%)	< 0,001
KHK	7 (8,9%)	-	2 (13,3% / 28,6%)	1 (4,5% / 14,3%)	2 (10% / 28,6%)	2 (40% / 28,6%)	0,106
Nikotin	11 (13,9%)	2 (11,8% / 18,2%)	-	5 (22,7% / 45,5%)	3 (15% / 27,3%)	1 (20% / 9,1%)	0,202
Glomerulonephritis*	35 (44,3%)	-	-	11 (50% / 31,4%)	19 (95% / 54,3%)	5 (100% / 14,3%)	< 0,001
chron. Pyelonephritis*	5 (6,3%)	-	5 (33,3% / 100%)	-	-	-	0,001
chron. Harnwegsinfekte	5 (6,3%)	-	2 (13,3% / 40%)	1 (4,5% / 20%)	1 (5% / 20%)	1 (20% / 20%)	0,353

Neben der absoluten Anzahl erfolgt in Klammern zunächst die Angabe der prozentualen Häufigkeit des Auftretens in der jeweiligen Studiengruppe. Die zweite prozentuale Angabe bezieht sich auf den Anteil, der in der gesamten Studienpopulation von dem Symptom betroffenen Personen. Bei den mit einem „*“ markierten Symptomen konnte im Chi-Quadrat-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen nachgewiesen werden. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Chi-Quadrat-Test (χ²).

Tabelle 12.14 des Anhangs fasst die Ursachen der chronischen Nierenschädigung des Studienkollektives zusammen. Bei den gesunden Probanden ist keine Nierenerkrankung bekannt gewesen. Allen Patienten der AH+/-DM-Gruppe war gemeinsam, dass es durch einen manifesten arteriellen Hypertonus zu einer Nierenschädigung im Rahmen einer benignen Nephrosklerose gekommen ist. Bei nur 20% der Patienten lag diese als Ursache der chronischen Niereninsuffizienz isoliert vor. Ein Großteil von 46,7% hatte zusätzlich noch eine diabetische Nephropathie. Bei 13,3% ist als weitere Ursache der Nierenschädigung eine chronische Pyelonephritis bekannt gewesen. Insgesamt 20% der AH+/-DM-Patienten zeigten ein Mischbild aus einer benignen Nephrosklerose, einer diabetischen Nephropathie und einer chronischen Pyelonephritis als Ursache der chronischen Nierenschädigung. 50% der Patienten mit einem SLE hatten keine renale Manifestation der Grundkrankheit. Einer dieser Patienten hatte eine chronische Niereninsuffizienz im Rahmen einer vaskulären und diabetischen Genese. Histologisch wurde bei 40,9% der SLE-Patienten eine Lupusnephritis nachgewiesen. Die Lupusnephritis ISN-Klasse IV dominierte mit einem Anteil von 18,2%, das waren 44,44% aller histologisch gesicherten Lupusnephritiden.

Lediglich zwei Patienten (10%) mit einer GPA hatten keine renale Manifestation der Grunderkrankung. Bei einem von ihnen konnte histologisch vor Jahren eine IgA-Nephropathie nachgewiesen werden. Eine Form der RPGN lag in 40% vor. In 30% erfolgte die Erstdiagnose zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses. Zweimal (10%) war die aggressive Form der RPGN mit > 50% Halbmondbildung vertreten. 25% der Patienten mit einer GPA hatten in der Vergangenheit eine RPGN. Zum Studienzeitpunkt lag nur noch eine geringe Aktivität der Grunderkrankung bzw. ein chronischer Schaden vor.

In der MPA-Gruppe konnte zum Studienzeitpunkt bei zwei Patienten (40%) eine sklerotische RPGN histologisch gesichert werden. In zwei weiteren Fällen (40%) lag ein chronischer Schaden in Folge einer abgelaufenen RPGN vor. Ein Patient mit einer MPA wurde bereits Jahre vor Diagnosestellung der MPA wegen einer terminalen Niereninsuffizienz im Rahmen einer diabetischen Nephropathie und einer benignen Nephrosklerose dialysepflichtig. Klinisch wurde im Rahmen der Vaskulitidiagnostik zum Studienzeitpunkt auch eine renale Beteiligung in Form einer Glomerulonephritis vermutet, eine Nierenbiopsie erfolgte nicht.

Die statistischen Kennzahlen der Blutdruckmessungen (RR nach Riva Roci) sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Bei den systolischen und diastolischen RR-Werten lagen signifikante Gruppenunterschiede ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,001$ im KW-Test) vor. Die systolischen Werte der GP- und AH+/-DM-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$ im MWU-Test) waren signifikant höher als die der SLE-Gruppe. Die Verteilung der diastolischen RR-Werte fiel etwas anders aus. Die diastolischen RR-Werte sowohl der AH+/-DM- ($p^* < 0,001$ im MWU-Test) als auch der SLE-Gruppe ($p^* = 0,001$ im MWU-Test) waren signifikant niedriger als die der gesunden Probanden. Die Werte des arteriellen Mitteldruckes wurden aus den systolischen und diastolischen RR-Werten berechnet. Ein signifikanter Gruppenunterschied bestand auch hier ($p = 0,006$ im KW-Test). Der mittelarterielle Druck der gesunden Probanden war signifikant höher im Vergleich zu den Patienten mit einem SLE ($p^* < 0,001$ im MWU-Test).

Tabelle 12.4 und Abbildung 12.1 im Anhang stellen die Verteilung der Blutdruckverhältnisse anhand der WHO-Klassifikation der arteriellen Hypertonie dar. Auffällig ist, dass bei lediglich 9% der SLE Probanden eine manifeste arterielle Hypertonie gemessen werden konnte. Bei über der Hälfte (59,1%) der SLE Patienten lag ein optimaler bzw. normaler Blutdruck vor. In der Gruppe der gesunden Probanden, bei der im Median der höchste diastolische (88 mmHg) und mittelarterielle Druck (104,7 mmHg) bestimmt wurde, hatten lediglich 5,9% einen optimalen und kein Proband einen normalen RR-Wert. 35,3% dieser Gruppe hatten hochnormale Blutdruckwerte und über die Hälfte (58,9%) einen Wert entsprechend einem arteriellen Hypertonus. In der AH+/-DM-Gruppe,

der zum einen der höchste systolische Wert im Median (140 mmHg), aber auch der niedrigste diastolische RR-Wert im Median (72 mmHg) zuzuordnen war, fielen ebenfalls über die Hälfte (60,1%) der Einzelmessungen in den Bereich der arteriellen Hypertonie, wobei 46,7% dem einer isolierten systolischen Hypertonie entsprachen. Hinsichtlich der kategorialen Verteilung der Blutdruckwerte nach der WHO-Klassifikation bestand ebenfalls ein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,006$ im Chi-Quadrat-Test).

Tabelle 4.1 fasst die statistischen Kennzahlen der Körpermaße zusammen. Signifikante Gruppenunterschiede stellten sich für die Merkmale Körpergröße ($p = 0,783$ im KW-Test) und Körpergewicht ($p = 0,034$ im KW-Test, aber keine Signifikanz beim paarweisen Vergleich im MWU-Test) nicht dar. Dieser bestand aber beim BMI ($p = 0,012$ im KW-Test). Die AH+/-DM-Gruppe, die mit $29,97 \text{ kg/m}^2$ mit dem höchsten BMI im Median gekennzeichnet war, unterschied sich signifikant von den gesunden Probanden mit dem niedrigsten BMI von $24,62 \text{ kg/m}^2$ im Median ($p^* < 0,001$ im MWU-Test).

Eine Zusammenfassung der aufgetretenen Symptome in den jeweiligen Studiengruppen vermittelt Tabelle 12.7 des Anhangs. Signifikante Gruppenunterschiede wurden in der Kategorie Allgemeinsymptome für die Symptome Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Abgeschlagenheit gesehen. Über Abgeschlagenheit klagte die Mehrheit der Patienten mit einer GPA (55%) und einem SLE (68,2%). Etwa ein Viertel der Patienten dieser beiden Gruppen berichteten auch von Nachtschweiß.

Für die Symptome Kopfschmerzen, Rhinitis, Epistaxis und Borken konnte im Chi-Quadrat-Test ebenfalls ein signifikanter Gruppenunterschied gesehen werden. Kopfschmerzen manifestierten sich bei fast der Hälfte der Patienten mit einem SLE. Eine vermehrte nasale Schleimproduktion bestand bei ca. einem Drittel der GPA- und SLE-Patienten. Epistaxis (45%) und Borken (35%) wurden nur bei Patienten mit einer GPA beobachtet. Bei den Symptomen des unteren Respirationstraktes wurde ein signifikanter Gruppenunterschied lediglich für den Husten gesehen, der sich bei 50% der GPA- und 40,9% der SLE-Patienten manifestierte. Hämoptysen traten nur bei 15% der Patienten mit einer GPA auf. Ein signifikanter Gruppenunterschied lag nicht vor. Dies galt auch für die Dyspnoe, über die mit Ausnahme der gesunden Probanden jeweils 20% bis 27,3% der Patienten der anderen Studiengruppen klagten.

Arthralgien traten in allen Studiengruppen, insbesondere aber beim SLE (63,6%) und der GPA (45%), auf. Arthritiden manifestierten sich in etwa bei einem Sechstel der Patienten mit einer GPA und einem SLE. Myalgien wurden in 50% der Fälle beim SLE gesehen. Für diese drei Manifestationen des Bewegungsapparates bestand ein signifikanter Gruppenunterschied. Dieser konnte auch für das Raynaud-Phänomen berechnet werden, das insbesondere gehäuft beim SLE (36,4%) auftrat.

Ödeme wurden vereinzelt bei Probanden aller Studiengruppen beobachtet. Ein signifikanter Gruppenunterschied bestand nicht. Weitere Symptome, die auf eine Störung im Bereich der Nieren und ableitenden Harnwege hinweisen (Nierenlagerklopfeschmerz, Pollakisurie, Dysurie und Makrohämaturie), traten ebenso wie der akute Harnwegsinfekt nur gelegentlich auf, ohne Nachweis eines signifikanten Gruppenunterschiedes.

4.1.1 Klinische Chemie

Differentialblutbild

Die statistischen Kennwerte der Parameter des Differentialblutbildes sind in Tabelle 12.10 des Anhangs zusammengefasst. Bis auf den Median der MPA-Gruppe, der mit $3,77 \cdot 10^{12}$ Erythrozyten/l unterhalb des klinischen Normbereiches ($4 - 5,5 \cdot 10^{12}/l$) lag, befanden sich die Mediane für die Anzahl der Erythrozyten der anderen Studiengruppen im klinischen Referenzbereich. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$ im KW-Test) für die

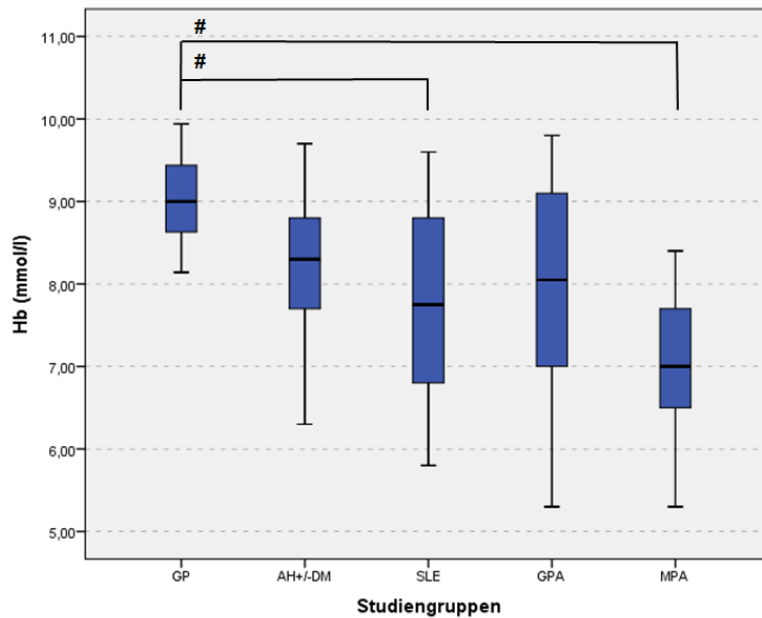
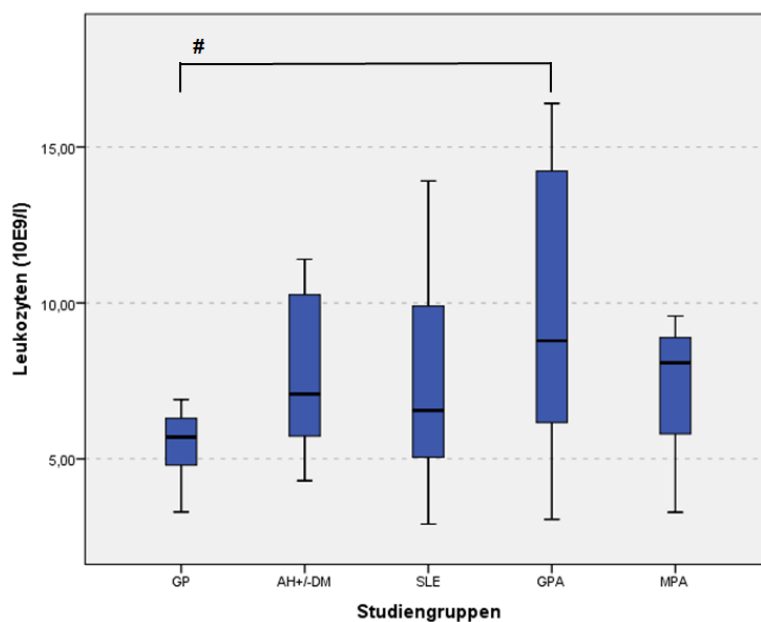


Abbildung 4.2 – Verteilung des Hämoglobins

Signifikante Unterschiede („#“, $p = 0,002$ im Kruskal-Wallis-Test) bestanden im paarweisen Vergleich im Mann-Whitney-U-Test zwischen den gesunden Probanden und der SLE- ($p^* < 0,001$) bzw. der MPA-Gruppe ($p^* < 0,001$). (Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

auch der Hk-Werte (jeweils $p = 0,002$) zwischen den Studiengruppen signifikant. Im paarweisen Vergleich mit dem MWU-Test differierten die Hb-Werte der gesunden Probanden gegenüber der SLE- und MPA-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) signifikant. Auch die Hk-Werte der gesunden Probanden waren signifikant höher als die der AH+/-DM- ($p^* = 0,001$), der SLE- ($p^* < 0,001$) und der MPA-Gruppe ($p^* < 0,001$).



Anzahl der Erythrozyten zwischen den Studiengruppen stellte sich im MWU-Test zwischen den gesunden Probanden und den jeweiligen anderen Studiengruppen dar (AH+/-DM und GPA: $p^* < 0,001$; SLE und MPA: $p^* = 0,001$). Den gesunden Probanden war mit einem Hb von $9,0 \text{ mmol/l}$ bzw. einem Hk von $0,44/l$ auch bei diesen beiden Parametern der jeweilige höchste Gruppenmedian zuzuordnen. Die niedrigsten Gruppenmediane für den Hb ($7,0 \text{ mmol/l}$) und den Hk ($0,36/l$) besaß die MPA-Gruppe. Im Kruskal-Wallis-Test unterschied sich sowohl die Verteilung der Hb- als

Bei der Anzahl der Thrombozyten bestand im Vergleich der Studiengruppen im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied ($p = 0,913$). Die Gruppenmediane lagen alle im Bereich der Norm ($150 -$

Abbildung 4.3 – Verteilung der Leukozyten

Die Verteilung der Leukozyten war im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,017$) signifikant unterschiedlich. Die GPA-Gruppe hatte signifikant höhere Leukozytenwerte im Vergleich zur GP-Gruppe ($p^* = 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). (#: signifikanter Unterschied; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

450*10E9/l), die Schwankungsbreite war gering. Auch die Gruppenmediane der Leukozyten lagen alle im klinischen Referenzbereich (4 - 9*10E9/l). Die gesunden Probanden hatten mit 5,7*10E9/l den niedrigsten Median. Der höchste Gruppenmedian mit 8,785*10E9/l und auch die höchste Einzelmessung einer Leukozytose von 16,4*10E9/l waren der GPA-Gruppe zuzuordnen. Die Leukozytenwerte der gesunden Probanden waren gegenüber denen der GPA-Gruppe signifikant niedriger.

Im Vergleich der Gruppenmediane der neutrophilen Granulozyten hatten die gesunden Probanden sowohl bei der relativen (56%) als auch bei der absoluten (2,912*10E9/l) Messung den niedrigsten Gruppenmedian. Die höchsten Gruppenmediane waren bei beiden Parametern mit 77,2% bzw. 6,352*10E9/l den Patienten mit einer GPA

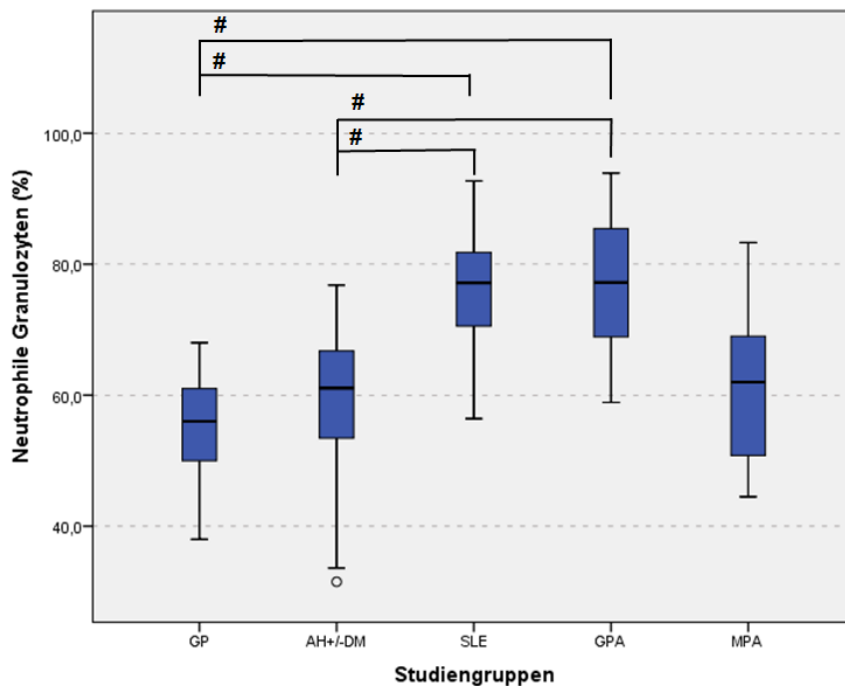


Abbildung 4.4 – Verteilung der neutrophilen Granulozyten (%)

Die relativen Anteile der Neutrophilen an den Gesamtleukozyten fielen in der SLE- und GPA-Gruppe signifikant höher als bei den gesunden Probanden und der AH+/-DM-Gruppe aus (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). (#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 20, GPA 20, MPA 5)

se für beide Bestimmungen jeweils zwischen der GP- vs. GPA-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) und der GP- vs. SLE-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) dar. Für die relative Bestimmung der neutrophilen Granulozyten konnten des Weiteren auch noch signifikant höhere Werte der GPA- ($p^* < 0,001$) und der SLE-Gruppe ($p^* < 0,001$) gegenüber der AH+/-DM-Gruppe nachgewiesen werden.

Die GPA- und SLE-Gruppen lagen mit ihren Gruppenmediane mit 13,5% bzw. 14,35% unterhalb der klinischen Norm (20 - 42%) für die relative Lymphozytenbestimmung und stellten mit 1,168*10E9/l bzw. 1,044*10E9/l auch die niedrigsten Absolutwerte im Median für die Lymphozyten. Den höchsten Gruppenmedian sowohl bei der relativen als auch der absoluten Bestimmung hatten mit 36% bzw. 1,86*10E9/l die gesunden Probanden. In beiden Messverfahren fielen signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen auf (jeweils $p < 0,001$ im KW-Test). Im paarweisen Vergleich mit dem MWU-Test konnten diese für beide Bestimmungen zwischen der GP- vs. GPA-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) bzw. GP- vs. SLE-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) und der AH+/-DM-

zuzuordnen. Bei der relativen Messung der Neutrophilen lag die SLE-Gruppe mit 77,15% im Median nahezu gleich auf mit der GPA-Gruppe. Betrachtet man aber die absolute Bestimmung der Neutrophilen, lag der Median der Patienten mit einem SLE mit 5,265*10E9/l deutlich unter dem der GPA-Gruppe. Im KW-Test bestanden sowohl für die relative als auch für die absolute Messung der Neutrophilen signifikante Gruppenunterschiede (jeweils $p < 0,001$). Im paarweisen Vergleich mit dem MWU-Test stellten sich diese

vs. GPA-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) bzw. AH+/-DM- vs. SLE-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$) nachgewiesen werden.

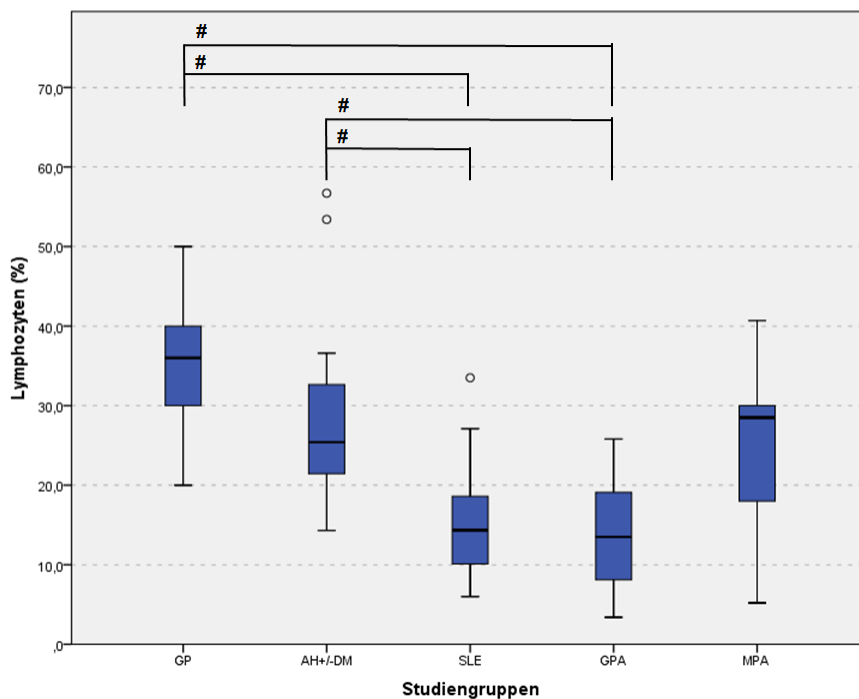


Abbildung 4.5 – Verteilung der Lymphozyten (%)

Der relative Anteil der Lymphozyten fiel in der GPA und SLE-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zu der GP- und AH+/-DM-Gruppe aus (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

(#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 20, GPA 20, MPA 5)

Die Gruppenmediane der relativen Monozytenbestimmung lagen alle im Bereich der klinischen Norm ($< 15\%$). Mit bis zu 17,7% bzw. 16,0% wurden bei Probanden der SLE- bzw. GPA-Gruppe Einzelwerte bestimmt, die oberhalb des Referenzbereiches lagen. Die Rangfolge der Gruppenmediane unterschied sich zwischen der relativen und absoluten Bestimmung der Monozyten nicht. Mit 9,3% bzw. $0,671 \cdot 10^9/l$ stellte die MPA-Gruppe jeweils den höchsten, die gesunden Probanden mit 6,0% bzw. $0,414 \cdot 10^9/l$ jeweils den niedrigsten Gruppenmedian. Bei der relativen Verteilung der Monozyten bestand kein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,466$ im KW-Test). Für die absolute Verteilung der Monozyten war dieser nachweisbar ($p = 0,026$ im KW-Test). Die absolute Anzahl der Monozyten war bei den gesunden Probanden signifikant niedriger als in der GPA-Gruppe ($p^* = 0,002$ im MWU-Test).

Alle Gruppenmediane der Eosinophilen lagen im klinischen Referenzbereich ($< 5\%$). Die Verteilung stellte sich im Gruppenvergleich signifikant ($p < 0,001$ im KW-Test) unterschiedlich dar. Der Anteil der Eosinophilen war in der AH+/-DM-Gruppe signifikant höher als in der GPA- bzw. SLE-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$). Bei den Basophilen lagen die Gruppenmediane mit Ausnahme der MPA-Gruppe, in welcher der Gruppenmedian mit 1,0% grenzwertig ausfiel, im klinischen Normbereich ($< 1\%$). Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$ im KW-Test) stellten sich im paarweisen Vergleich im MWU-Test zwischen der AH+/-DM- und der SLE-Gruppe ($p^* < 0,001$) sowie zwischen der SLE- und der MPA-Gruppe ($p^* < 0,001$) dar. Einen Überblick über die statistischen Kennwerte vermittelt Tabelle 12.10 des Anhangs.

C-reaktives Protein (CRP)

Die Gruppenmediane der Kontrollgruppen – GP (1,68 mg/l), AH+/-DM (2,79 mg/l) bzw. SLE (3,25 mg/l) – und der MPA-Gruppe (3,1 mg/l) lagen im klinischen Normbereich (< 5 mg/l). Alle CRP-Werte der MPA-Gruppe waren normwertig. Auch die Maximalwerte der anderen drei Gruppen waren nur leichtgradig ausgelenkt. Auffällig war der höchste CRP-Wert des Studienkollektives von 240 mg/l, der einem GPA-Patienten zuzuordnen war. Der Median der GPA-Gruppe lag mit 9,73 mg/l jedoch auch nur geringfügig oberhalb des Normbereiches. Signifikante Gruppenunterschiede stellten sich zwischen der GP- und der GPA- bzw. SLE-Gruppe dar. Tabelle 12.10 des Anhangs fasst die statistischen Kennwerte der Studiengruppen für das CRP zusammen.

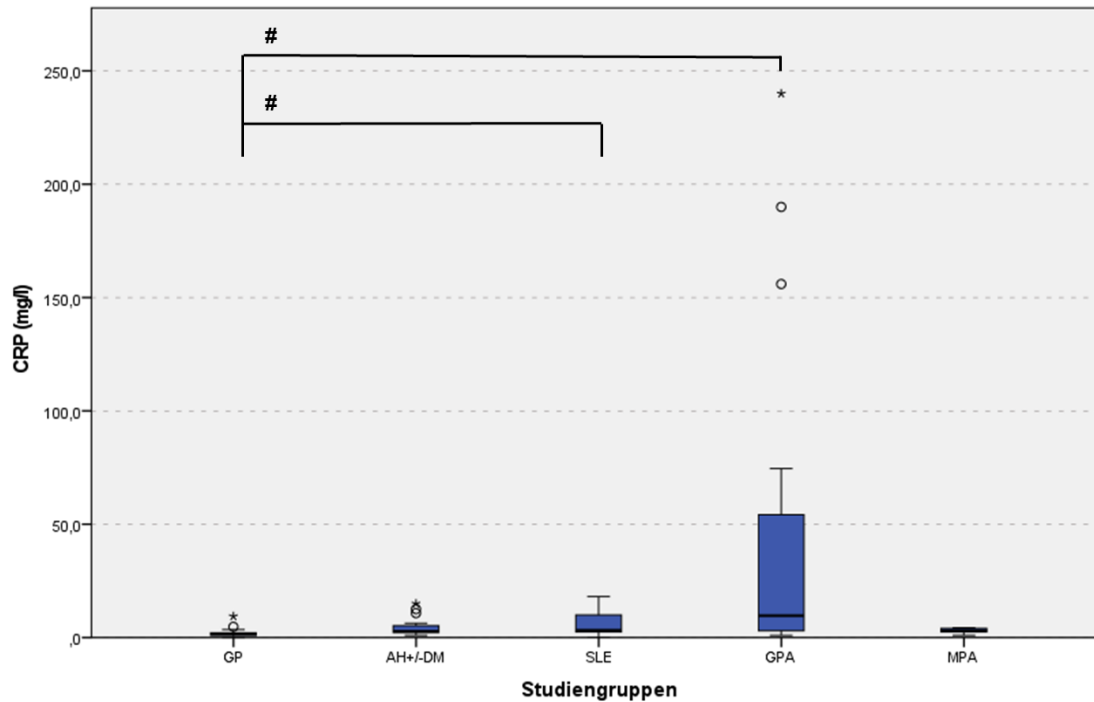


Abbildung 4.6 – Verteilung des C-reaktiven Proteins

In der Verteilung der CRP Werte stellte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen dar ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test). Die CRP-Werte der gesunden Probanden sind signifikant niedriger als die der GPA- ($p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test) und SLE-Gruppe ($p^* = 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

(#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

Retentionsparameter und glomeruläre Filtrationsrate

In der Zusammenschau der Gruppenmediane des Serumcreatinins fällt eine größere Spannbreite auf. Die Probanden der SLE- und GP-Gruppen hatten mit $75,0 \mu\text{mol/l}$ bzw. $78,0 \mu\text{mol/l}$ die niedrigsten Creatininwerte im Median. Die Mediane der anderen drei Studiengruppen lagen oberhalb des klinischen Normbereiches. Leicht erhöhte Creatininwerte im Median hatten die AH+/-DM- ($139,0 \mu\text{mol/l}$) und die GPA-Gruppen ($143,5 \mu\text{mol/l}$). Der mit Abstand höchste Median war mit $265,0 \mu\text{mol/l}$ der MPA-Gruppe zuzuordnen. Ihr gehörte auch der Proband mit der höchsten Einzelmessung von $1010,0 \mu\text{mol/l}$ an. Signifikante Gruppenunterschiede bestanden jeweils für die GP bzw. SLE-Gruppe zur AH+/-DM-, GPA- und MPA-Gruppe. Die statistischen Kennwerte sowohl des Serumcreatinins als auch der abgeschätzten glomerulären Filtrationsrate nach der MDRD-Methode (eGFR (MDRD)) und des Serumharnstoffs sind in Tabelle 12.9 des Anhangs zusammengefasst.

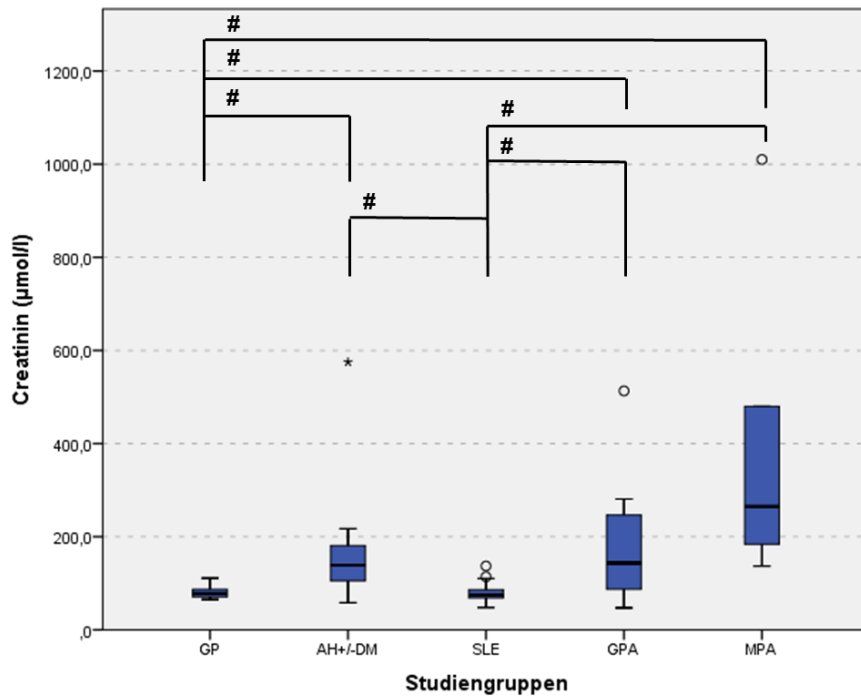


Abbildung 4.7 – Verteilung des Serumcreatinins

Signifikante Gruppenunterschiede ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test) stellten sich für die GP- bzw. SLE-Gruppe jeweils zu der AH+/-DM-, GPA- und MPA-Gruppe dar (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

(#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

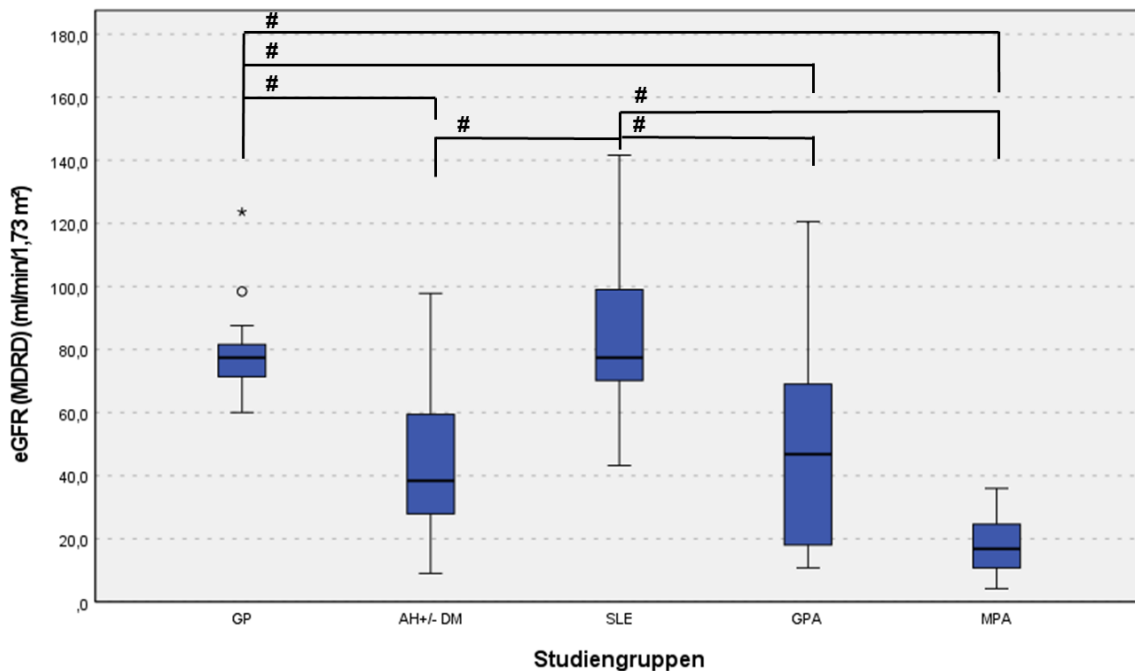
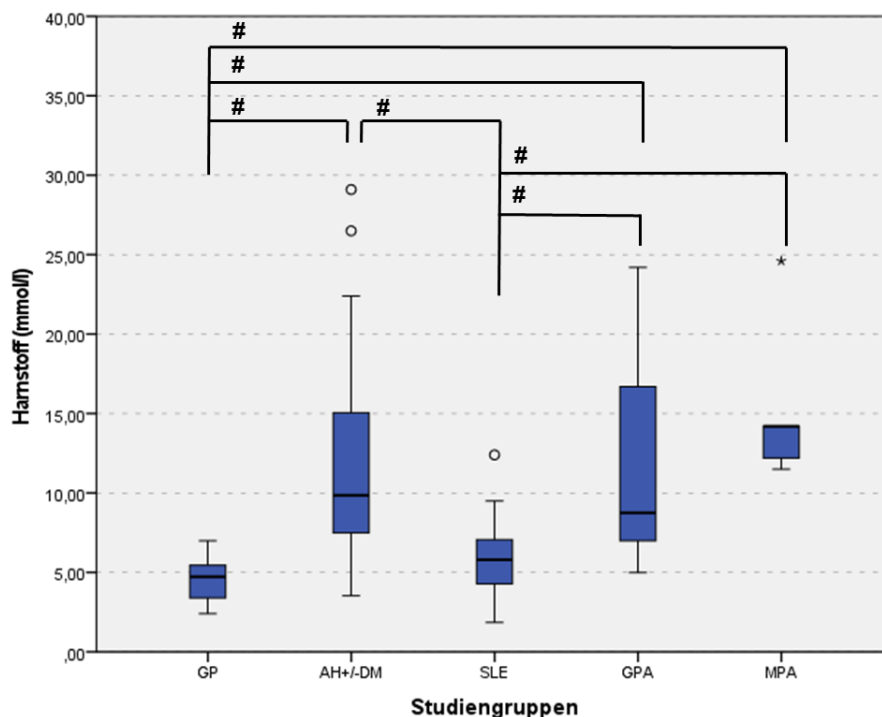


Abbildung 4.8 – Verteilung der geschätzten glomerulären Filtrationsrate ermittelt nach der MDRD-Formel

Die Verteilung der eGFR (MDRD) zwischen den Studiengruppen unterschied sich signifikant ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test). Im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test stellte sich ein signifikanter Unterschied jeweils zwischen der GP- bzw. SLE-Gruppe und den AH+/-DM- (jeweils $p^* < 0,001$), GPA- ($p^* = 0,001$ bzw. $p^* < 0,001$) sowie MPA-Gruppen (jeweils $p^* < 0,001$) dar. (#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

Entsprechend den niedrigen Werten für das Serumcreatinin hatten die GP- und die SLE-Gruppe mit 77,4 ml/min/1,73 m² die höchste eGFR (MDRD). Die eGFR (MDRD) der anderen drei Studiengruppen lag im Median unter 60 ml/min/1,73 m². Den niedrigsten Median für die eGFR (MDRD) hatte mit 16,8 ml/min/1,73 m² die MPA-Gruppe, die auch die Probanden mit den niedrigsten Einzelwerten von 4,2 ml/min/1,73 m² stellte. Die eGFR (MDRD) der GPA- (46,8 ml/min/1,73 m²) und AH+/-DM-Gruppe (38,4 ml/min/1,73 m²) waren im Median mittelgradig eingeschränkt. Analog zum Serumcreatinin bestanden signifikante Gruppenunterschiede jeweils für die GP bzw. SLE-Gruppe zur AH+/-DM-, GPA- und MPA-Gruppe.

Eine den Serumcreatininwerten ähnliche Verteilung der Gruppenmediane war beim Serumharnstoff nachzuvollziehen. Die GP- und die SLE-Gruppe hatten mit 4,73 mmol/l bzw. 5,8 mmol/l die niedrigsten Harnstoffwerte im



Median. Die Mediane der GPA- und AH+/-DM-Gruppe waren mit 8,75 mmol/l bzw. 9,86 mmol/l nur geringfügig ausgeleitet. Der höchste Serumharnstoffwert im Median mit 14,2 mmol/l konnte der MPA-Gruppe zugeordnet werden. Signifikante Gruppenunterschiede bestanden jeweils zwischen der GP- bzw. SLE-Gruppe zu den AH+/-DM-, GPA- und MPA-Gruppen.

Abbildung 4.9 – Verteilung des Serumharnstoffs

Signifikante Gruppenunterschiede ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test) bestanden für die GP-Gruppe zur AH+/-DM-, GPA- und MPA-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$). Die Serumharnstoffwerte der SLE-Gruppe waren gegenüber der AH+/-DM- ($p^* = 0,003$), GPA- ($p^* = 0,001$) und MPA-Gruppe ($p^* < 0,001$) signifikant niedriger (paarweiser Vergleich jeweils mit dem Mann-Whitney-U-Test). (#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 19, GPA 18, MPA 5)

Alle Patienten der MPA-Gruppe hatten eine höhergradige chronische Niereninsuffizienz. In zwei Fällen (40%) lag sogar eine terminale dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz vor. Auch alle Patienten der AH+/-DM-Gruppe waren durch eine chronische Niereninsuffizienz gekennzeichnet. In 73,4% konnte diese dem Stadium 3 und höher nach KDOQI zugeordnet werden. Bei den gesunden Probanden waren keine Nierenerkrankungen und somit auch keine chronische Niereninsuffizienz bekannt. Dies galt ebenso für 45,5% der Patienten mit einem SLE. Ein ebenso großer Anteil der SLE-Gruppe hatte eine chronische Niereninsuffizienz, allerdings lag bei lediglich 9,1% eine höhergradige Insuffizienz im Stadium 3 nach KDOQI vor. Nur zwei Patienten (9,1%) der SLE-Gruppe waren durch eine akute Verschlechterung der Nierenfunktion mit einem nephritischen Sediment und einer geringen Auslenkung der Retentionsparameter gekennzeichnet.

Vier Probanden der GPA-Gruppe (20%) hatten zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses ein akutes Nierenversagen. Inwieweit eine Chronifizierung eintreten würde, war noch nicht abschließend beurteilbar. Eine chronische

Niereninsuffizienz lag bei dreizehn Patienten der GPA-Gruppe (65%) vor, wobei in zwölf Fällen eine renale Beteiligung der Vaskulitis und bei einer Patientin eine abgelaufene IgA-Nephritis ursächlich waren. Bei zwei Patienten mit einer GPA (10%) lag ein nephritisches Sediment ohne eine Erhöhung der Retentionsparameter vor. Eine Zusammenfassung der Art der vorliegenden Nierenfunktionsstörungen vermittelt Tabelle 12.15 des Anhangs.

Urindiagnostik (Teststreifen und Sediment)

Im Vergleich der Studiengruppen bestand für die Leukozytenbestimmung im Teststreifen kein signifikanter Unterschied ($p = 0,107$ im KW-Test). Dieser konnte aber für die Erythrozyturie im Teststreifen nachgewiesen werden ($p < 0,001$ im KW-Test). In den Gruppen AH+/-DM ($p^* < 0,001$ im MWU-Test) und GPA ($p^* < 0,004$ im MWU-Test) trat rechnerisch eine signifikant höhere Erythrozyturie als bei den gesunden Probanden auf. Im Falle der AH+/-DM-Gruppe ist dies klinisch unter Vorbehalt einzuordnen. Bei 92,9% der Urinproben dieser Gruppe trat lediglich eine geringe Erythrozyturie von $\leq 25/\mu\text{l}$ auf. Bei nur einer Urinuntersuchung (7,1%) lag eine erhöhte Erythrozyturie von $\leq 150/\mu\text{l}$ vor. Bei den gesunden Probanden hatten 88,2% einen negativen Befund im Teststreifen, bei einem Probanden (5,9%) trat eine Erythrozyturie $\leq 25/\mu\text{l}$ auf. Bei einer gesunden Probandin (5,9%), die zur Zeit der Probenahme ihre Menstruationsblutung hatte, wurde eine Erythrozyturie $> 250/\mu\text{l}$ bestimmt. Demgegenüber konnte bei 28,6% der Urinproben der GPA-Patienten eine Erythrozyturie $> 250/\mu\text{l}$ gemessen werden und bei einer weiteren (7,1%) eine Erythrozyturie $\leq 250/\mu\text{l}$. Beim SLE wurden neben einer Ausnahme (Erythrozyturie $\leq 250/\mu\text{l}$) in den vorhandenen Urinproben nur negative Befunde (50%) oder eine nur gering ausgeprägte Erythrozyturie von $\leq 25/\mu\text{l}$ (42,9%) dokumentiert. Einen Überblick über die Leuko- und Erythrozyturie im Teststreifen vermittelt Tabelle 12.16 des Anhangs.

Die Verteilung der Leukozyturie im Urinsediment war relativ homogen. Es stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen dar ($p = 0,599$ im KW-Test). Für die Bestimmung der Erythrozyten im Urinsediment wurde dagegen ein signifikanter Gruppenunterschied gesehen ($p = 0,002$ im KW-Test), der sich zwischen der AH+/-DM- und der MPA-Gruppe darstellte ($p^* = 0,001$ im MWU-Test). In der AH+/-DM-Gruppe hatten 80% keine und 20% der Proben nur 1 - 5 Erythrozyten/Gesichtsfeld (GF). In der MPA-Gruppe wurde von den untersuchten Urinproben bei 50% >10 Erythrozyten/GF und bei 25% >500 Erythrozyten/GF bestimmt. Bei einem Probanden der MPA-Gruppe konnte aufgrund einer bestehenden Anurie kein Urin zur Diagnostik gewonnen werden. In der Mehrheit der Urinproben der gesunden Probanden (88,2%) und der SLE-Patienten (70,6%) bestand keine Erythrozyturie. Die höchste Einzelmessung von >500 Erythrozyten/GF erfolgte bei einer Patientin der GP-Gruppe, die zur Zeit der Probenahme ihre Menstruationsblutung hatte. In der GPA-Gruppe gab es einen größeren Anteil an Urinproben (47,1%) ohne eine Erythrozyturie. In 17,6 % bzw. in jeweils 11,8% wurde aber auch eine Erythrozyturie von >10 , >50 und >100 Erythrozyten/GF gesehen. Einen Überblick über die Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment vermittelt Tabelle 12.17 des Anhangs.

Mit 0,0 g/l Protein im Urin hatte die Gruppe der gesunden Probanden den niedrigsten Median aller Studiengruppen. Eine klinisch grenzwertige bzw. leicht erhöhte Urinproteinausscheidung hatten die SLE- und MPA-Gruppen mit 0,25 g/l bzw. 0,275 g/l im Median. Die mediane Proteinausscheidung der GPA- und AH+/-DM-Gruppen lag mit 0,075 g/l bzw. 0,1 g/l im klinischen Normbereich. Die mit Abstand höchste Einzelbestimmung konnte mit 5,0 g/l einem Patienten aus der SLE-Gruppe zugeordnet werden. Die Verteilung der Proteinausscheidung im Urin unterschied sich signifikant ($p = 0,002$ im KW-Test). Die AH+/-DM-Gruppe hatte gegenüber den gesunden

Probanden eine signifikant höhere Eiweißausscheidung im Urin. Tabelle 12.9 des Anhangs fasst die statistischen Kennwerte der Proteinurie im Teststreifen zusammen.

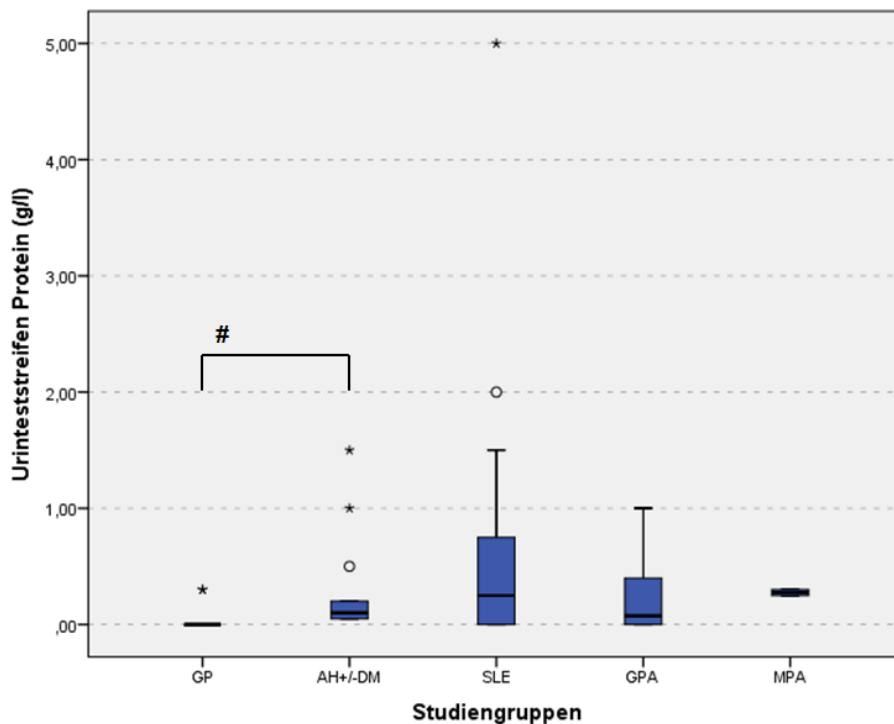


Abbildung 4.10 – Verteilung der Proteinurie im Urinteststreifen

Zwischen der Eiweißausscheidung im Urin der gesunden Probanden und der Gruppe der AH+/-DM bestand ein signifikanter Unterschied ($p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

(#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 14, SLE 22, GPA 20, MPA 4)

HbA1c

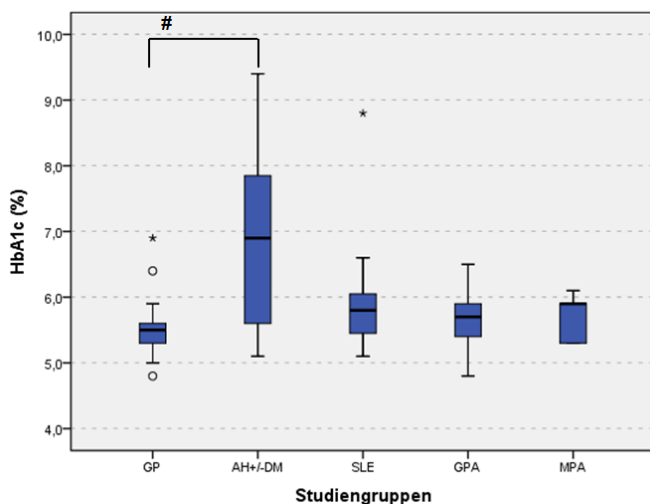


Abbildung 4.11 – Verteilung des HbA1c

Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,029$ im Kruskal-Wallis-Test) stellte sich zwischen der AH+/-DM-Gruppe und den gesunden Probanden dar ($p^* = 0,002$ im Mann-Whitney-U-Test).

(#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 19, GPA 18, MPA 5)

Im Vergleich der Gruppenmediane nach dem HbA1c waren der AH+/-DM-Gruppe mit 6,9 % bzw. 51,7 mmol/mol Hb im Median mit Abstand die höchsten Werte zuzuweisen. Die Mediane der anderen Studiengruppen lagen alle unter 6,0%. Die gesunden Probanden hatten mit 5,5% bzw. 36,7 mmol/mol Hb im Median die niedrigsten HbA1c-Werte. Eine Übersicht der statistischen Kennwerte für den HbA1c vermittelt Tabelle 12.9 des Anhangs. Ein signifikanter Gruppenunterschied (HbA1c (%) $p = 0,029$ bzw. HbA1c (mmol/mol Hb) $p = 0,032$ im KW-Test) wurde nur zwischen der GP- und der AH+/-DM-Gruppe (MWU-Test: HbA1c (%) $p^* = 0,002$ bzw. HbA1c (mmol/mol Hb) $p^* = 0,003$) festgestellt.

Autoantikörper und Krankheitsaktivität

Tabelle 4.3 fasst die statistischen Kennwerte der Autoantikörper c-ANCA/PR3-Ak (GPA), p-ANCA/MPO-Ak (MPA), ANA/dsDNA-Ak (SLE) und der Komplementfaktoren zusammen. Die Bestimmung der Komplementfaktoren erfolgte ausschließlich bei Patienten mit einem SLE, da in der Regel bei den AAVs kein Komplementverbrauch auftritt. Bei der quantitativen Bestimmung der dsDNA-Ak musste eine Differenzierung zwischen den Probanden der Universitätsmedizin Rostock (UNI) und dem Klinikum Südstadt Rostock (KSR) erfolgen, da unterschiedliche Messmethoden (Radioimmunassay bzw. ELISA) zur Anwendung kamen. Der Median der dsDNA-Ak der SLE-Patienten der UNI lag mit 5,6 U/ml im Normbereich. Der Median für die dsDNA-Ak der SLE-Patienten des KSR stellte sich mit 186 U/ml erhöht dar.

Die Krankheitsaktivität nach dem BVAS betrug bei den Patienten mit einer GPA im Median 7 Punkte, die der MPA-Gruppe 5 Punkte. Ein signifikanter Unterschied ergab sich im MWU-Test nicht ($p = 0,336$). Die höchste Einzelbestimmung der Aktivität der Grunderkrankung lag in der GPA-Gruppe mit 28 Punkten jedoch deutlich über der der MPA-Gruppe mit max. 8 Punkten im BVAS. Sowohl die PR3-Ak der GPA-Patienten als auch die MPO-Ak der MPA-Patienten waren mit 154 U/ml bzw. 200 U/ml im Median pathologisch erhöht.

Tabelle 4.3 – statistische Kennwerte der Autoantikörper und der Krankheitsaktivitätsindices

Parameter	Median (1. Quartil, 3. Quartil)	Minimum	Maximum	Normbereich
Granulomatose mit Polyangiitis (n = 20)				
c-ANCA (Titer)	1:100 (1:15,5 - 1:320)	1:5	1:3200	< 1:10
PR3-Ak (U/ml)	154 (45,75 - 719,08)	10	1383	< 20
BVAS_GPA (Punkte)	7 (3,25 - 19,5)	0	28	0
Mikroskopische Polyangiitis (n = 5)				
p-ANCA (Titer)	1:100 (1:21, 1:2100)	1:10	1:3200	< 1:10
MPO-Ak (U/ml)	200 (4,69 - 2208)	1	4216	< 20
BVAS_MPA (Punkte)	5 (2 - 7,5)	0	8	0
Systemischer Lupus erythematoses (n = 22)				
ANA (Titer)	1:2100 (1:640, 1:3200)	1:100	1:32000	< 1:100
dsDNA (U/ml) - UNI (n = 7)	5,6 (3,59 - 109)	0,22	7796	< 7
dsDNA (U/ml) - KSR (n = 15)	186 (50 - 540)	50	800	< 100
C3 (mg/l)	907 (834,5 - 1040,0)	450	1580	790 - 1520
C4 (mg/l)	123 (77,0 - 181,5)	23	305	100 - 400
SLEDAI-2K (Punkte)	6,5 (4 - 12,5)	0	33	0
ECLAM (Punkte)	3 (1 - 3)	1	9	0

Aufgrund unterschiedlicher Messmethoden der dsDNA-Ak musste eine Differenzierung der Patienten der Universitätsmedizin Rostock (UNI, Radioimmunassay) und dem Klinikum Südstadt Rostock (KSR, ELISA) erfolgen. In die Berechnung der Komplementfaktoren C3 und C4 gingen aufgrund fehlender Werte nur 21 von 22 Probanden der SLE-Gruppe ein.

Tabelle 12.34 des Anhangs fasst die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen BVAS-relevanten Vaskulitismanifestationen, getrennt nach den Entitäten der GPA und MPA, zusammen. Bei den Patienten mit einer MPA sind neben Allgemeinsymptomen nur renale Manifestationen und in einem Fall pulmonale Infiltrationen aufgetreten. Bei beiden Entitäten stellten Kriterien des renalen Manifestationskomplexes einen Hauptschwerpunkt dar (GPA 55% vs. MPA 80%). Im Falle der GPA-Gruppe spielte eine Beteiligung des HNO-Traktes noch eine entscheidende Rolle. 55% der Patienten mit einer GPA klagten über borkige Veränderungen der Nasenschleimhäute. Bei 40% traten auch Manifestationen des unteren Respirationstraktes auf (z.B. in jeweils 15% pulmonale Infiltrate, Pleuraergüsse/Pleuritis und pulmonale Knoten/Kavernen). Obwohl im Gegensatz zur MPA- bei der GPA-Grup-

pe mehr Organsysteme von der Grundkrankheit betroffen waren, bestand lediglich in Bezug auf den HNO-Bereich ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen ($p = 0,046$), der durch das häufige Auftreten von Borken bei den Patienten mit einer GPA bedingt war. In der MPA-Gruppe lag mit 100% vs. 50% gegenüber der GPA-Gruppe ein deutlich höherer Anteil an stabiler bzw. persistierender Krankheitsaktivität vor. Ein signifikanter Gruppenunterschied bestand im Exakter Test nach Fisher für den Krankheitsverlauf stabil vs. progredient dennoch nicht ($p = 0,061$).

4.2 Studienparameter (cf-DNA/NETs und sCD163)

Die GPA-Patienten hatten mit 235,85 ng/ml den höchsten Gruppenmedian für die cf-DNA/NETs_{hPI}, gefolgt von der SLE-Gruppe mit 214 ng/ml im Median. Der höchste Einzelwert (480,6 ng/ml) wurde ebenfalls bei einem Probanden der GPA-Gruppe bestimmt. Die Kontrollgruppen AH+/-DM und GP hatten mit 91,7 ng/ml bzw. 105,6 ng/ml die niedrigsten cf-DNA/NETs_{hPI} - Plasmakonzentrationen im Median. Der AH+/-DM-Gruppe war auch der Proband mit der niedrigsten Einzelbestimmung für die cf-DNA/NETs_{hPI} mit 21,8 ng/ml zugehörig. Signifikante Unterschiede ($p < 0,001$ im KW-Test) bestanden jeweils zwischen den Autoimmunerkrankungen GPA bzw. SLE und den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM). Die MPA-Gruppe rangierte mit einem Median von 142,7 ng/ml für die cf-DNA/NETs_{hPI} im mittleren Bereich. Ein signifikanter Unterschied zu einer der anderen Studiengruppen lag nicht vor.

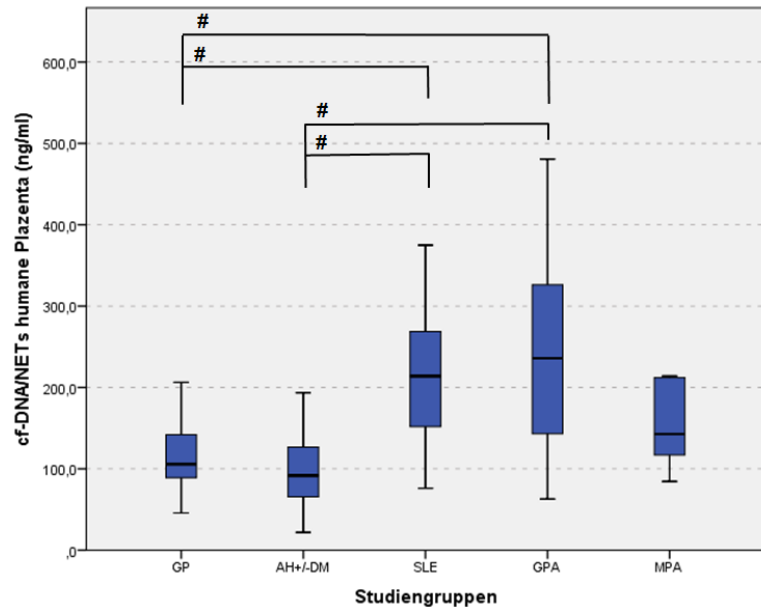


Abbildung 4.12 – Verteilung der cf-DNA/NETs humane Plazenta

Die Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs_{hPI} der gesunden Probanden waren signifikant niedriger als die der GPA- und SLE-Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). Dasselbe stellte sich auch für die AH+/-DM-Patienten gegenüber der GPA- und SLE-Gruppe dar (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). (#: signifikanter Unterschied; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

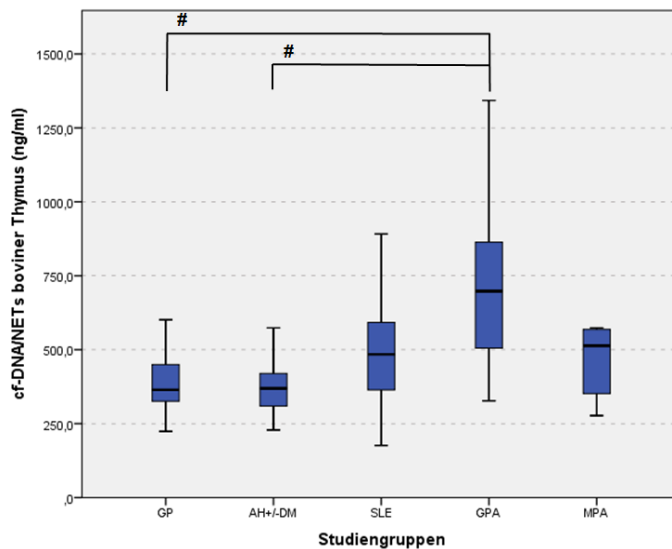


Abbildung 4.13 – Verteilung der cf-DNA/NETs boviner Thymus

Die cf-DNA/NETs_{bTh}-Plasmakonzentrationen der GPA-Gruppe waren gegenüber den gesunden Probanden und der AH+/-DM-Gruppe signifikant erhöht (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). (#: signifikanter Unterschied; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

In Analogie zur cf-DNA/NETs_{hPI} war der höchste Gruppenmedian der cf-DNA/NETs_{bTh}-Plasmakonzentration mit 697,95 ng/ml ebenfalls der GPA-Gruppe zuzuordnen. In dieser Studiengruppe wurde auch der höchste Einzelwert mit 1342,7 ng/ml bestimmt. Die nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen stellten mit 364,5 ng/ml (GP) und 369,1 ng/ml (AH+/-DM) ebenfalls die niedrigsten Gruppenmediane. Die niedrigste Einzelbestimmung der cf-DNA/NETs_{bTh} stammte aber mit 176,4 ng/ml von einem SLE-Patienten. Im Gegensatz zur cf-DNA/NETs_{hPI} nimmt bei der cf-DNA/NETs_{bTh}-Bestimmung die SLE-Gruppe mit einem Gruppenmedian von 484,4 ng/ml hinter der MPA-

Gruppe mit 513,3 ng/ml im Median nur den dritten Rang ein. Ein signifikanter Gruppenunterschied ($p < 0,001$ im KW-Test) stellte sich für die cf-DNA/NETs_bTh lediglich zwischen der GPA-Gruppe und den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) dar. Ein signifikanter Unterschied der anderen beiden autoimmunologischen Studiengruppen (SLE, MPA) untereinander, zu der GP- bzw. AH+/-DM-Gruppe oder den GPA-Patienten bestand nicht. Einen Überblick über die statistischen Kennzahlen der cf-DNA/NETs_hPI und der cf-DNA/NETs_bTh vermittelt Tabelle 12.8 des Anhangs.

Die höchsten Gruppenmediane des sCD163 hatten die SLE- (2,153 ng/ml) und die GPA-Gruppe (2,127 ng/ml). Der GPA-Gruppe gehörte aber auch der Proband mit der niedrigsten Einzelbestimmung (0,446 ng/ml) an. Der mit Abstand niedrigste Gruppenmedian (1,164 ng/ml) war den gesunden Probanden zuzuordnen. Die Gruppenmediane der AH+/-DM- (1,617 ng/ml) und MPA-Gruppe (1,601 ng/ml) lagen im mittleren Bereich auf einem vergleichbaren Niveau. Bei einem MPA-Patienten wurde der höchste Einzelwert für den sCD163 mit 4,697 ng/ml bestimmt. Ein signifikanter Gruppenunterschied ($p = 0,003$ im KW-Test) stellte sich nicht nur zwischen der GP- und SLE-Gruppe, sondern auch zwischen den gesunden Probanden und der AH+/-DM-Gruppe dar. Signifikante Gruppenunterschiede der sCD163-Plasmakonzentrationen der AAVs untereinander oder gegenüber den Kontrollgruppen bestanden nicht. Die statistischen Kennzahlen zum sCD163 sind in Tabelle 12.8 des Anhangs zusammengefasst.

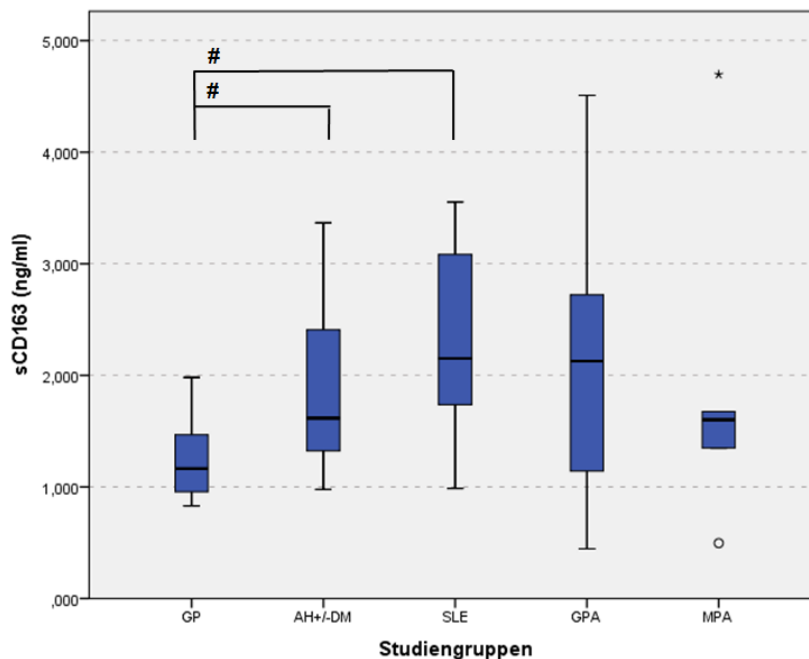


Abbildung 4.14 – Verteilung des sCD163

Die gesunden Probanden hatten signifikant niedrigere sCD163-Plasmakonzentrationen als die SLE- ($p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test) und die AH+/-DM-Gruppen ($p^* = 0,004$ im Mann-Whitney-U-Test). (#: signifikanter Unterschied; o: Ausreißer; *: Extremwert; Anzahl (n): GP 17, AH+/-DM 15, SLE 22, GPA 20, MPA 5)

4.3 Korrelationsanalysen

Im Rahmen der Korrelationsanalysen wurden Zusammenhänge zwischen den Studienparametern (cf-DNA/-NETs_hPI, cf-DNA/-NETs_bTh, sCD163) und den erhobenen quantitativen bzw. ordinalskalierten qualitativen Merkmalen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses untersucht. Einen Überblick über die Höhe der Korrelationen und deren Signifikanz vermitteln Tabelle 4.4 für die Probanden mit einer GPA bzw. die Tabellen 12.27 bis 12.33 des Anhangs für die Probanden der anderen Studiengruppen.

Tabelle 4.4 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einer Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)

Parameter - GPA	Anzahl	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
cf-DNA_hPI (ng/ml)	20	1,000 (-)	0,976 (<0,001)	0,708 (<0,001)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	20	0,976 (<0,001)	1,000 (-)	0,696 (0,001)
sCD163 (ng/ml)	20	0,708 (<0,001)	0,696 (0,001)	1,000 (-)
Alter (Jahre)	20	0,137 (0,564)	0,184 (0,438)	0,089 (0,709)
Körpergröße (cm)	20	-0,264 (0,260)	-0,319 (0,170)	-0,151 (0,526)
Körpergewicht (kg)	20	-0,365 (0,113)	-0,373 (0,105)	-0,090 (0,707)
BMI (kg/m ²)	20	-0,153 (0,519)	-0,092 (0,701)	0,101 (0,673)
RR-Systole (mmHg)	20	0,239 (0,310)	0,244 (0,300)	0,023 (0,922)
RR-Diastole (mmHg)	20	-0,064 (0,789)	-0,051 (0,830)	0,046 (0,847)
RR-Mitteldruck (mmHg)	20	0,021 (0,930)	0,047 (0,845)	-0,036 (0,880)
Erythrozyten (10E12/l)	20	-0,495 (0,027)	-0,543 (0,013)	-0,529 (0,016)
Hb (mmol/l)	20	-0,565 (0,009)	-0,592 (0,006)	-0,482 (0,031)
Hk (l/l)	20	-0,522 (0,018)	-0,548 (0,012)	-0,478 (0,033)
Thrombozyten (10E9/l)	20	0,564 (<0,010)	0,593 (0,006)	0,214 (0,366)
Leukozyten (10E9/l)	20	0,395 (0,084)	0,385 (0,094)	0,205 (0,387)
Neutrophile (%)	20	0,465 (0,039)	0,510 (0,022)	0,215 (0,363)
Neutrophile absolut (10E9/l)	20	0,386 (0,092)	0,408 (0,075)	0,176 (0,458)
Lymphozyten (%)	20	-0,501 (0,024)	-0,537 (0,015)	-0,317 (0,173)
Lymphozyten absolut (10E9/l)	20	-0,188 (0,427)	-0,221 (0,349)	-0,254 (0,280)
Monozyten (%)	20	-0,327 (0,159)	-0,369 (0,109)	0,031 (0,897)
Monozyten absolut (10E9/l)	20	0,176 (0,458)	0,131 (0,582)	0,265 (0,259)
Eosinophile (%)	20	-0,026 (0,912)	-0,015 (0,950)	0,006 (0,980)
Basophile (%)	20	-0,333 (0,152)	-0,323 (0,165)	-0,211 (0,373)
CRP (mg/l)	20	0,717 (<0,001)	0,673 (0,001)	0,706 (0,001)
Creatinin (µmol/l)	20	0,546 (0,013)	0,591 (0,006)	0,623 (0,003)
Harnstoff (mmol/l)	18	0,554 (0,017)	0,538 (0,021)	0,449 (0,062)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m ²)	20	-0,553 (0,011)	-0,611 (0,004)	-0,598 (0,005)
Urinteststreifen Leukozyten (1/µl)	14	0,491 (0,074)	0,457 (0,100)	0,738 (0,003)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/µl)	14	0,684 (0,007)	0,719 (0,004)	0,876 (<0,001)
Urinteststreifen Protein (g/l)	20	0,654 (0,002)	0,715 (<0,001)	0,750 (<0,001)
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	16	0,179 (0,508)	0,183 (0,497)	0,128 (0,636)
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	17	0,607 (<0,010)	0,599 (0,011)	0,643 (0,005)
25-OH-Vitamin D (nmol/l)	18	0,075 (0,766)	0,049 (0,848)	0,256 (0,305)
PTH (pg/ml)	17	0,159 (0,541)	0,159 (0,541)	0,179 (0,492)
HbA1c (%)	18	0,125 (0,622)	0,078 (0,758)	0,059 (0,815)
HbA1c (mmol/mol Hb)	18	0,131 (0,604)	0,080 (0,754)	0,067 (0,791)
c-ANCA (Titer)	20	0,684 (0,001)	0,675 (0,001)	0,718 (<0,001)
PR3-Ak (U/ml)	20	0,630 (0,003)	0,654 (0,002)	0,681 (0,001)
BVAS (Punkte)	20	0,830 (<0,001)	0,826 (<0,001)	0,765 (<0,001)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

Tabelle 4.5 – Korrelationen der Autoantikörper der GPA-Patienten mit der Krankheitsaktivität im BVAS

Parameter – GPA	Anzahl	c-ANCA (Titer)	PR3-Ak (U/ml)
BVAS (Punkte)	20	0,802 (<0,001)	0,840 (<0,001)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

Zwischen den beiden Studienparametern cf-DNA/NETs_hPI und cf-DNA/NETs_bTh konnte in allen Gruppen ein signifikanter Zusammenhang mit einer hohen (AH+/-DM $r_s = 0,825$) bzw. sehr hohen gleichsinnigen Korrelation (GPA $r_s = 0,976$, MPA $r_s = 1,000$, SLE $r_s = 0,990$, GP $r_s = 1,000$) berechnet werden. Eine ähnliche Beziehung fand sich zwischen den cf-DNA/NETs und dem sCD163 lediglich für die Patienten mit einer GPA (hohe Korrelation ($r_s = 0,708$) zwischen sCD163 und cf-DNA/NETs_hPI bzw. mittlere Korrelation ($r_s = 0,696$) zwischen sCD163 und cf-DNA/NETs_bTh). Bei den anderen Studiengruppen konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen den cf-DNA/NETs und dem sCD163 gesehen werden.

Für das Lebensalter trat nur im Falle der AH+/-DM-Gruppe, die mit 73 Jahren den höchsten Altersmedian besaß, eine signifikante mittlere positive Korrelation ($r_s = 0,608$) mit der cf-DNA/NETs_bTh auf. Ansonsten zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Alter und den Studienparametern.

In der kleinen Gruppe der MPA stellten sich signifikant hohe Korrelationen (jeweils $r_s = 0,900$) zwischen den drei Studienparametern und dem BMI dar. Das galt im Falle des sCD163 auch für das Merkmal Körpergewicht ($r_s = 0,900$). Weitere signifikante Korrelationen bestanden für die die Körpermaße beschreibenden Parameter (Größe, Gewicht, BMI) nicht.

Hinsichtlich der Blutdruckwerte traten nur vereinzelte signifikante Korrelationen auf. Die sCD163-Plasmakonzentrationen der gesunden Probanden zeigten eine negative Korrelation mit den Blutdruckwerten (RR-Systole $r_s = -0,487$, RR-Diastole $r_s = -0,512$, RR-Mitteldruck $r_s = -0,557$). In der AH+/-DM-Gruppe stellten sich signifikante mittlere negative Korrelationen der cf-DNA/NETs_hPI mit der Höhe der systolischen ($r_s = -0,641$) und mittelarteriellen ($r_s = -0,686$) Blutdrücke dar. Im Gegensatz dazu waren diese beim SLE auf geringem Niveau gleichgerichtet (RR-Systole $r_s = 0,442$, RR-Mitteldruck $r_s = 0,465$). Bei den AAVs stellte sich für keinen der Studienparameter ein signifikanter Zusammenhang mit der Höhe der Blutdruckwerte dar.

Bei den Patienten mit einer GPA konnten signifikante negative Korrelationen auf geringem bzw. mittlerem Niveau zwischen den Studienparametern und den Parametern des roten Blutbildes (Anzahl der Erythrozyten, Hb und Hk) gesehen werden. Probanden mit einer Anämie hatten tendenziell höhere plasmatische cf-DNA/NETs- und sCD163-Konzentrationen. Weiterhin bestand eine mittlere positive Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs und der Anzahl der Thrombozyten (r_s - und p -Werte siehe Tabelle 4.4)

Für die GPA-Gruppe konnte für den relativen Anteil der Neutrophilen, nicht aber für deren absolute Zahl, ein positiver Zusammenhang mit den cf-DNA/NETs auf geringem (cf-DNA_hPI $r_s = 0,465$) bzw. mittlerem Niveau (cf-DNA_bTh $r_s = 0,510$) beschrieben werden. Ein höherer Anteil neutrophiler Granulozyten korrelierte mit höheren Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs. Der relative Lymphozytenanteil zeigte dagegen negative Korrelationen zu den Konzentrationen der cf-DNA/NETs der GPA (cf-DNA_hPI: $r_s = -0,501$, cf-DNA_bTh $r_s = -0,537$) und des SLE (cf-DNA_hPI $r_s = -0,451$, cf-DNA_bTh $r_s = -0,479$). Beim SLE bestand auch zwischen der absoluten Anzahl der Lymphozyten und der cf-DNA/NETs_hPI ($r_s = -0,463$) bzw. dem sCD163 ($r_s = -0,589$) eine negative Korrelation. Für die Patienten mit einer MPA konnte lediglich zwischen dem sCD163 und der Gesamtleukozytenzahl ein signifikanter Zusammenhang ($r_s = 0,900$) gesehen werden. Signifikante Korrelationen zwischen den Studienparametern und den Parametern des Differentialblutbildes wurden in den AH+/-DM- und

GP-Gruppen nicht gefunden. Die CRP-Werte der GPA-Patienten korrelierten mit den Studienparametern auf einem mittleren bzw. hohen Niveau (r_s - und p-Werte siehe Tabelle 4.4). Die CRP-Werte der anderen Studiengruppen zeigten zum Teil zwar hohe Korrelationen mit den Studienparametern, jedoch ohne ein ausreichendes Signifikanzniveau.

In der GPA-Gruppe wurden mehrere interessante Korrelationen zwischen den Parametern zur Charakterisierung der Nierenfunktion und den Studienparametern gefunden. Höhere Werte für das Serumcreatinin korrelierten mit höheren Plasmakonzentrationen der Studienparameter. Ein inverser Zusammenhang bestand mit der eGFR nach der MDRD-Methode. Des Weiteren korrelierte der Serumharnstoff mit den plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen (r_s - und p-Werte siehe Tabelle 4.4). In den anderen Studiengruppen wurden für die Retentionsparameter und für die eGFR (MDRD) keine signifikanten Zusammenhänge mit den Studienparametern gesehen (siehe Tabellen 12.27 bis 12.32 des Anhangs).

Eine ähnliche Situation stellte sich bei der Urindiagnostik dar. Für die Patienten der Kontrollgruppen (SLE, GP, AH+/-DM) waren keine signifikanten Korrelationen nachweisbar. In der GPA-Gruppe konnten positive Korrelationen zwischen den Studienparametern und dem Schweregrad einer Erythrozyturie sowohl im Sediment als auch im Teststreifen nachgewiesen werden. Signifikante gleichsinnige Zusammenhänge stellten sich auch zwischen dem Ausmaß der Proteinurie und den Studienparametern dar (r_s - und p-Werte siehe Tabelle 4.4). Für die Patienten mit einer MPA wurde für alle drei Studienparameter zum einen eine negative Korrelation mit den Leukozyten und zum anderen ein positiver Zusammenhang mit den Erythrozyten im Urinteststreifen gesehen (r_s - und p-Werte siehe Tabelle 12.32 im Anhang). Allerdings sind diese Aussagen aufgrund der geringen Stichprobenanzahl von nur zwei Urinteststreifenuntersuchungen in der MPA-Gruppe nicht verwertbar.

