

Aus dem Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Vorstand: Priv. Doz. Dr. M. Vogeser

Veränderungen im IgG–Subklassenprofil bei Tumorerkrankungen

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Renate Schönbach

aus

Aschaffenburg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Irmgard Bumeder

Mitbetreuung durch die

Promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. P. Stieber

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.10.2009

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	01
2.	Fragestellung	06
3.	Methodik	07
3.1.	Methoden zur Bestimmung der IgG-Subklassen	07
3.1.1.	Affinitätschromatographie	07
3.1.1.1.	Testprinzip	07
3.1.1.2.	Testdurchführung	12
3.1.2.	Nephelometrie	18
3.2.	Methoden zur Bestimmung onkologischer Biomarker	19
3.3.	Statistische Methoden	24
3.3.1.	Analytische Qualität einer Analysenmethode	24
3.3.2.	Diagnostische Qualität einer Analysenmethode	25
3.3.3.	ROC – Kurven	25
4.	Material bzw. Patientenproben	26
4.1.	Behandlung der Proben bei Blutentnahme	26
4.2.	Behandlung der Proben nach Blutentnahme	26
4.3.	Zusammensetzung des Kollektivs	26

5.	Ergebnisse	29
5.1.	Ergebnisse der methodischen Evaluierung	29
5.1.1.	Methodische Probleme bzw. Fehlerquellen	29
5.1.2.	Reproduzierbarkeit der Messungen	38
5.1.3.	Stabilität der IgG-Subklassen	45
5.1.4.	Durchführbarkeit anderer Methoden	46
5.2.	Ergebnisse der klinischen Evaluierung	47
5.2.1.	Verhalten der IgG-Subklassen bei benignen und malignen Erkrankungen	47
5.2.2.	Methodenvergleich	56
5.2.3.	Abgleich der IgG-Subklassen mit etablierten onkologischen Biomarkern	59
6.	Diskussion	65
7.	Zusammenfassung	74
8.	Literatur	76
9.	Anhang	81
10.	Danksagung	90
11.	Lebenslauf	91

1. Einleitung

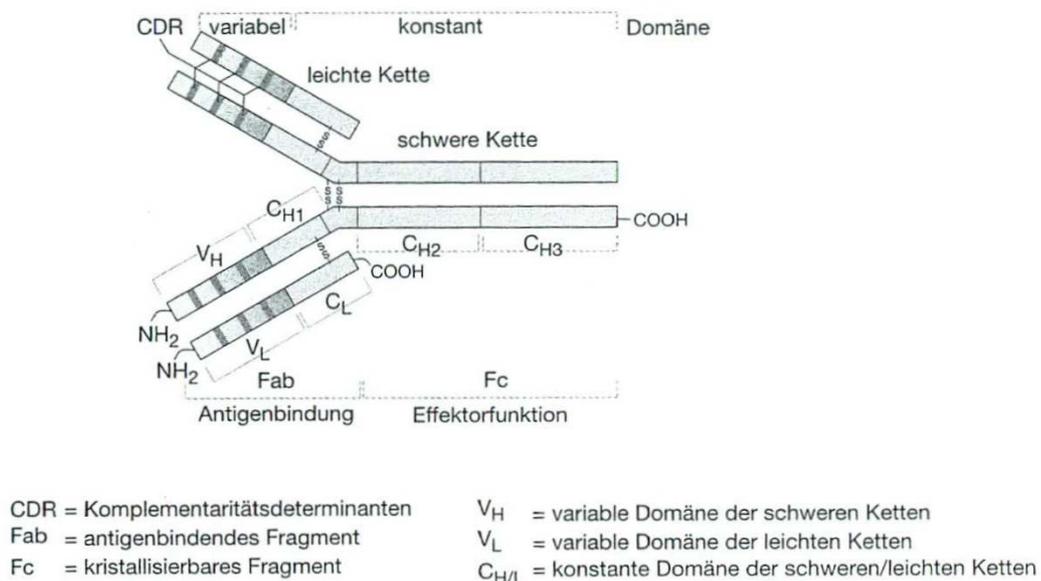
Die Immunglobuline sind Teil eines komplexen Systems, das mittels zahlreicher ineinandergreifender Mechanismen die Abwehr körperfremder Substanzen gewährleistet und einen effizienten Schutz vor Infektionen darstellt. Dieses Abwehrsystem (Immunsystem) lässt sich prinzipiell in zwei Bereiche aufteilen: die humorale und die zelluläre Immunität. Träger der humoralen Immunität sind die Immunglobuline (Ig), von denen bisher beim Menschen die Klassen IgG mit 4 Unterklassen (IgG1 - IgG4), IgA mit 2 Unterklassen (IgA1, IgA2), IgM, IgD und IgE bekannt sind. Die einzelnen Immunglobulinklassen haben unterschiedliche biologische Funktionen und sind im Organismus unterschiedlich stark vertreten. Das Immunglobulin G (IgG) stellt mit einem Anteil von 70 - 80% die am stärksten vertretene Klasse des gesamten Immunglobulinpools dar, die gleichermaßen im intra- und extravaskulären Pool verteilt ist. Der Referenzbereich von IgG im Serum von gesunden Erwachsenen liegt nach CRM-Standard 470 (Referenzmaterial der International Federation of Clinical Chemistry) zwischen 700 - 1600 mg/dl, bzw. 7 - 16 g/l. Dabei beträgt der prozentuale Anteil der Subklassen im Serum gesunder Individuen im allgemeinen 60 - 70 % IgG1, 20 - 30 % IgG2, 5 - 8 % IgG3 und 0,7 - 4 % IgG4, unabhängig vom absoluten Gehalt an Gesamt IgG (4, 37).

Das Konzept der durch Immunglobuline vermittelten Immunität diente bereits am Ende des 19. Jahrhunderts als Grundlage für die Gewinnung von Antiseren aus zunächst tierischen Organismen. Wenige Jahre später konnte man aus Placentaextrakten humane Antiseren herstellen, die im Rahmen der passiven Immunität einen wirksamen Schutz gegen Infektionskrankheiten wie Masern, Mumps und Keuchhusten darstellten. In den 50er Jahren war es bereits möglich, Patienten, die an einer Hypogammaglobulinämie litten, eine Therapie mit γ -Globulinpräparaten anzubieten.

Zur schematischen Darstellung des molekularen Erscheinungsbildes der Immunglobuline wählte *Rodney Porter* 1962 das IgG-Molekül, das als typisches Beispiel für die Grundstruktur eines Antikörpers herangezogen werden kann. Das IgG-Molekül steht für ein einheitliches Grundmodell aus vier Ketten, das auf zwei unterschiedlichen Typen von Polypeptidketten basiert: Zwei kleinere (leichte) Polypeptidketten (L = light chain), die bei allen Immunglobulinklassen gleich sind und jeweils zwei größere (schwere) Ketten (H = heavy chain), die sich in jeder Klasse

oder Subklasse unterschiedlich strukturiert darstellen. Bei den Leichtketten unterscheidet man zusätzlich zwischen kappa- und lambda-Typ. Die einzelnen Polypeptidketten werden durch kovalente und nichtkovalente Kräfte zusammengehalten und bilden ein Gerüst von paarweise identischen schweren und leichten Ketten. Alle Immunglobuline weisen diese einheitliche Grundstruktur auf, wobei das Immunglobulin G das Hauptimmunglobulin im normalen menschlichen Serum darstellt und nur als monomeres Protein auftritt (3, 26).

Abb. 1: Einheitliche Grundstruktur der Immunglobuline (3)

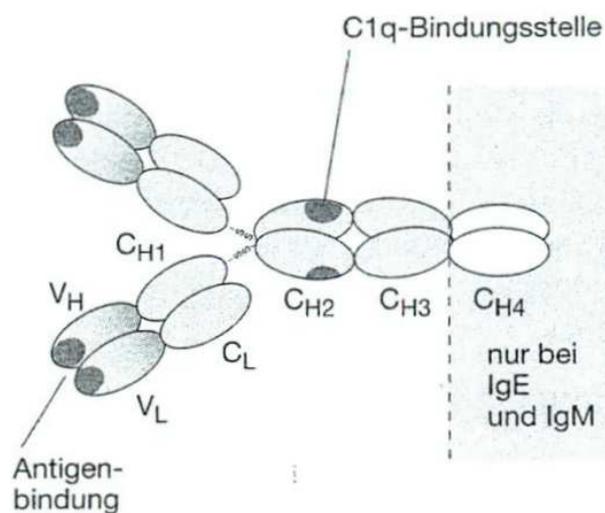


Die einzelnen Ketten sind durch Disulfidbrücken (Cysteinreste) miteinander verbunden. Das Enzym Papain spaltet das Immunglobulinmolekül in der „Hinge“ – (Türangel-) Region zwischen den C1- und C2 – Domänen in zwei identische Fragmente. Man erhält die Fab-Fragmente, die die Fähigkeit besitzen, Antigen zu binden und ein nicht antigenbindendes Fc-Fragment (Fc = kristallisierbar). Allerdings verhalten sich die vier IgG-Subklassen in der Empfindlichkeit gegenüber proteolytischen Enzymen wie Papain, Plasmin und Pepsin unterschiedlich: IgG1 und IgG3 werden durch Papain und Plasmin leicht in Fab - und Fc-Fragmente gespalten. IgG4 und besonders IgG2-Moleküle lassen sich durch diese Enzyme erst nach Zugabe von Cystein spalten.

Die Leichtketten bestehen immer aus zwei nahezu gleich großen Regionen (Domänen). Der konstante erste Teil (C_L) ist bei den verschiedenen Immunglobulinen sehr ähnlich aufgebaut, der variable Teil (V_L) hingegen zeichnet sich durch eine

extreme Variabilität der Aminosäuresequenz aus. Beide Domänen bestehen aus ca. 110 Aminosäuren. Die Schwereketten bestehen aus einer variablen Domäne (V_H) mit ebenfalls ca. 110 Aminosäuren und drei (bei IgE und IgM vier) konstanten Domänen (C_H). Die unterschiedlich aufgebauten Schwereketten bestimmen die Immunglobulinklasse (G, A, M, D und E). Die verschiedenen Domänen der Immunglobuline haben eine ähnliche globuläre Struktur mit mehreren gegenläufig angeordneten Faltblattstrukturen und Disulfidbrücken.

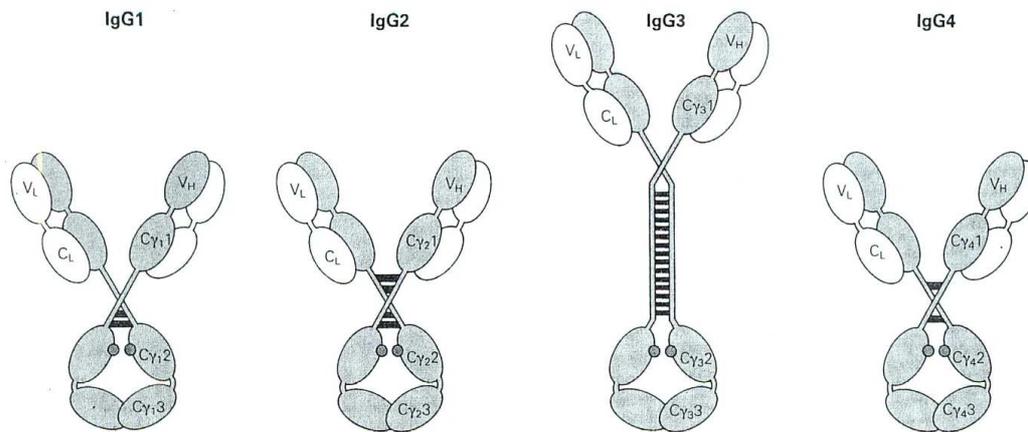
Abb. 2: Globuläre Struktur (3)



V_H = variable Domäne der schweren Ketten
 V_L = variable Domäne der leichten Ketten
 $C_{H/L}$ = konstante Domäne der schweren/leichten Ketten

Die 4-Kettenstruktur ist bei allen IgG-Subklassen gleich, sie unterscheiden sich jedoch in der Anzahl und Anordnung der Disulfidgruppen zwischen den Ketten der verschiedenen Subklassen. Beim IgG1 geht die Brücke zwischen leichten und schweren Ketten zur „Hinge“-Region, bei den Subklassen IgG2, IgG3 und IgG4 sitzt die Brückenbindung an der Verbindungsstelle zwischen den variablen und den konstanten Regionen.

Abb. 3: Brückenbindungen der IgG-Subklassen (26)



Die Immunglobuline werden auf der Zelloberfläche reifer B-Lymphozyten exprimiert sowie von Plasmazellen produziert und als Antikörper ins Blut abgegeben. Ein Teil der Immunglobuline ist – meist über Rezeptoren für das Fc-Fragment - an andere Zellen wie Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen oder Epithelzellen gebunden.

Die einzelnen Klassen und Subklassen zeigen ein unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer verschiedenen Funktionen, wie der Bindung von Antigenen und der Aktivierung des Komplementsystems. Als einziges Immunglobulin passiert IgG die Plazentaschranke und bewirkt so einen passiven Schutz des Fötus und des Neugeborenen. Bei der Geburt sind im kindlichen Serum alle vier IgG-Subklassen in ähnlicher Konzentration wie im mütterlichen Serum vorhanden. Die Konzentrationen nehmen nach der Geburt ab, bis nach etwa 6 Monaten das kindliche Immunsystem in Funktion tritt und sich die Werte bis zum 2. Lebensjahr den Erwachsenenwerten weitgehend angleichen (3, 4).

Störungen der Immunglobulinsynthese sind häufig Folge primärer Immundefekte, die in der Regel genetisch bedingt sind. Zur Gruppe der häufigsten primären Immundefekte zählen der selektive IgA-Mangel und das variable Immundefektsyndrom (CVID). Sekundäre Störungen der Infektabwehr sind häufig Folge schwerer Allgemeinerkrankungen oder von Therapiemaßnahmen. Erhöhte Immunglobulinkonzentrationen finden sich im Rahmen von polyklonalen Gammopathien, die bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, Lebererkrankungen und Autoimmunprozessen auftreten. Neben der reaktiven, heterogenen

γ -Globulinvermehrung findet man insbesondere beim multiplen Myelom und beim Morbus Waldenström eine exzessive Vermehrung strukturell und funktionell einheitlicher Immunglobuline bzw. deren Fragmente die als monoklonale Immunglobuline bezeichnet werden (37).

Ein völlig neuer Gesichtspunkt wurde von der Arbeitsgruppe um Erwin Schauenstein/Graz beim Auftreten maligner Tumore unterschiedlichster Gewebsherkunft beschrieben: Im Gegensatz zu den bisher beobachteten Abweichungen oder Subklassendefekten, bei denen meist eine oder mehrere Subklassen vermindert vorliegen und dadurch ein entsprechend erniedrigtes Gesamt-IgG gefunden wird, beschreibt die Grazer Arbeitsgruppe bei Vorliegen einer malignen Erkrankung eine Verschiebung des prozentualen Anteils der Subklassen bei unverändertem bzw. unauffälligem Gesamt-IgG. Ausgangspunkt für dieses Forschungsvorhaben war das Phänomen einer tumorbedingten Dysregulation der IgG-Subklassenbiosynthese bei Ratten (15, 36). Da sich bei Ratten ein relativ hoher B-Lymphozytenanteil im peripheren Blut findet, kann mit Zytoflow-Untersuchungen die veränderte Expression von Oberflächen-IgG auf B-Lymphozyten nachgewiesen werden. Allerdings ist der Anteil der humanen IgG exprimierenden B-Lymphozyten mit ca. 7 - 20% recht niedrig und unterliegt zudem starken Schwankungen, so daß nach einer anderen Methode zur Darstellung des IgG1/IgG2-Shifts gesucht werden mußte.

Zum Nachweis der tumorassoziierten IgG1-Reduktion wurde deshalb von der Grazer Arbeitsgruppe eine affinitätschromatographische Methode entwickelt, die eine quantitative Detektion von Gesamt-IgG, IgG1 und IgG2 erlaubt.

Die Untersuchungen bezogen sich zunächst auf Patientinnen mit benignen und malignen Erkrankungen der weiblichen Brust (10): Der tumorassoziierte IgG-Subklassenshift konnte bei Patientinnen mit Mammakarzinom beobachtet werden, während benigne Erkrankungen wie Mastitis, Fibrome oder andere gutartige Erkrankungen diese typischen Veränderung im Subklassenmuster nicht zeigten. Andere Arbeiten beschreiben die Dysproteinämie bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (1), kolorektalen Karzinomen (32) und bei gynäkologischen Karzinomen (31). Außerdem wurde ein benignes Kollektiv von Patienten mit rheumatischen Erkrankungen untersucht, bei denen ein entsprechender Shift nicht nachweisbar war.

2. Fragestellung

Ziel der prospektiven Studie, die im Institut für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern der Universität München durchgeführt wurde, war die Methodenevaluierung mit der Frage, ob eine methodische Machbarkeit besteht und eine mögliche klinische Relevanz der IgG-Subklassen im Abgleich zu bereits existierenden differenzialdiagnostischen Möglichkeiten der onkologischen Labordiagnostik gegeben ist.

Im Rahmen der **methodischen Evaluierung** sollten folgende Fragen näher untersucht werden:

- Stabilität der IgG-Subklassen
- Reproduzierbarkeit der Messungen
- Durchführbarkeit anderer Methoden

Bei der anschließenden **klinischen Evaluierung** der IgG-Subklassen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Verhalten der IgG-Subklassen bei verschiedensten benignen und malignen Erkrankungen in aktiven Stadien
- Beurteilung der Organ- respektive Tumorspezifität des IgG-Subklassenshifts im Hinblick auf ein mögliches diagnostisches Potential
- Abgleich der IgG-Subklassen mit bereits routinemäßig eingesetzten onkologischen Biomarkern im Hinblick auf eine additive Aussagekraft der onkologischen Labordiagnostik.

3. Methodik

3. 1. Methoden zur Bestimmung der IgG-Subklassen

3.1.1. Affinitätschromatographie

3.1.1.1. Testprinzip

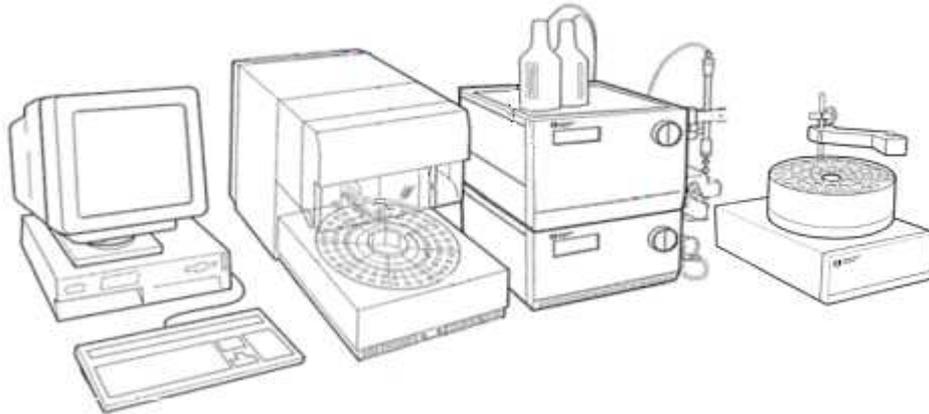
Das Prinzip der quantitativen affinitätschromatographischen Bestimmung der IgG-Subklassen basiert auf einer Antigen–Antikörper-Reaktion, bei der Antigen und Antikörper eine spezifische reversible Bindung eingehen. Der jeweilige spezifische Antikörper bindet dabei nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an ein Epitop des Antigens. Die affinitätschromatographische Methode, die von der Grazer Arbeitsgruppe entwickelt wurde (30), macht sich dieses Prinzip zu Nutze, indem von zwei unterschiedlichen Chromatographiesäulen mit jeweils verschiedenen Pufferlösungen Gesamt-IgG bzw. die Subklassen IgG1 und IgG2 eluiert werden.

Analysesystem

Zu Beginn der Studie kam das Chromatographiesystem ÄKTA basic 10 XT gekoppelt mit einem Autosampler A900 und einer Unicorn OS/2 Auswerte-Software mit Drucker HP Desk Jet (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) zum Einsatz.

Im Verlauf der Untersuchungen wurde das Analysesystem noch um einen Fraktionssamplers erweitert, zudem wurden die Eluate an einem externen Spektralphotometer gemessen.

Abb. 4: Analysensystem ÄKTA basic 10 XT



Chromatographie-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden)

Die Detektion von IgG-gesamt und den Subklassen IgG1 und IgG2 erfordert die Verwendung von zwei verschiedenen Chromatographiesäulen (HiTrap Protein G HP bzw. HiTrap Protein A HP), deren Grundgerüst jeweils aus einem Sepharosegel mit Streptokokkenprotein G (für IgG) bzw. Staphylokokkenprotein A (für IgG1 und IgG2) besteht. Die Zellwand von Staphylokokken und Streptokokken besteht aus einer dicken Mureinschicht. Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren durchziehen diese Mureinschicht und ragen nach außen. Über eine Peptidbindung sind zellwandassoziierte Proteine an das Murein gebunden. Protein A und Protein G binden dabei jeweils an den Fc-Teil des Immunglobulins.

HiTrap-1ml-Säule G für die Bestimmung von IgG-gesamt

Zur Bestimmung von IgG-gesamt verwendeten wir eine HiTrap Protein G HP 1ml Säule mit immobilisiertem Streptokokkenprotein G. Dieses Protein G ist ein Protein auf der Zelloberfläche der G-Streptokokken, ein Typ III Fc-Rezeptor, der ähnlich wie Protein A, an der Fc-Region von IgG bindet und somit einen natürlichen Rezeptor für IgG darstellt. Protein A und Protein G unterscheiden sich in ihren Bindungseigenschaften in Abhängigkeit der Struktur von IgG bzw. der IgG-Subklassen. So bindet immobilisiertes Streptokokkenprotein G stabiler an Gesamt-IgG, während zur Bestimmung der Subklassen IgG1 bzw. IgG2 die Affinität zu Staphylokokkenprotein A genutzt wird.

Das Grundgerüst der Miniatursäule besteht aus einem Sepharosegel mit immobilisiertem/recombinantem in E.coli synthetisiertem Protein G mit zwei IgG-bindenden Regionen. Die genetisch determinierte Albumin-bindende Region des nativen Protein G wurde dabei synthetisch so verändert, dass unerwünschte Kreuzreaktionen mit Albumin nicht auftreten können.

Protein G bindet IgG in einem weiten pH-Bereich; wobei die höchste Affinität von Protein G mit IgG im Bereich von pH 7.00 liegt.

Mit einem Glycinpuffer pH 2.70 lassen sich die entstandenen Immunkomplexe von der Säule eluieren. Die Eluate werden mit Hilfe eines Fraktionssamplers aufgefangen, und nach behutsamer Homogenisierung (Schwenken im Becherglas) bei 278 nm an einem externen Spektralphotometer gemessen. Dabei dient die jeweils verwendete Pufferlösung als Leerwert.

HiTrap-1ml-Säule A für die Bestimmung von IgG1 und IgG2

Zur Bestimmung von IgG1 und IgG2 wurde eine HiTrap 1 ml Säule mit immobilisiertem Staphylokokkenprotein A verwendet, welches eine pH-abhängige hohe Affinität zu den Fc-Fragmenten von IgG1 und IgG2 besitzt. Das Grundgerüst der Säule besteht ebenfalls aus einem Sepharosegel mit einem als Antigen wirkenden Protein A, produziert von Staphylokokkus aureus (Molekulargewicht 42 000), welches ähnlich wie Protein G zwei Bindungsstellen für IgG1 bzw. IgG2 aufweist.