In Zusammenschau der Korrelationsberechnungen zwischen den Studienparametern und dem Vitamin D - Haushalt (25-OH-Vitamin D und PTH) bzw. dem HbA1c konnte in keiner Studiengruppe ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Für den HbA1c (%) und der cf-DNA/NETs_hPI bestand in der AH+/-DM-Gruppe eine mittlere negative Korrelation ($r_s = -0,514$), die jedoch mit $p = 0,05$ das geforderte Signifikanzniveau ($p < 0,05$) marginal verfehlte.

Die Autoantikörper (c-ANCA, PR3-Ak) der Patienten mit einer GPA zeigten eine positive Korrelation mit den Studienparametern. Hohe Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs bzw. des sCD163 gingen mit hohen Antikörpertitern einher. Im Falle der MPA-Gruppe stellte sich eine signifikante Korrelation zu den Autoantikörpern (p-ANCA, MPO-Ak) nur für den sCD163 dar. Bei beiden Entitäten der AAV war für alle Studienparameter ein gleichsinniger Zusammenhang auf einem hohen Korrelationsniveau mit der Krankheitsaktivität im BVAS nachweisbar. In vergleichbarer Weise konnten diese Korrelationen auch zwischen den Autoantikörpern (c- bzw. p-ANCA, PR3- bzw. MPO-Ak) und dem BVAS beschrieben werden. Einen Überblick über die entsprechenden Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) und den Irrtumswahrscheinlichkeiten (p) geben die Tabellen 4.4 und 4.5 sowie die Tabellen 12.32 und 12.33 des Anhangs.

Für die Patienten mit einem SLE bestand kein signifikanter Zusammenhang der Studienparameter, weder mit den Autoantikörpern (ANA, anti-dsDNA-Ak), den Komplementfaktoren noch der Krankheitsaktivität im SLEDAI-2K bzw. ECLAM (siehe Tabelle 12.29 im Anhang). Im Gegensatz dazu korrelierten die ANA-Titer mit dem SLEDAI-2K- bzw. ECLAM-Scoring. Die anti-dsDNA-Ak der Patienten aus dem Klinikum Südstadt Rostock zeigten des Weiteren eine hohe Korrelation mit der Aktivität des SLE im SLEDAI-2K (siehe Tabelle 12.30 im Anhang).

4.4 Studienparameter in Abhängigkeit der Nierenfunktion

Der Einfluss einer Nierenfunktionseinschränkung auf die Höhe der Studienparameter sollte analysiert werden. Dazu wurden die Probanden entsprechend der zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses vorliegenden eGFR, berechnet nach der MDRD-Formel, die seinerzeit in der täglichen Praxis am gebräuchlichsten zum Einsatz kam, in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe (SP_eGFR \geq 60) bildeten die Patienten mit keiner bzw. nur einer leichten Einschränkung der Clearance von mindestens 60 ml/min/1,73 m². In der anderen Gruppe (SP_eGFR < 60) befanden sich die Probanden mit einer höhergradigen Einschränkung der Clearance von < 60 ml/min/1,73 m². Einen Überblick über die Aufteilung der gesamten Studienpopulation in die Gruppen SP_eGFR \geq 60 und SP_eGFR < 60 vermittelt Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6 – Einteilung der Studienpopulation nach der eGFR ermittelt mit der MDRD-Formel

SG	SP_eGFR \geq 60	SP_eGFR < 60
GP	17	-
AH+/-DM	4	11
SLE	19	3
GPA	7	13
MPA	-	5
Gesamt	47	32

SG: Studiengruppen; SP_eGFR \geq 60: Probanden der gesamten Studienpopulation mit einer eGFR berechnet nach der MDRD-Formel von \geq 60 ml/min/1,73 m²; SP_eGFR < 60: Probanden der gesamten Studienpopulation mit einer eGFR berechnet nach der MDRD-Formel von < 60 ml/min/1,73 m²;

Die gesunden Probanden hatten alle eine eGFR von mindestens 60 ml/min/1,73 m² und wurden somit durchweg der SP_eGFR \geq 60 - Gruppe zugeordnet. Patienten unter einer Dialysetherapie wurden unabhängig von der ermittelten eGFR in die Gruppe SP_eGFR < 60 eingeteilt. Die fünf Patienten mit einer MPA hatten alle eine chronische Niereninsuffizienz, mindestens im Stadium 3 nach KDOQI, zweimal lag sogar eine dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz (Stadium 5 nach KDOQI) vor (siehe auch Tabelle 12.15 des Anhangs). Alle Patienten mit einer MPA waren der SP_eGFR < 60 - Gruppe zugehörig. Die Untersuchung eines möglichen Einflusses einer Niereneinschränkung auf die Höhe der Studienparameter wurde zum einen für das gesamte Studienkollektiv und zum anderen für die Studiengruppen GPA und AH+/-DM durchgeführt. Für die SLE-Gruppe, deren Patienten bis auf drei Ausnahmen alle der SP_eGFR \geq 60 - Gruppe angehörten, wurde der Vergleich wegen des sehr niedrigen Stichprobenumfangs von nur drei Probanden in der SP_eGFR < 60 - Gruppe (weniger als 20% der gesamten SLE-Gruppe) nicht durchgeführt.

4.4.1 Gesamtes Studienkollektiv

Tabelle 4.7 – Subanalyse Nierenfunktion: Retentionsparameter, eGFR und Studienparameter nach Einteilung der Studienpopulation entsprechend der berechneten glomerulären Filtrationsrate (eGFR)

Parameter	SP_eGFR \geq 60	Min	Max	SP_eGFR < 60	Min	Max	p (MWU)
Creatinin (μ mol/l)	77,0 (68,4 - 86,0)	47	124	172,5 (137,0 - 260,75)	89	1010	< 0,001
eGFR (ml/min/1,73 m ²)	78,6 (70,8 - 96,6)	60,0	141,6	28,2 (18,0 - 46,05)	4,2	58,8	< 0,001
Harnstoff (mmol/l)	5,3 (3,6 - 6,25)	1,86	9,5	12,4 (8,75 - 20,9)	5,0	29,1	< 0,001
cf-DNA_hPI (ng/ml)	142,0 (103,2 - 218,5)	45,8	374,9	157,3 (89,9 - 244,0)	21,8	480,6	0,491
cf-DNA_bTh (ng/ml)	421,7 (336,8 - 525,6)	176,4	891,5	516,2 (355,7 - 690,3)	228,5	1342,7	0,054
sCD163 (ng/ml)	1,529 (1,059 - 2,341)	0,616	3,553	1,913 (1,393 - 2,816)	0,446	4,697	0,064

Bei der statistischen Auswertung des Serumharnstoffs gingen die Werte von 31 der 32 Probanden der SP_eGFR < 60 - Gruppe sowie von 43 der 47 Probanden der SP_eGFR \geq 60 - Gruppe ein. Von den restlichen 5 Probanden lagen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses keine aktuellen Harnstoffwerte vor.

(SP_eGFR \geq 60: Probanden der gesamten Studienpopulation mit keiner bzw. nur leichten Einschränkung der eGFR von mindestens 60 ml/min/1,73 m² nach der MDRD-Formel; SP_eGFR < 60: Probanden der gesamten Studienpopulation mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR von < 60 ml/min/1,73 m² nach der MDRD-Formel; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test)

Die Mediane der beiden Gruppen für das Creatinin, der eGFR nach der MDRD-Formel und dem Harnstoff differierten deutlich und unterschieden sich hochsignifikant voneinander. Die Mediane für die cf-DNA/NETs_hPI lagen auf einem ähnlichen Niveau. Im Falle der cf-DNA/NETs_bTh war die Plasmakonzentration mit 516,2 ng/ml im Median in der SP_eGFR < 60 - Gruppe höher als in der SP_eGFR ≥ 60 - Gruppe mit 421,7 ng/ml. Ein signifikanter Unterschied bestand dennoch nicht. Auch beim sCD163 hatten die Patienten mit einer höhergradigeren Einschränkung der eGFR im Median eine höhere Plasmakonzentration vorzuweisen, jedoch ebenfalls ohne Nachweis eines signifikanten Unterschieds im MWU-Test. Einen Überblick über die statistischen Kennwerte vermittelt Tabelle 4.7.

4.4.2 Granulomatose mit Polyangiitis und Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus Typ 2

Tabelle 4.8 – Subanalyse Nierenfunktion: Retentionsparameter, eGFR und Studienparameter nach Einteilung der Patienten mit einer GPA entsprechend der berechneten glomerulären Filtrationsrate (eGFR)

Parameter	GPA_eGFR ≥ 60	Min	Max	GPA_eGFR < 60	Min	Max	p (MWU)
Creatinin (µmol/l)	84,0 (67,1 - 98,0)	47,0	124,0	232,0 (143,5 - 265,5)	89,0	513,0	< 0,001
eGFR (ml/min/1,73 m²)	82,2 (65,4 - 96,6)	62,4	120,6	19,2 (17,1 - 46,8)	10,8	58,8	< 0,001
Harnstoff (mmol/l)	6,2 (5,36 - 8,15)	4,99	9,20	15,8 (7,82 - 21,3)	5,0	24,2	0,026
cf-DNA_hPI (ng/ml)	184,0 (94,9 - 239,1)	63,0	308,3	244,4 (174,05 - 385,95)	76,6	480,6	0,081
cf-DNA_bTh (ng/ml)	500,8 (392,8 - 731,8)	327,3	735,2	761,0 (531,9 - 1001,5)	340,6	1342,7	0,046
sCD163 (ng/ml)	1,282 (0,695 - 1,911)	0,616	2,477	2,426 (1,733 - 3,607)	0,446	4,509	0,030

Bei der statistischen Auswertung des Serumharnstoffs gingen die Werte von allen Probanden der GPA_eGFR < 60 - Gruppe, jedoch von nur 5 der 7 Probanden der GPA_eGFR ≥ 60 - Gruppe ein. Von den restlichen 2 Probanden der GPA_eGFR ≥ 60 - Gruppe lagen zum Studieneinschluss keine aktuellen Harnstoffwerte vor.

(GPA_eGFR ≥ 60: Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten mit keiner bzw. nur leichten Einschränkung der eGFR von mindestens 60 ml/min/1,73 m² nach der MDRD-Formel; GPA_eGFR < 60: Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR von < 60 ml/min/1,73 m² nach der MDRD-Formel; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test)

Bei den Patienten mit einer GPA wurden 7 Probanden der GPA_eGFR ≥ 60 - Gruppe und 13 Probanden der GPA_eGFR < 60 - Gruppe zugeordnet. Das Serumcreatinin und die eGFR nach der MDRD-Formel unterschieden sich hochsignifikant voneinander. Die Serumharnstoffwerte differierten ebenfalls signifikant. Der jeweils höhere Gruppenmedian des jeweiligen Studienparameters war der GPA_eGFR < 60 - Gruppe zugehörig, so dass die Gruppe mit den höheren Retentionsparametern und der schlechteren eGFR höhere cf-DNA/NETs- und sCD163-Werte besaß. Signifikante Gruppenunterschiede bestanden aber nur für die cf-DNA/NETs_bTh und dem sCD163, nicht im Falle der cf-DNA/NETs_hPI. Einen Überblick über die statistischen Kennwerte vermittelt Tabelle 4.8.

In der weiteren Betrachtung vermeintlicher Unterschiede zwischen den beiden Gruppen als mögliche Ursache für die unterschiedliche Höhe der Studienparameter erfolgte die Evaluation des Krankheitsverlaufes und der Krankheitsaktivität im BVAS. In der GPA_eGFR ≥ 60 - Gruppe befanden sich 4 Patienten (57,1%) mit einer Progredienz der Grundkrankheit und 3 Patienten (42,9%) mit einem stabilen Verlauf der GPA. Der GPA_eGFR < 60 - Gruppe waren 6 Patienten (46,2%) mit einem progredienten und 7 Patienten (53,8%) mit einem stabilen Verlauf der GPA zugehörig. Ein signifikanter Unterschied bestand im Exakter Test nach Fisher nicht (p = 1,000). Für die Krankheitsaktivität im BVAS ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (p = 0,275 im Mann-Whitney-U-Test). Die Krankheitsaktivität in der GPA_eGFR < 60 - Gruppe betrug 9 Punkte im Median (1. Quartil 4,5 Punkte, 3. Quartil 24 Punkte) und lag etwas höher als in der GPA_eGFR ≥ 60 - Gruppe mit 5 Punkten im Median (1. Quartil 0 Punkte, 3. Quartil 13 Punkte). Auch die höchsten und niedrigsten Absolutwerte

der Krankheitsaktivität nach dem BVAS unterschieden sich in beiden Gruppen nicht deutlich (GPA_eGFR \geq 60: Minimum 0 Punkte, Maximum 20 Punkte; GPA_eGFR $<$ 60: Minimum 0 Punkte, Maximum 28 Punkte).

Tabelle 4.9 – Subanalyse Nierenfunktion: Retentionsparameter, eGFR und Studienparameter nach Einteilung der AH+/-DM-Gruppe entsprechend der berechneten glomerulären Filtrationsrate (eGFR)

Parameter	AH+/-DM_eGFR \geq 60	Min	Max	AH+/-DM_eGFR $<$ 60	Min	Max	p (MWU)
Creatinin ($\mu\text{mol/l}$)	83,15 (63,95 - 91,25)	58,4	93,1	162,0 (124,0 - 196,0)	117,0	575,0	0,001
eGFR (ml/min/1,73 m^2)	68,7 (61,95 - 91,65)	61,2	97,8	31,2 (25,2 - 50,4)	9,0	57,6	0,001
Harnstoff (mmol/l)	4,79 (3,72 - 6,02)	3,54	6,25	10,7 (8,84 - 22,4)	8,73	29,1	0,001
cf-DNA_hPI (ng/ml)	113,05 (75,28 - 173,78)	63,1	193,6	89,3 (61,7 - 139,2)	21,8	171,3	0,343
cf-DNA_bTh (ng/ml)	316,9 (256,3 - 520,75)	253,5	571,3	384,3 (320,7 - 425,1)	228,5	573,9	0,571
sCD163 (ng/ml)	1,861 (1,03 - 3,035)	0,977	3,202	1,617 (1,363 - 2,283)	1,189	3,367	0,753

AH+/-DM_eGFR \geq 60: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus - Patienten mit keiner bzw. nur leichten Einschränkung der eGFR von mindestens 60 ml/min/1,73 m² nach der MDRD-Formel; **AH+/-DM_eGFR $<$ 60:** Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus-Patienten mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR von $<$ 60 ml/min/1,73 m² nach der MDRD-Formel; **Min:** Minimum; **Max:** Maximum; **p (MWU):** Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test

Die Werte für das Serumcreatinin, den -harnstoff sowie der eGFR nach der MDRD-Formel unterschieden sich zwischen der AH+/-DM_eGFR \geq 60 - und der AH+/-DM_eGFR $<$ 60 - Gruppe signifikant voneinander. Die Gruppenmediane für die cf-DNA/NETs_hPI und des sCD163 der Patienten mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR lagen unter denen der AH+/-DM_eGFR \geq 60 - Gruppe, d.h. trotz höherer Retentionsparameter und einer schlechteren eGFR hatte die AH+/-DM_eGFR $<$ 60 - Gruppe niedrigere Werte dieser Studienparameter im Median. Im Falle der cf-DNA/NETs_bTh hatte die AH+/-DM_eGFR \geq 60 - Gruppe die niedrigeren Werte im Median. Auch bei der Betrachtung der Maximal- und Minimalwerte der einzelnen Studienparameter differierten diese zwischen den beiden Gruppen nicht sehr stark. Letztendlich konnte für die Studienparameter kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der eGFR in der AH+/-DM-Gruppe gesehen werden. Einschränkend muss man die Stichprobenanzahl von 4 Probanden (26,67% der AH+/-DM-Gruppe) für die AH+/-DM_eGFR \geq 60- gegenüber 11 Probanden (73,33% der AH+/-DM-Gruppe) in der AH+/-DM_eGFR $<$ 60 - Gruppe nennen.

Interessant ist der Vergleich der AH+/-DM_eGFR $<$ 60- und der GPA_eGFR $<$ 60 - Gruppe, die mit 11 bzw. 13 Probanden in etwa gleich große Stichprobenumfänge darstellten. Signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen mit einer höhergradigen Einschränkung der eGFR bestanden für die Retentionsparameter (Creatinin p = 0,277; HST p = 0,424) und der eGFR nach der MDRD-Formel (p = 0,303) nicht. Dagegen konnte für die cf-DNA/NETs (jeweils p $<$ 0,001), nicht aber für den sCD163 (p = 0,093) ein signifikanter Unterschied berechnet werden.

Für die Gruppen mit keiner bzw. einer nur leichten Einschränkung der eGFR (GPA_eGFR \geq 60 und AH+/-DM_eGFR \geq 60) konnte weder für die Nieren- (Creatinin: p = 0,927; HST: p = 0,190; eGFR (MDRD): p = 0,527) noch die Studienparameter (cf-DNA/NETs_hPI: p = 0,412; cf-DNA/NETs_bTh: p = 0,109; sCD163 p = 0,315) ein signifikanter Unterschied gesehen werden.

4.5 Vergleich hohe und niedrige Krankheitsaktivität im BVAS

Ein Vergleich innerhalb der Gruppe der GPA zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses sollte den Zusammenhang zwischen der Höhe der Studienparameter und der Höhe der Krankheitsaktivität, ermittelt nach dem BVAS, untersuchen. Es wurden zwei Gruppen gebildet. Der Gruppe mit der niedrigen Krankheitsaktivität ($BVAS \leq 5$) wurden die Patienten mit einer GPA zugeordnet, deren Krankheitsaktivität im BVAS max. fünf Punkte betrug. GPA-Patienten mit einer Krankheitsaktivität von mindestens sechs Punkten im BVAS wurden in die Gruppe mit erhöhter Krankheitsaktivität ($BVAS \geq 6$) einsortiert. Die Anzahl der Patienten in beiden Gruppen betrug jeweils 10. Die Gruppe mit der höheren Krankheitsaktivität bestand je zur Hälfte aus Frauen und Männern. In der $BVAS \leq 5$ - Gruppe überwog mit 70% zu 30% das weibliche Geschlecht. Ein signifikanter Gruppenunterschied bezogen auf das Geschlecht lag allerdings nicht vor ($p = 0,650$). Die $BVAS \leq 5$ - Gruppe war mit 65 Jahren im Median (1. Quartil 56,25 Jahre, 3. Quartil 69,25 Jahre) älter als die $BVAS \geq 6$ - Gruppe mit 59 Jahren im Median (1. Quartil 51,75 Jahre, 3. Quartil 67,5 Jahre). Ein signifikanter Altersunterschied lag aber nicht vor ($p = 0,315$). Hinsichtlich der Komorbiditäten, die die Tabelle 12.36 des Anhangs gegenüberstellt, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Eine Nierenbeteiligung der Grundkrankheit in Form einer Glomerulonephritis trat bei allen Patienten der $BVAS \geq 6$ - Gruppe und in 80% der Fälle der $BVAS \leq 5$ - Gruppe auf. Bei einem weiteren Patienten (10%) der $BVAS \leq 5$ - Gruppe war eine Glomerulonephritis im Rahmen einer IgA-Nephropathie bekannt.

Tabelle 12.37 des Anhangs vermittelt einen Überblick über die Häufigkeit des Auftretens der einzelnen Symptome in den Untersuchungsgruppen. In der $BVAS \geq 6$ - Gruppe manifestierten sich die jeweiligen Symptome in der Regel häufiger als in der $BVAS \leq 5$ - Gruppe. Ein signifikanter Unterschied ($p = 0,033$) bestand für das Symptom Myalgien, das bei der Hälfte der Patienten der $BVAS \geq 6$ - Gruppe, nicht aber in der $BVAS \leq 5$ - Gruppe, auftrat. Weitere signifikante Unterschiede bestanden nicht. Für die Symptome Abgeschlagenheit und Epistaxis gab es eine klare Tendenz der häufigeren Manifestation in der $BVAS \geq 6$ - Gruppe. Mit $p = 0,07$ lag in beiden Fällen jedoch keine Signifikanz im Exakten Test nach Fisher vor.

Blutbild und CRP

Tabelle 4.10 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Differentialblutbild und CRP

Parameter	$BVAS \leq 5$	Min	Max	$BVAS \geq 6$	Min	Max	p (MWU)
Erythrozyten (10E12/l)	4,585 (4,218 - 4,823)	3,85	5,44	4,055 (3,528 - 4,48)	3,11	5,66	0,075
Hb (mmol/l)	8,85 (7,68 - 9,7)	7,3	9,8	7,0 (6,33 - 8,23)	5,3	9,7	0,029
Hk (l/l)	0,43 (0,37 - 0,46)	0,35	0,48	0,35 (0,3 - 0,4)	0,26	0,48	0,035
Thrombozyten (10E9/l)	206 (184 - 282,75)	155	376	306,5 (245,25 - 431,75)	196	628	0,023
Leukozyten (10E9/l)	6,73 (5,303 - 14,023)	3,1	14,6	9,83 (7,6 - 14,497)	4,9	16,4	0,165
Neutrophile (%)	77,95 (66,78 - 86,63)	58,9	93,0	77,0 (68,93 - 85,3)	64,8	93,9	0,853
Eosinophile (%)	0,35 (0,18 - 1,33)	0,0	2,7	1,9 (0,0 - 2,95)	0,0	5,2	0,280
Basophile (%)	0,25 (0,1 - 0,4)	0,1	0,5	0,15 (0,0 - 0,55)	0,0	1,0	0,631
Lymphozyten (%)	13,5 (8,58 - 24,35)	3,4	25,8	13,7 (4,85 - 18,65)	4,0	20,8	0,579
Monozyten (%)	6,4 (3,93 - 10,58)	3,0	16,0	7,55 (5,75 - 8,65)	1,2	14,2	0,739
CRP (mg/l)	3,0 (2,61 - 3,83)	1,0	32,2	54,25 (14,48 - 164,5)	9,25	240,0	< 0,001

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Die Medianwerte der Parameter des roten Blutbildes – Anzahl der Erythrozyten, Hb und Hk – der BVAS ≤ 5 - Gruppe waren im Vergleich zur BVAS ≥ 6 - Gruppe höher. Die Unterschiede für das Hb und den Hk waren signifikant. Die Hb- (7,0 mmol/l) und Hk-Werte (0,35/l) der BVAS ≥ 6 - Gruppe konnten dem einer Anämie zugeordnet werden, die Anzahl der Erythrozyten ($4,055 \cdot 10^{12}/l$) war grenzwertig. Die Thrombozyten fielen mit $306,5 \cdot 10^9/l$ im Median in der BVAS ≥ 6 - Gruppe signifikant höher als in der BVAS ≤ 5 - Gruppe ($206 \cdot 10^9/l$) aus. Die Mediane der Leukozyten lagen für beide Gruppen im Bereich der klinischen Norm. Der Median der BVAS ≥ 6 - Gruppe war mit $9,83 \cdot 10^9/l$ zwar höher als der Median der BVAS ≤ 5 - Gruppe ($6,73 \cdot 10^9/l$), ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht. Die Mediane und auch die Einzelwerte für die höchste und niedrigste Bestimmung differierten in der prozentualen Messung der neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in beiden Gruppen nur leicht. Ein Unterschied, der sich als hoch signifikant herausstellte, war für die CRP-Werte zu sehen. Mit 54,25 mg/l im Median und einem Höchstwert von 240 mg/l lag das CRP in der BVAS ≥ 6 - Gruppe deutlich höher im Vergleich zur BVAS ≤ 5 - Gruppe, dessen Median sich mit 3,0 mg/l als normwertig darstellte und dessen Höchstwert mit 32,2 mg/l sogar niedriger als der Median der Gruppe mit der höheren Krankheitsaktivität war.

Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Urindiagnostik

Tabelle 4.11 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Proteinurie

Parameter	BVAS ≤ 5	Min	Max	BVAS ≥ 6	Min	Max	p (MWU)
Creatinin ($\mu\text{mol/l}$)	127 (85,43 - 185,75)	47,0	266,0	190 (92,75 - 269,0)	67,1	513	0,315
Harnstoff (mmol/l)	7,9 (6,08 - 17,88)	5,0	22,9	12,3 (7,61 - 19,85)	4,99	24,2	0,460
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m^2)	54,3 (25,65 - 70,2)	16,2	120,6	31,5 (17,25 - 75,0)	10,8	96,6	0,436
Urinteststreifen Protein (g/l)	0 (0 - 0,138)	0	0,7	0,3 (0 - 0,55)	0	1,0	0,105

Für die Auswertung des Harnstoffs konnten wegen fehlender Bestimmungen nur 8 von 10 Patienten der GPA_BVAS ≥ 6 - Gruppe berücksichtigt werden. In der GPA_BVAS ≤ 5 - Gruppe lagen für alle Probanden die Harnstoffwerte vor. Angegeben sind der Median sowie in Klammern das 1. und 3. Quartil. (Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test)

Der Creatininwert der BVAS ≤ 5 - Gruppe ist im Median mit 127 $\mu\text{mol/l}$ niedriger als in der BVAS ≥ 6 - Gruppe mit 190 $\mu\text{mol/l}$. Die eGFR nach der MDRD-Methode stellte sich dementsprechend auch besser dar. Ein zu vermutender signifikanter Unterschied lag jedoch für keinen der beiden Parameter vor. Dieser konnte auch für den Serumharnstoff nicht nachgewiesen werden.

In der BVAS ≤ 5 - Gruppe war die Proteinausscheidung im Teststreifen in mindestens 50% der Fälle 0 g/l. Selbst in 75% betrug sie maximal 0,138 g/l und lag somit immer noch im Bereich der Norm. Der Median von 0,3 g/l der Patienten mit einer höheren Krankheitsaktivität musste als eine pathologische Proteinurie angesehen werden. Die höchste Einzelbestimmung mit 1,0 g/l konnte ebenfalls der BVAS ≥ 6 - Gruppe zugeordnet werden. Trotz der Differenz zwischen den Medianen und Einzelbestimmungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden.

Einen Überblick über das Ausmaß der Leuko- und Erythrozyturie im Teststreifen bzw. im Sediment vermitteln die Tabellen 4.12 und 4.13. Für die Leukozyturie, die unabhängig von der Messmethode nur vereinzelt in stärkerer Ausprägung in beiden Gruppen auftrat, bestand weder im Teststreifen noch im Sediment ein signifikanter Gruppenunterschied. Im Gegensatz dazu wurde in der BVAS ≥ 6 - Gruppe sowohl im Teststreifen als auch im Sediment eine signifikant höhere Erythrozyturie gemessen. In allen verfügbaren Urinuntersuchungen konnte für die BVAS ≤ 5 - Gruppe keine oder nur eine marginale Erythrozyturie ($\leq 25/\mu\text{l}$) im Teststreifen nachgewiesen

werden. Diese stellte sich in der BVAS ≥ 6 - Gruppe ausgeprägter dar. Allein in 40% der Fälle betrug die Erythrozyturie im Teststreifen $> 250/\mu\text{l}$. Ein ähnliches Bild konnte für die Bestimmung der Erythrozyten im Sediment gezeichnet werden. In den verfügbaren Urinuntersuchungen war bis auf eine Ausnahme (Nachweis von 6 - 10 Erythrozyten/GF) in der BVAS ≤ 5 - Gruppe kein Erythrozyt nachweisbar. Demgegenüber trat allein in jeweils 20% in der BVAS ≥ 6 - Gruppe eine Erythrozyturie von > 50 bzw. > 100 Erythrozyten/GF auf.

Tabelle 4.12 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen (UT)

UT Leukozyten	negativ	≤ 25	≤ 75	≤ 100	≤ 250	≤ 500	k.A.	p (MWU)
BVAS ≤ 5	4 (40%)	2 (20%)	-	-	-	1 (10%)	3 (30%)	0,073
BVAS ≥ 6	-	3 (30%)	3 (30%)	-	1 (10%)	-	3 (30%)	

UT Erythrozyten	negativ	≤ 25	≤ 50	≤ 150	≤ 250	> 250	k.A.	p (MWU)
BVAS ≤ 5	4 (40%)	3 (30%)	-	-	-	-	3 (30%)	0,001
BVAS ≥ 6	-	1 (10%)	1 (10%)	-	1 (10%)	4 (40%)	3 (30%)	

k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Tabelle 4.13 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment

	0	1 – 5	6 - 10	> 10	> 50	> 100	> 500	k.A.	p (MWU)
Urinsediment Leukozyten									
BVAS ≤ 5	2 (20%)	1 (10%)	-	2 (20%)	-	-	1 (10%)	4 (40%)	0,792
BVAS ≥ 6	2 (20%)	4 (40%)	1 (10%)	3 (30%)	-	-	-	-	
Urinsediment Erythrozyten									
BVAS ≤ 5	6 (60%)	-	1 (10%)	-	-	-	-	3 (30%)	0,010
BVAS ≥ 6	2 (20%)	1 (10%)	-	3 (30%)	2 (20%)	2 (20%)	-	-	

k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

In der BVAS ≥ 6 - Gruppe wurde in 80% der Fälle auch die Diagnostik auf dysmorphe Erythrozyten durchgeführt. Im Median wurden 57,5% dysmorphe Erythrozyten (1. Quartil 7,5%, 3. Quartil 75%, Minimum 0%, Maximum 90%) nachgewiesen, von denen im Median 2% Akanthozyten (1. Quartil 0%, 3. Quartil 5,75%, Minimum 0%, Maximum 8%) waren. In der BVAS ≤ 5 - Gruppe trat nur in einem Fall eine Erythrozyturie im Urinsediment auf. Dysmorphe Erythrozyten stellten sich in der Phasenkontrastmikroskopie nicht dar.

Autoantikörper und Krankheitsaktivität

Tabelle 4.14 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS

Parameter	BVAS ≤ 5	Min	Max	BVAS ≥ 6	Min	Max	p (MWU)
c-ANCA (Titer)	1:21 (1:10 - 1:49)	1:5	1:320	1:320 (1:265 - 1:1000)	1:100	1:3200	$< 0,001$
PR3-Ak (U/ml)	46,5 (28,78 - 100,83)	10,0	163,0	627,15 (199,0 – 1037,0)	145,0	1383,0	$< 0,001$
BVAS (Punkte)	3,5 (0 - 5)	0	5	19 (10 - 25,25)	9	28	$< 0,001$

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Unter Berücksichtigung der Einteilung der Patienten mit einer GPA nach der Krankheitsaktivität im BVAS mit einem maximalen Score von fünf Punkten in der Gruppe mit der niedrigeren Aktivität der Grunderkrankung bestand ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In der BVAS ≥ 6 - Gruppe lag der mediane Score mit 19 Punkten deutlich höher gegenüber der BVAS ≤ 5 - Gruppe mit 3,5 Punkten im Median. Die höchste Einzelbestimmung in der BVAS ≥ 6 - Gruppe betrug 28 Punkte, die niedrigste 9 Punkte. In der

BVAS ≤ 5 - Gruppe schwankten die Einzelwerte zwischen 0 und 5 Punkten. Auftreten und Häufigkeiten der einzelnen Manifestationen des BVAS fasst Tabelle 12.38 des Anhangs zusammen. Für die Krankheitsmanifestationen Myalgien und Hämaturie bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Auch die Manifestationen Borken, Konjunktivitis und Proteinurie traten in der BVAS ≥ 6 - Gruppe mit Abstand häufiger auf. Das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ im Exakter Test nach Fisher wurde jedoch nicht erreicht. In der BVAS ≤ 5 - Gruppe waren mit 80% zu 20% der BVAS ≥ 6 - Gruppe signifikant mehr Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf. Die Höhe der Autoantikörper – c-ANCA und PR3-Ak – spiegelte das unterschiedliche Niveau der Krankheitsaktivität wieder und fiel in der BVAS ≥ 6 - Gruppe hochsignifikant höher aus. Die Mediane der c-ANCA und PR3-Ak lagen mit 1:320 bzw. 627,15 U/ml deutlich über denen der BVAS ≤ 5 - Gruppe mit 1:21 bzw. 46,5 U/ml.

Studienparameter

Tabelle 4.15 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Studienparameter

Parameter	BVAS ≤ 5	Min	Max	BVAS ≥ 6	Min	Max	p (MWU)
cf-DNA_hPI (ng/ml)	143,15 (90,33 - 240,03)	63,0	244,4	326,2 (230,1 - 414,3)	184,0	480,6	0,002
cf-DNA_bTh (ng/ml)	512,9 (379,75 - 695,68)	327,3	761,0	863,6 (689,35 - 1045,23)	435,2	1342,7	0,003
sCD163 (ng/ml)	1,142 (0,675 - 2,323)	0,446	2,426	2,722 (1,931 - 3,819)	1,595	4,509	0,001

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Sowohl die cf-DNA/NETs als auch der sCD163 unterschieden sich zwischen den Studiengruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität sehr signifikant voneinander. Die Mediane der cf-DNA/NETs_hPI und cf-DNA/NETs_bTh waren in der BVAS ≥ 6 - Gruppe mit 326,2 ng/ml bzw. 863,6 ng/ml deutlich höher als in der Gruppe mit der niedrigeren Krankheitsaktivität (143,15 ng/ml bzw. 512,9 ng/ml). Für die BVAS ≥ 6 - Gruppe bestand für beide cf-DNA/NETs ein signifikanter Unterschied zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP und AH+/-DM). Dies galt nicht für die BVAS ≤ 5 - Gruppe (siehe auch Tabellen 12.39 und 12.40 des Anhangs).

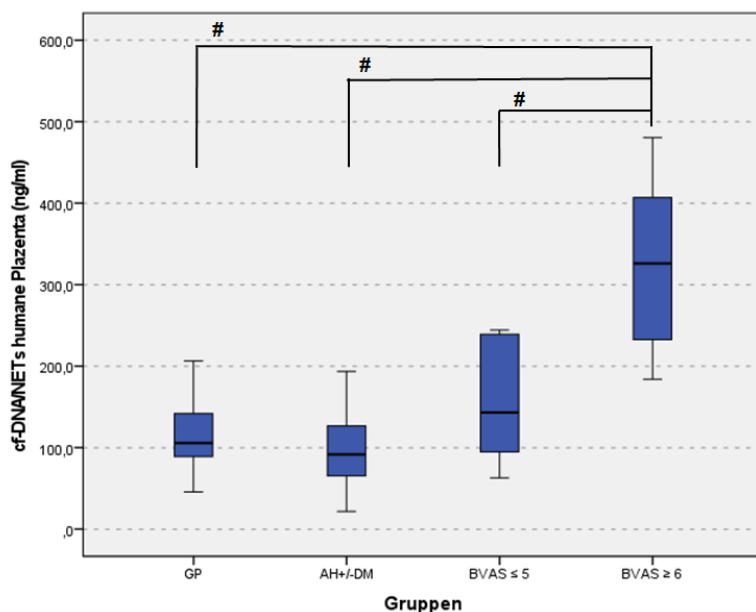


Abbildung 4.15 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: cf-DNA/NETs humane Plazenta

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) Patienten mit einer Krankheitsaktivität von mindestens 6 Punkten im BVAS (BVAS ≥ 6 , n = 10) hatten eine signifikant („#“) höhere Plasmakonzentration an cf-DNA/NETs humane Plazenta als die GPA-Patienten mit einer Krankheitsaktivität von maximal 5 Punkten im BVAS (BVAS ≤ 5 , n = 10; $p^* = 0,002$ im Mann-Whitney-U-Test). Signifikante Unterschiede („#“) zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – gesunde Probanden (GP, n = 17) und Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, n = 15) – bestanden nur für die BVAS ≥ 6 - Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

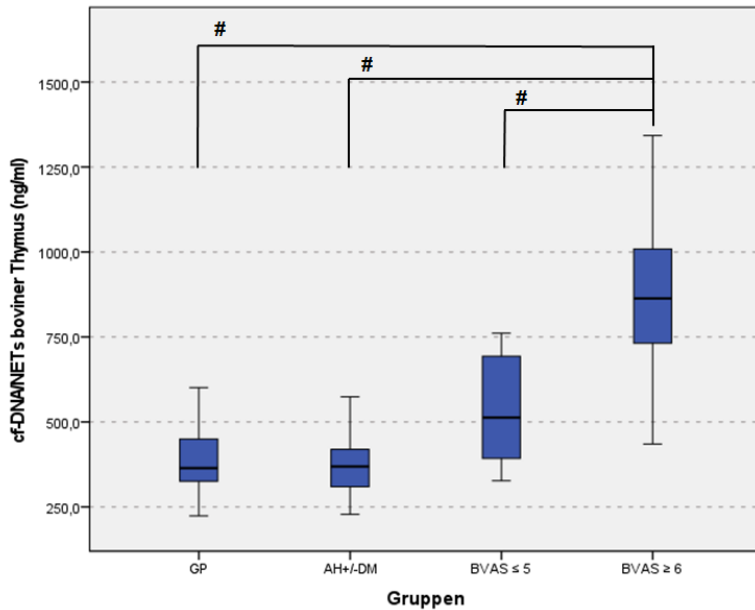


Abbildung 4.16 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: cf-DNA/NETs boviner Thymus

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten mit einer Krankheitsaktivität von mindestens 6 Punkten im BVAS (BVAS ≥ 6 , n = 10) hatten eine signifikant („#“) höhere Plasmakonzentration an cf-DNA/NETs boviner Thymus als die GPA-Patienten mit einer Krankheitsaktivität von maximal 5 Punkten im BVAS (BVAS ≤ 5 , n = 10; $p^* = 0,003$ im Mann-Whitney-U-Test). Signifikante Unterschiede („#“) zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – gesunde Probanden (GP, n = 17) und Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, n = 15) – bestanden nur für die BVAS ≥ 6 - Gruppe (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

Die Plasmakonzentration des sCD163 war in der BVAS ≥ 6 - Gruppe mit 2,722 ng/ml im Median ebenfalls signifikant höher als in der BVAS ≤ 5 - Gruppe (1,142 ng/ml im Median). Ein signifikanter Gruppenunterschied der BVAS ≥ 6 - Gruppe bestand auch zu den gesunden Probanden, nicht aber zur AH+/-DM-Gruppe. Die mediane Plasmakonzentration des sCD163 der BVAS ≤ 5 - Gruppe lag auf dem Niveau der gesunden Probanden (1,142 ng/ml vs. 1,164 ng/ml). Es bestanden keine Unterschiede zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (siehe auch Tabelle 12.41 des Anhangs).

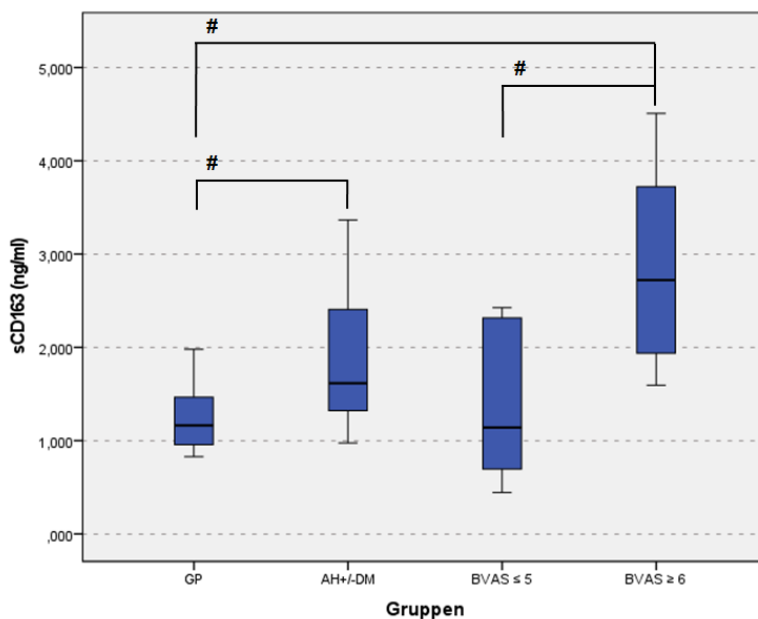


Abbildung 4.17 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: sCD163

Die Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten mit einer Krankheitsaktivität von mindestens 6 Punkten im BVAS (BVAS ≥ 6 , n = 10) hatten eine signifikant („#“) höhere sCD163-Plasmakonzentration als die GPA-Patienten mit einer Krankheitsaktivität von maximal 5 Punkten im BVAS (BVAS ≤ 5 , n = 10; $p^* = 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). Signifikante Unterschiede zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen bestanden nur für die BVAS ≥ 6 - Gruppe gegenüber den gesunden Probanden (GP, n = 17; $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test). Die sCD163-Plasmakonzentrationen der GP-Gruppe waren des Weiteren auch signifikant („#“) niedriger im Vergleich zu der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, n = 15) - Gruppe ($p^* = 0,004$ im Mann-Whitney-U-Test).

4.6 Vergleich progredienter und stabiler Verlauf der GPA

Für die Patienten mit einer GPA erfolgte zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses eine nähere Betrachtung hinsichtlich des unterschiedlichen Krankheitsverlaufes. Es wurden zwei Gruppen gebildet. In der Gruppe „GPA_stabil“ wurden die Patienten zusammengefasst, bei denen keine Verschlechterung der Krankheitsaktivität um den Untersuchungszeitpunkt auftrat. In der Gruppe „GPA_progredient“ sind die Patienten mit einer neuerlichen Verschlechterung der Grundkrankheit erfasst worden. Die Anzahl der Probanden betrug in beiden Gruppen 10. Die Hälfte der Probanden in der GPA_progredient - Gruppe war jeweils dem weiblichen bzw. männlichen Geschlecht zuzuordnen, wohingegen in der GPA_stabil - Gruppe das weibliche Geschlecht mit 70% zu 30% überwog. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Geschlechterverteilung bestand zwischen den beiden Untersuchungsgruppen aber nicht ($p = 0,650$ im Exakter Test nach Fisher). Mit 65 Jahren (1. Quartil 53 Jahre, 3. Quartil 69 Jahre) ist das mediane Alter der stabilen Verlaufsgruppe höher als mit 59 Jahren (1. Quartil 54,75 Jahre, 3. Quartil 68,5 Jahre) in der GPA_progredient - Gruppe, ein signifikanter Unterschied bestand aber auch hier nicht ($p = 0,579$).

Bei 90% der Patienten beider Gruppen lag eine renale Manifestation der Grunderkrankung vor. Bei einer weiteren Patientin der GPA_stabil - Gruppe war anamnestisch eine Glomerulonephritis in Form einer IgA-Nephropathie bekannt, die keine Manifestation der GPA darstellte. Eine Gegenüberstellung aller Komorbiditäten ist in Tabelle 12.44 des Anhangs enthalten. Für keine Komorbidität konnte im Exakter Test nach Fisher ein signifikanter Gruppenunterschied nachgewiesen werden.

Tabelle 12.45 des Anhangs fasst das Auftreten der einzelnen Symptome in den Untersuchungsgruppen zusammen. Symptome des oberen und unteren Respirationstrakts, u.a. Epistaxis und Husten, traten tendenziell in der Gruppe mit einem progredienten Verlauf häufiger auf, ein signifikanter Gruppenunterschied bestand aber nicht. Symptome des allgemeinen Krankheitsgefühls sowie des Muskel- und Skelettsystems manifestierten sich ebenfalls vermehrt in der Gruppe mit einer Verschlechterung der Grunderkrankung. Insbesondere für die Symptome Arthralgien und Abgeschlagenheit bestand bei Betrachtung der Werte mit 70% bzw. 80% betroffener Patienten in der GPA_progredient-Gruppe gegenüber 20% bzw. 30% in der stabilen Verlaufsgruppe ein subjektiv größerer Unterschied, der sich im paarweisen Vergleich mit dem Exakter Test nach Fisher aber als nicht signifikant darstellte. Letztendlich konnte nur für das Symptom Myalgien ein signifikanter Unterschied ($p = 0,033$) zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Blutbild und CRP

Die Parameter des roten Blutbilds der GPA_stabil-Gruppe lagen im Median höher als die der GPA_progredient-Gruppe (siehe Tabelle 4.16). Ein signifikanter Unterschied bestand für das Hb. Der Median der Gruppe mit einem stabilen Verlauf war mit 8,85 mmol/l dem klinischen Normbereich zuzuordnen. Mit 7,3 mmol/l lag der Median der progredienten Gruppe leicht unterhalb des Referenzbereiches (7,4 - 9,9 mmol/l). Für den Hk (GPA_progredient 0,36/l; GPA_stabil 0,43/l) deutete sich ebenfalls ein Unterschied an, der aber nicht signifikant ausfiel.

Im Hinblick auf die Anzahl der Thrombozyten und Leukozyten sowie der Verteilung der Leukozyten im Differentialblutbild stellten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede dar. Dieser wurde aber für das CRP gesehen. Das CRP der GPA_progredient-Gruppe (54,25 mg/l im Median) war gegenüber den Patienten mit einem stabilen Verlauf der GPA (3,0 mg/l, im klinischen Normbereich liegend) signifikant erhöht.

Tabelle 4.16 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Blutbild und CRP

Parameter	GPA_progredient	Min	Max	GPA_stabil	Min	Max	p (MWU)
Erythrozyten (10E12/l)	4,055 (3,708 - 4,565)	3,11	5,66	4,515 (4,188 - 4,823)	3,58	5,44	0,218
Hb (mmol/l)	7,3 (6,33 - 8,23)	5,3	9,7	8,85 (7,75 - 9,7)	6,4	9,8	0,035
Hk (l/l)	0,36 (0,3 - 0,4)	0,26	0,48	0,43 (0,37 - 0,46)	0,32	0,48	0,063
Thrombozyten (10E9/l)	283,5 (202 - 426,5)	185	628	230,5 (192,25 - 303,25)	155	421	0,247
Leukozyten (10E9/l)	12,23 (7,465 - 14,497)	4,4	16,4	6,78 (5,723 - 12,353)	3,1	14,6	0,143
Neutrophile (%)	77,75 (71,65 - 85,3)	66,6	93,9	77,2 (64,3 - 86,63)	58,9	93,0	0,579
Eosinophile (%)	1,55 (0 - 2,7)	0	3,7	0,35 (0,18 - 1,55)	0	5,2	0,481
Basophile (%)	0,15 (0 - 0,4)	0	0,5	0,25 (0,1 - 0,55)	0,1	1,0	0,353
Lymphozyten (%)	12,85 (4,85 - 17,45)	4,0	20,0	13,85 (8,58 - 24,35)	3,4	25,8	0,315
Monozyten (%)	7,55 (4,53 - 10,88)	1,2	14,2	7,05 (4,5 - 9,15)	3	16	0,853
CRP (mg/l)	54,25 (12,68 - 164,5)	3,0	240,0	3,0 (2,61 - 9,49)	1,0	32,2	0,004

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Urindiagnostik

Tabelle 4.17 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Proteinurie

Parameter	GPA_progredient	Min	Max	GPA_stabil	Min	Max	p (MWU)
Creatinin (µmol/l)	139,0 (82,25 - 269,0)	67,1	513	144,5 (88,23 - 235,25)	47	266	0,853
Harnstoff (mmol/l)	12,5 (7,31 - 19,85)	4,99	24,2	8,05 (6,08 - 17,88)	5,0	22,9	0,515
eGFR(MDRD) (ml/min/1,73m ²)	46,8 (17,25 - 75,0)	10,8	96,6	42,3 (18,9 - 67,95)	16,2	120,6	0,796
Urinstreifen Protein (g/l)	0,3 (0,0 - 0,55)	0	1,0	0,025 (0,0 - 0,138)	0	0,7	0,247

Für die Auswertung des Harnstoffs konnten wegen fehlender Bestimmungen nur 8 von 10 Patienten der GPA_progredient - Gruppe berücksichtigt werden. In der GPA_stabil - Gruppe lagen für alle Probanden die Harnstoffwerte vor. Angegeben sind der Median sowie in Klammern das 1. und 3. Quartil. (Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test)

Die Gruppenmediane für das Creatinin und die eGFR (MDRD) lagen auf einem ähnlichen Niveau mit marginal besseren Werten in der progredienten Verlaufsgruppe. Die Gruppenmediane für den Serumharnstoff differierten deutlicher, ein signifikanter Unterschied war aber ebenfalls nicht nachzuvollziehen (siehe Tabelle 4.17). Die Proteinurie im Teststreifen ist bei den Patienten mit einer Progredienz der GPA mit 0,3 g/l im Median ausgeprägter gegenüber den 0,025 g/l im Median der stabilen Gruppe. Ein signifikanter Unterschied bestand dennoch nicht.

Tabelle 4.18 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinstreifen (UT)

UT Leukozyten	negativ	≤ 25	≤ 75	≤ 100	≤ 250	≤ 500	k.A.	p (MWU)
GPA_progredient	1 (10%)	3 (30%)	2 (20%)	-	1 (10%)	-	3 (30%)	0,456
GPA_stabil	3 (30%)	2 (20%)	1 (10%)	-	-	1 (10%)	3 (30%)	
UT Erythrozyten	negativ	≤ 25	≤ 50	≤ 150	≤ 250	> 250	k.A.	p (MWU)
GPA_progredient	1 (10%)	1 (10%)	-	-	1 (10%)	4 (40%)	3 (30%)	0,038
GPA_stabil	3 (30%)	3 (30%)	1 (10%)	-	-	-	3 (30%)	

k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Die Tabellen 4.18 und 4.19 fassen die Häufigkeiten des Auftretens der unterschiedlichen Schweregrade der Leukozyt- und Erythrozyturie, bestimmt durch den Teststreifen bzw. im Sediment, zusammen. Sowohl im Sediment als auch nach dem Teststreifenverfahren bestand bei beiden Verlaufsformen in der Mehrzahl der Fälle keine

bzw. nur eine leichte Leukozyturie. Höhergradige Leukozyturien traten jeweils nur vereinzelt auf. Ein signifikanter Gruppenunterschied bestand im Falle der Leukozyturie weder für die Bestimmung im Teststreifen noch im Sediment.

Tabelle 4.19 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment

	0	1 – 5	6 - 10	> 10	> 50	> 100	> 500	k.A.	p (MWU)
Urinsediment Leukozyten									
GPA_progred.	1 (10%)	4 (40%)	1 (10%)	2 (20%)	-	-	1 (10%)	1 (10%)	0,536
GPA_stabil	3 (30%)	1 (10%)	-	3 (30%)	-	-	-	3 (30%)	
Urinsediment Erythrozyten									
GPA_progred.	1 (10%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)	-	1 (10%)	0,004
GPA_stabil	7 (70%)	-	-	1 (10%)	-	-	-	2 (20%)	

k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Ein anderes Bild zeichnete sich für die Anzahl der Erythrozyten im Urin. Im Teststreifen lag in 50% der Fälle der progredienten Verlaufsgruppe eine signifikante Erythrozyturie von > 250/µl oder ≤ 250/µl vor. Demgegenüber war in der GPA_stabil-Gruppe in 60% keine bzw. nur eine marginale Erythrozyturie (≤ 25/µl) nachweisbar. Für beide Gruppen lagen in 30% der Fälle keine Untersuchungsergebnisse für den Teststreifen vor. Im Urinsediment wurden in 70% der Fälle in der stabilen Verlaufsgruppe keine Erythrozyten gefunden. Lediglich in 10% war eine Erythrozyturie von > 10/Gf nachweisbar. Im Gegensatz dazu ist in der GPA_progredient-Gruppe in 60% der Fälle eine Erythrozyturie von > 10/Gf oder höherer Ausprägung aufgetreten. Sowohl im Teststreifen als auch im Sediment stellte sich eine signifikant stärker ausgeprägte Erythrozyturie bei den Patienten mit einem progredienten Verlauf der GPA dar.

Im Falle der progredienten Verlaufsform wurde in 80% der Fälle auch die Diagnostik auf dysmorphe Erythrozyten durchgeführt. In den untersuchten Urinproben konnten im Median 40% dysmorphe Erythrozyten (1. Quartil 0%, 3. Quartil 75%, Minimum 0%, Maximum 90%) nachgewiesen werden, von denen im Median 1% Akanthozyten (1. Quartil 0%, 3. Quartil 5%, Minimum 0%, Maximum 8%) waren. Dysmorphe Erythrozyten traten in der Gruppe mit einem stabilen Krankheitsverlauf nur in einem Fall auf (65% dysmorphe Erythrozyten, davon 5% Akanthozyten; histologisch fortgeschrittene sklerosierende extra- und intrakapilläre Glomerulonephritis ohne Nachweis einer aktuellen Prozessaktivität). Für die restlichen Patienten der GPA_stabil-Gruppe war eine Bestimmung bei fehlendem Nachweis von Erythrozyten im Urinsediment nicht möglich.

Autoantikörper und Krankheitsaktivität

Tabelle 4.20 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS

Parameter	GPA_progredient	Min	Max	GPA_stabil	Min	Max	p (MWU)
c-ANCA (Titer)	1:320 (1:265 - 1:1000)	1:5	1:3200	1:32 (1:10 - 1:100)	1:10	1:1000	0,015
PR3-Ak (U/ml)	615,5 (136,75 - 1037,0)	10	1383	49,0 (40,30 - 171,25)	18,5	443,3	0,015
BVAS (Punkte)	19 (8,75 - 25,25)	3	28	4,5 (0 - 6)	0	10	0,002

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Die Gruppenmediane der Autoantikörper c-ANCA und PR3-Ak waren mit 1:320 bzw. 615,5 U/ml für die Gruppe mit dem progredienten Krankheitsverlauf höher als bei den Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf (c-ANCA 1:32, PR3-Ak 49,0 U/ml). Der höchste Einzelwert für die PR3-Ak in der GPA_progredient-

Gruppe war mit 1383 U/ml mehr als dreimal so hoch wie der höchste Einzelwert für einen Patienten mit einem stabilen Verlauf. Auch die Aktivität im BVAS stellte sich für die Patienten mit der progredienten Verlaufsform mit 19 Punkten im Median höher dar als in der GPA_stabil-Gruppe mit 4,5 Punkten im Median. Der Maximalwert für die Krankheitsaktivität im BVAS fiel in der progredienten Gruppe mit 28 Punkten deutlich höher aus als in der Vergleichsgruppe (max. 10 Punkte). Sowohl für die Autoantikörper - c-ANCA und PR3-AK - als auch für die Krankheitsaktivität im BVAS bestand ein signifikanter Gruppenunterschied. Einen graphischen Überblick über die Verteilung der PR3-Ak sowie des BVAS geben die Abbildungen 12.12 und 12.13 im Anhang.

Die Tabelle 12.46 des Anhangs fasst die Häufigkeit des Auftretens der im BVAS eingeschlossenen Manifestationen der Vaskulitis für die beiden Gruppen zusammen. Ein signifikanter Unterschied für eine einzelne Manifestation ist nur im Falle der Myalgien nachzuweisen. 50% der Patienten mit einem progredienten Verlauf klagten über Myalgien. In der GPA_stabil-Gruppe traten keine Myalgien auf. Arthralgien/Arthritiden und Konjunktividen sind ebenfalls mit Abstand häufiger in der progredienten Gruppe vorgekommen. Ein signifikanter Unterschied lag aber nicht vor. Betrachtet man nur die Organsysteme an sich, traten in der stabilen Verlaufsgruppe keine Beteiligungen der Schleimhäute im Mund- und Genitalbereich sowie Manifestationen im Bereich der Augen auf. Im Falle der Patienten mit einer progredienten Verlaufsform kam es in der Hälfte der Fälle zu einzelnen Manifestationen, so dass für den Organkomplex ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand.

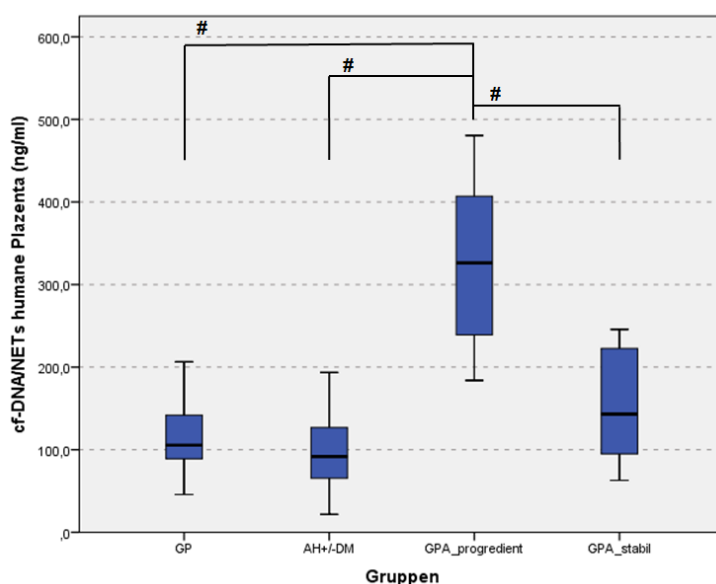
Studienparameter

Tabelle 4.21 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Studienparameter

Parameter	GPA_progredient	Min	Max	GPA_stabil	Min	Max	p (MWU)
cf-DNA_hPI (ng/ml)	326,2 (237,48 - 414,3)	184,0	480,6	143,15 (90,33 - 228,05)	63,0	245,7	0,002
cf-DNA_bTh (ng/ml)	849,1 (700,23 - 1045,23)	435,2	1342,7	512,9 (379,75 - 611,75)	327,3	764,2	0,007
sCD163 (ng/ml)	2,694 (1,447 - 3,819)	0,857	4,509	1,733 (0,675 - 2,363)	0,446	2,533	0,063

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Sowohl für die cf-DNA/NETs_hPI als auch für die cf-DNA/NETs_bTh konnte ein signifikanter Gruppenunterschied gesehen werden. Mit 326,2 ng/ml bzw. 849,1 ng/ml im Median waren die Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs_hPI und cf-DNA/NETs_bTh in der GPA_progredient - Gruppe höher als in der stabilen Gruppe mit



143,15 ng/ml bzw. 512,9 ng/ml im Median. Im Gegensatz zur GPA_stabil - Gruppe waren die Plasmakonzentrationen

Abbildung 4.18 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: cf-DNA/NETs humane Plazenta

Die Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs humane Plazenta der Patienten mit einer progredienten Verlaufsform der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA_progredient, n = 10) fielen sowohl gegenüber denen mit einem stabilen Verlauf der Grunderkrankung (GPA_stabil, n = 10; p* = 0,002 im Mann-Whitney-U-Test) als auch gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – gesunde Probanden (GP, n = 17) und Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, n = 15) – signifikant („#“) höher aus (jeweils p* < 0,001 im Mann-Whitney-U-Test).

nen der cf-DNA/NETs der Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf auch signifikant höher als die der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM; siehe auch Tabellen 12.47 und 12.48 im Anhang).

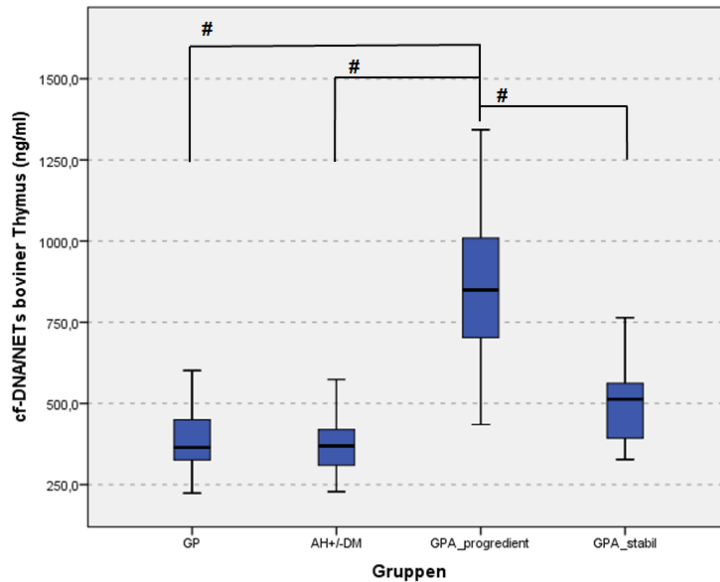


Abbildung 4.19 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: cf-DNA/NETs boviner Thymus

Die Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs boviner Thymus der Patienten mit einer progredienten Verlaufsform der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA_progredient, n = 10) fielen sowohl gegenüber denen mit einem stabilen Verlauf der Grunderkrankung (GPA_stabil, n = 10; $p^* = 0,007$ im Mann-Whitney-U-Test) als auch gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – gesunde Probanden (GP, n = 17) und Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, n = 15) – signifikant („#“) höher aus (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

Für den sCD163 lag der Gruppenmedian der progredienten Gruppe ebenfalls über dem der stabilen Gruppe (2,694 ng/ml vs. 1,733 ng/ml), jedoch bestand für diesen Studienparameter kein signifikanter Gruppenunterschied. Im Vergleich mit den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen bestand ein signifikanter Gruppenunterschied lediglich zwischen der GPA_progredient - Gruppe und den gesunden Probanden. Für die Gruppe der Patienten mit einer stabilen Verlaufsform der GPA traten für die Plasmakonzentrationen des sCD163 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu der AH+/-DM- oder der GP-Gruppe auf (siehe auch Tabelle 12.49 im Anhang).

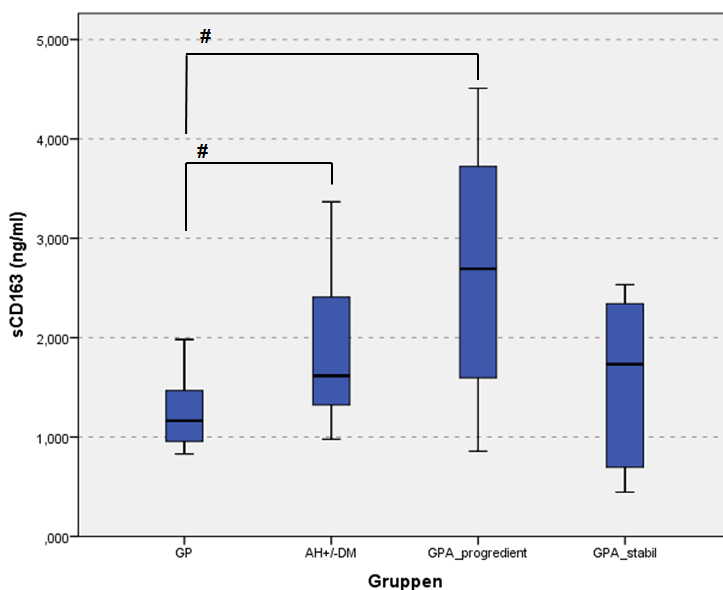


Abbildung 4.20 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: sCD163

Die Plasmakonzentrationen an sCD163 der Patienten mit einer progredienten Verlaufsform der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA_progredient, n = 10) waren signifikant höher als die der gesunden Probanden (GP, n = 17; $p^* = 0,007$ im Mann-Whitney-U-Test). Die sCD163 Plasmakonzentrationen der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, n = 15) - Gruppe stellten sich ebenfalls signifikant („#“) erhöht gegenüber den gesunden Probanden dar ($p^* = 0,004$ im Mann-Whitney-U-Test). Die Patienten mit einer stabilen Verlaufsform der Grunderkrankung (GPA_stabil, n = 10) unterschieden sich weder zur GPA_progredient - Gruppe noch zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen.

4.7 Vergleich Aufnahme und Entlassung bei Neudiagnose oder Rezidiv der GPA

Für Patienten mit einer GPA, die aufgrund einer Erstdiagnose bzw. eines Rezidivs der Grundkrankheit stationär behandelt wurden, erfolgte die vergleichende Auswertung zwischen den Zeitpunkten Aufnahme und Entlassung. Es gingen acht Krankenhausaufenthalte von insgesamt sechs Patienten mit ausgeglichenem Geschlechterverhältnis (3 weibliche, 3 männliche) in den Vergleich ein. In vier Fällen wurde die GPA erstmalig diagnostiziert. In den anderen vier Fällen lag ein Rezidiv der Grundkrankheit vor. Zwei von den vier Rezidiven traten bei Patienten (jeweils einmal weiblich bzw. männlich) auf, bei denen bereits der Krankenhausaufenthalt im Rahmen der Erstdiagnose in den Vergleich mit einbezogen wurde.

Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme waren die Patienten im Median 63 Jahre alt (1. Quartil 56,25 Jahre; 3. Quartil 67 Jahre). Das Alter des jüngsten Patienten betrug 42 Jahre, das des ältesten 73 Jahre. Im Median dauerte die stationäre Behandlung 19,5 Tage (1. Quartil 12,25 Tage; 3. Quartil 25,25 Tage). Der längste Krankenhausaufenthalt betrug 71 Tage, der kürzeste 10 Tage. Bei drei von vier Patienten, bei denen die GPA neu diagnostiziert wurde, ist anamnestisch kein arterieller Hypertonus bekannt gewesen. Dieser wurde jedoch in allen drei Fällen ebenfalls neu diagnostiziert und therapiert. Patienten, die aufgrund eines Rezidivs aufgenommen wurden, litten alle unter einer bekannten arteriellen Hypertonie. Bei keinem der Patienten lag ein Diabetes mellitus oder eine KHK vor. Eine Hyperlipidämie und ein Nikotinabusus waren in jeweils einem Fall (16,67%) bekannt. Bei den vier Erstdiagnosen der GPA trat eine RPGN Typ 3 (1x fokal, 1x gemischt, 2x > 50% Halbmonde) auf. Alle Patienten mit einem Rezidiv hatten eine bekannte Glomerulonephritis als renale Beteiligung der GPA. In 75% ist es zum Zeitpunkt der Aufnahme zu einer Verschlechterung der Retentionsparameter gekommen. Bei keinem der Patienten sind bis dato anamnestisch chronische Harnwegsinfekte bzw. eine chronische Pyelonephritis bekannt gewesen. Einen Überblick über die vorliegenden Symptome um den Zeitpunkt der Aufnahme bzw. der Entlassung gibt Tabelle 12.52 des Anhangs. Für die Symptome Nachtschweiß, Abgeschlagenheit, Husten, Arthralgien und Myalgien war ein deutlicher Abfall der Häufigkeit des Auftretens zur Entlassung zu beobachten. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Letztlich konnte für kein Symptom ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten beobachtet werden.

Blutbild und CRP

Tabelle 4.22 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Differentialblutbild und CRP

Parameter	Aufnahme	Min	Max	Entlassung	Min	Max	p (WT)
Erythrozyten (10E12/l)	3,67 (3,18 - 4,08)	2,95	4,36	3,92 (3,47 - 4,04)	3,23	4,24	0,401
Hb (mmol/l)	6,25 (5,53 - 7,25)	5,30	8,20	6,8 (6,1 - 7,33)	5,9	8,1	0,326
Hk (l/l)	0,29 (0,273 - 0,35)	0,26	0,41	0,335 (0,305 - 0,37)	0,29	0,4	0,291
Thrombozyten (10E9/l)	340,5 (259,0 - 490,0)	204	628	192,5 (151,75 - 316,75)	138	395	0,012
Leukozyten (10E9/l)	14,55 (11,043 - 16,275)	4,9	16,4	9,675 (6,77 - 15,4)	4,4	23,9	0,327
Neutrophile (%)	84,95 (82,33 - 92,43)	75,0	94,0	76,95 (68,1 - 91,28)	63,9	100	0,327
Eosinophile (%)	0 (0 - 1,43)	0	3,7	0,7 (0,23 - 1,43)	0	2,0	0,236
Basophile (%)	0 (0 - 0,1)	0	0,2	0 (0 - 0,1)	0	0,5	0,480
Lymphozyten (%)	5,95 (4,18 - 7,53)	2,0	20,0	13,45 (2,53 - 19,3)	0	23,3	0,327
Monozyten (%)	6,55 (4,25 - 8,08)	1,2	11,0	9,05 (5,43 - 11,13)	0	13,6	0,208
CRP (mg/l)	177,5 (74,48 - 228,25)	15,9	402,0	20,75 (4,8 - 32,85)	1,0	45,8	0,012

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Bei Aufnahme wurde mit 340,5 10E9/l im Median eine signifikant höhere Thrombozytenanzahl im Vergleich zum Ende der Behandlung mit 192,5 10E9/l bestimmt. Für das CRP konnte ebenfalls ein signifikanter Abfall zwischen Aufnahme (177,5 mg/l im Median) und Entlassung (20,75 mg/l im Median) dokumentiert werden. Bei den restlichen Parametern des Differentialblutbildes war kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten nachweisbar.

Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Urindiagnostik

Tabelle 4.23 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Proteinurie

Parameter	Aufnahme	Min	Max	Entlassung	Min	Max	p (WT)
Creatinin (µmol/l)	273 (205,25 - 375,75)	148	513	224,5 (178,75 - 275,75)	153	300	0,093
Harnstoff (mmol/l)	17,4 (11,53 - 20,45)	8,25	24,2	15,65 (12,83 - 16,15)	12,5	27,2	0,674
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m ²)	16,5 (13,2 - 28,8)	10,8	43,8	25,8 (19,8 - 31,5)	15,0	32,4	0,345
Urinteststreifen Protein (g/l)	0,85 (0,5 - 1,75)	0,3	2,5	1,0 (0,75 - 1,5)	0,7	2,0	0,854

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Für das Serumcreatinin konnte zwar ein Abfall von 273 µmol/l im Median bei Aufnahme auf 224,5 µmol/l im Median bei Entlassung gesehen werden, jedoch stellte sich der Unterschied für die beiden Zeitpunkte im Wilcoxon-Test als nicht signifikant heraus. Auch die Verbesserung der eGFR nach der MDRD-Methode war nicht signifikant.

In der Urindiagnostik fiel sowohl im Teststreifen als auch im Sediment zu beiden Untersuchungszeitpunkten eine ausgeprägte Erythrozyturie auf, die sich nicht signifikant unterschied. Die Untersuchung auf dysmorphe Erythrozyten erfolgte in sechs von acht Fällen am Anfang des stationären Aufenthalts. Im Median lag der Anteil der dysmorphe Erythrozyten bei 82,5% (1. Quartil 45%, 3. Quartil 92,25%, Minimum 30%, Maximum 99%), wobei der Anteil an Akanthozyten 3,5% im Median (1. Quartil 1,5%, 3. Quartil 17%, Minimum 0%, Maximum 50%) betrug.

Tabelle 4.24 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen (UT)

UT Leukozyten	negativ	≤ 25	≤ 75	≤ 100	≤ 250	≤ 500	k.A.	p (WT)
Aufnahme	-	4 (50%)	3 (37,5%)	-	1 (12,5%)	-	-	0,705
Entlassung	-	2 (25%)	4 (50%)	-	-	-	2 (25%)	
UT Erythrozyten	negativ	≤ 25	≤ 50	≤ 150	≤ 250	> 250	k.A.	p (WT)
Aufnahme	-	1 (12,5%)	-	-	-	7 (87,5%)	-	1,000
Entlassung	-	-	-	-	-	6 (75%)	2 (25%)	

k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Tabelle 4.25 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment

	0	1 – 5	6 - 10	> 10	> 50	> 100	> 500	k.A.	p (WT)
Urinsediment Leukozyten									
Aufnahme	-	2 (25%)	2 (25%)	3 (37,5%)	-	-	-	1 (12,5%)	0,102
Entlassung	-	3 (37,5%)	2 (25%)	1 (12,5%)	-	-	-	2 (25%)	
Urinsediment Erythrozyten									
Aufnahme	-	1 (12,5%)	-	1 (12,5%)	1 (12,5%)	5 (62,5%)	-	-	0,414
Entlassung	-	-	-	-	5 (62,5%)	1 (12,5%)	-	2 (25%)	

k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Sowohl im Sediment als auch im Teststreifen stellte sich für die Mehrzahl der Fälle vor und nach Entlassung eine meist moderate Leukozyturie dar. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht. Zu beiden Untersuchungszeitpunkten konnte eine pathologische Proteinurie im Teststreifen gemessen werden, die zur Entlassung etwas höher ausfiel, sich aber nicht signifikant unterschied.

Autoantikörper und Krankheitsaktivität

Bei der Autoantikörperdiagnostik der Patienten mit einer GPA konnte sowohl für die c-ANCA als auch für die PR3-Ak ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten Aufnahme bzw. Entlassung nachgewiesen werden. Für die c-ANCA sank die Plasmakonzentration von 1:320 im Median vor Therapie auf 1:90 im Median zum Zeitpunkt der Entlassung. Eine ähnliche Dynamik konnte für die PR3-Ak beobachtet werden, deren Konzentration sich von 619,5 U/ml auf 84,85 U/ml im Median reduzierte. Der Rückgang der Krankheitsaktivität, bestimmt nach dem BVAS, von 24 auf 7,5 Punkte im Median war ebenfalls signifikant.

Tabelle 4.26 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS

Parameter	Aufnahme	Min	Max	Entlassung	Min	Max	p (WT)
c-ANCA (Titer)	1:320 (1:320 - 1:1000)	1:100	1:3200	1:90 (1:32 - 1:100)	1:32	1:320	0,027
PR3-Ak (U/ml)	619,5 (219,0 - 1062,0)	87,9	1383,0	84,85 (52,03 - 99,28)	35,2	105	0,017
BVAS (Punkte)	24 (18,25 - 27,5)	16	28	7,5 (5,0 - 9,0)	2	10	0,012

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

Tabelle 12.53 des Anhangs fasst die im BVAS aufgetretenen Krankheitsmanifestationen zum Zeitpunkt der Aufnahme bzw. Entlassung zusammen. Bis auf abdominale Probleme konnten bei Aufnahme für alle anderen BVAS-relevanten Organsysteme bzw. Symptomkomplexe einzelne Beteiligungen dokumentiert werden. In 87,5% der Fälle sind Allgemeinsymptome, insbesondere Myalgien (75%) und Arthralgien/Arthritiden (62,5%), aufgetreten. Des Weiteren kam es in vielen Fällen (75%) zu Manifestationen im Bereich des oberen und unteren Respirationstraktes. Besonders erwähnenswert ist das Vorhandensein von blutig nasalen Veränderungen bzw. Borken (75%), aber auch von pulmonalen Infiltraten, Pleuraergüssen und Hämoptysen (jeweils 37,5%). Alle Patienten hatten eine renale Beteiligung der Grundkrankheit. Zum Ende der stationären Behandlung war – unverändert zum Aufnahmezeitpunkt – bei allen Patienten eine pathologische Proteinurie und bei einem Großteil von 87,5% eine Hämaturie nachweisbar. Bei den Organsystemen bzw. Symptomkomplexen lässt sich lediglich für das Auftreten von Allgemeinsymptomen im Gesamten ein signifikanter Unterschied ($p = 0,031$) zwischen den Untersuchungszeitpunkten belegen. Für einzelne Manifestationen konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Die Symptome Myalgien und Arthralgien/Arthritiden traten zum Zeitpunkt der Entlassung deutlich seltener auf, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied ($p = 0,063$). Da das Einschlusskriterium für diesen Vergleich eine Aktivitätszunahme der Grundkrankheit war und alle Probanden eine remissionsinduzierende Therapie erhielten, bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,008$) hinsichtlich des Verlaufes der Grundkrankheit (progredient vs. stabil/persistierend).

Studienparameter

Für alle Studienparameter konnte im Median ein signifikanter Abfall der jeweiligen Plasmakonzentrationen zwischen den Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4.27). Die Konzentrationen der cf-DNA/NETs sank im Verlauf des stationären Aufenthaltes von im Median 380,15 ng/ml (cf-DNA/NETs_hPL)

bzw. 978,45 ng/ml (cf-DNA/NETs_bTh) auf 195,05 ng/ml (cf-DNA/NETs_hPL) bzw. 568,45 ng/ml (cf-DNA/NETs_bTh). In einem Fall wurden zum Entlassungszeitpunkt höhere cf-DNA/NETs - Werte als bei Aufnahme dokumentiert. Dieser Patientin konnten auch die höchsten Einzelwerte für die cf-DNA/NETs_hPL (Aufnahme 480,6 ng/ml, Entlassung 527 ng/ml) bzw. der cf-DNA/NETs_bTh (Aufnahme 1342,7 ng/ml, Entlassung 1457 ng/ml) zugeordnet werden. Die Plasmakonzentrationen für die cf-DNA/NETs_hPL und cf-DNA/NETs_bTh waren sowohl zum Zeitpunkt der Aufnahme als auch zum Zeitpunkt der Entlassung signifikant höher als die der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen GP und AH+/-DM (siehe auch Tabellen 12.54 - 12.57 im Anhang).

Tabelle 4.27 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Studienparameter

Parameter	Aufnahme	Min	Max	Entlassung	Min	Max	p (WT)
cf-DNA_hPL (ng/ml)	380,15 (295,28 - 429,1)	261,1	480,6	195,05 (174,0 - 212,43)	146,3	527,0	0,017
cf-DNA_bTh (ng/ml)	978,45 (802,55 - 1117,48)	664,5	1342,7	568,45 (477,33 - 640,0)	396,0	1457,0	0,017
sCD163 (ng/ml)	3,201 (1,916 - 4,010)	1,257	4,509	1,737 (1,118 - 2,815)	1,022	3,391	0,017

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt.