Bei der Applikation von Serum gewährleistet ein pH Wert von 7.00 eine hohe Affinität zwischen Protein A und IgG1 bzw. IgG2.

Die Immunkomplexe von IgG2 lassen sich mit einem Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.70 von der Säule isolieren. Die Immunkomplexe von IgG1 werden im Anschluß mit einem Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.30 eluiert. Die aufgefangenen Eluate werden, wie oben beschrieben, extern am Spektralphotometer bei 278 nm gegen den jeweiligen Pufferleerwert gemessen und anschließend die Proteinkonzentration nach einem von der Grazer Arbeitsgruppe ermittelten für IgG spezifischen Extinktionskoeffizient berechnet.

Reagenzien

Die benötigten Reagenzien wurden von der Firma MERCK bezogen:

- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Fa. MERCK (Art.nr: 106580)
- Citronensäure-Monohydrat, Fa. MERCK (Art.nr: 100244)
- Glycin, Fa. MERCK (Art.nr: 4201.000)
- Salzsäure, $c[\text{HCl}] = 2 \text{ mol/l}$ (2 N), Fa. MERCK (Art.nr: 109063. 1000)

Mit diesen Reagenzien wurden die für die Herstellung der gebrauchsfertigen Pufferlösungen benötigten Stammlösungen angesetzt.

Benötigte Pufferlösungen

Zur affinitätschromatographischen Messung von **IgG-gesamt** werden drei verschiedene Pufferlösungen benötigt:

- Basispuffer (Natriumphosphat-Citrat-Puffer) pH 7.00
- Glycinpuffer (Glycin-Hydrochlorid-Puffer) pH 2.70
- Citratpuffer

Zur affinitätschromatographischen Messung von **IgG1 und IgG2** werden vier verschiedene Pufferlösungen benötigt:

- Basispuffer (Natriumphosphat-Citrat-Puffer) pH 7.00
- Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.70
- Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.30
- Citratpuffer

Herstellung der Puffer

Die einzelnen Puffer haben eine Haltbarkeitsdauer von zwei Tagen und müssen jeweils frisch hergestellt werden. Als Ausgangsbasis dienen drei verschiedene Stammlösungen aus denen in jeweils unterschiedlichem Mischungsverhältnis die gebrauchsfertigen Puffer hergestellt werden.

Herstellung der Stammlösungen

Da die fertigen Stammlösungen auch bei Kühlung jeweils nur drei Tage haltbar sind, wurden sie zweimal wöchentlich angesetzt.

- Lösung A: Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 0.2 M (36 g Dihydrat / 1l aqua dest.)
- Lösung B: Citronensäure-Monohydrat 0.1 M (21 g Citronensäure-Monohydrat / 1l aqua dest.)
- Lösung C: 7.5 g Glycin / 1l aqua dest.

Herstellung der gebrauchsfertigen Pufferlösungen

Aus den Stammlösungen werden die jeweils für den Tag benötigten Pufferlösungen hergestellt und exakt mit einem pH-Meter auf den vorgegebenen pH-Wert eingestellt.

- Puffer pH 7.00: 820 ml Lösung A
180 ml Lösung B
- Puffer pH 4.70 240 ml Lösung A
280 ml Lösung B
480 ml aqua dest.
- Puffer pH 4.30: 425 ml Lösung A
575 ml Lösung B
- Puffer pH 2.70: Lösung C wird mit verdünnter HCl (2 mol/l)
vorsichtig auf pH 2.7 eingestellt
- Citratpuffer: Stammlösung B

Einleitung von Heliumgas in die Pufferlösungen

Abschließend werden die gebrauchsfertigen Pufferlösungen in 500 ml Flaschen umgefüllt. Da eventuell vorhandene kleinste Luft- bzw. Gasbläschen die Messung stören und deshalb nicht in das Analysensystem gelangen dürfen, wird ein Heliumgas durch die Pufferlösungen geleitet. Nach 3 Minuten sind die Pufferlösungen gebrauchsfertig.

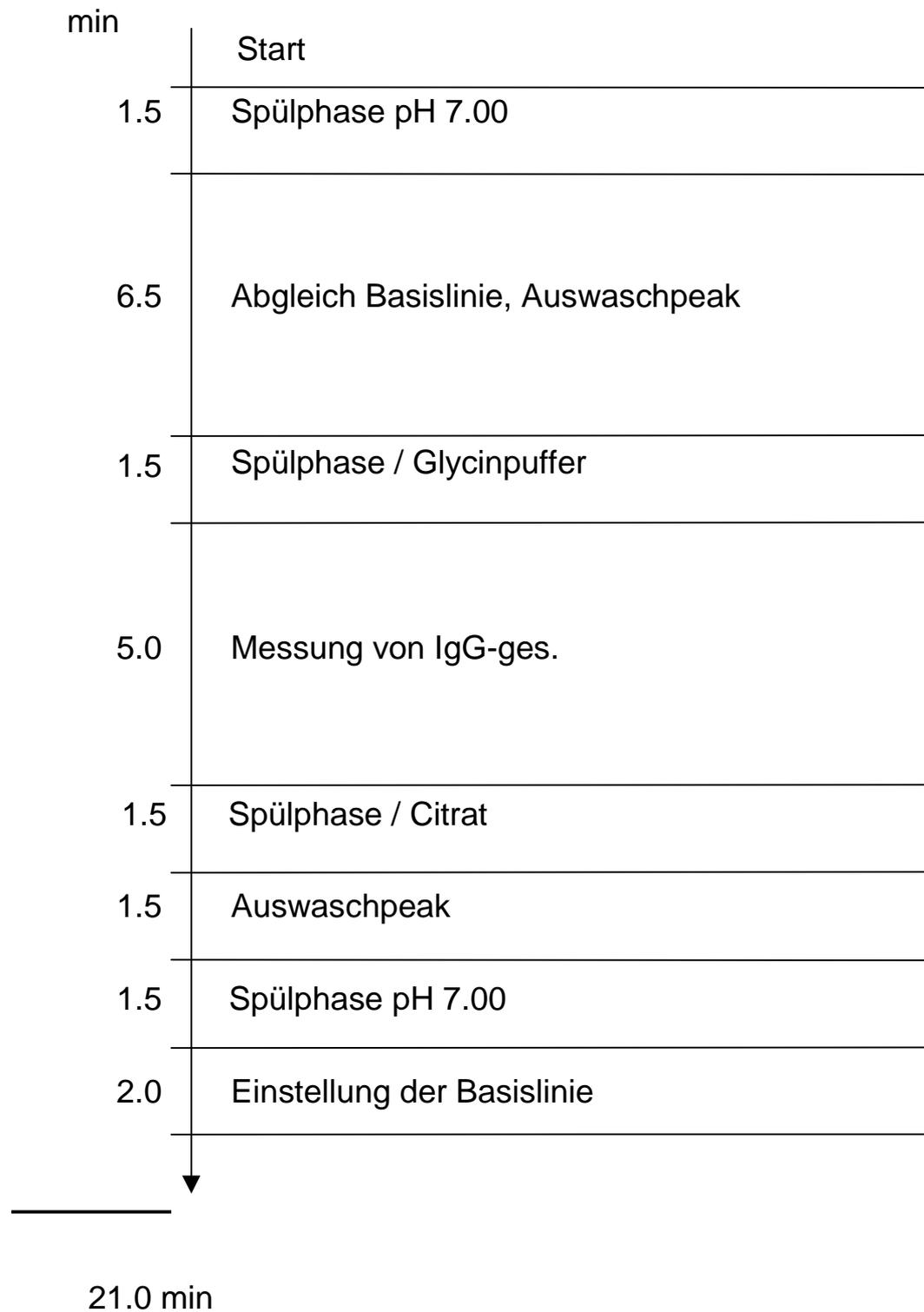
3.1.1.2. Testdurchführung

Gerätevorbereitung

Vor Beginn der Messung wird das gesamte Analysensystem 20 Minuten bei einer Flußrate von 1ml/min mit Basispuffer durchgespült. Danach wird die jeweils benötigte HiTrap-Säule installiert. Die für den vorgesehenen Messvorgang benötigten Pufferlösungen werden bereitgestellt und die einzelnen Pumpenschläuche eingebracht. Es ist zu beachten, dass sich keine Luftblasen an den Ansaugfiltern bilden und dass die für die gesamte Serie jeweils benötigte Puffermenge bei Raumtemperatur vorliegt. Ein 15-minütiges Wasch-/Spülprogramm spült dann zunächst das gesamte System mit Basispuffer, im Anschluß werden die einzelnen Kanäle/Schläuche mit der für die Messung benötigten Pufferlösung mit einer Flußrate von 10ml/min durchgespült, abschließend erfolgt ein Spülgang, der auch die Säule mit einschließt und eine Flußrate von 1 ml/min aufweist.

Wie im nachfolgenden Flussdiagramm dargestellt, benötigt man zur Analyse eines Serums ca. 70 Minuten. Da die Bestimmung von IgG1 und IgG2 direkt im Anschluss an die jeweilige Messung von IgG-gesamt auch einen Wechsel der Säulen und der Pufferlösungen bedingt und dadurch einen hohen Zeitaufwand darstellt, werden erst alle IgG-Messungen durchgeführt, danach das Gerät gespült, die Säule gewechselt, dann die Messung von IgG1 und IgG2 angeschlossen.

Bei optimalem Ablauf der Messungen können täglich maximal 5 Seren (jeweils eine Kontrolle und vier Patientenseren) gemessen werden.

Zeitlicher Ablauf der Messung von IgG-gesamt:

Anschließend erfolgt nach gründlicher Spülung des Analysensystems der Säulen- und Pufferwechsel zur Messung von IgG2 und IgG1.

Bestimmung von IgG-gesamt

Zur Bestimmung von IgG-gesamt werden drei verschiedene Puffer benötigt::

Basispuffer (Natriumphosphat-Citrat-Puffer) pH 7.00

Glycin - Puffer pH 2.70

Citrat – Puffer (Lösung B)

In ein Probengefäß wird 1 ml frisches oder unmittelbar vor der Bearbeitung aufgetautes, durch vorsichtige Drehbewegungen (wegen der labilen Brückenbindungen) homogenisiertes Serum gegeben. Das Gefäß wird in die entsprechende Position des Probenellers des Autosamplers A900 gestellt. Zur Messung werden 300 µl Serum angesaugt (ca. 100 µl sind Totvolumen für den Vorlauf, genau 100 µl Serum werden auf die HiTrap-1ml-Säule mit immobilisiertem Staphylokokkenprotein-G aufgetragen und nochmals ca. 100 µl Serum werden für den Nachlauf benötigt).

Die Messung wird mit einer zweiminütigen Vorspülphase mit dem Basispuffer gestartet. Danach dient eine kurze Vorlaufphase zur Einstellung der Basislinie. Nach ca. drei Minuten beginnt der Peak, der das Auswaschen der ungebundenen Anteile mit dem Basispuffer signalisiert. Nach sieben Minuten ist dieser Vorgang beendet und das Niveau der Basislinie erreicht. Nach einem zweiminütigen Vorlauf mit Glycinpuffer beginnt der eigentliche Messvorgang: während im Chromatogramm der zweite Peak entsteht, wird das an das Staphylokokkenprotein G gebundene IgG-gesamt mit Glycinpuffer von der Säule eluiert. Im Anschluß daran werden nach einer weiteren Vorspülphase mit Citratpuffer die restlichen, auf der Säule verbliebenen Verunreinigungen mit Citratpuffer abgespült. Am Ende des Messvorgangs erfolgt die erneute Einstellung der Basislinie mit dem Basispuffer. Der reine Messvorgang dauert 15 Minuten, unter Berücksichtigung der Spülphasen werden ca 20 Minuten pro Messung benötigt. Nach Abschluss einer Analysenserie muß die Säule nach dem Entfernen aus dem Analysensystem noch einmal per Hand mit Citratpuffer durchgespült und anschließend mit Basispuffer wieder neutralisiert werden.