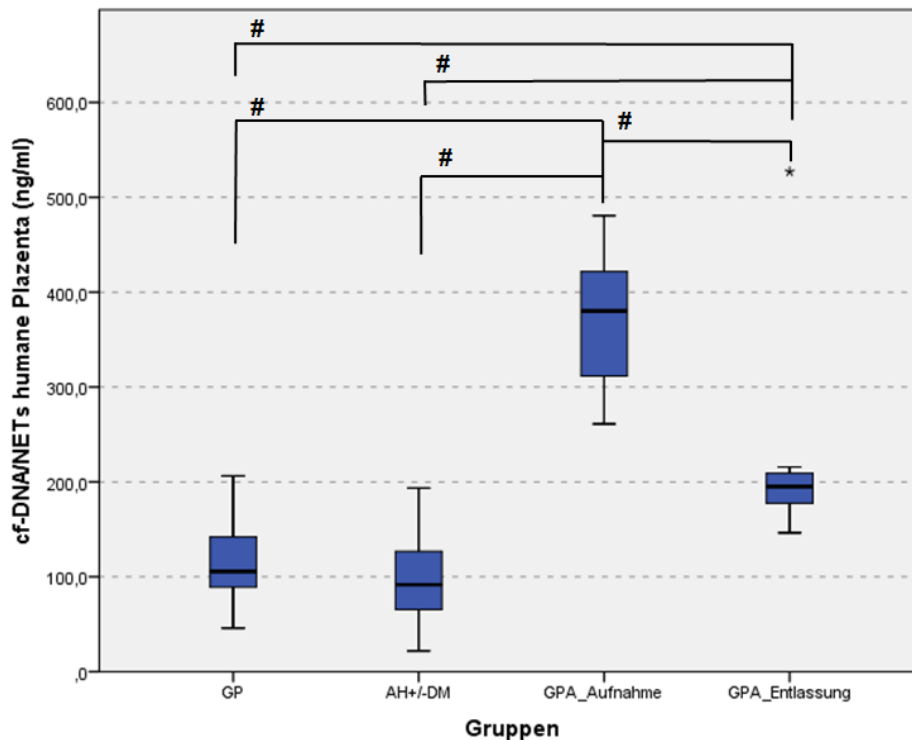


Abbildung 4.21 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: cf-DNA/NETs humane Plazenta

Im Wilcoxon-Test ($p = 0,017$) zeigte sich in der Subanalyse der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ein signifikanter Abfall der cf-DNA/NETs humanen Plazenta-Plasmakonzentration zur Entlassung ($n = 8$). Gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, $n = 15$) und den gesunden Probanden (GP, $n = 17$) – waren sowohl zur Aufnahme als auch zur Entlassung die cf-DNA/NETs humane Plazenta-Plasmakonzentrationen signifikant erhöht (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

(#: signifikanter Unterschied; *: Extremwert)

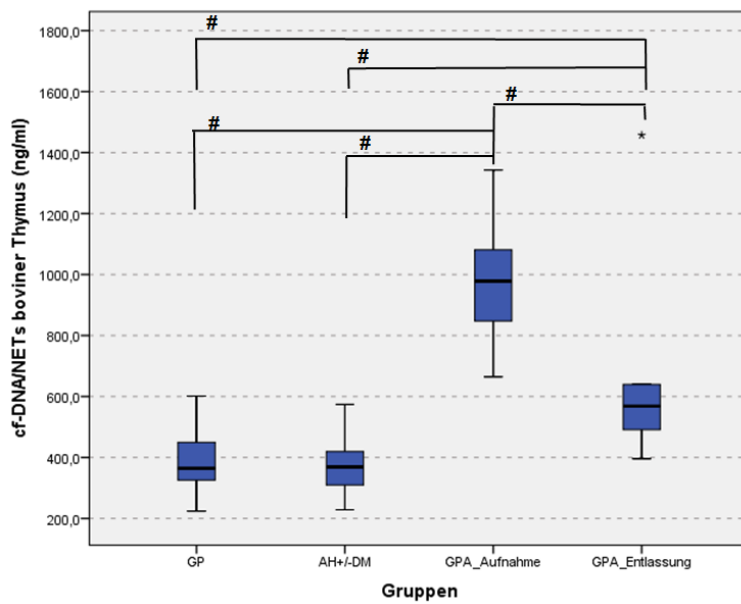


Abbildung 4.22 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: cf-DNA/NETs boviner Thymus

Im Wilcoxon-Test ($p = 0,017$) zeigte sich in der Subanalyse der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ein signifikanter Abfall der cf-DNA/NETs boviner Thymus - Plasmakonzentration zur Entlassung ($n = 8$). Gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, $n = 15$) und den gesunden Probanden (GP, $n = 17$) – waren sowohl zur Aufnahme (jeweils $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test) als auch zur Entlassung (jeweils $p = 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test) die cf-DNA/NETs boviner Thymus - Plasmakonzentrationen signifikant erhöht. (#: signifikanter Unterschied; *: Extremwert)

Auch der Median des sCD163 sank im Rahmen der stationären Behandlung signifikant von 3,201 ng/ml auf 1,737 ng/ml. Beim sCD163 wurde für alle Patienten eine höhere Plasmakonzentration zur Aufnahme im Vergleich zur Entlassung bestimmt. Gegenüber den gesunden Probanden bestand zum Zeitpunkt der Aufnahme, aber nicht mehr bei Entlassung, ein signifikanter Unterschied. Für die Patienten mit einer AH+/-DM konnte für den sCD163 zu keinem der beiden Untersuchungszeitpunkte ein signifikanter Unterschied zu den GPA-Patienten gesehen werden (siehe auch Tabellen 12.58 und 12.59 im Anhang).

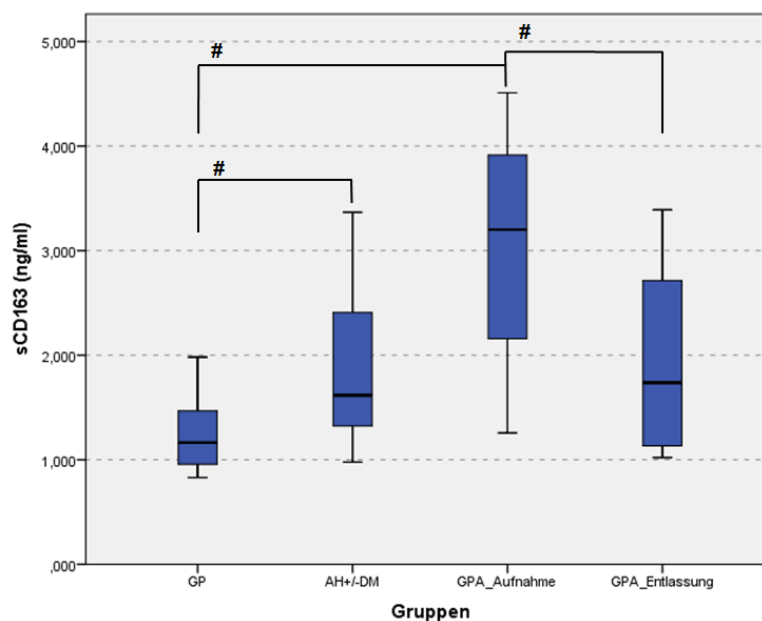


Abbildung 4.23 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: sCD163

Im Wilcoxon-Test ($p = 0,017$) zeigte sich in der Subanalyse der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) ein signifikanter Abfall der sCD163-Plasmakonzentration zur Entlassung ($n = 8$). Im Vergleich zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen bestand lediglich ein signifikanter Unterschied ($p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test) der GPA-Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme mit den gesunden Probanden (GP, $n = 17$). Die sCD163-Plasmakonzentrationen der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus (AH+/-DM, $n = 15$) - Gruppe war ebenfalls gegenüber den Gesunden signifikant erhöht ($p^* = 0,004$). (#: signifikanter Unterschied)

4.8 Einfluss einer Cyclophosphamidtherapie

Für vier Patienten mit der Erstdiagnose einer GPA erfolgte die weitere Beobachtung im Verlauf der Therapie mit Cyclophosphamid. Die zwei männlichen bzw. zwei weiblichen Patienten/innen waren zum Zeitpunkt des Therapiebeginns im Median 59,5 Jahre (1. Quartil 54,5 Jahre; 3. Quartil 66 Jahre) alt. Das Höchstalter betrug 67 Jahre, der jüngste Patient war 54 Jahre alt. In drei Fällen war eine RPGN Typ 3 – einmal fokale Form, zweimal > 50% Halbmonde – bekannt. Bei dem vierten Patienten lag keine Nierenbeteiligung vor, stattdessen konnten granulomatöse Veränderungen im Bereich des Urogenitaltraktes gesehen werden. Eine arterielle Hypertonie wurde in den drei Fällen der renalen Beteiligung der Grundkrankheit erstmals diagnostiziert und therapiert. Der vierte Patient hatte keine arterielle Hypertonie. Ein Diabetes mellitus oder eine KHK lag bei keinem der Patienten vor. Ein Patient hatte eine Hyperlipidämie und betrieb einen fortgesetzten Nikotinabusus. Chronische Harnwegsinfekte traten vor der Therapie mit Cyclophosphamid nur bei einem Probanden auf, nach Ende des Therapieregimes klagten zwei der Probanden (50%) über rezidivierende Harnwegsinfekte. Eine chronische Pyelonephritis war bei keinem der Probanden bekannt. Hinsichtlich der Komorbiditäten bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten. Zwei Patienten, von denen jeweils einer weiblich bzw. männlich war, bekamen insgesamt sechs Kurse Cyclophosphamid verabreicht. Die anderen beiden Patienten, ebenfalls einmal männlich bzw. weiblich, erhielten sieben Kurse. Der Vergleich der Parameter wurde zwischen den Zeitpunkten vor und nach erfolgter Cyclophosphamid-Pulstherapie durchgeführt. Vor Therapiebeginn lag der Schwerpunkt der aufgetretenen Symptomatik neben Allgemeinsymptomen wie Nachtschweiß und Abgeschlagenheit im Bereich des oberen Respirationstraktes und des Muskel- sowie Skelettsystems. Nach Therapie zeigten sich die einzelnen Symptome zu einem Großteil regredient bzw. traten in einer verminderten Häufigkeit auf. Ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Manifestation der einzelnen Symptome konnte zwischen den zwei Untersuchungszeitpunkten nicht nachgewiesen werden. Tabelle 12.60 des Anhangs vermittelt einen Überblick über die Häufigkeit der aufgetretenen Symptome vor und nach Therapie.

Blutbild und CRP

Tabelle 4.28 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Differentialblutbild und CRP

Parameter	vor Cyclo	Min	Max	nach Cyclo	Min	Max	p (WT)
Erythrozyten (10E12/l)	3,96 (3,48 - 4,51)	3,37	4,64	3,67 (3,46 - 4,66)	3,39	4,98	0,465
Hb (mmol/l)	6,85 (6,18 - 7,3)	6,10	7,30	6,95 (6,38 - 7,53)	6,20	7,70	0,581
Hk (l/l)	0,325 (0,285 - 0,365)	0,28	0,37	0,34 (0,318 - 0,385)	0,31	0,40	0,197
Thrombozyten (10E9/l)	283,5 (261 - 546)	259	628	345 (192,25 - 443,75)	161	457	0,715
Leukozyten (10E9/l)	14,55 (14,15 - 15,98)	14,1	16,4	8,86 (6,77 - 11,35)	6,7	11,6	0,068
Neutrophile (%)	83,85 (81,2 - 87,1)	80,5	88,0	82,2 (74,3 - 88,08)	72,4	89,3	0,715
Eosinophile (%)	1,55 (0,33 - 3,23)	0	3,7	0,65 (0,15 - 1,83)	0,1	2,1	0,465
Basophile (%)	0,15 (0,03 - 0,35)	0	0,4	0,1 (0,03 - 0,55)	0	0,7	0,705
Lymphozyten (%)	6,2 (4,18 - 12,95)	4,0	14,7	11,0 (8,38 - 14,53)	7,5	15,7	0,465
Monozyten (%)	7 (3,83 - 8,08)	3,1	8,1	6,2 (2,75 - 9,28)	2,2	9,7	1,000
Neutrophile (10E9/l)	12,201 (11,488 - 13,926)	11,32	14,43	7,2424 (5,1085 - 9,8890)	4,84	10,33	0,068
Lymphozyten (10E9/l)	0,9044 (0,6612 - 1,8331)	0,66	2,07	0,9583 (0,7961 - 1,1449)	0,77	1,18	0,715
Monozyten (10E9/l)	1,0242 (0,5474 - 1,2756)	0,44	1,31	0,4784 (0,2681 - 0,8040)	0,25	0,86	0,068
CRP (mg/l)	173 (41,25 - 227,5)	3	240	3,87 (1,42 - 8,32)	1	9,4	0,144

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Cyclo: Cyclophosphamid; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Die Mediane des roten Blutbilds – Erythrozytenzahl, Hb und Hk – waren sowohl vor als auch nach Cyclophosphamid-Pulstherapie einer Anämie zuzuordnen, ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten bestand nicht. Die Anzahl der Gesamtleukozyten entsprach initial mit 14,55 10E9/l im Median einer Leukozytose. Nach Cyclophosphamidtherapie lag sie mit 8,86 10E9/l im Median im klinischen Normbereich. Die Reduktion der Leukozytenzahl stellte sich aber nur tendenziell dar und war nicht signifikant. Für die einzelnen Untergruppen der Leukozyten konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden. Sowohl vor als auch nach Cyclophosphamid-Pulstherapie lag ein hoher Anteil neutrophiler Granulozyten von 83,85% bzw. 82,2% vor. Die absolute Anzahl der Neutrophilen und Monozyten stellte sich nach Therapie deutlich niedriger als vor Therapiebeginn dar, signifikant waren die Unterschiede aber ebenfalls nicht. Trotz einem deutlich erhöhtem CRP von 173 mg/l im Median vor der Cyclophosphamid - Pulstherapie und einem normwertigen Median von 3,87 mg/l nach Therapie stellte sich im Vergleich der abhängigen Stichproben im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied dar.

Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Urindiagnostik

Tabelle 4.29 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Retentionsparameter, eGFR (MDRD) und Proteinurie

Parameter	vor Cyclo	Min	Max	nach Cyclo	Min	Max	p (WT)
Creatinin (µmol/l)	198 (100 - 446,75)	84	513	127,5 (69,25 - 188)	53	205	0,068
Harnstoff (mmol/l)	12,5 (8,49 - 19,63)	8,25	20,9	12 (6,96 - nicht vorhanden)	6,96	20,6	0,109
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m²)	30,9 (12,6 - 60,0)	10,8	65,4	46,2 (32,4 - 96,9)	31,2	110,4	0,068
Urinstreifen Protein (g/l)	0,6 (0,125 - 0,925)	0	1	0,125 (0,0125 - 1,55)	0	2	1,000

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Cyclo: Cyclophosphamid; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Betrachtet man die Mediane für das Creatinin und die eGFR (MDRD), kam es nach erfolgter Cyclophosphamid-Pulstherapie zu einer Reduktion des Serumcreatinins von 198 µmol/l auf 127,5 µmol/l im Median und auch die eGFR (MDRD) verbesserte sich dementsprechend. Die Veränderungen hatten aber nur tendenziellen Charakter, sie waren nicht signifikant. Für die Parameter Serumharnstoff und Proteinurie im Teststreifen stellten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten dar, obwohl die Proteinurie von 0,6 g/l auf 0,125 g/l im Median sank.

Tabelle 4.30 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Leuko- und Erythrozyturie im Urinstreifen (UT)

UT Leukozyten	negativ	≤ 25	≤ 75	≤ 100	≤ 250	≤ 500	k.A.	p (WT)
vor Cyclo	-	1 (25%)	1 (25%)	-	1 (25%)	-	1 (25%)	0,157
nach Cylo	-	1 (25%)	-	1 (25%)	-	1 (25%)	1 (25%)	
UT Erythrozyten	negativ	≤ 25	≤ 50	≤ 150	≤ 250	> 250	k.A.	p (WT)
vor Cyclo	-	-	-	-	-	3 (75%)	1 (25%)	0,102
nach Cylo	-	2 (50%)	-	-	1 (25%)	-	1 (25%)	

Cyclo: Cyclophosphamid; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Die Verteilung der Schweregrade der Leukozyturie, sowohl im Teststreifen als auch im Urinsediment, ist vor und nach Therapie homogen und unterscheidet sich nicht signifikant. Die Erythrozyturie fiel initial von der Intensität in beiden Messverfahren zwar stärker aus, ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten wurde dennoch nicht beobachtet.

Die Bestimmung der dysmorphen Erythrozyten erfolgte bei allen vier Patienten vor Therapiebeginn. Im Median betrug ihr Anteil 40% (1. Quartil 7,5%, 3. Quartil 80%, Minimum 0%, Maximum 90%), wobei der Anteil an Akanthozyten nur bei 1% im Median (1. Quartil 0%, 3. Quartil 5%, Minimum 0%, Maximum 6%) lag. Bei dem Patienten mit einer granulomatösen Urozystitis und ohne renale Manifestation der GPA wurden dementsprechend keine dysmorphen Erythrozyten im Urinsediment gefunden.

Tabelle 4.31 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment

	0	1 – 5	6 - 10	> 10	> 50	> 100	> 500	k.A.	p (WT)
Urinsediment Leukozyten									
vor Cylo	-	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	-	-	1 (25%)	-	1,000
nach Cylo	-	1 (25%)	-	2 (50%)	-	1 (25%)	-	-	
Urinsediment Erythrozyten									
vor Cylo	-	-	1 (25%)	1 (25%)	-	2 (50%)	-	-	0,109
nach Cylo	1 (25%)	1 (25%)	-	1 (25%)	1 (25%)	-	-	-	

Cylo: Cyclophosphamid; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Autoantikörper und Krankheitsaktivität

Tabelle 4.32 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Autoantikörper und Krankheitsaktivität im BVAS

Parameter	vor Cylo	Min	Max	nach Cylo	Min	Max	p (WT)
c-ANCA (Titer)	1:660 (1:320 - 1:1000)	1:320	1:1000	1:55 (1:10 - 1:265)	1:10	1:320	0,102
PR3-Ak (U/ml)	615,5 (189 - 1240)	112	1383	48,8 (15,25 - 107,85)	12,6	119	0,144
BVAS (Punkte)	25,5 (10 - 27,5)	5	28	5 (2,75 - 8)	2	9	0,109

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Cylo: Cyclophosphamid; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Im Rahmen der Cyclophosphamid-Pulstherapie kam es zu einem Abfall der Autoantikörper von 1:660 auf 1:55 im Median für die c-ANCA bzw. von 615,5 U/ml auf 48,8 U/ml im Median für die PR3-Ak. Rechnerisch ließ sich im Wilcoxon-Test jedoch kein signifikanter Unterschied für die beiden Parameter zwischen den Untersuchungszeitpunkten nachweisen. Auch für die Krankheitsaktivität im BVAS ergab sich kein signifikanter Unterschied, obwohl es zu einer Abnahme von 25,5 auf 5 Punkte im Median kam. Bei einem Patienten blieb der BVAS mit 5 Punkten nach Therapie unverändert zum Vorwert.

Studienparameter

Tabelle 4.33 – Subanalyse Cyclophosphamidtherapie: Studienparameter

Parameter	vor Cylo	Min	Max	nach Cylo	Min	Max	p (WT)
cf-DNA_hPI (ng/ml)	375,5 (265,35 - 429,1)	239,1	436,5	114,6 (101,85 - 141,08)	97,9	149,6	0,068
cf-DNA_bTh (ng/ml)	986,05 (760,8 - 1117,48)	693,4	1153,6	410,45 (317,03 - 503,2)	290,5	529,5	0,068
sCD163 (ng/ml)	3,914 (1,574 - 4,408)	0,857	4,509	1,0595 (0,924 - 1,345)	0,890	1,428	0,144

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Cylo: Cyclophosphamid; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test

Betrachtet man die Mediane für die cf-DNA/NETs, dann liegen die Werte nach erfolgter Cyclophosphamidtherapie deutlich unter denen vor Beginn der Therapie. Die medianen Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs_hPI fielen von 375,5 ng/ml auf 114,6 ng/ml, die der cf-DNA/NETs_bTh verringerte sich von 986,05 ng/ml auf 410,45 ng/ml. Im paarweisen Vergleich der abhängigen Stichproben im Wilcoxon-Test konnte jedoch keine ausreichende Signifikanz der beschriebenen Dynamik nachgewiesen werden. Es wurde lediglich eine Tendenz auf-

gezeigt. Unter Verwendung des T-Tests für verbundene Stichproben, der die Mittelwerte und nicht die Mediane zum Vergleich heranzieht, stellte sich der Unterschied für die cf-DNA/NETs als signifikant heraus (Vergleich Tabelle 12.61 des Anhangs). Die Bedingung der Normalverteilung der Einzelwerte war für beide Messreihen der cf-DNA/NETs erfüllt. Die Werte der cf-DNA/NETs vor Therapie unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppen GP und AH+/-DM. Nach Therapie lagen die Werte der cf-DNA/NETs auf einem ähnlichen Niveau wie die der Kontrollgruppen, ein signifikanter Unterschied bestand nicht mehr (siehe auch Abschnitt 12.6.2. des Anhangs)

Der sCD163 zeigte nach erfolgter Therapie mit Cyclophosphamid ebenfalls einen Abfall der Plasmakonzentration von 3,914 ng/ml auf 1,0595 ng/ml im Median. Der Unterschied stellte sich allerdings, sowohl im Wilcoxon- als auch im T-Test, als nicht signifikant heraus. Interessanterweise bestand trotz der hohen sCD163-Plasmakonzentrationen vor Therapie kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen (siehe auch Abschnitt 12.6.2 des Anhangs).

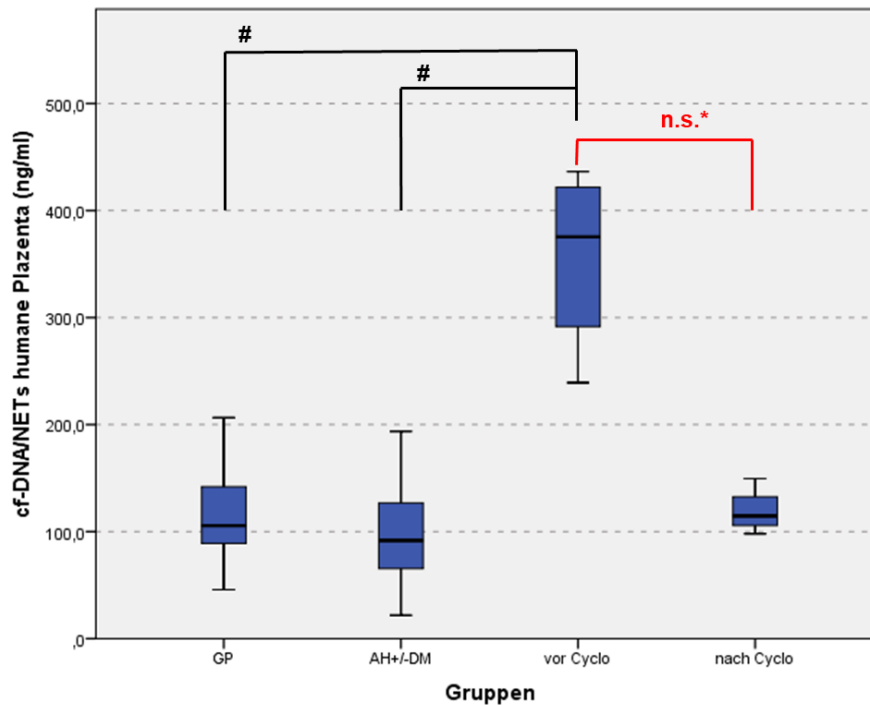


Abbildung 4.24 – Subanalyse Cyclophosphamid: cf-DNA/NETs humane Plazenta

Der Abfall der cf-DNA/NETs humanen Plazenta unter Cyclophosphamid (Cyclo, n = 4) ist im parameterfreien Wilcoxon-Test nicht signifikant (p = 0,068) sondern nur tendenziell. Im T-Test für abhängige Stichproben besteht ein signifikanter Unterschied (p = 0,016) → n.s.*: nicht signifikant im parameterfreien Test, aber signifikanter Unterschied im parametrischen Test bei vorliegender Normalverteilung.

Nur die Plasmakonzentrationen vor Cyclophosphamidtherapie unterschieden sich signifikant („#“) zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – den gesunden Probanden (GP, n = 17; p* < 0,001 im Mann-Whitney-U-Test) sowie der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus - Gruppe (AH+/-DM, n = 15; p* = 0,001 im Mann-Whitney-U-Test).

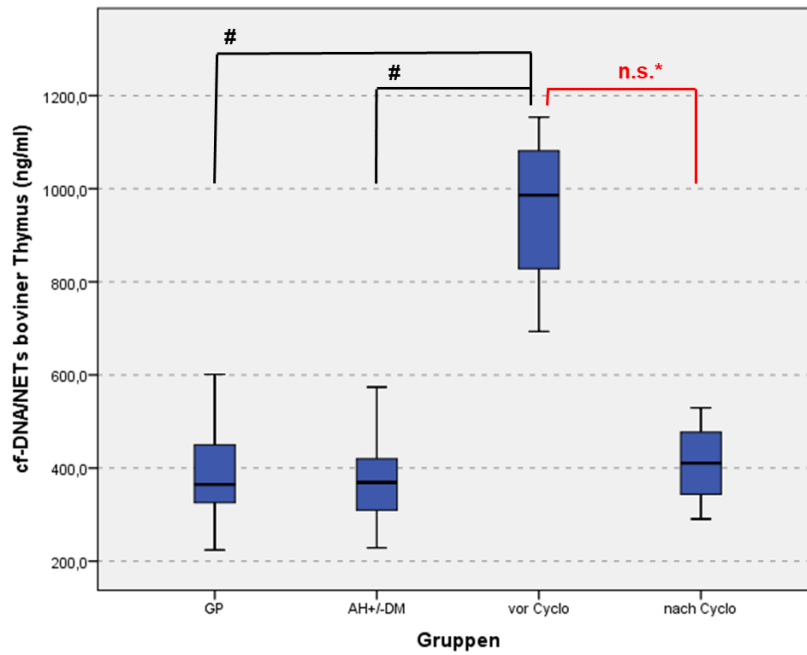


Abbildung 4.25 – Subanalyse Cyclophosphamid: cf-DNA/NETs boviner Thymus

Der Abfall der cf-DNA/NETs boviner Thymus unter Cyclophosphamid (Cyclo, n = 4) ist im parameterfreien Wilcoxon-Test nicht signifikant ($p = 0,068$) sondern nur tendenziell. Im T-Test für abhängige Stichproben besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,012$) → n.s.*: nicht signifikant im parameterfreien Test, aber signifikanter Unterschied im parametrischen Test bei vorliegender Normalverteilung.

Nur die Plasmakonzentrationen vor Cyclophosphamidtherapie unterschieden sich signifikant („#“) zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen – den gesunden Probanden (GP, n = 17; $p^* < 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test) sowie der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus - Gruppe (AH+/-DM, n = 15; $p^* = 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test).

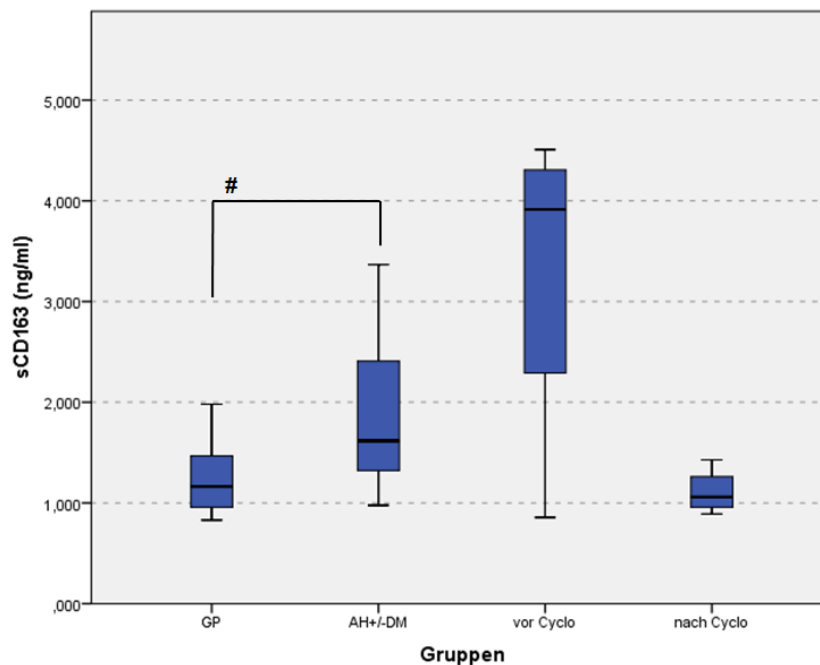


Abbildung 4.26 – Subanalyse Cyclophosphamid: sCD163

Der Abfall des sCD163 unter Cyclophosphamid (Cyclo, n = 4) ist weder im parameterfreien Wilcoxon-Test ($p = 0,144$) noch im T-Test für abhängige Stichproben ($p = 0,061$) signifikant.

Die sCD163-Plasmakonzentrationen vor und nach Cyclophosphamidtherapie unterschieden sich auch nicht zu denen der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen. Die gesunden Probanden (GP, n = 17) hatten signifikant („#“, $p^* = 0,004$ im Mann-Whitney-U-Test) niedrigere sCD163-Plasmakonzentrationen gegenüber der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus - Gruppe (AH+/-DM, n = 15).

4.9 Einfluss einer Plasmaaustauschtherapie

In einer weiteren Subanalyse, welche fünf Patienten der GPA-Gruppe umfasste, wurde der Einfluss einer Plasmaaustauschtherapie auf die Höhe der cf-DNA/NETs und dem sCD163 untersucht. Es erfolgten bei jeweils zwei Probanden insgesamt 6 bzw. 7 Kurse und bei einem Probanden 8 Kurse eines vom Volumen her einfachen Plasmaaustauschs. Im Median wurden 7 (1. Quartil 6; 3. Quartil 7,5) Plasmaaustauschtherapien durchgeführt. Substituiert wurde mit Fresh Frozen Plasma (FFPs). Unter der Plasmaaustauschtherapie kam es zu einem signifikanten Abfall der Plasmakonzentrationen, sowohl des CRPs, der Autoantikörper (c-ANCA und PR3-Ak) als auch der cf-DNA/NETs (in beiden Messreihen). Die Krankheitsaktivität im BVAS reduzierte sich ebenfalls signifikant. Tendenziell fiel die Plasmakonzentration des sCD163 auch, der Unterschied war aber nicht signifikant. Die Abbildungen 4.27 und 4.28 stellen die Dynamiken des Verlaufs der Studienparameter bei zwei Patienten mit jeweils 6 Kursen dar. Teilweise ist es zwischen den Kursen zu einem erneuten Anstieg der Plasmakonzentrationen gekommen.

Tabelle 4.34 – statistische Kennzahlen vor und nach Plasmaaustauschtherapie

Parameter	vor Plasmaaustausch	Min	Max	nach Plasmaaustausch	Min	Max	p (WT)
Creatinin (µmol/l)	386 (305 - 492,5)	265	513	233 (213,5 - 385)	207	529	0,080
eGFR (ml/min/1,73m²)	12,6 (9,6 - 16,5)	8,4	18,0	22,2 (14,4 - 24,6)	10,2	27,0	0,080
CRP (mg/l)	190 (70,45 - 297,5)	15,90	402	7,84 (1,54 - 13,4)	1,35	16	0,043
c-ANCA (Titer)	1:1000 (1:320 - 1:2100)	1:320	1:3200	1:32 (1:21 - 1:210)	1:10	1:320	0,043
PR3-Ak (U/ml)	735,0 (290,0 - 1201,5)	152,0	1383,0	51,5 (22,3 - 236,0)	12,9	321,0	0,043
BVAS (Punkte)	25 (17 - 28)	16	28	6 (5 - 17,5)	5	26	0,043
cf-DNA_hPI (ng/ml)	344,1 (245,9 - 380,15)	212,8	395,3	139,0 (72,25 - 211,7)	61,5	230,6	0,042
cf-DNA_bTh (ng/ml)	937,7 (602,6 - 1001,5)	540,7	1009,1	454,8 (201,3 - 608,15)	191,3	636,9	0,043
sCD163 (ng/ml)	2,91 (1,9495 - 3,7315)	1,257	3,740	1,544 (0,235 - 2,562)	0,205	2,653	0,080

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt. Die Berechnung der eGFR erfolgte nach der MDRD-Methode.

Für beide cf-DNA/NETs bestand vor, aber nicht mehr nach Plasmaaustauschtherapie, ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen GP und AH+/-DM. Die Plasmakonzentration an sCD163 war gegenüber den gesunden Probanden vor Austausch auch signifikant erhöht. Nach Austausch bestand kein signifikanter Unterschied mehr. Im Vergleich mit der AH+/-DM-Gruppe wurde bei der sCD163-Plasmakonzentration weder vor noch nach Plasmaaustauschtherapie ein signifikanter Unterschied gesehen (siehe auch Abschnitt 12.7 im Anhang).

Unmittelbar nach Abschluss des letzten Kurses der Plasmaaustauschtherapie konnte keine signifikante Verbesserung der Nierenfunktionsparameter – Serumcreatinin und eGFR (MDRD) – dokumentiert werden (siehe Tabelle 4.34). Nach einer gewissen Latenzzeit – zum Zeitpunkt der Entlassung – verbesserte sich die Nierenfunktion signifikant (siehe Tabelle 4.35). Im Median betrug die Zeit zwischen dem letzten Plasmaaustausch und der Entlassung 10 Tage (1. Quartil 6,5 Tage; 3. Quartil 35,5 Tage; Minimum 6 Tage; Maximum 55 Tage). Einschränkung anzumerken ist, dass bei einem Patienten mit einem zeitlichen Abstand von 15 Tagen zur Plasmaaustauschtherapie (insgesamt 8 Kurse) ein weiteres Plasmaphereseverfahren – die Immunadsorption (insgesamt 6 Kurse) – durchgeführt wurde.

Tabelle 4.35 – Vergleich der Nierenfunktion vor Plasmaaustauschtherapie und zum Zeitpunkt der Entlassung

Parameter	vor Plasmaaustausch	Min	Max	Entlassung	Min	Max	p (WT)
Creatinin (µmol/l)	386 (305 - 492,5)	265	513	207 (164 - 272,5)	153	300	0,043
eGFR (ml/min/1,73m²)	12,6 (9,6 - 16,5)	8,4	18,0	27,0 (19,8 - 31,2)	19,80	31,80	0,043

Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (WT): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Wilcoxon-Test. Signifikante Unterschiede sind farblich hinterlegt. Die Berechnung der eGFR erfolgte nach der MDRD-Methode.

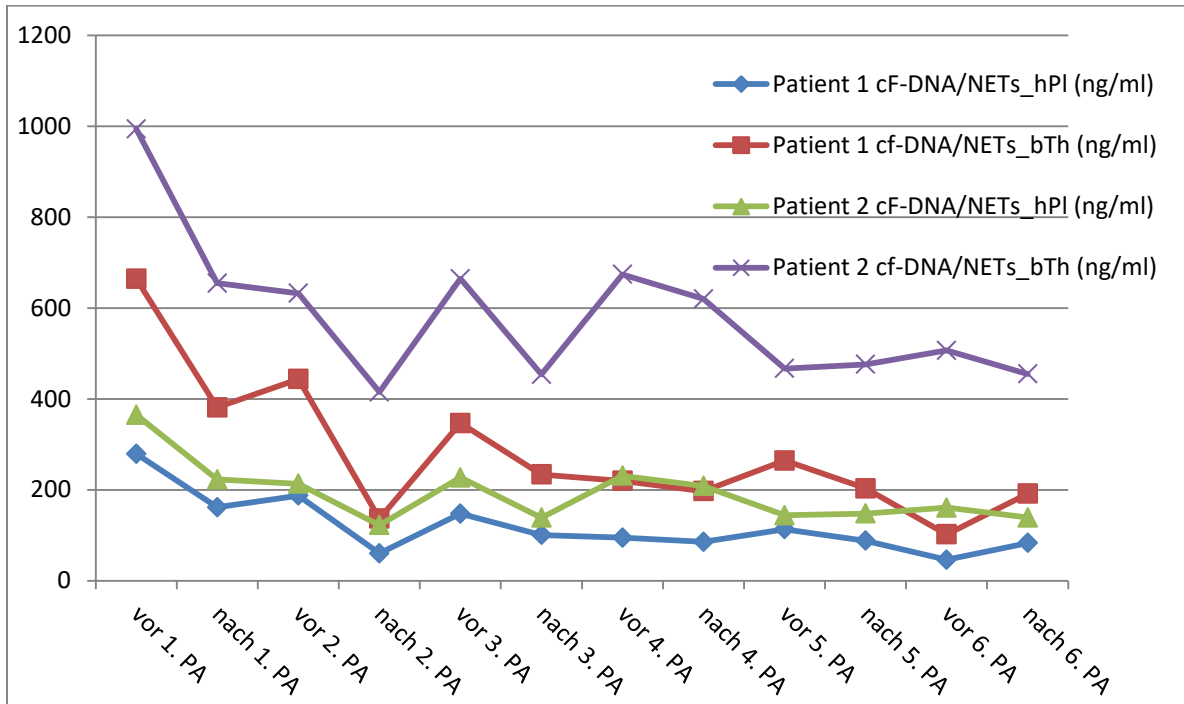


Abbildung 4.27 – Plasmatische cf-DNA/NETs-Konzentrationen unter einer Plasmaaustauschtherapie

Dargestellt sind die Veränderungen der Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs_hPI bzw. cf-DNA/NETs_bTh zweier Patienten unter einer Plasmaaustauschtherapie von jeweils 6 Kursen.

(cf-DNA/NETs_hPI: cf-DNA/NETs humane Plazenta; cf-DNA/NETs_bTh: cf-DNA/NETs boviner Thymus; PA: Plasmaaustausch)

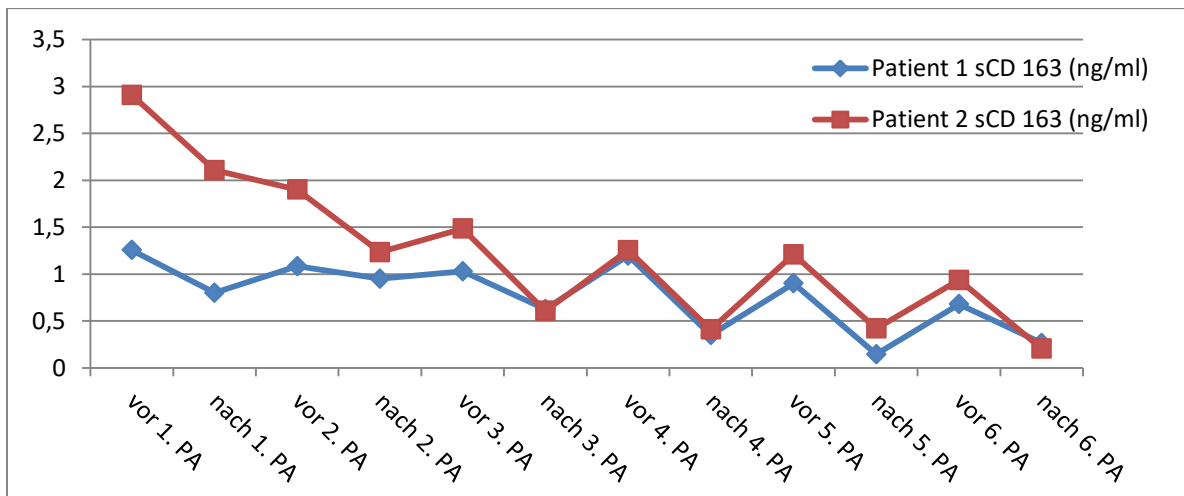


Abbildung 4.28 – Plasmatische sCD163-Konzentrationen unter einer Plasmaaustauschtherapie

Dargestellt sind die Veränderungen der Plasmakonzentrationen an sCD163 zweier Patienten unter einer Plasmaaustauschtherapie von jeweils 6 Kursen. (sCD163: soluble Cluster of Differentiation 163; PA: Plasmaaustausch)

5 Diskussion

5.1 cf-DNA/NETs - ein Parameter zur Aktivitätsbestimmung von AAVs?

Erstmalig bestimmten Kessenbrock et al. 2009 in einer kleinen Stichprobe höhere Serumkonzentrationen an NET-Bestandteilen (MPO-DNA-Komplexe) bei Patienten mit einer aktiven AAV im Vergleich zu Patienten mit einer Remission der Grunderkrankung, gesunden Probanden und Patienten mit einer multiplen Sklerose [48]. Verlaufsbeobachtungen, Korrelationen mit der Krankheitsaktivität, klinischen und paraklinischen Parametern erfolgten nicht. Die Eignung der cf-DNA/NETs als klinischer Parameter ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die höchsten Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs konnten in beiden Messreihen (humane Plazenta und boviner Thymus) den Patienten mit einer GPA zugeordnet werden, die sich signifikant von denen der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) unterschieden (siehe Abbildungen 4.12. und 4.13). Die in der Literatur für den SLE beschriebene verminderte Fähigkeit zur NET-Degradation [84, 106, 126] und erhöhte plasmatische cf-DNA-Konzentrationen [126, 127, 173] bestätigten sich im Falle der cf-DNA/NETs_{hPI}-Messreihe. Deren mediane Plasmakonzentration unterschied sich signifikant von den anderen beiden Kontrollgruppen (AH+/-DM, GP). Für die Plasmakonzentrationen der SLE-Gruppe nach der cf-DNA/NETs_{bTh}-Bestimmung bestanden allerdings keine Gruppenunterschiede (siehe Abbildungen 4.12 und 4.13). Bei asiatischen Patienten mit einer MPA wurde neben einem gesteigerten Potenzial zur NET-Induktion neutrophiler Granulozyten auch von einer verminderten Clearance der NETs [189, 190] und signifikant erhöhten plasmatischen cf-DNA-Konzentrationen berichtet [191]. Die Mediane der plasmatischen cf-DNA/NETs der MPA-Patienten lagen in der vorliegenden Arbeit aber nur im mittleren Bereich zwischen den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen mit ihren niedrigen Medianen und den hohen Gruppenmedianen der GPA-Patienten. Signifikante Gruppenunterschiede wurden nicht gesehen (siehe Abbildungen 4.12. und 4.13). Einschränkend ist jedoch auf die im Gegensatz zu den anderen Studiengruppen geringe Probandenanzahl von nur fünf Patienten sowie das im Vergleich zu der GPA-Gruppe vorliegende niedrigere Niveau (medianer BVAS: GPA 7 vs. MPA 5) und geringere Spektrum der Krankheitsaktivität (Spannbreite im BVAS: GPA 0...28, MPA 0...8) der MPA Patienten hinzuweisen. Bei keinem der MPA-Patienten lag ein progredienter Krankheitsverlauf vor. Andererseits bestand eine hohe bis sehr hohe Korrelation zwischen der Höhe der Autoantikörper bzw. der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen und der Krankheitsaktivität im BVAS. Zwischen der Höhe der plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen und der Titer der p-ANCA bzw. MPO-Ak konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang gesehen werden (siehe Tabellen 12.32 und 12.33). Die Fähigkeit von Seren MPO-ANCA positiver Patienten zur NET-Induktion korrelierte bei Nakazawa et al. mit der Krankheitsaktivität im BVAS, so dass eine vermehrte NET-Bildung ebenfalls mit einem höheren BVAS-Scoring assoziiert war. Es bestand aber auch kein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der NET-Bildung und der Höhe der MPO-ANCA, obwohl die MPO-ANCA der entscheidende NET-induzierende Faktor waren [190]. In der vorliegenden Arbeit hatten alle Patienten mit einer MPA eine renale Beteiligung. Allerdings bestand entweder nur noch eine sehr geringe renale Aktivität der Grunderkrankung oder es handelte sich um eine chronische Schädigung. Die positive Korrelation zwischen der Höhe der plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen und dem Ausmaß der Erythrozyturie im Teststreifen war aufgrund der Testanzahl von nur zwei Proben nicht aussagekräftig.

Erhöhte plasmatische Konzentrationen an cf-DNA/NETs bzw. von NET-Bestandteilen bei Patienten mit einer AAV konnten parallel auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben werden [51, 191, 192]. Eine explizite Un-

terteilung in die Entitäten GPA und MPA erfolgte in den europäischen Studien nicht. Die AAV-Patienten eines chinesischen Kollektives waren alle p-ANCA und MPO-AK positiv [191], entsprechend dem deutlich häufigeren Auftreten MPO-ANCA positiver Vaskulitiden in Ostasien [10]. Die cf-DNA-Konzentrationen von Patienten mit einer aktiven AAV (durchschnittliches BVAS-Scoring von 19,9 Punkten) waren bei Wang et al. ebenfalls gegenüber denen gesunder Probanden signifikant erhöht. Die Autoren fanden aber keinen Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen von aktiven AAV-Patienten und denen in Remission [191]. Im Gegensatz dazu konnten in der vorliegenden Arbeit sowohl für die Differenzierung zwischen einer hohen ($BVAS \geq 6$) vs. niedrigen Aktivität ($BVAS \leq 5$) als auch zwischen einem progredienten vs. stabilen Verlauf der GPA signifikante Unterschiede der plasmatischen cf-DNA-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die Plasmakonzentrationen der jeweiligen Gruppe mit der höheren Krankheitsaktivität ($BVAS \geq 6$ und GPA_progredient) waren gegenüber beiden nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) signifikant höher. Diese Unterschiede bestanden für die Gruppen mit einer niedrigeren Krankheitsaktivität ($BVAS \leq 5$ und GPA_stabil) nicht mehr (siehe Kapitel 4.5 und 4.6). Eine schwedische Studie mit einem gemischten Patientenkollektiv aus PR3-ANCA- und MPO-ANCA-positiven AAVs konnte dieselben Zusammenhänge zwischen Patienten mit einer aktiven AAV, Patienten in Remission und gesunden Probanden aufzeigen [192]. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit und der chinesischen Studie [191] erfolgte allerdings nicht die Messung der plasmatischen cf-DNA mittels Picogreen, sondern die Bestimmung von Nukleosomen-MPO-Komplexen mittels eines ELISAs [192]. Bemerkenswerterweise ist die Krankheitsaktivität in der $BVAS \geq 6$ -Gruppe (19 Punkte im Median; 18,2 Punkte im Mittel bei Vorliegen einer Normalverteilung) mit denen der aktiven AAV-Patienten von Wang et al. ($BVAS$ 19,9 Punkte im Mittel) [191] vergleichbar. Obwohl in der $BVAS \leq 5$ -Gruppe nur bei drei Patienten eine komplette Remission ($BVAS$ 0 Punkte) bestand und ein medianer $BVAS$ -Score von 3,5 Punkten vorlag, war der Gruppenunterschied in der vorliegenden Arbeit trotz geringerer Spannbreite der Krankheitsaktivität gegenüber Wang et al. signifikant. Ein Vergleich der GPA-Probanden hinsichtlich des Vorliegens einer kompletten Remission ($BVAS$ 0 Punkte) und noch aktiver AAV ($BVAS \geq 1$ Punkte) ist in dieser Arbeit wegen der unterschiedlichen Gruppengrößen von nur 3 Patienten in Remission vs. 17 Patienten mit Aktivität der GPA nicht sinnvoll durchführbar gewesen.

Im Gegensatz zur chinesischen Arbeit [191] stellten sich positive Korrelationen auf hohem Niveau (cf-DNA_hPI $r = 0,830$; cf-DNA_bTh $r = 0,826$) zwischen dem BVAS-Scoring und den plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen dar. Höhere CRP-Werte waren in beiden Studien mit höheren cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen assoziiert, die Korrelation fiel bei Wang et al. aber deutlich schwächer aus ($r = 0,396$ gegenüber $r = 0,717$ [cf-DNA_hPI] und $r = 0,673$ [cf-DNA_bTh]) [191]. In der schwedischen Arbeit bestand weder für das CRP noch für die Krankheitsaktivität im BVAS eine Korrelation mit den plasmatischen Konzentrationen der NET-Bestandteile [192]. Insbesondere im Rahmen einer Exazerbation rheumatologischer Erkrankungen kann eine Anämie auftreten [150]. Zwischen den Parametern des roten Blutbildes (Anzahl der Erythrozyten, Hb und Hk) traten in der vorliegenden Arbeit inverse Korrelationen mit den cf-DNA/NETs auf (siehe Tabelle 4.4).

Auch in den ROC-Berechnungen konnten für beide Subanalysen der GPA-Gruppe (Differenzierung nach der Krankheitsaktivität bzw. des Krankheitsverlaufes) sowohl für die cf-DNA_hPI als auch für die cf-DNA_bTh hohe Werte von mindestens 0,850 für die Fläche unter der Kurve (AUC) ermittelt werden (siehe Tabellen 12.43 und 12.51). Plasmatische Konzentrationen von $\geq 245,05$ ng/ml für die cf-DNA_hPI (Sensitivität 0,7, Spezifität 1,0) bzw. $\geq 717,15$ ng/ml (Sensitivität 0,8, Spezifität 0,9) für die cf-DNA_bTh waren hinweisend auf eine erhöhte Aktivität der Grunderkrankung von mindestens 6 Punkten im BVAS.

Das Alter scheint keinen Einfluss auf die Höhe der plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen zu haben. Während sich die Altersmediane der beiden nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP und AH+/-DM) signifikant voneinander unterschieden, lagen die cf-DNA/NETs-Konzentrationen aber für beide Messmethoden gleichermaßen auf einem niedrigen Niveau. Zum anderen waren die SLE-Patienten gegenüber den GPA-Patienten deutlich jünger, unterschieden sich in der Höhe der cf-DNA/NETs aber nicht signifikant. Viel mehr spiegelt die Altersverteilung die klinische Realität wieder. Die Erstmanifestation des SLE (im Mittel zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr [120]) tritt in der Regel deutlich früher auf als bei den AAVs (Peak der Inzidenz im 6. bis 8. Lebensjahrzehnt [9, 11]). Eine benigne Nephrosklerose bzw. eine diabetische Nephropathie stellen Langzeitschäden dar und führen – natürlich in Abhängigkeit des Ausmaßes der arteriellen Hypertonie bzw. der diabetischen Stoffwechsellaage – tendenziell im höherem Alter zu einer zunehmenden chronischen Niereninsuffizienz [7, 150, 193]. Für die Merkmale Geschlecht, Körpergröße und Körpergewicht traten keine Gruppenunterschiede auf, somit konnte auch kein möglicher Einfluss auf die Studienparameter bewertet werden. Der höchste BMI war der AH+/-DM-Gruppe zuzuordnen, der sich von dem der gesunden Probanden signifikant unterschied. Sowohl die arterielle Hypertonie als auch der Diabetes mellitus Typ 2 treten vermehrt bei Patienten mit Übergewicht/A-dipositas auf und beides sind Kriterien der Definition des metabolischen Syndroms [150]. Da sich die cf-DNA/NETs-Konzentrationen dieser beiden nicht-autoimmunologischen Studiengruppen auf einem Niveau befanden, scheint der BMI ebenfalls keinen Einfluss auf die Höhe der cf-DNA/NETs zu haben. Für die MPA-Gruppe bestand zwar eine hohe Korrelation der cf-DNA/NETs mit dem BMI (siehe Tabelle 12.32), allerdings gingen in die Berechnung auch nur fünf Probanden ein. Im Rahmen der Blutdruckbestimmungen lagen für alle drei Parameter (Systole, Diastole, arterieller Mitteldruck) die Werte der gesunden Probanden signifikant höher als bei den Patienten mit einem SLE (siehe Tabelle 4.1). Die Höhe der Werte der cf-DNA/NETs_{hPI}-Konzentrationen stellten sich hingegen entgegengesetzt dar (siehe Abbildung 4.12). Die schlechtere Blutdruckeinstellung der gesunden Probanden (mehr als die Hälfte der Blutdruckmessungen waren einer arteriellen Hypertonie zuzuordnen, obwohl nur bei 29,4% der gesunden Probanden ein arterieller Hypertonus anamnestisch bekannt war) ist ggf. auf eine seltenere ärztliche Konsultation im Vergleich zu den anderen Studiengruppen zurückzuführen. Signifikante Korrelationen traten in der GP-Gruppe ebenso wie bei den AAVs nicht auf. Ein widersprüchliches Bild präsentierte sich für die Korrelationsanalyse der SLE- und AH+/-DM-Gruppen. In beiden Fällen bestanden signifikante Korrelationen zwischen der cf-DNA/NETs_{hPI} und den systolischen bzw. mittelarteriellen Blutdruckwerten, die im Falle der SLE-Patienten positiv und für die AH+/-DM-Gruppe invers ausfielen (siehe Tabellen 12.28 und 12.29). Ein möglicher Einfluss des Blutdrucks auf die Höhe der cf-DNA/NETs zeichnete sich letztlich nicht eindeutig ab.

SLE-Patienten mit einer verminderten NET-Clearance hatten in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen entsprechend einer ausgeprägteren Krankheitsaktivität einen höheren SLEDAI-2K-Score, wiesen signifikant höhere Titer von Anti-NET-Ak, Anti-dsDNA-Ak und ANA sowie einen höheren Komplementverbrauch auf [84, 106, 126]. Im Falle einer verminderten NET-Degradation würde man höhere plasmatische cf-DNA/NETs-Konzentrationen erwarten. Die Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs_{hPI} (nicht aber die der cf-DNA/NETs_{bTh}) der Patienten mit einem SLE waren in der vorliegenden Arbeit signifikant erhöht gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (siehe Abschnitt 4.2). Allerdings ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen und der Höhe der Autoantikörper (ANA, ds-DNA-Ak), dem CRP oder den Komplementfaktoren darstellen (siehe Tabelle 12.29). Eine signifikante Korrelation der cf-DNA/NETs mit der Krankheitsaktivität im SLEDAI-2K oder ECLAM stellte sich lediglich für die Unter-

gruppe der SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis (cf-DNA_{hPI}: SLEDAI-2K und ECLAM; cf-DNA_{bTh}: nur SLEDAI-2K), nicht aber für die Gesamtheit der SLE-Patienten dar. Demgegenüber korrelierten jedoch die ANAs (SLEDAI-2K, ECLAM) und die dsDNA-Ak der SLE-Patienten aus dem Klinikum Südstadt Rostock (SLEDAI-2K) mit der Krankheitsaktivität (siehe Tabellen 12.29 bis 12.31). Der ideale Cut-off im SLEDAI-2K zur Diskriminierung eines aktiven Erkrankungszustandes des SLE mit der Notwendigkeit zur Therapieintensivierung ist ein Score von 3 oder 4 Punkten [183]. Der mediane SLEDAI-2K-Score lag in der vorliegenden Arbeit mit 6,5 Punkten über dieser Grenze. Eine defizitäre NET-Degradation tritt vor allem im Zustand der erhöhten Aktivität des SLE auf [106]. Die individuelle Fähigkeit des NET-Abbaus schwankt aber im zeitlichen Verlauf. Der Zustand der verminderten NET-Clearance tritt anteilig seltener auf und betrifft eher eine Minderheit der SLE-Patienten [128]. Im Vergleich zu der GPA-Gruppe lagen in der SLE-Gruppe weniger Verläufe mit der Notwendigkeit einer deutlichen Intensivierung der immunsuppressiven Therapie vor. Des Weiteren könnten Unterschiede in der NET-Formierung zwischen dem SLE und der GPA ursächlich für die diskrepanten Korrelationsanalysen (u.a. hinsichtlich der Krankheitsaktivität, des Blutbilds und CRPs, der Autoantikörper sowie Nierenfunktionsparameter), die im Falle des SLE nicht signifikant ausfielen, und der nur mäßigen Erhöhung der cf-DNA_{bTh}-Messung sein. Von quantitativen und qualitativen Unterschieden der NETs von SLE- und AAV-Patienten berichtet eine Arbeit von Van Dam et al.. Während es bei den AAV-Patienten innerhalb von Stunden zur klassischen „suizidalen“ Netosis mit der Entstehung flächenmäßig größerer NETs kam, erfolgte beim SLE die NADPH-Oxidase und PAD4 unabhängige Formierung kleinerer clusterförmiger NETs ohne Lyse der Neutrophilen innerhalb von Minuten. Neben Unterschieden im Proteinbesatz war in den NETs der SLE Patienten auch mitochondriale DNA enthalten. Die quantitative NET-Bildung durch Seren von AAV-Patienten fiel signifikant höher aus und korrelierte stärker mit der Krankheitsaktivität als beim SLE [194]. Auch Pruchniak et. al berichteten von einer deutlich geringeren Kapazität der NET-Bildung neutrophiler Granulozyten von SLE-Patienten im Vergleich zu Patienten mit einer GPA [195]. Dies kann ein plausibler Erklärungsansatz für niedrigere plasmatische cf-DNA/NETs - Konzentrationen (insbesondere in der cf-DNA_{bTh}-Messreihe) der SLE-Gruppe sein. Andererseits besteht aufgrund der geringeren Größe der NETs beim SLE im Vergleich zur GPA auch die Möglichkeit einer nur vermindert erfolgten Einlagerung des fluoreszierenden Farbstoffs Picogreen, so dass die plasmatischen cf-DNA/NETs - Konzentrationen der SLE-Gruppe ggf. fälschlicherweise zu niedrig ausfielen.

Ein verminderter NET-Abbau ist mit einem häufigeren Auftreten einer Lupusnephritis assoziiert [84, 106]. SLE-Patienten mit Lupusnephritiden konnten in anderen Arbeiten auch signifikant erhöhte cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen zugeordnet werden [127, 196, 197]. Bei Vorliegen einer Lupusnephritis waren bei Zhang et al. die cf-DNA-Plasmakonzentrationen signifikant höher im Vergleich zu SLE-Patienten ohne eine renale Manifestation. Darüber hinaus korrelierte die Höhe der plasmatischen cf-DNA-Konzentrationen direkt mit dem Ausmaß der Proteinurie im 24 h-Sammelurin und indirekt mit der endogenen Creatinin-Clearance [127]. Weitere Studien bestätigten den Zusammenhang deutlich erhöhter NET-Konzentrationen und der Schwere einer Proteinurie im Rahmen einer Lupusnephritis [196, 197]. In der vorliegenden Arbeit ließen sich keine belastbaren Korrelationen zwischen den cf-DNA/NETs-Konzentrationen und den Retentionsparametern (Creatinin, Harnstoff), der eGFR (MDRD), der endogenen Creatinin-Clearance oder einer Proteinurie (im 24 h-Sammelurin bzw. Teststreifen) finden, weder für die Gesamtheit der SLE-Patienten noch für die Untergruppe mit einer Lupusnephritis (siehe Tabellen 12.13, 12.29 und 12.31). Für die Patienten mit einer Lupusnephritis bestand lediglich für beide cf-DNA/NETs eine positive Korrelation mit dem Ausmaß der Erythrozyturie im Urinsediment bzw. im Falle der cf-DNA_{bTh} auch für die Leukozyturie im Sediment. Andererseits konnte kein Unterschied im Hinblick auf die

Schwere der Erythro- oder Leukozyturie im Sediment zwischen SLE-Patienten mit oder ohne eine Lupusnephritis festgestellt werden (siehe Tabelle 12.26). Inwiefern eine glomeruläre Ursache der Erythrozyturie vorlag, konnte aufgrund nur begrenzt vorliegender Phasenkontrastmikroskopien des Urinsediments keine Aussage getroffen werden. Alles in allem hatten SLE Patienten ohne eine Lupusnephritis im Median eine höhere cf-DNA/NETs-Konzentration als deren Pendant mit der jeweiligen Manifestation, ohne dass ein signifikanter Unterschied vorlag (siehe Tabelle 12.24). Allerdings konnten einer Patientin mit einer Erstmanifestation des SLE und einer Lupusnephritis ISN-Klasse IV die höchsten cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen zugeordnet werden. Für die Retentionsparameter (Creatinin, HST), der eGFR (MDRD) und der endogenen Creatinin-Clearance stellten sich in der Gegenüberstellung Lupusnephritis vs. keine renale Manifestation aber ebenfalls keine Gruppenunterschiede dar. Einzig SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis hatten eine schwerere Proteinurie, sowohl im 24 h-Sammelurin als auch im Urinteststreifen (siehe Tabelle 12.24). Das kann aber auch Ausdruck einer chronischen Schädigung sein. In dem Patientenkollektiv von Zhang et al. waren mehr Patienten mit einer aktiven Lupusnephritis (26) vertreten [127]. Mutmaßlich war dort die Einschränkung der Nierenfunktion auch ausgeprägter, die Höhen der Retentionsparameter und der Clearanceberechnungen sind aber nicht publiziert worden. In der vorliegenden Arbeit lag in 81,8% keine oder nur eine leichte chronische Niereninsuffizienz (maximal Stadium 2 nach KDOQI) vor. Lediglich zwei Patienten (9,1%) hatten eine höhergradige Einschränkung, aber auch nur im Stadium 3 nach KDOQI, und von denen war nur bei einem eine Lupusnephritis bekannt. Der andere hatte eine chronische Niereninsuffizienz im Rahmen einer vaskulären und diabetischen Genese. Lediglich bei nur zwei weiteren Patienten (9,1%) lag eine akute Lupusnephritis mit der Notwendigkeit der Einleitung einer Remissions-induzierenden Therapie vor. Paraklinisch war in diesen Fällen vor allem ein nephritisches Sediment auffällig. Die Auslenkung der Retentionsparameter war in beiden Fällen nur gering, so dass auch eine Eingruppierung in die Kategorie „nephritisches Sediment ohne Erhöhung der Retentionsparameter“ anstelle der Kategorie „akute Niereninsuffizienz“ in Tabelle 12.15 des Anhangs zur Disposition stand. Zusammenfassend ließ sich die in der Literatur beschriebene Assoziation einer ausgeprägteren NETosis bzw. höherer cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen mit dem Auftreten einer Lupusnephritis nicht nachvollziehen. Möglicherweise manifestieren sich diese Zusammenhänge in einem Kollektiv mit einer ausgeprägteren Aktivität der Lupusnephritiden. Patienten mit aktiven Lupusnephritiden hatten in anderen Arbeiten signifikant höhere plasmatische NET-Konzentrationen als Patienten mit einer inaktiven Lupusnephritis [127, 196]. Histopathologisch wurden NETs bzw. NET-IgG-Komplexe in betroffenen Glomeruli und Tubuli im Rahmen von Lupusnephritiden nachgewiesen [84, 198]. Je höher der Anteil der durch NETs-afektierten Glomeruli war, um so ausgeprägter stellte sich die Proteinurie dar [198]. Durch Blockierung der NET-Bildung konnte im Mausmodell eine Reduktion der Aktivität der Lupusnephritiden mit Verbesserung klinischer (Proteinurie) und histopathologischer Befunde (geringere Inflammation und Ablagerung von Immunkomplexen) erreicht werden [199].

Neutrophile Granulozyten und deren NETs scheinen ein Baustein im multifaktoriellen Geschehen des chronischen Entzündungsprozesses beim Diabetes mellitus zu sein [81, 200–203]. NETs sind an der verzögerten Wundheilung von Diabetikern beteiligt [201]. In Serien von Typ 2 Diabetikern mit einer diabetischen Retinopathie konnten signifikant erhöhte Serumkonzentrationen an NET-Bestandteilen (DNA-Histon-Komplexe und neutrophile Elastase) im Vergleich zu Diabetikern ohne Retinopathie gemessen werden. Die neutrophile Elastase stellt einen unabhängigen Risikofaktor der diabetischen Retinopathie dar [202]. Neutrophile Granulozyten von Patienten mit einem Diabetes mellitus neigen zu einer verstärkten NET-Bildung [201], hohe Glucosekonzentrationen sind ein Induktor der NETosis [200, 202]. Des Weiteren konnten bei Patienten mit einem Diabetes melli-

tus Typ 2 erhöhte Plasmakonzentrationen an NET-Bestandteilen im Vergleich zu Nichtdiabetiker bestimmt werden [81, 200]. Menegazzo et al. beschrieben eine positive Korrelation zwischen der Höhe des HbA1c bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 und der Höhe der Plasmakonzentrationen an Mono- und Oligonucleosomen [200]. Die Plasmakonzentration an Homocystein, einem direkten und indirekten (durch Plättchenaktivierung) Induktor der NETosis, stellte sich bei Typ 2 Diabetikern erhöht dar und korrelierte positiv mit den Plasmakonzentrationen an neutrophiler Elastase und cf-DNA sowie dem proinflammatorischen Zytokin IL-6, das u.a. von aktivierten Neutrophilen freigesetzt wird. Es wurde postuliert, dass unter hyperglykämischen Bedingungen erhöhte Homocysteinkonzentrationen zu einer kontinuierlich ablaufenden vermehrten NET-Bildung beitragen. Unterstützt wird diese These durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} und mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies (O^{2-}) – wichtigen Bestandteilen in der Signaltransduktion der NET-Bildung – in Neutrophilen von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu Neutrophilen gesunder Probanden unter Homocystein [81].

In der vorliegenden Arbeit konnten die beschriebenen Zusammenhänge zwischen den NETs und dem Diabetes mellitus Typ 2 nicht bestätigt werden. In keiner Studiengruppe bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe der cf-DNA/NETs und dem HbA1c (siehe Abschnitte 4.3 und 12.2.12). Die HbA1c-Werte der AH+/-DM-Gruppe waren lediglich gegenüber den gesunden Probanden signifikant erhöht (siehe Abbildung 4.11), die Werte der cf-DNA/NETs_hPI bzw. cf-DNA/NETs_bTh lagen jedoch mit denen der GP-Gruppe auf einem Niveau und fielen im Vergleich zur GPA signifikant niedriger aus (siehe Abschnitt 4.2). Allerdings lag nur bei 66,7% der Probanden der AH+/-DM-Gruppe ein Diabetes mellitus Typ 2 vor. In der Subanalyse, die lediglich die Patienten der AH+/-DM-Gruppe mit einem Diabetes mellitus Typ 2 betrachtete (siehe Abschnitt 12.2.2), stellte sich jedoch eine ähnliche Situation dar. Mit 7,6% bzw. 59,4 mmol/mol Hb war der HbA1c dieser Gruppe im Median zwar signifikant höher als die HbA1c-Werte der GP-, GPA- und SLE-Gruppen, andererseits hatte diese Subgruppe den niedrigsten Median für die cf-DNA/NETs_hPI (82,5 ng/ml), der sich signifikant von denen der GPA- und SLE-Gruppen unterschied. Für die cf-DNA/NETs_bTh lagen die Werte der Diabetes-Subgruppe und der gesunden Probanden mit 368,65 ng/ml bzw. 364,5 ng/ml auf einem Niveau und unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant, die der GPA-Patienten waren signifikant höher. Bei den Korrelationsanalysen stellte sich, ebenfalls im Widerspruch zu den Ergebnissen von Menegazzo et al., ein entgegengesetzter Zusammenhang zwischen der Höhe der cf-DNA/NETs und des HbA1c dar, der jedoch nicht signifikant ausfiel (siehe Tabelle 12.6 des Anhangs).

Zusammenfassend waren die cf-DNA/NETs-Werte trotz diabetischer Stoffwechsellage signifikant niedriger als die der GPA und zum Teil der SLE-Patienten (bei der cf-DNA_hPI) und lagen mit denen der Gesunden auf einem Niveau. Eine vermehrte NETosis im Rahmen einer Hyperglykämie lag nicht vor. Eine Bestimmung der Plasmaglukosekonzentration zum Zeitpunkt der Blutentnahme erfolgte allerdings nicht. Menegazzo et al. hatten mit 38 Probanden, gegenüber 10 Probanden der vorliegenden Studie, deutlich mehr Typ 2 Diabetiker in ihrer Studienpopulation. Der HbA1c lag im Mittel mit 7,1 +/- 0,2 % bzw. 54,6 +/- 1,9 mmol/mol Hb bei Menegazzo et al. aber niedriger als der HbA1c der Diabetes mellitus-Subpopulation (Mittelwert: 7,43 +/- 1,23 % bzw. 57,74 +/- 13,5 mmol/mol Hb), so dass in der vorliegenden Studie längerfristig betrachtet eine schlechtere Stoffwechsellage bestand. Wie langanhaltend der beschriebene Priming-Effekt durch erhöhte Glukosekonzentrationen auf eine vermehrte NETosis der Neutrophilen ist, wird in der Literatur jedoch nicht beschrieben. Zwischen der Plasmakonzentration der neutrophilen Elastase und dem Nüchternblutzucker bzw. der postprandialen Plasmaglukosekonzentration wurden zwar signifikante positive Korrelationen beschrieben, die in beiden Fällen jedoch nur von geringer Stärke waren ($r = 0,32$) [81]. Des Weiteren ist das Ausmaß an der für die NETosis in den überwie-

genden Fällen notwendigen Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen vom jeweiligen Stimulus abhängig (längeranhaltende und höhere Produktion von Radikalen unter PMA als unter Homocystein bzw. IL6) [81]. Joshi et al. bestätigten zwar ebenfalls eine vermehrte NET-Bildung durch neutrophile Granulozyten von Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 im Rahmen der chronischen Inflammation, insbesondere bei höheren Plasmaglukosekonzentrationen, allerdings waren diese NETs kleiner, zerfielen schneller und besaßen eine niedrigere Elastaseaktivität als NETs, die von Neutrophilen einer gesunden Vergleichsgruppe gebildet wurden. Des Weiteren kam es zu keiner gesteigerten NET-Bildung nach Stimulierung mit potenten Induktoren der NETosis, wie LPS und IL-6 [203]. Signifikante Korrelationen des HbA1c mit NET-Bestandteilen lagen auch bei Joshi et al. nicht vor [81]. Ein Grund für die niedrig gemessenen cf-DNA/NETs-Werte der Diabetes mellitus Studienpatienten, die sich von denen der gesunden Probanden nicht unterschieden, ist somit trotz einer möglichen potentiell vermehrten NET-Bildung in der beeinträchtigten Stabilität der im Rahmen eines hyperglykämischen Milieus entstandenen NETs zu sehen. Sollten unter einer hyperglykämischen Stoffwechsellage zudem eher kleinere NETs entstanden sein, dann könnten wegen resultierender eingeschränkter Interkalierungsmöglichkeiten durch den Fluoreszenzfarbstoff Picogreen des Weiteren fälschlicherweise zu niedrige cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen bestimmt worden sein. Ein weiterer Aspekt ist natürlich, dass es unter der zum Zeitpunkt der Blutentnahme vorliegenden Blutzuckereinstellung zu keiner vermehrten NETosis, die in vitro insbesondere erst unter deutlich erhöhten Glukosekonzentrationen ermittelt wurde (25 mmol/l bzw. 30 mmol/l) [200, 202], gekommen ist und somit die Werte auf dem Niveau der gesunden Probanden lagen.

Für die cf-DNA/NETs der Diabetes mellitus-Subpopulation stellte sich eine signifikante hohe positive Korrelation mit der Höhe des Serumharnstoffs dar. Zudem lag eine mittlere negative Korrelation mit der eGFR (MDRD) vor. Für das Serumcreatinin und die Proteinurie bestanden keine signifikanten Korrelationen (siehe Tabelle 12.6). Die Höhe an zellfreier ds-DNA korrelierte bei Menegazzo et al. mit dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie und kardiovaskulären Erkrankungen [200]. Andererseits fanden Park et. al keinen Unterschied in der Höhe der Plasmakonzentrationen von NET-Bestandteilen bei Typ 2 Diabetikern mit bzw. ohne eine diabetische Nephropathie [202]. In der vorliegenden Arbeit hatten alle Diabetiker eine manifeste diabetische Nephropathie, so dass zu der Höhe der cf-DNA/NETs bei Diabetikern ohne eine diabetische Nephropathie keine Aussage getroffen werden konnte. Allerdings kann die Höhe der cf-DNA/NETs möglicherweise einen Hinweis auf den Schweregrad der diabetischen Nephropathie geben. Bei den Probanden bestanden jedoch keine isolierten Nierenschädigungen durch den Diabetes mellitus. Vielmehr litten alle Probanden zusätzlich unter einer manifesten arteriellen Hypertonie, so dass Nierenschäden darüber hinaus im Rahmen einer benignen Nephrosklerose auftraten. Andererseits bestand auch bei Menegazzo et al. bei der Mehrheit der Probanden (68,4%) eine arterielle Hypertonie. Für die gesamte AH+/-DM-Gruppe fanden sich für keinen der Studienparameter signifikante Korrelationen mit den Nierenparametern.

Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden, dass die cf-DNA/NETs als Aktivitätsparameter von Patienten mit einer GPA eingesetzt werden können. Belastbare Aussagen zur MPA sind aufgrund der geringen Anzahl der Stichprobe nicht möglich. Die cf-DNA/NETs der GPA waren in beiden Messreihen zum einen gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen signifikant erhöht, zum anderen bestanden signifikante Korrelationen der cf-DNA/NETs mit der Höhe der Autoantikörper sowie dem BVAS-Scoring. Des Weiteren ließen sich anhand der Höhe der plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentrationen hohe (BVAS \geq 6) vs. niedrige (BVAS \leq 5) Krankheitsaktivitäten der GPA voneinander differenzieren.

5.2 cf-DNA/NETs - ein Parameter zur Verlaufsbeurteilung von AAVs?

Zur Remissionsinduktion einer GPA im Falle einer generalisierten Verlaufsform mit Beeinträchtigung von Organfunktionen ist eine Kombinationstherapie aus Glukokortikoiden (1 mg/kg KG Prednisolonäquivalent pro Tag, max. 80 mg/d) und Cyclophosphamid etabliert [6, 24]. Vier Patienten mit einer Erstmanifestation der GPA, die u.a. schwerwiegende renale und/oder pulmonale Organbeteiligungen zeigten, wurden im Verlauf der Cyclophosphamid-Pulstherapie, die im Median 6,5 Zyklen betrug, weiter evaluiert. Nach Abschluss der Therapie konnte in der Mehrzahl eine Regredienz bzw. ein vermindertes Auftreten der Vaskulitis-assoziierten Krankheitsmanifestationen beobachtet werden, ein signifikanter Unterschied bestand jedoch für keines der Symptome. Die Krankheitsaktivität im BVAS sank von 25,5 auf 5 Punkte im Median. Die Verbesserung des Scores stellte sich aber ebenso wenig wie die Reduktion der Autoantikörper (c-ANCA und PR3-Ak) im Wilcoxon-Test als signifikant heraus (siehe Tabelle 4.32). Dagegen war der Abfall der cf-DNA/NETs im Wilcoxon-Test zumindest tendenziell auszumachen ($p = 0,068$ für cf-DNA_hPI bzw. cf-DNA_bTh, im Gegensatz zu den anderen Aktivitätsparametern mit $p > 0,100$) und fiel im T-Test für verbundene Stichproben signifikant aus (siehe Tabelle 12.61, galt nicht für die anderen Aktivitätsparameter). Der Nutzen einer Cyclophosphamidtherapie zur Remissionsinduktion, Mortalitätssenkung und Verbesserung der Nierenfunktion ist in den letzten Jahrzehnten eindeutig belegt worden [9, 26, 29, 30]. In der Vor-Cyclophosphamidära lag die Mortalität in den ersten beiden Jahren bei 80% [22]. Eine Remissionsinduktion unter Cyclophosphamid ist in ca. 70 - 90% der Fälle erfolgreich [167] und wird in der Regel zwischen 3 und 6 Monaten erreicht [30]. Durch den Einsatz von Immunsuppressiva wie Cyclophosphamid kam es zu einer Steigerung des 10-Jahresüberlebens auf etwa 75% [204]. Festzuhalten ist, dass es unter der Cyclophosphamidtherapie im Median zu einem deutlichen (signifikanten) Abfall der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen kam (cf-DNA_hPI 375,5 ng/ml \rightarrow 114,6 ng/ml; cf-DNA_bTh 986,05 ng/ml \rightarrow 410,45 ng/ml) und diese sich noch vor, aber nicht mehr nach Therapie von denen der GP- bzw. AH+/-DM-Gruppe signifikant unterschieden. Der mediane BVAS-Score sank ebenfalls, wenngleich bei keinem Patienten ein Score von 0 Punkten erreicht wurde und der Gruppenunterschied nicht signifikant war. In einem Fall blieb der Score bei 5 Punkten unverändert. Bei der Patientin bestand initial – aber nicht mehr im Rahmen der Reevaluation nach Cyclophosphamid-Pulstherapie – neben einer pulmonalen Manifestation (pulmonale Infiltrate und Kavernenbildung) eine granulomatöse Urozystitis. Diese ist aber keine BVAS-relevante Krankheitsmanifestation und konnte im Scoring somit auch nicht abgebildet werden. Die Regredienz der granulomatösen Urozystitis schlug sich im Ergebnis der Krankheitsaktivität im BVAS somit nicht nieder. V.a. wegen der Progredienz der pulmonalen Kaverne (ist für den BVAS relevant bei Erstmanifestation bzw. bei Größenzunahme) sank die Krankheitsaktivität im BVAS nicht. Die Verbesserung der Nierenfunktionsparameter (Creatinin, eGFR (MDRD)) bildete sich in ähnlicher Weise wie die der cf-DNA/NETs ab. Sie war lediglich tendenzieller Natur und nicht signifikant ($p = 0,068$, siehe Tabelle 4.29), obwohl initial bei zwei der vier Patienten eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz in Folge der RPGN mit histologischem Nachweis $> 50\%$ Halbmonden vorlag, es im Rahmen der Therapie zu einer Erholung der Nierenfunktion kam (Abfall des Creatinins von 198 $\mu\text{mol/l}$ auf 127,5 $\mu\text{mol/l}$ im Median, Steigerung der eGFR (MDRD) von 30,9 ml/min/1,73 m² auf 46,2 ml/min/1,73 m² im Median) und bei keinem der Probanden nach Therapie eine Notwendigkeit zur Nierenersatztherapie bestand. Die Regredienz der Protein- und Hämaturie unter der Cyclophosphamidtherapie war ebenfalls nicht signifikant. Unter einer Remissions-induzierenden immunsuppressiven Therapie mit Cyclophosphamid oder Rituximab kommt es in der Regel zu einer Verbesserung der Nierenfunktion [205]. Allerdings besteht eine deutliche Diskrepanz zwischen den Zeiträumen der Erholung der Nierenfunktionsparameter. Während das Serumcreatinin bei Kaukasiern nach ca. 3 Monaten

sein Nadir erreicht, kann eine vermehrte Protein- und Hämaturie länger als 300 Tage persistieren, bis sich ein neues Plateau einstellt [205].

Die größte Schwäche der vorliegenden Cyclophosphamid-Subanalyse ist die kleine Stichprobenanzahl von lediglich vier Probanden. Die beschriebenen tendenziellen Verbesserungen würden sich in einem größeren Kollektiv möglicherweise als signifikant darstellen. In einer weiteren Subanalyse der GPA-Patienten, bei der acht stationäre Behandlungen wegen eines vermehrten Aktivitätszustandes der GPA (Erstmanifestation bzw. Rezidiv) analysiert wurden, stellten sich eindeutigere Ergebnisse in der Verlaufsbeurteilung dar. Die Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs reduzierten sich ebenso signifikant wie die Krankheitsaktivität im BVAS (siehe Abschnitt 4.7). Für den Symptomkomplex der Allgemeinsymptomatik im Gesamten trat ein signifikant vermindertes Auftreten zum Zeitpunkt der Entlassung auf. Auch die Plasmakonzentrationen des CRPs und der paraklinisch etablierten Aktivitätsparameter c-ANCA und PR3-Ak sanken signifikant. Eine Verbesserung der Nierenfunktion bzw. des Ausmaßes der pathologischen Protein- und Erythrozyturie lag aber nicht vor. Zusammenfassend bildete sich die paraklinisch und klinisch fassbare Abnahme der Krankheitsaktivität unter der eingeleiteten Remissions-induzierenden Therapie (Methylprednisolonstoßtherapie 250 - 500 mg/d über 3 d, Einleitung oder Fortsetzung einer Cyclophosphamid-Pulstherapie in 6 von 8 Fällen, Durchführung einer Plasmaaustauschbehandlung in 5 Fällen, Durchführung einer Immunadsorptionsbehandlung in 2 Fällen) auch in den sinkenden Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs ab. Die cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt der Entlassung waren aber weiterhin gegenüber den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) erhöht (siehe Abbildungen 4.21 und 4.22). Dies spiegelte sich in der immer noch vorliegenden medianen Krankheitsaktivität von 7,5 Punkten im BVAS wider. Für die Kinetik der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen von Verbrennungsoptionen und Traumapatienten konnte bereits ein prognostischer Wert hinsichtlich der Mortalität herausgestellt werden [131, 133]. Höhere Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs nach Verbrennungstraumata standen mit einer höheren Letalität in Zusammenhang [133]. Polytraumapatienten mit einem erneuten Peak der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen im Verlauf entwickelten signifikant häufiger ein septisches Krankheitsbild und hatten ebenfalls eine höhere Letalität [131, 132]. Bei Beobachtungen von Patienten mit einem SLE variierte bei mehr als einem Drittel die Fähigkeit zur NET-Degradation im zeitlichen Verlauf [128]. Der verminderte NET-Abbau war mit einer höheren Krankheitsaktivität, höheren Autoantikörpern (ANA, anti-dsDNS-Ak) und dem vermehrtem Auftreten einer Lupusnephritis assoziiert [84, 106].

In allen Fällen der stationären Behandlung erfolgte eine Methylprednisolontherapie (250 - 500 mg/d) über drei Tage. Anschließend wurde in jeweils der Hälfte der Fälle auf ein Prednisolonschema in der Dosierung von 80 mg/d bzw. 100 mg/d gewechselt und in der Folge schrittweise reduziert. Die hochdosierte Prednisolontherapie ist im Rahmen der Standardtherapie zur Remissionsinduktion in Kombination mit Cyclophosphamid oder Rituximab etabliert [6, 24]. Der zusätzliche Benefit einer initialen Hochdosismethylprednisolontherapie im Rahmen von Organ- bzw. lebensbedrohlichen Verläufen ist umstritten [6, 25] und ist in den aktuellen europäischen Empfehlungen der EULAR und ERA-EDTA nicht enthalten [24]. Laut der Leitlinie der DGRh soll der Einsatz dieser Therapie aufgrund eines vermeintlich erhöhten Infektionsrisikos und der damit verbundenen möglichen erhöhten Frühmortalität nur in Ausnahmefällen bei besonders schwerwiegenden Verläufen in Erwägung gezogen werden. Eine ausreichende Evidenz (Stufe IV) oder eine Empfehlung (Stärke 0) liegen nicht vor [6]. Bis auf eine randomisierte Studie, in der ein hochdosierter Methylprednisolonstoß gegenüber der Plasmaaustauschtherapie hinsichtlich einer kurzfristigen Verbesserung der Nierenfunktion unterlegen war [206], fehlten zunächst größere Untersuchungen. In einer retrospektiven chinesischen Arbeit von 2017 konnte durch eine zusätzlich zur Stan-

Standardinduktionstherapie (Prednisolon plus Cyclophosphamid bzw. Mycophenolat mofetil) durchgeführte hochdosierte Methylprednisolontherapie bei AAV-Patienten mit einer GFR $< 10 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion und ein längeres dialysefreies Überleben analysiert werden. Signifikant weniger Patienten waren dialysepflichtig, ohne dass vermehrt unerwünschte Ereignisse oder eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe auftraten. Die Mortalität fiel in der Methylprednisolongruppe sogar tendenziell niedriger aus. In ROC-Analysen dieser chinesischen Studienpopulation wurde ein positiver Effekt der Methylprednisolonstoßtherapie für Patienten mit einem Serumkreatinin $< 855 \mu\text{mol/l}$ und einer Urinprotein-Creatininratio von $< 3,7 \text{ g/d}$ postuliert [207]. Die Wirkung des Methylprednisolons hängt mutmaßlich mit der starken antiinflammatorischen Wirkung und der Reduktion der ANCA-produzierenden Plasmazellen zusammen [207]. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar eine Regredienz der Retentionsparameter sowie eine Verbesserung der eGFR (MDRD) beobachtet werden, im Gegensatz zu den Studienparametern fielen diese aber nicht signifikant aus (siehe Tabelle 4.23). Im Vergleich zu der chinesischen Studie war die eGFR nach der MDRD-Formel mit $16,5 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ höher, so dass sich bei einer besseren Ausgangslage ein möglicher Benefit der Methylprednisolontherapie auf die Nierenfunktion nicht entsprechend abbilden konnte. Des Weiteren war der Beobachtungszeitraum deutlich kürzer (19,5 Tage gegenüber 31 Monaten im Median). In einer kürzlich veröffentlichten multizentrischen retrospektiven Studie (USA und Europa) zeigte eine hochdosierte Methylprednisolontherapie (im Median 1,5 g kumulativ über 3 Tage) zusätzlich zur Standardtherapie (Cyclophosphamid, orale Kortikosteroide, Plasmaaustausch) keinen Nutzen hinsichtlich des Gesamtüberlebens, der Verbesserung der Nierenfunktion sowie der Reduktion von Rezidiven. Vielmehr war die Methylprednisolontherapie mit einem signifikant häufigeren Auftreten von Infektionen in den ersten drei Monaten und der Erstmanifestation eines Diabetes mellitus assoziiert [208]. Zusammenfassend ist der Benefit einer initial hochdosierten Methylprednisolontherapie bei schwerer AAV umstritten. Inwiefern die Methylprednisolontherapie einen Einfluss auf die NETosis hat und wie hoch der Anteil an der Reduktion der plasmatischen cf-DNA/NETs war, ist nicht klar. Unter einer Steroidtherapie kommt es zu einer vermehrten Ausschwemmung Neutrophiler in die Zirkulation und Migration ins Gewebe [3], formal steigt zumindest die Anzahl der peripheren Neutrophilen. In vitro zeigten isolierte neutrophile Granulozyten von AAV-Patienten in 75% eine deutliche Abnahme der NET-Bildung an Tag 4 und eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare quantitative NET-Formierung an Tag 15 nach Einleitung einer Corticosteroidpuls-therapie. Eine gleichsinnige Abnahme der Plasma-DNA-Level konnte ebenfalls beobachtet werden. Allerdings erfasste das Studienkollektiv lediglich vier Probanden [51]. Andererseits hatte eine Steroidtherapie keinen Einfluss auf die Höhe der Konzentration an plasmatischer NET-Bestandteile von AAV-Patienten [192]. Des Weiteren beeinflusste eine orale Prednisolontherapie weder die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur NETosis nach Stimulierung mit anti-RNP-Ak [107] noch kam es zu einer Beeinträchtigung des Ausmaßes der NET-Bildung bei Patienten mit einem SLE [209].

Wang et al. konnten im zeitlichen Verlauf eines chinesischen Studienkollektives keinen signifikanten Unterschied zwischen den Plasmakonzentrationen zum Zeitpunkt einer erhöhten Aktivität der AAV und nach Erreichen einer Remission bestimmen und verneinten die Eignung der cf-DNA als klinischen Biomarker. Die beteiligten AAV-Patienten waren in der chinesischen Studie im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit alle MPO-ANCA positiv [191]. In Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten demgegenüber die cf-DNA/NETs bei Patienten mit einer GPA (in dieser Arbeit alle PR3-AK positiv) als ein geeigneter Parameter zur kurzfristigen stationären Verlaufsbeurteilung bei erhöhter Aktivität der Grunderkrankung sowie mutmaßlich

auch langfristig im Rahmen einer Remissions-induzierenden Therapie mit Cyclophosphamid eingesetzt werden, auch wenn weitere Untersuchungen an einem größeren Studienkollektiv notwendig sind. Diese Einschätzung wird durch zwei europäische Studien, die einen signifikanten Unterschied zwischen den plasmatischen Konzentrationen an NET-Bestandteilen [192] bzw. dem Ausmaß der ex-vivo NET-Induktion durch Seren von AAV-Patienten [210] im zeitlichen Verlauf im Zustand der erhöhten Krankheitsaktivität vs. Remission ausmachen konnten, untermauert.

5.3 cf-DNA/NETs - nur Biomarker oder auch therapeutisches Target?

Kessenbrock et al. wiesen NETs erstmalig im Glomerulum von Patienten mit aktiver renaler Beteiligung einer AAV nach und formulierten die Hypothese der ANCA-induzierten NET-Formierung als Ursache einer RPGN bei Vaskulitispatienten [48]. Mit Ausnahme einer niederländischen Arbeit [210] wurde die Fähigkeit von ANCAs zur Stimulation der NETosis von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt [51, 117, 190, 211, 211]. Auch bei Patienten mit einem SLE konnten durch Autoantikörper (anti-RNP-Ak) neutrophile Granulozyten zur NETosis stimuliert werden [107]. Andererseits stellte sich die Frage, inwiefern NETs als potentielle Quelle von Antigenen zur Autoantikörperbildung beitragen könnten. Bis vor kurzem wurden Störungen im Rahmen der Apoptose bzw. bei der Beseitigung apoptotischer Zellfragmente sowie ein infektbedingtes molekulares Mimikry (Kreuzreaktion von Antikörpern mikrobieller Antigene mit neutrophilen Antigenen) als Ursache einer ANCA-Bildung diskutiert [4]. Des Weiteren zeigten Neutrophile von AAV-Patienten *in vitro* eine erhöhte Neigung zum spontanen Zelltod (NETosis bzw. Nekrose) [192].

Der Einfluss einer posttranslationalen Modifikation von Histonen im Rahmen der NETosis durch die PAD4 auf die Entwicklung einer autoimmunen Reaktion mit Autoantikörperbildung gegen citrullinierte Histone, wie er für die rheumatoide Arthritis bzw. Felty's Syndrom diskutiert wird [113–115], hat gegebenenfalls beim SLE eine untergeordnete Bedeutung. Er scheint bei den AAVs keine Rolle zu spielen, da Seren dieser Vaskulitispatienten zum einen nur in geringem Maße Anti-Histon-Ak aufweisen und diese zum anderen bevorzugt an nicht modifizierte Histone binden [115]. Nichtsdestotrotz sind die Zielantigene der ANCAs – MPO und PR3 – in den NETs enthalten [48] und nicht mehr innerhalb der neutrophilen Granulozyten vor dem Immunsystem abgeschirmt.

Sowohl bei *in-vitro* als auch humanen *in-vivo* Experimenten konnte eine rege Interaktion zwischen myeloischen dendritischen Zellen (antigenpräsentierende Zellen, die im Rahmen des adaptiven Immunsystems mit T- und B-Lymphozyten kommunizieren) und den NETs nachgewiesen werden, mit dem Ergebnis eines Antigentransfers von NET-Bestandteilen wie PR3, MPO und DNA an die dendritischen Zellen. Der Transfer war abhängig von der intakten Integrität der NETs. Diese Interaktion mit Antigenbeladung myeloischer dendritischer Zellen war mit nekrotischen Neutrophilen nicht und bei sich in Apoptose befindlichen neutrophilen Granulozyten nur in deutlich geringerem Ausmaß nachweisbar. Nach Beimpfung von Mäusen mit den von NETs bzw. apoptotischen Neutrophilen antigenbeladenden myeloischen dendritischen Zellen trat in beiden Fällen eine ANCA-Bildung auf, die jedoch im Falle der mit NET-Bestandteilen beladenen dendritischen Zellen signifikant höher ausfiel. Vaskulitische Organveränderungen wurden nur bei diesen Tieren beobachtet [212]. Der Transfer von apoptotischen neutrophilen Bestandteilen im Mausmodell löste trotz Beeinträchtigung der Toleranz und ANCA-Induktion keine Vaskulitis aus [212, 213].

Durch NET-Bestandteile, nicht aber sich in Apoptose oder Nekrose befindende neutrophile Granulozyten, kommt es auch zu einer Aktivierung von plasmatischen dendritischen Zellen und zur INF- α Produktion [107]. So wandelt beispielsweise LL37, ein Bestandteil der NETs, körpereigene humane DNA durch Komplexbildung in einen Aktivator plasmatischer dendritischer Zellen mit konsekutiver Produktion von INF- α um [110]. NETs sind durch Stimulierung von plasmatischen dendritischen Zellen ein Hauptfaktor der INF- α Produktion bei Patienten mit einem SLE [107]. INF- α senkt wiederum die Schwelle neutrophiler Granulozyten zur NETosis durch Stimulation mit Autoantikörpern wie anti-RNP-Ak [107]. Seren von SLE Patienten mit signifikant höheren INF-Konzentrationen haben eine höhere Kapazität zur NET-Bildung [209] und degradieren NETs nur mangelhaft [106]. Des Weiteren zeigten Patienten mit einer renalen Beteiligung einer aktiven AAV im Serum sowie lokal im Bereich renaler Läsionen mit neutrophiler Infiltration eine erhöhte INF- α Produktion [48]. INF- α stimuliert die Dif-

ferenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen [111] und fördert die Reifung von myeloischen dendritischen Zellen [109]. Des Weiteren wirken Interferone als unterstützender Faktor zur Auslösung der NETosis bei reifen neutrophilen Granulozyten auf sonst inadäquate Stimuli [214].

Neben der indirekten Kommunikationskaskade über dendritische Zellen findet aber auch eine direkte – T-Zell-rezeptor abhängige – Interaktion zwischen NETs und $CD4^+$ T-Lymphozyten statt, mit dem Ergebnis einer Senkung der Aktivierungsschwelle der $CD4^+$ T-Lymphozyten, so dass in der Folge eigentlich inadäquate Stimuli zu einer T-Zellaktivierung und entsprechender Immunantwort mit Zytokinproduktion (u.a. $INF-\gamma$) und T-Zellproliferation führen können [108].

Abbildung 5.1 vermittelt mit den dazugehörigen Erläuterungen einen Überblick über die Pathogenese der AAV.

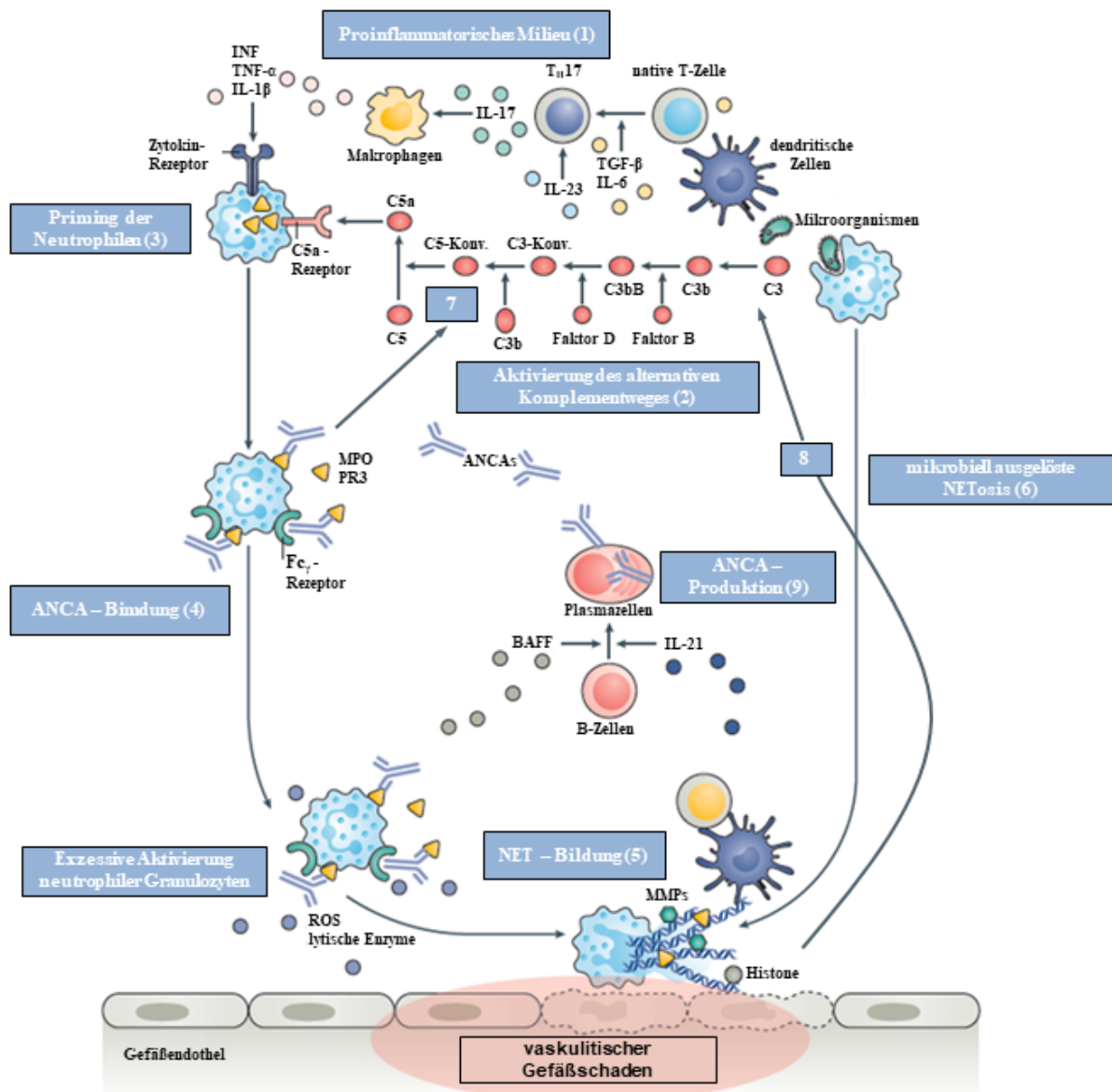


Abbildung 5.1 – Darstellung der Pathogenese ANCA-assoziiierter Kleingefäßvaskulitiden (modifiziert nach [2])

Erläuterungen zu Abbildung 5.1:

- 1. Entstehung eines proinflammatorischen Milieus in Reaktion auf eine Infektion:**
Im Rahmen einer mikrobiellen Invasion kommt es durch die Präsentation von Antigenen und Freisetzung von TGF- β , IL-6 und IL-23 durch dendritische Zellen zur Differenzierung nativer T-Zellen in T_H17-Zellen, die wiederum IL-17 ausschütten. IL-17 aktiviert Makrophagen zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β [2].
- 2. Aktivierung des alternativen Komplementweges:**
C3b, das spontan im Plasma bzw. im Rahmen des klassischen Komplementweges oder als Reaktion auf eine mikrobielle Infektion gebildet wird, bindet an die Oberfläche von Bakterien. Durch Assoziation mit dem Faktor B, der durch die Protease Faktor D umgewandelt wird, entsteht die membrangebundene C3-Konvertase (C3bBb). Nach Anlagerung eines weiteren C3b-Moleküles wird die alternative C5-Konvertase (C3bBb3b) gebildet, die die Spaltung des Komplementfaktors C5 in C5a und C5b katalysiert. Die C3- und C5-Konvertasen werden durch das Protein Properdin stabilisiert [2, 215, 216].
- 3. Priming neutrophiler Granulozyten:**
Durch proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-1 β), dem Anaphylatoxin und Chemotaxin C5a, sowie Interferonen kommt es zum Priming (Sensibilisierung) neutrophiler Granulozyten, in dessen Rahmen die Translokation der Antigene MPO und PR3 aus den primären Granula auf die Zelloberfläche erfolgt [2, 4, 7, 107].
- 4. ANCA-induzierte Aktivierung neutrophiler Granulozyten:**
ANCAs binden mit der Fab-Region an die Antigene MPO und PR3, die nun auf der neutrophilen Membran dem Immunsystem zugänglich sind. Durch gleichzeitige Bindung der Fc-Region der Immunglobuline an den neutrophilen Fc γ -Rezeptor kommt es zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten [2, 4].
- 5. Bildung von NETs und Entstehung vaskulitischer Gefäß- und Organveränderungen:**
Die Aktivierung der Neutrophilen bewirkt die Degranulation mit Freisetzung von proteolytischen Enzymen und ROS, eine vermehrte Zytokinproduktion und die Bindung der neutrophilen Granulozyten ans Gefäßendothel durch Expression von Adhäsionsmolekülen. Des Weiteren wird durch die ANCA-bedingte Aktivierung der Neutrophilen die Bildung von NETs initiiert. Letztlich kommt es zu einer Alteration des Gefäßendothels und der Manifestation vaskulitischer typischer Gewebe- und Organveränderungen [2, 4]. Die Menge und Ausbreitung der NETs in Vaskulitis-assoziierten nekrotischen Läsionen ist bei den AAVs gegenüber nicht durch ANCAs ausgelöste Vaskulitiden ausgeprägter. NETs finden sich histopathologisch auch in den nekrotischen Anteilen granulomatöser Veränderungen bei der GPA [217]. Die Destruktion der gewebeständigen NETs durch die DNase I ist bei AAVs vermindert [217].
- 6. NET-Formierung durch mikrobielle Stimuli:**
Eine Stimulierung neutrophiler Granulozyten zur Formierung von NETs kann durch diverse Mikroorganismen (gram+/gram-Bakterien, Pilze, Viren oder Parasiten) ausgelöst werden [62, 66].
- 7. Aktivierte neutrophile Granulozyten fördern den alternativen Komplementweg:**
Aktivierte neutrophile Granulozyten setzen Properdin, der einzige fördernde Regulator des alternativen Komplementweges, aus den sekundären Granula frei. Properdin kann als Substrat zur Konvertasenbildung dienen mit konsekutiver Aktivierung des alternativen Komplementweges. Des Weiteren stabilisiert Properdin die C3- und C5-Konvertasen [4, 215, 218].
- 8. NETs können den alternativen Komplementweg auslösen:**
Bestandteile des alternativen Komplementweges (u.a. Faktor B, Properdin, Membranangriffskomplex C5b-9) sind in den NETs gebunden. NETs können darüber hinaus den alternativen Komplementweg initiieren [78, 218].
- 9. NET-bedingte Bildung von ANCAs:**
Strukturen von den in den NETs gebundenen, freiliegenden Antigenen MPO und PR3 werden durch dendritische Zellen CD4+-T-Lymphozyten präsentiert. Aktivierte CD4+-T-Lymphozyten schütten IL-21 aus. Durch IL-21 und dem B-cell-activating-factor (BAFF), der von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird, kommt es zur Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen in ANCA-produzierende Plasmazellen [2].

Das Wechselspiel von ANCAs und NETs hat letztlich einen Circulus vitiosus zur Konsequenz. Die ANCA-induzierte Aktivierung der Neutrophilen stimuliert zum einen die NET-Bildung [2, 4] und durch Freisetzung von Properdin aus den neutrophilen sekundären Granula wird zum anderen die alternative Komplementkaskade gefördert mit dem Resultat des Primings weiterer neutrophiler Granulozyten [4]. Die NET-vermittelte Aktivierung des adaptiven Immunsystems bewirkt die Differenzierung ANCA-produzierender Plasmazellen [2]. Des Weiteren können NETs ebenfalls die alternative Komplementkaskade auslösen [78, 218].

Die cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen der Patienten mit einer GPA korrelierten in beiden Messverfahren (cf-DNA_hPI bzw. cf-DNA_bTh) mit der Höhe der Autoantikörper (c-ANCA und PR3-Ak) sowie der Krankheitsaktivität im BVAS (siehe Tabelle 4.4). Etablierte Therapiekonzepte mit Einleitung einer Cyclophosphamidtherapie und Durchführung einer Plasmaaustauschbehandlung greifen in die komplexen Mechanismen des zellulären und adaptiven Immunsystems ein. Der Plasmaaustausch senkte nicht nur die Höhe der Autoantikörper sig-

nifikant, sondern auch die Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs (siehe Tabelle 4.34). Die medianen cf-DNA/NETs-Konzentrationen waren nach Plasmaaustauschbehandlung zwar noch höher als die der AH+/-DM- und GP-Gruppe, unterschieden sich zu ihnen aber nicht mehr signifikant. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass neben der Plasmaaustauschtherapie bei allen Probanden gleichzeitig eine hochdosierte Steroidtherapie (Methylprednisolonstoßtherapie 250 - 500 mg/d über drei Tage, anschließend hochdosierte Prednisolontherapie) und bei vier von fünf Probanden eine Cyclophosphamid-Pulstherapie lief. Andererseits kam es insbesondere unter den ersten Plasmaaustauschbehandlungen zu einer deutlichen Absenkung der cf-DNA/NETs-Konzentrationen (siehe Abbildung 4.27). Um etwa 75% an einem IgG-Autoantikörper aus dem Organismus zu entfernen, sind fünf bis sieben Plasmaaustausche notwendig [219]. Im Median erfolgten 7 Plasmaaustauschbehandlungen. Die Antikörper gegen Proteinase 3 (ein IgG-Protein) wurden zu 92,99% vermindert, der Abfall der cf-DNA/NETs_hPI bzw. cf-DNA/NETs_bTh fiel ebenfalls mit 59,6% bzw. 51,5% signifikant aus. Interessanterweise fällt die prozentuale Senkung der Antikörper höher als die der cf-DNA/NETs aus. Möglicherweise ist die Ursache in der weiterbestehenden vermehrten NETosis im Rahmen der Grunderkrankung zu sehen. Hinweisend darauf ist der teilweise auftretende erneute Anstieg der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentrationen zwischen den Austauschbehandlungen. Die Therapie mit Steroiden und Cyclophosphamid kann durch die immunmodulierende Wirkung nur auf die weitere Bildung von Autoantikörpern und möglicherweise auch der NETs Einfluss nehmen. Die Verminderung der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentrationen wird neben der endogenen Degradation nur durch den Plasmaaustausch realisiert.

Die Degradation der NETs erfolgt durch die hauptsächlich im Pankreas und den Nieren produzierte calciumabhängige Serum-DNase I [84, 85]. Die Serumkonzentration an DNase I von Patienten mit einer AAV ist erhöht. Allerdings bestand ein negativer Zusammenhang zwischen der Höhe der plasmatischen cf-DNA-Konzentrationen und der Aktivität der DNase I [191]. Trotz erhöhter DNase I - Plasmakonzentrationen wurde ein verminderter NET-Abbau auch beim SLE gesehen [126]. Ursachen einer verminderten endogenen Degradation der NETs durch die DNase I sind u.a. Inhibitoren der DNase I sowie Antikörper, die die Netze vor einem Abbau durch die Nuklease schützen [84]. Bei Patienten mit einem SLE und einer zeitweilig gestörten NET - Clearance waren Antikörper gegen DNA sowohl vor, während als auch nach der Phase des verminderten NET - Abbaus erhöht. Im Gegensatz dazu fanden sich erhöhte Anti-Histon-Antikörper nur vor und während der Phase der verminderten NET - Degradation [128]. C1q, eine Subeinheit des C1 - Komplexes der klassischen Komplementkaskade [85], kann zum einen durch Bindung an die NETs und zum anderen durch direkte Inhibierung der DNase I die Degradation der NETs behindern [106]. Der Effekt wird durch ein synergistisches Zusammenspiel von C1q und NET-spezifischen - Antikörpern noch verstärkt. Diese Phänomene scheinen jedoch nicht unbedingt im Serum, sondern eher lokal bei Vorliegen von höheren Konzentrationen von C1q und der Immunglobuline eine Rolle zu spielen [106]. In einer in vitro Studie förderte C1q hingegen die Serum - Clearance von NETs bzw. NET - Bestandteilen durch Makrophagen [85]. Das in den NETs enthaltene kationische antimikrobiell wirkende Peptid LL37 schützt körpereigene Nukleinsäuren durch Komplexbildung vor dem extrazellulären Abbau [109]. NETs die sich unter dem Einfluss des Thyreostatikums Propylthiouracil gebildet haben, konnten durch die DNase I nur vermindert abgebaut werden. Propylthiouracil ist kein direkter Inhibitor der DNase I. Ein Schutz der NETs muss mutmaßlich mit der Interaktion zwischen dem Thyreostatikum bzw. seinen Metaboliten und den NETs zusammenhängen [118]. Für Patienten mit einem SLE konnte zudem gezeigt werden, dass die Fähigkeit zum Abbau der NETs nicht nur individuell unterschiedlich sein kann, sondern auch mit der Krankheitsaktivität variiert. Im Rahmen einer erhöhten Aktivität der Grunderkrankung kann im Vergleich zur Remission eine defizitäre Degradation der

NETs vorliegen [106]. Auch Seren von Patienten mit einer mikroskopischen Polyangiitis degradieren NETs schlechter, zum Teil bedingt durch eine verminderte Aktivität der DNase I [190] und teilweise unter dem Einfluss von anti-NET-Ak [189]. Ist die endogene Degradation der NETs beeinträchtigt, stellt der Plasmaaustausch eine schnelle und effektive Variante zur Clearance dar.

Nach aktuellen Empfehlungen besteht die Indikation zum Plasmaaustausch bei einer schweren Nierenfunktionseinschränkung im Rahmen einer RPGN (Creatinin $> 500 \mu\text{mol/l}$ bzw. $> 5,8 \text{ mg/dl}$) bzw. im Falle einer schweren alveolären Hämorrhagie [6, 24]. Die Empfehlungen gehen u.a. auf die MEPEX-Studie von 2007 zurück, in der die Plasmaaustauschbehandlung gegenüber einer hochdosierten Methylprednisolontherapie bei Patienten mit einem schwergradigen akuten Nierenversagen (Creatinin $> 500 \mu\text{mol/l}$ und/oder Notwendigkeit zur Dialysetherapie) einen signifikanten Vorteil hinsichtlich der Verbesserung der Nierenfunktion und Dialysefreiheit über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr erbrachte [206]. Über eine längere Phase von im Median fast vier Jahren konnte allerdings kein Unterschied hinsichtlich der Studienendpunkte – Verbesserung der Nierenfunktion und Mortalität – ermittelt werden [44]. Hinweise auf einen günstigen Effekt der Plasmaaustauschtherapie bei alveolärer Hämorrhagie geben kleinere Studien und Fallberichte [220–226].

Im vorliegenden kleinen Kollektiv konnte bei allen Probanden eine Nierenbeteiligung im Sinne einer RPGN Typ III nachgewiesen werden. Zweimal lagen Hämoptysen, jedoch keine schweren alveolären Hämorrhagien mit respiratorischer Insuffizienz vor. Ein initialer Creatininanstieg auf $> 500 \mu\text{mol/l}$ wurde lediglich bei einem Patienten (Creatinin $513 \mu\text{mol/l}$) dokumentiert, in zwei weiteren Fällen erfolgte im Rahmen der stationären Behandlung ebenfalls eine Hämodialysetherapie (Creatinin $472 \mu\text{mol/l}$ bzw. $345 \mu\text{mol/l}$). Zwei Patienten hatten Serumcreatininwerte $< 500 \mu\text{mol/l}$ (Creatinin von $265 \mu\text{mol/l}$ bzw. $386 \mu\text{mol/l}$) und bedurften keiner Nierenersatztherapie. Der Nutzen einer Plasmaaustauschbehandlung bei Nierenfunktionseinschränkungen mit einem Creatinin $< 500 \mu\text{mol/l}$ wird seit langem kontrovers diskutiert [166]. Der Benefit einer Plasmaaustauschbehandlung zur Verbesserung der Nierenfunktion war neben der Sterblichkeit ein primärer Endpunkt der 2020 veröffentlichten internationalen multizentrischen PEXIVAS-Studie. In einem für AAV-Verhältnisse sehr großen Probandenkollektiv mit schweren renalen (ANCA-assoziierte Glomerulonephritis mit einer eGFR $< 50 \text{ ml/min./1,73 m}^2$) oder pulmonalen (diffuse pulmonale Hämorrhagien) Manifestationen der Grundkrankheit stellte sich für keinen der beiden Endpunkte (ESKD, Mortalität) eine Verbesserung durch eine zusätzliche Plasmaaustauschtherapie (7 Kurse in 14 Tagen, insgesamt 352 Probanden) im Vergleich zur alleinigen Standardtherapie mit Glucocorticoiden und Cyclophosphamid (Erhaltungstherapie mit Azathioprin) bzw. Rituximab (ebenfalls insgesamt 352 Probanden) dar. Alle Patienten erhielten initial eine hochdosierte intravenöse Methylprednisolontherapie über drei Tage mit einer kumulativen Dosis von 1 bis 3 g. Ein Unterschied in den Ergebnissen wurde weder in der Langzeitanalyse (mediane Beobachtungszeit 2,9 Jahre) noch nach einem Jahr Follow-up gesehen. Die mediane Serumcreatininkonzentration lag in beiden Gruppen der PEXIVAS-Studie mit $327 \mu\text{mol/l}$ (Gruppe mit Plasmaaustausch, 28,7% hatten ein Serumcreatinin $> 500 \mu\text{mol/l}$) bzw. $336 \mu\text{mol/l}$ (Gruppe ohne Plasmaaustausch, 29,5% hatten ein Serumcreatinin $> 500 \mu\text{mol/l}$) auf einem Niveau [227]. Die PEXIVAS-Studie untermauert vorherige kleinere unizentrische Studien, die keinen eindeutigen Nutzen (Risiko einer ESKD bzw. Mortalität) einer Plasmaaustauschtherapie bei renaler Beteiligung einer AAV sahen [45, 46]. In einem Kommentar zu den Ergebnissen der PEXIVAS-Studie hoben Derebail et al. jedoch auch Grenzen dieser Studie und deren klinische Relevanz hervor. Sie machten auf eine fehlende histologische Aufarbeitung (eine Nierenbiopsie war kein Einschlusskriterium der PEXIVAS-Studie) aufmerksam und postulierten den Benefit einer Plasmaaustauschtherapie in Abhängigkeit von dem Vorliegen aktiver Inflammationen versus sklerotischer Veränderungen [228]. Für die Reversibi-

lität der histologischen Veränderungen einer RPGN ist der Zeitpunkt des Therapiebeginnes von entscheidender Bedeutung. Entsprechend der histopathologischen Klassifikation ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden nach Berden et al. korreliert sowohl die Qualität als auch die Quantität histologischer Veränderungen mit der renalen Prognose. Fokale Veränderungen (weniger als 50% der Glomeruli betroffen) sind in der Regel mit vergleichsweise leichteren renalen Funktionseinschränkungen und einer guten renalen Prognose vergesellschaftet (93% renales Überleben nach 5 Jahren). Patienten mit einer hohen renalen Aktivität der Vaskulitis (Ausbildung von Halbmonden "crescentic" in mehr als 50% der Glomeruli) haben initial meist eine schwergradigere Einschränkung der Nierenfunktion. Es besteht bei entsprechender therapeutischer Intervention jedoch eine gute Erfolgsaussicht für eine Erholung (76% renales Überleben nach 5 Jahren) [229]. Durch eine rechtzeitige Therapie können sich die zellulären Halbmonde zurückbilden, ansonsten erfolgt zunächst eine fibrozelluläre und schließlich irreversible fibröse Umwandlung [7]. Im Gegensatz zu aktiven Entzündungsprozessen sind chronische sklerotische Veränderungen einer immunmodulatorischen Therapie nicht mehr zugänglich [228]. Treten zum größten Teil sklerotische Veränderungen (mehr als 50% der Glomeruli sind von einer Sklerose betroffen) auf, besteht ein deutlich höheres Risiko der Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz (nur 50% renales Überleben nach 5 Jahren). Patienten bei denen keine der genannten Phänotypen dominant auftreten (sog. Mixed-Klasse), haben ein mittelmäßiges Risikoprofil hinsichtlich des renalen Outcomes (61% renales Überleben nach 5 Jahren) [229]. Auch Houben et al. bestätigten in einer klinischen Auswertung die Notwendigkeit einer rechtzeitigen Diagnose und Therapieeinleitung der AAV, da längere (unbehandelte) Prodromalphasen mit einem schlechteren renalen Outcome assoziiert sind (vermehrtes Auftreten einer Proteinurie nach 6 Monaten, höheres Risiko einer ESKD und höhere Mortalität im Verlauf nach 3 Jahren) [230].

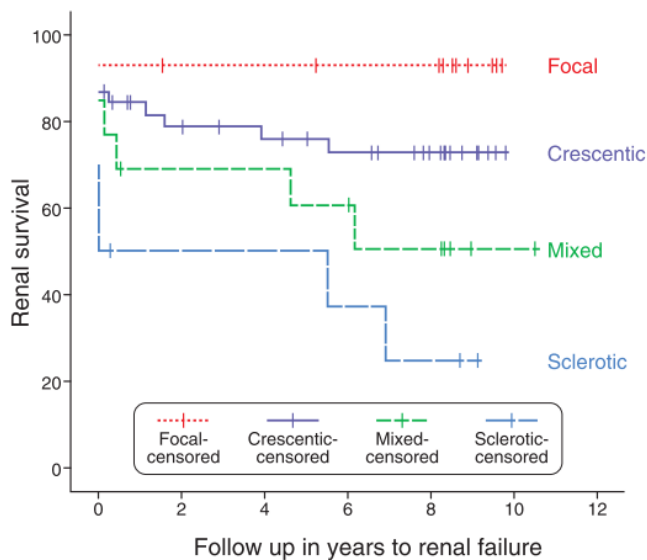


Abbildung 5.2 – Renales Überleben entsprechend des histologischen Phänotyps der RPGN Typ III [229]

In der vorliegenden Arbeit konnte die Plasmaaustauschtherapie lediglich an einer sehr kleinen Stichprobe von fünf Behandlungen evaluiert werden. Jeweils einmal lag ein fokaler bzw. gemischter Typ der AAV-assoziierten RPGN vor. In den weiteren Fällen wurde histologisch eine RPGN Typ III mit mehr als 50% Halbmonden nachgewiesen. Ein sklerotischer Phänotyp der RPGN-Typ III war nicht vertreten. Im Median lag das Serumcreatinin vor Plasmaaustauschtherapie bei 386 $\mu\text{mol/l}$ und fiel zum Abschluss auf 233 $\mu\text{mol/l}$. Die eGFR (MDRD) stieg von 12,6 ml/min/1,73 m^2 auf 22,2 ml/min/1,73 m^2 . Die Verbesserung der Nierenfunktion direkt nach Abschluss der Plasmaaustauschbehandlungen war nicht signifikant. Unterschiedliche Rekonvaleszenzzeiten einzelner Krankheitsmanifestationen sind allerdings in der Literatur beschrieben. In einer retrospektiven Arbeit verbesserte sich im Gegensatz zur renalen Funktion die pulmonale Funktion bei diffusen pulmonalen Hämorrhagien im Zuge der Plasmaaustauschbehandlung rascher [226]. In der vorliegenden Arbeit konnte im Intervall zum Zeitpunkt der Entlassung, die im Median 10 Tage nach dem letzten Plasmaaustausch erfolgte, schließlich eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion beobachtet werden

unterschiedliche Rekonvaleszenzzeiten einzelner Krankheitsmanifestationen sind allerdings in der Literatur beschrieben. In einer retrospektiven Arbeit verbesserte sich im Gegensatz zur renalen Funktion die pulmonale Funktion bei diffusen pulmonalen Hämorrhagien im Zuge der Plasmaaustauschbehandlung rascher [226]. In der vorliegenden Arbeit konnte im Intervall zum Zeitpunkt der Entlassung, die im Median 10 Tage nach dem letzten Plasmaaustausch erfolgte, schließlich eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion beobachtet werden

(Creatinin 207 $\mu\text{mol/l}$, eGFR (MDRD) 27,0 ml/min/1,73 m^2). Die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie bestand bei keinem der fünf Patienten mehr (initial bei drei Probanden durchgeführt). Ein Patient mit einem protrahierten Krankheitsverlauf und einer Aufenthaltsdauer von 71 Tagen hatte nach 8 Kursen Plasmaaustausch zusätzlich noch 6 Kurse Immunadsorption erhalten. Vor Immunadsorptionstherapie bestand weiterhin noch eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. Ein limitierender Faktor ist jedoch neben der geringen Probandenanzahl der Untersuchung eine fehlende Kontrollgruppe. Vergleichbar mit der PEXIVAS-Studie erfolgte bei allen Probanden ein Methylprednisolonstoß über drei Tage (250 - 500 mg/d) mit anschließender hochdosierter Prednisolontherapie (80 - 100 mg/d) und in vier von fünf Fällen die Cyclophosphamid-Pulstherapie. In der vorliegenden Arbeit konnte nach meiner Kenntnis jedoch erstmals gezeigt werden, dass es im Rahmen der Plasmaaustauschtherapie neben einer signifikanten Abnahme der ANCA's auch zu einer signifikanten Clearance von NETs kommt. Durch eine rasche und effektive Senkung der an der Pathogenese der Vaskulitis beteiligten Akteure NETs bzw. ANCA's im schweren Schub der Erkrankung, mit dem Ziel einer Durchbrechung des Circulus vitiosus, gelingt mutmaßlich für den Moment eine bessere Kontrolle der Krankheitsaktivität und eine Reduktion des Risikos einer progredienten Gewebe- bzw. Organschädigung mit zunehmendem Funktionsverlust (sofern diese nicht schon irreversibel aufgetreten ist). Die Krankheitsaktivität sank im BVAS unter der Plasmaaustauschtherapie signifikant. In einer niederländischen Studie profitierten Patienten mit einem Krankheitsprogress unter der etablierten Standardinduktionstherapie (Cyclophosphamid und Steroide) von einer Therapieeskalation mittels Plasmapherese. Die Nierenfunktion verbesserte sich signifikant und lag im weiteren Beobachtungszeitraum auf einem dem der Kontrollgruppe ohne Krankheitsprogress unter der Standardinduktionstherapie vergleichbaren Niveau. Ein Mortalitätsunterschied bestand nicht [231]. Die kurzfristige innerklinische Mortalität von AAV-Patienten mit pulmonalen Hämorrhagien ließ sich durch eine Apheresetherapie tendenziell reduzieren [223]. Im Rahmen des Plasmaaustausches werden neben ANCA's und NETs auch weitere plasmatische Bestandteile, die an den pathophysiologischen Prozessen der Grunderkrankung beteiligt sind und inflammatorische Prozesse aufrechterhalten, entfernt. Mögliche Akteure sind u.a. weitere pathologische Antikörper (z.B. gegen LAMP2 und Plasminogen), aktivierte Lymphozyten, Komplementfaktoren, Adhensionsmoleküle, Zyto- bzw. Chemokine sowie Fibrinogen und andere Gerinnungsfaktoren [219, 232]. Des Weiteren kann die Depletion von anti-NET-Ak einen positiven Einfluss auf die Degradation der weiterhin vorhandenen NETs haben [84, 106, 189]. Durch den Entzug von Properdin, BAFF und INF könnte es ebenfalls zu einer Störung des Circulus vitiosus kommen.

Weitere kleinere Studien fanden ebenfalls Hinweise für einen positiven Effekt der Plasmaaustauschtherapie, insbesondere auch bei einem niedrigeren Grad der Nierenfunktionseinschränkung. In einer dänischen unizentrischen Studie konnte für Probanden mit einem Creatinin $> 250 \mu\text{mol/l}$ durch eine Plasmaaustauschbehandlung zusätzlich zur Therapie mit Cyclophosphamid und oralen Steroiden eine signifikant verbesserte Nierenfunktion über einen Beobachtungszeitraum von 5 Jahren nachgewiesen werden, ein Mortalitätsunterschied bestand nicht [166]. Eine weitere dänische Zentrumsstudie bestätigte den Nutzen einer Plasmaaustauschtherapie zur signifikanten Verbesserung der renalen Funktionen, insbesondere auch bei Patienten mit einem Creatinin $< 500 \mu\text{mol/l}$ (Einschlusskriterium war eine eGFR $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$), ebenfalls ohne Senkung der Mortalität, aber Reduktion des Rezidivrisikos der Grunderkrankung über einen Beobachtungszeitraum von einem Jahr [233]. In einer retrospektiven Analyse profitierten alle Patienten mit einer RPGN im Rahmen nekrotisierender Vaskulitiden, die durch nahezu 90% des Studienkollektives durch eine AAV bedingt war, unabhängig vom Ausgangsniveau des Creatinins zusätzlich zur Standardtherapie von einer Plasmaaustauschbehandlung. Eine hochsignifikante Verbesserung der Nierenfunktion über einen Beobachtungszeitraum von zwei Jahren hinweg wurde insbesondere in den

Subgruppen mit einem Creatinin zwischen 250 µmol/l - 500 µmol/l bzw. einem Creatinin > 500 µmol/l gesehen. Möglicherweise bestand ein positiver Zusammenhang zwischen der Anzahl der Plasmaaustauschbehandlungen und der Verbesserung der glomerulären Filtrationsrate [220]. Kurzfristig kann der Plasmaaustausch die Nierenfunktion möglicherweise günstig beeinflussen und reduziert das Risiko des Auftretens einer terminalen Nierensuffizienz (in bestimmten Fällen), ohne dass langfristig ein Mortalitätsvorteil vorliegt [234]. Zwar ist die Plasmaaustauschtherapie mit höheren Kosten und einem größeren Ressourcenverbrauch vergesellschaftet, ein signifikant häufigeres Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen wurde in der Plasmaaustauschgruppe der PEXIVAS-Studie aber nicht berichtet [227, 228].

Dass es unter einer Cyclophosphamid-Pulstherapie zu einem Abfall der Plasmakonzentrationen an cf-DNA/NETs kommt, wurde bereits beschrieben (siehe Abschnitte 4.8 und 5.2). Im Folgenden soll das Interaktionspotential der Cyclophosphamidtherapie mit dem NET-Stoffwechsel diskutiert werden. Cyclophosphamid ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Alkylanzien, das neben der zytotoxischen auch eine starke immunsuppressive Wirkung besitzt. In der Leber erfolgt CYP2B6-abhängig die Bioaktivierung des inaktiven Prodrugs und über mehrere Folgereaktionen, bei denen u.a. das urotoxisch wirkende Acrolein abgespalten wird, entsteht das N,N-Bis(2-chloethyl)-phosphorsäurediamid, eine stark alkylierende Verbindung. Neben reaktiven Verbindungen mit Proteinen kommt es durch kovalente Bindung u.a. an Guanin zu Strukturveränderungen der DNA, wie abnormen Basenpaarungen, Cross-link-Bildung von DNA-Strängen, Einzelstrangbrüchen, Spaltung von DNA-Ketten usw.. Letztlich wird durch die Alkylierung der Nukleinsäuren die DNA-Replikation und somit die Zellteilung beeinträchtigt [39, 235]. Insbesondere Lymphozyten reagieren sehr empfindlich auf Cyclophosphamid [39]. Die Folge ist eine Reduktion der Lymphozytenanzahl, die sowohl die B- als auch die T-Zellreihe betrifft und somit zu einer Beeinträchtigung der Antikörperbildung sowie der zellulären Immunität führt [25, 39]. Der bereits beschriebene Circulus vitiosus zur Aufrechterhaltung der autoimmunologischen Prozesse, an denen auch die ANCAs und NETs beteiligt sind, müsste folglich durch die immunsuppressive Wirkung des Cyclophosphamids durchbrochen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte weder für den relativen Anteil der Lymphozyten noch für die absolute Lymphozytenanzahl ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten gesehen werden. Die absolute Lymphozytenanzahl vor und nach Cyclophosphamidtherapie lag auf einem ähnlichen Niveau (904,4/µl gegenüber 958,3/µl). Eine Aussage über die Funktionsfähigkeit der Lymphozyten kann nicht getroffen werden. Die Bestimmung der Lymphozytenanzahl ist aber auch von dem Zeitpunkt der Blutentnahme abhängig. Der Leukozytennadir und somit auch eine ausgeprägtere Lymphozytopenie treten in der Regel nach etwa 10 Tagen der Cyclophosphamidbolusgabe auf. Das Knochenmark regeneriert sich relativ zügig, so dass nach ca. 20 Tagen eine Normalisierung der peripheren Blutzellen eintritt [236]. Die Probeentnahme erfolgte im Median 39,5 Tage nach Applikation des letzten Kurses Cyclophosphamid, also nach Erholung aus dem Nadir. Inwiefern das Cyclophosphamid auch den Vorgang der NETosis beeinflussen kann, ist unklar. Prinzipiell ist die NETosis eine Form des Zelltodes, der sich in morphologischen und molekularen Aspekten von der Apoptose und Nekrose unterscheidet. Im Rahmen dieses Prozesses kommt es zur Dekondensation des Chromatins mit Verlust der Differenzierung in Eu- und Heterochromatin sowie einer Expansion des Zellkerns, der sich in der Folge vesikelartig auflöst. Durch den parallelen Verlust der meisten Granulamembranen können sich in der noch vitalen Zelle, die weiterhin von einer intakten Zellmembran umgeben ist, Kernbestandteile (DNA und Histone), granuläre und zytoplasmatische Komponenten mischen und formieren, so dass Chromatin und granuläre Proteine, wie z.B. die neutrophile Elastase, miteinander assoziieren. Durch Ruptur der Zellmembran erfolgt die Freisetzung der NETs in den Extrazellulärraum [65]. Möglicherweise kann das Cyclophosphamid durch Alteration der DNA-Struktur und Proteininter-

aktionen die physiologischen Abläufe, insbesondere die Veränderungen der Chromatinstruktur und die Transformation des Zellkerns beeinträchtigen. Des Weiteren behindert die veränderte DNA-Struktur ggf. die regelrechte Formierung der NETs. Durch abnorme Basenpaarungen, Einzelstrangbrüche und Spaltung von DNA-Ketten kann die Stabilität der NETs herabgesetzt sein. Spekulativ wäre eine solche Beeinträchtigung der Stabilität der NETs nicht nur im Rahmen der Neubildung möglich, sondern auch durch Alkylierung des DNA-Grundgerüsts bereits bestehender NETs im Extrazellulärraum.

Ein weiterer Aspekt einer verminderten Neubildung von NETs ist mutmaßlich auf eine reduzierte Anzahl an neutrophilen Granulozyten, die den Hauptteil der Leukozyten ausmachen, zurückzuführen. Für die Patienten mit einer GPA, deren Neutrophilenzahl sowohl absolut als auch relativ signifikant höher gegenüber den gesunden Probanden war, bestand eine signifikante geringe bzw. mittlere positive Korrelation der cf-DNA/NETs mit der relativen, nicht aber der absoluten Anzahl der Neutrophilen (siehe Tabelle 4.4). Die absolute Anzahl der Neutrophilen von Probanden einer schwedischen Arbeit mit einer aktiven AAV war gegenüber Gesunden ebenfalls signifikant erhöht und korrelierte des Weiteren mit der Höhe der Plasmakonzentrationen an NET-Bestandteilen [192]. Bei Probanden mit einer rheumatoiden Arthritis stellte sich im Allgemeinen auch kein linearer Zusammenhang zwischen der Höhe der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentrationen und der absoluten Anzahl der neutrophilen Granulozyten dar. Allerdings wurden bei einer Subpopulation mit $> 6,0 \cdot 10^9$ Neutrophilen/l signifikant höhere Plasmakonzentrationen an NET-Bestandteilen gemessen, als bei Patienten mit einer niedrigeren Anzahl neutrophiler Granulozyten [134]. Im Rahmen der Cyclophosphamid-Pulstherapie ist eine Reduktion der Leukozyten eine häufig beobachtete Nebenwirkung. Erfahrungsgemäß fällt diese jedoch geringer aus als unter der täglichen oralen Cyclophosphamidapplikation [26, 28, 29]. In der vorliegenden Arbeit sank unter der Cyclophosphamid - Pulstherapie die Anzahl der Leukozyten von $14550/\mu\text{l}$ auf $8860/\mu\text{l}$ im Median. Der Abfall stellte sich im parameterfreien Test nach Wilcoxon jedoch nur tendenziell ($p = 0,068$) dar. Der relative Anteil der Neutrophilen an der Gesamtanzahl der Leukozyten lag vor und nach Cyclophosphamid-Pulstherapie auf einem Niveau (83,85% vs. 82,2%). Die absolute Anzahl der Neutrophilen reduzierte sich unter Therapie tendenziell, aber nicht signifikant ($p = 0,068$). In vitro produzieren in Abhängigkeit vom Stimulus bis zu 80% der aktivierten neutrophilen Granulozyten NETs [82], so dass es im Rahmen einer Leukozytenreduktion auch zu einem quantitativen Abfall der NETs und somit der cf-DNA kommen müsste. Letztlich versucht man jedoch in der klinischen Praxis durch Anpassung der Cyclophosphamiddosis entsprechend des Leukozytennadir, des Alters und der Nierenfunktion eine stärkere Myelonsuppression mit ausgeprägterer Leukozytopenie wegen des erhöhten Infektionsrisikos zu vermeiden [9].

In dem Studienkollektiv der vorliegenden Arbeit erfolgte die Remissions-induzierende Therapie jeweils mit Cyclophosphamid. Mittlerweile wird auch das Biologikum Rituximab, das in mehreren Studien eine vergleichbare Effektivität aufwies [32, 33] und durch eine B-Zelldepletion mit reduzierter Antikörperproduktion sowie verminderter MHC II-abhängiger Antigenpräsentation zu einer Beeinträchtigung sowohl des humoralen als auch des zellulären Immunsystems führt [31], in den Leitlinien zur Remissionsinduktion bei Organ- und lebensbedrohlichen Verläufen empfohlen [6, 24]. Da bei keinem der AAV-Patienten in dem Beobachtungszeitraum der Studie eine Rituximabtherapie eingeleitet wurde, konnte der Einfluss von Rituximab auf die cf-DNA/NETs bzw. dem sCD163 nicht untersucht werden. In zukünftigen Studien sollte daher auch die Wechselwirkung von Rituximab mit den NETs und deren Kinetik erforscht werden.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass die NETs nicht nur ein interessanter Biomarker zur Einschätzung der Krankheitsaktivität und Verlaufsbeurteilung sind, sondern aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Pathogenese der AAVs auch ein therapeutisches Target darstellen. Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit für den Plasmaaustausch und die Cyclophosphamid - Pulstherapie lassen vermuten, dass durch diese in der klinischen Praxis etablierten Therapien auch ein Eingriff in die bei den AAVs auftretende pathologisch gesteigerte NET-Bildung erfolgt. Allerdings wäre nach den Ergebnissen der PEXIVAS-Studie prinzipiell eine zusätzlich zur Standardinduktionstherapie durchgeführte Plasmaaustauschbehandlung im Rahmen einer schwereren renalen Beteiligung der AAV nicht generell indiziert. Inwieweit sich die Ergebnisse der PEXIVAS-Studie auf die Therapieregime der AAV bzw. Leitlinienempfehlungen in Zukunft auswirken, bleibt abzuwarten. Derebrail und Falk postulierten in einem Kommentar zur PEXIVAS-Studie einen zu erwartenden Benefit einer zusätzlichen Plasmaaustauschtherapie in ausgewählten Fällen, zu denen Patienten mit einer Koinzidenz einer anti-glomerulären Basalmembranerkrankung sowie bei Auftreten einer RPGN mit fehlenden bzw. minimalen histologisch nachweisbaren sklerotischen Veränderungen gehören [228]. Die Plasmaaustauschbehandlung ist sicherlich als kurzfristige Interventionsmöglichkeit zur Akutbehandlung einzuordnen, auch im Hinblick auf eine schnelle Durchbrechung des Circulus vitiosus aus ANCAs und NETs. Hinsichtlich der Langzeiteffekte hat mutmaßlich die immunmodulierende Therapie (u.a. Cyclophosphamid, Corticosteroide) einen größeren Einfluss.

5.4 cf-DNA/NETs und ANCA-assoziierte nekrotisierende Glomerulonephritis

In Nierenbiopsien von AAV-Patienten mit einer nekrotisierenden Glomerulonephritis wurden NETs in betroffenen Glomeruli und im Interstitium nachgewiesen [48, 49, 237]. Ein Zusammenhang zwischen NET-assoziierten histopathologischen Veränderungen und dem Auftreten eines Organversagens wurde u.a. bereits für ein ischämisch getriggertes akutes Leberversagen [104] sowie einem TRALI [96] berichtet. Die Konzentrationen an NET-Bestandteilen (citruinierte-Histon H3-DNA-Komplexe) in renalen Läsionen von AAV-Patienten wurden als signifikant höher gegenüber gesunden Probanden beschrieben und zeigten eine hohe Korrelation zu den plasmatischen Konzentrationen [191]. Für die Patienten mit einer GPA bestanden in der vorliegenden Arbeit für die cf-DNA/NETs zum einen positive Korrelationen zur Höhe der Retentionsparameter (Creatinin, HST), zum anderen eine inverse Korrelation zur eGFR (MDRD) (siehe Tabelle 4.4). Wang et al. fanden zuvor keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den plasmatischen cf-DNA-Konzentrationen einer chinesischen Kohorte MPO-ANCA positiver AAV-Patienten und dem Serumcreatinin bzw. der eGFR (MDRD) [191]. Andererseits korrelierte das Ausmaß der glomerulären Infiltration durch neutrophile Granulozyten in Biopsien von ANCA-assoziierten Glomerulonephritiden mit der Höhe des Serumcreatinins [238].

AAV-Patienten mit hoher Affinität der MPO-ANCAs zur Myeloperoxidase hatten in einer japanischen Studie eine signifikant höhere Krankheitsaktivität im BVAS. In den Glomeruli traten mehr NETs auf. Histopathologisch stellten sich hauptsächlich Formen der erhöhten Prozessaktivität der Glomerulonephritis dar (fokaler Typ bzw. >50% Halbmonde). AAV-Patienten mit einer niedrigen Affinität der MPO-ANCAs zeigten weniger prolongierte Verläufe des Nierenversagens. Histologisch lagen vermehrt chronische Veränderungen vor (sklerotischer bzw. gemischter Typ der Glomerulonephritis) [239]. In der vorliegenden Arbeit konnten hohe systemische cf-DNA/NETs - Konzentrationen mehrheitlich Patienten mit einer aktiven Glomerulonephritis vom fokalen Typ bzw. >50% Halbmonden zugeordnet werden. Extrazelluläre Ablagerungen an MPO, die hauptsächlich durch neutrophile Granulozyten, insbesondere im Rahmen der NET-Bildung, freigesetzt werden, treten in AAV-assoziierten Glomerulonephritiden quantitativ in höherem Ausmaß auf und konnten glomerulär, periglomerulär, tubulär und

im Interstitium gesehen werden. Ein höheres Ausmaß an extrazellulärer zytotoxisch wirkender MPO korreliert mit einem höheren Anteil an Glomeruli mit vermehrter Aktivität der Vaskulitis (segmentale Nekrosen und extrakapilläre halbmondförmige Proliferationen) [237]. Glomeruläre Endothelzellen können NETs internalisieren, die NET-Aufnahmekapazität der Endothelzellen ist allerdings limitiert [198]. TLR2- und TLR4-vermittelt bewirken die in den NETs enthaltenen Histone eine Destruktion der Glomeruli mit Auftreten einer Proteinurie. Neben der Nekrose vaskulärer Strukturen, Zerstörung der Podozyten und der Infiltration weiterer Leukozyten kommt es zur Aktivierung parietaler Epithelzellen mit nachfolgender Hyperplasie und halbmondförmiger Proliferationen im Bowmankapselraum [240]. Die NET-gebundene Elastase beeinträchtigt durch die Proteolyse endothelialer Zellkontakte die Integrität des Endothelzellverbandes. Daraus resultiert ebenfalls ein transendothelialer Proteinverlust [198]. Des Weiteren kann die prolongierte Einwirkung der neutrophilen Elastase einen Verlust endothelialer Zellmarker initiieren und bewirkt so eine Konvertierung der Endothelzellen zu einem mesenchymalen Phänotyp, wodurch eine Fibrosierung des Nierenparenchyms begünstigt werden kann [198]. Ein vermehrtes Auftreten fibrotischer bzw. sklerotischer Veränderungen ist mit einer schlechteren renalen Prognose und einem höheren Auftreten fortdauernder Notwendigkeit zur Nierenersatztherapie assoziiert [241].

Für die GPA-Gruppe stellte sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen und des Ausmaßes der Erythrozyturie im Teststreifen bzw. Sediment sowie der Schwere der Proteinurie im Urinteststreifen und 24-h-Sammelurin dar (siehe Tabellen 4.4 und 12.13). Auch in den ROC-Analysen der GPA-Patienten mit einer ANCA-assoziierten Glomerulonephritis (siehe Anhang 12.2.10) bestand eine enge Beziehung der cf-DNA/NETs hinsichtlich des Vorliegens einer pathologischen Proteinurie (> 200 mg/d), einer pathologischen Hämaturie (> 10 Erythrozyten/GF und Nachweis von dysomorphen Erythrozyten in der Phasenkontrastmikroskopie) sowie der Kombination von beiden. Die AUC-Werte lagen in einem Bereich von 0,819 bis 0,889. Plasmakonzentrationen von $\geq 245,05$ ng/ml für die cf-DNA/NETs_hPI (Sensitivität 0,833, Spezifität 0,833) bzw. $\geq 762,6$ ng/ml für die cf-DNA/NETs_bTh (Sensitivität 0,833, Spezifität 0,917) können auf das Auftreten einer pathologischen Proteinurie + Hämaturie bei Vorliegen einer renalen Beteiligung der GPA hinweisen. Für die isolierte Betrachtung der Proteinurie können schon Plasmakonzentrationen von $\geq 163,9$ ng/ml (cf-DNA/NETs_hPI; Sensitivität 0,917, Spezifität 0,667) bzw. $\geq 748,1$ ng/ml (cf-DNA/NETs_bTh; Sensitivität 0,583, Spezifität 1,0) auf eine Pathologie hindeuten. Die Proteinurie kann ein Anhalt für eine vermehrte renale Aktivität der Grunderkrankung sein [174], ist oftmals aber auch Ausdruck einer chronischen Schädigung [242]. Demgegenüber ist die Erythrozyturie mit Nachweis dysomorpher Erythrozyten, als Hinweis auf eine glomeruläre Schädigung, ein Aktivitätskriterium der ANCA-assoziierten Glomerulonephritis [7]. Eine Regredienz der Hämaturie in Kombination mit einer Stabilisierung bzw. Verbesserung der renalen Funktion wird als Remissionskriterium in verschiedenen Studien angesetzt [243]. Bei GPA-Patienten mit einer erhöhten Aktivität (BVAS ≥ 6) bzw. einem progredienten Verlauf der Grunderkrankung konnten im Gegensatz zu Patienten mit einer niedrigen Aktivität (BVAS ≤ 5) bzw. einem stabilen Krankheitsverlauf sowohl eine signifikant höhere Erythrozyturie im Urinteststreifen und Urinsediment als auch signifikant höhere cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen bestimmt werden (siehe Abschnitte 4.5 und 4.6). Im Falle der GPA_BVAS ≥ 6 - Gruppe bestand auch hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens einer Hämaturie, als Manifestationskriterium im BVAS, ein signifikanter Unterschied zur GPA_BVAS ≤ 5 - Gruppe. Dysmorphe Erythrozyten bzw. Akanthozyten traten mit einer Ausnahme in der GPA_stabil - Gruppe (histologisch fortgeschrittene sklerosierende extra- und intrakapilläre Glomerulonephritis ohne Nachweis einer Prozessaktivität) nur in den beiden Gruppen mit signifikant erhöhten cf-DNA/NETs-Konzentrationen (GPA_progredient, GPA_BVAS ≥ 6) auf. Die Genese einer persistierenden Hämaturie trotz klinischer Remis-

sion ist oftmals schwierig zu klären. Neben einem chronischen Schaden kann auch eine auf einem niedrigen Aktivitätsniveau (low-grade) weiterbestehende Glomerulonephritis ursächlich sein [243]. Diese Differenzierung nimmt auch auf das BVAS-Scoring Einfluss, da ein chronischer Schaden nicht berücksichtigt wird. Allerdings bestand lediglich bei drei GPA-Patienten eine klinische Remission (BVAS-Scoring 0). Eine glomeruläre Hämaturie trat nur bei Patienten mit weiteren extrarenal bestehenden klinischen Krankheitsmanifestationen und deutlich erhöhter Aktivität der GPA auf. Prinzipiell hatten AAV-Patienten mit einer persistierenden Hämaturie trotz klinischer Remission in einer größeren chinesischen Studie ein schlechteres renales Outcome [243]. Des Weiteren ist das Auftreten einer persistierenden Hämaturie in Remission (insbesondere auch die Dauer der Hämaturie) im Gegensatz zur pathologischen Proteinurie mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv der renalen Vasculitis assoziiert [242]. In den ROC-Analysen der GPA-Patienten mit einer bekannten AAV-assoziierten Glomerulonephritis wiesen erhöhte Plasmakonzentrationen von $\geq 227,6$ ng/ml (cf-DNA/NETs_hPI; Sensitivität 1,0, Spezifität 0,7) bzw. $\geq 762,6$ ng/ml (cf-DNA/NETs_bTh; Sensitivität 0,833, Spezifität 0,9) auf das Vorliegen einer pathologischen Hämaturie hin (siehe Anhang 12.2.10).

Erhöhte cf-DNA/NETs - Plasmakonzentrationen bilden eine erhöhte Aktivität der GPA ab. Im Falle des Vorliegens einer renalen Manifestation der Vasculitis spiegelt sich eine vermehrte renale Aktivität auch in einer systemischen Erhöhung der cf-DNA/NETs - Konzentrationen wider. Eine Einschränkung der Nierenfunktion führt aber nicht zwangsläufig zu einer Erhöhung der cf-DNA/NETs. Zum einen bestand weder in der Subanalyse der Krankheitsaktivität (GPA_BVAS ≤ 5 vs. GPA_BVAS ≥ 6) noch des Krankheitsverlaufes (GPA_stabil vs. GPA_proгредиent) ein signifikanter Unterschied der Retentionsparameter (Serumcreatinin, -harnstoff) oder der eGFR (MDRD), obwohl in beiden Fällen die cf-DNA/NETs - Konzentrationen signifikant differierten (siehe Abschnitte 4.5 und 4.6). Zum anderen hatten GPA - Patienten mit einer höhergradigen Einschränkung der Nierenfunktion (GPA_eGFR < 60), die sich in der Höhe der Retentionsparameter und der eGFR (MDRD) signifikant von denen mit keiner bzw. einer leichten Einschränkung der eGFR (MDRD) (GPA_eGFR ≥ 60) unterschieden, nur im Falle der cf-DNA/NETs_bTh signifikant erhöhte systemische Konzentrationen (für die cf-DNA/NETs_hPI lag lediglich ein tendenzieller Unterschied vor, siehe Tabelle 4.8). Betrachtet man die Gesamtheit des Studienkollektives entsprechend dem Vorliegen einer höhergradigen (SP_eGFR < 60) bzw. keiner oder leichten (SP_eGFR ≥ 60) Einschränkung der eGFR (Vorliegen signifikanter Unterschiede für Serumcreatinin, -harnstoff und eGFR (MDRD)) wurden keine Unterschiede in der Höhe der cf-DNA/NETs - Konzentrationen gesehen (siehe Tabelle 4.7). Die cf-DNA/NETs_hPI lag sogar auf einem ähnlichen Niveau (SP_eGFR ≥ 60 142,0 ng/ml vs. SP_eGFR < 60 157,3 ng/ml). Das gleiche Bild stellte sich für die Subanalyse der AH+/-DM-Gruppe dar. Trotz signifikanter Unterschiede der Nierenfunktionsparameter bestanden keine signifikanten Differenzen für die cf-DNA/NETs (siehe Tabelle 4.9). Beim paarweisen Vergleich der einzelnen Studiengruppen waren sowohl die Nierenfunktionsparameter als auch die cf-DNA/NETs der gesunden Probanden signifikant niedriger als die der GPA-Gruppe. Allerdings bestand auch ein Unterschied zu den Nierenfunktionsparametern der AH+/-DM-Gruppe, die wie die gesunden Probanden niedrige cf-DNA/NETs-Konzentrationen aufwies. Auf der anderen Seite lagen auch für die Patienten mit einem SLE signifikant niedrigere Retentionsparameter und eine verbesserte eGFR (MDRD) gegenüber der GPA- und AH+/-DM-Gruppe vor. Die cf-DNA/NETs-Konzentrationen unterschieden sich zu den Patienten mit einer GPA aber nicht und waren, zumindest im Falle der cf-DNA/NETs_hPI, signifikant höher gegenüber denen der AH+/-DM-Gruppe (Vergleich Abbildungen 4.7 bis 4.9 sowie 4.12 und 4.13). Des Weiteren hatten GPA-Patienten gegenüber Patienten der AH+/-DM-Gruppe mit vergleichbarer höhergradiger Einschränkung der Nierenfunktion (eGFR < 60) signifikant höhere cf-DNA/NETs-Konzentrationen (in bei-

den Messreihen). Zusammenfassend scheint im Allgemeinen die Höhe der Nierenfunktionseinschränkung keine Rolle auf die Höhe der cf-DNA/NETs - Konzentration zu spielen. Eine renale Aktivität der GPA wiederum hat einen Einfluss auf die systemischen cf-DNA/NETs - Konzentrationen und kann zur Beurteilung der Aktivität der renalen Vaskulitis mit herangezogen werden.

5.5 Zellfreie plasmatische DNA - neutrophilen Ursprungs?

In der Diskussion stehen die Quellen zellfreier plasmatischer DNA (cf-DNA). Neben der NETosis können auch andere Ursachen, u.a. Zelluntergang im Rahmen von entzündlichen Prozessen und Tumoren, eine Rolle spielen. Demers et al. konnten nach Beimpfung von Mäusen mit Mammakarzinomzellen einen signifikanten Anstieg neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut messen, der mit dem Tumorwachstum korrelierte. Zudem bestimmten sie auch einen signifikanten Anstieg zellfreier DNA im Plasma. Im Rahmen von Regressionsanalysen (plasmatische DNA als abhängige Variable) war der Anstieg der plasmatischen zellfreien DNA besser durch die gestiegene Anzahl der neutrophilen Granulozyten als durch die Tumorgröße ableitbar. Des Weiteren wurde ein höherer Prozentsatz an citrulliniertem Histon H3 bestimmt, das bei der NETosis entsteht, so dass die gestiegene Plasmakonzentration zellfreier DNA mutmaßlich neutrophilen Ursprungs war [92]. NET-Marker zeigten bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1 eine gleichsinnige Korrelation mit der Anzahl neutrophiler Granulozyten. Bei Probanden mit einer verminderten Neutrophilenzahl wurden signifikant niedrigere Serenspiegel an PR3 und neutrophiler Elastase gemessen. Auf eine normwertige Anzahl an neutrophilen Granulozyten extrapoliert, bestand kein Unterschied zu den Kontrollgruppen [244]. Auch bei Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 konnte eine positive Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen an neutrophiler Elastase und DNA-Histon-Komplexen (Nukleosomen) gesehen werden [200, 202]. DNA-Histon-Komplexe können diversen Zellursprungs sein, die neutrophile Elastase wird jedoch nur von neutrophilen Granulozyten freigesetzt [202].

Auf den ersten Blick widersprüchliche Befunde stellten sich beim Vergleich septischer vs. nicht septischer Intensivpatienten dar. Neben signifikant höheren Plasmakonzentrationen an IL-6 und IL-8 wurden bei den Sepsispatienten auch signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen an cf-DNA und freien Histonen bestimmt, im Einklang mit der Vorstellung einer Mobilisierung neutrophiler Granulozyten und konsekutiver NET-Bildung im Rahmen der Sepsis. Im Gegensatz dazu waren die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten septischer Patienten zur NET-Bildung nach Stimulierung mit PMA in-vitro und die NET-vermittelte Elimination von E.coli signifikant vermindert. Über die in vivo Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten zur NETosis konnte keine Aussage getätigt werden [245]. Die Fähigkeit Neutrophiler zur NET-Formierung scheint auch abhängig vom Milieu zu sein [92], so dass in-vivo und in-vitro Versuche nur eingeschränkt vergleichbar sind. Hashiba et al. bestimmten bei den Sepsispatienten aber auch einen signifikant höheren Anteil (absolut und relativ) unreifer neutrophiler Granulozyten. Sie postulierten, dass die reifen Neutrophilen im Rahmen des septischen Geschehens bereits verbraucht wurden und durch NET-Bildung mutmaßlich zum Auftreten der erhöhten cf-DNA beigetragen hatten [245]. Unreife neutrophile Granulozyten, die bspw. vermehrt im Rahmen einer Linksverschiebung ins periphere Blut ausgeschwemmt werden, unterscheiden sich gegenüber reifen Neutrophilen u.a. durch eine verminderte Expression Interferon-abhängiger Genabschnitte. Bei reifen neutrophilen Granulozyten kann durch eine Interferon-abhängige Sensibilisierung die NET-Bildung auch durch sonst inadäquate Stimuli erfolgen. Dieser Mechanismus greift bei unreifen Neutrophilen nicht und die NETosis bleibt aus [214]. Auch neonatale neutrophile Granulozyten besitzen nur eine eingeschränkte Fähigkeit zur NET-Bildung [246]. In einer kanadischen Studie korrelierten die er-

höhten plasmatischen cf-DNA-Konzentrationen von Sepsispatienten mit einer Erhöhung der MPO-Plasmakonzentrationen. Als weiterer Beleg für einen NET-bedingten Anstieg der plasmatischen cf-DNA wurde ein signifikanter Anstieg an NETosis-spezifischem citrullinierten Histon H3 beobachtet. Dagegen wurde bei Traumapatienten der Anstieg an cf-DNA auf nekrotisches bzw. verletztes Gewebe zurückgeführt [247].

Zhang et al. konnten für Patienten mit einem SLE belegen, dass die vermehrte Freisetzung von NETs, insbesondere durch neutrophile Granulozyten, zum Teil auch durch low-density Granulozyten, die hauptsächliche Quelle plasmatischer cf-DNA war [127]. Gould et al. zeigten nicht nur, dass die cf-DNA im Blut hauptsächlich neutrophilen Ursprungs, sondern auch, dass deren Anstieg durch die Freisetzung von NETs bedingt war. Nach Inkubation von Vollblut bzw. einer gereinigten Lösung neutrophiler Granulozyten mit Stimulatoren der NETosis (LPS bzw. Lipoteichonsäure/Peptidoglycane) konnte eine gleichartige Menge an cf-DNA gemessen werden. Durch Unterbindung der NETosis mittels eines PAD4-Inhibitors (CL-Amidine) wurde weder im Vollblut noch in der neutrophilen Lösung ein Anstieg der cf-DNA bestimmt [94].