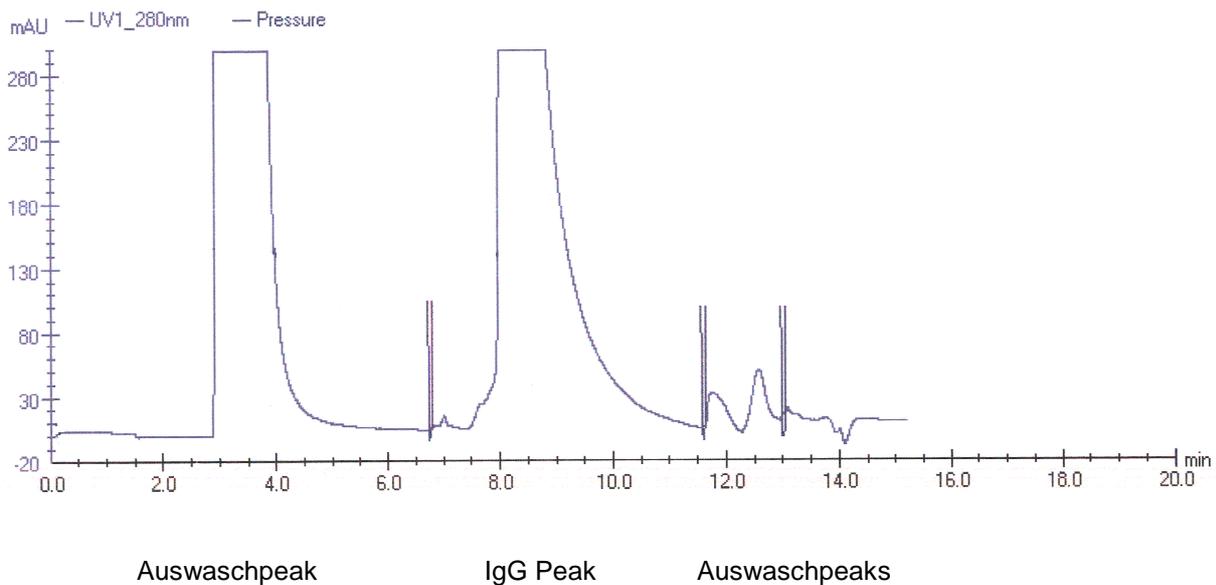
In der Anfangsphase erfolgte im Anschluss an die jeweilige Messung die computergestützte Auswertung der Chromatogramme mit Hilfe eines speziell entwickelten Rechenprogramms (Unicorn Software).

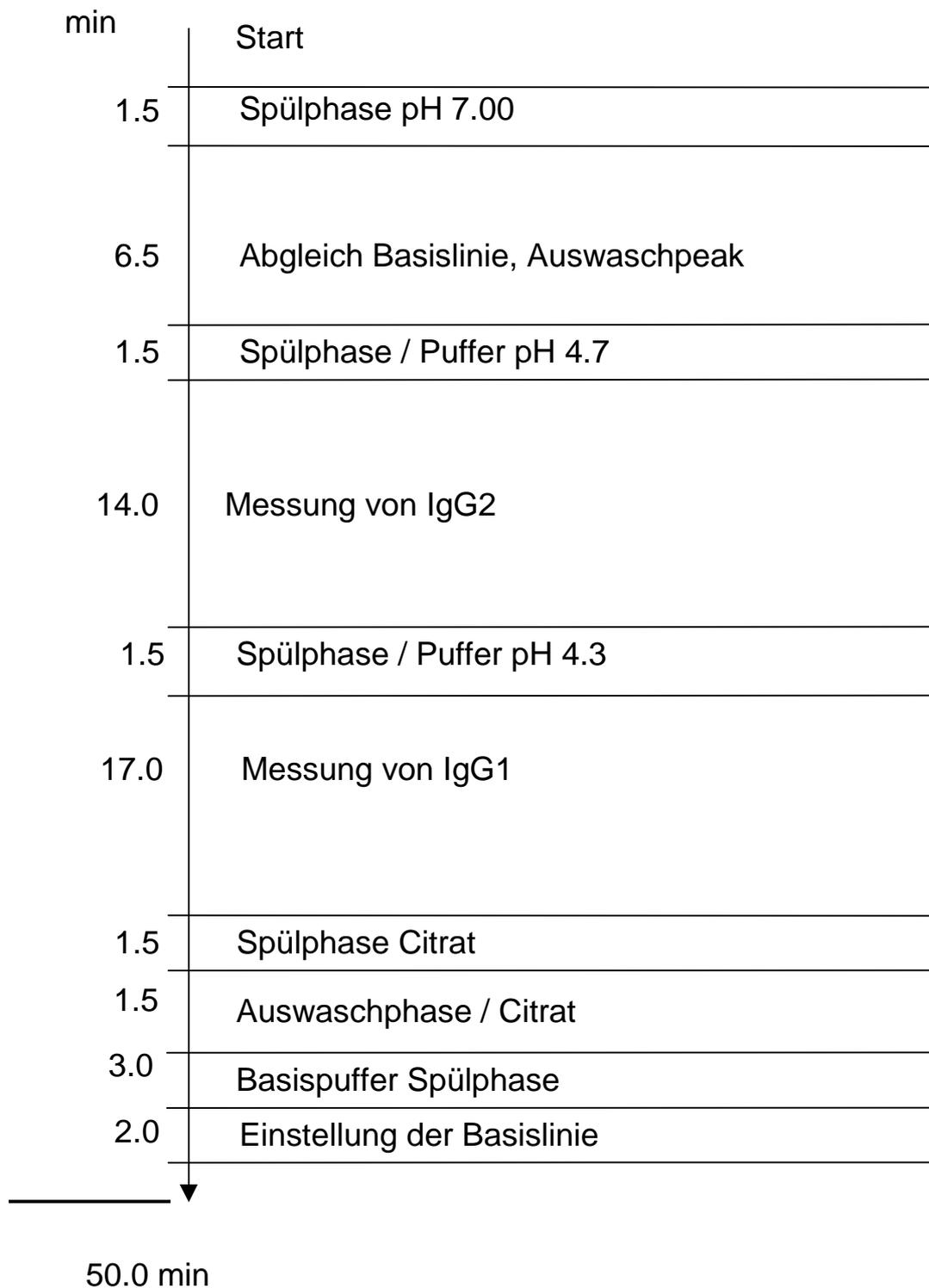
Im Verlauf der Studie stellte sich heraus, dass eine externe spektralphotometrische Messung der Eluate mit einer geringeren Impräzision einhergeht (siehe Abschnitt 5.1.1.: Fehlerquellen).

Ein zusätzlich in das Gerätesystem integrierter Fraktionssamplern ermöglichte das zur externen Messung notwendig gewordene Auffangen der Eluate. Diese wurden jeweils am Ende einer Serie bei einer Wellenlänge von 278 nm gegen den zur aktuellen Messung verwendeten Puffer als Probenleerwert gemessen (für IgG-gesamt Glycin pH 2.70, für IgG1 Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.30, für IgG2 Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.70).

Dazu wurden die mittels Fraktionssamplern in 10 ml-Reagenzröhrchen aufgefangenen Eluate in Glaskölbchen zusammengekippt, vorsichtig homogenisiert und anschließend bei 278 nm gemessen. Es erfolgte jeweils eine Doppelmessung, der Mittelwert der beiden Extinktionen diente dann zur Berechnung der Konzentration. Nach Multiplikation der Extinktion mit dem für diese Wellenlänge spezifischen Faktor 1.58 erhält man das endgültige Ergebnis der Messung in mg/ml.

Abb. 5: Chromatogramm IgG-gesamt



Zeitlicher Ablauf der Messung von IgG1 und IgG2

Bestimmung von IgG2 und IgG1

Zur Bestimmung von IgG2 und IgG1 werden vier verschiedene Puffer benötigt:

Basispuffer (Natriumphosphat-Citrat-Puffer) pH 7,00

Puffer (Natriumphosphat-Citrat-Puffer) pH 4,70

Puffer (Natriumphosphat-Citrat-Puffer) pH 4,30

Citrat-Puffer (Lösung B)

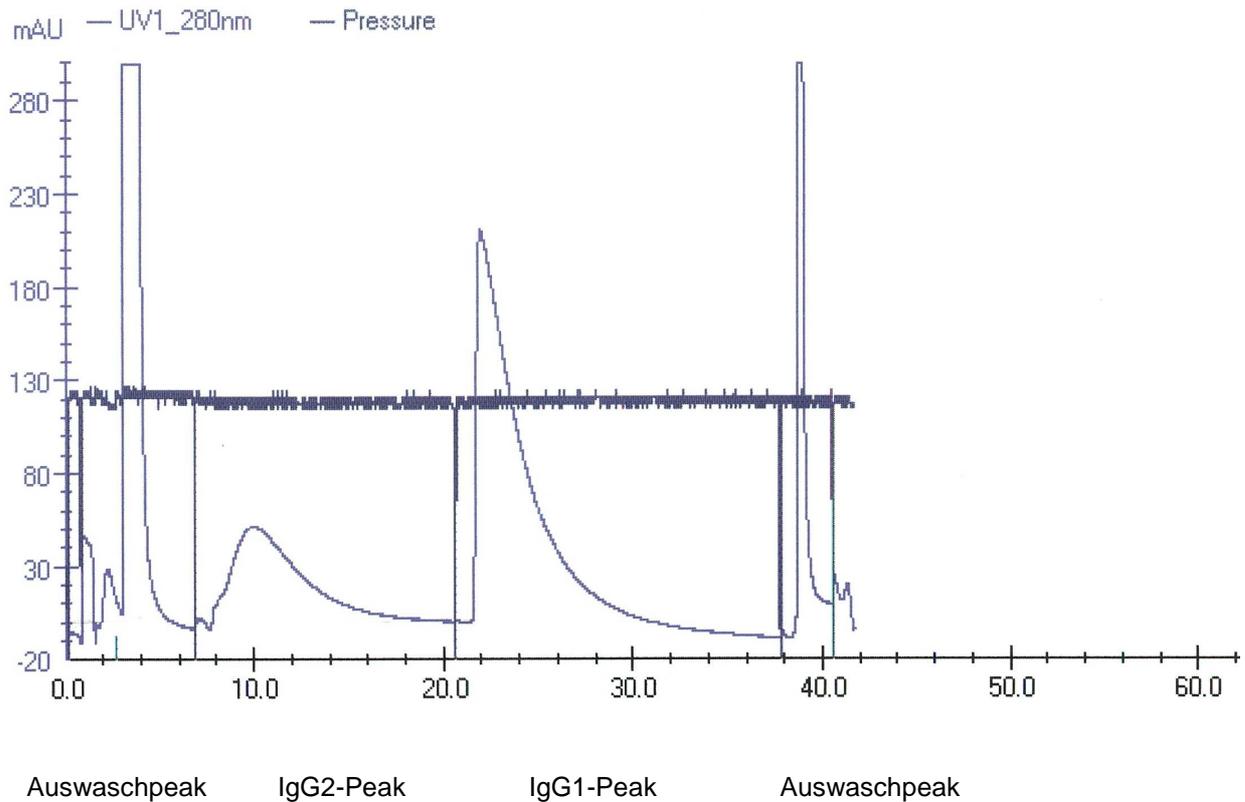
Vor dem Einsetzen der Säule muß das gesamte System mit dem Basispuffer und anschließend die einzelnen Kanäle mit den zur Analyse jeweils benötigten Pufferlösungen vorgespült werden (Dauer 15 Minuten). Danach kann die Säule (HiTrap 1ml Säule mit immobilisiertem Staphylokokkenprotein A) eingesetzt und ein weiterer Wasch-/Spülvorgang angeschlossen werden.