Für die Patienten mit einer GPA konnte in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der Höhe der Plasmakonzentrationen der cf-DNA/NETs und dem relativen Anteil der neutrophilen Granulozyten aufgezeigt werden (siehe Tabelle 4.4). Auch höhere Werte der absoluten Anzahl neutrophiler Granulozyten korrelierten tendenziell mit höheren Konzentrationen plasmatischer cf-DNA. Dieser Zusammenhang war aber nicht signifikant (cf-DNA_hPI: $p = 0,092$; cf-DNA_bTh: $p = 0,075$). Die GPA-Gruppe hatte sowohl relativ als auch absolut die höchste Anzahl an Neutrophilen, die sich signifikant von denen der gesunden Probanden unterschied (siehe Abschnitt 4.1.1 und Abbildung 4.4). Im Falle der relativen Messung bestand auch ein signifikanter Unterschied zur zweiten nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppe (AH+/-DM).

Zur Bestimmung der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentrationen kam Picogreen (ein interkalierender Farbstoff zur Erfassung extrazellulärer DNA) zum Einsatz, der nicht nur NET-gebundene DNA, sondern auch Doppelstrang-DNA anderen Ursprungs detektiert, die im Rahmen einer nekrotisierenden Vaskulitis anfallen kann. Bei Bakteriämien kann sich Picogreen auch in von Bakterien freigesetzter DNA einlagern. Allerdings wurde dieses Phänomen im signifikanten Ausmaß nur bei *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben [76]. Letztlich ist die Quelle der in dieser Arbeit bestimmten plasmatischen cf-DNA nicht zweifelsfrei zu klären. Die zentrale Rolle der neutrophilen Granulozyten und der NETs in der Pathogenese der AAV [2, 4] wurde aber bereits ausführlich diskutiert. In Zusammenschau mit der signifikant erhöhten Anzahl der Neutrophilen und deren Korrelation mit den plasmatischen cf-DNA - Konzentrationen ist ein neutrophiler Ursprung für einen Großteil der zellfreien extrazellulären plasmatischen DNA stark anzunehmen. Diese Hypothese wird auch durch einen Report von Watanabe-Kusunoki et al. geteilt, die eine Erhöhung der systemischen cf-DNA bei einer Propylthiouracil-assoziierten AAV auf eine vermehrte Konzentration persistierender NETs zurückführten [211].

5.6 sCD163

Neben neutrophilen Granulozyten enthalten auch Monozyten, die ca. 10% der zirkulierenden Leukozyten ausmachen, die Antigene MPO und PR3. Diese sind in Lysosomen vertreten und werden im Rahmen des Primings durch bspw. TNF- α , analog zu den Vorgängen bei den Neutrophilen, auch auf der Oberfläche von Monozyten präsentiert. ANCAs aktivieren Monozyten zur Produktion von ROS, proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF- α , IL-1 β usw.) und dem Chemokin MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Monozyten von Patienten mit einer GPA haben eine vermehrte Integrinexprimierung auf der Zelloberfläche, die u.a. bei der Diapedese eine Rolle spielt. Die im Rahmen von entzündlichen Prozessen in die Peripherie rekrutierten Monozyten differenzieren sich zu Makrophagen [162]. Über das vermehrte Auftreten von CD163-exprimierenden M2-Makrophagen in vaskulitischen Veränderungen der Atemwege [139] und ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden [161] sowie deren Häufung in Granulomen von GPA-Patienten [163] wurde bereits in der Einleitung berichtet. Die Eignung der löslichen Form des CD163-Transmembranrezeptors (sCD163) als ein Aktivitätsparameter von AAVs, wie sie u.a. im Falle der rheumatoiden Arthritis angedeutet wurde [149, 151], sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Die niedrigste mediane sCD163-Plasmakonzentration konnte den gesunden Probanden zugeordnet werden. Interessanterweise bestand weder für die GPA noch für die MPA ein signifikanter Unterschied der plasmatischen sCD163-Konzentrationen zu den gesunden Probanden, obwohl die mediane sCD163-Plasmakonzentration der GPA-Gruppe auf einem vergleichbar hohen Niveau wie die der SLE-Gruppe lag (siehe Abbildung 4.14). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Monozyten, sowohl relativ als auch absolut, und der Höhe der sCD163-Konzentrationen trat in keiner der fünf Studiengruppen auf. Lediglich in der MPA-Gruppe bestand eine positive hohe Korrelation der Gesamtleukozytenzahl und dem sCD163 ($r_s = 0,900$). Der Phänotyp der Makrophagen ist abhängig vom Umgebungsmilieu und wird v.a. durch Zytokine beeinflusst. Im Gegensatz zu Seren Gesunder, bei denen mehrheitlich M0-Makrophagen (nicht aktiviert) in Erscheinung treten, kommt es durch Seren von AAV-Patienten, insbesondere bei erhöhter Aktivität der Grunderkrankung, zu einem verstärkten Auftreten des M2c-Phänotyps der Makrophagen. Mögliche Ursachen sind u.a. erhöhte Zytokinserumkonzentrationen von IL-10 und IL-17 bei AAV-Patienten [141]. Ohlsson et al. fanden für Seren von MPA-Patienten in Remission keinen Unterschied bei der Phänotypisierung von Makrophagen gegenüber Gesunden (hauptsächlich M0-Phänotyp) [141]. Die Krankheitsaktivität der MPA-Patienten in der vorliegenden Arbeit betrug im Median im BVAS lediglich 5 Punkte, der höchste Einzelwert nur 8 Punkte. Im Vergleich zu den gesunden Probanden (1,164 ng/ml) war die mediane sCD163-Konzentration nur mäßig erhöht (1,601 ng/ml). Patienten mit einer GPA exprimierten trotz bestehender Remission bei Ohlsson et al. vermehrt den M2c-Phänotyp der Makrophagen [141]. Die mediane sCD163-Plasmakonzentration lag in der vorliegenden Arbeit mit 2,127 ng/ml deutlich über der der gesunden Kontrollgruppe, ein signifikanter Unterschied bestand dennoch nicht. Rouselle et al. berichteten von erhöhten sCD163-Serumkonzentrationen in Ratten mit einer AAV und renaler Beteiligung [160], andere fanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den sCD163-Plasmakonzentrationen von AAV-Patienten und Gesunden [174].

Von einem signifikant höheren Anteil an M2- gegenüber M1-Makrophagen wurde in entzündlichen Läsionen der Atemwege [139] sowie in granulomatösen pulmonalen Veränderungen [163] berichtet. Allerdings konnte für die Expression des Makrophagenphänotyps kein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der Krankheitsausbreitung bzw. einer Erstmanifestation oder einem Rezidiv der GPA gesehen werden [139]. Betrachtet man die Kor-

relationsanalysen und einzelne Subanalysen der GPA-Patienten der vorliegenden Arbeit, kann man auf den ersten Blick den Eindruck bekommen, dass der sCD163 in gewisser Weise schon die Krankheitsaktivität der GPA abbildet. Auch die AUC der ROC-Analysen zur Vorhersage der Krankheitsaktivität ($BVAS \leq 5$ vs. $BVAS \geq 6$) entsprechend der Höhe des sCD163 war mit 0,910 hoch. Des Weiteren korrelierte die Höhe der plasmatischen sCD163-Konzentration mit der Höhe der Autoantikörper (c-ANCA und PR3-Ak sowie p-ANCA und MPO-Ak) und der Krankheitsaktivität der GPA bzw. MPA im BVAS. GPA-Patienten mit einer erhöhten Aktivität ($BVAS \geq 6$) hatten signifikant höhere sCD163-Plasmakonzentrationen gegenüber gesunden Probanden und GPA-Patienten mit einer niedrigen Krankheitsaktivität ($BVAS \leq 5$) (siehe Abbildung 4.17). Ferner konnte ein signifikanter Abfall der sCD163-Konzentration im Rahmen der stationären Behandlung von Patienten mit einer Erstmanifestation bzw. einem Rezidiv der GPA beobachtet werden. Zum Zeitpunkt der Aufnahme, aber nicht mehr bei Entlassung, unterschieden sich die plasmatischen sCD163-Konzentrationen von denen gesunder Probanden signifikant (siehe Abbildung 4.23). Dekkema et al. berichteten von signifikant erhöhten sCD163-Serumkonzentrationen im Vergleich zu Gesunden bei AAV-Patienten mit einer renalen Vaskulitis, jedoch nicht bei AAV-Patienten ohne eine renale Manifestation [248]. Bei allen Patienten der GPA_ $BVAS \geq 6$ - Gruppe und der stationären Verlaufsbeurteilung war eine renale Manifestation der GPA bekannt. Die Retentionsparameter (Serumcreatinin und Serumharnstoff) der GPA-Gruppe waren gegenüber denen der GP- und SLE-Gruppen signifikant erhöht bzw. die eGFR (MDRD) entsprechend reduziert (siehe Abbildungen 4.7 bis 4.9). Im Gegensatz zu den cf-DNA/NETs bestand kein signifikanter Unterschied der sCD163-Konzentrationen zwischen GPA-Patienten mit einem progredienten bzw. stabilen Verlauf der Grunderkrankung, obwohl diese beiden Gruppen sich in der Aktivität der GPA signifikant unterschieden. Auch unter einer Plasmaaustauschbehandlung bzw. einer Cyclophosphamid-Pulstherapie fielen die sCD163-Plasmakonzentrationen nicht signifikant. Im Falle der Cyclophosphamid-Subanalyse der GPA-Patienten lag nicht einmal vor Therapie, trotz erheblich erhöhter Krankheitsaktivität von 25,5 Punkten im BVAS, ein signifikanter Unterschied des sCD163 zu den gesunden Probanden vor (siehe Abbildung 4.26). Im Vergleich zu der AH+/-DM-Gruppe bestand weder für die MPA- und GPA-Gruppen noch für eine der Gruppen der GPA-Subanalysen (insbesondere ist auf die Gruppen mit der jeweiligen erhöhten Krankheitsaktivität bzw. vor Therapie hinzuweisen (GPA_ $BVAS \geq 6$, GPA_progredient, Aufnahme, vor Plasmaaustausch, vor Cyclo)) ein signifikanter Unterschied der sCD163-Plasmakonzentrationen. Die medianen sCD163-Konzentrationen der GPA_ $BVAS \leq 5$ - (1,142 ng/ml) und GPA_stabil - Gruppen (1,733 ng/ml), denen in ihren jeweiligen Vergleichen eine signifikant niedrigere Krankheitsaktivität im BVAS zugeordnet werden konnte, sind sogar niedriger bzw. liegen auf einem ähnlichem Niveau wie die der AH+/-DM-Gruppe (1,617 ng/ml), wengleich keine signifikanten Unterschiede vorlagen. Bei der Auswertung der Ergebnisse bildeten die plasmatischen sCD163-Konzentrationen der AAV-Patienten zwar unterschiedliche Inflammationszustände ab, spiegelten die Krankheitsaktivität der AAVs in mehreren Subanalysen aber nicht konsistent wider. Bestätigt wird dieser Eindruck von den Ergebnissen von O'Reilly et al., die keine signifikanten Unterschiede der sCD163-Serumkonzentrationen von Patienten mit aktiver AAV, gut beherschter Grunderkrankung, AAV in Remission und Gesunden fanden [174]. Auch Dekkema et al. beobachteten keinen signifikanten Abfall der sCD163-Serumkonzentration nach Remissionsinduktion [248].

M2-Makrophagen kommen nicht nur im Rahmen chronischer Entzündungsprozesse vor, sondern treten auch bei akuten Inflammationen und Infektionen in Erscheinung [135, 136, 139]. Sepsispatienten haben signifikant erhöhte sCD163-Plasmakonzentrationen. Die Schwere der Sepsis bildet sich entsprechend des Anstiegs der sCD163-Konzentration ab [249]. Zur Differenzierung einer bakteriellen von einer nicht-bakteriellen Infektion zeigt der

sCD163 eine hohe Spezifität. In der Diagnostik einer systemischen bakteriellen Infektion bewies der sCD163 eine vergleichbare Eignung gegenüber dem CRP und PCT [250]. Die CRP-Werte der gesunden Probanden waren in der vorliegenden Arbeit signifikant niedriger als die der GPA-Gruppe (siehe Abbildung 4.6). Hohe CRP-Werte der GPA-Patienten korrelierten signifikant mit deutlich erhöhten sCD163-Konzentrationen ($r_s = 0,706$). Mit Ausnahme der Subanalyse zum Krankheitsverlauf der GPA (progredient vs. stabil) bestand ein signifikanter Unterschied der sCD163-Plasmakonzentrationen für den Fall, dass den Vergleichsgruppen auch unterschiedlich hohe CRP-Werte zugeordnet werden konnten (GPA_BVAS ≥ 6 vs. GPA_BVAS ≤ 5 ; GPA_Aufnahme vs. GPA_Entlassung). Für die Untersuchungszeitpunkte vor und nach Behandlung mit Cyclophosphamid wurde weder ein Unterschied zwischen den sCD163-Plasmakonzentrationen noch dem CRP gesehen. Zusammenfassend stellte sich ein engerer Zusammenhang zwischen dem sCD163 und den CRP-Werten der GPA-Patienten dar. Neben der Grunderkrankung hatten mutmaßlich weitere Faktoren, wie z.B. bakterielle Infektionen, einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der plasmatischen sCD163-Konzentrationen. Die sCD163-Serumkonzentrationen von AAV-Patienten in Remission mit einem Infekt waren in einer japanischen Studie höher als bei AAV-Patienten mit aktiver Grunderkrankung bzw. infektfreien AAV-Patienten in Remission. Dabei korrelierte die Höhe des sCD163 ebenfalls mit der Höhe des CRPs. Aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität des sCD163 zur Unterscheidung von AAV-Patienten mit bzw. ohne infektiösem Geschehen, postulierten die Autoren die Nutzung des sCD163 als einen Biomarker zur Detektion von infektiösen Komplikationen von AAV-Patienten [251].

Im Rahmen ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden infiltrieren Makrophagen sowohl Glomeruli als auch das Interstitium [159, 160, 252]. Dabei wurde ein hoher Anteil CD163-exprimierender Makrophagen in beiden Kompartimenten beobachtet [174]. Makrophagen sind insbesondere in den glomerulären Kapselproliferaten nachweisbar [159, 238], treten aber auch in fibrinoiden Nekrosen auf und sind lokal mit kleinsten Beeinträchtigungen der glomerulären Basalmembran assoziiert [238]. Das Ausmaß der glomerulären Makrophageninfiltration steht im positiven Zusammenhang mit der Schwere der Ausbildung glomerulärer fibrinoider Nekrosen und der Anzahl der Glomeruli mit halbmondförmigen Kapselproliferaten [238, 252]. Die Nierenfunktion (Serumcreatinin) korreliert mit dem Grad der interstitiellen und glomerulären Infiltration durch Makrophagen [252]. CD163-exprimierende M2-Makrophagen wurden sowohl in proliferativen glomerulären Veränderungen als auch in akuten tubulointerstitiellen Läsionen ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden gesehen. Das Ausmaß der M2-Makrophageninfiltration akuter tubulointerstitieller Veränderungen stand im Zusammenhang mit der Einschränkung der Nierenfunktion [161]. In der vorliegenden Arbeit hatten die Patienten mit einer AAV gegenüber den gesunden Probanden signifikant höhere Serumcreatininkonzentrationen und verminderte eGFRs nach der MDRD-Methode (siehe Abbildungen 4.7 und 4.8). Bei 18 von 20 Patienten mit einer GPA war eine renale Manifestation der Vaskulitis bekannt. Das Serumcreatinin korrelierte positiv mit der Höhe der plasmatischen sCD163-Konzentration, entsprechend einer negativen Korrelation des sCD163 mit der eGFR (MDRD) und der endogenen Creatinin-Clearance (siehe Tabellen 4.4 und 12.13). Im Einklang mit den Ergebnissen der cf-DNA/NETs bestanden in der GPA-Gruppe positive Korrelationen (in der Mehrheit sogar auf hohem Niveau) zwischen der Höhe des sCD163 und des Ausmaßes der Proteinurie im Urineststreifen bzw. 24h-Sammelurin und der Erythrozyturie, sowohl im Teststreifen als auch im Sediment. Zusätzlich wurde auch ein positiver Zusammenhang zwischen der Leukozyturie im Teststreifen und dem sCD163 gesehen. Die GPA_BVAS ≥ 6 -Gruppe, die im Gegensatz zu den GPA-Patienten mit einer niedrigen Aktivität der Vaskulitis (GPA_BVAS ≤ 5) durch eine glomeruläre Hämaturie gekennzeichnet war, hatte auch signifikant erhöhte sCD163 - Plasmakonzentrationen. In der GPA_progredient - Gruppe konnte gegenüber der GPA_stabil - Gruppe ebenfalls eine ausgeprägtere glomeruläre

Hämaturie beobachtet werden. Allerdings unterschieden sich die plasmatischen sCD163-Konzentrationen nicht signifikant, sondern nur tendenziell. In den ROC-Analysen (siehe Abschnitt 12.2.10) stellten sich sowohl für die Proteinurie (AUC 0,944), die Hämaturie (AUC 0,867) als auch bei einem kombinierten Auftreten beider Pathologien (AUC 0,889) hohe Werte für die AUCs dar. Plasmatische sCD163-Konzentrationen $\geq 2,505$ ng/ml (Sensitivität 0,833, Spezifität 0,917) sind bei bekannter renaler Manifestation der GPA hinweisend auf das Vorhandensein einer Proteinurie + Hämaturie. Alles in allem scheinen GPA-Patienten mit einer ausgeprägteren renalen Aktivität der Grunderkrankung gegenüber Patienten mit einer kompensierten renalen Aktivität bzw. keiner renalen Manifestation der GPA höhere plasmatische sCD163-Konzentrationen zu haben. Für HIV-1 Patienten unter antiretroviraler Therapie mit hohen systemischen sCD163-Konzentrationen konnte ein signifikant gesteigertes Risiko, an einer HIV-assoziierten chronischen Nierenschädigung zu erkranken, aufgezeigt werden [143].

Zur Bestimmung der Aktivität und zur Therapiekontrolle ANCA-assoziiierter Glomerulonephritiden wird seit kurzem die Messung des sCD163 im Urin als eine neue Methode propagiert. Die sCD163-Urinkonzentrationen von AAV-Patienten mit aktiver renaler Beteiligung unterscheiden sich signifikant von Patienten mit hoher extrarenaler Aktivität der AAV (ohne renale Manifestation) und Patienten in Remission (sowohl mit als auch ohne renale Beteiligung) [174, 248]. Unter Therapie kommt es zu einem zügigen Konzentrationsabfall [174]. Ein Rezidiv der renalen Vaskulitis kann durch einen erneuten Anstieg der sCD163-Urinkonzentration detektiert werden [253]. Es gibt unterschiedliche Berichte, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Höhe der sCD163 Serum- und Urinkonzentrationen besteht. Tendenziell überwiegen die Ergebnisse mit Nachweis einer positiven Korrelation [174, 248]. Die sCD163-Urinkonzentration ist mit dem Ausmaß der glomerulären Infiltration durch M2-Makrophagen assoziiert. O'Reilly et al. vermuten eine direkte Freisetzung des sCD163 in den Urin nach Abspaltung durch die Metalloprotease [174]. Der sCD163 hat eine molare Masse von annähernd 130 kDa [135] und sollte bei intakter Nierenfunktion nicht glomerulär filtriert werden. Kommt es jedoch im Rahmen einer renalen Beteiligung der AAV zu einer Schädigung der glomerulären Basalmembran mit Auftreten einer unselektiven Proteinurie (z.B. IgG 150 kDa), wäre der Übertritt von plasmatischem sCD163 in den Urin denkbar. Erhöhte systemische sCD163-Konzentrationen könnten dann auch zu einer Erhöhung der Urinkonzentration beitragen. Eine beschriebene positive Korrelation zwischen der Höhe der sCD163-Urinkonzentrationen und dem Ausmaß einer Proteinurie [248] stützt diese Theorie. Des Weiteren fanden O'Reilly et al. bei Patienten trotz hoher extrarenaler Aktivität, jedoch ohne renale Beteiligung der Vaskulitis, keine erhöhten sCD163-Urinkonzentrationen [174]. Eine tubuläre Sezernierung von sCD163 erfolgt nicht [168]. Im Frühstadium der renalen Vaskulitis wird zumindest die lokale renale sCD163-Produktion der entscheidende Faktor sein. M2-Makrophagen sind der dominierende Zelltyp in frühen Läsionen der ANCA-assoziierten pauciimmunen Glomerulonephrits. In mit fibrinoiden Nekrosen betroffenen Glomeruli traten sie sowohl endo-, extra- als auch perikapsulär quantitativ am häufigsten auf. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen kommen sie auch signifikant häufiger in histologisch unverändert scheinenden Glomeruli vor [238]. Des Weiteren war im Mausmodell die sCD163-Urinkonzentration weit vor Ausbildung des histologischen Vollbildes der renalen Vaskulitis deutlich erhöht [174]. In Kombination mit den Urin- und Serumkonzentrationen des T-Zellmarkers sCD25 besteht die Möglichkeit noch frühere Krankheitsstadien zu detektieren. Zwischen der Urin- und Serumkonzentration des sCD25 besteht eine positive Korrelation [248]. Für die Studienpopulation der GPA der vorliegenden Arbeit ist in der Mehrzahl der Fälle histologisch eine höhergradige glomeruläre Schädigung zum Zeitpunkt der Untersuchung oder in der Vergangenheit nachgewiesen worden. Alles in allem ist bei bekannter renaler Manifestation der GPA ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der renalen Vaskulitis und der Höhe der plasmatischen sCD163-Konzentration anzunehmen.

Die höchsten plasmatischen sCD163-Konzentrationen im Median wurden bei Patienten mit einem SLE gemessen, die sich signifikant von denen der gesunden Probanden unterschieden (siehe Abbildung 4.14). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen japanischer Studien [155, 158, 168]. Nakayama et al. fanden zusätzlich eine Assoziation des sCD163 mit der Höhe der dsDNA-Ak und ein vermehrtes Auftreten einer Leukopenie bei erhöhten sCD163-Serumkonzentrationen [155]. Diese Zusammenhänge bestätigten sich in der vorliegenden Arbeit nicht. Es konnte weder für die Autoantikörper (ANA, dsDNA-Ak) oder die Komplementfaktoren noch für die Krankheitsaktivität im SLEDAI bzw. ECLAM eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Ein negativer Zusammenhang bestand lediglich für die Höhe des sCD163 mit der absoluten Lymphozytenzahl (siehe Tabelle 12.29). Bei SLE-Patienten mit einem Makrophagenaktivierungssyndrom fanden Nishino et al. demgegenüber einen Zusammenhang zwischen der Höhe der sCD163-Serumkonzentrationen und der Krankheitsaktivität im SLEDAI-2k. Diese Patienten sind allerdings auch durch besonders hohe sCD163-Konzentrationen gekennzeichnet. Unter Therapie spiegelte sich der Rückgang der Krankheitsaktivität in entsprechend fallenden sCD163-Serumkonzentrationen wider [158]. Glucocorticoide bewirken eine vermehrte Expression von CD163 auf der Makrophagenoberfläche [157]. 77,3% der Patienten der SLE-Gruppe standen unter einer Therapie mit Prednisolon oder Methylprednisolon. Die Höhe der Anti-dsDNA-Ak-Konzentration korreliert mit der glomerulären Anzahl an M2c-Makrophagen sowie mit der glomerulären und tubulären Anzahl an M2a-Makrophagen von SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis. Ein erhöhter Komplementverbrauch stellte sich bei Lupusnephritiden mit einer vermehrten glomerulären Infiltration mit CD163-exprimierenden M2c-Makrophagen dar [157]. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der sCD163-Plasmakonzentration und den Autoantikörpern (ANA, dsDNA-Ak), den Komplementfaktoren (C3 bzw. C4) oder der Krankheitsaktivität (SLEDAI bzw. ECLAM) konnte auch nicht in der Untergruppe der SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis gesehen werden (siehe Tabelle 12.31). Eine glomeruläre Akkumulation an M2-Makrophagen ist insbesondere bei der Lupusnephritis ISN-Klasse IV zu beobachten. Tubulointerstitielle Infiltrationen durch M2-Makrophagen treten bei SLE-Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion vermehrt auf, unabhängig von der pathologischen Klassifikation der Lupusnephritis [168]. Die histologische Aktivität der Lupusnephritis korreliert mit der Anzahl an M2-Makrophagen [161, 168]. Die sCD163-Plasmakonzentrationen der SLE Patienten ohne (2,122 ng/ml) bzw. mit einer Lupusnephritis (2,169 ng/ml) lagen auf einem vergleichbaren Niveau und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe Tabelle 12.24). In beiden Fällen waren diese jedoch gegenüber den gesunden Probanden signifikant erhöht. Ein Zusammenhang der plasmatischen sCD163-Konzentrationen mit den Retentionsparametern (Serumcreatinin und -harnstoff), der eGFR (MDRD) bzw. der endogenen Creatinin-Clearance oder dem Ausmaß der Protein- (Urinteststreifen, 24h-Sammelurin), Leuko- bzw. Erythrozyturie (Teststreifen, Sediment) stellte sich für die Patienten der SLE-Gruppe sowohl im Gesamten als auch nach Differenzierung hinsichtlich dem Vorliegen einer Lupusnephritis nicht dar (siehe Tabellen 12.29 und 12.31). Im Vergleich mit den SLE-Patienten ohne eine renale Manifestation konnte lediglich eine signifikant höhere Proteinurie im Urinteststreifen und 24 h-Sammelurin bei den SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis gemessen werden. Die Retentionsparameter, die eGFR (MDRD) und die endogene Creatinin-Clearance unterschieden sich nicht (siehe Tabelle 12.24). Bei Olmes et al. bestand eine direkte Korrelation zwischen dem Ausmaß der tubulointerstitiellen (nicht aber der glomerulären) Infiltration durch CD163-exprimierende M2c-Makrophagen und den Retentionsparametern (Serumcreatinin und -harnstoff) sowie ein inverser Zusammenhang mit der Creatinin-Clearance. Des Weiteren korrelierte die Anzahl der tubulointerstitiellen M2c-Makrophagen mit der Schwere der interstitiellen Fibrose und tubulären Atrophie [157]. Ein limitierender Faktor der vorliegenden Arbeit ist die geringe Anzahl an Patienten mit einer höhergradigen Einschränkung der Nieren-

funktion. Von zehn SLE-Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz lag bei lediglich zwei Probanden ein Stadium 3 vor, höhere Stadien waren nicht vertreten (siehe Tabelle 12.15). Bei einem von diesen zwei Patienten war nicht eine Lupusnephritis, sondern eine vaskuläre Genese und diabetische Nephropathie Ursache der Nierenschädigung. Zwei Patienten mit einer akuten Lupusnephritis hatten nur marginal ausgelenkte Retentionsparameter.

Ein geeigneterer Parameter zur Einschätzung der renalen Aktivität scheint auch beim SLE die Urinkonzentration des sCD163 zu sein. Deutlich erhöhte Werte treten v.a. im Urin von Patienten mit einer proliferativen Form, insbesondere der diffusen Lupusnephritis ISN-Klasse IV, auf. Die sCD163-Urinkonzentration korreliert mit der glomerulären und - in geringerem Ausmaß - auch tubulointerstitiellen Anzahl an CD163-positiven Zellen [168].

Der SLE ist ein unabhängiger Risikofaktor der Arteriosklerose. Erhöhte sCD163-Serumkonzentrationen von Patienten mit einem SLE sind mit einem vermehrten Auftreten und der Progression von Kalkplaques der Carotiden assoziiert [254]. Patienten mit signifikanten Koronarsklerosen konnten höhere sCD163-Plasmakonzentrationen zugeordnet werden als Patienten ohne eine relevante KHK. Des Weiteren korrelierte der sCD163 mit der Anzahl der betroffenen Gefäße [255]. Höhere sCD163-Plasmakonzentrationen HIV-infizierter Männer sind zudem mit einer höheren Prävalenz an kalzifizierten und gemischten Koronarplaques assoziiert [256]. Sowohl die arterielle Hypertonie als auch der Diabetes mellitus gehören zu den Hauptrisikofaktoren einer vorzeitigen Arteriosklerose [150]. Die Pathologien Adipositas [257], Arteriosklerose [255], arterielle Hypertonie [258] und Diabetes mellitus Typ 2 [259, 260] sind durch chronische inflammatorische Prozesse unter Beteiligung von Monozyten/Makrophagen gekennzeichnet. Die plasmatischen sCD163-Konzentrationen der AH+/-DM-Gruppe waren gegenüber denen der gesunden Probanden signifikant erhöht (siehe Abbildung 4.14). Anamnestisch ist lediglich bei 13,3% der AH+/-DM-Gruppe eine KHK bekannt gewesen, allerdings lag bei 80% der Probanden eine Fettstoffwechselstörung vor. Der AH+/-DM-Gruppe konnte auch der höchste BMI zugeordnet werden, der sich signifikant von denen der gesunden Probanden unterschied. Erhöhte sCD163-Konzentrationen konnten sowohl bei adipösen Erwachsenen [258] als auch adipösen prepubertären Kindern [257] bestimmt werden und waren mit einem ungünstigen metabolischen Profil assoziiert (u.a. Bauchumfang, viszerale Fettmasse, erhöhte Insulinresistenz und Triglyceride sowie vermindertes HDL-Cholesteroll) [257]. Eine positive Korrelation des BMIs und des Körpergewichtes mit dem sCD163 wurde in der AH+/-DM-Gruppe nicht gesehen. Diese stellte sich aber für die Probanden mit einer MPA dar (siehe Tabellen 12.28 und 12.32), denen mit 27,47 kg/m² der zweithöchste BMI zugeordnet werden konnte und in 80% eine Fettstoffwechselstörung sowie 40% eine KHK vorlag.

Für die gesunden Probanden, deren Blutdruckwerte gegenüber der SLE-Gruppe signifikant erhöht waren, bestanden negative Korrelationen der Blutdruckwerte (Systole, Diastole und arterieller Mitteldruck) mit dem sCD163 (siehe Tabelle 12.27). Al-Daghri et al. fanden hingegen eine positive Assoziation des sCD163 mit den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten einer saudischen Population mit Adipositas. Unabhängig vom BMI stellte sich der Zusammenhang zwischen dem sCD163 und dem diastolischen Blutdruck weiterhin als signifikant heraus [258]. Andere fanden eine positive Korrelation zwischen dem sCD163 und erhöhten systolischen Blutdruckwerten [261]. In der vorliegenden Arbeit bestanden in der AH+/-DM-Gruppe keine signifikanten Korrelationen mit den Blutdruckwerten. Allerdings lag in 46,7% der Fälle eine isolierte systolische Hypertonie vor und die diastolischen Blutdruckwerte der AH+/-DM-Gruppe waren signifikant niedriger gegenüber denen der Gesunden.

Betrachtet man nur die sCD163-Plasmakonzentrationen der Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 der AH+/-DM-Gruppe (n = 10 von 15) lagen diese im Median auf dem gleichen Niveau, wie die der Gesamtgruppe (1,643 ng/ml vs. 1,617 ng/ml). Dennoch bestand für die Subpopulation der Patienten mit einem Diabetes mellitus kein signifikanter Unterschied zu den gesunden Probanden. Andere berichteten von erhöhten sCD163-Plasmakonzentrationen bei einem Diabetes mellitus Typ 2 [260, 262]. Darüberhinaus waren in einer dänischen Studie erhöhte sCD163-Plasmakonzentrationen in der Allgemeinbevölkerung mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 vergesellschaftet [261]. Allerdings korrelierten in der vorliegenden Untersuchung die plasmatischen Konzentrationen des sCD163 weder bei der Gesamtheit der AH+/-DM-Gruppe noch bei der Subpopulation der Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 2 mit dem HbA1c, obwohl der mediane HbA1c in beiden Fällen gegenüber dem der Gesunden signifikant erhöht war (siehe Abbildung 4.11 sowie Abschnitt 12.2.2 und Tabelle 12.28 im Anhang). Dies steht aber in Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien [193, 263]. Einerseits wird eine positive Korrelation zwischen dem sCD163 und der Insulinresistenz beschrieben [262] und die sCD163-Plasmakonzentration als ein unabhängiger Prediktor für das Ausmaß der Insulinresistenz proklamiert [264]. Andererseits beschreiben andere Autoren eine stärkere Assoziation des Ausmaßes der membrangebundenen monozytären CD163-Expression mit der Insulinresistenz [265]. Allerdings korreliert ein Anstieg des sCD163 mit einer kompensatorischen Zunahme der Insulinsekretion beim Diabetes mellitus Typ 2 [263].

Chronisch inflammatorische Prozesse spielen auch bei der Entwicklung der diabetischen Nephropathie eine entscheidende Rolle [260, 266]. Histopathologisch konnte eine etwas vermehrte M2-Makrophagenanzahl bei Vorliegen einer Expansion der mesangialen Matrix in der frühen Phase der renalen Schädigung einer diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden [168]. Diabetespatienten, die innerhalb einer Dekade eine diabetische Nephropathie entwickelten, hatten im Vergleich zu Patienten ohne spätere Manifestation einer diabetischen Nephropathie eine tendenziell höhere Plasmakonzentration an sCD163 zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Diabetes mellitus [193]. Auch im Mausmodell sind erhöhte sCD163-Plasmakonzentrationen und ein verminderter Anteil an CD163+ Monozyten mit im Verlauf einsetzenden strukturellen renalen Umbauvorgängen und einem Funktionsverlust assoziiert [260]. Im Gegensatz zu Min et al., die eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten sCD163-Konzentrationen und einer verminderten eGFR bei Patienten mit einer diabetischen Nephropathie beschrieben [260], konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl in der Subpopulation der Patienten mit einer diabetischen Nephropathie als auch in der Gesamtheit der AH+/-DM-Gruppe kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe des sCD163 und der Einschränkung der Nierenfunktion (Creatinin, eGFR (MDRD), HST, Proteinurie im Urinteststreifen bzw. 24 h-Sammelurin) gesehen werden (siehe Tabellen 12.6, 12.13 und 12.28). In einer niederländischen Studie korrelierte nur die Gesamtanzahl der interstitiellen Makrophagen (nicht die Subpopulation der CD163+ Makrophagen) mit der renalen Filtrationsleistung bzw. dem Serumcreatinin und der Albuminurie. Die Intensität des Auftretens glomerulärer CD163+ Makrophagen war aber mit den histopathologischen Veränderungen Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie assoziiert [266]. Histologische Befunde von Patienten der AH+/-DM-Gruppe konnten in der vorliegenden Arbeit nicht ausgewertet werden, da Nierenbiopsien zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses klinisch nicht notwendig waren und somit auch nicht durchgeführt wurden.

Ein Unterschied der plasmatischen sCD163-Konzentrationen zwischen der Diabetes mellitus Typ 2 - Subpopulation (alle Patienten hatten eine diabetische Nephropathie) und den AAV- bzw. SLE-Gruppen bestand nicht. Auch eine japanische Studie kam zu dem Ergebnis, dass sich die sCD163-Konzentrationen von Patienten mit ei-

ner renalen Beteiligung der AAV, SLE-Patienten mit Lupusnephritiden und Patienten mit einer diabetischen Nephropathie nicht signifikant unterscheiden [168]. Ein einschränkender Faktor der Analyse der vorliegenden Arbeit ist, dass bei allen Patienten in der AH+/-DM-Gruppe eine chronische Nierenschädigung aufgrund einer benignen Nephrosklerose und in den meisten Fällen zusätzlich auch eine diabetische Nephropathie vorlag. Die Höhe der sCD163-Konzentrationen von Hypertonikern bzw. Diabetikern ohne renale Komplikationen kann nicht beurteilt werden. Bei den gesunden Probanden war kein Diabetes mellitus bekannt. Bei lediglich fünf gesunden Probanden lag eine Arterielle Hypertonie ohne Hinweis auf eine Nierenschädigung vor. Von diesen fünf Probanden konnten zwei von ihnen die höchsten (1,981 ng/ml und 1,705 ng/ml) und zwei Probanden die niedrigsten (0,830 ng/ml und 0,871 ng/ml) Auslenkungen der GP-Gruppe zugeordnet werden.

Der Einfluss des Grades einer Nierenfunktionseinschränkung auf die Höhe des sCD163 lässt sich abschließend nicht eindeutig klären. Einerseits hatten in der AH+/-DM-Gruppe die Patienten mit einer signifikant besseren Nierenfunktion leicht höhere (1,861 ng/ml vs. 1,617 ng/ml), aber nicht signifikant unterschiedliche sCD163-Konzentrationen. Andererseits waren die sCD163-Konzentrationen der GPA-Patienten mit einer schwergradigen Nierenfunktionsstörung signifikant höher als deren Pendanten mit keiner bzw. leichtgradigen Nierenfunktionseinschränkung (2,426 ng/ml vs. 1,282 ng/ml), ohne dass ein signifikanter Unterschied für die Krankheitsaktivität bestand. Des Weiteren unterschieden sich die sCD163-Konzentrationen der GPA- und AH+/-DM-Patienten mit einer eGFR < 60 ml/min/1,73 m² nicht signifikant voneinander. Betrachtet man die Gesamtpopulation der Studie hatten Probanden mit einer eGFR < 60 ml/min/1,73 m² eine tendenziell ($p = 0,064$) höhere plasmatische sCD163-Konzentration im Vergleich zu den Probanden mit einer eGFR ≥ 60 ml/min/1,73 m² (1,913 ng/ml vs. 1,529 ng/ml, siehe Tabellen 4.7 bis 4.9). Allerdings konnten mit Ausnahme der GPA-Gruppe keine signifikanten Korrelationen zwischen der Höhe des sCD163 und der Einschränkung der Nierenfunktion bzw. einer Proteinurie gesehen werden (siehe Tabellen 4.4, 12.27 bis 12.29 und 12.32).

Prinzipiell waren in den Studiengruppen tendenziell mehr Frauen vertreten. Das Geschlecht hat nach Deichgräber et al. aber keinen Einfluss auf die Höhe des sCD163 [263]. Møller et al. fanden einen geschlechtsunabhängigen Anstieg und eine positive Korrelation der sCD163-Plasmakonzentrationen mit dem Alter [261]. Dieser Zusammenhang stellte sich in der vorliegenden Arbeit nicht dar. In keiner Studiengruppe lag eine signifikante Korrelation zwischen dem Lebensalter und der Höhe des sCD163 vor. Zwar waren sowohl das Alter als auch der sCD163 der gesunden Probanden im Vergleich zur AH+/-DM-Gruppe im Median signifikant niedriger. Demgegenüber konnten den SLE-Patienten die höchsten Werte für den sCD163 zugeordnet werden, deren Alter im Median ebenfalls signifikant niedriger als das der AH+/-DM-Gruppe war. Zudem lag die mediane sCD163-Plasmakonzentration der GPA-Gruppe nahezu auf einem Niveau mit der der SLE-Gruppe, die sich im Alter signifikant unterschieden (siehe Abbildungen 4.1 und 4.14).

5.7 Schlussfolgerungen: cf-DNA/NETs - eine sinnvolle Ergänzung zu den ANCAs

Bei den AAVs handelt es sich um Erkrankungen mit einer vergleichsweise niedrigen Inzidenz und Prävalenz. Studien werden zunehmend im internationalen Verbund (z.B. auf europäischer Ebene) durchgeführt. Nichtsdestotrotz ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen eine maßgebliche Anzahl an Patienten mit einer Erstdiagnose bzw. einem Rezidiv einer AAV lokal zu rekrutieren. Auf internationaler Ebene haben sich bisher nur wenige Arbeitsgruppen mit der Bedeutung der Plasmakonzentrationen an NET-Bestandteilen beschäftigt. Im Falle der cf-DNA/NETs-Bestimmung mittels dem fluoreszierenden Farbstoff Picogreen hat nach meiner Kenntnis lediglich eine chinesische Arbeitsgruppe um Wang et al. [191] Serumkonzentrationen bei MPO-ANCA positiven AAV-Patienten gemessen und mit klinischen Parametern korreliert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte im Gegensatz zu den meisten Studien eine Unterteilung in die Krankheitsentitäten GPA (alle PR3-ANCA positiv) und MPA (alle MPO-ANCA positiv). Der Fokus der Analysen lag gegenüber Wang et al. [191] auf PR3-ANCA positiven Patienten mit einer GPA. Des Weiteren bestand das Studienkollektiv aus Kaukasiern und ist daher vor allem für den europäischen Raum repräsentativ. Der Vergleich bzw. die Übertragung der Ergebnisse auf andere Ethnien, wie dem asiatischen Raum, ist bis zum Vorliegen weiterer Untersuchungen unter Vorbehalt zu betrachten. Insgesamt wurde der Nutzen der NETs als Biomarker bei AAVs mit Blick auf die bisherigen Studien noch als uneindeutig bewertet [267]. Einen Beitrag, um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu gewinnen, liefert diese Dissertation. Nach meinem Wissensstand ist eine Untersuchung in diesem Umfang, d.h. unter Einbeziehung einer Vielzahl klinischer und paraklinischer Parameter sowie medikamentöser bzw. therapeutischer Interventionen, noch nicht durchgeführt worden. Im Falle der cf-DNA/NETs konnte ihre Bedeutung als zusätzlicher paraklinischer Parameter zur Einschätzung der Aktivität der GPA, insbesondere auch einer renalen Vaskulitis, herausgearbeitet werden.

ANCA treten bei bis zu 90% der AAV-Patienten auf und spielen im Rahmen der Diagnostik und Klassifizierung der AAVs eine wichtige Rolle [268]. Die ANCA-Titer korrelieren jedoch nicht immer zuverlässig mit der Krankheitsaktivität der AAVs [166]. Bei leichten Verlaufsformen mit nur lokal begrenzten Veränderungen, wie Granulomen im Bereich des Respirationstraktes, sind ANCA teilweise gar nicht nachweisbar [269]. Mehr als die Hälfte der AAV-Patienten mit schweren Krankheitsepisoden in der Anamnese erleiden ein Rezidiv der Grunderkrankung [270]. Ein klares Konzept der ANCA-Verlaufskontrollen ist in der klinischen Praxis nicht etabliert [270]. In einer Metaanalyse war der Anstieg der ANCA bzw. die Persistenz erhöhter ANCA in der Remission nur ein moderater Prediktor für ein Rezidiv der Vaskulitis. Zum Teil ist das Rezidiv erst mehr als ein Jahr nach der positiven ANCA-Kinetik aufgetreten [271]. Andere fanden keinen prediktiven Wert des ANCA-Titers für ein Rezidiv [204, 272]. In einer retrospektiven Analyse fiel bei einem Viertel der AAV-Patienten der ANCA-Status bzw. die ANCA-Kinetik diskordant zur klinischen Situation (u.a. erneut positive bzw. persistierend erhöhte ANCA ohne Auftreten eines Rezidivs, negative ANCA trotz Rezidiv, ANCA-Fluktuationen im Rezidiv) aus [273]. Die Kombination aus einer positiven Kinetik der Anzahl neutrophiler Granulozyten, CRP und PR-3-Ak war im Gegensatz zu den einzelnen Parametern in 59% der Fälle hinweisend auf ein Rezidiv innerhalb der nächsten sechs Monate. Ein hoher Anteil von 41% der Rezidive wurde durch diese Kombination jedoch nicht vorhergesagt [204]. Eine niederländische Studie fand einen stärkeren Zusammenhang zwischen einer positiven ANCA-Kinetik und dem Auftreten eines Rezidivs bei AAV-Patienten mit einer renalen Beteiligung im Vergleich zu AAV-Patienten ohne renale Manifestationen heraus. Allerdings berichtete auch diese Arbeitsgruppe, dass die Kinetik unter Vorbehalt und nicht als einziges Kriterium zu betrachten sei, da sich bei weniger

als der Hälfte der Patienten das Rezidiv innerhalb eines Jahres ereignete [274]. In einer japanischen Kohorte hauptsächlich MPO-ANCA positiver Patienten mit renaler Vaskulitis war das Auftreten eines Rezidivs mit dem Anstieg der ANCA's sowie einer pulmonalen Beteiligung der Grunderkrankung assoziiert [275]. Neben den vaskulitischen Manifestationen (pulmonale Hämorrhagien, Glomerulonephritis) der GPA ist auch eine erfolgte remissionsinduzierende Therapie mit Rituximab bei GPA-Patienten mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv der Grunderkrankung bei einem Anstieg der PR3-ANCA's assoziiert. Dies galt nicht für eine Remissioninduktion mit Cyclophosphamid und anschließender Erhaltungstherapie mit Azathioprin. Vielmehr ist in diesem Fall eine positive PR3-ANCA-Kinetik allein kein begründetes Kriterium für eine Intensivierung der immunsuppressiven Therapie [270]. Insgesamt ist die Datenlage hinsichtlich des Nutzens von ANCA-Messungen zur Vorhersage eines Rezidivs einer AAV sehr heterogen und zum Teil sind die Studien nur schwer zu vergleichen [43, 269]. Die Entscheidung zur Intensivierung einer immunsuppressiven Therapie sollte nicht allein von den ANCA's abhängig gemacht werden [269]. Es sind weitere Biomarker zur Beurteilung der Krankheitsaktivität der AAVs notwendig. Insbesondere Patienten mit dem Nachweis von PR3-Ak [27, 34, 38, 42] sowie der Krankheitsentität der GPA [34] haben ein erhöhtes Risiko für rezidivierende Verläufe der Grunderkrankung. Die cf-DNA/NETs - Plasmakonzentration hat sich in der vorliegenden Arbeit als ein potentieller Kandidat für PR-3-AK positive Patienten mit einer GPA herauskristallisiert. Zum einen bildet sie die Krankheitsaktivität ab und zum anderen eignet sie sich sowohl zur kurz- als auch langfristigen Verlaufskontrolle der GPA. Im Rezidiv kommt es zum erneuten Anstieg der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentration. Die Eignung der cf-DNA/NETs als Biomarker der GPA ist allerdings unter Berücksichtigung von noch offenen weiteren Fragen zu betrachten.

Erstens sind die cf-DNA/NETs für die GPA nicht spezifisch, da die NETs, wie einleitend beschrieben wurde, auch bei diversen anderen infektiösen sowie nicht-infektiös bedingten Entzündungsprozessen eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu den ANCA's sind die cf-DNA/NETs bei der Diagnosestellung der AAV somit nicht aussagekräftig. Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität können sie in Zusammenschau mit der Klinik (u.a. BVAS-Scoring), paraklinischer Parameter (u.a. CRP, Retentionsparameter, ANCA's usw.) und ggf. weiterer teils noch in Evaluation befindlicher Biomarker (u.a. Anzahl CD20-positiver B-Zellen unter einer Rituximabtherapie, BAFF, Faktoren des alternativen Komplementweges wie C5a [268]) zur Einschätzung der Krankheitsaktivität und Therapieanpassungen beitragen. Dies könnte insbesondere auch bei den selten auftretenden ANCA-negativen Vaskulitiden von Bedeutung sein. Insbesondere GPA Patienten mit einer lokalisierten Verlaufsform sind nicht immer ANCA positiv [43].

Zweitens ist unklar, in welchen zeitlichen Abständen cf-DNA/NETs - Bestimmungen sinnvoll sind und wie sich der Zusammenhang einer positiven Kinetik und einer klinischen Verschlechterung darstellt. Ist diese erst im Schub messbar oder tritt bereits vorher ein signifikanter Anstieg der cf-DNA/NETs auf? Bei den ANCA's manifestierten sich Rezidive nicht selten erst mehr als ein Jahr nach beobachtetem Titer-Anstieg [271, 274]. Möglicherweise besteht bei den cf-DNA/NETs eine engere zeitliche Korrelation. Im vorliegenden Studienkollektiv bestanden hierfür vereinzelte Hinweise, die in größeren Studien weiter zu evaluieren sind. Zumindest bei Polytraumapatienten hatte ein erneuter deutlicher Anstieg der cf-DNA/NETs einen hohen positiven prädiktiven Wert für die Entwicklung einer zeitnahen schweren Sepsis und Multiorganversagen [131, 132]. Des Weiteren bildete in einem kürzlich veröffentlichten Fallbericht die Kinetik von NET-Bestandteilen bei einer Patientin mit einer Medikamenten-induzierten Vaskulitis unter einer B-Zell-reduzierenden Therapie mit Rituximab im Gegensatz zu den anti-PR3-Ak die Krankheitsaktivität im BVAS im Verlauf besser ab [276].

Drittens sind zur Vergleichbarkeit von Studienergebnissen und zum Einsatz in der klinischen Praxis einheitliche Messmethoden zur Bestimmung der cf-DNA/NETs - Plasmakonzentration notwendig. Verlaufsbestimmungen einzelner Probanden dieser Studie wurden zur besseren Vergleichbarkeit in einem Messdurchgang vorgenommen, um eine mögliche Inter-Assay-Variabilität zu reduzieren. Da die Probensammlung über zwei Jahre erfolgte, waren einige Proben länger kryokonserviert als andere. Dies kann eine potentielle Fehlerquelle für Messunterschiede darstellen. In früheren Untersuchungen zeigten sich die cf-DNA/NETs - Konzentrationen allerdings auch nach mehrmaligem Auftauen und erneuter Kryokonservierung über längere Zeit stabil (persönliche Kommunikation Dr. med. J. Altrichter Biomedizinisches Forschungszentrum Rostock). Welcher Standard (humane Plazenta oder boviner Thymus) sich zur Bestimmung der cf-DNA/NETs - Konzentrationen im klinischen Alltag besser eignet, ist mit dieser Arbeit nicht abschließend zu klären. In den Subanalysen der GPA stellten sich keine Unterschiede hinsichtlich der signifikanten Ergebnisse dar. Das galt auch für die Korrelationsanalysen der GPA-, MPA und GP-Gruppen. Vereinzelt traten Unterschiede in den Korrelationsanalysen der AH+/-DM-Gruppe und der Gesamtheit der SLE-Patienten auf (siehe Tabellen 12.28 und 12.29 des Anhangs). Interessant sind einzelne divergierende Ergebnisse hinsichtlich des SLE. Während für die Gesamtheit der SLE-Patienten bei der cf-DNA/NETs_hPI signifikante Unterschiede zu den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) bestanden und bei den Korrelationsanalysen der SLE-Probanden mit einer Lupusnephritis neben der positiven signifikanten Korrelation mit der Krankheitsaktivität im SLEDAI-2K diese auch für den ECLAM auftrat, bestand für die cf-DNA/NETs_bTh der SLE-Gruppe kein Unterschied zu den gesunden Probanden bzw. der AH+/-DM-Gruppe und es lag für die SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis auch keine signifikante Korrelation mit dem ECLAM (nur beim SLEDAI-2K) vor. Zum einen ist möglicherweise der humane Ursprung der Plazenta-DNA vorteilhaft, wenn es um die Bestimmung menschlicher cf-DNA/NETs-Konzentrationen geht. Zum anderen fällt der Anstieg der linearen Funktionen bei der humanen Plazenta-Messreihe steiler aus, so dass sich Unterschiede besser darstellen könnten (insbesondere bei Verlaufsbeurteilungen). Andererseits lag nur ein Teil der Messwerte der cf-DNA/NETs_hPI - Reihe im Gegensatz zu den Messergebnissen der cf-DNA/NETs_bTh - Reihe im Bereich der linearen Sensitivität (190 bis 9000 ng/ml) des cf-DNA-Quant-Assays. Rein technisch spiegelt derjenige DNA-Standard die cf-DNA/NETs am besten wider, dessen DNA-Fragmente eine ähnliche Größe wie die der NETs aufweisen. Für diesen Fall lägen vergleichbare Voraussetzungen zur Interkalierung durch den fluoreszierenden Farbstoff Picogreen vor (persönliche Kommunikation Dr. med. J. Altrichter Biomedizinisches Forschungszentrum Rostock). Zwar war auch die Performance des humanen Plazenta Standards bei der Evaluation des cf-DNA-Quant KITs durch Trillium Diagnostics besser, ein abschließendes Resümee stand zum damaligen Zeitpunkt aber noch aus [175]. Auch in der vorliegenden Arbeit besteht der (subjektive) Eindruck für eine Bevorzugung des humanen Plazenta Standards, allerdings lässt sich ein klarer Vorteil gegenüber dem bovinen Thymus Standard auf Grundlage der hier gewonnenen Daten nicht zuverlässig formulieren. Letztlich hängt die Wahl auch von weiteren Faktoren ab, wie dem Aufwand der Herstellung des DNA-Standards und der Wirtschaftlichkeit.

Im Gegensatz zu den cf-DNA/NETs bestand für die sCD163-Plasmakonzentration der GPA-Patienten kein signifikanter Unterschied zu den gesunden Probanden und in weiteren Analysen spiegelte der sCD163 nur inkonsistent die Aktivität der GPA wider. Insofern ist er als Ergänzung zu den ANCA zur Einschätzung der generellen Aktivität der GPA nicht verwertbar. Im Falle des Vorliegens einer ANCA-assoziierten Glomerulonephritis weisen die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass auch die systemische sCD163-Konzentration zur Einschätzung

der Aktivität der renalen Vaskulitis mit herangezogen werden kann. Die plasmatische sCD163-Konzentration könnte ergänzend zu der sCD163-Urinkonzentration sowie der Urin- und Plasmakonzentration des T-Zellmarkers CD25 eingesetzt werden, drei Parameter die nach aktuellem Wissensstand vielversprechend die Aktivität einer pauciimmunen Glomerulonephritis abbilden [248].

6 Thesen

- Morbidität und Mortalität von Patienten mit ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitiden (AAV) – der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und der mikroskopischen Polyangiitis (MPA) – konnten in den letzten Jahrzehnten durch den Einsatz immunsuppressiver Medikamente deutlich gesenkt werden, sind aber weiterhin gegenüber der Normalbevölkerung signifikant erhöht.
- Neben der Klinik und speziellen Scores (u.a. BVAS) sind zur Einschätzung der Krankheitsaktivität der AAVs insbesondere die anti-neutrophilen cytoplasmatischen Antikörper (ANCA) im klinischen Alltag etabliert. Diese korrelieren jedoch nicht immer zuverlässig mit der Krankheitsaktivität und sind nur teilweise zur Vorhersage eines Rezidivs der Grunderkrankung geeignet.
- Aufgrund der hohen Rezidivgefahr der AAVs ist es notwendig weitere Biomarker zur Aktivitäts- und Verlaufsbeurteilung zu finden, um immunsuppressive Therapien besser steuern zu können. Einerseits soll ein Progress der Grunderkrankung und das Risiko zunehmender Organschäden frühzeitig verhindert werden. Andererseits ist eine unnötige Intensivierung der Immunsuppressiva mit der Folge eines höheren Risikos Therapie-assoziiierter Schäden zu vermeiden.
- Die von neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum freigesetzten Netze, sogenannte „Neutrophil Extrazellulär Traps“ (NETs), bestehen aus einem Chromatingrundgerüst, das u.a. mit den Zielantigenen der ANCA – Proteinase 3 (PR3) und Myeloperoxidase (MPO) – bestückt ist. Die NETs spielen für die Pathogenese der AAVs eine zentrale Rolle.
- Das Transmembranprotein CD163 (Cluster of Differentiation 163) wird auf Makrophagen und Monozyten exprimiert. Im Rahmen inflammatorischer Prozesse kommt es zur Abspaltung der extrazellulären Domäne, dem sCD163 (soluble CD163). Dieser Marker vermehrter Makrophagenaktivität tritt u.a. auch bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, wie der rheumatoiden Arthritis und dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), in erhöhten Plasmakonzentrationen auf.
- Zur Evaluation der NETs bzw. des sCD163 als potentielle Biomarker von AAVs wurden 79 Probanden in die Studie eingeschlossen (GPA 20 Patienten, MPA 5 Patienten; Kontrollgruppen: SLE 22 Patienten, 15 Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Rahmen einer benignen Nephrosklerose und zum überwiegenden Teil in Kombination mit einer diabetischen Nephropathie, 17 gesunde Probanden). Die Plasmakonzentrationen der NETs bzw. der zellfreien DNA (cf-DNA/NETs) wurden durch Interkalierung mit dem fluoreszierenden Farbstoff Picogreen bestimmt. Die Quantifizierung des sCD163 erfolgte durch einen Sandwich - ELISA.
- Die cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen von Patienten mit einer GPA sind gegenüber Gesunden erhöht und bilden die Krankheitsaktivität der Grunderkrankung ab.
- Es besteht eine positive Korrelation zwischen der plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentration und der Krankheitsaktivität im BVAS sowie den Autoantikörpern (c-ANCA und PR3-Ak).

- Mit Hilfe der cf-DNA/NETs besteht die Möglichkeit zur Differenzierung zwischen einer hohen und einer niedrigen Krankheitsaktivität bzw. einem progredienten und stabilen Verlauf der GPA.
- Die cf-DNA/NETs-Plasmakonzentration ist ein geeigneter Verlaufspareter sowohl zum kurzfristigen (stationäre Behandlung) als auch zum langfristigen Therapiemonitoring (u.a. Remissions-induzierende Therapie) von Patienten mit einer GPA.
- Eine Cyclophosphamid-Pulstherapie senkt die plasmatische cf-DNA/NETs-Konzentration von Patienten mit einer GPA.
- Bei einer schweren Verlaufsform der GPA mit einer aktiven ANCA-assoziierten Glomerulonephritis kommt es durch eine Plasmaaustauschtherapie zu einer signifikanten Senkung der cf-DNA/NETs, so dass sie einen Beitrag zur frühzeitigen Durchbrechung des Circulus vitiosus aus ANCAs und NETs leisten könnte.
- Bei Vorliegen einer ANCA-assoziierten Glomerulonephritis bestehen signifikante Zusammenhänge zwischen der plasmatischen cf-DNA/NETs-Konzentration und dem Ausmaß der Nierenschädigung (positive Korrelationen mit dem Serumcreatinin und dem Serumharnstoff, negative Korrelation mit der eGFR) sowie der Protein- bzw. Hämaturie.
- Patienten mit einem SLE haben ebenfalls erhöhte cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen. Ein Zusammenhang zwischen den cf-DNA/NETs und der Krankheitsaktivität (SLEDAI-2K, ECLAM), den Autoantikörpern (ANA, ds-DNA-Ak) oder den Komplementfaktoren (C3, C4) stellt sich generell nicht dar.
- Die cf-DNA/NETs-Plasmakonzentrationen von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Rahmen einer arteriellen Hypertonie bzw. einem Diabetes mellitus unterscheiden sich nicht von denen Gesunder. Ein Einfluss der diabetischen Stoffwechsellage (HbA1c) oder der Höhe der Blutdruckwerte auf die plasmatische cf-DNA/NETs-Konzentration zeichnet sich nicht ab.
- Die plasmatischen sCD163-Konzentrationen von Patienten mit einer AAV unterscheiden sich im Allgemeinen nicht signifikant von denen Gesunder und können zur Differenzierung der Krankheitsaktivität der GPA nicht zuverlässig herangezogen werden.
- Im Rahmen einer Remissions-induzierenden Therapie der GPA mit Cyclophosphamid bzw. unter einer Plasmaaustauschtherapie bei einer schweren Verlaufsform der GPA mit einer aktiven ANCA-assoziierten Glomerulonephritis tritt kein signifikanter Abfall der sCD163-Plasmakonzentration auf.
- GPA-Patienten mit einer vermehrten renalen Aktivität der Grunderkrankung haben höhere plasmatische sCD163-Konzentrationen als GPA-Patienten mit einer kompensierten ANCA-assoziierten Glomerulonephritis bzw. ohne eine renale Manifestation der GPA. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe des sCD163 und der renalen Aktivität der GPA ist anzunehmen. Für die sCD163-Plasmakonzentration bestehen signifikante Korrelationen mit der Schwere der Nierenfunktionseinschränkung (positive Korrelation mit dem Serumcreatinin, negative Korrelationen mit der eGFR und der endogenen Creatinin-Clearance) und mit dem Ausmaß der Protein- und Hämaturie.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, et al. 2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Arthritis Rheum* 2013;65(1):1–11.
- 2 Nakazawa D, Masuda S, Tomaru U, et al. Pathogenesis and therapeutic interventions for ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Rheumatol* 2019;15(2):91–101.
- 3 Longo DL, Dietel M, Harrison TR. *Harrisons Innere Medizin*, 18th edn. Berlin, London, Berlin: Lehmanns Media; McGraw-Hill; ABW Wissenschaftsverl. 2013.
- 4 Geetha D, Jefferson JA. ANCA-Associated Vasculitis: Core Curriculum 2020. *Am J Kidney Dis* 2019.
- 5 Pagnoux C. Updates in ANCA-associated vasculitis. *Eur J Rheumatol* 2016;3(3):122–33.
- 6 Schirmer JH, Aries PM, Groot K de, et al. S1-Leitlinie Diagnostik und Therapie der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. *Z Rheumatol* 2017;76(Suppl 3):77–104.
- 7 Kuhlmann U, Böhrer J, Luft FC, et al., eds. *Nephrologie: Pathophysiologie - Klinik - Nierenersatzverfahren*, 6th edn. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag 2015.
- 8 Hagen EC, Daha MR, Hermans J, et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int* 1998;53(3):743–53.
- 9 Shi L. Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: prevalence, treatment, and outcomes. *Rheumatol Int* 2017;37(11):1779–88.
- 10 Pearce FA, Craven A, Merkel PA, et al. Global ethnic and geographic differences in the clinical presentations of anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56(11):1962–69.
- 11 Watts RA, Mahr A, Mohammad AJ, et al. Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30 Suppl 1:i14-22.
- 12 Terrier B, Dechartres A, Deligny C, et al. Granulomatosis with polyangiitis according to geographic origin and ethnicity: clinical-biological presentation and outcome in a French population. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56(3):445–50.
- 13 Herlyn K, Buckert F, Gross WL, et al. Doubled prevalence rates of ANCA-associated vasculitides and giant cell arteritis between 1994 and 2006 in northern Germany. *Rheumatology (Oxford)* 2014;53(5):882–89.
- 14 Lyons PA, Rayner TF, Trivedi S, et al. Genetically distinct subsets within ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2012;367(3):214–23.
- 15 Jones BE, Yang J, Muthigi A, et al. Gene-Specific DNA Methylation Changes Predict Remission in Patients with ANCA-Associated Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2017;28(4):1175–87.
- 16 Yamaguchi M, Ando M, Katsuno T, et al. Smoking Is a Risk Factor for Relapse of Antimyeloperoxidase Antibodies-Associated Vasculitis. *J Clin Rheumatol* 2018;24(7):361–67.
- 17 Salmela A, Rasmussen N, Tervaert JWC, et al. Chronic nasal *Staphylococcus aureus* carriage identifies a subset of newly diagnosed granulomatosis with polyangiitis patients with high relapse rate. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56(6):965–72.

- 18 Fijolek J, Wiatr E, Petroniec V, et al. The presence of staphylococcal superantigens in nasal swabs and correlation with activity of granulomatosis with polyangiitis in own material. *Clin Exp Rheumatol* 2018;36 Suppl 111(2):40–45.
- 19 Besada E, Koldingsnes W, Nossent JC. Staphylococcus Aureus carriage and long-term Rituximab treatment for Granulomatosis with polyangiitis. *PeerJ* 2015;3:e1051.
- 20 Heijl C, Mohammad AJ, Westman K, et al. Long-term patient survival in a Swedish population-based cohort of patients with ANCA-associated vasculitis. *RMD Open* 2017;3(1):e000435.
- 21 Flossmann O, Berden A, Groot K de, et al. Long-term patient survival in ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2011;70(3):488–94.
- 22 Westman K, Flossmann O, Gregorini G. The long-term outcomes of systemic vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2015;30 Suppl 1:i60-6.
- 23 Hellmich B, Flossmann O, Gross WL, et al. EULAR recommendations for conducting clinical studies and/or clinical trials in systemic vasculitis: focus on anti-neutrophil cytoplasm antibody-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(5):605–17.
- 24 Yates M, Watts RA, Bajema IM, et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2016;75(9):1583–94.
- 25 Luqmani RA. State of the art in the treatment of systemic vasculitides. *Front Immunol* 2014;5:471. doi: 10.3389/fimmu.2014.00471.
- 26 Groot K de, Harper L, Jayne DRW, et al. Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;150(10):670–80.
- 27 Harper L, Morgan MD, Walsh M, et al. Pulse versus daily oral cyclophosphamide for induction of remission in ANCA-associated vasculitis: long-term follow-up. *Ann Rheum Dis* 2012;71(6):955–60.
- 28 La-Crette J, Royle J, Lanyon PC, et al. Long-term outcomes of daily oral vs. pulsed intravenous cyclophosphamide in a non-trial setting in ANCA-associated vasculitis. *Clin Rheumatol* 2018;37(4):1085–90.
- 29 Groot K de, Adu D, Savage CO. The value of pulse cyclophosphamide in ANCA-associated vasculitis: meta-analysis and critical review. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(10):2018–27.
- 30 Langford CA. Cyclophosphamide as induction therapy for Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Clin Exp Immunol* 2011;164 Suppl 1:31–34.
- 31 Taha R, El-Haddad H, Almuallim A, et al. Systematic review of the role of rituximab in treatment of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis, hepatitis C virus-related cryoglobulinemic vasculitis, Henoch-Schönlein purpura, ankylosing spondylitis, and Raynaud's phenomenon. *Open Access Rheumatol* 2017;9:201–14.
- 32 Stone JH, Merkel PA, Spiera R, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2010;363(3):221–32.
- 33 Jones RB, Tervaert JWC, Hauser T, et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 2010;363(3):211–20.
- 34 Specks U, Merkel PA, Seo P, et al. Efficacy of remission-induction regimens for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2013;369(5):417–27.

- 35 Jones RB, Furuta S, Tervaert JWC, et al. Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis: 2-year results of a randomised trial. *Ann Rheum Dis* 2015;74(6):1178–82.
- 36 Geetha D, Specks U, Stone JH, et al. Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis with renal involvement. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(4):976–85.
- 37 Pagnoux C, Mahr A, Hamidou MA, et al. Azathioprine or methotrexate maintenance for ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2008;359(26):2790–803.
- 38 Puéchal X, Pagnoux C, Perrodeau É, et al. Long-Term Outcomes Among Participants in the WEGENT Trial of Remission-Maintenance Therapy for Granulomatosis With Polyangiitis (Wegener's) or Microscopic Polyangiitis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2016;68(3):690–701.
- 39 Lemmer B, Brune K. Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie, 14th edn. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.
- 40 Guillevin L, Pagnoux C, Karras A, et al. Rituximab versus azathioprine for maintenance in ANCA-associated vasculitis. *N Engl J Med* 2014;371(19):1771–80.
- 41 Cohen Tervaert JW. Trimethoprim-sulfamethoxazole and antineutrophil cytoplasmic antibodies-associated vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2018;30(4):388–94.
- 42 Unizony S, Villarreal M, Miloslavsky EM, et al. Clinical outcomes of treatment of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis based on ANCA type. *Ann Rheum Dis* 2016;75(6):1166–69.
- 43 Kemna MJ, van Paassen P, Damoiseaux JG, et al. Maintaining remission in patients with granulomatosis with polyangiitis or microscopic polyangiitis: The role of ANCA. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 2017;79(1):1–12.
- 44 Walsh M, Casian A, Flossmann O, et al. Long-term follow-up of patients with severe ANCA-associated vasculitis comparing plasma exchange to intravenous methylprednisolone treatment is unclear. *Kidney Int* 2013;84(2):397–402.
- 45 Frausová D, Hrušková Z, Lánská V, et al. Long-term outcome of patients with ANCA-associated vasculitis treated with plasma exchange: a retrospective, single-centre study. *Arthritis Res Ther* 2016;18:168. doi: 10.1186/s13075-016-1055-5.
- 46 Solar-Cafaggi D, Atisha-Fregoso Y, Hinojosa-Azaola A. Plasmapheresis therapy in ANCA-associated vasculitides: A single-center retrospective analysis of renal outcome and mortality. *J Clin Apher* 2016;31(5):411–18.
- 47 Hurtado PR, Jeffs L, Nitschke J, et al. CpG oligodeoxynucleotide stimulates production of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ANCA associated vasculitis. *BMC Immunol* 2008;9:34. doi: 10.1186/1471-2172-9-34.
- 48 Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 2009;15(6):623–25.
- 49 Yoshida M, Sasaki M, Sugisaki K, et al. Neutrophil extracellular trap components in fibrinoid necrosis of the kidney with myeloperoxidase-ANCA-associated vasculitis. *Clin Kidney J* 2013;6(3):308–12.
- 50 Nakazawa D, Tomaru U, Yamamoto C, et al. Abundant neutrophil extracellular traps in thrombus of patient with microscopic polyangiitis. *Front Immunol* 2012;3(Article 333):1–3.

- 51 Kambas K, Chrysanthopoulou A, Vassilopoulos D, et al. Tissue factor expression in neutrophil extracellular traps and neutrophil derived microparticles in antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis may promote thromboinflammation and the thrombophilic state associated with the disease. *Ann Rheum Dis* 2014;73(10):1854–63.
- 52 Boer OJ de, Li X, Goebel H, et al. Nuclear smears observed in H&E-stained thrombus sections are neutrophil extracellular traps. *J Clin Pathol* 2016;69(2):181–82.
- 53 Merkel PA, Lo GH, Holbrook JT, et al. Brief Communication: High Incidence of Venous Thrombotic Events among Patients with Wegener Granulomatosis: The Wegener's Clinical Occurrence of Thrombosis (WeCLOT) Study. *Ann Intern Med* 2005;142(8):620. doi: 10.7326/0003-4819-142-8-200505030-00011.
- 54 Stassen PM, Derks RPH, Kallenberg CGM, et al. Venous thromboembolism in ANCA-associated vasculitis--incidence and risk factors. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(4):530–34.
- 55 Hansson P-O. Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism in the General Population. *Arch Intern Med* 1997;157(15):1665–70.
- 56 Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(36):15880–85.
- 57 Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost* 2012;10(1):136–44.
- 58 Leliefeld PHC, Wessels CM, Leenen LPH, et al. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 2016;20:73. doi: 10.1186/s13054-016-1250-4.
- 59 Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie, 6th edn. Stuttgart: Thieme 2019.
- 60 Cooper PR, Palmer LJ, Chapple ILC. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol 2000* 2013;63(1):165–97.
- 61 Metchnikoff É. L'immunité dans les maladies infectieuses. Paris: Masson & Cie, Éditeurs Libraires de l'académie de médecine 1901.
- 62 Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol* 2009;30(11):513–21.
- 63 Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(8):577–82.
- 64 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532–35.
- 65 Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007;176(2):231–41.
- 66 Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 2012;198(5):773–83.
- 67 Healy LD, Puy C, Itakura A, et al. Colocalization of neutrophils, extracellular DNA and coagulation factors during NETosis: Development and utility of an immunofluorescence-based microscopy platform. *J Immunol Methods* 2016;435:77–84.
- 68 Urban C, Zychlinsky A. Netting bacteria in sepsis. *Nat Med* 2007;13(4):403–04.
- 69 Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* 2006;8(4):668–76.

- 70 Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood* 2009;114(13):2619–22.
- 71 O'Neil LJ, Kaplan MJ, Carmona-Rivera C. The Role of Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in Vascular Damage in Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med* 2019;8(9). doi: 10.3390/jcm8091325.
- 72 Pruchniak MP, Demkow U. Potent NETosis inducers do not show synergistic effects in vitro. *Cent Eur J Immunol* 2019;44(1):51–58.
- 73 Urban CF, Ermert D, Schmid M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009;5(10):e1000639.
- 74 Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, et al. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 2005;66(11):1146–54.
- 75 Yazdani HO, Chen H-W, Tohme S, et al. IL-33 exacerbates liver sterile inflammation by amplifying neutrophil extracellular trap formation. *J Hepatol* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.010>.
- 76 Pilszczyk FH, Salina D, Poon KKH, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 2010;185(12):7413–25.
- 77 Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* 2007;2007(379):pe11. doi: 10.1126/stke.3792007pe11.
- 78 Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N. Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Biomolecules* 2019;9(8). doi: 10.3390/biom9080365.
- 79 Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nat Chem Biol* 2011;7(2):75–77.
- 80 Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* 2018;18(2):134–47.
- 81 Joshi MB, Baipadithaya G, Balakrishnan A, et al. Elevated homocysteine levels in type 2 diabetes induce constitutive neutrophil extracellular traps. *Sci Rep* 2016;6:36362. doi: 10.1038/srep36362.
- 82 Yousefi S, Mihalache C, Kozłowski E, et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* 2009;16(11):1438–44.
- 83 Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, et al. Neutrophils Discriminate between Lipopolysaccharides of Different Bacterial Sources and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* 2016;7:484. doi: 10.3389/fimmu.2016.00484.
- 84 Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(21):9813–18.
- 85 Farrera C, Fadeel B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. *J Immunol* 2013;191(5):2647–56.
- 86 Gupta A, Hasler P, Gebhardt S, et al. Occurrence of neutrophil extracellular DNA traps (NETs) in pre-eclampsia: a link with elevated levels of cell-free DNA? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1075:118–22.
- 87 Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, et al. Neutrophil NETs: a novel contributor to preeclampsia-associated placental hypoxia? *Semin Immunopathol* 2007;29(2):163–67.
- 88 Zhong XY, Laivuori H, Livingston JC, et al. Elevation of both maternal and fetal extracellular circulating deoxyribonucleic acid concentrations in the plasma of pregnant women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184(3):414–19.

- 89 Hahn S, Holzgreve W. Fetal cells and cell-free fetal DNA in maternal blood: new insights into pre-eclampsia. *Hum Reprod Update* 2002;8(6):501–08.
- 90 Gupta AK, Gebhardt S, Hillermann R, et al. Analysis of plasma elastase levels in early and late onset preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2006;273(4):239–42.
- 91 Marder W, Knight JS, Kaplan MJ, et al. Placental histology and neutrophil extracellular traps in lupus and pre-eclampsia pregnancies. *Lupus Sci Med* 2016;3(1):e000134. doi: 10.1136/lupus-2015-000134.
- 92 Demers M, Krause DS, Schatzberg D, et al. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(32):13076–81.
- 93 Brühl M-L von, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012;209(4):819–35.
- 94 Gould TJ, Vu TT, Swystun LL, et al. Neutrophil extracellular traps promote thrombin generation through platelet-dependent and platelet-independent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34(9):1977–84.
- 95 Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007;13(4):463–69.
- 96 Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2012;122(7):2661–71.
- 97 Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010;584(14):3193–97.
- 98 Liu S, Su X, Pan P, et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Sci Rep* 2016;6:37252. doi: 10.1038/srep37252.
- 99 Narasaraaju T, Yang E, Samy RP, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. *Am J Pathol* 2011;179(1):199–210.
- 100 Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS ONE* 2012;7(2):e32366.
- 101 Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 2009;15(11):1318–21.
- 102 Xu J, Zhang X, Monestier M, et al. Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *J Immunol* 2011;187(5):2626–31.
- 103 Yang R, Zou X, Tenhunen J, et al. HMGB1 and Extracellular Histones Significantly Contribute to Systemic Inflammation and Multiple Organ Failure in Acute Liver Failure. *Mediators Inflamm* 2017;2017:5928078. <https://doi.org/10.1155/2017/5928078>.
- 104 Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, et al. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology* 2015;62(2):600–14.
- 105 Merza M, Hartman H, Rahman M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice With Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2015;149(7):1920-1931.e8.
- 106 Leffler J, Martin M, Gullstrand B, et al. Neutrophil extracellular traps that are not degraded in systemic lupus erythematosus activate complement exacerbating the disease. *J Immunol* 2012;188(7):3522–31.

- 107 Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011;3(73):73ra20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001201.
- 108 Tillack K, Breiden P, Martin R, et al. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol* 2012;188(7):3150–59.
- 109 Ganguly D, Chamilos G, Lande R, et al. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009;206(9):1983–94.
- 110 Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007;449(7162):564–69.
- 111 Blanco P, Palucka AK, Gill M, et al. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 2001;294(5546):1540–43.
- 112 Pinegin B, Vorobjeva N, Pinegin V. Neutrophil extracellular traps and their role in the development of chronic inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2015;14(7):633–40.
- 113 Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *The Journal of Immunology* 2008;180(3):1895–902.
- 114 Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, et al. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis* 2014;73(7):1414–22.
- 115 Dwivedi N, Upadhyay J, Neeli I, et al. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps. *Arthritis Rheum* 2012;64(4):982–92.
- 116 Wang Y, Xiao Y, Zhong L, et al. Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with β -cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2014;63(12):4239–48.
- 117 Lood C, Hughes GC. Neutrophil extracellular traps as a potential source of autoantigen in cocaine-associated autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 2017;56(4):638–43.
- 118 Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, et al. Abnormal conformation and impaired degradation of propylthiouracil-induced neutrophil extracellular traps: implications of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2012;64(11):3779–87.
- 119 Gestermann N, Di Domizio J, Lande R, et al. Netting Neutrophils Activate Autoreactive B Cells in Lupus. *J Immunol* 2018;200(10):3364–71.
- 120 Gergianaki I, Bertias G. Systemic Lupus Erythematosus in Primary Care: An Update and Practical Messages for the General Practitioner. *Front Med (Lausanne)* 2018;5:161. doi: 10.3389/fmed.2018.00161.
- 121 Yaniv G, Twig G, Shor DB-A, et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun Rev* 2015;14(1):75–79.
- 122 Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
- 123 Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25(11):1271–77.
- 124 Lorenz G, Desai J, Anders H-J. Lupus nephritis: update on mechanisms of systemic autoimmunity and kidney immunopathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2014;23(3):211–17.