Zur Bestimmung von IgG1 und IgG2 werden erneut 300 µl Serum verbraucht. Nachdem die Säule mit 100 µl Serum beschickt wurde, wird zuerst wieder der ungebundene Anteil mit dem Basispuffer pH 7.00 von der Säule eluiert. Danach erfolgt die Vorspülphase mit Natrium-phosphat-Citrat-Puffer pH 4.70. Mit diesem Puffer werden zuerst die Anteile des IgG2 entfernt. Im Diagramm erscheint der erste, meist niedrigere IgG2-Peak, der sich in einem relativ flach verlaufenden Tailing der Basislinie nähert. IgG1 wird danach mit Natriumphosphat-Citrat-Puffer pH 4.30 eluiert. Es folgt ein erneuter Spülvorgang von 2 Minuten. Der sich anschließende Anstieg des IgG1-Peaks verläuft relativ steil, darauf folgt ein gleichmäßiger Abfall bis zur Basislinie.

Nach der Messung werden die auf der Säule verbliebenen Reste mit Citratpuffer abgespült und anschließend mit Puffer pH 7.00 der Basiswert eingestellt.

Die Gesamtdauer der Detektion von IgG1 und IgG2 beträgt ca. 54 Minuten, wodurch sich eine komplette Messzeit von IgG-gesamt, IgG1 und IgG2 von über einer Stunde ergibt. Abschließend erfolgt – wie bei IgG-gesamt beschrieben - die Messung der Eluate am externen Spektralphotometer sowie die Berechnung der Endergebnisse.

Abb. 6: Chromatogramm IgG2 und IgG1



3.1.2. Nephelometrie

Die Nephelometrie nutzt das Phänomen der Antigen-Antikörper-Bindung über die Umwandlung von Streulicht in elektrische Signale. Dabei reagieren gelöste Antigene mit den gegen sie gerichteten Antikörpern und bilden unlösliche Antigen-Antikörper-Komplexe. Die dadurch entstehenden Immunkomplexe verursachen eine Trübung und vermögen so einen durch die Lösung geschickten Lichtstrahl zu streuen. Das Streulicht wird über ein Linsensystem auf einen Photodetektor fokussiert und in elektrische Signale umgewandelt, die direkt proportional zur Intensität des gestreuten Lichts sind. Die jeweiligen Konzentrationen werden durch einen Vergleich von mitgeführten Standardkurven errechnet.

Die parallele Vermessung eines Teils der affinitätschromatographisch bestimmten IgG-Subklassen erfolgte am BN II der Firma DadeBehring mit Antikörpern (IgG-Subklassen BNA Kombi-Kit, Bestell-Nr. LK001.G mit der Lot-Nr. 029715) der Firma The Binding Site.

Die Seren wurden parallel zur Affinitätschromatographischen Subklassenbestimmung gemessen. Zur Bestimmung von IgG sowie IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 werden insgesamt 300 µl Serum in die vorgesehenen Probengefäße pipettiert.

Die Serumproben werden automatisch 1: 400 mit Diluent verdünnt und anschließend gemessen. Reicht diese Verdünnung nicht aus, so erfolgt automatisch eine höhere Verdünnung der jeweiligen Probe, um eine Messung im linearen Bereich der Standardkurve zu gewährleisten.

In jeder Analysenserie wurden die im Kombi-Kit enthaltenen Kalibratoren und Kontrollen (high und low) mitgeführt. Die Konzentrationen der IgG-Subklassenkontrollen sind jeweils auf dem Flaschenetikett angegeben. Als maximale Abweichung sind 15 % vom Sollwert zulässig.

Die Summe der IgG-Subklassen-Konzentrationen wurden mit der Gesamt-IgG-Konzentration verglichen, bei Abweichungen > 20 % vom Gesamt-IgG-Wert wurde die Probe mit einer höheren Verdünnung erneut gemessen.

3.2. Methoden zur Bestimmung onkologischer Biomarker

Im Gegensatz zu den Veränderungen im IgG-Subklassenmuster, die letztlich auf immunologische Reaktionen zurückzuführen sind, ist die Konzentration der onkologischen Biomarker von verschiedenen In-vivo-Einflussgrößen (Tumormasse, Tumorausbreitung und Blutversorgung des Tumors, sowie Synthese und Freisetzung der Substanz) abhängig. Die meist niedrigen Serumkonzentrationen onkologischer Biomarker (bei Gesunden) können nur mit hochempfindlichen Nachweismethoden bestimmt werden, z. B. mit immunchemischen Methoden, die über eine Antigen-Antikörper-Reaktion nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an ein Epitop des jeweiligen Proteins binden. Hochmolekulare Antigene wie Tumormarker können durch so markierte Reaktionspartner auch in geringen Konzentrationen detektiert werden.

Diese herkömmlichen, allgemein gebräuchlichen immunchemischen Nachweismethoden basieren auf kompetitiven und nicht kompetitiven Testverfahren.

Bei den kompetitiven Tests liegt eine konstante Menge an markiertem Antigen vor, das Serum mit dem zu bestimmenden Antigen und dem spezifischen Antikörper wird hinzugegeben. Radioaktiv markiertes Antigen und freies Antigen konkurrieren um den Antikörper. Die Menge der radioaktiv markierten Antigen-Antikörper-Komplexe ist umgekehrt proportional zu der Menge an Antigen im untersuchten Material.

Bei den nicht kompetitiven Tests liegt der markierte Antikörper im Überschuß vor. Das zu bestimmende Antigen wird zwischen einem Festphasen-Antikörper und dem im Überschuss zugegebenen markierten Antikörper gebunden (Sandwich-Assay). Die Konzentration des gebundenen markierten Antikörpers ist proportional der Konzentration des zu bestimmenden Antikörpers.

Bei der Bestimmung der onkologischen Biomarker besteht eine starke Methodenabhängigkeit. So können mit Kits verschiedener Herstellerfirmen im gleichen Serum völlig unterschiedliche Werte gemessen werden. Diese Schwankungen können auch dann auftreten, wenn es sich im Prinzip um dieselbe Methode und identische Antikörper handelt.

3.2.1. CEA

Das carcinoembryonale Antigen (CEA) wurde erstmals 1965 von Gold und Freedman (7) als tumorassoziiertes Antigen beschrieben. Ursprünglich wurde angenommen, dass CEA spezifisch für Krebserkrankungen des Verdauungstraktes sei. In den folgenden Jahren stellte sich heraus, dass erhöhte Werte auch bei anderen Malignomen und bei verschiedenen benignen Erkrankungen auftreten können (19, 20, 35).

Das Carcinoembryonale Antigen gehört zur Gruppe der carcinoembryonalen Antigene, die während der Embryonal- und Fetalzeit gebildet werden und im Serum gesunder Erwachsener nur in geringer Konzentration vorkommen.

CEA ist Biomarker der ersten Wahl für das Kolonkarzinom und in Kombination mit CA 15-3 für das Mammakarzinom. Das CEA hat sich besonders bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zur Therapieüberwachung und zur Verlaufsbeurteilung bewährt.

CEA wurde im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen gynäkologischen Erkrankungen, bei Patientinnen mit Erkrankungen der Mamma und bei Patienten mit

benignen bzw. malignen gastrointestinalen Erkrankungen mit einem Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA) am AxSYM Analysengerät der Firma Abbott USA bestimmt.

3.2.2. CA 15-3

Cancer Antigen 15-3 (CA 15-3) ist ein im Serum zirkulierendes muzinöses Glycoprotein und wird besonders bei Patientinnen mit Mammakarzinom ins Serum abgegeben. (34, 35).

CA 15-3 stellt den Biomarker der ersten Wahl bei der Verlaufs- und Therapiekontrolle des Mammakarzinoms dar. Eine erhöhte Serumspiegel korreliert statistisch mit dem Status der Erkrankung.

Die Bestimmung des CA 15-3-Wertes im Serum erfolgte mittels „ECLIA“ (Sandwichprinzip, **ElektroChemiLumineszenzImmuno Assay**) am Elecsys 2010 (Immunoassay Analysensystem der Firma Roche Deutschland).

3.2.3. CA 19-9

Carbohydrate Antigen 19-9 (CA 19-9) ist ein Glykolipid, welches in fetalem Epithel von Magen, Pankreas und Darm sowie in Leber und Lunge von Erwachsenen vorkommt. Zudem ist es Bestandteil vieler Schleimhautzellen.

CA 19-9 gilt als Biomarker der ersten Wahl bei der Differentialdiagnose und der Verlaufskontrolle von Pankreas-Karzinom-Patienten.

Die Durchführung dieser Tests (Sandwichprinzip, „ECLIA“ **ElektroChemiLumineszenz ImmunoAssay**) erfolgte am Elecsys 2010 (Immunoassay Analysensystem der Firma ROCHE Mannheim), Probenmaterial war ebenfalls Serum).

3.2.4. CA 72-4

Cancer Antigen 72-4 (CA 72-4) ist ein im Serum zirkulierendes, mizinähnliches Glykoprotein, das vorwiegend bei Adenokarzinomen nachgewiesen wird, aber auch in fetalem Gewebe wie Kolon, Magen und Ösophagus vorkommt (8).

Besonders bei Patienten mit Magenkarzinom wird von den Epithelzellen vermehrt CA 72-4 exprimiert. Die diagnostische Sensitivität ist hier höher als die von CA 19-9 und CEA. Statistisch besteht eine Korrelation zwischen Krankheitsstadium und CA 72-4 Erhöhung.

Der Biomarker CA 72-4 dient - gegebenenfalls in Kombination mit CEA und CA 19-9 - vor allem zur Therapie- und Verlaufskontrolle bei Patienten mit Magenkarzinom. In der vorliegenden Studie finden sich nur wenige Patienten mit Magenkarzinom. Da aber auch erhöhte CA 72-4 Werte beim mizinösen Ovarialkarzinom gefunden werden, bestimmten wir CA 72-4 bei Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen sowie mit benignen gynäkologischen Erkrankungen in Kombination mit CEA und CA 125.

Die Bestimmung von CA 72-4 (Sandwichprinzip, „ECLIA“ ElektroChemiLumineszenz ImmunoAssay) erfolgte am Elecsys 2010 (Immunoassay Analysensystem der Firma ROCHE Mannheim), als Probenmaterial wurde Serum verwendet.

3.2.5. CA 125

Cancer Antigen (CA 125), ein mucinähnliches Glycoprotein, ist ein mit nicht mucinösem epithelalem Ovarialkarzinom assoziiertes Oberflächenantigen. Das Protein wird von der Oberfläche der Ovarialkarzinomzellen produziert und in Serum oder Aszites abgesondert.

CA 125 dient vor allem postoperativ zur Beurteilung des therapeutischen Erfolgs und zur Überwachung des Krankheitsverlaufs bei Patientinnen, die sich einer Ovarialkarzinom-Behandlung unterzogen haben. CA 125 ist der wichtigste onkologische Biomarker zur Therapie- und Verlaufskontrolle besonders bei Patientinnen mit serösem Ovarialkarzinom (8, 12, 13).

Zur Bestimmung des CA 125 dient ein nach der Sandwichmethode an zwei Stellen ansetzender Immunoassay mit direkter Chemilumineszenz-Technologie, bei dem zwei CA 125 - spezifische Maus-Antikörper verwendet werden (Kryptor, Brahms).

3.2.6. PSA

Das prostataspezifische Antigen ist eine Serinprotease, die eine ähnliche Wirkung wie Chymotrypsin besitzt. PSA ist ein Glykoprotein aus 237 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 30000 Dalton.

PSA wird hauptsächlich im Drüsenepithel der Prostata produziert, aber auch in geringen Mengen bei Mammakarzinomen, bei Neoplasien der Speicheldrüse, in den Zellen der männlichen Urethra, im Blut, in der Muttermilch und im Urin gefunden. Die Bestimmung von PSA dient in Verbindung mit der digital-rektalen Untersuchung (DRU) zur Differentialdiagnose eines Prostatakarzinoms.

Sowohl bei der Erstdiagnose eines Prostatakarzinoms als auch bei einem Tumorrezidiv oder dem Vorliegen von Tumorrestgewebe nach Operationen kann die Bestimmung des PSA-Wertes von klinischem Nutzen sein.

Die Konzentration des PSA wurde mit dem AxSYM Gesamt-PSA Assay, einem Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA) am AxSYM Analysengerät der Firma Abbott bestimmt; Probenmaterial war, wie bei allen parallel vermessenen Proben, jeweils Serum.

3.2.7. fPSA

Das prostataspezifische Antigen liegt im Blut in drei Formen vor, von denen die wichtigste immunologisch nachweisbare Form das an den Serinprotease-Inhibitor Alpha-1-Antichymotrypsin (PSA-ACT) gebunden ist (22). Eine weitere, im Serum in geringen Mengen nachweisbare Form ist das freie PSA, eine inaktive Form, die nicht an Proteaseinhibitoren gebunden ist. Die dritte PSA-Form, die einen Komplex mit Alpha-2-Makroglobulin bildet, wird derzeit routinemäßig immunologisch noch nicht nachgewiesen.

Der Anteil des freien PSA am PSA-Gesamt kann zur differenzialdiagnostischen Abklärung herangezogen werden, da der Anteil an freiem PSA im Serum von Patienten mit Prostatakarzinom (aber auch bei akuten Prostatiden) signifikant niedriger ist als bei Patienten mit einem Prostataadenom (21-24).

Die Konzentration des freien PSA im Serum wurde mit dem AxSYM Freies PSA Assay, einem Mikropartikel-Enzymimmunoassay (MEIA) am AxSYM Analysengerät der Firma Abbott bestimmt.

3.3. Statistische Methoden

3.3.1. Analytische Qualität einer Analysenmethode

Analytische Spezifität

Die Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, negative Ergebnisse als solche zu erkennen. Die Spezifität eines Tests zeichnet sich dadurch aus, richtig negative Werte zu messen. Je weniger falsch-positive Ergebnisse ein Test liefert, um so spezifischer ist er.

Nachweisgrenzen

Die Untersuchungen aus Graz hatten ergeben, dass hämolytische, ikterische und insbesondere lipämische Seren häufig keine ausreichend genaue Messungen ergeben, da dies meist zu Störsignalen zwischen den einzelnen Peaks führte und eine Auswertung der Chromatogramme nicht möglich war. In der vorliegenden Studie wurden solche Seren deshalb nicht untersucht.

Präzision

Intra-Assay-Varianz

Die Intra-Assay-Varianz beschreibt die Präzision innerhalb einer Analysenserie und ist ein Maß für die Streuung der Werte innerhalb einer Messreihe. Dabei wird eine Probe mehrmals hintereinander in einer Messreihe gemessen und aus den einzelnen Ergebnissen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Inter-Assay-Varianz

Die Inter-Assay-Varianz beschreibt die Präzision von Tag zu Tag und ist ein Maß für die Streuung der Werte zwischen verschiedenen Messreihen. Dabei wird jeweils ein

Aliquot einer Probe in verschiedenen Messreihen (an verschiedenen Tagen) gemessen. Aus den erhaltenen Ergebnissen wird der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

3.3.2. Diagnostische Qualität einer Analysenmethode

Diagnostische Spezifität

Die diagnostische Spezifität beschreibt die Fähigkeit eines Testes, Gesunde als gesund zu erkennen. Je weniger falsch positive (pathologische) Ergebnisse ein Test liefert, desto spezifischer ist er.

Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität beschreibt die Fähigkeit eines Testes, bei Erkrankten richtig positive - pathologische - Werte zu ermitteln. Spezifität und Sensitivität eines Testes sind aneinander gekoppelt und nur in ihrer Kombination diagnostisch relevant.

3.3.3. ROC – Kurven

Zur besseren Einschätzung der klinischen Aussagekraft eines Testverfahrens werden Sensitivitäts-Spezifitäts-Diagramme, sog. ROC-Kurven (receiver-operating-characteristic-curves) erstellt. Auf der Abszisse wird die Spezifität, auf der Ordinate die Sensitivität aufgetragen. Im Idealfall liefert ein onkologischer Biomarker mit einer guten diagnostischen Trennschärfe eine Kurve, die entlang der Ordinate bis zur linken oberen Ecke steil ansteigt und sich dann asymptotisch einer Parallelen zur Abszisse nähert. Je weiter die Kurve nach rechts verschoben ist und je flacher sich der Kurvenverlauf darstellt, desto geringer ist die Aussagekraft der jeweiligen Methode. Wird der Kurvenverlauf zur Diagonalen, so besteht generell keine Trennschärfe zwischen den untersuchten Kollektiven.

4. Material bzw. Patientenproben

4.1. Behandlung der Proben bei Blutentnahme

Um präanalytische Beeinflussungen zu minimieren, wurden die Blutproben einheitlich behandelt: 20 – 40 Minuten nach der Entnahme aus der Armvene wurde das Probenmaterial 15 Minuten bei 3000 Umdrehungen zentrifugiert und das Serum vom Blutkuchen getrennt.

4.2. Behandlung der Proben nach Blutentnahme

Obwohl die Untersuchungen zur Stabilität keinen eindeutigen Hinweis auf die Notwendigkeit der Zugabe von SOD als Stabilisator ergab, haben wir aufgrund der Ergebnisse aus Graz allen Seren innerhalb von 4 Stunden nach Abnahme und Zentrifugation SOD zugegeben (0.025 ml SOD / 2 ml Serum) und diese in 1 ml Portionen bei minus 80⁰ Celsius bis zur Verarbeitung tiefgefroren. Einmal aufgetaute Seren wurden nicht wieder eingefroren.

4.3. Zusammensetzung des Kollektivs

Das untersuchte Kollektiv setzt sich aus drei Subkollektiven zusammen: gesunde Personen, Patienten mit benignen Erkrankungen und Patienten mit malignen Erkrankungen.

Gesunde

Es wurden nur gesunde Personen ausgewählt, die nach klinisch-chemischer Untersuchung unauffällige Werte aufwiesen; Blutspender wurden wegen einer möglichen Zellproliferation nicht in das Kollektiv aufgenommen. Bei breit gefächerter Altersverteilung (Alter 18 – 75 Jahre) waren 15 Personen männlichen (m) und 33 Personen weiblichen (w) Geschlechts (Tab.1: Gesunde Personen).

Bei 10 Probanden aus diesem Subkollektiv wurden jeweils 20 – 30 ml Blut aus der Armvene entnommen. Mit diesem Material wurden die Analysen zur Überprüfung der

Stabilität durchgeführt. Dazu wurde einem Teil des Serums nach dem Zentrifugieren und Dekantieren Superoxiddismutase (SOD) als Stabilisator zugesetzt. Das Material wurde so aliquotiert, dass Proben zur Messung nach 2, 4, 8, 16 und 24 Stunden zur Verfügung standen, weitere Proben wurden bei minus 80° Celsius bzw. bei minus 20° Celsius tiefgefroren. Mit dem zweiten Teil des Materials wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren, hier wurde kein Stabilisator hinzu gefügt (Tab.4: Stabilität).

Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen

Bei den Patientenseren fand keine Vorselektion statt. Im Sinne der prospektiven Studie wurden die Messungen in Unkenntnis des klinischen Hintergrundes durchgeführt. Auf diese Weise konnte eine Verteilung von Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen entsprechend der Prävalenz der Erkrankungen in unserer Klinik erreicht werden. Erst in Kenntnis der genaueren Klinik fand die Zuordnung in das jeweilige Subkollektiv statt, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Proben vor Therapie jeglicher Art entnommen waren, mit Ausnahme der chronischen nicht malignen Erkrankungen. Allerdings wurde dadurch eine weit größere Anzahl von Patientenseren untersucht.

Patienten mit benignen Erkrankungen

Diese Gruppe bestand aus 374 Patienten (191 m, 183 w) mit benignen Erkrankungen verschiedenster Organsysteme. Patienten, bei denen mehrere Grunderkrankungen vorlagen oder bei denen verschiedene Organsysteme betroffen waren, wurden nicht in das Subkollektiv aufgenommen.

Tab. 1: Zusammensetzung des Kollektivs: gesunde Personen und Patienten mit benignen Erkrankungen

Gesunde Personen	n	=	48
Patienten mit benignen Erkrankungen			
benige Lungenerkrankungen	n	=	16
benigne Mammaerkrankungen	n	=	26
benigne gynaekologische Erkrankungen	n	=	115
benigne gastroenterol. Erkrankungen	n	=	75
benigne urologische Erkrankungen	n	=	73
benigne Prostataerkrankungen	n	=	55
Autoimmunerkrankungen	n	=	14

Patienten mit malignen Erkrankungen

In dieser Gruppe wurden 376 Patienten (164 m, 212 w) mit malignen Tumoren unterschiedlicher Organsysteme untersucht; sowie 17 Patienten bei denen nach erfolgreicher Therapie kein erneutes Tumorwachstum festgestellt wurde. Diese 17 Patienten wurden aus dem Kollektiv entfernt.

Tab. 2: Zusammensetzung des Kollektivs maligne Erkrankungen

Patienten mit malignen Erkrankungen			
Lungenkarzinome	n	=	58
Mammakarzinome	n	=	82
Gynaekologische Karzinome	n	=	58
Gastroenterologische Karzinome	n	=	46
Kolorektale Karzinome	n	=	45
Prostatakarzinome	n	=	32
Urologische Karzinome	n	=	34
Sonstige	n	=	21

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der methodischen Evaluierung

5.1.1. Methodische Probleme bzw. Fehlerquellen

Die Untersuchungen im Rahmen der methodischen Evaluierung zeigten, dass die affinitätschromatographische Bestimmung der IgG-Subklassen von zahlreichen Störfaktoren beeinflusst werden kann. **Fehlerquellen**, die eine exakte Bestimmung der IgG-Subklassen verhindern, ergaben sich insbesondere bei

- **der Herstellung und Verwendung der Pufferlösungen**
 - **der Wartung des Analysensystems**
 - **der Aufzeichnung der Chromatogramme.**
-
- Herstellung und Verwendung der Pufferlösungen
 Im Rahmen der methodischen Evaluierung wurde zu Beginn der Studie geprüft, welche Methode sich am besten zur **Herstellung** der Puffer eignet. Von der Grazer Arbeitsgruppe war bekannt, dass die Haltbarkeit der gebrauchsfertigen Pufferlösungen nur 1 – 2 Tage beträgt und dass schon geringste Verunreinigungen die Reproduzierbarkeit der Messungen erheblich beeinflussen. Da die Herstellung der Pufferlösungen sehr zeitintensiv ist, wurde entschieden, dass die einzelnen Puffer von der hauseigenen Apotheke bereitgestellt werden sollten. Die sterilisierten und so vergleichsweise lange haltbaren Lösungen wurden in 500 ml Flaschen zur Verfügung gestellt.
 Die während der ersten Wochen durchgeführten Untersuchungen ergaben eine Diskrepanz bei der Messung des Wertes von IgG-gesamt im Vergleich zu den Ergebnissen, die aus der Messung der Subklassen IgG1 und IgG2 resultierten. Die Differenz war zu hoch, als dass sie mit den fehlenden Anteilen der nicht erfassten Subklassen IgG3 und IgG4 hätte erklärt werden können.
 Als Fehlerursache wurden zunächst gerätetechnische Mängel (Verunreinigung im Schlauchsystem, Verschleppung) vermutet.