- 125 Fanouriakis A, Kostopoulou M, Alunno A, et al. 2019 update of the EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2019;78(6):736–45.
- 126 Jeremic I, Djuric O, Nikolic M, et al. Neutrophil extracellular traps-associated markers are elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2019;39(11):1849–57.
- 127 Zhang S, Lu X, Shu X, et al. Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Intern Med* 2014;53(24):2763–71.
- 128 Leffler J, Gullstrand B, Jönsen A, et al. Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2013;15(4):R84. doi: 10.1186/ar4264.
- 129 MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948;142(3-4):241–43.
- 130 Logters T, Paunel-Gorgulu A, Zilkens C, et al. Diagnostic accuracy of neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs) for septic arthritis. *J Orthop Res* 2009;27(11):1401–07.
- 131 Margraf S, Logters T, Reipen J, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs): a potential prognostic marker for posttraumatic development of inflammatory second hit and sepsis. *Shock* 2008;30(4):352–58.
- 132 Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, et al. Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma. *Mediators Inflamm* 2012;2012:149560. doi: 10.1155/2012/149560.
- 133 Altrichter J, Zedler S, Kraft R, et al. Neutrophil-derived circulating free DNA (cf-DNA/NETs), a potential prognostic marker for mortality in patients with severe burn injury. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2010;36(6):551–57.
- 134 Wang W, Peng W, Ning X. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis* 2018;21(2):415–21.
- 135 Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(17):2352–63.
- 136 van Gorp H, Delpitte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 2010;47(7-8):1650–60.
- 137 Zhi Y, Gao P, Xin X, et al. Clinical significance of sCD163 and its possible role in asthma (Review). *Mol Med Rep* 2017;15(5):2931–39.
- 138 Matsushita T, Takehara K. Soluble CD163 is a potential biomarker in systemic sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2019;19(3):197–99.
- 139 Souza AWS de, van Timmeren M, Sanders J-S, et al. M2 macrophage is the predominant phenotype in airways inflammatory lesions in patients with granulomatosis with polyangiitis. *Arthritis Res Ther* 2017;19(1):100. doi: 10.1186/s13075-017-1310-4.
- 140 Hassan WASE, Baraka EAE, Elnady BM, et al. Serum Soluble CD163 and its association with various disease parameters in patients with systemic sclerosis. *Eur J Rheumatol* 2016;3(3):95–100.
- 141 Ohlsson SM, Linge CP, Gullstrand B, et al. Serum from patients with systemic vasculitis induces alternatively activated macrophage M2c polarization. *Clin Immunol* 2014;152(1-2):10–19.

- 142 Subramanian K, Du R, Tan NS, et al. CD163 and IgG codefend against cytotoxic hemoglobin via autocrine and paracrine mechanisms. *J Immunol* 2013;190(10):5267–78.
- 143 Kirkegaard-Klitbo DM, Mejer N, Knudsen TB, et al. Soluble CD163 predicts incident chronic lung, kidney and liver disease in HIV infection. *AIDS* 2017;31(7):981–88.
- 144 Hiraoka A, Horiike N, Akbar SMF, et al. Soluble CD163 in patients with liver diseases: very high levels of soluble CD163 in patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol* 2005;40(1):52–56.
- 145 Laursen TL, Wong GL-H, Kazankov K, et al. Soluble CD163 and mannose receptor associate with chronic hepatitis B activity and fibrosis and decline with treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2018;33(2):484–91.
- 146 Grønbaek H, Sandahl TD, Mortensen C, et al. Soluble CD163, a marker of Kupffer cell activation, is related to portal hypertension in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;36(2):173–80.
- 147 Kazankov K, Rode A, Simonsen K, et al. Macrophage activation marker soluble CD163 may predict disease progression in hepatocellular carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 2016;76(1):64–73.
- 148 Fouad R, Hamza I, Khairy M, et al. Role of Serum Soluble CD163 in the Diagnosis, Risk of Bleeding, and Prognosis of Gastro-Esophageal Varices in Cirrhotic Patients. *J Interferon Cytokine Res* 2017;37(3):112–18.
- 149 Greisen SR, Møller HJ, Stengaard-Pedersen K, et al. Macrophage activity assessed by soluble CD163 in early rheumatoid arthritis: association with disease activity but different response patterns to synthetic and biologic DMARDs. *Clin Exp Rheumatol* 2015;33(4):498–502.
- 150 Herold G. Innere Medizin 2019: Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold Gerd 2018.
- 151 Colafrancesco S, Priori R, Alessandri C, et al. sCD163 in AOSD: a biomarker for macrophage activation related to hyperferritinemia. *Immunol Res* 2014;60(2-3):177–83.
- 152 Sakumura N, Shimizu M, Mizuta M, et al. Soluble CD163, a unique biomarker to evaluate the disease activity, exhibits macrophage activation in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Cytokine* 2018;110:459–65.
- 153 Frantz C, Pezet S, Avouac J, et al. Soluble CD163 as a Potential Biomarker in Systemic Sclerosis. *Dis Markers* 2018;2018:8509583. doi: 10.1155/2018/8509583.
- 154 Shimizu K, Ogawa F, Yoshizaki A, et al. Increased serum levels of soluble CD163 in patients with scleroderma. *Clin Rheumatol* 2012;31(7):1059–64.
- 155 Nakayama W, Jinnin M, Makino K, et al. CD163 expression is increased in the involved skin and sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Eur J Dermatol* 2012;22(4):512–17.
- 156 Terai S, Ueda-Hayakawa I, Nguyen CTH, et al. Palisaded neutrophilic and granulomatous dermatitis associated with systemic lupus erythematosus: possible involvement of CD163+ M2 macrophages in two cases, and a review of published works. *Lupus* 2018;27(14):2220–27.
- 157 Olmes G, Büttner-Herold M, Ferrazzi F, et al. CD163+ M2c-like macrophages predominate in renal biopsies from patients with lupus nephritis. *Arthritis Res Ther* 2016;18:90. doi: 10.1186/s13075-016-0989-y.
- 158 Nishino A, Katsumata Y, Kawasumi H, et al. Usefulness of soluble CD163 as a biomarker for macrophage activation syndrome associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2019;28(8):986–94.

- 159 Xiao H, Heeringa P, Liu Z, et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am J Pathol* 2005;167(1):39–45.
- 160 Rousselle A, Ketritz R, Schreiber A. Monocytes Promote Crescent Formation in Anti-Myeloperoxidase Antibody-Induced Glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2017;187(9):1908–15.
- 161 Li J, Yu Y-F, Liu C-H, et al. Significance of M2 macrophages in glomerulonephritis with crescents. *Pathol Res Pract* 2017;213(9):1215–20.
- 162 Brunini F, Page TH, Gallieni M, et al. The role of monocytes in ANCA-associated vasculitides. *Autoimmun Rev* 2016;15(11):1046–53.
- 163 Park J, Lee EB, Song YW. Decreased tumour necrosis factor- α production by monocytes of granulomatosis with polyangiitis. *Scand J Rheumatol* 2014;43(5):403–08.
- 164 Mukhtyar C. VALIDATION OF THE BIRMINGHAM VASCULITIS ACTIVITY SCORE (VERSION 3). MASTER OF SCIENCE 2009.
- 165 Mukhtyar C, Lee R, Brown D, et al. Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3). *Ann Rheum Dis* 2009;68(12):1827–32.
- 166 Szpirt WM, Heaf JG, Petersen J. Plasma exchange for induction and cyclosporine A for maintenance of remission in Wegener's granulomatosis--a clinical randomized controlled trial. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26(1):206–13.
- 167 Mukhtyar C, Flossmann O, Hellmich B, et al. Outcomes from studies of antineutrophil cytoplasm antibody associated vasculitis: a systematic review by the European League Against Rheumatism systemic vasculitis task force. *Ann Rheum Dis* 2008;67(7):1004–10.
- 168 Endo N, Tsuboi N, Furuhashi K, et al. Urinary soluble CD163 level reflects glomerular inflammation in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2016;31(12):2023–33.
- 169 Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis & Rheumatism* 1990;33(8):1101–07.
- 170 MACANOVIC M, LACHMANN PJ. Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay. *Clin Exp Immunol* 1997;108(2):220–26.
- 171 Barra GB, Santa Rita TH, Almeida Vasques J de, et al. EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem* 2015;48(15):976–81.
- 172 TRILLIUM DIAGNOSTICS LL., Curtis A, cfDNA-Quant - Assay for quantification of cell free DNA in human plasma (Prototype Assay, instruction manual).
- 173 Chen JA, Meister S, Urbonaviciute V, et al. Sensitive detection of plasma/serum DNA in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2007;40(4):307–10.
- 174 O'Reilly VP, Wong L, Kennedy C, et al. Urinary Soluble CD163 in Active Renal Vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(9):2906–16.
- 175 TRILLIUM DIAGNOSTICS LL., Trillium Diagnostics - cfDNA-Quant Validation Studies (Note to Investigators and suggested Plate Layout).
- 176 TRILLIUM DIAGNOSTICS LL., Kebeddes C, Macro163™ ELISA (IQP-383), soluble CD163 ELISA assay for the measurement of macrophage and monocyte activation (instruction manual).
- 177 Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 2002;2002 Feb;29:288–91.

- 178 Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis & Rheumatism* 1992;35(6):630–40.
- 179 Gladman DD, Urowitz MB, Kagal A, et al. Accurately describing changes in disease activity in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 2000;27(2):377–79.
- 180 Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, et al. Sensitivity to change of 3 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Indices: international validation. *The Journal of Rheumatology* 1994;21(8):1468–71.
- 181 Hawker G, Gabriel S, Bombardier C, et al. A reliability study of SLEDAI: a disease activity index for systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 1993;20(4):657–60.
- 182 Gladman DD, Goldsmith CH, Urowitz MB, et al. Crosscultural validation and reliability of 3 disease activity indices in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 1992;19(4):608–11.
- 183 Yee C-S, Farewell VT, Isenberg DA, et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 2011;50(5):982–88.
- 184 Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, et al. Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10(5):541–47.
- 185 Castrejon I, Tani C, Jolly M, et al. Indices to assess patients with systemic lupus erythematosus in clinical trials, long-term observational studies, and clinical care. *Clin Exp Rheumatol* 2014;32(5 Suppl 85):S-85-95.
- 186 Sato JO, Corrente JE, Saad-Magalhaes C. Correlation between the Modified Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 and the European Consensus Lupus Activity Measurement in juvenile systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2016:1479–84.
- 187 Mosca M, Bencivelli W, Vitali C, et al. The validity of the ECLAM index for the retrospective evaluation of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2000;9(6):445–50.
- 188 Krentz H. Schließende statistische Analysen, 2nd edn. Aachen: Shaker 2008.
- 189 Hattanda F, Nakazawa D, Watanabe-Kusunoki K, et al. The presence of anti-neutrophil extracellular trap antibody in patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology (Oxford)* 2019;58(7):1293–98.
- 190 Nakazawa D, Shida H, Tomaru U, et al. Enhanced formation and disordered regulation of NETs in myeloperoxidase-ANCA-associated microscopic polyangiitis. *J Am Soc Nephrol* 2014;25(5):990–97.
- 191 Wang H, Sha L-L, Ma T-T, et al. Circulating Level of Neutrophil Extracellular Traps Is Not a Useful Biomarker for Assessing Disease Activity in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *PLoS ONE* 2016;11(2):e0148197. doi: 10.1371/journal.pone.0148197.
- 192 Söderberg D, Kurz T, Motamedi A, et al. Increased levels of neutrophil extracellular trap remnants in the circulation of patients with small vessel vasculitis, but an inverse correlation to anti-neutrophil cytoplasmic antibodies during remission. *Rheumatology (Oxford)* 2015;54(11):2085–94.
- 193 Samuelsson M, Dereke J, Svensson MK, et al. Soluble plasma proteins ST2 and CD163 as early biomarkers of nephropathy in Swedish patients with diabetes, 15–34 years of age: A prospective cohort study. *Diabetol Metab Syndr* 2017;9(1):793. doi: 10.1186/s13098-017-0240-2.

- 194 van Dam LS, Kraaij T, Kamerling SWA, et al. Intrinsically Distinct Role of Neutrophil Extracellular Trap Formation in Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis Compared to Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2019;71(12):2047–58.
- 195 Pruchniak MP, Ostafin M, Wachowska M, et al. Neutrophil extracellular traps generation and degradation in patients with granulomatosis with polyangiitis and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2019;52(3):126–35.
- 196 El-Ghoneimy DH, Hesham M, Hasan R, et al. The behavior of neutrophil extracellular traps and NADPH oxidative activity in pediatric systemic lupus erythematosus: relation to disease activity and lupus nephritis. *Clin Rheumatol* 2019;38(9):2585–93.
- 197 Bruschi M, Bonanni A, Petretto A, et al. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) profiles in patients with incident SLE and lupus nephritis. *The Journal of Rheumatology* 2019. doi: 10.3899/jrheum.181232.
- 198 Pieterse E, Rother N, Garsen M, et al. Neutrophil Extracellular Traps Drive Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37(7):1371–79.
- 199 Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice. *Ann Rheum Dis* 2015;74(12):2199–206.
- 200 Menegazzo L, Ciciliot S, Poncina N, et al. NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 2015;52(3):497–503.
- 201 Wong SL, Demers M, Martinod K, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med* 2015;21(7):815–19.
- 202 Park J-H, Kim J-E, Gu J-Y, et al. Evaluation of Circulating Markers of Neutrophil Extracellular Trap (NET) Formation as Risk Factors for Diabetic Retinopathy in a Case-Control Association Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2016;124(9):557–61.
- 203 Joshi MB, Lad A, Bharath Prasad AS, et al. High glucose modulates IL-6 mediated immune homeostasis through impeding neutrophil extracellular trap formation. *FEBS Lett* 2013;587(14):2241–46.
- 204 Hogan PCP, O'Connell RM, Scollard S, et al. Biomarkers Predict Relapse in Granulomatosis with Polyangiitis. *J Biomark* 2014;2014:596503. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/596503>.
- 205 Oomatia A, Moran SM, Kennedy C, et al. Prolonged Duration of Renal Recovery Following ANCA-Associated Glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 2016;43(2):112–19.
- 206 Jayne DRW, Gaskin G, Rasmussen N, et al. Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(7):2180–88.
- 207 Ma Y, Han F, Chen L, et al. The impact of intravenous methylprednisolone pulses on renal survival in anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis with severe renal injury patients: a retrospective study. *BMC Nephrol* 2017;18(1):381. doi: 10.1186/s12882-017-0782-4.
- 208 Chanouzas D, McGregor JAG, Nightingale P, et al. Intravenous pulse methylprednisolone for induction of remission in severe ANCA associated Vasculitis: a multi-center retrospective cohort study. *BMC Nephrol* 2019;20(1):58. <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1226-0>.
- 209 van der Linden M, van den Hoogen LL, Westerkamp GH, et al. Neutrophil extracellular trap release is associated with antinuclear antibodies in systemic lupus erythematosus and anti-phospholipid syndrome. *Rheumatology (Oxford)* 2018;57:1228–1234. doi: 10.1093/rheumatology/key067.

- 210 Kraaij T, Kamerling SWA, van Dam LS, et al. Excessive neutrophil extracellular trap formation in ANCA-associated vasculitis is independent of ANCA. *Kidney Int* 2018;94(1):139–49.
- 211 Watanabe-Kusunoki K, Abe N, Nakazawa D, et al. A case report dysregulated neutrophil extracellular traps in a patient with propylthiouracil-induced anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(17):e15328.
- 212 Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity. *Blood* 2012;120(15):3007–18.
- 213 Patry YC, Trewick DC, Gregoire M, et al. Rats injected with syngenic rat apoptotic neutrophils develop antineutrophil cytoplasmic antibodies. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(8):1764–68.
- 214 Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *J Biol Chem* 2004;279(42):44123–32.
- 215 Michels MAHM, Volokhina EB, van de Kar NCAJ, et al. The role of properdin in complement-mediated renal diseases: a new player in complement-inhibiting therapy? *Pediatr Nephrol* 2019;34(8):1349–67.
- 216 Heinrich PC, Müller M, Graeve L, et al., eds. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9th edn. Berlin: Springer 2014.
- 217 Masuda S, Nonokawa M, Futamata E, et al. Formation and Disordered Degradation of Neutrophil Extracellular Traps in Necrotizing Lesions of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Am J Pathol* 2019;189(4):839–46.
- 218 Wang H, Wang C, Zhao M-H, et al. Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. *Clin Exp Immunol* 2015;181(3):518–27.
- 219 Casian A, Jayne D. Plasma exchange in the treatment of Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, Churg-Strauss syndrome and renal limited vasculitis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23(1):12–17.
- 220 Luna G de, Chauveau D, Aniort J, et al. Plasma exchanges for the treatment of severe systemic necrotizing vasculitides in clinical daily practice: Data from the French Vasculitis Study Group. *J Autoimmun* 2015;65:49–55.
- 221 Haupt ME, Pires-Ervoes J, Brannen ML, et al. Successful use of plasmapheresis for granulomatosis with polyangiitis presenting as diffuse alveolar hemorrhage. *Pediatr Pulmonol* 2013;48(6):614–16.
- 222 Goto K, Nakai K, Fujii H, et al. The Effects of Plasma Exchange on Severe Vasculitis with Diffuse Alveolar Hemorrhage. *Intern Med* 2017;56(1):55–59.
- 223 Uechi E, Okada M, Fushimi K. Effect of plasma exchange on in-hospital mortality in patients with pulmonary hemorrhage secondary to antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: A propensity-matched analysis using a nationwide administrative database. *PLoS ONE* 2018;13(4):e0196009.
- 224 Klemmer PJ, Chalermkulrat W, Reif MS, et al. Plasmapheresis therapy for diffuse alveolar hemorrhage in patients with small-vessel vasculitis. *Am J Kidney Dis* 2003;42(6):1149–53.
- 225 Sattar Y, Susheela AT, Ullah W, et al. Use of Plasmapheresis and Immunosuppressants to Treat Diffuse Alveolar Hemorrhage in a Patient with Granulomatosis with Polyangiitis. *Medicina (Kaunas)* 2019;55(7). doi: 10.3390/medicina55070378.

- 226 Geri G, Terrier B, Heshmati F, et al. Effect of plasma exchange in acute respiratory failure due to Anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Crit Care* 2018;22(1):328. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2264-x>.
- 227 Walsh M, Merkel PA, Peh C-A, et al. Plasma Exchange and Glucocorticoids in Severe ANCA-Associated Vasculitis. *N Engl J Med* 2020;382(7):622–31.
- 228 Derebail VK, Falk RJ. ANCA-Associated Vasculitis - Refining Therapy with Plasma Exchange and Glucocorticoids. *N Engl J Med* 2020;382(7):671–73.
- 229 Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, et al. Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(10):1628–36.
- 230 Houben E, Groenland SL, van der Heijden JW, et al. Relation between duration of the prodromal phase and renal damage in ANCA-associated vasculitis. *BMC Nephrol* 2017;18(1):378. doi: 10.1186/s12882-017-0797-x.
- 231 Joode AAE de, Sanders JSF, Smid WM, et al. Plasmapheresis rescue therapy in progressive systemic ANCA-associated vasculitis: single-center results of stepwise escalation of immunosuppression. *J Clin Apher* 2014;29(5):266–72.
- 232 Wood L, Jacobs P. The effect of serial therapeutic plasmapheresis on platelet count, coagulation factors, plasma immunoglobulin, and complement levels. *J Clin Apher* 1986;3(2):124–28.
- 233 Gregersen JW, Kristensen T, Krag SRP, et al. Early plasma exchange improves outcome in PR3-ANCA-positive renal vasculitis. *Clin Exp Rheumatol* 2012;30(1 Suppl 70):S39-47.
- 234 Walters G. Role of therapeutic plasmapheresis in ANCA-associated vasculitis. *Pediatr Nephrol* 2016;31(2):217–25.
- 235 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, et al., eds. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 9th edn. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft 2008.
- 236 Baxter Oncology GmbH. Fachinformation Endoxan 2015.
- 237 O'Sullivan KM, Lo CY, Summers SA, et al. Renal participation of myeloperoxidase in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated glomerulonephritis. *Kidney Int* 2015;88(5):1030–46.
- 238 Zhao L, David MZ, Hyjek E, et al. M2 macrophage infiltrates in the early stages of ANCA-associated pauci-immune necrotizing GN. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10(1):54–62.
- 239 Yoshida M, Yamada M, Sudo Y, et al. Myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody affinity is associated with the formation of neutrophil extracellular traps in the kidney and vasculitis activity in myeloperoxidase anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated microscopic polyangiitis. *Nephrology (Carlton)* 2016;21(7):624–29.
- 240 Kumar SVR, Kulkarni OP, Mulay SR, et al. Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(10):2399–413.
- 241 Xu P-C, Chen T, Wu S-J, et al. Pathological severity determines the renal recovery for anti-myeloperoxidase antibody-associated vasculitis requiring dialysis at disease onset: a retrospective study. *BMC Nephrol* 2019;20(1):287. <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1487-7>.
- 242 Rhee RL, Davis JC, Ding L, et al. The Utility of Urinalysis in Determining the Risk of Renal Relapse in ANCA-Associated Vasculitis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2018;13(2):251–57.

- 243 Lv L, Chang D-Y, Li Z-Y, et al. Persistent hematuria in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis during clinical remission: chronic glomerular lesion or low-grade active renal vasculitis? *BMC Nephrol* 2017;18(1):354. doi: 10.1186/s12882-017-0763-7.
- 244 Qin J, Fu S, Speake C, et al. NETosis-associated serum biomarkers are reduced in type 1 diabetes in association with neutrophil count. *Clin Exp Immunol* 2016;184(3):318–22.
- 245 Hashiba M, Huq A, Tomino A, et al. Neutrophil extracellular traps in patients with sepsis. *J Surg Res* 2015;194(1):248–54.
- 246 Gomez-Lopez N, Romero R, Xu Y, et al. Neutrophil Extracellular Traps in the Amniotic Cavity of Women with Intra-Amniotic Infection: A New Mechanism of Host Defense. *Reprod Sci* 2017;24(8):1139–53.
- 247 Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, et al. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med Exp* 2019;7(1):29. <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0251-4>.
- 248 Dekkema GJ, Abdulahad WH, Bijma T, et al. Urinary and serum soluble CD25 complements urinary soluble CD163 to detect active renal anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: a cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 2019;34(2):234–42.
- 249 Cui Y, Zhang Y-c, Rong Q-f, et al. Changes and significance of soluble CD 163 in sepsis and severe sepsis in children. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2012;50(9):653–56.
- 250 Knudsen TB, Larsen K, Kristiansen TB, et al. Diagnostic value of soluble CD163 serum levels in patients suspected of meningitis: comparison with CRP and procalcitonin. *Scand J Infect Dis* 2007;39(6-7):542–53.
- 251 Nagai M, Hirayama K, Ebihara I, et al. Serum levels of the soluble haemoglobin scavenger receptor CD163 in MPO-ANCA-associated renal vasculitis. *Scand J Rheumatol* 2016;45(5):397–403.
- 252 Weidner S, Carl M, Riess R, et al. Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage. *Arthritis Rheum* 2004;50(11):3651–57.
- 253 Villacorta J, Lucientes L, Goicoechea E, et al. Urinary soluble CD163 as a biomarker of disease activity and relapse in antineutrophil cytoplasm antibody-associated glomerulonephritis. *Clin Kidney J* 2021;14(1):212–19. doi:10.1093/ckj/sfaa043.
- 254 David C, Divard G, Abbas R, et al. Soluble CD163 is a biomarker for accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus patients at apparent low risk for cardiovascular disease. *Scand J Rheumatol* 2019:1–5.
- 255 Aristoteli LP, Møller HJ, Bailey B, et al. The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;184(2):342–47.
- 256 McKibben RA, Margolick JB, Grinspoon S, et al. Elevated levels of monocyte activation markers are associated with subclinical atherosclerosis in men with and those without HIV infection. *J Infect Dis* 2015;211(8):1219–28.
- 257 Carreras-Badosa G, Prats-Puig A, Diaz-Roldan F, et al. The macrophage activation product sCD163 is associated with a less favourable metabolic profile in prepubertal children. *Pediatr Obes* 2016;11(6):543–50.

- 258 Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Bindahman LS, et al. Soluble CD163 is associated with body mass index and blood pressure in hypertensive obese Saudi patients. *Eur J Clin Invest* 2012;42(11):1221–26.
- 259 Alvarado-Vázquez PA, Grosick RL, Moracho-Vilrriales C, et al. Cytokine production capabilities of human primary monocyte-derived macrophages from patients with diabetes mellitus type 2 with and without diabetic peripheral neuropathy. *J Pain Res* 2019;12:69–81.
- 260 Min D, Brooks B, Wong J, et al. Monocyte CD163 is altered in association with diabetic complications: possible protective role. *J Leukoc Biol* 2016;100(6):1375–83.
- 261 Møller HJ, Frikke-Schmidt R, Moestrup SK, et al. Serum soluble CD163 predicts risk of type 2 diabetes in the general population. *Clin Chem* 2011;57(2):291–97.
- 262 Rojo-Martínez G, Maymó-Masip E, Rodríguez MM, et al. Serum sCD163 levels are associated with type 2 diabetes mellitus and are influenced by coffee and wine consumption: results of the Di@bet.es study. *PLoS ONE* 2014;9(6):e101250.
- 263 Deichgræber P, Witte DR, Møller HJ, et al. Correction to: Soluble CD163, adiponectin, C-reactive protein and progression of dysglycaemia in individuals at high risk of type 2 diabetes mellitus: the ADDITION-PRO cohort. *Diabetologia* 2018;61(2):498–503.
- 264 Parkner T, Sørensen LP, Nielsen AR, et al. Soluble CD163: a biomarker linking macrophages and insulin resistance. *Diabetologia* 2012;55(6):1856–62.
- 265 Kawarabayashi R, Motoyama K, Nakamura M, et al. The Association between Monocyte Surface CD163 and Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res* 2017;2017:6549242. <https://doi.org/10.1155/2017/6549242>.
- 266 Klessens CQF, Zandbergen M, Wolterbeek R, et al. Macrophages in diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2017;32(8):1322–29.
- 267 Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells* 2020;9(4):915. doi: 10.3390/cells9040915.
- 268 Tedesco M, Gallieni M, Pellegata F, et al. Update on ANCA-associated vasculitis: from biomarkers to therapy. *J Nephrol* 2019;32(6):871–82.
- 269 Fijolek J, Wiatr E. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) - their role in pathogenesis, diagnosis, and treatment monitoring of ANCA-associated vasculitis. *Cent Eur J Immunol* 2020;45(2):218–27. doi:10.5114/ceji.2019.92494.
- 270 Fussner LA, Hummel AM, Schroeder DR, et al. Factors Determining the Clinical Utility of Serial Measurements of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies Targeting Proteinase 3. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 2016;68(7):1700–10.
- 271 Tomasson G, Grayson PC, Mahr AD, et al. Value of ANCA measurements during remission to predict a relapse of ANCA-associated vasculitis--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(1):100–09.
- 272 Finkelstein JD, Merkel PA, Schroeder D, et al. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Ann Intern Med* 2007;147(9):611–19.
- 273 Thai L-H, Charles P, Resche-Rigon M, et al. Are anti-proteinase-3 ANCA a useful marker of granulomatosis with polyangiitis (Wegener's) relapses? Results of a retrospective study on 126 patients. *Autoimmun Rev* 2014;13(3):313–18.
- 274 Kemna MJ, Damoiseaux J, Austen J, et al. ANCA as a predictor of relapse: useful in patients with renal involvement but not in patients with nonrenal disease. *J Am Soc Nephrol* 2015;26(3):537–42.

- 275 Yamaguchi M, Ando M, Kato S, et al. Increase of Antimyeloperoxidase Antineutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA) in Patients with Renal ANCA-associated Vasculitis: Association with Risk to Relapse. *The Journal of Rheumatology* 2015;42(10):1853–60.
- 276 Chang C-H, Jung C-J, Huang Y-M, et al. The first reported case of trastuzumab induced interstitial lung disease associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibody vasculitis - A case report and a prospective cohort study on the usefulness of neutrophil derived biomarkers in monitoring vasculitis disease activity during follow-up. *Breast* 2021;61:35–42. doi:10.1016/j.breast.2021.11.016.

8 Lebenslauf

Zur Person

Name: Daniel Mocosch

9 Konferenzbeiträge

Fischland – Symposium, 22. - 23.04.2016 (Strandhotel Fischland, Dierhagen)

Teilnahme am Wettbewerb Science Slam (2. Platz): „NETs und Autoimmunkrankheiten“

13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 23. - 26. September 2021 (Rostock)

referierter Konferenzbeitrag – Abstract und Postervorstellung :

„Zellfreie DNA im Plasma als Biomarker bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden“

(**D. Mokosch**, S. Mitzner, J. Altrichter)

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Daniel Mocosch, eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation („Bedeutung der cf-DNA/NETs und des sCD163 als diagnostische Parameter ANCA-assoziiertes Kleingefäßvaskulitiden“) selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, den 29.03.2022

Daniel Mocosch

11 Danksagung

Für die Vergabe und Betreuung dieses interessanten und vielschichtigen Themas gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. S. Mitzner, dem Leiter der Sektion Nephrologie an der Universitätsmedizin Rostock, und Herrn Dr. med. J. Altrichter, aus dem Biomedizinischen Forschungsinstitut Rostock. Vielen Dank für das Vertrauen, das Sie in mich gesetzt haben, die Geduld, die Sie aufgebracht haben und Ihre Anregungen bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Für die Rekrutierung der Studienteilnehmer möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. med. A. Mitzner (zum damaligen Zeitpunkt Leiterin der nephrologischen Ambulanz der Universitätsmedizin) und Schwester Eva bedanken. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Ch. Kneitz, dem damaligen Chefarzt der Rheumatologie des Klinikum Südstadt Rostock, und den Mitarbeitern der rheumatologischen Tagesklinik im Klinikum Südstadt Rostock. Hier möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Schwester Ines bedanken, die die Studien der Rheumatologie begleitete. Ohne diese Unterstützung wäre die Rekrutierung einer ausreichenden Anzahl von Patienten mit diesen zum Teil eher selten vorkommenden Erkrankungen nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Helga Weiss-Reining aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum Rostock für ihren Einsatz bei der Probenlogistik und der Rekrutierung der gesunden Probanden aus dem Institut sowie der Verwaltung der Universitätsmedizin Rostock. Ohne ihren Rat, ihre Anregungen, Motivation und Unterstützung wäre die Sammlung und Messung der Proben nicht so reibungslos möglich gewesen.

Mein großer und liebevoller Dank gilt meiner Familie. Ohne meine Eltern und Großeltern wäre der von mir eingeschlagene Lebens- und Bildungsweg nicht möglich gewesen. Sie haben mich sowohl in der Schulzeit aber auch im Studium immer motiviert und bedingungslos unterstützt. Ich hoffe, mein Opa ist zufrieden mit diesem Ergebnis auf das er so lange warten musste. Ganz besonders hervorheben möchte ich meine liebe Frau Sophie. Danke, dass du mich in den letzten Jahren immer wieder angespornt und mir den Rücken freigehalten hast, damit ich diese Dissertation, neben all den anderen Verpflichtungen, fertigstellen konnte. Ohne dich wäre dies nicht möglich gewesen. Ganz lieben Dank für dein Verständnis und deine Geduld, die aufzubringen sicher nicht immer einfach waren. Meine Dissertation möchte ich auch unseren Kindern widmen, die das größte Geschenk für uns sind.

12 Anhang

Abbildungsverzeichnis des Anhangs

Abbildung 12.1 – Häufigkeitsverteilung der Stadien der arteriellen Hypertonie nach der WHO-Klassifikation	161
Abbildung 12.2 – ROC-Analyse pathologische Proteinurie in Bezug auf die cf-DNA/NETs	171
Abbildung 12.3 – ROC-Analyse pathologische Proteinurie in Bezug auf den sCD163	171
Abbildung 12.4 – ROC-Analyse pathologische Hämaturie in Bezug auf die cf-DNA/NETs	172
Abbildung 12.5 – ROC-Analyse pathologische Hämaturie in Bezug auf den sCD163	173
Abbildung 12.6 – ROC-Analyse pathologische Protein- und Hämaturie in Bezug auf die cf-DNA/NETs	174
Abbildung 12.7 – ROC-Analyse pathologische Protein- und Hämaturie in Bezug auf den sCD163.....	174
Abbildung 12.8 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Proteinase 3 - Antikörper.....	185
Abbildung 12.9 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: BVAS - Scoring.....	185
Abbildung 12.10 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung einer hohen (BVAS \geq 6) von einer niedrigen (BVAS \leq 5) Krankheitsaktivität der GPA in Bezug auf die cf-DNA/NETs	188
Abbildung 12.11 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung einer hohen (BVAS \geq 6) von einer niedrigen (BVAS \leq 5) Krankheitsaktivität der GPA in Bezug auf den sCD163.....	188
Abbildung 12.12 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Proteinase 3 - Antikörper.....	190
Abbildung 12.13 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: BVAS - Scoring.....	190
Abbildung 12.14 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung des Krankheitsverlaufes (progreredient vs. stabil) der Patienten mit einer GPA in Bezug auf die cf-DNA/NETs	192
Abbildung 12.15 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung des Krankheitsverlaufes (progreredient vs. stabil) der Patienten mit einer GPA in Bezug auf den sCD163.....	193
Abbildung 12.16 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Proteinase 3 - Ak.....	195
Abbildung 12.17 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Krankheitsaktivität im BVAS	195

Tabellenverzeichnis des Anhangs

Tabelle 12.1 – Zusammenfassung des prozentualen Auftretens der ACR-Kriterien der GPA-Patienten	147
Tabelle 12.2 – Zusammenfassung des prozentualen Auftretens der ACR-Kriterien der Patienten mit einem SLE.....	147
Tabelle 12.3 – Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter	149
Tabelle 12.4 – Darstellung des Blutdruckniveaus entsprechend der WHO-Klassifikation der arteriellen Hypertonie.	161
Tabelle 12.5 – ausgewählte statistische Kennwerte der Subpopulation Diabetes mellitus Typ 2	162
Tabelle 12.6 – ausgewählte Korrelationsanalysen der Subpopulation Diabetes mellitus Typ 2	162
Tabelle 12.7 – Häufigkeitsverteilung der Symptommanifestation ausgewählter Organsysteme	163
Tabelle 12.8 – statistische Kennwerte der Studienparameter cf-DNA/NETs_hPI, cf-DNA/NETs_bTh und sCD163 .	164
Tabelle 12.9 – statistische Kennwerte der Retentionsparameter, der eGFR (MDRD), des Proteins im Urineststreifen sowie von HbA1c, 25-OH-Vitamin D und Parathormon	165
Tabelle 12.10 – statistische Kennwerte des Differentialblutbildes und des CRPs	166
Tabelle 12.11 – statistische Kennwerte der endogenen Creatinin-Clearance und des Ausmaßes der Proteinurie im 24 Stunden-Sammelurin	167
Tabelle 12.12 – Gruppenvergleiche der endogenen Creatinin-Clearance	167
Tabelle 12.13 – Berechnungen der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für die endogene Creatinin-Clearance und dem Protein im 24 Stunden-Sammelurin.....	167
Tabelle 12.14 – Zusammenfassung der Genese der Nierenerkrankungen	168
Tabelle 12.15 – Überblick über die Art der Nierenfunktionseinschränkung.....	168
Tabelle 12.16 – Häufigkeitsverteilung des Auftretens unterschiedlicher Schweregrade einer Leukozyturie bzw. Erythrozyturie im Urineststreifen	169
Tabelle 12.17 – Häufigkeitsverteilung des Auftretens unterschiedlicher Schweregrade einer Leukozyturie bzw. Erythrozyturie im Urinsediment.....	170
Tabelle 12.18 – Schwellenwerte (cut off) der Studienparameter im Hinblick auf das Auftreten einer pathologischen Proteinurie	172
Tabelle 12.19 – AUC - Berechnungen der Studienparameter für das Auftreten einer pathologischen Proteinurie	172
Tabelle 12.20 – Schwellenwerte (cut off) der Studienparameter im Hinblick auf das Auftreten einer pathologischen Hämaturie	173
Tabelle 12.21 – AUC - Berechnungen der Studienparameter für das Auftreten einer pathologischen Hämaturie	173
Tabelle 12.22 – Schwellenwerte (cut off) der Studienparameter im Hinblick auf das kombinierte Auftreten einer pathologischen Protein- und Hämaturie.....	175
Tabelle 12.23 – AUC - Berechnungen der Studienparameter für das kombinierte Auftreten einer pathologischen Protein- und Hämaturie.....	175
Tabelle 12.24 – Vergleich SLE Patienten ohne bzw. mit einer Lupusnephritis.....	176
Tabelle 12.25 – Leuko- und Erythrozyturie im Urineststreifen in Abhängigkeit des Vorliegens einer Lupusnephritis.....	176
Tabelle 12.26 – Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment in Abhängigkeit des Vorliegens einer Lupusnephritis .	176
Tabelle 12.27 – Korrelationsanalysen der gesunden Probanden (GP)	177
Tabelle 12.28 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz durch eine Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus Typ 2 (AH+/-DM)	178
Tabelle 12.29 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes (SLE)	179
Tabelle 12.30 – Korrelationen zwischen den Autoantikörpern und der Krankheitsaktivität der SLE-Patienten	180
Tabelle 12.31 – ausgewählte Korrelationsanalysen nach Differenzierung der SLE - Patienten ohne bzw. mit Manifestation einer Lupusnephritis.....	180

Tabelle 12.32 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einer mikroskopischen Polyangiitis (MPA).....	181
Tabelle 12.33 – Korrelationen der Autoantikörper der MPA-Patienten mit der Krankheitsaktivität im BVAS	181
Tabelle 12.34 – Vergleich des Auftretens BVAS-relevanter Manifestationen bei den Patienten mit einer Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) bzw. mikroskopischen Polyangiitis (MPA)	182
Tabelle 12.35 – Überblick über die immunmodulierende Medikation zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses	183
Tabelle 12.36 – Komorbiditäten in den Gruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität der GPA	184
Tabelle 12.37 – Symptommanifestationen in den Gruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität der GPA	184
Tabelle 12.38 – Verteilung der für den BVAS relevanten Krankheitsmanifestationen (BVAS \leq 5 vs. BVAS \geq 6).....	186
Tabelle 12.39 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA für den Studienparameter cf-DNA_hPI unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen	187
Tabelle 12.40 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA für den Studienparameter cf-DNA_bTh unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen.....	187
Tabelle 12.41 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA für den Studienparameter sCD163 unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen	187
Tabelle 12.42 – Schwellenwerte (cut off) hinsichtlich der Differenzierung einer hohen (BVAS \geq 6) von einer niedrigen (BVAS \leq 5) Krankheitsaktivität der GPA	187
Tabelle 12.43 – AUC - Berechnungen im Hinblick auf die Differenzierung der Krankheitsaktivität der Granulomatose mit Polyangiitis (BVAS \leq 5 / BVAS \geq 6).....	188
Tabelle 12.44 – Komorbiditäten in den Gruppen mit progredientem bzw. stabilem Verlauf der GPA	189
Tabelle 12.45 – Symptommanifestationen in den Gruppen mit progredientem bzw. stabilem Verlauf der GPA.....	189
Tabelle 12.46 – Verteilung der für den BVAS relevanten Krankheitsmanifestationen (progredient vs. stabil)	191
Tabelle 12.47 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA für den Studienparameter cf-DNA_hPI unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen.....	192
Tabelle 12.48 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA für den Studienparameter cf-DNA_bTh unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen.....	192
Tabelle 12.49 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA für den Studienparameter sCD163 unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen	192
Tabelle 12.50 – Schwellenwerte (cut off) hinsichtlich der Differenzierung eines progredienten von einem stabilen Krankheitsverlauf der Granulomatose mit Polyangiitis	193
Tabelle 12.51 – AUC - Berechnungen im Hinblick auf die Differenzierung des Krankheitsverlaufes (progredient vs. stabil) der Granulomatose mit Polyangiitis.....	193
Tabelle 12.52 – Symptome zum Zeitpunkt der Aufnahme und der Entlassung.....	194
Tabelle 12.53 – Verteilung der für den BVAS relevanten Krankheitsmanifestationen (Aufnahme vs. Entlassung)	196
Tabelle 12.54 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_hPI bei Aufnahme.....	197
Tabelle 12.55 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_hPI bei Entlassung	197
Tabelle 12.56 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_bTh bei Aufnahme.....	197
Tabelle 12.57 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_bTh bei Entlassung.....	197
Tabelle 12.58 – Gruppenvergleiche für den sCD163 bei Aufnahme	198
Tabelle 12.59 – Gruppenvergleiche für den sCD163 bei Entlassung.....	198
Tabelle 12.60 – Überblick über ausgewählte Symptome vor und nach der Therapie mit Cyclophosphamid der Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten.....	199
Tabelle 12.61 – Vergleich der Mittelwerte der Plasmakonzentrationen der Studienparameter vor und nach Cyclophosphamid-Pulstherapie der Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten	199

Tabelle 12.62 – Gruppenvergleiche cf-DNA_hPI vor Cyclophosphamidtherapie	200
Tabelle 12.63 – Gruppenvergleiche cf-DNA_bTh vor Cyclophosphamidtherapie	200
Tabelle 12.64 – Gruppenvergleiche sCD163 vor Cyclophosphamidtherapie	200
Tabelle 12.65 – Gruppenvergleiche sCD163 nach Cyclophosphamidtherapie	200
Tabelle 12.66 – Gruppenvergleiche cf-DNA_hPI vor Plasmaaustausch.....	201
Tabelle 12.67 – Gruppenvergleiche cf-DNA_bTh vor Plasmaaustausch.....	201
Tabelle 12.68 – Gruppenvergleiche sCD163 vor Plasmaaustausch	201
Tabelle 12.69 – Gruppenvergleiche sCD163 nach Plasmaaustausch.....	201

12.1 Allgemeiner Teil

12.1.1 Ethikvotum



UNIVERSITÄT ROSTOCK
MEDIZINISCHE FAKULTÄT



Universität Rostock, Medizinische Fakultät, PF 10 08 88, D-18055 Rostock

Daniel Mokosch
Thomas-Müntzer Platz 30
18057 Rostock

Ethikkommission

Vorsitz: Prof. Dr. R. Wegener
Sitz: St. Georg Straße 108
18055 Rostock
Tel.: (0381) 494 - 9939
Fax: (0381) 494 - 9902
e-mail: ethik@med.uni-rostock.de

13.10.2009

Stellungnahme der Ethikkommission

Titel der Studie: Erforschung des Einflusses von Autoimmunkrankheiten auf die Entstehung entzündlicher Erkrankungen der Niere

Antragsteller: Daniel Mokosch
Universitätsklinikum Rostock, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II,
Sektion Nephrologie

Registriernummer: A 2009 51 (Bei Schriftwechsel bitte stets angeben)

Eingang Ethikkommission: 09.09.2009

Nachgereichte Unterlagen: 18.09.2009

Sehr geehrter Herr Mokosch,

der Vorsitzende der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock hat die von Ihnen eingereichten Unterlagen im Auftrag der Kommission geprüft. Die Unterlagen liegen der Kommission vollständig vor.

Es bestehen aus berufsrechtlicher und ethischer Sicht keine Bedenken gegen die Durchführung des o.g. Forschungsprojektes.

Wir weisen Sie darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters des Projektes und der teilnehmenden Ärzte entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission von dieser Stellungnahme unberührt bleibt.

Die Kommission wünscht Ihnen bei der Durchführung Ihres Forschungsvorhabens viel Erfolg. Für die Übermittlung eines Abschlussberichts wäre Ihnen die Ethikkommission sehr verbunden.

Allgemeine Hinweise:

- Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser klinischen Prüfung verbleibt beim Sponsor, bei der Leiterin/dem Leiter der klinischen Prüfung und bei den Prüferinnen/Prüfern.
- Zusammensetzung und Arbeitsweise der Ethik-Kommission entsprechen nationalen Gesetzen, Vorschriften und der ICH-GCP-Leitlinie in der jeweils gültigen Fassung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. R. Wegener
Vorsitzender der Ethikkommission

Swaantje Kautz-Kohlschein
Geschäftsstellenleiterin

12.1.2 American College of Rheumatology (ACR) – Kriterien

Es wurden die zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses (11/2009 bis 11/2011) gültigen Kriterien des American College of Rheumatologie (ACR) für die Granulomatose mit Polyangiitis (von 1990 [169]) und dem systemischen Lupus erythematoses (Einführung 1982 [123], Aktualisierung 1997 [122]) berücksichtigt.

Tabelle 12.1 – Zusammenfassung des prozentualen Auftretens der ACR-Kriterien der Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten

ACR – Kriterien der Granulomatose mit Polyangiitis	
Nasale oder orale Entzündung	16 (80%)
Pathologisches Rö-Thorax	12 (60%)
Pathologisches Urinsediment	18 (90%)
Granulomatöse Entzündung	7 (35%)

Tabelle 12.2 – Zusammenfassung des prozentualen Auftretens der ACR-Kriterien der Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses

ACR – Kriterien des systemischen Lupus erythematoses	
Schmetterlingserythem	15 (68,18%)
Diskoide Hautveränderungen	4 (18,18%)
Photosensibilität	15 (68,18%)
Oronasale Ulzerationen	1 (4,55%)
Arthritis (nicht-erosiv)	16 (72,73%)
Pleuritis	7 (31,82%)
Perikarditis	5 (22,73%)
Persistierende Proteinurie	11 (50,0%)
Zelluläre Zylinder	6 (27,27%)
Krampfanfälle	1 (4,55%)
Psychose	1 (4,55%)
Hämolytische Anämie	1 (4,55%)
Leukozytopenie (< 4000/mm ³)	4 (18,18%)
Lymphozytopenie (< 1500/mm ³)	6 (27,27%)
Thrombozytopenie (< 100000/mm ³)	5 (22,73%)
Anti-dsDNA-Ak	18 (81,82%)
Anti-Sm-Ak	5 (22,73%)
Antiphospholipid-Ak	10 (45,45%)
Antinukleäre Antikörper	22 (100%)

12.1.3 Aufstellung der Reagenzien, Materialien und Geräte

12.1.3.1 Bestimmung der cf-DNA/NETs

Reagenzien

- humane Plazenta-DNA (50 µg/ml = 50000 ng/ml, lyophilisiert mit EDTA & Tris buffer, pH 8,0)
- bovine Thymus-DNA (50 µg/ml = 50000 ng/ml, lyophilisiert mit EDTA & Tris buffer, pH 8,0)
- Picogreen™ (200x) [lizensiert von Life Technologies, Eugene, Oregon, USA]
- Standardverdünnungspuffer (10x; 5% BSA (bovine serum albumin) in 10x PBS, pH 7,4)
- Probenverdünnungspuffer (1x, PBS (phosphate-buffered saline))
- Aqua bidest

Verbrauchsmaterialien

- 96 well Platte (unbeschichtet, Polystyrene) aus dem cf-DNA-Quant-KIT von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC
- 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Pipettenspitzen (Eppendorf Biopur® 20 µl, 200 µl und 1000 µl)
- Messpipette CELLSTAR® von Greiner Bio-One (10 ml in 1/10 ml, serological pipette, sterile)
- S-Monovetten® EDTA-K, 2,6 ml
- Sarstedt Blutentnahmekanüle Multifly® mit 200 mm Schlauch und Multi-Adapter (G 21)

Geräte

- einfache Pipetten: Eppendorf Reference® 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl und 100 - 1000 µl
- 8-Kanal Pipette: Eppendorf Research® plus 30 - 300 µl
- Pipettierhilfe für die Messpipette: Eppendorf Easypet®
- Vortexer Heidolph REAX 2000
- Eppendorf Thermomixer® 5436
- Zentrifuge für 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße: Eppendorf® Centrifuge 5417C
- Fluoreszenzplattenreader infinite M200 von Tecan (Seriennummer: 712004717)
- Computerprogramme: Tecan i-control 1.9.17.0; Microsoft Excel 2010; Microsoft Excel-Applikation cf-DNA-Quant Analysis Template von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC

12.1.3.2 Bestimmung des sCD163

Reagenzien

- rekombinanter sCD163-Standard (pulverförmig)
- biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen CD163 (200x, enthält 0,02% Natriumazid (NaN₃))
- Streptavidine-HRP (Horseradishperoxidase (Meerrettichperoxidase))
- Waschpuffer (10x, enthält 0,01% Thiomersal (Thimerosal))
- Verdünnungspuffer (10x, enthält 0,01% Thiomersal (Thimerosal))
- TMB-Substratlösung (enthält < 0,02% w/w TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethylbezidin))
- Stop-Lösung (0,2 M H₂SO₄)
- Aqua bidest

Verbrauchsmaterialien

- mit einem polyklonalem Antikörper gegen CD163 vorbeschichtete 96-well Mikrotiterplatte aus dem Macro163™ - KIT von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC
- adhesive Plattenversiegler (4x) aus dem Macro163™ - KIT von TRILLIUM DIAGNOSTICS LLC
- Pipettenspitzen (Eppendorf Biopur® 20 µl, 200 µl und 1000 µl)
- Messpipette CELLSTAR® von Greiner Bio-One (10 ml in 1/10 ml, serological pipette, sterile)
- 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
- Waschwanne

Geräte

- einfache Pipetten: Eppendorf Reference® 0,5 - 10 µl, 10 - 100 µl, 50 - 200 µl und 100 - 1000 µl
- 8-Kanal Pipette: Eppendorf Research® plus 30 - 300 µl
- Pipettierhilfe für die Messpipette: Eppendorf Easypet®
- Meßzylinder: BRAND 100:1 ml (+/- 0,5 ml Abweichung, ISO 4788)
- Gefäße: SCHOTT DURAN 500 ml, KIMAX® KIMBLE 100 ml
- Zentrifuge für 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen: Eppendorf® Centrifuge 5417C
- Vortexer Heidolph REAX 2000
- Eppendorf Thermomixer® 5436
- Mikrolattenshaker Heidolph Titramax 101
- Mikrotiterplattenleser: BioTek EL808
- Software: Gen5 1.11 von BioTek Instruments GmbH

12.1.4 Messmethodiken der Routinelaborparameter

Tabelle 12.3 – Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
Erythrozyten und Thrombozyten	Erythrozyten: 10E12/l Thrombozyten: 10E9/l	Erythrozyten: ♂: 4,5 - 5,5 ♀: 4 - 5 Thrombozyten: 150 - 450	EDTA-Blut (S-Monovette® EDTA-K)	Sysmex (hämatologisches Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung nach dem Widerstandsmessprinzip - nach Verdünnung der Probe wird ein definiertes Volumen in die Messkammer gespritzt → beim Durchtritt durch eine Kapillaröffnung erzeugt die jeweilige Zelle eine elektrische Widerstandsänderung, die als elektrischer Impuls gemessen wird - proportionaler Zusammenhang zwischen Größe des Impulses und der Zellgröße (u.a. Differenzierung zwischen Erythrozyten und Thrombozyten möglich) - Messung der Anzahl der Impulsänderungen eines definierten Probenvolumens pro Zeiteinheit - Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung verhindert einen Doppeldurchtritt und eine Rezirkulation der Zellen (Quelle: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XE-5000) Sysmex Xtra 1/2009)
Hämoglobin (Hb)	mmol/l	♂: 8,6 - 12 ♀: 7,4 - 9,9	EDTA-Blut (S-Monovette® EDTA-K)	Sysmex (hämatologisches Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - photometrische Messung - Verdünnung der Probe u.a. mit Natrium-Lauryl-Sulfat (SLS), das sowohl hydrophobe als auch hydrophile Eigenschaften besitzt - Zelllyse und Freisetzung des Hbs → hydrophobe Gruppen des SLS binden an den Globinanteil, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Hbs kommt und die Oxidation des zweiwertigen Eisens des Häms unter Entstehung von Methämoglobin ermöglicht wird → hydrophile Gruppen des SLS binden an das dreiwertige Eisen des Methämoglobins → photometrische Analyse des entstandenen Farbkomplexes (Absorptionsmaximum bei 550 nm) (Quelle: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XE-5000) Sysmex Xtra 1/2009)
Hämatokrit	l/l	♂: 0,4 - 0,51 ♀: 0,35 - 0,47	EDTA-Blut (S-Monovette® EDTA-K)	Sysmex (hämatologisches Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - Prinzip der kumulativen Impulshöhensummierung - Bestimmung aus der Summe aller Einzelimpulse der Erythrozyten (siehe oben Widerstandsmessprinzip zur Messung der Erythrozytenanzahl) (Quelle: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (XE-5000) Sysmex Xtra 1/2009)
Leukozyten und Differenzierung	Leukozyten (gesamt): 10E9/l Differenzierung Angabe in %	4 - 9 * 10E9/l	EDTA-Blut (S-Monovette® EDTA-K)	Sysmex (hämatologisches Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - Fluoreszenz-Durchflusszytometrie - Probenverdünnung und Zugabe einer Lyse substanz zur Zerstörung der Erythrozyten und Perforation der Leukozytenmembranen, anschließend Färbung von Nukleinsäuren im Kern und Zytoplasma mit einem Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff - durchflusszytometrische Analyse mittels Halbleiterlaser - Messung der Fluoreszenzintensität (proportional zum RNA/DNA-Gehalt der Zelle → Informationen über Zellaktivität und Zellreife) und Seitwärtsstreulichtintensität (Aussage über innere Zellstruktur: Granula, Kerngröße und Lobularität des Zellkerns) → Differenzierung der Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile, Eosinophile und Basophile) möglich (Quelle: Fluoreszenz-Durchflusszytometrie in der Hämatologie (xs-Serie) Sysmex Xtra 2/2007)

Fortsetzung Tabelle 12.3 - Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
CRP	mg/l	< 5	Lithium-Heparin-Plasma (S-Monovette® Plasma)	Beckman Coulter (Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - turbidimetrischer Immuntest - Die Probe wird mit einem Puffer (Glycinpuffer) und einer Latexsuspension, deren Latexpartikel anti-humane-CRP-Antikörper tragen, gemischt. Das CRP bindet unter Bildung nicht löslicher Aggregate an die anti-humanen-CRP-Antikörper der Latexpartikel. Diese Aggregate bedingen eine Streuung des einfallenden Lichts. Die Extinktion ist proportional zur CRP-Konzentration. (Quelle: Beckmann Coulter Gebrauchsanweisung BLOSR6X99 10, 12/2018) (Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006)
Komplement 3 (C3)	mg/l	900 - 1800	Serum (S-Monovette® Serum)	Beckman Coulter (Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - immunturbidimetrischer Test - Die Probe wird mit einer Pufferlösung (u.a. Tris(hydroxymethyl)aminomethan, kurz TRIS-Puffer) und einem Antiserum (Ziege) gemischt. Das humane C3 bindet unter Bildung nicht löslicher Aggregate an die Antihuman-C3-Antikörper. Diese Aggregate bedingen eine Streuung des einfallenden Lichts. Die Extinktion ist proportional zur C3-Konzentration. (Quelle: Beckmann Coulter Gebrauchsanweisung BLOSR6X59 05, 05/2017) (Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006)
Komplement 4 (C4)	mg/l	100 - 400	Serum (S-Monovette® Serum)	Beckman Coulter (Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - immunturbidimetrischer Test - Die Probe wird mit einer Pufferlösung (u.a. Tris(hydroxymethyl)aminomethan, kurz TRIS-Puffer) und einem Antiserum (Ziege) gemischt. Das humane C4 bindet unter Bildung nicht löslicher Aggregate an die Antihuman-C4-Antikörper. Diese Aggregate bedingen eine Streuung des einfallenden Lichts. Die Extinktion ist proportional zur C4-Konzentration. (Quelle: Beckmann Coulter Gebrauchsanweisung BLOSR6X60 05, 05/2017) (Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006)
Creatinin	μmol/l	Plasma: ♂: 59 - 104 ♀: 45 - 84	Lithium-Heparin-Plasma (S-Monovette® Plasma)	Beckman Coulter (Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung nach der Jaffé-Methode, einem kinetischen Farbttest - Creatinin geht mit Pikrinsäure in einem alkalischen Milieu einen gelb-orangen Komplex ein (Creatinin-Pikrat-Komplex) - die Absorptionsabweichungsrate bei 520/800 nm in der photometrischen Messung ist proportional zur Creatininkonzentration (Quelle: Beckmann Coulter Gebrauchsanweisung BLOSR6X78 15, 12/2018)
Harnstoff	mmol/l	2,8 - 7,2	Lithium-Heparin-Plasma (S-Monovette® Plasma)	Beckman Coulter (Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung mittels kinetischem UV-Test - Hydrolyse des Harnstoffs bei Anwesenheit von Wasser zu Ammoniak und Kohlendioxid durch das Enzym Urease. Das gebildete Ammoniak verbindet sich mit 2-Oxoglutarat (α-Ketoglutarat) zu 2-L-Glutamat. In dieser von der Glutamatdehydrogenase katalysierten Reaktion kommt es zur Oxidation von Nicotinamidadeninukleotid(phosphat) ($\text{NAD(P)H} \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$). Der Abfall der bei 340 nm photometrisch bestimmten NAD(P)H-Extinktion pro Zeiteinheit ist proportional zur Harnstoffkonzentration. (Quelle: Beckmann Coulter Gebrauchsanweisung BLOSR6X34 03, 04/2015) (Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006)

Fortsetzung Tabelle 12.3 - Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
eGFR (MDRD)	ml/min/1,73 m ²	95 - 160 (altersabhängig)			<ul style="list-style-type: none"> Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) mit der MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) - Formel: $GFR \left(\frac{ml}{min} \right) = 186 \times \left(\frac{Serumcreatinin \left[\frac{\mu mol}{l} \right]}{88,4} \right)^{-1,154} \times Alter^{-0,203} \times 0,742 (\text{♀})$ <p>Formel gilt nur für Weiße mit einer chronischen Niereninsuffizienz. Bei Männern entfällt die Multiplikation mit 0,742. (Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006) (Quelle: Herold, Gerd (2018): Innere Medizin 2019. Eine vorlesungsorientierte Darstellung)</p>
endogene Creatinin-Clearance	ml/min/1,73 m ²	♂: ≥ 110 ♀: ≥ 95 (altersabhängig)			<ul style="list-style-type: none"> Berechnung der endogenen Creatinin-Clearance aus den Creatininkonzentrationen im 24 h-Sammelurin und im Serum $Creatinin\ clearance \left(\frac{ml}{min} \right) = \frac{Urin-Creatininkonzentration \times Urinvolumen\ in\ 24\ h\ (in\ ml)}{Serum-Creatininkonzentration \times 1440\ min.}$ <p>1440 min. entsprechen der Sammelzeit an einem Tag 24*60 Minuten. (Quelle: Herold, Gerd (2018): Innere Medizin 2019. Eine vorlesungsorientierte Darstellung)</p>
Protein im 24 h-Sammelurin	g/d	0,05 - 0,08 g/d (Ruhezustand) bis 0,3 g/d bei Belastung	24 h - Urinprobe ohne Konservierungsmittel	Beckman Coulter (Analysegerät)	<ul style="list-style-type: none"> Ausnutzung der Veränderung des Absorptionsmaximums einer Pyrogallolrot-Molybdat-Verbindung (roter Komplex, max. Absorption bei 470 nm) nach Bindung an alkalischen Aminogruppen von Proteinen (blau-violetter Komplex, max. Absorption bei 600 nm) Die Absorption des Pyrogallolrot-Molybdat-Proteinkomplexes ist direkt proportional zur Proteinkonzentration <p>(Quelle: Beckmann Coulter Gebrauchsanweisung BLOSR6X70 03, 05/2015)</p>
Urinteststreifen Leukozyten	1/μl	< 25/μl	8,5 ml frischer Mittelstrahlurin (Urin-Monovette)	URISYS 2400 Cassette (Roche)	<ul style="list-style-type: none"> semiquantitative Bestimmung die Esterasen der Granulozyten spalten den im Feld enthaltenen Indoxylester → Indoxyl reagiert mit Diazoniumsalz zu einem violetten Farbstoff Lymphozyten werden nicht erfasst <p>(Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006) (Quelle: Roche, URISYS 2400 Cassette, 2018-01, V 2.0 Deutsch) (Quelle: https://www.roche.de/res/content/7807/urinalyse-kompodium.pdf)</p>
Urinteststreifen Erythrozyten	1/μl	< 10/μl	8,5 ml frischer Mittelstrahlurin (Urin-Monovette)	URISYS 2400 Cassette (Roche)	<ul style="list-style-type: none"> semiquantitative Bestimmung das Testfeld enthält u.a. ein organisches Hydroperoxid und ein Chromogen (z.B. o-Toluidin oder 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)) Ausnutzung der Peroxidase-artigen Wirkung von Hämoglobin → durch Einwirkung von Hämoglobin läuft die Oxidation des Chromogens durch das organische Hydroperoxid ab → Farbumschlag intakte Erythrozyten werden durch im Testfeld enthaltene Stoffe lysiert und setzen Hämoglobin frei auch Myoglobin kann die Reaktion auslösen <p>(Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006) (Quelle: Roche, URISYS 2400 Cassette, 2018-01, V 2.0 Deutsch) (Quelle: https://www.roche.de/res/content/7807/urinalyse-kompodium.pdf)</p>

Fortsetzung Tabelle 12.3 - Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
Urinstreifenteststreifen Protein	mg/l	< 100	8,5 ml frischer Mittelstrahlurin (Urin-Monovette)	URISYS 2400 Cassette (Roche)	<ul style="list-style-type: none"> - semiquantitative Bestimmung - Prinzip des „Proteinfehlers“ bestimmter pH-Indikatoren (u.a. Tetrabromphenolblau): durch Kontakt mit Proteinen treten bei konstantem pH-Wert spektrale Veränderungen auf - normalerweise liegt der Umschlagsbereich des pH-Indikators Tetrabromphenolblau (gelb/blau) bei pH 3 bis 4 → bei Anwesenheit von Proteinen (insbesondere Albumin) Umschlag schon zwischen pH 2 und 3 → der pH-Wert des Puffergemisches des Protein-testfeldes bleibt konstant, d.h. bei Anwesenheit von Proteinen erfolgt ein Farbumschlag (Quelle: Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie 6. Auflage, 2006) (Quelle: Roche, URISYS 2400 Cassette, 2018-01, V 2.0 Deutsch) (Quelle: https://www.roche.de/res/content/7807/urinanalyse-kompendium.pdf)
Urinsediment Leukozyten und Erythrozyten	l/Gesichtsfeld	keine	10 ml frischer Mittelstrahlurin (Urinbecher/Urin-Monovette)	Mikroskop Leica DMLS	<ul style="list-style-type: none"> - 5 Minuten zentrifugieren bei 2600 U/min. (Zentrifuge Hettich Universal Z11 Urine) - überstehende Flüssigkeit wird abgegossen und das Sediment gemischt - ein Tropfen der Mischung wird auf einen Objektträger pipettiert - Beurteilung im Mikroskop bei 100 - 300x Vergrößerung (Quelle: Universitätsmedizin Rostock ILAB, Standardarbeitsanweisung Analyt (SAA), Dokument-ID SAA-310-V24)
Dysmorphie Erythrozyten im Urin	%	< 20%	10 ml frischer Mittelstrahlurin (Urinbecher/Urin-Monovette)	Phasenkontrast-Mikroskop Olympus X45/Hämatologie (10-er Okular, 40-er Objektiv → 400fache Vergrößerung)	<ul style="list-style-type: none"> - 10 ml frischer Mittelstrahlurin wird 10 Minuten bei 1000 U/min. zentrifugiert (Zentrifuge Hettich/Hämatologie), der Überstand vorsichtig abgegossen und das Sediment gemischt - 50 µl Urinsediment werden in die Madaus-Zählkammer pipettiert - nach 2 minütiger Sedimentation werden 100 Erythrozyten phasenkontrastmikroskopisch (400fache Vergrößerung) hinsichtlich ihrer Morphologie (eumorph oder dysmorph) beurteilt - glomeruläre Erythrozyten: Ringformen („Schwimmreifen“, Anulozyten), Akanthozyten, destruierte Formen - nicht-glomeruläre Erythrozyten: Stechapfelform, zarte Doppelkonturen, Scheibenform, Fältelungen - Beurteilung: <ul style="list-style-type: none"> o sichere Glomerulonephritis: > 80% dysmorphe Erythrozyten o eine glomeruläre Hämaturie ist sehr wahrscheinlich: > 75% dysmorphe Erythrozyten und > 5% Akanthozyten o fragliche Glomerulopathie: 20 bis 50% dysmorphe Erythrozyten o keine Glomerulonephritis: < 20% dysmorphe Erythrozyten (Quelle: Universitätsmedizin Rostock ILAB, Standardarbeitsanweisung Analyt (SAA), Dokument-ID SAA-351-V19)

Fortsetzung Tabelle 12.3 - Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
Hämoglobin A1c (HbA1c)	% bzw. mmol/mol Hb	< 6% bzw. < 42 mmol/mol Hb	EDTA-Blut (S-Monovette® EDTA-K)		<ul style="list-style-type: none"> - Immunoturbidimetrischer Test standardisiert nach DCCT/NSGP Protokoll - Angabe des Verhältnisses des HbA1c zum Gesamthämoglobin (% oder als mmol/mol Hb) - Vorbereitung der Probe durch Hinzugabe des Denaturierungsreagenz (u.a. Puffer mit pH von 2,4, Konservierungsmittel und Protease Pepsin) → Hämolyse und Denaturierung des Hämoglobins - Gesamthämoglobin: kolorimetrische Bestimmung. Hinzugabe des Gesamthämoglobinreagenz (Natriumhydroxid, Triton, Octylphenoxypolyethoxyethanol) → Überführung der Hämoglobinderivate in ein alkalisches Hämatin-Derivat (Farbumschlag nach grün). Messung der veränderten Absorptionsfähigkeit bei 570/660 nm. - HbA1c-Bestimmung mittels turbidimetrischer Immuninhibitionsmethode: Hinzugabe von monoklonalen HbA1c-Antikörpern (auf Latexpartikeln gebunden) und HbA1c-Polyhaptene (kovalent an Polymere gekoppelt). HbA1c-Antikörper binden bei fehlendem HbA1c vollständig an die HbA1c-Polyhaptene unter Bildung eines agglutinierten Komplexes der turbidimetrisch gemessen wird (hohe Absorption). Vorhandenes HbA1c konkurriert unter Bildung löslicher Antigen-Antikörper-Komplexe mit den Polyhaptenen um die monoklonalen HbA1c-Antikörper, so dass nur überschüssige Antikörper an die Polyhaptene binden und eine Agglutination einsetzt. Die Absorptionsabnahme (Messung bei 340/700 nm) ist proportional zur HbA1c-Konzentration. <p>(Quelle: Universitätsmedizin Rostock ILAB, Standardarbeitsanweisung Analyt (SAA), Dokument-ID SAA-148-V28) (Quelle: Analyticon® Biotechnologies AG Am Mühlenberg 10, 35104 Lichtenfels (Deutschland), Dokument PHbA1c-B_GB-D_21_001_03.01_2013-01-02)</p>
Parathormon (PTH)	pg/ml	15,0 - 65,0	EDTA-Blut (S-Monovette® EDTA-K)	Cobas®	<ul style="list-style-type: none"> - Sandwichprinzip - Inkubation der Probe mit einem biotinylierten monoklonalen PTH-spezifischen Antikörper (bindet das N-terminale Fragment) und mit einem Ruthenium-Komplex markierten monoklonalen PTH-spezifischen Antikörper (bindet das C-terminale Fragment) → Bildung eines Sandwichkomplexes - Durch Zugabe von Streptavidin-beschichtete Mikropartikel wird der Sandwichkomplex durch Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen an die Festphase gebunden. - Die Mikropartikel des Reaktionsgemisches werden in der Messzelle durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche der Elektrode fixiert und nicht gebundene Stoffe mit ProCell/ProCell M entfernt. - Nach Induktion einer Chemilumineszenzemission (durch Anlegen einer Spannung) wird diese mit dem Photomultiplier gemessen und der PTH-Wert anhand einer Kalibrierungskurve bestimmt. <p>(Quelle: Cobas® Elecsys PTH STAT, ms_04892470190V12.0, 12/2019)</p>
25-OH-Vit. D	nmol/l	> 50	Serum (S-Monovette® Serum)	ARCHITECT iSystems	<ul style="list-style-type: none"> - verzögerter kompetitiver Ein-Schritt-Immunoassay - Mischung der Probe mit einem Verdünnungsmittel (Citratpuffer mit EDTA, Methanol, 8-Anilino-1-Naphtalinsulfonsäure, Netzmittel) und mit monoklonalen anti-Vitamin D-IgG beschichteten paramagnetischen Mikropartikeln → 25-OH-Vit. D wird vom Vitamin D bindenden Protein gelöst und bildet mit den Mikropartikeln einen Antigen-Antikörper-Komplex. - Hinzugabe von Acridinium-markiertem Vitamin D → bindet an freie Stellen der mit monoklonalen anti-Vitamin D beschichteten Mikropartikel. - Hinzugabe von Pre-Trigger- (enthält u.a. Wasserstoffperoxid) und Trigger-Lösungen (enthält u.a. Natriumhydroxid) → Messung der Chemilumineszenzreaktion, die Konzentration an 25-OH-Vit. D ist zu den gemessenen relativen Lichteinheiten proportional <p>(Quelle: Abbott Laboratories, Abbot Park, IL 60064 USA, ARCHITECT 25-OH-Vitamin D, de 5P02 G8-0376/R03 B5P021, 08/2016)</p>

Fortsetzung Tabelle 12.3 - Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
c-ANCA und p-ANCA	Titer	< 1:10	Serum (S-Monovette® Serum)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG	<ul style="list-style-type: none"> - indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) - Inkubation von Patientenserum (verdünnte Probe, 1:10 mit PBS-Tween) mit auf Objektträgern aufgebrauchten Ethanol-fixierten Granulozyten (EOH) und Formaldehyd-fixierten Granulozyten (HCHO) - Bei Vorhandensein von spezifischen Antikörpern (IgA, IgG, IgM) binden diese an die Antigene. Nach einem Waschgang (PBS-Tween) werden gebundene Antikörper mit Hilfe eines Fluorescein-markierten Anti-Human-IgG (Ziege) angefärbt und nach erneutem Auswaschen anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt (typische Muster) <ul style="list-style-type: none"> o cytoplasmatisches Muster - cANCA: körnige Fluoreszenz gleichmäßig über das gesamte Cytoplasma verteilt unter Aussparung der Zellkerne → in der Regel durch die Antikörper gegen die Proteinase 3 bedingt (teilweise auch durch Antikörper gegen das BPI möglich) o perinukleäres Muster - pANCA: glatte Fluoreszenz bandförmig um die Zellkerne der Granulozyten → bedingt durch Autoantikörper unterschiedlicher Spezifität u.a. Myeloperoxidase, neutrophile Elastase, Laktoferrin, Lysozym, Kathepsin G <p>(Vorteil der Formaldehyd-fixierten Granulozyten: reagieren relativ spezifisch mit Autoantikörpern gegen die Myeloperoxidase und nicht mit Autoantikörpern gegen Elastase, Laktoferrin, Lysozym und Kathepsin G)</p> <p>(Quelle: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck (Germany))</p>
Proteinase 3 (PR3) - Antikörper	RE/ml (RE: relative Einheiten)	< 20	Serum (S-Monovette® Serum)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung mittels eines ELISAs - Inkubation (30 Minuten) von Probenverdünnungen (1:101 mit Probenpuffer) auf mit einem Gemisch aus rekombinanter humaner und nativer humaner PR3 beschichteten Reagenzgefäßen. Bei Vorhandensein von PR3-Antikörpern binden diese an das Antigen. Nach einem Waschdurchgang (Waschpuffer) erfolgt ein zweiter Inkubationsschritt (30 Minuten) mit einem Peroxidase-markierten Anti-Human-IgG-Antikörper (Enzymkonjugat, vom Kaninchen). Nach erneutem Waschvorgang wird eine Chromogen/Substratlösung (TMB/ H₂O₂) hinzugegeben, das von der Peroxidase umgesetzt wird (Inkubation der Farbreaktion unter Lichtschutz). Nach 15 Minuten erfolgt durch Zugabe der Stopplösung (0,5 Molare Schwefelsäure) die Beendigung des Substratumsatzes. Anschließend wird die Farbintensität photometrisch bestimmt (Meßwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 - 650 nm). <p>(Quelle: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck (Germany))</p>
Myeloperoxidase (MPO) - Antikörper	RE/ml (RE: relative Einheiten)	< 20	Serum (S-Monovette® Serum)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG	<ul style="list-style-type: none"> - Bestimmung mittels eines ELISAs - Inkubation (30 Minuten) von Probenverdünnungen (1:101 mit Probenpuffer) auf mit MPO-beschichteten Reagenzgefäßen. Bei Vorhandensein von MPO-Antikörpern binden diese an das Antigen. Nach einem Waschdurchgang (Waschpuffer) erfolgt ein zweiter Inkubationsschritt (30 Minuten) mit einem Peroxidase-markierten Anti-Human-IgG-Antikörper (Enzymkonjugat, vom Kaninchen). Nach erneutem Waschvorgang wird eine Chromogen/Substratlösung (TMB/H₂O₂) hinzugegeben, das von der Peroxidase umgesetzt wird (Inkubation der Farbreaktion unter Lichtschutz). Nach 15 Minuten erfolgt durch Zugabe der Stopplösung (0,5 Molare Schwefelsäure) die Beendigung des Substratumsatzes. Anschließend wird die Farbintensität photometrisch bestimmt (Meßwellenlänge 450 nm, Referenzwellenlänge 620 - 650 nm). <p>(Quelle: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck (Germany))</p>

Fortsetzung Tabelle 12.3 - Darstellung der Methodiken zur Bestimmung der Routinelaborparameter

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Probenmaterial	Firma/Gerät	Messmethodik
Anti nukleäre Antikörper (ANA)	Titer	< 1:100	Serum (S-Monovette® Serum)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG	<ul style="list-style-type: none"> - indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) - Inkubation von Patientenserum (verdünnte Probe, 1:100 mit PBS-Tween) mit auf Objektträgern aufgebrauchten humanen Epithelzellen (HEp-20-10-Zellen) und Gefrierschnitten einer Primatenleber - Bei Vorhandensein von spezifischen Antikörpern (IgA, IgG, IgM) binden diese an die Antigene. Nach einem Waschgang (PBS-Tween) werden gebundene Antikörper mit Hilfe eines Fluoresceinmarkierten Anti-Human-IgG (Ziege) angefärbt und nach erneutem Auswaschen anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt (typische Muster) - Startverdünnung ist 1:100, weitere Verdünnungsstufen jeweils um den Faktor 10 - angegebener Titer entspricht derjenigen Verdünnungsstufe bei der eine spezifische Fluoreszenz noch detektierbar ist (Vergleich mit Negativkontrolle) (Quelle: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck (Germany))
Anti-dsDNA-Ak (Uni Rostock)	IE/ml (IE: internationale Einheiten)	< 7	Serum (S-Monovette® Serum)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG	<ul style="list-style-type: none"> - Radioimmunoassay (RIA) nach Farr - Patientenproben werden mit Jod-125-markierter (Plasmid-)dsDNA inkubiert (1 Stunde). Bei Vorhandensein von anti-dsDNA-Antikörpern binden diese an die dsDNA unter Bildung von Antigen-Antikörperkomplexen. Durch die Zugabe einer Ammoniumsulfatlösung kommt es zur Ausfällung dieser Komplexe. Nicht gebundene Jod-125-markierte dsDNA wird nach Zentrifugation durch Dekantieren oder Absaugen des Überstandes entfernt. Die mittels Gamma-Counter ermittelte Radioaktivität ist proportional zur Anti-dsDNA-Ak-Konzentration. (Quelle: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck (Germany))
Anti-dsDNA-Ak (Klinikum Südstadt Rostock)	IE/ml (IE: internationale Einheiten)	< 100	Serum (S-Monovette® Serum)	EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG	<ul style="list-style-type: none"> - Anwendung des Anti-dsDNA-NcX-ELISA (IgG) - verdünnte Proben (1:201) werden in mit dsDNA-Nukleosomen-Komplexen beschichtete Reagenzgefäße pipettiert, anschließend Inkubation (30 min.) und Waschlösungen - Hinzugabe des mit einer Peroxidase gekoppelten Anti-Human-IgG-Antikörper als Antiserum, anschließend Inkubation (30 min.) und Waschlösungen - Hinzugabe der Chromogen- bzw. Substratlösung, Inkubation (15 min.), anschließend Pipettierung der Stopp-Lösung - photometrische Messung bei 450 nm (Quelle: EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostik AG, Lübeck (Germany))

12.1.5 Krankheitsaktivitätsindices und Studienbogen

12.1.5.1 Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in Version 3

Birmingham Vasculitis Activity Score (v 3) (weighting with major items are highlighted)

Patient ID: _____ Date of birth: _____ Total score: _____
 Assessor: _____ Date of assessment: _____

Tick an item only if attributable to active vasculitis. If there are no abnormalities in a section, please tick 'None' for that organ-system. If all abnormalities are due to persistent disease (active vasculitis which is not new/worse in the prior 4 weeks), tick the **PERSISTENT** box at the bottom right corner

Is this the patient's first assessment?		Yes <input type="radio"/>		No <input type="radio"/>	
	P	N/W		P	N/W
1. General Max	2	3	6. Cardiovascular Max	3	6
Myalgia	1	1	Loss of pulses	1	4
Arthralgia / arthritis	1	1	Valvular heart disease	2	4
Fever $\geq 38^\circ\text{C}$	2	2	Pericarditis	1	3
Weight loss $\geq 2\text{ kg}$	2	2	◆ Ischaemic cardiac pain	2	4
2. Cutaneous Max	3	6	◆ Cardiomyopathy	3	6
Infarct	1	2	◆ Congestive cardiac failure	3	6
Purpura	1	2	7. Abdominal Max	4	9
Ulcer	1	4	Peritonitis	3	9
◆ Gangrene	2	6	Bloody diarrhoea	3	9
Other skin vasculitis	1	2	◆ Ischaemic abdominal pain	2	6
3. Muc membranes/ eyes Max	3	6	8. Renal Max	6	12
Mouth ulcers	1	2	Hypertension	1	4
Genital ulcers	1	1	Proteinuria $>1+$	2	4
Adnexal inflammation	2	4	◆ Haematuria $\geq 10\text{ RBCs/hpf}$	3	6
Significant proptosis	2	4	Creatinine $125\text{-}249\mu\text{mol/L}$ ($1.41\text{-}2.82\text{mg/dl}$)*	◆	4
Scleritis / Episcleritis	1	2	Creatinine $250\text{-}499\mu\text{mol/L}$ ($2.83\text{-}5.64\text{mg/dl}$)*	◆	6
Conjunctivitis / Blepharitis / Keratitis	1	1	◆ Creatinine $\geq 500\mu\text{mol/L}$ ($\geq 5.66\text{mg/dl}$)*	◆	8
Blurred vision	2	3	◆ Rise in serum creatinine $>30\%$ or fall in creatinine clearance $>25\%$	◆	6
Sudden visual loss	◆	6	*Can only be scored on the first assessment		
Uveitis	2	6	9. Nervous system Max	6	9
◆ Retinal changes (vasculitis / thrombosis / exudate / haemorrhage)	2	6	Headache	1	1
4. ENT Max	3	6	Meningitis	1	3
Bloody nasal discharge / crusts / ulcers / granulomata	2	4	Organic confusion	1	3
Paranasal sinus involvement	1	2	Seizures (not hypertensive)	3	9
Subglottic stenosis	3	6	◆ Cerebrovascular accident	3	9
Conductive hearing loss	1	3	◆ Spinal cord lesion	3	9
◆ Sensorineural hearing loss	2	6	◆ Cranial nerve palsy	3	6
5. Chest Max	3	6	Sensory peripheral neuropathy	3	6
Wheeze	1	2	◆ Mononeuritis multiplex	3	9
Nodules or cavities	◆	3	10. Other Max	◆	◆
Pleural effusion / pleurisy	2	4	a.	◆	◆
Infiltrate	2	4	b.	◆	◆
Endobronchial involvement	2	4	c.	◆	◆
◆ Massive haemoptysis / alveolar haemorrhage	4	6	d.	◆	◆
◆ Respiratory failure	4	6	PERSISTENT DISEASE ONLY: (Tick here if all the abnormalities are due to persistent disease) <input type="checkbox"/>		

◆ Indicates major item ◆ These items are not scored P=Persistent N/W=New or Worse

Max indicates the maximum score for each section

Maximum persistent score = 33 Maximum new/worse score = 63

Please note, only score for persistent if all items are persistent; if any items are new/worse score all items as new/worse

References: Luqmani, RA, et al. (1994). "Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis." QJM 87(11):671-8.

Luqmani, RA, et al. (1997). "Disease assessment and management of the vasculitides." Baillieres Clin Rheumatol 11(2): 423-46. Mukhtyar C.

et al (2009). "Modification and validation of the Birmingham Vasculitis Activity Score (version 3) ARD 68:1827

Internetquelle:

https://unn.no/Documents/Kvalitetsregistre/Norsk%20Vaskulittregister%20og%20biobank/BVASv3_scoring.pdf

12.1.5.2 Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000 (SLEDAI-2K)

Study No.: _____ Patient Name: _____ Visit Date: ____

(Enter weight in SLEDAI Score column if descriptor is present at the time of the visit or in the preceding 10 days.)

Weight	SLEDAI SCORE	Descriptor	Definition
8	_____	Seizure	Recent onset, exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	_____	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized, or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8	_____	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features, inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness, or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infectious, or drug causes.
8	_____	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid, or optic neuritis. Exclude hypertension, infection, or drug causes.
8	_____	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	_____	Lupus headache	Severe, persistent headache; may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	_____	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	_____	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infarction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	_____	Arthritis	≥ 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	_____	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	_____	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	_____	Hematuria	>5 red blood cells/high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	_____	Proteinuria	>0.5 gram/24 hours
4	_____	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	_____	Rash	Inflammatory type rash.
2	_____	Alopecia	Abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	_____	Mucosal ulcers	Oral or nasal ulcerations.
2	_____	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	_____	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion, or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	_____	Low complement	Decrease in CH50, C3, or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory
2	_____	Increased DNA binding	Increased DNA binding by Farr assay above normal range for testing laboratory.
1	_____	Fever	>38° C. Exclude infectious cause.
1	_____	Thrombocytopenia	<100,000 platelets / x10 ⁹ /L, exclude drug causes.
1	_____	Leukopenia	< 3,000 white blood cells / x10 ⁹ /L, exclude drug causes.

TOTAL
SLEDAI
SCORE _____

Quelle:

Gladman, Dafna D.; Ibañez, Dominique; Urowitz, Murray B. (2002): Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. In: *J Rheumatol* 2002 Feb;29, S. 288–291.

12.1.5.3 European Consensus Lupus Activity Measurement (ECLAM)

1. Generalized manifestations	Any of the following:	0.5
Fever	Documented basal morning temperature of 37.5°C not due to an infective process	
Fatigue	A subjective feeling of extraordinary tiredness	
2. Articular manifestations	Any of the following:	1
Arthritis	Non-erosive arthritis involving at least 2 peripheral joints (wrist, metacarpophalangeal or proximal, interphalangeal joints).	
Evolving arthralgia	New onset or worsening of specific localized pain without objective symptoms in at least two peripheral joints	
3a. Active muco-cutaneous manifestations	Any of the following:	0.5
Malar rash	Fixed erythema, flat or raised over the malar eminences, and tending to spare the naso-labial folds.	
Generalised rash	Amaculo-papular rash not induced by drugs, that may be located anywhere on the body, and that is not strictly dependent on sun exposure.	
Discoid rash	Erythematous, raised patches with adherent keratotic scaling and follicular plugging.	
Skin vasculitis	Including digital ulcers, purpura, urticaria, bullous lesions.	
Oral ulcers	Oral or naso-pharyngeal ulcers, usually painless, observed by a physician.	
3b. Evolving mucocutaneous manifestations	If any of the above mucocutaneous manifestations are new or have worsened since the last observation, add 1 point.	1
4. Myositis*	Confirmed by raised muscle enzymes and/or EMG examination and/or histology.	2
5. Pericarditis	Documented by ECC or rub or evidence of pericardial effusion on ultrasound.	1
6. Intestinal manifestations	Any of the following:	2
Intestinal vasculitis	Evidence of acute intestinal vasculitis.	
Sterile peritonitis	Evidence of abdominal effusion in the absence of infective processes.	
7. Pulmonary manifestations	Any of the following:	1
Pleurisy	Clinical or radiological evidence of pleural effusion in the absence of infective processes.	
Pneumonitis	Single or multiple lung opacities on chest X-ray thought to reflect active disease not due to an infective process.	
Ingravescent dyspnoea	Due to an evolving interstitial involvement.	
8. Evolving neuropsychiatric manifest.*	New appearance or worsening of any of the following:	2
Headache/migrane	Recently developed, persistent or recurrent/ Poorly responsive to the most commonly used drugs, but partially or totally responsive to corticosteroids.	
Seizures	Grand mal or petit mal seizures, Jacksonian fits, temporal lobe seizures, or choreic syndrome, in the absence of offending drugs or known metabolic derangements (e.g. uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance).	
Stroke	Cerebral infarction or haemorrhage, instrumentally confirmed.	
Organic brain disease	Impairment of memory orientation, perception, and ability to calculate.	
Psychosis	Dissociative features in the absence of offending drugs or known metabolic derangements, e.g. uremia, ketoacidosis, or electrolyte imbalance.	
9a. Renal manifestations* ⁺	Any of the following:	0.5
Proteinuria	At least 500 mg/day.	
Urinary casts	Red cells, haemoglobin, granular, tubular, or mixed casts.	
Haematuria	Microscopic or macroscopic.	
Raised serum creatinine or reduced creatinine clearance		
9b. Evolving renal manifestations	If any of the above renal manifestations are new and have worsened since the last two observations, add 2 points.	
10. Haematologic features	Any of the following:	1
Non-haemolytic anaemia	A Coombs-negative normocytic hypochromic or normochromic anaemia without reticulocytosis.	
Haemolytic anaemia*	A Coombs-positive haemolytic anaemia, with reticulocytosis and elevated LDH, in the absence of offending drugs.	
Leukopenia (or lymphopenia)	Less than 3,500/mm ³ WBC (or 1,500/mm ³ lymphocytes) in the absence of offending drugs.	
Thrombocytopenia	Less than 100,000/mm ³ in the absence of offending drugs.	
11. Erythrocyte sedimentation rate		
Raised ESR	>25 mm/h by Westergren or comparable methods, not due to other concomitant pathological process.	1
12a. Hypocomplementaemia	Reduced plasma level of any of the following:	1
C3	By radial immunodiffusion or laser nephelometer.	
CH50	By standardized haemolytic methods.	
12b. Evolving hypocomplementaemia	Significantly reduced level of any of the items mentioned above (plus C4) with respect to the last observation.	1
FINAL SCORE #		

*If this system (or manifestations) is the only involvement present from among items 1-10, add 2 more points. + Excluding patients with end-stage chronic renal disease. #If the final total score is not an integer number, round off to the lower integer for values <6 and to the higher integer for values >6. If the final total score is >10, round off to 10.

Quelle:

Castrejon, I.; Tani, C.; Jolly, M.; Huang, A.; Mosca, M. (2014): Indices to assess patients with systemic lupus erythematosus in clinical trials, long-term observational studies, and clinical care. In: *Clinical and experimental rheumatology* 32 (5 Suppl 85), S-85-95.

12.1.5.4 Studienbogen

„Erforschung des Einflusses von Autoimmunerkrankungen auf die Entstehung entzündlicher Erkrankungen der Niere“
 Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Daniel Mokosch Fallnummer: Studiennummer:

Studie: Autoimmunerkrankungen und Nierenschäden
-Anamnesebogen -

Fallnummer:	Studiennummer:	Datum:
Initialen (Anfang von Vor-/Nachname):	Geb.-Datum:	
Aufnahme:	<input type="checkbox"/> stationär <input type="checkbox"/> ambulant	

Allgemeine Angaben

männlich / weiblich Alter: Jahre
 Größe: cm Gewicht: kg

Probandentyp für die Studie

Morbus Wegener: Mikroskopische Polyangiitis (mPA):
 Syst. Lupus Erythematoses: arterielle Hypertonie:
 Diabetes mellitus: Gesunder Patient:

Eigenanamnese

Diabetes mellitus	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Hypertonie:	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Hyperlipidämie:	<input type="checkbox"/>	Anämie:	<input type="checkbox"/>
Zystenniere:	<input type="checkbox"/>	Pyelonephritis:	<input type="checkbox"/>
Glomerulonephritis:	<input type="checkbox"/>		

Allgemeine Anamnese

Nachtschweiß:	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein	Fieber:	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
Abgeschlagenheit:	<input type="checkbox"/>	Gewichtab/-zunahme:	<input type="checkbox"/>
Kopfschmerzen:	<input type="checkbox"/>	Ödeme:	<input type="checkbox"/>
Schwerhörigkeit:	<input type="checkbox"/>	Husten:	<input type="checkbox"/>
verstopfte Nase:	<input type="checkbox"/>	Epistaxis:	<input type="checkbox"/>
Urämischer Fötör:	<input type="checkbox"/>	Café-au lait-Kolorit:	<input type="checkbox"/>
Alkohol:	<input type="checkbox"/>	Nikotin:	<input type="checkbox"/>
Nierenlager:	<input type="checkbox"/>	Harnwegsinfekt:	<input type="checkbox"/>
Arthralgien:	<input type="checkbox"/>	Myalgien:	<input type="checkbox"/>
Arthritiden:	<input type="checkbox"/>	Myositiden:	<input type="checkbox"/>

CRF Version 1 vom 27.10.2010 Seite 1 von 4

„Erforschung des Einflusses von Autoimmunerkrankungen auf die Entstehung entzündlicher Erkrankungen der Niere“
 Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Daniel Mokosch Fallnummer: Studiennummer:

Aktuelle Medikamente:

Blutbild

Erythrozyten:	Tpt/l	Neutrophile Granulozyten:	%
Hb:	mmol/l	Eosinophile Granulozyten:	%
Hk:	l/l	Basophile Granulozyten:	%
Thrombozyten:	Gpt/l	Lymphozyten:	%
Gesamtleukozytenzahl:	Gpt/l	Monozyten:	%

Klinische Chemie

CRP: mg/l

Nierenparameter

Urinstatus: • normal • Oligurie • Anurie • Polyurie

	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein		<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Nykturie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pollakisurie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Algurie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Strangurie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dysurie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Polydypsie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Urinfarbe:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Hämaturie:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			

Urinsteststreifen

pH:	Glucose:	mg/dl	Proteine:	mg/dl
Leukozyten: /µl	Ketone:	mg/dl	Erythrozyten:	/µl
Nitrit: mg/dl				

Phasenkontrast – Mikroskopie

	<input type="checkbox"/> ja	<input type="checkbox"/> nein
Erythrozyten:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Erythrozytenzylinder:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Akanthozyten:	<input type="checkbox"/>	%
dysmorphe Erythrozyten:	<input type="checkbox"/>	%

CRF Version 1 vom 27.10.2010 Seite 2 von 4

Anhang - 12.1 Allgemeiner Teil

„Erforschung des Einflusses von Autoimmunkrankheiten auf die Entstehung entzündlicher Erkrankungen der Niere“
 Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Daniel Mokosch Fallnummer: Studiennummer:

Filtrationsleistung	
Serum-Creatinin:	µmol/l
Urin-Creatinin:	µmol/kg KG * Tag
endogene Creatinin-Clearance:	ml/(min * 1,73m ² KO)
MDRD – Clearance:	ml/(min * 1,73m ² KO)
Harnstoff:	mmol/l

Elektolyte			
Natrium:	mmol/l	Kalium:	mmol/l
Serum-Ca:	mmol/l	Phosphat:	mmol/l

Syntheseleistung			
Vit. D:	pg/ml	PTH:	pg/ml

Mikrobiologische Untersuchung	
Staphylococcus aureus - Fimbrien Typ H:	

Blutzucker – Bestimmungen	
Nüchtern - Blutzucker:	mmol/l
HbA _{1c} :	%

Blutdruck – Messung			
systolisch:	mmHg	diastolisch:	mmHg
arterielle Hypertonie: ja / nein			
Grad der arteriellen Hypertonie:			
Optimal	Normal	Hoch-normal	Hyp. Grad 1
			Hyp. Grad 2
			Hyp. Grad 3
			Isolierte sys. Hyp.

Immunologische Untersuchungen	
cANCA:	pANCA:
ANA:	

CRF Version 1 vom 27.10.2010 Seite 3 von 4

„Erforschung des Einflusses von Autoimmunkrankheiten auf die Entstehung entzündlicher Erkrankungen der Niere“
 Prof. Dr. med. Steffen Mitzner, Daniel Mokosch Fallnummer: Studiennummer:

Extrarenale Manifestationen/Aktivitäten der Autoimmunkrankheit
 (Sind granulomatöse Entzündungen vorhanden?)

- Nasennebenhöhlen:
- Respirationstrakt:
- Lunge:

Rö – Thorax:

Weiteres:

Ergebnisse der Serum CF – DNA Untersuchungen:

Anmerkungen zur Biopsie ((nekrotisierende) Glomerulonephritis vorhanden?):

CRF Version 1 vom 27.10.2010 Seite 4 von 4

12.2 Anhang I – Auswertung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses

12.2.1 Analyse der Blutdruckmessungen entsprechend der WHO-Klassifikation

Tabelle 12.4 – Darstellung des Blutdruckniveaus entsprechend der WHO-Klassifikation der arteriellen Hypertonie

SG	Optimal	Normal	Hochnormal	Hypertonie I	Hypertonie II	Hypertonie III	iso. sys. H.
GP	1 (5,9%)	-	6 (35,3%)	6 (35,3%)	2 (11,8%)	-	2 (11,8%)
AH+/-DM	2 (13,3%)	2 (13,3%)	2 (13,3%)	1 (6,7%)	1 (6,7%)	-	7 (46,7%)
SLE	5 (22,7%)	8 (36,4%)	7 (31,8%)	-	1 (4,5%)	1 (4,5%)	-
GPA	4 (20%)	3 (15%)	6 (30%)	3 (15%)	1 (5%)	-	3 (15%)
MPA	-	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)	-	-	1 (20%)

SG: Studiengruppen; iso. sys. H.: isolierte systolische Hypertonie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematodes; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis

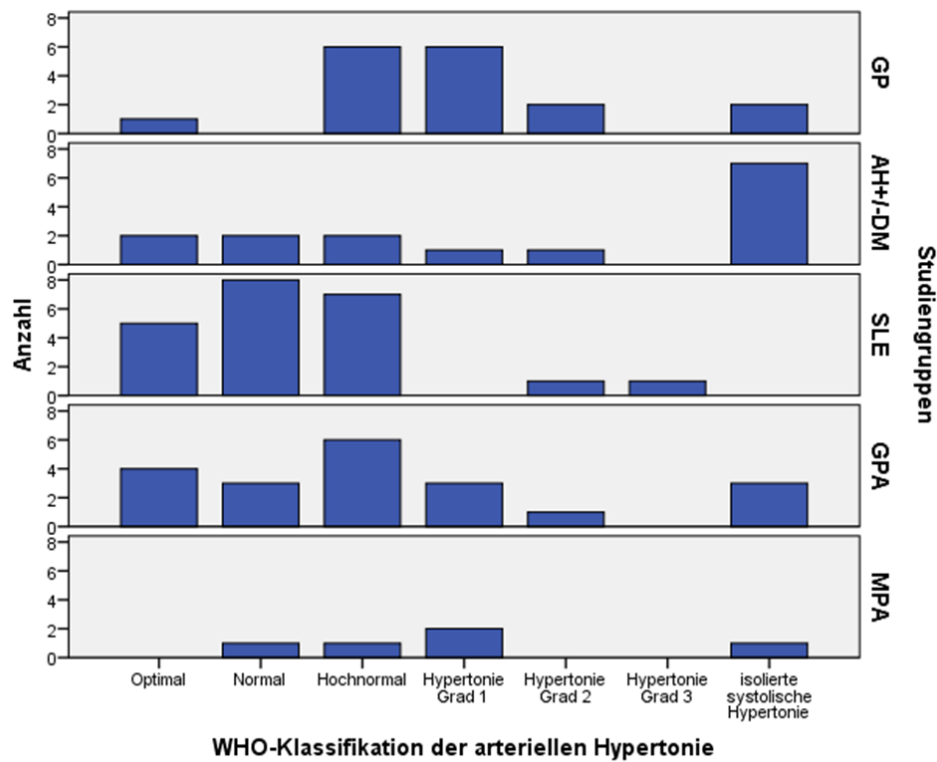


Abbildung 12.1 – Häufigkeitsverteilung der Stadien der arteriellen Hypertonie nach der WHO-Klassifikation

(GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematodes; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis)

12.2.2 Subpopulation Diabetes mellitus Typ 2

Tabelle 12.5 – ausgewählte statistische Kennwerte der Subpopulation Diabetes mellitus Typ 2

Parameter	Median (1. Qu., 3. Qu.)	Min	Max	signifikante Unterschiede zur Subpopulation D.m. Typ 2
HbA1c (%)	7,6 (6,5 - 8,35)	5,6	9,4	↑ als GP (p* < 0,001), GPA (p* < 0,001) und SLE (p* = 0,002)
HbA1c (mmol/mol Hb)	59,4 (47,88 - 67,75)	37,2	79,7	↑ als GP (p* < 0,001), GPA (p* < 0,001) und SLE (p* = 0,002)
UrinTS Protein (g/l)	0,1 (0,05 - 0,75)	0,05	1,5	↑ als GP (p* < 0,001)
cf-DNA_hPI (ng/ml)	82,5 (59,3 - 119,23)	21,8	171,3	↓ als GPA (p* < 0,001) und SLE (p* < 0,001)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	368,65 (315,13 - 439,78)	228,5	573,9	↓ als GPA (p* < 0,001)
sCD163 (ng/ml)	1,643 (1,343 - 2,481)	1,189	3,367	keine

Für die Berechnung der Proteinurie im Teststreifen (UrinTS Protein) wurden wegen einer fehlenden Bestimmung nur 9 von 10 Probanden mit einem Diabetes mellitus Typ 2 der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus - Gruppe berücksichtigt. Im Kruskal-Wallis-Test konnte im Vergleich zu den anderen Studiengruppen zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses für folgende Parameter ein Unterschied detektiert werden: HbA1c (%) (p = 0,002), HbA1c (mmol/mol Hb) (p = 0,002), UrinTS Protein (p = 0,003), cf-DNA_hPI (p < 0,001), cf-DNA_bTh (p < 0,001), sCD163 (p = 0,003). Die jeweiligen signifikant unterschiedlichen Einzelgruppenvergleiche zur Subpopulation Diabetes mellitus Typ 2 (D.m. Typ 2) im Mann-Whitney-U-Test sind mit Angabe der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit (nach α -Adjustierung ist ein Signifikanzniveau von p* < 0,005 gefordert) in der rechten Spalte der Tabelle aufgeführt. (Qu.: Quartil; Min: Minimum; Max: Maximum; UrinTS Protein: Protein im Urinteststreifen; GP: gesunde Probanden; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; SLE: systemischer Lupus erythematodes)

Tabelle 12.6 – ausgewählte Korrelationsanalysen der Subpopulation Diabetes mellitus Typ 2

Parameter	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
cf-DNA_hPI (ng/ml)	-	1,000 (<0,010)	0,200 (0,580)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	1,000 (<0,010)	-	0,200 (0,580)
sCD163 (ng/ml)	0,200 (0,580)	0,200 (0,580)	-
HbA1c (%)	-0,432 (0,213)	-0,432 (0,213)	0,340 (0,336)
HbA1c (mmol/mol Hb)	-0,406 (0,244)	-0,406 (0,244)	-0,406 (0,244)
Creatinin (μ mol/l)	0,503 (0,138)	0,503 (0,138)	-0,455 (0,187)
Harnstoff (mmol/l)	0,758 (0,011)	0,758 (0,011)	0,248 (0,489)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	-0,661 (0,038)	-0,661 (0,038)	0,261 (0,467)
Urin-Protein 24h-SU (mg/d)	0,018 (0,960)	0,018 (0,960)	-0,333 (0,347)
UrinTS Protein (g/l)	0,085 (0,828)	0,085 (0,828)	-0,136 (0,727)

Für die Korrelationsberechnung der Proteinurie im Teststreifen (UrinTS Protein) wurden wegen einer fehlenden Bestimmung nur 9 von 10 Probanden mit einem Diabetes mellitus Typ 2 der Arteriellen Hypertonie +/- Diabetes mellitus - Gruppe berücksichtigt. Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p. Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

(Urin-Protein 24h-SU: Protein im 24 Stunden Sammelurin; UrinTS Protein: Protein im Urinteststreifen)

12.2.3 Symptommanifestationen

Tabelle 12.7 – Häufigkeitsverteilung der Symptommanifestation ausgewählter Organsysteme

	Gesamt	GP	AH+/-DM	SLE	GPA	MPA	p (χ^2)
Gewichtsverlust *	13 (16,5%)	-	5 (33,3%, 38,5%)	2 (9,1%, 15,4%)	5 (25%, 38,5%)	1 (20%, 7,7%)	0,031
Nachtschweiß *	11 (13,9%)	-	-	6 (27,3%, 54,5%)	5 (25%, 45,5%)	-	0,004
Fieber	5 (6,3%)	-	-	3 (13,6%, 60%)	2 (10%, 40%)	-	0,150
Abgeschlagenheit *	30 (38,0%)	1 (5,9%, 3,3%)	-	15 (68,2%, 50%)	11 (55%, 36,7%)	3 (60%, 10%)	< 0,001
Kopfschmerzen *	18 (22,8%)	2 (11,8%, 11,1%)	-	10 (45,5%, 55,6%)	5 (25%, 27,8%)	1 (20%, 5,6%)	0,005
Rhinitis *	16 (20,3%)	1 (5,9%, 6,3%)	-	7 (31,8%, 43,8%)	7 (35%, 43,8%)	1 (20%, 6,3%)	0,009
Epistaxis *	9 (11,4%)	-	-	-	9 (45%, 100%)	-	< 0,001
Borken *	7 (8,9%)	-	-	-	7 (35%, 100%)	-	< 0,001
Husten *	23 (29,1%)	2 (11,8%, 8,7%)	-	9 (40,9%, 39,1%)	10 (50%, 43,5%)	2 (40%, 8,7%)	< 0,001
Hämoptysen	3 (3,8%)	-	-	-	3 (15%, 100%)	-	0,072
Dyspnoe	15 (19,0%)	-	4 (26,7%, 26,7%)	6 (27,3%, 40%)	4 (20%, 26,7%)	1 (20%, 6,7%)	0,072
Arthralgien *	30 (38,0%)	3 (17,6%, 10%)	3 (20%, 10%)	14 (63,6%, 46,7%)	9 (45%, 30%)	1 (20%, 3,3%)	0,013
Arthritiden *	7 (8,9%)	-	-	4 (18,2%, 57,1%)	3 (15%, 42,9%)	-	0,049
Myalgien *	19 (24,1%)	-	1 (6,7%, 5,3%)	11 (50%, 57,9%)	5 (25%, 26,3%)	2 (40%, 10,5%)	< 0,001
Myositiden	2 (2,5%)	-	-	1 (4,5%, 50%)	1 (5%, 50%)	-	0,631
Raynaud-Syndrom *	13 (16,5%)	-	1 (6,7%, 7,7%)	8 (36,4%, 61,5%)	3 (15%, 23,1%)	1 (20%, 7,7%)	0,014
Sicca-Symptomatik	4 (5,1%)	-	1 (6,7%, 25%)	1 (4,5%, 25%)	1 (5%, 25%)	1 (20%, 25%)	0,520
Ödeme	9 (11,4%)	1 (5,9%, 11,1%)	2 (13,3%, 22,2%)	1 (4,5%, 11,1%)	4 (20%, 44,4%)	1 (20%, 11,1%)	0,479
Nierenlagerklopfeschmerz	5 (6,3%)	-	-	2 (9,1%, 40%)	2 (10%, 40%)	1 (20%, 20%)	0,209
akuter Harnwegsinfekt	5 (6,3%)	1 (5,9%, 20%)	1 (6,7%, 20%)	1 (4,5%, 20%)	2 (10%, 40%)	-	0,881
Pollakisurie	9 (11,4%)	1 (5,9%, 11,1%)	-	5 (22,7%, 55,6%)	2 (10%, 22,2%)	1 (20%, 11,1%)	0,145
Dysurie	4 (5,1%)	1 (5,9%, 25%)	-	1 (4,5%, 25%)	2 (10%, 50%)	-	0,572
Makrohämaturie	5 (6,3%)	1 (5,9%, 20%)	1 (6,7%, 20%)	-	2 (10%, 40%)	1 (20%, 20%)	0,365

Neben der absoluten Anzahl erfolgt in Klammern zunächst die Angabe der prozentualen Häufigkeit des Auftretens in der jeweiligen Studiengruppe. Die zweite prozentuale Angabe bezieht sich auf den Anteil, der in der gesamten Studienpopulation von dem Symptom betroffenen Personen. Bei den mit einem „*“ markierten Symptomen konnte im Chi-Quadrat-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen nachgewiesen werden. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Chi-Quadrat-Test (χ^2).

12.2.4 Studienparameter

Tabelle 12.8 – statistische Kennwerte der Studienparameter cf-DNA/NETs_hPI, cf-DNA/NETs_bTh und sCD163

	cf-DNA/NETs_hPI (ng/ml)			cf-DNA/NETs_bTh (ng/ml)			sCD163 (ng/ml)			
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
SP	143,8 (94,9 - 232,6)			449,7 (352,3 - 573,9)			1,668 (1,189 - 2,477)			SP
GP	105,6 (88,35 - 141,95)	45,8	206,4	364,5 (323,95 - 449,90)	223,9	601,4	1,164 (0,944 - 1,498)	0,83	1,981	GP
AH+/-DM	91,7 (63,1 - 139,2)	21,8	193,6	369,1(298,40 - 425,10)	228,5	573,9	1,617 (1,282 - 2,534)	0,977	3,367	AH+/-DM
SLE	214 (149,93 - 269,33)	76,1	374,9	484,4 (363,50 - 607,48)	176,4	891,5	2,153 (1,647 - 3,086)	0,986	3,553	SLE
GPA	235,85 (142,83 - 335,15)	63	480,6	697,95 (503,08 - 913,3)	327,3	1342,7	2,127 (1,071 - 2,816)	0,446	4,509	GPA
MPA	142,7 (100,7 - 213,1)	84,4	214,2	513,3 (314,5 - 571,4)	277,3	573,9	1,601 (0,923 - 3,186)	0,496	4,697	MPA

Qu.: Quartil; Min: Minimum; Max: Maximum; SP: gesamte Studienpopulation; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematoses; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis

12.2.5 Klinische Chemie

Tabelle 12.9 – statistische Kennwerte der Retentionsparameter, der eGFR (MDRD), des Proteins im Urinteststreifen sowie von HbA1c, 25-OH-Vitamin D und Parathormon

	Creatinin ($\mu\text{mol/l}$)			eGFR (MDRD) (ml/min/1,73m^2)			Harnstoff (mmol/l)			Protein im Urinteststreifen (g/l)			
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
SP	87,0 (73,0 - 150,0)			64,2 (33,0 - 79,8)			6,49 (4,95 - 10,9)			0,05 (0,00 - 0,30)			SP
GP	78,0 (71,0 - 87,0)	65	111	77,4 (67,5 - 83,7)	60	123,6	4,73 (3,29 - 5,51)	2,41	7	0,00 (0,00 - 0,00)	0	0,3	GP
AH+/-DM	139,0 (93,1 - 183,0)	58,4	575	38,4 (27,6 - 61,2)	9	97,8	9,86 (6,25 - 17,20)	3,54	29,1	0,10 (0,05 - 0,275)	0,05	1,5	AH+/-DM
SLE	75,0 (68,3 - 86,25)	47,9	137	77,4 (70,05 - 99,75)	43,2	141,6	5,80 (3,76 - 7,60)	1,86	12,4	0,25 (0,00 - 0,813)	0	5	SLE
GPA	143,5 (86,68 - 247,25)	47	513	46,8 (18,0 - 70,8)	10,8	120,6	8,75 (6,80 - 17,75)	4,99	24,2	0,075 (0,00 - 0,45)	0	1	GPA
MPA	265,0 (160,5 - 745,0)	137	1010	16,8 (7,5 - 30,3)	4,2	36	14,20 (11,85 - 19,40)	11,5	24,6	0,275 (0,25 - 0,30)	0,25	0,3	MPA

	HbA1c (%)			HbA1c (mmol/mol Hb)			25-OH-Vitamin D (nmol/l)			Parathormon (pg/ml)			
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
SP	5,65 (5,4 - 6,1)			38,5 (36,0 - 43,05)			38,3 (29,5 - 57,5)			53,91 (38,11 - 81,75)			SP
GP	5,5 (5,25 - 5,65)	4,8	6,9	36,7 (33,8 - 38,65)	28,9	51,7	37,0 (28,6 - 53,6)	23,6	91,2	49,2 (39,4 - 63,1)	18,3	121	GP
AH+/-DM	6,9 (5,6 - 8,0)	5,1	9,4	51,7 (37,2 - 64,1)	31,8	79,7	31,5 (29,6 - 42,9)	12,8	70,1	75,45 (48,05 - 102,25)	13,4	246	AH+/-DM
SLE	5,8 (5,4 - 6,1)	5,1	8,8	39,9 (36,0 - 43,2)	32,2	73	37,4 (22,95 - 58,55)	10	88,2	41,97 (26,03 - 54,93)	14,1	90,64	SLE
GPA	5,7 (5,4 - 5,9)	4,8	6,5	39,0 (36,0 - 41,0)	29	48	41,4 (33,4 - 55,05)	10	88,7	59,25 (42,65 - 84,35)	21,7	282	GPA
MPA	5,9 (5,3 - 6,0)	5,3	6,1	41,0 (34,25 - 42,15)	34	43	96,75 (38,3 - 113,5)	23,9	114	208,0 (52,25 - 470,11)	13	691,22	MPA

Bei den Berechnungen für die Proteinurie im Teststreifen wurden nur 77 von 79 Probanden berücksichtigt, da bei 1 AH+/-DM- bzw. 1 MPA-Patienten keine Werte vorlagen [17 GP, 14 AH+/-DM, 22 SLE, 20 GPA, 4 MPA]. Bei den Berechnungen für den Harnstoff und den HbA1c wurden nur 74 von 79 Probanden berücksichtigt, da bei 3 SLE- bzw. 2 GPA-Patienten keine Werte vorlagen [17 GP, 15 AH+/-DM, 19 SLE, 18 GPA, 5 MPA]. Bei den Berechnungen für das 25-OH-Vitamin D wurden nur 71 von 79 Probanden berücksichtigt, da bei 5 SLE-, 2 GPA- und 1 MPA-Patienten keine Werte vorlagen [17 GP, 15 AH+/-DM, 17 SLE, 18 GPA, 4 MPA]. Bei den Berechnungen für das PTH wurden nur 73 von 79 Probanden berücksichtigt, da bei 1 AH+/-DM-, 2 SLE- und 3 GPA-Patienten keine Werte vorlagen [17 GP, 14 AH+/-DM, 20 SLE, 17 GPA, 5 MPA].

(Qu.: Quartil; Min: Minimum; Max: Maximum; SP: gesamte Studienpopulation; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematoses; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis)

	Erythrozyten (10E12/l)			Hämoglobin (mmol/l)			Hämatokrit (l/l)			Thrombozyten (10E9/l)			SP
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
SP	4,5 (4,07 - 4,75)			8,3 (7,3 - 9,0)			0,4 (0,36 - 0,43)			251 (200 - 305)			
GP	4,78 (4,69 - 5,115)			9,0 (8,60 - 9,57)			0,44 (0,42 - 0,46)			240 (214,5 - 282,0)			GP
AH+/-DM	4,49 (4,30 - 4,64)			8,3 (7,60 - 8,90)			0,40 (0,38 - 0,41)			255 (192,0 - 311,0)			AH+/-DM
SLE	4,39 (4,008 - 4,695)			7,75 (6,78 - 8,83)			0,38 (0,34 - 0,42)			228 (157,0 - 337,3)			SLE
GPA	4,34 (3,88 - 4,63)			8,05 (6,85 - 9,2)			0,39 (0,34 - 0,45)			263 (197,0 - 365,5)			GPA
MPA	3,77 (3,265 - 4,305)			7,0 (5,90 - 8,05)			0,36 (0,3 - 0,4)			243 (208,5 - 365,0)			MPA

	Leukozyten (10E9/l)			Neutrophile relativ (%)			Neutrophile abs. (10E9/l)			Lymphozyten relativ (%)			SP
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
SP	6,57 (5,3 - 9,9)			68,1 (58,45 - 78,75)			4,322 (3,056 - 7,102)			20,8 (12,8 - 31,1)			
GP	5,70 (4,55 - 6,35)			56,0 (49,5 - 63,0)			2,912 (2,580 - 3,677)			36,0 (30,0 - 40,5)			GP
AH+/-DM	7,08 (5,43 - 10,60)			61,1 (52,7 - 68,1)			4,656 (2,636 - 6,017)			25,4 (20,8 - 33,6)			AH+/-DM
SLE	6,555 (4,968 - 9,975)			77,15 (69,93 - 81,85)			5,265 (3,690 - 8,203)			14,35 (9,5 - 18,95)			SLE
GPA	8,785 (5,963 - 14,315)			77,2 (68,5 - 85,98)			6,352 (4,399 - 11,826)			13,5 (7,9 - 19,55)			GPA
MPA	8,08 (4,545 - 9,235)			62,0 (47,65 - 76,15)			4,105 (2,530 - 7,008)			28,5 (11,6 - 35,35)			MPA

	Lymphozyten abs. (10E9/l)			Monozyten relativ (%)			Monozyten abs. (10E9/l)			Eosinophile relativ (%)			SP
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
SP	1,3997 (1,022 - 2,067)			7,1 (5,3 - 9,1)			0,528 (0,38 - 0,672)			1,4 (0,3 - 2,85)			
GP	1,86 (1,388 - 2,321)			6,0 (5,0 - 8,5)			0,414 (0,277 - 0,462)			1,0 (0 - 3,0)			GP
AH+/-DM	1,855 (1,430 - 3,079)			8,3 (6,1 - 9,3)			0,590 (0,421 - 0,731)			3,3 (1,8 - 4,4)			AH+/-DM
SLE	1,044 (0,728 - 1,298)			6,75 (5,03 - 8,68)			0,529 (0,325 - 0,639)			1,0 (0,33 - 1,6)			SLE
GPA	1,168 (0,695 - 1,436)			7,1 (4,7 - 9,45)			0,571 (0,449 - 0,915)			0,85 (0,13 - 2,3)			GPA
MPA	1,724 (0,901 - 2,021)			9,3 (5,5 - 10,9)			0,671 (0,300 - 0,847)			2,4 (1,3 - 7,9)			MPA

	Basophile relativ (%)			CRP (mg/l)		
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max
SP	0,2 (0 - 0,45)			3,0 (1,72 - 9,42)		
GP	0 (0 - 1)			1,68 (1,0 - 2,24)		
AH+/-DM	0,4 (0,2 - 0,5)			2,79 (2,21 - 6,32)		
SLE	0,2 (0 - 0,2)			3,25 (2,46 - 10,65)		
GPA	0,2 (0,1 - 0,4)			9,73 (3,0 - 57,73)		
MPA	1,0 (0,45 - 1,6)			3,1 (1,76 - 4,24)		

Tabelle 12.10 – statistische Kennwerte des Differentialblutbildes und des CRPs

Bei den Berechnungen der Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten relativ bzw. absolut sowie den Eosinophilen und Basophilen relativ wurden aufgrund nicht vorhandener Werte von 2 SLE-Patienten nur 77 von 79 Probanden berücksichtigt [17 GP, 15 AH+/-DM, 20 SLE, 20 GPA, 5 MPA].

(Qu.: Quartil; Min: Minimum; Max: Maximum; abs.: absolut; SP: gesamte Studienpopulation; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematoses; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis)

12.2.6 24 Stunden-Sammelurin

In die Berechnungen für den 24 Stunden-Sammelurin gingen nur Probanden der AH+/-DM-, GPA- und SLE-Gruppen ein. Für die gesunden Probanden wurde kein Urin gesammelt und in der MPA-Gruppe lagen nur die Werte von 3 Probanden vor.

Tabelle 12.11 – statistische Kennwerte der endogenen Creatinin-Clearance und des Ausmaßes der Proteinurie im 24 Stunden-Sammelurin

	endogene Creatinin-Clearance (ml/min/1,73m ²)			U-Protein-24-h-Sammelurin (mg/d)			
	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	Median (1. - 3. Qu.)	Min	Max	
AH+/-DM	51,6 (35,4 - 74,4)	13,2	140,4	181 (62 - 940)	38	3566	AH+/-DM
SLE	75,6 (64,8 - 110,1)	39	185,4	197 (97 - 986)	27	4316	SLE
GPA	66,6 (21,75 - 82,2)	2,4	117,6	701 (174,5 - 1056)	65	2539	GPA

Einen Überblick über die signifikanten Gruppenunterschiede für die endogene Creatinin-Clearance gibt Tabelle 12.12. Für die Proteinurie im 24-h-Sammelurin bestanden keine signifikanten Gruppenunterschiede ($p = 0,384$ im Kruskal-Wallis-Test).

Wegen fehlender Bestimmungen konnten nicht von allen Patienten der GPA- bzw. SLE-Gruppe die Werte in die Berechnungen einfließen:

→ endogene Creatinin-Clearance: AH+/-DM 15/15, SLE 17/22, GPA 16/20;

→ U-Protein-24-h-Sammelurin: AH+/-DM 15/15, SLE 19/22, GPA 17/20;

endCreaCl	AH+/-DM	GPA	SLE
AH+/-DM		0,861	0,007
GPA			0,041
SLE			

Tabelle 12.12 – Gruppenvergleiche der endogenen Creatinin-Clearance

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,022$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeiten) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) sind rot hervorgehoben.

Tabelle 12.13 – Berechnungen der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman für die endogene Creatinin-Clearance und dem Protein im 24 Stunden-Sammelurin

	AH+/-DM			SLE			GPA			
	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163	
endCreaCl	0,238 (0,394)	-0,052 (0,854)	-0,218 (0,435)	-0,066 (0,801)	-0,081 (0,758)	0,245 (0,343)	-0,418 (0,107)	-0,421 (0,105)	-0,556 (0,025)	endCreaCl
U-Protein24h	-0,82 (0,771)	0,064 (0,820)	-0,314 (0,254)	0,223 (0,359)	0,177 (0,468)	0,356 (0,135)	0,566 (0,018)	0,676 (0,003)	0,679 (0,003)	U-Protein24h

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

Abkürzungen: AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematoses; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; endCreaCl: endogene Creatinin-Clearance; U-Protein24h: Protein im 24 Stunden-Sammelurin; cf-DNA_hPI: cf-DNA/NETs humane Plazenta; cf-DNA_bTh: cf-DNA/NETs boviner Thymus; sCD163: soluble Cluster of Differentiation 163;

12.2.7 Genese der Nierenerkrankungen

Tabelle 12.14 – Zusammenfassung der Genese der Nierenerkrankungen

	GP	AH+/-DM	SLE	GPA	MPA
keine Nierenerkrankung bekannt (1)	17 (100%)	-	10 (45,5%)	1 (5%)	-
benigne NS	-	3 (20%)	-	-	-
benigne NS + diab. NP	-	7 (46,7%)	1 (4,5%)	-	1 (20%)*
benigne NS + chron. PN	-	2 (13,3%)	-	-	-
benigne NS + diab. NP + chron. PN	-	3 (20%)	-	-	-
renale Beteiligung der GK (keine Histo)	-	-	2 (9,1%)	5 (25%)	-
Lupusnephritis ISN-Klasse I	-	-	1 (4,5%)	-	-
Lupusnephritis ISN-Klasse II	-	-	1 (4,5%)	-	-
Lupusnephritis ISN-Klasse III	-	-	2 (9,1%)	-	-
Lupusnephritis ISN-Klasse IV	-	-	4 (18,2%)	-	-
Lupusnephritis ISN-Klasse V	-	-	1 (4,5%)	-	-
RPGN – sklerotisch	-	-	-	2 (10%)	2 (40%)
RPGN – fokal	-	-	-	1 (5%)	-
RPGN – > 50% Halbmonde	-	-	-	2 (10%)	-
RPGN – gemischt	-	-	-	3 (15%)	-
Z.n. RPGN (2)	-	-	-	5 (25%)	2 (40%)
Z.n. IgA-Nephropathie	-	-	-	1 (5%)	-

„(1)“ bei den Patienten mit einer Autoimmunerkrankung liegt keine renale Manifestation der Grunderkrankung vor

„(2)“ aktuell nur noch geringe renale Aktivität DD chronische Schädigung

„*“ zusätzlich zur benignen Nephrosklerose und diabetischen Nephropathie wird auch eine Beteiligung der Vaskulitis als Ursache der chronischen Niereninsuffizienz angenommen

(benigne NS: benigne Nephrosklerose; diab. NP: diabetische Nephropathie; chron. PN: chronische Pyelonephritis; ISN-Klasse: Klassifikation nach der International Society of Nephrology; RPGN: rapid-progressive-Glomerulonephritis; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematodes; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis)

12.2.8 Art der Nierenfunktionseinschränkung

Tabelle 12.15 – Überblick über die Art der Nierenfunktionseinschränkung

	GP (n = 17)	AH+/-DM (n = 15)	SLE (n = 22)	GPA (n = 20)	MPA (n = 5)
keine Nierenerkrankung	17 (100%)	-	10 (45,5%)	1 (5%)	-
Stadium 1 chron. NI (eGFR ≥ 90 ml/min/1,73 m ²)	-	1 (6,7%)	3 (13,6%)	1 (5%)	-
Stadium 2 chron. NI (eGFR 60 - 89 ml/min/1,73 m ²)	-	3 (20%)	5 (22,7%)	3 (15%)	-
Stadium 3 chron. NI (eGFR 30 - 59 ml/min/1,73 m ²)	-	6 (40%)	2 (9,1%)	4 (20%)	1 (20%)
Stadium 4 chron. NI (eGFR 15 - 29 ml/min/1,73 m ²)	-	4 (26,7%)	-	5 (25%)	2 (40%)
Stadium 5 chron. NI (eGFR < 15 ml/min/1,73 m ²)	-	1 (6,7%)	-	-	2 (40%)
akute Niereninsuffizienz	-	-	2 (9,1%)	4 (20%)	-
nephritisches Sediment ohne Erhöhung der Retentionsparameter	-	-	-	2 (10%)	-

chron. NI: chronische Niereninsuffizienz; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematodes; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis

12.2.9 Urindiagnostik (Teststreifen und Sediment)

Tabelle 12.16 – Häufigkeitsverteilung des Auftretens unterschiedlicher Schweregrade einer Leukozyturie bzw. Erythrozyturie im Urinteststreifen

	GP	AH+/-DM	SLE	GPA	MPA
Leukozyten im Teststreifen (1/µl, NB: < 25):					
	n = 17	n = 14	n = 14	n = 14	n = 2
negativ	9 (52,9%, 45%)	-	7 (50%, 35%)	4 (28,6%, 20%)	-
≤ 25	5 (29,4%, 19,2%)	11 (78,6%, 42,3%)	4 (28,6%, 15,4%)	5 (35,7%, 19,2%)	1 (50%, 3,8%)
≤ 75	1 (5,9%, 20%)	-	-	3 (21,4%, 60%)	1 (50%, 20%)
≤ 100	1 (5,9%, 100%)	-	-	-	-
≤ 250	1 (5,9%, 16,7%)	1 (7,1%, 16,7%)	3 (21,4%, 50%)	1 (7,1%, 16,7%)	-
≤ 500	-	2 (14,3%, 66,7%)	-	1 (7,1%, 33,3%)	-
> 500	-	-	-	-	-
Erythrozyten im Teststreifen (1/µl, NB: < 10):					
	n = 17	n = 14	n = 14	n = 14	n = 2
negativ	15 (88,2%, 57,7%)	-	7 (50%, 26,9%)	4 (28,6%, 15,4%)	-
≤ 25	1 (5,9%, 4,0%)	13 (92,9%, 52%)	6 (42,9%, 24%)	4 (28,6%, 16%)	1 (50%, 4,0%)
≤ 50	-	-	-	1 (7,1%, 100%)	-
≤ 150	-	1 (7,1%, 100%)	-	-	-
≤ 250	-	-	1 (7,1%, 50%)	1 (7,1%, 50%)	-
> 250	1 (5,9%, 16,7%)	-	-	4 (28,6%, 66,7%)	1 (50%, 16,7%)

Aufgrund nicht vorhandener Werte konnten sowohl für die Berechnungen der Leukozyten als auch der Erythrozyten im Urinteststreifen nur 61 von 79 Probanden berücksichtigt werden. Es fehlen jeweils die Werte von 1 AH+/-DM-, 8 SLE-, 6 GPA- und 3 MPA-Patienten [17 GP, 14 AH+/-DM, 14 SLE, 14 GPA, 2 MPA].

(GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematoses; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis)

Tabelle 12.17 – Häufigkeitsverteilung des Auftretens unterschiedlicher Schweregrade einer Leukozyturie bzw. Erythrozyturie im Urinsediment

	GP	AH+/-DM	SLE	GPA	MPA
Leukozyten im Urinsediment (1/GF, NB: < 4/GF):					
	n = 17	n = 15	n = 17	n = 16	n = 4
0	9 (52,9%, 34,6%)	4 (26,7%, 15,4%)	8 (47,1%, 30,8%)	4 (25%, 15,4%)	1 (25%, 3,8%)
1 - 5	4 (23,5%, 21,1%)	7 (46,7%, 36,8%)	1 (5,9%, 5,3%)	5 (31,3%, 26,3%)	2 (50%, 10,5%)
6 - 10	1 (5,9%, 25%)	-	1 (5,9%, 25%)	1 (6,3%, 25%)	1 (25%, 25%)
> 10	2 (11,8%, 18,2%)	1 (6,7%, 9,1%)	3 (17,6%, 27,3%)	5 (31,3%, 45,5%)	-
> 50	-	1 (6,7%, 33,3%)	2 (11,8%, 66,7%)	-	-
> 100	1 (5,9%, 25%)	2 (13,3%, 50%)	1 (5,9%, 25%)	-	-
> 500	-	-	1 (5,9%, 50%)	1 (6,3%, 50%)	-
Erythrozyten im Urinsediment (1/GF, NB: < 1/GF):					
	n = 17	n = 15	n = 17	n = 17	n = 4
0	15 (88,2%, 31,9%)	12 (80%, 25,5%)	12 (70,6%, 25,5%)	8 (47,1%, 17%)	-
1 - 5	-	3 (20%, 42,9%)	2 (11,8%, 28,6%)	1 (5,9%, 14,3%)	1 (25%, 14,3%)
6 - 10	1 (5,9%, 50%)	-	-	1 (5,9%, 50%)	-
> 10	-	-	3 (17,6%, 37,5%)	3 (17,6%, 37,5%)	2 (50%, 25%)
> 50	-	-	-	2 (11,8%, 100%)	-
> 100	-	-	-	2 (11,8%, 66,7%)	1 (25%, 33,3%)
> 500	1 (5,9%, 100%)	-	-	-	-

Aufgrund nicht vorhandener Werte konnten für die Berechnungen der Leukozyten im Urinsediment nur 69 von 79 Probanden berücksichtigt werden. Es fehlen die Werte von 5 SLE-, 4 GPA- und 1 MPA-Patienten [17 GP, 15 AH+/-DM, 17 SLE, 16 GPA, 4 MPA]. Für die Berechnungen der Erythrozyturie im Urinsediment konnten wegen fehlender Bestimmungen von 5 SLE-, 3 GPA- und 1 MPA-Patienten nur 70 von 79 Probanden berücksichtigt werden [17 GP, 15 AH+/-DM, 17 SLE, 17 GPA, 4 MPA].

(GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus; SLE: systemischer Lupus erythematodes; GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis)

12.2.10 ROC - Analysen bei Vorliegen einer renalen Beteiligung der GPA

In den folgenden Receiver-Operating-Characteristics (ROC) - Analysen wurden 18 der 20 GPA-Patienten einbezogen. Eine GPA-Patientin hatte keine renale Manifestation der Grunderkrankung, bei einer weiteren GPA-Patientin war vor Jahren eine IgA-Nephropathie bioptisch gesichert worden. Die Kriterien für die pathologische Proteinurie (> 200 mg/d) und Hämaturie (≥ 10 Erythrozyten/GF und Nachweis von dysmorphen Erythrozyten) sind entsprechend des BVAS festgelegt worden.

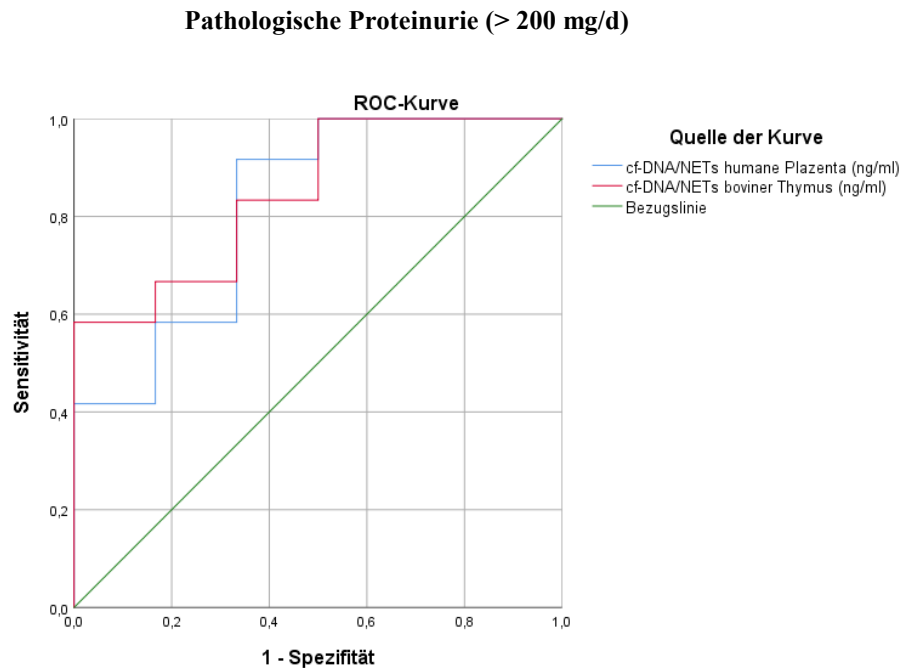


Abbildung 12.2 – ROC-Analyse pathologische Proteinurie in Bezug auf die cf-DNA/NETs

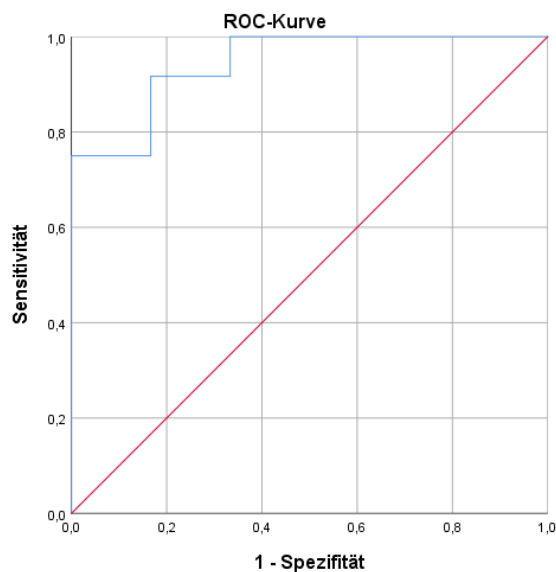


Abbildung 12.3 – ROC-Analyse pathologische Proteinurie in Bezug auf den sCD163

Tabelle 12.18 – Schwellenwerte (cut off) der Studienparameter im Hinblick auf das Auftreten einer pathologischen Proteinurie

Studienparameter	cut off (ng/ml)	Sensitivität	Spezifität
cf-DNA_hPI	163,9	0,917	0,667
cf-DNA_bTh	748,1	0,583	1,000
sCD163	1,753	0,917	0,833
	2,329	0,750	1,000

Im Falle des sCD163 konnten bei der Berechnung des maximalen Youden-Index zwei cut-off-Werte ermittelt werden. Für die klinische Praxis ist der cut-off-Wert von 1,753 ng/ml eher geeignet.

Tabelle 12.19 – Area Under the Curve (AUC) - Berechnungen der Studienparameter für das Auftreten einer pathologischen Proteinurie

Studienparameter	Fläche (AUC)	Standardfehler	asympt. Signifikanz	asympt. 95% Konfidenzintervall (Untergrenze / Obergrenze)
cf-DNA_hPI	0,819	0,111	0,031	0,601 / 1,000
cf-DNA_bTh	0,847	0,094	0,019	0,662 / 1,000
sCD163	0,944	0,053	0,003	0,841 / 1,000

Pathologische Hämaturie

(≥ 10 Erythrozyten/GF und Nachweis von dysomorphen Erythrozyten in der Phasenkontrastmikroskopie)

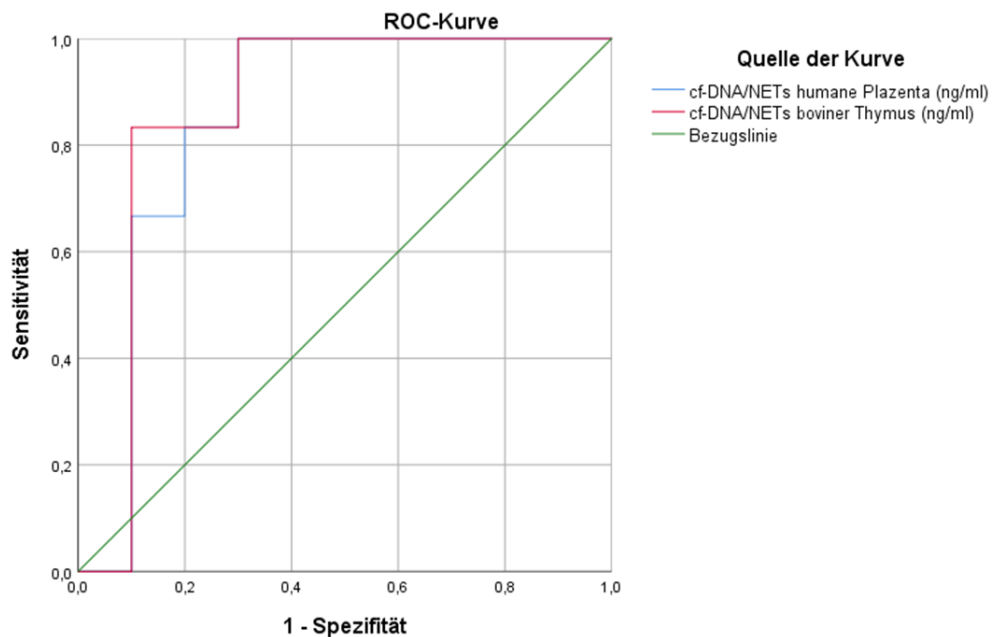


Abbildung 12.4 – ROC-Analyse pathologische Hämaturie in Bezug auf die cf-DNA/NETs

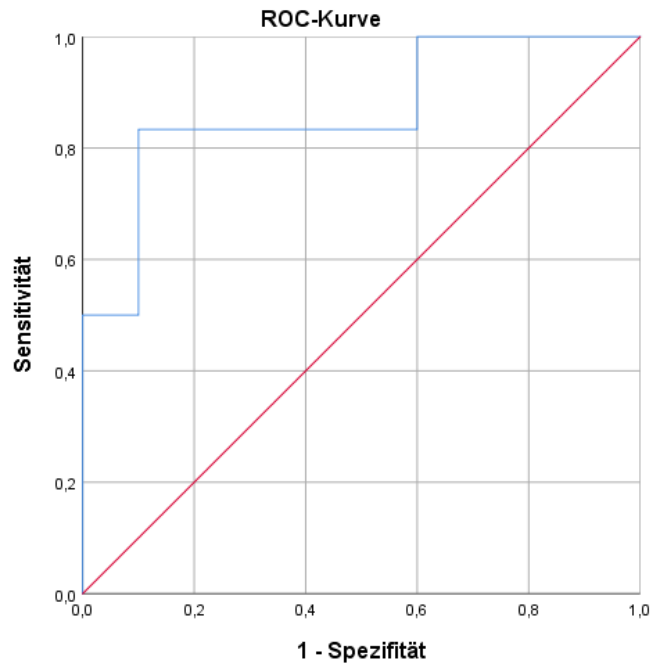


Abbildung 12.5 – ROC-Analyse pathologische Hämaturie in Bezug auf den sCD163

Tabelle 12.20 – Schwellenwerte (cut off) der Studienparameter im Hinblick auf das Auftreten einer pathologischen Hämaturie

Studienparameter	cut off (ng/ml)	Sensitivität	Spezifität
cf-DNA_hPI	227,6	1,000	0,700
cf-DNA_bTh	762,6	0,833	0,900
sCD163	2,505	0,833	0,900

Tabelle 12.21 – Area Under the Curve (AUC) - Berechnungen der Studienparameter für das Auftreten einer pathologischen Hämaturie

Studienparameter	Fläche (AUC)	Standardfehler	asympt. Signifikanz	asympt. 95% Konfidenzintervall (Untergrenze / Obergrenze)
cf-DNA_hPI	0,850	0,103	0,023	0,648 / 1,000
cf-DNA_bTh	0,867	0,100	0,017	0,670 / 1,000
sCD163	0,867	0,103	0,017	0,666 / 1,000

Kombination pathologische Proteinurie und Hämaturie

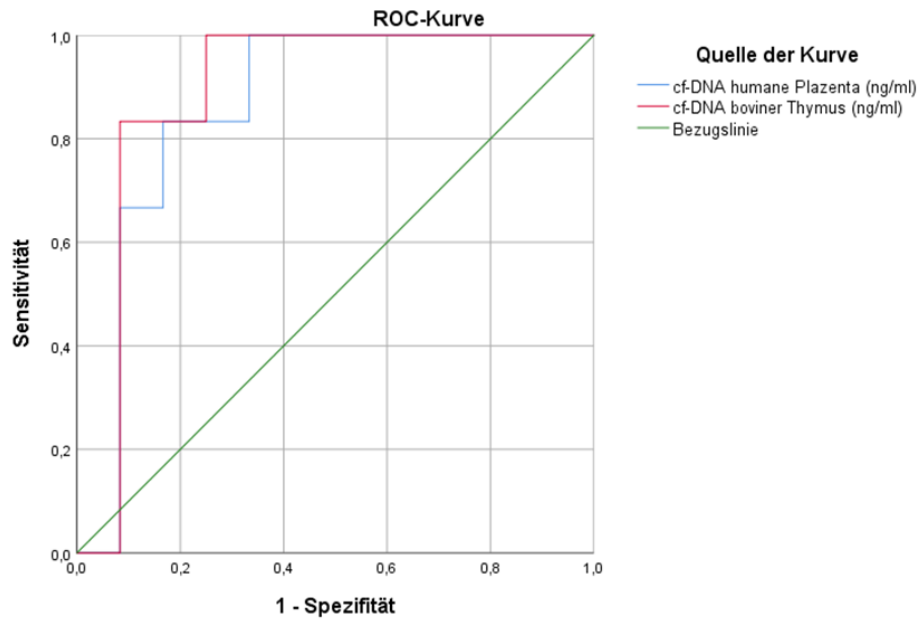


Abbildung 12.6 – ROC-Analyse pathologische Protein- und Hämaturie in Bezug auf die cf-DNA/NETs

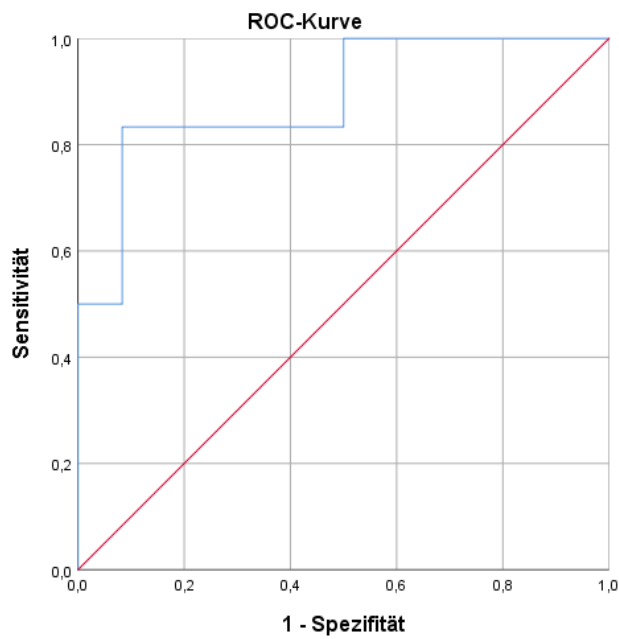


Abbildung 12.7 – ROC-Analyse pathologische Protein- und Hämaturie in Bezug auf den sCD163

Tabelle 12.22 – Schwellenwerte (cut off) der Studienparameter im Hinblick auf das kombinierte Auftreten einer pathologischen Protein- und Hämaturie

Studienparameter	cut off (ng/ml)	Sensitivität	Spezifität
cf-DNA_hPI	227,60	1,000	0,667
	245,05	0,833	0,833
cf-DNA_bTh	717,15	1,000	0,750
	762,60	0,833	0,917
sCD163	2,505	0,833	0,917

Im Falle der beiden cf-DNAs konnten bei der Berechnung des maximalen Youden-Index zwei cut-off-Werte ermittelt werden. Für die klinische Praxis ist der cut-off-Wert von 245,05 ng/ml für die cf-DNA_hPI bzw. 762,60 ng/ml für die cf-DNA_bTh eher geeignet.

Tabelle 12.23 – Area Under the Curve (AUC) - Berechnungen der Studienparameter für das kombinierte Auftreten einer pathologischen Protein- und Hämaturie

Studienparameter	Fläche (AUC)	Standardfehler	asympt. Signifikanz	asympt. 95% Konfidenzintervall (Untergrenze / Obergrenze)
cf-DNA_hPI	0,861	0,091	0,015	0,682 / 1,000
cf-DNA_bTh	0,889	0,085	0,009	0,722 / 1,000
sCD163	0,889	0,087	0,009	0,718 / 1,000

12.2.11 Differenzierung der SLE-Patienten entsprechend des Vorliegens einer Lupusnephritis

Tabelle 12.24 – Vergleich SLE Patienten ohne bzw. mit einer Lupusnephritis

Parameter	SLE_keine LN	Min	Max	SLE_LN	Min	Max	p (MWU)
Creatinin (µmol/l)	74,0 (64,0 - 81,0)	57,0	137,0	80,0 (69,4 - 87,0)	47,9	114,0	0,478
eGFR (ml/min/1,73m ²)	79,2 (69,6 - 99,0)	46,8	123,6	75,6 (72,6 - 102,0)	43,2	141,6	0,748
Harnstoff (mmol/l)	5,8 (4,2 - 8,2)	3,3	12,4	5,88 (3,51 - 6,47)	1,86	9,50	0,549
endCreaCl (ml/min/1,73m ²)	66,6 (61,8 - 87,0)	39,0	121,2	88,2 (68,1 - 121,35)	46,8	185,4	0,230
U-Protein 24h-SU (mg/d)	166,0 (58,75 - 227,5)	27	352	590,0 (143,0 - 2421,0)	82	4316	0,041
UT-Protein (g/l)	0,0 (0,0 - 0,25)	0,0	0,25	0,75 (0,25 - 1,5)	0,05	5,0	< 0,001
C3 (mg/l)	943 (893,25 - 1042,5)	490	1090	870 (750 - 1040)	450	1580	0,468
C4 (mg/l)	120 (79 - 178,5)	23	250	123 (61 - 183)	50	305	0,809
ANA (Titer)	1:10 ³ (1:320 - 1:3200)	1:100	1:32000	1:3200(1:10 ³ - 1:3200)	1:320	1:10 ⁴	0,243
SLEDAI-2K (Punkte)	4 (2 - 12)	0	16	8 (6 - 25)	4	33	0,116
ECLAM (Punkte)	3 (1 - 3)	1	5	3 (2 - 3)	1	9	0,652
cf-DNA_hPI (ng/ml)	233,3 (201,2 - 270,9)	76,1	323,1	168,6 (144,3 - 239,5)	90,0	374,9	0,300
cf-DNA_bTh (ng/ml)	515,6 (446,2 - 653,6)	176,4	709,3	388,0 (362,6 - 564,9)	239,6	891,5	0,365
sCD163 (ng/ml)	2,122 (1,377 - 3,118)	1,057	3,553	2,169 (1,773 - 2,929)	0,986	3,407	0,847

Die Hälfte der Patienten mit einem SLE hatte eine Lupusnephritis (LN), so dass jeder Gruppe jeweils 11 Patienten zugeordnet wurden. Das Ausmaß der Proteinurie war sowohl im 24-h-Sammelurin (U-Protein 24h-SU) als auch im Teststreifen (UT-Protein) bei den Patienten mit einer Lupusnephritis signifikant erhöht. Demgegenüber konnte weder für die Retentionsparameter, der eGFR berechnet nach der MDRD-Formel, der endogenen Creatinin-Clearance (endCreaCl), den Komplementfaktoren, der Aktivitätsscores noch den Studienparametern ein signifikanter Gruppenunterschied gesehen werden. Wegen nicht vorhandener Bestimmungen gingen für die folgenden Parameter nicht 11/11-Wertepaare in die Berechnungen ein: Harnstoff (HST) 9/10, endogene Creatinin-Clearance (endCreaCl) 7/10, Urin-Protein im 24-h-Sammelurin (U-Protein 24h-SU) 8/11, C3 10/11, C4 10/11.

(SLE_keine LN: Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes ohne Manifestation einer Lupusnephritis; SLE_LN: Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes und manifester Lupusnephritis; Angabe des Medians sowie in Klammern des 1. und 3. Quartils; Min: Minimum; Max: Maximum; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben dargestellt.)

Tabelle 12.25 – Leuko- und Erythrozyturie im Urinteststreifen in Abhängigkeit des Vorliegens einer Lupusnephritis

UT Leukozyten	negativ	≤ 25	≤ 75	≤ 100	≤ 250	≤ 500	k.A.	p (MWU)
SLE_keine LN	6 (54,5%)	-	-	-	-	-	5 (45,5%)	0,005
SLE_LN	1 (9,1%)	4 (36,4%)	-	-	3 (27,3%)	-	3 (27,3%)	
UT Erythrozyten	negativ	≤ 25	≤ 50	≤ 150	≤ 250	> 250	k.A.	p (MWU)
SLE_keine LN	6 (54,5%)	-	-	-	-	-	5 (45,5%)	0,005
SLE_LN	1 (9,1%)	6 (54,5%)	-	-	1 (9,1%)	-	3 (27,3%)	

SLE_keine LN: Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes ohne Manifestation einer Lupusnephritis; SLE_LN: Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes und manifester Lupusnephritis; k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Unterschiede sind hervorgehoben dargestellt.

Tabelle 12.26 – Leuko- und Erythrozyturie im Urinsediment in Abhängigkeit des Vorliegens einer Lupusnephritis

	0	1 – 5	6 - 10	> 10	> 50	> 100	> 500	k.A.	p (MWU)
Urinsediment Leukozyten									
SLE_keine LN	3 (27,3%)	1 (9,1%)	1 (9,1%)	-	-	-	1(9,1%)	5(45,5%)	0,660
SLE_LN	5 (45,5%)	-	-	3(27,3%)	2(18,2%)	1(9,1%)	-	-	
Urinsediment Erythrozyten									
SLE_keine LN	5 (45,5%)	-	-	1 (9,1%)	-	-	-	5(45,5%)	0,591
SLE_LN	7 (63,6%)	2(18,2%)	-	2(18,2%)	-	-	-	-	

SLE_keine LN: Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes ohne Manifestation einer Lupusnephritis; SLE_LN: Patienten mit einem systemischen Lupus erythematodes und manifester Lupusnephritis; k.A.: keine Angabe wegen fehlender Urindiagnostik möglich; p (MWU): Irrtumswahrscheinlichkeit p im Mann-Whitney-U-Test.