Deshalb wurden Kontrollmessungen des Leerwertes durchgeführt, wobei auf beide Säulen an Stelle von Serum Basispuffer pH 7.00 appliziert wurde. Sowohl die Leerwert-Messung von IgG-gesamt als auch die der Subklassen zeigten keine auffälligen Abweichungen (z.B. eine Verschiebung der Basislinie bzw. einen erhöhten Leerwert).

Schließlich wurde untersucht, ob sich die affinitätschromatographisch ermittelten Werte durch eine andere Methode bestätigen lassen (siehe Tabelle 1). Daraufhin wurde ein Teil der Seren am BN II mit Antikörpern der Firma The Binding Site gemessen. Zusätzlich wurden mehrere Messungen mit Referenzseren (high und low) der Firma The Binding Site durchgeführt. Diese vergleichenden Messungen (ÄKTA basic 10 XT und BN II) ergaben für IgG-gesamt nur gering abweichende Werte, die Wiederfindung bei den Messungen von IgG1 und IgG2 waren deutlich niedriger als die am Nephelometer gemessenen Werte. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl bei den Patientenseren als auch bei den Kontrollseren.

Tab. 3: **Abweichungen von den Sollwerten** (Kontrollseren high / low) bei den affinitätschromatographischen Messungen (ÄKTA) und im Gegensatz dazu die nephelometrisch (BN II) ermittelten Werte

	IgG gesamt	IgG1	IgG2
ÄKTA			
Kontrolle high	13,06	7,86	4,58
	13,51	5,65	3,1
	13,49	5,69	3,1
	12,88	5,88	3,22
Kontrolle low	7,57	4,39	2,47
	7,17	2,48	1,36
	7,21	2,47	1,33
	6,87	2,39	1,24
BN II			
Kontrolle high	13,06	7,86	4,58
	12,95	7,15	4,57
	13,75	7,95	4,96
	13,78	7,44	4,87
Kontrolle low	7,57	4,39	2,47
	8,02	4,35	2,41
	8,06	4,47	2,57
	7,64	4,82	2,66

In Rücksprache mit der Grazer Arbeitsgruppe wurde nun die pH-Einstellung sowie die Stabilität des pH-Wertes der Pufferlösungen überprüft. Es stellte sich heraus, dass der pH-Wert der in der Apotheke hergestellten sterilen Pufferlösungen bei der laborinternen pH-Messung beim Basispuffer bei pH 7.08 (Soll pH 7.00) lag, der Natriumphosphat-Citrat-Puffer für die IgG2-Messung lag bei pH 4.75 (Soll pH 4.70) und der Natriumphosphat-Citrat-Puffer für die IgG1-Messung lag bei pH 4.36 (Soll pH 4.30). Die pH – Werte wurden entsprechend korrigiert. Um Abweichungen zwischen frisch angesetzten Pufferlösungen und pH-korrigierten Lösungen (bei der jeweils benötigten Puffertagesmenge erfolgte eine Feineinstellung des pH-Wertes) auszuschließen, wurden anschließend über mehrere Tage vergleichende Messungen durchgeführt. Da sich bei diesen Analysen keine voneinander abweichenden Werte ergaben, wurde entschieden, dass die sterilen Pufferlösungen bei entsprechender pH-Korrektur weiterhin verwendet werden können.

Bei der **Verwendung** der Pufferlösungen muss zudem besonders darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen, da selbst kleinste Gasbläschen die Messung erheblich stören. Zudem ist es wegen der Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes wichtig, dass die Pufferlösungen für die Messung bei Raumtemperatur vorliegen.

Die Temperaturabhängigkeit und die kurze Haltbarkeit der Pufferlösungen führen außerdem dazu, dass eine Messreihe nicht beliebig erweitert werden kann: Während des Messvorgangs müssen die Pufferlösungen bei Zimmertemperatur vorliegen. Dabei liegt der Tagesbedarf an Pufferlösung liegt zwischen 400 ml – 800 ml, abhängig vom jeweiligen Puffer und der Anzahl der zu messenden Proben. Die voraussichtlich benötigten Pufferlösungen werden am Vortag aus der Kühlung genommen, um dann bei Zimmertemperatur zur Verfügung zu stehen. Dabei ist zu beachten, dass die insgesamt benötigte Menge tatsächlich bis zum Abschluß der Untersuchungen ausreicht, da eine Zugabe von z. B. frisch hergestelltem Puffer zu einer Extinktionsänderung führt, insbesondere zu Veränderungen beim Einstellen des Probenleerwerts woraus in der Regel eine deutliche Verfälschung der Probenextinktionen resultiert:

Beispiel: Extinktionsänderung und deren Einfluß auf den Quotienten IgG1/IgG-gesamt:

Extinktion (IgG)	0.220	----	9.60 mg/ml
	0.230	----	10.04 mg/ml
Extinktion (IgG1)	0.035	----	5,43 mg/ml
	0.040	----	6.20 mg/ml

Es ergibt sich bei der Berechnung des Quotienten IgG1/IgG-gesamt eine Spanne zwischen 64 % und 54 % und somit entweder eine hochnormale Wertelage oder einen Wert im pathologischen Bereich.

- Wartung des Analysensystems

Während der ersten Monate wurde die ÄKTA-Analyseneinheit nach Abschluß der täglichen Untersuchungen jeweils gründlich gespült, wobei der letzte Spülgang mit Basispuffer pH 7.00 erfolgte. Es stellte sich aber heraus, dass Störungen im Betriebssystem besonders dann auftraten, wenn das Gerät über mehrere Tage ausgeschaltet war (z.B. andere Arbeitseinheiten, Wochenende), wobei insbesondere Verstopfungen im Schlauchsystem auftraten. Die anfallenden Reparaturarbeiten mußten teilweise vom Kundendienst der Firma Pharmacia durchgeführt werden, wodurch jeweils mehrere Tage keine Messungen durchgeführt werden konnten.

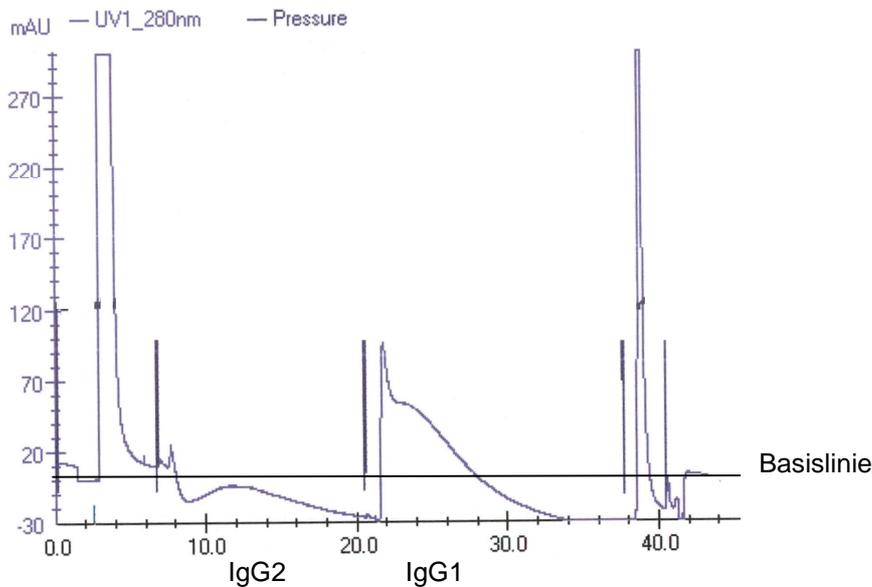
Um diese Ausfälle zu vermeiden, wurde entschieden, das Gerätesystem permanent bei minimaler Durchflussrate mit Basispuffer zu spülen. Das Problem der Verklebungen und Funktionseinschränkungen nach längeren Ruhephasen konnte durch diese Maßnahme behoben werden. Allerdings wurde dadurch die Lebensdauer der Photozelle (ca. 5000 Std.) deutlich beeinträchtigt:

Absinken der Basislinie

Nach 9 – 10 Monaten Betriebsdauer wurde ein Absinken der Basislinie im Chromatogramm registriert (Abb. 7). Sowohl bei der Messung von IgG-gesamt als auch bei der Messung von IgG2 und IgG1 fiel die Basislinie innerhalb der jeweiligen Analyse deutlich ab, sodass eine Auswertung des Chromatogramms

nicht mehr möglich war. Nach intensiver Fehlersuche (fehlerhafte Charge der Säulen, Verunreinigung der Puffer, Druckschwankungen) wurde durch den Kundendienst festgestellt, dass die Ursache dieses Phänomens der überschrittenen Brenndauer der Photozelle zuzuschreiben war.

Abb. 7: Absinken der Peaks unter die Basislinie



- Beeinflussung der Chromatogrammaufzeichnung

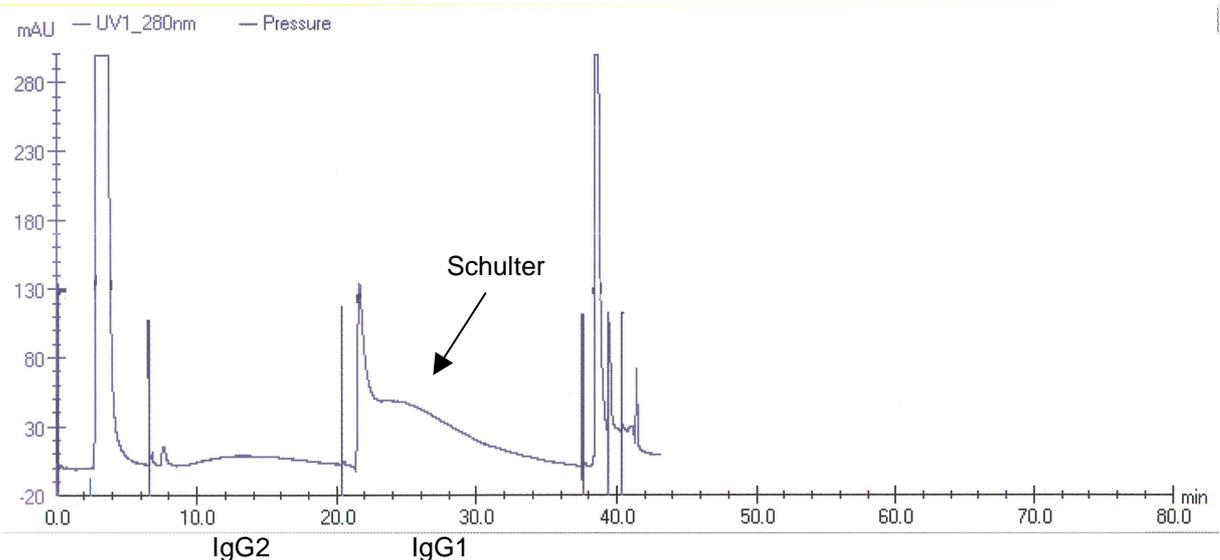
Bei der Bestimmung der IgG-Subklassen insbesondere bei der Messung von IgG2 handelt es sich häufig um die Detektion sehr geringer Konzentrationen, die eine hohe Empfindlichkeit der Untersuchungsmethode voraussetzt. Dies führt allerdings auch dazu, dass die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme extrem störanfällig ist.

Von der Grazer Arbeitsgruppe war bekannt, dass insbesondere ikterische und lipämische Seren schwierig auszuwerten sind, da zum einen die Säulen zu stark verunreinigt werden und zum anderen die anschließende Auswertung der Chromatogramme wegen der zusätzlich auftretenden Peaks nicht korrekt durchgeführt werden kann. Obwohl in dieser Studie aus diesem Grund die Untersuchung der IgG-Subklassen bei ikterischen und lipämischen Seren nicht durchgeführt wurde, traten auch bei der Aufzeichnung der Chromatogramme von völlig „unauffälligen“ Seren Probleme auf, die keine genaue Auswertung der jeweiligen Messung zuließen.