12.2.12 Korrelationsanalysen

12.2.12.1 Gesunde Probanden

Tabelle 12.27 – Korrelationsanalysen der gesunden Probanden (GP)

Parameter – GP	Anzahl	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
cf-DNA_hPI (ng/ml)	17	1,000 (-)	1,000 (<0,010)	0,088 (0,736)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	17	1,000 (<0,010)	1,000 (-)	0,088 (0,736)
sCD163 (ng/ml)	17	0,088 (0,736)	0,088 (0,736)	1,000 (-)
Alter (Jahre)	17	0,201 (0,439)	0,201 (0,439)	0,337 (0,185)
Körpergröße (cm)	17	-0,020 (0,940)	-0,020 (0,940)	0,142 (0,586)
Körpergewicht (kg)	17	0,163 (0,531)	0,163 (0,531)	0,290 (0,260)
BMI (kg/m ²)	17	0,229 (0,376)	0,229 (0,376)	0,300 (0,241)
RR-Systole (mmHg)	17	-0,108 (0,680)	-0,108 (0,680)	-0,487 (0,047)
RR-Diastole (mmHg)	17	0,104 (0,692)	0,104 (0,692)	-0,512 (0,036)
RR-Mitteldruck (mmHg)	17	0,056 (0,830)	0,056 (0,830)	-0,557 (0,020)
Erythrozyten (10E12/l)	17	0,395 (0,117)	0,395 (0,117)	0,071 (0,786)
Hb (mmol/l)	17	0,393 (0,118)	0,393 (0,118)	0,146 (0,575)
Hk (l/l)	17	0,458 (0,064)	0,458 (0,064)	0,121 (0,643)
Thrombozyten (10E9/l)	17	0,461 (0,063)	0,461 (0,063)	-0,069 (0,794)
Leukozyten (10E9/l)	17	-0,097 (0,711)	-0,097 (0,711)	-0,110 (0,673)
Neutrophile (%)	17	0,055 (0,833)	0,055 (0,833)	0,020 (0,940)
Neutrophile absolut (10E9/l)	17	0,066 (0,801)	0,066 (0,801)	-0,027 (0,918)
Lymphozyten (%)	17	0,055 (0,833)	0,055 (0,833)	-0,037 (0,888)
Lymphozyten absolut (10E9/l)	17	0,159 (0,541)	0,159 (0,541)	-0,142 (0,586)
Monozyten (%)	17	-0,187 (0,472)	-0,187 (0,472)	0,035 (0,895)
Monozyten absolut (10E9/l)	17	-0,199 (0,445)	-0,199 (0,445)	0,023 (0,929)
Eosinophile (%)	17	-0,268 (0,299)	-0,268 (0,299)	0,188 (0,471)
Basophile (%)	17	-0,021 (0,935)	-0,021 (0,935)	0,181 (0,487)
CRP (mg/l)	17	0,467 (0,058)	0,467 (0,058)	-0,005 (0,985)
Creatinin (μmol/l)	17	-0,289 (0,261)	-0,289 (0,261)	0,158 (0,544)
Harnstoff (mmol/l)	17	-0,064 (0,808)	-0,064 (0,808)	0,186 (0,474)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	17	0,170 (0,513)	0,170 (0,513)	-0,397 (0,114)
Urinteststreifen Leukozyten (1/μl)	17	-0,116 (0,658)	-0,116 (0,658)	0,180 (0,488)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/μl)	17	0,319 (0,211)	0,319 (0,211)	0,245 (0,343)
Urinteststreifen Protein (g/l)	17	0,149 (0,568)	0,149 (0,568)	0,037 (0,887)
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	17	-0,100 (0,702)	-0,100 (0,702)	0,179 (0,491)
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	17	0,319 (0,211)	0,319 (0,211)	0,245 (0,343)
25-OH-Vitamin D (nmol/l)	17	-0,113 (0,667)	-0,113 (0,667)	-0,088 (0,736)
PTH (pg/ml)	17	0,478 (0,052)	0,478 (0,052)	0,360 (0,155)
HbA1c (%)	17	0,126 (0,630)	0,126 (0,630)	0,240 (0,354)
HbA1c (mmol/mol Hb)	17	0,072 (0,783)	0,072 (0,783)	0,259 (0,316)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

12.2.12.2 Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus Typ 2

Tabelle 12.28 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz durch eine Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus Typ 2 (AH+/-DM)

Parameter – AH+/-DM	Anzahl	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
cf-DNA_hPI (ng/ml)	15	1,000 (-)	0,825 (<0,001)	0,096 (0,732)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	15	0,825 (<0,001)	1,000 (-)	0,321 (0,243)
sCD163 (ng/ml)	15	0,096 (0,732)	0,321 (0,243)	1,000 (-)
Alter (Jahre)	15	0,448 (0,094)	0,608 (0,016)	0,287 (0,300)
Körpergröße (cm)	15	-0,165 (0,556)	-0,104 (0,712)	-0,201 (0,472)
Körpergewicht (kg)	15	-0,486 (0,066)	-0,411 (0,128)	-0,114 (0,685)
BMI (kg/m ²)	15	-0,400 (0,140)	-0,318 (0,248)	0,079 (0,781)
RR-Systole (mmHg)	15	-0,641 (0,010)	-0,307 (0,266)	0,170 (0,545)
RR-Diastole (mmHg)	15	-0,507 (0,054)	-0,453 (0,090)	0,125 (0,656)
RR-Mitteldruck (mmHg)	15	-0,686 (0,005)	-0,424 (0,116)	0,188 (0,503)
Erythrozyten (10E12/l)	15	-0,007 (0,980)	-0,375 (0,168)	-0,282 (0,308)
Hb (mmol/l)	15	0,179 (0,523)	-0,147 (0,601)	-0,118 (0,675)
Hk (l/l)	15	0,090 (0,750)	-0,227 (0,416)	-0,086 (0,759)
Thrombozyten (10E9/l)	15	-0,386 (0,156)	-0,114 (0,685)	0,036 (0,899)
Leukozyten (10E9/l)	15	-0,261 (0,348)	0,086 (0,761)	0,096 (0,732)
Neutrophile (%)	15	-0,114 (0,685)	0,150 (0,594)	-0,068 (0,810)
Neutrophile absolut (10E9/l)	15	-0,343 (0,211)	0,057 (0,840)	0,121 (0,666)
Lymphozyten (%)	15	0,286 (0,302)	-0,018 (0,950)	-0,129 (0,648)
Lymphozyten absolut (10E9/l)	15	0,050 (0,860)	0,100 (0,723)	0,100 (0,723)
Monozyten (%)	15	-0,021 (0,939)	-0,029 (0,919)	0,374 (0,170)
Monozyten absolut (10E9/l)	15	-0,332 (0,226)	-0,071 (0,800)	0,396 (0,143)
Eosinophile (%)	15	-0,297 (0,282)	-0,412 (0,127)	0,220 (0,430)
Basophile (%)	15	-0,318 (0,248)	-0,354 (0,195)	-0,071 (0,802)
CRP (mg/l)	15	-0,066 (0,815)	0,247 (0,376)	0,231 (0,408)
Creatinin (μmol/l)	15	-0,032 (0,909)	0,318 (0,248)	-0,043 (0,879)
Harnstoff (mmol/l)	15	0,118 (0,676)	0,396 (0,143)	0,114 (0,685)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	15	-0,036 (0,899)	-0,361 (0,187)	0,075 (0,791)
Urintestsreifen Leukozyten (1/μl)	14	0,009 (0,975)	0,037 (0,901)	-0,055 (0,851)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/μl)	14	0,241 (0,407)	0,034 (0,907)	-0,378 (0,182)
Urinteststreifen Protein (g/l)	14	0,039 (0,894)	0,122 (0,678)	0,060 (0,839)
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	15	0,124 (0,660)	0,110 (0,695)	-0,040 (0,888)
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	15	0,077 (0,785)	0,039 (0,891)	-0,386 (0,156)
25-OH-Vitamin D (nmol/l)	15	0,204 (0,467)	0,032 (0,909)	-0,221 (0,428)
PTH (pg/ml)	14	0,200 (0,493)	0,486 (0,078)	-0,015 (0,958)
HbA1c (%)	15	-0,514 (0,050)	-0,193 (0,491)	0,187 (0,504)
HbA1c (mmol/mol Hb)	15	-0,490 (0,064)	-0,148 (0,598)	0,214 (0,443)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

12.2.12.3 Systemischer Lupus erythematoses

Tabelle 12.29 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einem systemischen Lupus erythematoses (SLE)

Parameter – SLE	Anzahl	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
cf-DNA_hPI (ng/ml)	22	1,000 (-)	0,990 (<0,001)	0,398 (0,067)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	22	0,990 (<0,001)	1,000 (-)	0,412 (0,057)
sCD163 (ng/ml)	22	0,398 (0,067)	0,412 (0,057)	1,000 (-)
Alter (Jahre)	22	-0,19 (0,932)	-0,053 (0,816)	-0,160 (0,476)
Körpergröße (cm)	22	0,057 (0,801)	0,035 (0,877)	-0,136 (0,547)
Körpergewicht (kg)	22	0,171 (0,446)	0,171 (0,446)	-0,188 (0,401)
BMI (kg/m ²)	22	0,282 (0,204)	0,292 (0,187)	-0,028 (0,903)
RR-Systole (mmHg)	22	0,442 (0,039)	0,415 (0,055)	0,091 (0,689)
RR-Diastole (mmHg)	22	0,384 (0,078)	0,342 (0,119)	-0,002 (0,994)
RR-Mitteldruck (mmHg)	22	0,465 (0,029)	0,428 (0,047)	0,032 (0,886)
Erythrozyten (10E12/l)	22	-0,270 (0,224)	-0,270 (0,224)	-0,232 (0,300)
Hb (mmol/l)	22	-0,421 (0,051)	-0,401 (0,064)	-0,348 (0,112)
Hk (l/l)	22	-0,393 (0,071)	-0,379 (0,082)	-0,303 (0,171)
Thrombozyten (10E9/l)	22	0,056 (0,803)	0,113 (0,617)	-0,232 (0,300)
Leukozyten (10E9/l)	22	0,140 (0,536)	0,170 (0,449)	-0,262 (0,240)
Neutrophile (%)	20	0,405 (0,077)	0,441 (0,052)	0,317 (0,173)
Neutrophile absolut (10E9/l)	20	0,208 (0,380)	0,251 (0,286)	-0,159 (0,502)
Lymphozyten (%)	20	-0,451 (0,046)	-0,479 (0,033)	-0,361 (0,118)
Lymphozyten absolut (10E9/l)	20	-0,463 (0,040)	-0,444 (0,050)	-0,589 (0,006)
Monozyten (%)	20	-0,281 (0,230)	-0,314 (0,178)	-0,047 (0,845)
Monozyten absolut (10E9/l)	20	-0,335 (0,148)	-0,304 (0,193)	-0,409 (0,073)
Eosinophile (%)	20	-0,349 (0,132)	-0,386 (0,092)	-0,100 (0,676)
Basophile (%)	20	-0,144 (0,546)	-0,215 (0,363)	0,123 (0,605)
CRP (mg/l)	22	0,337 (0,125)	0,352 (0,108)	0,101 (0,655)
Creatinin (µmol/l)	22	0,170 (0,450)	0,130 (0,563)	-0,224 (0,316)
Harnstoff (mmol/l)	19	0,047 (0,847)	0,002 (0,994)	0,021 (0,932)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	22	-0,193 (0,391)	-0,153 (0,497)	0,194 (0,388)
Urinteststreifen Leukozyten (1/µl)	14	0,072 (0,808)	0,115 (0,696)	0,053 (0,858)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/µl)	14	0,128 (0,663)	0,160 (0,585)	0,287 (0,319)
Urinteststreifen Protein (g/l)	22	0,063 (0,780)	0,069 (0,760)	0,260 (0,243)
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	17	0,227 (0,380)	0,325 (0,204)	-0,271 (0,292)
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	17	0,480 (0,051)	0,458 (0,064)	0,060 (0,820)
25-OH-Vitamin D (nmol/l)	17	-0,47 (0,859)	-0,020 (0,940)	-0,206 (0,428)
PTH (pg/ml)	20	0,018 (0,940)	-0,042 (0,860)	-0,057 (0,811)
HbA1c (%)	19	0,179 (0,463)	0,181 (0,458)	-0,147 (0,547)
HbA1c (mmol/mol Hb)	19	0,217 (0,372)	0,211 (0,386)	-0,109 (0,657)
ANA (Titer)	22	-0,042 (0,852)	-0,023 (0,921)	0,164 (0,466)
dsDNA - UNI (U/ml)	7	0,250 (0,589)	0,250 (0,589)	0,607 (0,148)
dsDNA - KSR (U/ml)	15	-0,034 (0,904)	-0,034 (0,904)	0,193 (0,491)
C3 (mg/l)	21	0,165 (0,475)	0,141 (0,542)	-0,075 (0,748)
C4 (mg/l)	21	-0,233 (0,309)	-0,256 (0,263)	-0,275 (0,227)
SLEDAI-2K (Punkte)	22	0,141 (0,530)	0,154 (0,494)	0,080 (0,725)
ECLAM (Punkte)	22	0,407 (0,060)	0,388 (0,074)	0,229 (0,306)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

Tabelle 12.30 – Korrelationen zwischen den Autoantikörpern und der Krankheitsaktivität der SLE-Patienten

Parameter – SLE	ANA (Titer)	dsDNA - UNI (U/ml)	dsDNA - KSR (U/ml)
SLEDAI-2K (Punkte)	0,709 (<0,001)	0,126 (0,788)	0,760 (0,001)
ECLAM (Punkte)	0,500 (0,018)	0,019 (0,968)	0,466 (0,080)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

Tabelle 12.31 – ausgewählte Korrelationsanalysen nach Differenzierung der systemischen Lupus erythematodes (SLE) - Patienten ohne bzw. mit Manifestation einer Lupusnephritis

Parameter	Anzahl	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
SLE-Patienten ohne renale Beteiligung der Grunderkrankung (n = 11)				
Creatinin (µmol/l)	11	0,109 (0,750)	0,109 (0,750)	-0,027 (0,937)
Harnstoff (mmol/l)	9	0,050 (0,898)	0,050 (0,898)	0,067 (0,865)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	11	-0,091 (0,790)	-0,091 (0,790)	0,018 (0,958)
endogene Creatinin-Clearance (ml/min/1,73 m ²)	7	0,464 (0,294)	0,464 (0,294)	0,607 (0,148)
U-Protein 24 h-Sammelurin (mg/d)	8	0,762 (0,028)	0,762 (0,028)	0,548 (0,160)
Urinteststreifen Protein (g/l)	11	0,387 (0,239)	0,387 (0,239)	0,516 (0,104)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/µl)	6	keine Analyse möglich gewesen		
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	6	0,131 (0,805)	0,131 (0,805)	-0,393 (0,441)
Urinteststreifen Leukozyten (1/µl)	6	keine Analyse möglich gewesen		
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	6	-0,516 (0,295)	-0,516 (0,295)	-0,638 (0,173)
ANA (Titer)	11	-0,202 (0,552)	-0,202 (0,552)	0,339 (0,307)
dsDNA-Ak - UNI (U/ml)	0	alle SLE-Patienten der UNI hatten eine Lupusnephritis		
dsDNA-Ak - KSR (U/ml)	11	-0,098 (0,775)	-0,098 (0,775)	0,237 (0,482)
C3 (mg/l)	10	0,127 (0,726)	0,127 (0,726)	0,030 (0,934)
C4 (mg/l)	10	0,176 (0,627)	0,176 (0,627)	-0,103 (0,777)
SLEDAI-2K (Punkte)	11	0,051 (0,883)	0,051 (0,883)	0,078 (0,819)
ECLAM (Punkte)	11	0,405 (0,216)	0,405 (0,216)	0,334 (0,316)
SLE-Patienten mit einer Lupusnephritis (n = 11)				
Creatinin (µmol/l)	11	0,182 (0,593)	0,109 (0,750)	-0,345 (0,298)
Harnstoff (mmol/l)	10	-0,261 (0,467)	-0,345 (0,328)	-0,164 (0,651)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	11	-0,118 (0,729)	-0,073 (0,832)	0,536 (0,089)
endogene Creatinin-Clearance (ml/min/1,73 m ²)	10	-0,297 (0,405)	-0,345 (0,328)	-0,067 (0,855)
U-Protein 24 h-Sammelurin (mg/d)	11	0,109 (0,750)	<0,001 (1,000)	0,445 (0,170)
Urinteststreifen Protein (g/l)	11	0,328 (0,325)	0,264 (0,432)	0,456 (0,159)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/µl)	8	0,655 (0,078)	0,655 (0,078)	0,436 (0,280)
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	11	0,715 (0,013)	0,667 (0,025)	0,524 (0,098)
Urinteststreifen Leukozyten (1/µl)	8	0,574 (0,137)	0,574 (0,137)	-0,378 (0,356)
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	11	0,497 (0,120)	0,613 (0,045)	0,005 (0,989)
ANA (Titer)	11	0,478 (0,137)	0,512 (0,108)	-0,014 (0,966)
dsDNA-Ak - UNI (U/ml)	7	0,250 (0,589)	0,250 (0,589)	0,607 (0,148)
dsDNA-Ak - KSR (U/ml)	4	0,400 (0,600)	0,400 (0,600)	0,400 (0,600)
C3 (mg/l)	11	0,118 (0,729)	0,118 (0,729)	-0,200 (0,555)
C4 (mg/l)	11	-0,419 (0,199)	-0,506 (0,113)	-0,437 (0,179)
SLEDAI-2K (Punkte)	11	0,772 (0,005)	0,713 (0,014)	0,257 (0,445)
ECLAM (Punkte)	11	0,617 (0,043)	0,560 (0,073)	0,414 (0,205)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

12.2.12.4 Mikroskopische Polyangiitis

Tabelle 12.32 – Korrelationsanalysen der Patienten mit einer mikroskopischen Polyangiitis (MPA)

Parameter – MPA	Anzahl	cf-DNA_hPI	cf-DNA_bTh	sCD163
cf-DNA_hPI (ng/ml)	5	1,000 (-)	1,000 (<0,010)	0,700 (0,188)
cf-DNA_bTh (ng/ml)	5	1,000 (<0,010)	1,000 (-)	0,700 (0,188)
sCD163 (ng/ml)	5	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)	1,000 (-)
Alter (Jahre)	5	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)	0,300 (0,624)
Körpergröße (cm)	5	0,632 (0,252)	0,632 (0,252)	0,791 (0,111)
Körpergewicht (kg)	5	0,600 (0,285)	0,600 (0,285)	0,900 (0,037)
BMI (kg/m ²)	5	0,900 (0,037)	0,900 (0,037)	0,900 (0,037)
RR-Systole (mmHg)	5	-0,300 (0,624)	-0,300 (0,624)	0,300 (0,624)
RR-Diastole (mmHg)	5	-0,410 (0,493)	-0,410 (0,493)	0,051 (0,935)
RR-Mitteldruck (mmHg)	5	-0,300 (0,624)	-0,300 (0,624)	0,200 (0,747)
Erythrozyten (10E12/l)	5	-0,200 (0,747)	-0,200 (0,747)	-0,300 (0,624)
Hb (mmol/l)	5	-0,100 (0,873)	-0,100 (0,873)	-0,100 (0,873)
Hk (l/l)	5	-0,100 (0,873)	-0,100 (0,873)	-0,100 (0,873)
Thrombozyten (10E9/l)	5	0,300 (0,624)	0,300 (0,624)	0,700 (0,188)
Leukozyten (10E9/l)	5	0,600 (0,285)	0,600 (0,285)	0,900 (0,037)
Neutrophile (%)	5	0,100 (0,873)	0,100 (0,873)	0,600 (0,285)
Neutrophile absolut (10E9/l)	5	0,500 (0,391)	0,500 (0,391)	0,800 (0,104)
Lymphozyten (%)	5	-0,500 (0,391)	-0,500 (0,391)	-0,800 (0,104)
Lymphozyten absolut (10E9/l)	5	0,300 (0,624)	0,300 (0,624)	-0,300 (0,624)
Monozyten (%)	5	0,100 (0,873)	0,100 (0,873)	0,100 (0,873)
Monozyten absolut (10E9/l)	5	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)
Eosinophile (%)	5	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)	0,200 (0,747)
Basophile (%)	5	-0,700 (0,188)	-0,700 (0,188)	-0,700 (0,188)
CRP (mg/l)	5	0,800 (0,104)	0,800 (0,104)	0,800 (0,104)
Creatinin (µmol/l)	5	-0,400 (0,505)	-0,400 (0,505)	-0,100 (0,873)
Harnstoff (mmol/l)	5	-0,154 (0,805)	-0,154 (0,805)	-0,410 (0,493)
eGFR (MDRD) (ml/min/1,73 m ²)	5	0,400 (0,505)	0,400 (0,505)	0,100 (0,873)
Urinteststreifen Leukozyten (1/µl)	2 !	-1,000 (<0,010)	-1,000 (<0,010)	-1,000 (<0,010)
Urinteststreifen Erythrozyten (1/µl)	2 !	1,000 (<0,010)	1,000 (<0,010)	1,000 (<0,010)
Urinteststreifen Protein (g/l)	4	-0,447 (0,553)	-0,447 (0,553)	0,000 (1,000)
Urinsediment Leukozyten (1/GF)	4	0,632 (0,368)	0,632 (0,368)	-0,316 (0,684)
Urinsediment Erythrozyten (1/GF)	4	0,632 (0,368)	0,632 (0,368)	0,949 (0,051)
25-OH-Vitamin D (nmol/l)	4	-0,800 (0,200)	-0,800 (0,200)	-0,800 (0,200)
PTH (pg/ml)	5	-0,200 (0,747)	-0,200 (0,747)	0,500 (0,391)
HbA1c (%)	5	0,738 (0,155)	0,738 (0,155)	0,211 (0,734)
HbA1c (mmol/mol Hb)	5	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)	0,200 (0,747)
p-ANCA (Titer)	5	0,700 (0,188)	0,700 (0,188)	1,000 (<0,010)
MPO-Ak (U/ml)	5	0,821 (0,089)	0,821 (0,089)	0,975 (0,005)
BVAS (Punkte)	5	0,900 (0,037)	0,900 (0,037)	0,900 (0,037)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt. Für die Untersuchungen im Urineststreifen ist zu beachten, dass lediglich nur zwei Proben analysiert wurden, weshalb eine gesonderte farbliche Hervorhebung erfolgte.

Tabelle 12.33 – Korrelationen der Autoantikörper der MPA-Patienten mit der Krankheitsaktivität im BVAS

Parameter – MPA	Anzahl	p-ANCA (Titer)	MPO-Ak (U/ml)
BVAS (Punkte)	5	0,900 (0,037)	0,975 (0,005)

Angegeben wird der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman r_s sowie in Klammern die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit p . Signifikante Korrelationen sind hervorgehoben dargestellt.

12.2.13 Manifestationen im BVAS

Tabelle 12.34 – Vergleich des Auftretens BVAS-relevanter Manifestationen bei den Patienten mit einer Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) bzw. mikroskopischen Polyangiitis (MPA)

Manifestation des BVAS	GPA (n = 20)	MPA (n = 5)	p (Fisher)
Allgemeinsymptome	10 (50%)	2 (40%)	1,000
Myalgien	5 (25%)	2 (40%)	0,597
Arthralgien/Arthritiden	9 (45%)	1 (20%)	0,615
Fieber (> 38°C)	2 (10%)	-	1,000
Gewichtsverlust (> 2 kg)	5 (25%)	1 (20%)	1,000
Haut	2 (10%)	0 (0%)	1,000
kutaner Infarkt	1 (5%)	-	1,000
andere Hautvaskulitis	1 (5%)	-	1,000
Die Manifestationen Purpura, Hautulcera und Gangrän sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Mundschleimhaut und Augen	5 (25%)	0 (0%)	0,544
genitale Ulcera	1 (5%)	-	1,000
Konjunktivitis, Blepharitis, Keratitis	4 (20%)	-	0,549
Die Manifestationen Ulcera der Mundschleimhaut, Drüsenentzündung, signifikante Proptosis, Skleritis und Episkleritis, Verschwommensehen, plötzlicher Sehverlust, Uveitis und retinale Veränderungen sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Hals-Nasen-Ohrenbereich *	11 (55%)	0 (0%)	0,046
blutige nasale Veränderungen, Borken*	11 (55%)	-	0,046
paranasale Sinusitis	4 (20%)	-	0,549
subglottische Stenose	-	-	-
leitender Hörverlust	1 (5%)	-	1,000
sensorineuraler Hörverlust	1 (5%)	-	1,000
Unterer Respirationstrakt	8 (40%)	1 (20%)	0,621
Giemen	2 (10%)	-	1,000
pulmonale Knoten/Kaverne	3 (15%)	-	1,000
Pleuraerguss/Pleuritis	3 (15%)	-	1,000
pulmonale Infiltrate	3 (15%)	1 (20%)	1,000
endobronchiale Beteiligung	1 (5%)	-	1,000
Hämoptysen/Hämorrhagien	2 (10%)	-	1,000
respiratorisches Versagen	-	-	-
Kardiovaskuläres System	0 (0%)	0 (0%)	-
Die Manifestationen Pulsverlust, Herzklappenveränderungen, Perikarditis, ischämische Herzkrankheit, Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Abdomen	0 (0%)	0 (0%)	-
Die Manifestationen Peritonitis, blutige Diarrhoen und abdominelle Ischämie sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Niere	11 (55%)	4 (80%)	0,615
Hypertonie (diastolisch > 95 mmHg)	2 (10%)	-	1,000
Proteinurie (> 200 mg/d)	11 (55%)	4 (80%)	0,615
Hämaturie	6 (30%)	3 (60%)	0,312
Serum-Creatinin 125 - 249 µmol/l	4 (20%)	1 (20%)	1,000
Serum-Creatinin 250 - 499 µmol/l	4 (20%)	1 (20%)	1,000
Serum-Creatinin > 500 µmol/l	1 (5%)	-	1,000
Verschlechterung der Nierenfunktion	-	-	-
Nervensystem	3 (15%)	0 (0%)	1,000
Kopfschmerzen	1 (5%)	-	1,000
organisch bedingte Verwirrtheit/Demenz	1 (5%)	-	1,000
Apoplex	1 (5%)	-	1,000
Die Manifestationen Meningitis, Krampfanfälle, Rückenmarksläsionen, Hirnnervenlähmungen, sensorische periphere Neuropathie und Mononeuritis multiplex sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Aktivitätsstatus - persistierend	10 (50%)	5 (100%)	0,061

Signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen wurden hervorgehoben dargestellt und mit „*“ markiert. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Exakter Test nach Fisher.

12.2.14 Immunmodulierende Therapie

Tabelle 12.35 – Überblick über die immunmodulierende Medikation zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses

	GPA	MPA	SLE
Vor Therapieeinleitung	5 (25%)	2 (40%)	1 (4,5%)
Therapie ausgesetzt	2 (10%)	-	1 (4,5%)
Prednisolon	10 (50%)	2 (40%)	15 (68,2%)
Methylprednisolon	2 (10%)	-	2 (9,1%)
Azathioprin	3 (15%)	-	2 (9,1%)
Cyclophosphamid	2 (10%)	-	-
Cyclosporin A	-	-	1 (4,5%)
Hydroxychloroquin	-	-	9 (40,9%)
Leflunomid	1 (5%)	-	1 (4,5%)
Methotrexat	2 (10%)	-	-
Mycophenolat	-	-	1 (4,5%)
Mycophenolat-Mofetil	-	1 (20%)	7 (31,8%)
Tacrolimus	-	1 (20%)	-

GPA: Granulomatose mit Polyangiitis; MPA: mikroskopische Polyangiitis; SLE: systemischer Lupus erythematoses

12.3 Anhang II – Vergleich hohe und niedrige Krankheitsaktivität der GPA

12.3.1 Komorbiditäten und Symptome

Tabelle 12.36 – Komorbiditäten in den Gruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität der GPA

Komorbidität	BVAS ≤ 5	BVAS ≥ 6	p (Fisher)
Arterielle Hypertonie	6 (60 %)	7 (70 %) [+ 3 (30%) mit Neudiagnose]	1,000 [0,087]
Diabetes mellitus	-	-	-
Hyperlipidämie	5 (50 %)	3 (30 %)	0,650
KHK	2 (20 %)	-	0,474
Nikotin	2 (20 %)	1 (10 %)	1,000
Glomerulonephritis	9 (90 %) davon 1 (10 %) IgA- Nephropathie	10 (100 %)	1,000
chron. Pyelonephritis	-	-	-
chron. Harnwegsinfekte	1 (10 %)	-	1,000

Ein signifikanter Gruppenunterschied bestand im Exakter Test nach Fisher für keine der Komorbiditäten (der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit). Im Falle der BVAS ≥ 6 - Gruppe war bei 70% ein arterieller Hypertonus bereits anamnestisch bekannt gewesen. In weiteren 30% wurde im Rahmen der Erstdiagnose einer Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) mit rapid-progressiver Glomerulonephritis auch eine arterielle Hypertonie erstmalig festgestellt. (BVAS ≤ 5: GPA-Patienten mit maximal 5 Punkten im BVAS; BVAS ≥ 6: GPA-Patienten mit mindestens 6 Punkten im BVAS)

Tabelle 12.37 – Symptommanifestationen in den Gruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität der GPA

Symptom	BVAS ≤ 5	BVAS ≥ 6	p (Fisher)
Gewichtsverlust	1 (10 %)	4 (40 %)	0,303
Nachtschweiß	1 (10 %)	4 (40 %)	0,303
Fieber	-	2 (20 %)	0,474
Abgeschlagenheit ⁺	3 (30 %)	8 (80 %)	0,070
Kopfschmerzen	2 (20 %)	3 (30 %)	1,000
Rhinitis	2 (20 %)	5 (50 %)	0,350
Epistaxis ⁺	2 (20 %)	7 (70 %)	0,070
Borken	2 (20 %)	5 (50 %)	0,350
Husten	3 (30 %)	7 (70 %)	0,179
Hämoptysen	1 (10 %)	2 (20 %)	1,000
Dyspnoe	3 (30 %)	1 (10 %)	0,582
Arthralgien	3 (30 %)	6 (60 %)	0,370
Arthritiden	1 (10 %)	2 (20 %)	1,000
Myalgien [*]	-	5 (50 %)	0,033
Myositiden	-	1 (10 %)	1,000
Raynaud-Syndrom	-	3 (30 %)	0,211
Sicca-Symptomatik	1 (10 %)	-	1,000
Ödeme	1 (10 %)	3 (30 %)	0,582
Nierenlagerklopfeschmerz	-	2 (20 %)	0,474
akuter Harnwegsinfekt	1 (10 %)	1 (10 %)	1,000
Pollakisurie	-	2 (20 %)	0,474
Dysurie	1 (10 %)	1 (10 %)	1,000
Makrohämaturie	-	2 (20 %)	0,474

Für das mit „*“ markierte Symptom bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Exakter Test nach Fisher. Bei den mit „+“ markierten Symptomen wurde das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit $p = 0,07$ knapp überschritten (Tendenz). Alle anderen Symptome hatten im paarweisen Vergleich ein Signifikanzniveau von $p > 0,100$. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Exakter Test nach Fisher.

(BVAS ≤ 5: GPA-Patienten mit maximal 5 Punkten im BVAS; BVAS ≥ 6: GPA-Patienten mit mindestens 6 Punkten im BVAS)

12.3.2 Autoantikörper und BVAS

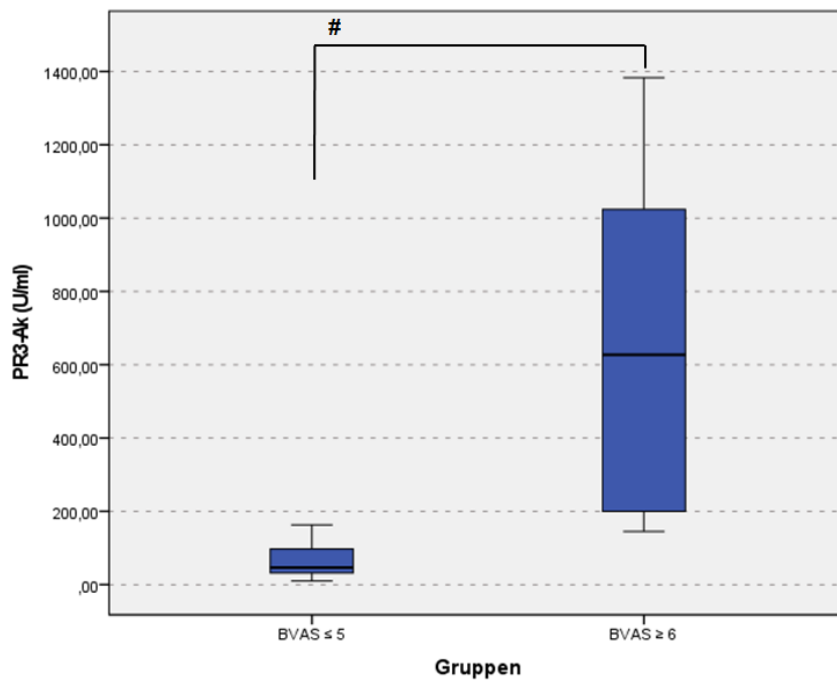


Abbildung 12.8 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: Proteinase 3 - Antikörper
Die Proteinase 3 - Antikörper (PR3-Ak) der Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten mit einer Krankheitsaktivität von mindestens 6 Punkten im BVAS (BVAS ≥ 6, n = 10) waren signifikant höher („#“, p < 0,001 im Mann-Whitney-U-Test) im Vergleich zu denen mit einer niedrigen Krankheitsaktivität von maximal 5 Punkten im BVAS (BVAS ≤ 5, n = 10).

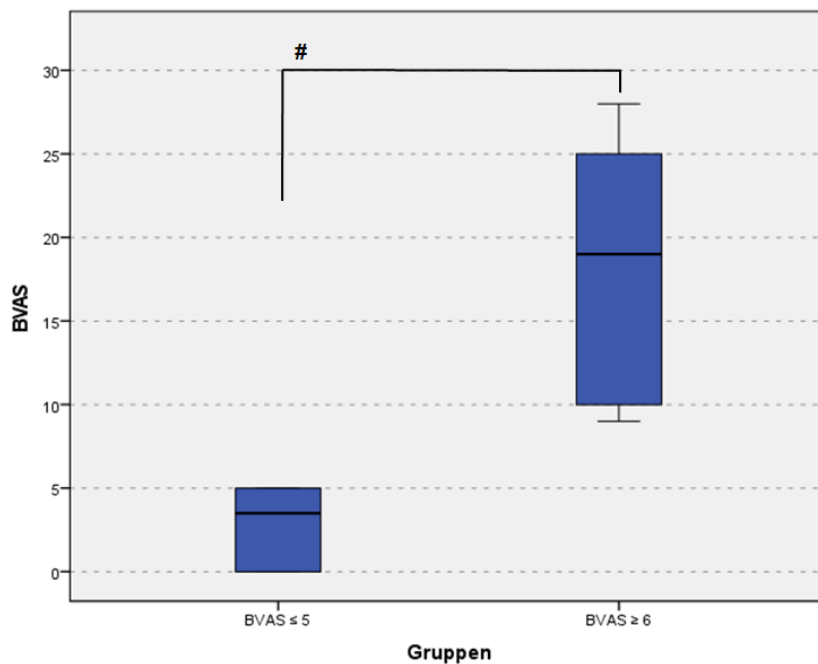


Abbildung 12.9 – Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA: BVAS - Scoring
Die Verteilung der Krankheitsaktivität im BVAS der Granulomatose mit Polyangiitis - Patienten von mindestens 6 Punkten (BVAS ≥ 6, n = 10) bzw. höchstens 5 Punkten (BVAS ≤ 5, n = 10) unterschied sich hoch signifikant („#“, p < 0,001 im Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 12.38 – Verteilung der für den BVAS relevanten Krankheitsmanifestationen (BVAS ≤ 5 vs. BVAS ≥ 6)

Manifestation	BVAS ≤ 5 (n = 10)	BVAS ≥ 6 (n = 10)	p (Fisher)
Allgemeinsymptome	3 (30%)	7 (70%)	0,179
Myalgien *	-	5 (50%)	0,033
Arthralgien/Arthritiden	3 (30%)	6 (60%)	0,370
Fieber (> 38°C)	-	2 (20%)	0,474
Gewichtsverlust (> 2 kg)	1 (10%)	4 (40%)	0,303
Haut	-	2 (20%)	0,474
kutaner Infarkt	-	1 (10%)	1,000
andere Hautvaskulitis	-	1 (10%)	1,000
Die Manifestationen Purpura, Hautulcera und Gangrän sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Mundschleimhaut und Augen	1 (10%)	4 (40%)	0,303
genitale Ulcera	1 (10%)	-	1,000
Konjunktivitis, Blepharitis, Keratitis ⁺	-	4 (40%)	0,087
Die Manifestationen Ulcera der Mundschleimhaut, Drüsenentzündungen, signifikante Proptosis, Skleritis/Episkleritis, Verschwommensehen, plötzlicher Sehverlust, Uveitis und retinale Veränderungen sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Hals-Nasen-Ohrenbereich ⁺	3 (30%)	8 (80%)	0,070
blutige nasale Veränderungen, Borken ⁺	3 (30%)	8 (80%)	0,070
paranasale Sinusitis	1 (10%)	3 (30%)	0,582
subglottische Stenose	-	-	-
leitender Hörverlust	-	1 (10%)	1,000
sensorineuraler Hörverlust	-	1 (10%)	1,000
Unterer Respirationstrakt	2 (20%)	6 (60%)	0,170
Giemen	1 (10%)	1 (10%)	1,000
pulmonale Knoten/Kaverne	1 (10%)	2 (20%)	1,000
Pleuraerguss/Pleuritis	-	3 (30%)	0,211
pulmonale Infiltrate	-	3 (30%)	0,211
endobronchiale Beteiligung	-	1 (10%)	1,000
Hämoptysen/Hämorrhagien	-	2 (20%)	0,474
respiratorisches Versagen	-	-	-
Kardiovaskuläres System	-	-	-
Die Manifestationen Pulsverlust, Herzklappenveränderungen, Perikarditis, ischämische Herzkrankheit, Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Abdomen	-	-	-
Die Manifestationen Peritonitis, blutige Diarrhoen und abdominelle Ischämie sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Niere ⁺	3 (30%)	8 (80%)	0,070
Hypertonie (diastolisch > 95 mmHg)	-	2 (20%)	0,474
Proteinurie (> 200 mg/d) ⁺	3 (30%)	8 (80%)	0,070
Hämaturie *	-	6 (60%)	0,011
Serum-Creatinin 125 - 249 µmol/l	1 (10%)	3 (30%)	0,582
Serum-Creatinin 250 - 499 µmol/l	1 (10%)	3 (30%)	0,582
Serum-Creatinin > 500 µmol/l	-	1 (10%)	1,000
Verschlechterung der Nierenfunktion	-	-	-
Nervensystem	1 (10%)	2 (20%)	1,000
Kopfschmerzen	-	1 (10%)	1,000
organisch bedingte Verwirrtheit/Demenz	1 (10%)	-	1,000
Apoplex	-	1 (10%)	1,000
Die Manifestationen Meningitis, Krampfanfälle, Rückenmarksläsionen, Hirnnervenlähmungen, sensorische periphere Neuropathie und Mononeuritis multiplex sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Aktivitätsstatus – persistierend *	8 (80%)	2 (20%)	0,023

Für die mit „*“ markierten Manifestationen bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Gruppen im Exakter Test nach Fisher. Bei den mit „+“ markierten Organsystemen bzw. Manifestationen war $p < 0,100$, das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde aber nicht erreicht (Tendenz). Bei allen anderen Manifestationen war $p > 0,100$ im Gruppenvergleich. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Exakter Test nach Fisher.
(BVAS ≤ 5: GPA-Patienten mit maximal 5 Punkten im BVAS; BVAS ≥ 6: GPA-Patienten mit mindestens 6 Punkten im BVAS)

12.3.3 Studienparameter

Tabelle 12.39 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA für den Studienparameter cf-DNA_hPI unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen

cf-DNA_hPI	BVAS ≤ 5	BVAS ≥ 6	GP	AH+/-DM
BVAS ≤ 5		0,002	0,103	0,041
BVAS ≥ 6			< 0,001	< 0,001
GP				0,350
AH+/-DM				

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,008$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben.
(BVAS ≤ 5: GPA-Patienten mit maximal 5 Punkten im BVAS; BVAS ≥ 6: GPA-Patienten mit mindestens 6 Punkten im BVAS; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.40 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA für den Studienparameter cf-DNA_bTh unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen

cf-DNA_bTh	BVAS ≤ 5	BVAS ≥ 6	GP	AH+/-DM
BVAS ≤ 5		0,003	0,015	0,026
BVAS ≥ 6			< 0,001	< 0,001
GP				0,737
AH+/-DM				

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,008$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben.
(BVAS ≤ 5: GPA-Patienten mit maximal 5 Punkten im BVAS; BVAS ≥ 6: GPA-Patienten mit mindestens 6 Punkten im BVAS; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.41 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsaktivität der GPA für den Studienparameter sCD163 unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen

sCD163	BVAS ≤ 5	BVAS ≥ 6	GP	AH+/-DM
BVAS ≤ 5		0,001	0,863	0,080
BVAS ≥ 6			< 0,001	0,010
GP				0,004
AH+/-DM				

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,008$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben.
(BVAS ≤ 5: GPA-Patienten mit maximal 5 Punkten im BVAS; BVAS ≥ 6: GPA-Patienten mit mindestens 6 Punkten im BVAS; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

12.3.4 ROC (Receiver-Operating-Characteristics) - Analysen

Tabelle 12.42 – Schwellenwerte (cut off) hinsichtlich der Differenzierung einer hohen (BVAS ≥ 6) von einer niedrigen (BVAS ≤ 5) Krankheitsaktivität der GPA

Studienparameter	cut off (ng/ml)	Sensitivität	Spezifität
cf-DNA_hPI	245,05	0,700	1,000
cf-DNA_bTh	717,15	0,800	0,900

Tabelle 12.43 – Area Under the Curve (AUC) - Berechnungen im Hinblick auf die Differenzierung der Krankheitsaktivität der Granulomatose mit Polyangiitis (BVAS ≤ 5 / BVAS ≥ 6)

Studienparameter	Fläche (AUC)	Standardfehler	asympt. Signifikanz	asympt. 95% Konfidenzintervall (Untergrenze / Obergrenze)
cf-DNA_hPl	0,900	0,068	0,002	0,766 / 1,000
cf-DNA_bTh	0,880	0,080	0,004	0,723 / 1,000
sCD163	0,910	0,065	0,002	0,783 / 1,000

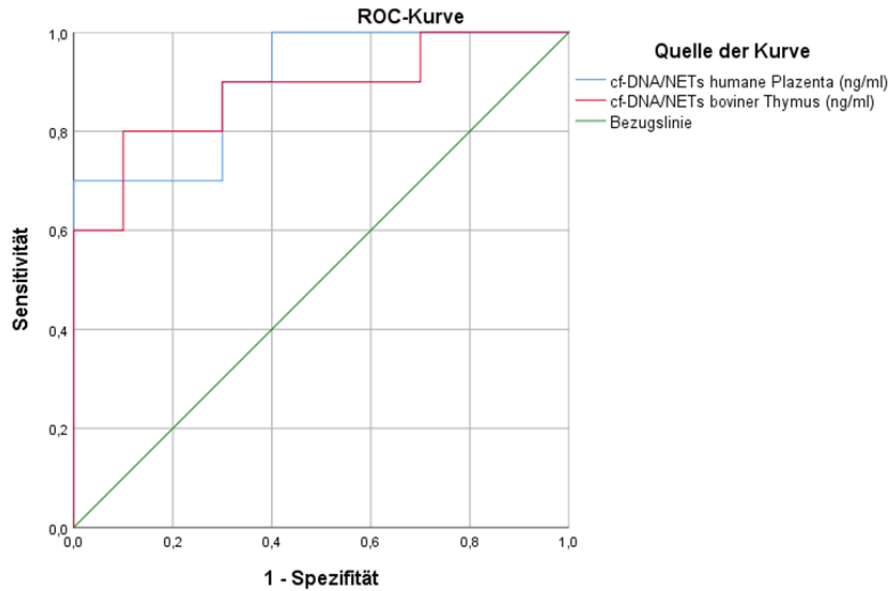


Abbildung 12.10 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung einer hohen (BVAS ≥ 6) von einer niedrigen (BVAS ≤ 5) Krankheitsaktivität der GPA in Bezug auf die cf-DNA/NETs

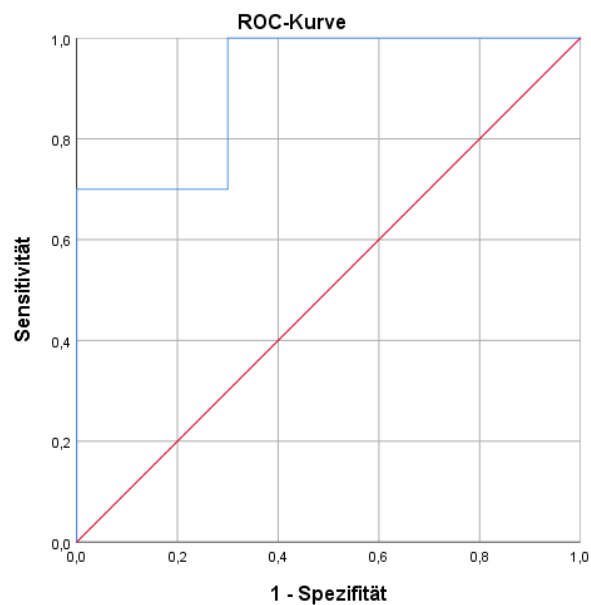


Abbildung 12.11 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung einer hohen (BVAS ≥ 6) von einer niedrigen (BVAS ≤ 5) Krankheitsaktivität der GPA in Bezug auf den sCD163

12.4 Anhang III – Vergleich progredienter und stabiler Verlauf der GPA

12.4.1 Komorbiditäten und Symptome

Tabelle 12.44 – Komorbiditäten in den Gruppen mit progredientem bzw. stabilem Verlauf der GPA

Komorbidität	GPA_progredient	GPA_stabil	p (Fisher)
Arterielle Hypertonie	5 (50%) bekannt [+ 3 (30%) mit Neudiagnose]	8 (80%)	0,350 [1,000]
Diabetes mellitus	-	-	-
Hyperlipidämie	3 (30%)	5 (50%)	0,650
KHK	1 (10%)	1 (10%)	1,000
Nikotin	2 (20%)	1 (10%)	1,000
Glomerulonephritis	9 (90%)	10 (100%) davon 1 (10%) IgA- Nephropathie	1,000
chron. Pyelonephritis	-	-	-
chron. Harnwegsinfekte	1 (10%)	-	1,000

Ein signifikanter Gruppenunterschied (im Exakter Test nach Fisher) bestand für keine der Komorbiditäten (der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit). In der Gruppe mit einem progredienten Krankheitsverlauf war bei 5 Patienten (50%) ein arterieller Hypertonus bekannt gewesen. Bei weiteren drei Patienten (30%) ist im Rahmen der Erstdiagnose der GPA mit Auftreten einer rapid-progressiven Glomerulonephritis auch erstmalig die Manifestation einer arteriellen Hypertonie diagnostiziert worden.

Tabelle 12.45 – Symptomanifestationen in den Gruppen mit progredientem bzw. stabilem Verlauf der GPA

Symptom	GPA_progredient	GPA_stabil	p (Fisher)
Gewichtsverlust	3 (30%)	2 (20%)	1,000
Nachtschweiß	4 (40%)	1 (10%)	0,303
Fieber	2 (20%)	-	0,474
Abgeschlagenheit ⁺	8 (80%)	3 (30%)	0,070
Kopfschmerzen	4 (40%)	1 (10%)	0,303
Rhinitis	5 (50%)	2 (20%)	0,350
Epistaxis	6 (60%)	3 (30%)	0,370
Borken	4 (40%)	3 (30%)	1,000
Husten	7 (70%)	3 (30%)	0,179
Hämoptysen	2 (20%)	1 (10%)	1,000
Dyspnoe	2 (20%)	2 (20%)	1,000
Arthralgien ⁺	7 (70%)	2 (20%)	0,070
Arthritiden	3 (30%)	-	0,211
Myalgien [*]	5 (50%)	-	0,033
Myositiden	1 (10%)	-	1,000
Raynaud-Syndrom	3 (30%)	-	0,211
Sicca-Symptomatik	-	1 (10%)	1,000
Ödeme	2 (20%)	2 (20%)	1,000
Nierenlagerklopfeschmerz	2 (20%)	-	0,474
akuter Harnwegsinfekt	2 (20%)	-	0,474
Pollakisurie	2 (20%)	-	0,474
Dysurie	2 (20%)	-	0,474
Makrohämaturie	2 (20%)	-	0,474

Für das mit „*“ markierte Symptom bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Exakter Test nach Fisher zwischen den Untersuchungsgruppen. Bei den mit „+“ markierten Symptomen wurde das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit $p = 0,07$ knapp verfehlt (Tendenz). Alle anderen Symptome hatten im paarweisen Vergleich ein Signifikanzniveau von $p > 0,100$. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Exakter Test nach Fisher.

12.4.2 Autoantikörper und BVAS

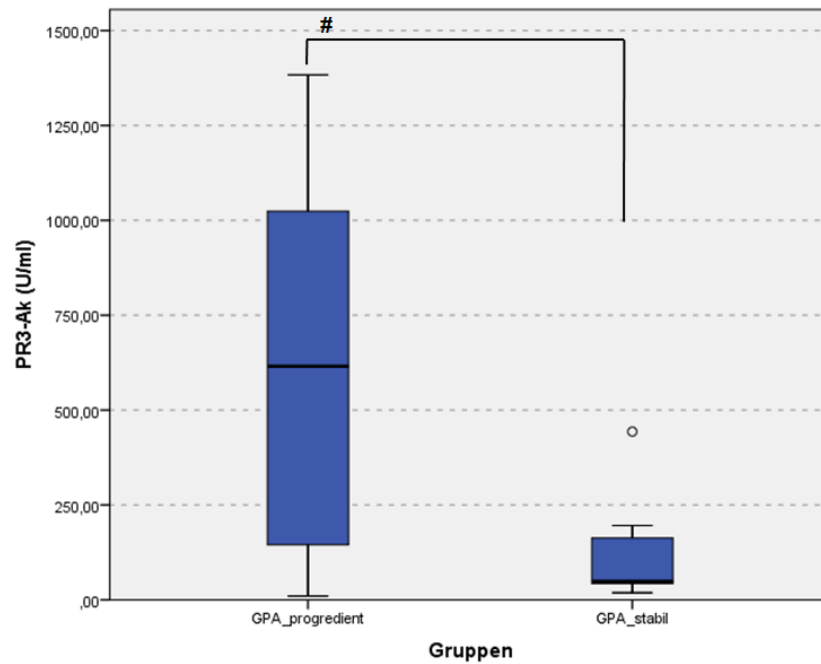


Abbildung 12.12 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: Proteinase 3 - Antikörper
Die Proteinase 3 - Antikörper (PR3-Ak) der Patienten mit einer progredienten Verlaufsform der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA_progredient, n = 10) waren signifikant höher („#“, p = 0,015 im Mann-Whitney-U-Test) im Vergleich zu denen mit einem stabilen Verlauf der Grunderkrankung (GPA_stabil, n = 10).

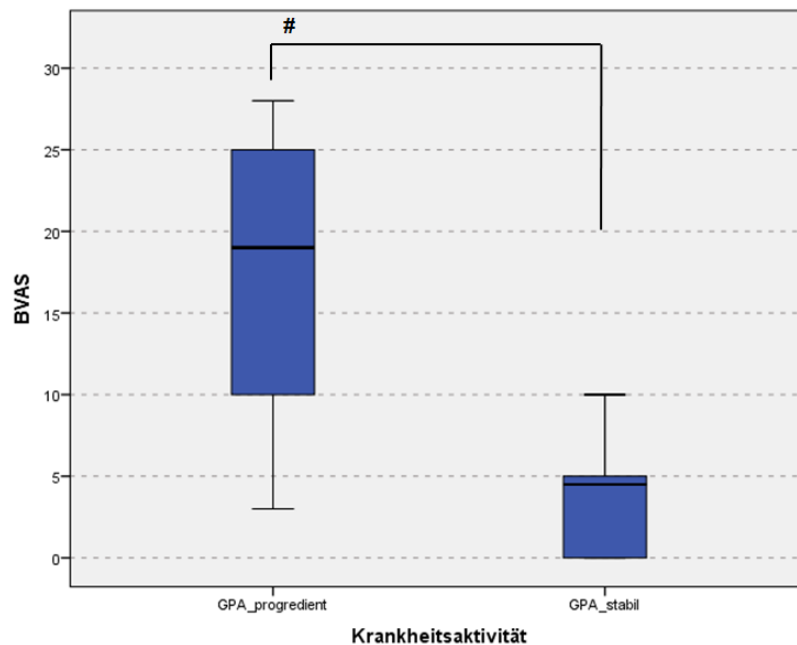


Abbildung 12.13 – Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA: BVAS - Scoring
Die Krankheitsaktivität im BVAS der Patienten mit einer progredienten Verlaufsform der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA_progredient, n = 10) war signifikant höher („#“, p = 0,002 im Mann-Whitney-U-Test) im Vergleich zu denen mit einem stabilen Verlauf der Grunderkrankung (GPA_stabil, n = 10).

Tabelle 12.46 – Verteilung der für den BVAS relevanten Krankheitsmanifestationen (progredient vs. stabiler Verlauf)

Manifestation	progredienter Verlauf (n = 10)	stabiler Verlauf (n = 10)	p (Fisher)
Allgemeinsymptome	7 (70%)	3 (30%)	0,179
Myalgien *	5 (50%)	-	0,033
Arthralgien/Arthritiden ⁺	7 (70%)	2 (20%)	0,070
Fieber (> 38°C)	2 (20%)	-	0,474
Gewichtsverlust (> 2 kg)	3 (30%)	2 (20%)	1,000
Haut	2 (20%)	-	0,474
kutaner Infarkt	1 (10%)	-	1,000
andere Hautvaskulitis	1 (10%)	-	1,000
Die Manifestationen Purpura, Hautulcera und Gangrän sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Mundschleimhaut und Augen *	5 (50%)	-	0,033
genitale Ulcera	1 (10%)	-	1,000
Konjunktivitis, Blepharitis, Keratitis ⁺	4 (40%)	-	0,087
Die Manifestationen Ulcera der Mundschleimhaut, Drüsenentzündungen, signifikante Proptosis, Skleritis/Episkleritis, Verschwommensehen, plötzlicher Sehverlust, Uveitis und retinale Veränderungen sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Hals-Nasen-Ohrenbereich	6 (60%)	5 (50%)	1,000
blutige nasale Veränderungen, Borken	6 (60%)	5 (50%)	1,000
paranasale Sinusitis	2 (20%)	2 (20%)	1,000
subglottische Stenose	-	-	-
leitender Hörverlust	1 (10%)	-	1,000
sensorineuraler Hörverlust	1 (10%)	-	1,000
Unterer Respirationstrakt	6 (60%)	2 (20%)	0,170
Giemen	1 (10%)	1 (10%)	1,000
pulmonale Knoten/Kaverne	3 (30%)	-	0,211
Pleuraerguss/Pleuritis	3 (30%)	-	0,211
pulmonale Infiltrate	2 (20%)	1 (10%)	1,000
endobronchiale Beteiligung	1 (10%)	-	1,000
Hämoptysen/Hämorrhagien	2 (20%)	-	0,474
respiratorisches Versagen	-	-	-
Kardiovaskuläres System	-	-	-
Die Manifestationen Pulsverlust, Herzklappenveränderungen, Perikarditis, ischämische Herzkrankheit, Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Abdomen	-	-	-
Die Manifestationen Peritonitis, blutige Diarrhoen und abdominelle Ischämie sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Niere	6 (60%)	5 (50%)	1,000
Hypertonie (diastolisch > 95 mmHg)	2 (20%)	-	0,474
Proteinurie (> 200 mg/d)	6 (60%)	5 (50%)	1,000
Hämaturie	5 (50%)	1 (10%)	0,141
Serum-Creatinin 125 - 249 µmol/l	1 (10%)	3 (30%)	0,582
Serum-Creatinin 250 - 499 µmol/l	3 (30%)	1 (10%)	0,582
Serum-Creatinin > 500 µmol/l	1 (10%)	-	1,000
Verschlechterung der Nierenfunktion	-	-	-
Nervensystem	3 (30%)	-	0,211
Kopfschmerzen	1 (10%)	-	1,000
organisch bedingte Verwirrtheit/Demenz	1 (10%)	-	1,000
Apoplex	1 (10%)	-	1,000
Die Manifestationen Meningitis, Krampfanfälle, Rückenmarksläsionen, Hirnnervenlähmungen, sensorische periphere Neuropathie und Mononeuritis multiplex sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Aktivitätsstatus - persistierend	0 (0%)	10 (100%)	Unterscheidungskriterium

Für die mit „*“ markierten Manifestationen/Organsysteme bestand ein signifikanter Gruppenunterschied im Exakter Test nach Fisher zwischen den beiden Gruppen mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf der Granulomatose mit Polyangiitis (progredient vs. stabil). Bei den mit „+“ markierten Manifestationen ist $p < 0,100$, das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde aber nicht erreicht (Tendenz). Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit im Exakter Test nach Fisher.

12.4.3 Studienparameter

Tabelle 12.47 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA für den Studienparameter cf-DNA_hPI unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen

cf-DNA hPI	GPA progredient	GPA stabil	GP	AH+/-DM
GPA progredient		0,002	< 0,001	< 0,001
GPA stabil			0,103	0,041
GP				0,350
AH+/-DM				

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,008$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GPA_progredient: GPA-Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf; GPA_stabil: GPA-Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.48 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA für den Studienparameter cf-DNA_bTh unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen

cf-DNA bTh	GPA progredient	GPA stabil	GP	AH+/-DM
GPA progredient		0,007	< 0,001	< 0,001
GPA stabil			0,018	0,036
GP				0,737
AH+/-DM				

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,008$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GPA_progredient: GPA-Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf; GPA_stabil: GPA-Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.49 – Gruppenvergleiche der Subanalyse Krankheitsverlauf der GPA für den Studienparameter sCD163 unter Berücksichtigung der nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen

sCD163	GPA progredient	GPA stabil	GP	AH+/-DM
GPA progredient		0,063	0,007	0,160
GPA stabil			0,264	0,531
GP				0,004
AH+/-DM				

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,009$. In der Tabelle sind die p^* -Werte im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,008$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GPA_progredient: GPA-Patienten mit einem progredienten Krankheitsverlauf; GPA_stabil: GPA-Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

12.4.4 ROC (Receiver-Operating-Characteristics) - Analysen

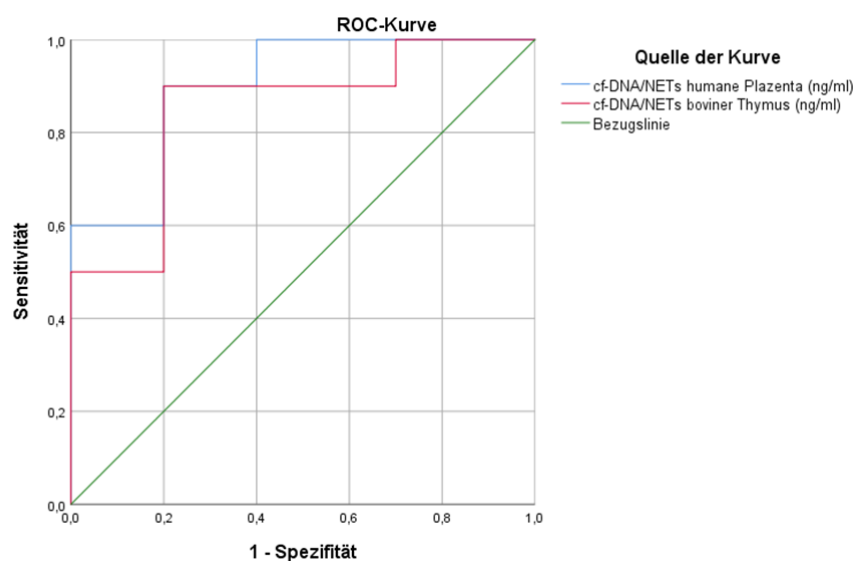


Abbildung 12.14 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung des Krankheitsverlaufes (progredient vs. stabil) der Patienten mit einer GPA in Bezug auf die cf-DNA/NETs

Tabelle 12.50 – Schwellenwerte (cut off) hinsichtlich der Differenzierung eines progredienten von einem stabilen Krankheitsverlauf der Granulomatose mit Polyangiitis

Studienparameter	cut off (ng/ml)	Sensitivität	Spezifität
cf-DNA_hPI	227,60	0,900	0,800
cf-DNA_bTh	627,70	0,900	0,800

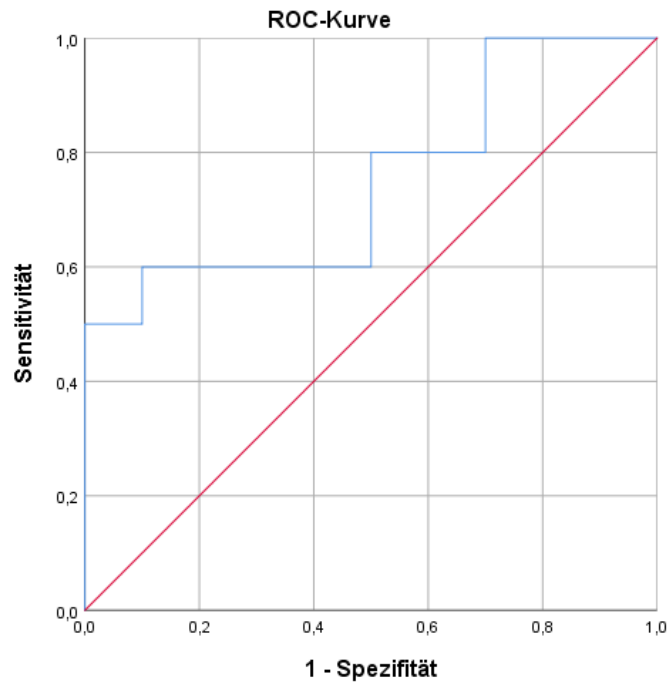


Abbildung 12.15 – ROC-Analyse hinsichtlich der Differenzierung des Krankheitsverlaufes (progredient vs. stabil) der Patienten mit einer GPA in Bezug auf den sCD163

Tabelle 12.51 – Area Under the Curve (AUC) - Berechnungen im Hinblick auf die Differenzierung des Krankheitsverlaufes (progredient vs. stabil) der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA)

Studienparameter	Fläche (AUC)	Standardfehler	asympt. Signifikanz	asympt. 95% Konfidenzintervall (Untergrenze / Obergrenze)
cf-DNA_hPI	0,900	0,068	0,002	0,766 / 1,000
cf-DNA_bTh	0,850	0,090	0,008	0,674 / 1,000
sCD163	0,750	0,113	0,059	0,529 / 0,971

12.5 Anhang IV – Vergleich Aufnahme und Entlassung bei Neudiagnose bzw. Rezidiv der GPA

12.5.1 Symptome

Tabelle 12.52 – Symptome zum Zeitpunkt der Aufnahme und der Entlassung

Symptome	Aufnahme	Entlassung	p (McNemar)
Gewichtsverlust	3 (37,5%)	2 (25%)	1,000
Nachtschweiß ⁺	5 (62,5%)	0 (0%)	0,063
Fieber	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0,500
Abgeschlagenheit ⁺	7 (87,5%)	2 (25%)	0,063
Kopfschmerzen	3 (37,5%)	2 (25%)	1,000
Sinusitis nasalis	4 (50%)	0 (0%)	0,125
Epistaxis	6 (75%)	2 (25%)	0,125
Borken	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0,500
Husten ⁺	5 (62,5%)	0 (0%)	0,063
Hämoptysen	3 (37,5%)	0 (0%)	0,250
Dyspnoe	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0,500
Arthralgien ⁺	5 (62,5%)	0 (0%)	0,063
Arthritiden	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
Myalgien ⁺	6 (75%)	1 (12,5%)	0,063
Myositiden	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
Raynaud-Syndrom	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
Sicca-Symptomatik	0 (0%)	0 (0%)	-
Ödeme	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,625
Nierenlagerklopfeschmerz	3 (37,5%)	0 (0%)	0,250
akuter Harnwegsinfekt	0 (0%)	0 (0%)	-
Pollakisurie	2 (25%)	2 (25%)	1,000
Dysurie	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
Makrohämaturie	4 (50%)	0 (0%)	0,125

Für die mit einem „+“ gekennzeichneten Symptome ist ein tendenzieller Abfall des Auftretens zum Zeitpunkt der Entlassung, aber kein signifikanter Unterschied, zu beobachten gewesen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p im McNemar-Test für verbundene Stichproben betrug in diesen Fällen jeweils 0,063. Für die restlichen Symptome lag der p-Wert über 0,100.

12.5.2 Autoantikörper und BVAS

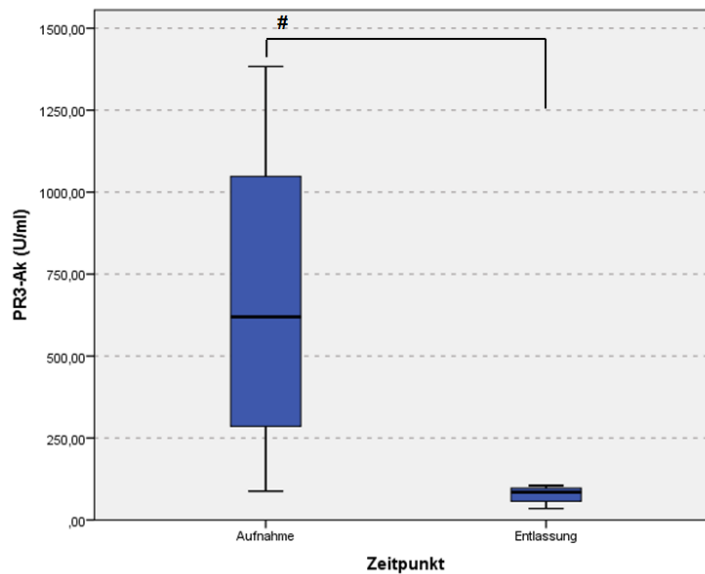


Abbildung 12.16 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Proteinase 3 - Ak
Im Rahmen des stationären Aufenthaltes (n = 8) kam es zu einem signifikanten („#“) Abfall der Proteinase 3 - Antikörper (PR3-Ak, p = 0,017 im Wilcoxon-Test).

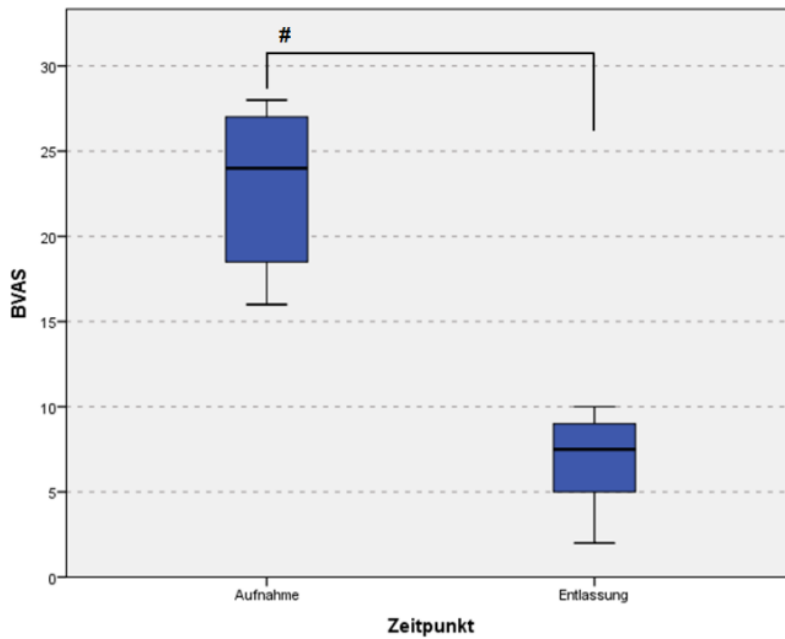


Abbildung 12.17 – Subanalyse Aufnahme und Entlassung: Krankheitsaktivität im BVAS
Im Rahmen des stationären Aufenthaltes (n = 8) kam es zu einem signifikanten („#“) Abfall der Krankheitsaktivität im BVAS (p = 0,012 im Wilcoxon-Test).

Tabelle 12.53 – Verteilung der für den BVAS relevanten Krankheitsmanifestationen (Aufnahme vs. Entlassung)

Manifestation	Aufnahme	Entlassung	p (McNemar)
Allgemeinsymptome *	7 (87,5%)	1 (12,5%)	0,031
Myalgien +	6 (75%)	1 (12,5%)	0,063
Arthralgien/Arthritiden +	5 (62,5%)	-	0,063
Fieber (> 38°C)	3 (37,5%)	-	0,250
Gewichtsverlust (> 2 kg)	3 (37,5%)	-	0,250
Haut	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
andere Hautvaskulitis	1 (12,5%)	-	1,000
Die Manifestationen kutaner Infarkt, Purpura, Hautulcera und Gangrän sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Mundschleimhaut und Augen	4 (50%)	0 (0%)	0,125
Konjunktivitis, Blepharitis, Keratitis	4 (50%)	-	0,125
Die Manifestationen Ulcera der Mundschleimhaut, genitale Ulcera, Drüsenentzündung, signifikante Proptosis, Skleritis/Episkleritis, Verschwommensehen, plötzlicher Sehverlust, Uveitis und retinale Veränderungen sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Hals-Nasen-Ohrenbereich	6 (75%)	4 (50%)	0,500
blutige nasale Veränderungen, Borken	6 (75%)	3 (37,5%)	0,250
paranasale Sinusitis	1 (12,5%)	-	1,000
subglottische Stenose	-	-	-
leitender Hörverlust	1 (12,5%)	1 (12,5%)	1,000
sensorineuraler Hörverlust	1 (12,5%)	-	1,000
Unterer Respirationstrakt	6 (75%)	3 (37,5%)	0,250
Giemen	-	-	-
pulmonale Knoten/Kaverne	1 (12,5%)	-	1,000
Pleuraerguss/Pleuritis	3 (37,5%)	-	0,250
pulmonale Infiltrate	3 (37,5%)	3 (37,5%)	1,000
endobronchiale Beteiligung	-	-	-
Hämoptysen/Hämorrhagien	3 (37,5%)	-	0,250
respiratorisches Versagen	-	-	-
Kardiovaskuläres System	1 (12,5%)	-	1,000
Perikarditis	1 (12,5%)	-	1,000
Die Manifestationen Pulsverlust, Herzklappenveränderungen, ischämische Herzkrankheit, Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Abdomen	0 (0%)	0 (0%)	-
Die Manifestationen Peritonitis, blutige Diarrhoen und abdominelle Ischämie sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Niere	8 (100%)	8 (100%)	1,000
Hypertonie (diastolisch > 95 mmHg)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0,500
Proteinurie (> 200 mg/d)	8 (100%)	8 (100%)	1,000
Hämaturie	7 (87,5%)	7 (87,5%)	1,000
Serum-Creatinin 125 - 249 µmol/l	1 (12,5%)	-	-
Serum-Creatinin 250 - 499 µmol/l	3 (37,5%)	-	-
Serum-Creatinin > 500 µmol/l	1 (12,5%)	-	-
Verschlechterung der Nierenfunktion	2 (25%)	-	0,500
Nervensystem	1 (12,5%)	1 (12,5%)	1,000
Kopfschmerzen	1 (12,5%)	-	1,000
Mononeuritis multiplex	-	1 (12,5%)	1,000
Die Manifestationen Meningitis, organisch bedingte Verwirrtheit/Demenz, Krampfanfälle, Apoplex, Rückenmarksläsionen, Hirnnervenläsionen und sensorische periphere Neuropathie sind in beiden Gruppen nicht aufgetreten.			
Aktivitätsstatus – persistierend *	0 (0%)	8 (100%)	0,008

Für die Häufigkeit des Auftretens des mit „**“ markierten Symptomkomplexes bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Zeitpunkten Aufnahme und Entlassung im Test nach McNemar für verbundene Stichproben. Der p-Wert entspricht der Irrtumswahrscheinlichkeit. Bei den mit „+“ markierten Manifestationen lag eine tendenzielle Abnahme der Häufigkeit der Symptome vor ($p < 0,100$), das geforderte Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde aber nicht erreicht. Bei allen anderen Manifestationen war $p > 0,100$ beim Vergleich der verbundenen Stichproben. Da die in dieser Subanalyse eingeschlossenen Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten eine Erstmanifestation bzw. ein Rezidiv der Grunderkrankung hatten und in allen Fällen eine Reduktion der Krankheitslast zur Entlassung hin erreicht werden konnte, bestand hinsichtlich des Aktivitätsstatus dementsprechend ein sehr signifikanter Unterschied.

12.5.3 Studienparameter

Die Tabellen 12.54 bis 12.59 fassen die Ergebnisse der Gruppenvergleiche der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten zu den Zeitpunkten Aufnahme bzw. Entlassung mit den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) zusammen. Ein Vergleich der GPA-Patienten zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ist bereits im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben erfolgt.

Tabelle 12.54 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_hPI bei Aufnahme

cf-DNA hPI	Aufnahme	GP	AH+/-DM
Aufnahme		< 0,001	< 0,001
GP			0,350
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.55 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_hPI bei Entlassung

cf-DNA hPI	Entlassung	GP	AH+/-DM
Entlassung		< 0,001	< 0,001
GP			0,350
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.56 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_bTh bei Aufnahme

cf-DNA bTh	Aufnahme	GP	AH+/-DM
Aufnahme		< 0,001	< 0,001
GP			0,737
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.57 – Gruppenvergleiche für die cf-DNA_bTh bei Entlassung

cf-DNA bTh	Entlassung	GP	AH+/-DM
Entlassung		0,001	0,001
GP			0,737
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,002$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.58 – Gruppenvergleiche für den sCD163 bei Aufnahme

sCD163	Aufnahme	GP	AH+/-DM
Aufnahme		< 0,001	0,019
GP			0,004
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.59 – Gruppenvergleiche für den sCD163 bei Entlassung

sCD163	Entlassung	GP	AH+/-DM
Entlassung		0,043	0,975
GP			0,004
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,012$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

12.6 Anhang V – Einfluss einer Cyclophosphamidtherapie

12.6.1 Symptome

Tabelle 12.60 – Überblick über ausgewählte Symptome vor und nach der Therapie mit Cyclophosphamid (Cyclo) der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten

	vor Cyclo	nach Cyclo	p (McNemar)
Gewichtsverlust	1 (25%)	-	1,000
Nachtschweiß	3 (75%)	-	0,250
Fieber	2 (50%)	-	0,500
Abgeschlagenheit	3 (75%)	2 (50%)	1,000
Kopfschmerzen	1 (25%)	-	1,000
Rhinitis nasalis	3 (75%)	1 (25%)	0,625
Epistaxis	3 (75%)	-	0,250
Borken	2 (50%)	-	0,500
Husten	3 (75%)	1 (25%)	0,625
Hämoptysen	1 (25%)	-	1,000
Dyspnoe	2 (50%)	1 (25%)	1,000
Arthralgien	4 (100%)	1 (25%)	0,250
Arthritiden	1 (25%)	-	1,000
Myalgien	2 (50%)	1 (25%)	1,000
Myositiden	-	-	
Raynaud-Syndrom	-	-	-
Sicca-Symptomatik	-	-	-
Ödeme	1 (25%)	-	1,000
Nierenlagerklopfeschmerz	1 (25%)	-	1,000
akuter Harnwegsinfekt	1 (25%)	1 (25%)	1,000
Pollakisurie	1 (25%)	-	1,000
Dysurie	2 (50%)	-	0,500
Makrohämaturie	1 (25%)	-	1,000

Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bestand für keines der aufgeführten Symptome zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten im McNemar-Test (p gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an).

12.6.2 Studienparameter

Tabelle 12.61 – Vergleich der Mittelwerte der Plasmakonzentrationen der Studienparameter vor und nach Cyclophosphamid-Pulstherapie (Cyclo) der Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten

Parameter	vor Cyclo	Min	Max	nach Cyclo	Min	Max	p (T-Test)
cf-DNA_hPI (ng/ml)	356,65 +/- 87,32	239,1	436,5	119,18 +/- 21,77	97,9	149,6	0,016
cf-DNA_bTh (ng/ml)	954,78 +/- 192,24	693,4	1153,6	410,23 +/- 98,22	290,5	529,5	0,012
sCD163 (ng/ml)	3,299 +/- 1,659	0,857	4,509	1,109 +/- 0,229	0,890	1,428	0,061

Für die Werte aller drei Studienparameter liegt eine Normalverteilung vor. Es erfolgt die Angabe des Mittelwerts +/- Standardabweichung sowie der Minima (Min) und Maxima (Max). Der p-Wert gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit im T-Test für verbundene Stichproben an.

Die Tabellen 12.62 bis 12.65 fassen die Ergebnisse der Gruppenvergleiche vor bzw. nach Cyclophosphamid-Pulstherapie mit den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) zusammen. Ein Vergleich auf signifikante Unterschiede der Studienparameter vor und nach Cyclophosphamid-Pulstherapie ist bereits im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben erfolgt. Wegen einer fehlenden Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test für die Studienparameter cf-DNA_hPI ($p = 0,425$) und cf-DNA_bTh ($p = 0,759$) nach Therapie wurde keine weitere Differenzierung mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Tabelle 12.62 – Gruppenvergleiche cf-DNA_hPI vor Cyclophosphamidtherapie

cf-DNA_hPI	vor Cyclo	GP	AH+/-DM
vor Cyclo		< 0,001	0,001
GP			0,350
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,004$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (vor Cyclo: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten vor Cyclophosphamidtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.63 – Gruppenvergleiche cf-DNA_bTh vor Cyclophosphamidtherapie

cf-DNA_bTh	vor Cyclo	GP	AH+/-DM
vor Cyclo		< 0,001	0,001
GP			0,737
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,005$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (vor Cyclo: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten vor Cyclophosphamidtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.64 – Gruppenvergleiche sCD163 vor Cyclophosphamidtherapie

sCD163	vor Cyclo	GP	AH+/-DM
vor Cyclo		0,120	0,152
GP			0,004
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,010$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (vor Cyclo: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten vor Cyclophosphamidtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.65 – Gruppenvergleiche sCD163 nach Cyclophosphamidtherapie

sCD163	nach Cyclo	GP	AH+/-DM
nach Cyclo		0,517	0,020
GP			0,004
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,006$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (nach Cyclo: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten nach Cyclophosphamidtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

12.7 Anhang VI – Einfluss einer Plasmaaustauschtherapie

Die Tabellen 12.66 bis 12.69 fassen die Ergebnisse der Gruppenvergleiche vor bzw. nach Plasmaaustauschtherapie mit den nicht-autoimmunologischen Kontrollgruppen (GP, AH+/-DM) zusammen. Ein Vergleich auf signifikante Unterschiede der Studienparameter vor und nach Plasmaaustauschtherapie ist bereits im Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben erfolgt. Wegen einer fehlenden Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test für die Studienparameter cf-DNA_hPI ($p = 0,494$) und cf-DNA_bTh ($p = 0,865$) nach Plasmaaustauschtherapie erfolgte keine weitere Differenzierung mittels des Mann-Whitney-U-Tests.

Tabelle 12.66 – Gruppenvergleiche cf-DNA_hPI vor Plasmaaustausch

cf-DNA_hPI	vor PA	GP	AH+/-DM
vor PA		< 0,001	< 0,001
GP			0,350
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (vor PA: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten vor Plasmaaustauschtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.67 – Gruppenvergleiche cf-DNA_bTh vor Plasmaaustausch

cf-DNA_bTh	vor PA	GP	AH+/-DM
vor PA		< 0,001	0,001
GP			0,737
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,003$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (vor PA: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten vor Plasmaaustauschtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.68 – Gruppenvergleiche sCD163 vor Plasmaaustausch

sCD163	vor PA	GP	AH+/-DM
vor PA		0,002	0,098
GP			0,004
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,001$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (vor PA: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten vor Plasmaaustauschtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)

Tabelle 12.69 – Gruppenvergleiche sCD163 nach Plasmaaustausch

sCD163	nach PA	GP	AH+/-DM
nach PA		0,704	0,497
GP			0,004
AH+/-DM			

Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,028$. In der Tabelle sind die p^* -Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit) im paarweisen Vergleich mit dem Mann-Whitney-U-Test angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede ($p^* < 0,017$ nach α -Adjustierung) wurden rot hervorgehoben. (nach PA: Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) - Patienten nach Plasmaaustauschtherapie; GP: gesunde Probanden; AH+/-DM: Arterielle Hypertonie +/- Diabetes mellitus)