Schulterbildung bei der Messung von IgG1

Häufigster Fehler während der ersten Monate der Affinitätschromatographischen Bestimmung der IgG-Subklassen war eine Schulterbildung bei der Aufzeichnung des Peaks von IgG1. Ursache dafür sind wohl in den meisten Fällen Proteinreste, die während der Detektion von IgG2 mit Natriumphosphatpuffer pH 4,70 noch auf der Säule haften bleiben, und bei der anschließenden Eluierung von IgG1 mit Natriumphosphatpuffer pH 4,30 als Coeluat in der Anfangsphase des IgG1-Peaks mit abgespült werden und so eine Schulterbildung verursachen. Dieses Phänomen tritt unabhängig von der Konzentration an IgG-gesamt bzw. von IgG2 auf und ist daher nicht auf eine allmähliche Überladung der Säule zurück zu führen. Zur Problemlösung mußte bei Auftreten einer Schulter im IgG1-Peak ein mehrstündiges Spülprogramm sowie eine Reinigung der Säule mit Citratpuffer eingeleitet werden. Das alleinige Auswechseln der jeweils verwendeten Säule war zur Problemlösung nicht ausreichend – auch wenn bei der folgenden Messung eine frische Säule zum Einsatz kam, konnten keine fehlerfreien Chromatogramme erzielt werden.

Abb. 8: Schulterbildung beim IgG1-Peak

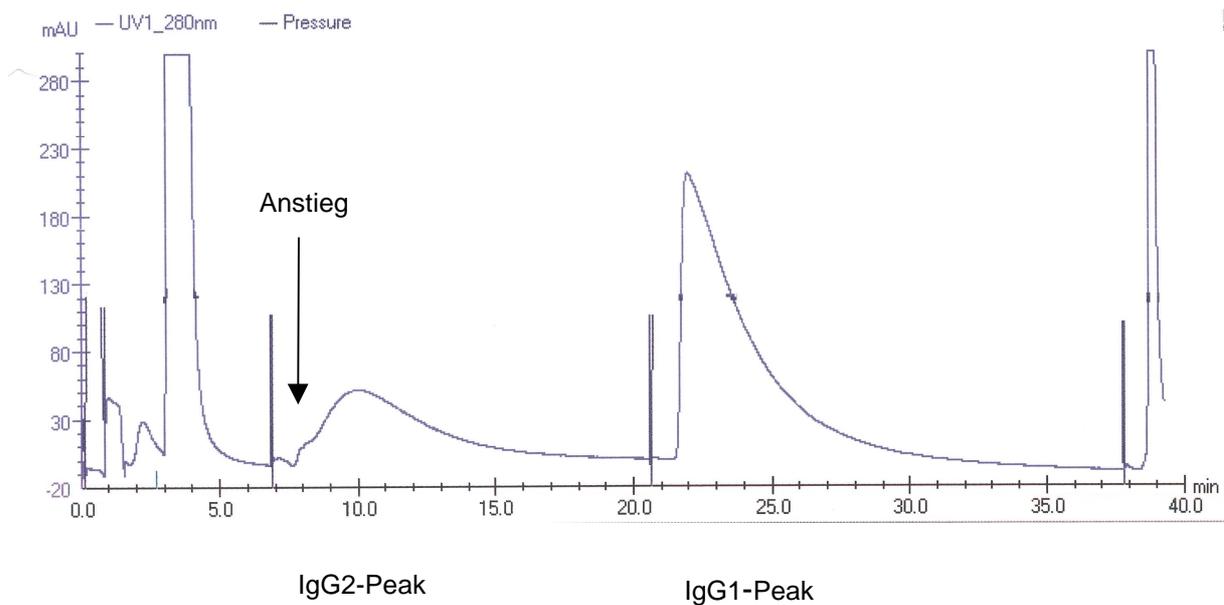


Anstieg im Fronting des IgG2-Peaks

Bei der Messung von IgG2 wurde häufig in der ersten Phase des IgG2-Peaks ein Anstieg des Peaks aufgezeichnet, der nicht zur eigentlichen Detektion von IgG2 gezählt werden kann (Abb. 9). Da es sich insbesondere bei der Messung von

IgG2 um sehr niedrige Konzentrationen handelt, war die Auswertung des Chromatogramms in diesen Fällen meist nicht möglich. Eine genaue Ursache für das Auftreten dieses Phänomens konnte nicht eruiert werden, eine Problemlösung ergab sich erst durch die externe photometrische Messung der Eluate .

Abb. 9: Anstieg im Fronting des IgG2-Peaks



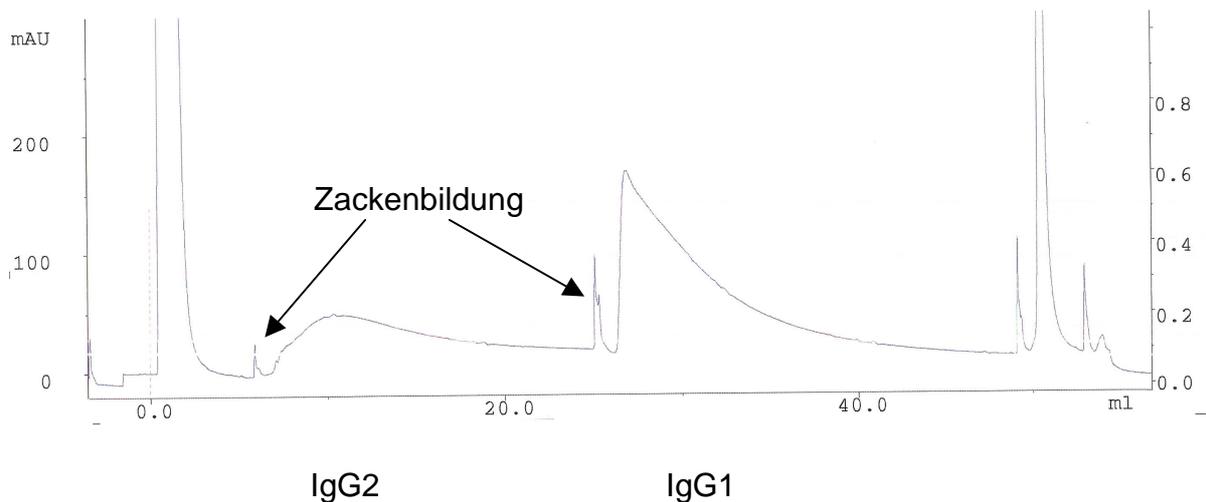
Zackenbildung

Sowohl bei der Messung von IgG2 als auch bei der Messung von IgG1 trat bei einem Teil der Seren vor Beginn der Aufzeichnung des IgG2- bzw. des IgG1-Peaks eine positive oder in seltenen Fällen auch eine negative Zacke (Peak) auf. Eine korrekte Auswertung der Chromatogramme konnte wegen der oben beschriebenen Problematik nicht mehr durchgeführt werden, wobei jeweils die Auswertung des IgG2-Peaks aufgrund der meist niedrigen Konzentrationen eine hohe Fehlerbreite aufwies.

Die Ursache der Zackenbildung konnte nicht geklärt werden, da meist nicht ausreichend Material zur Verfügung stand, um die Messung wiederholen zu können. Außerdem ergab sich beim Auftreten dieses Phänomens in der Regel eine Verschleppung auf die folgenden Seren dieser Messreihe.

Zur Behebung des Fehlers mußte die Serie beendet und das Gerät gespült werden, wobei die Säule ebenfalls manuell mit Citrat und anschließend mit Basispuffer gründlich gereinigt werden mußte.

Abb. 10: Zackenbildung vor IgG2- und IgG1-Peak



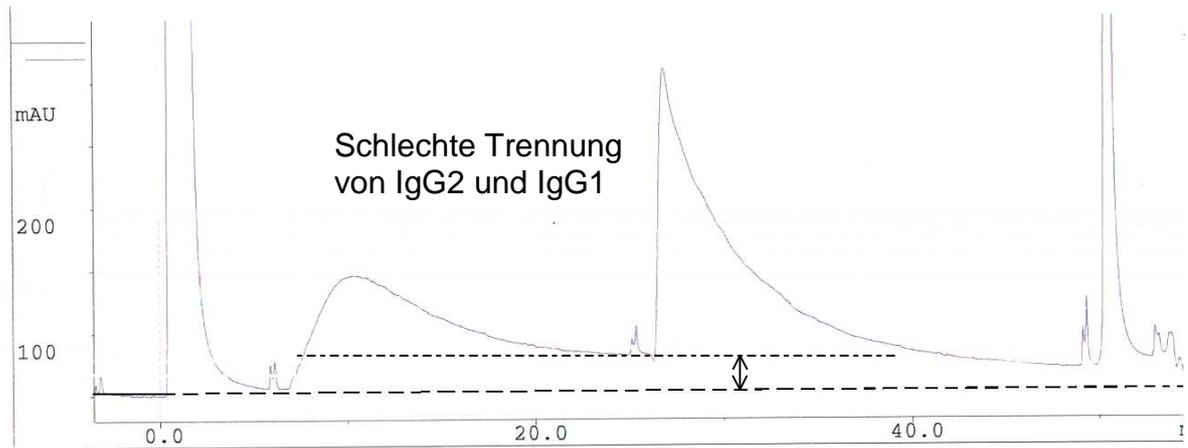
Schlechte Trennung von IgG2 und IgG1

Häufig wurde nach Abschluss der Messung von IgG2– auch bei Seren mit normaler oder niedriger IgG2-Konzentration - am Ende des IgG2-Peaks die Basislinie nicht erreicht (Abb. 11). Die Auswertung der Chromatogramme wurde dann durch ein unzureichendes Tailing des Elutionspeaks von IgG2 stark beeinträchtigt. Eine Ursache für dieses Phänomen konnte nicht gefunden werden. Da dieser Anstieg sich nicht im Verlauf einer Messreihe entwickelte, sondern auch bei anschließender Verwendung einer völlig neuen Säule reproduzierbar blieb, ist eine allmähliche Überladung der Säule mit Proteinresten eher unwahrscheinlich.

Bei unsauberer Trennung der Eluate war es in jedem Fall nötig, die jeweilige Messreihe zu stoppen, das Gerätesystem mehrere Stunden zu spülen und eine Reinigung der Säule durchzuführen. Durch den hohen Zeitaufwand konnten dann die für diesen Tag vorgesehenen Untersuchungen häufig nicht mehr

durchgeführt und die für die Analyse vorgesehenen restlichen Proben mußten verworfen werden.

Abb. 11: Schlechte Trennung zwischen IgG2- und IgG1-Peak



Die Probleme bei der Auswertung der Chromatogramme traten hauptsächlich bei der Untersuchung der Subklassen auf. Die Messreihe mußte dann, wie oben beschrieben, abgebrochen werden. Eine Wiederholung der Messung war häufig nicht möglich, da nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Eine weitere Folge war, dass die bereits durchgeführte Bestimmung von IgG-gesamt verworfen werden mußte.

Nach ca. einjähriger Studiendauer wurde deshalb entschieden, dass die vielschichtigen und häufig auftretenden Probleme, die sich vor allem durch die erschwerte Auswertung der Chromatogramme ergaben, nur durch eine Modifikation der Methode gelöst werden konnten.

Dazu wurden sowohl die Eluate von mehreren Proben mit korrektem Kurvenverlauf und solche von Proben mit nicht auswertbaren Chromatogrammen an einem externen Photometer gemessen. Gleichzeitig wurde bei diesen Seren die Subklassenbestimmung am BN II durchgeführt. Der Vergleich der durch die externe Messung ermittelten Werte mit den BN II - Werten führte zu dem Beschluss, im weiteren Studienverlauf auf die Auswertung der Chromatogramme zu verzichten und

die Eluate von IgG-gesamt, IgG2 und IgG1 aufzufangen, um diese an einem externen Photometer zu messen.

Durch diese modifizierte Vorgehensweise konnten die meisten Messungen hinreichend korrekt ausgewertet werden; allerdings war zum Auffangen der Eluate eine permanente personelle Präsenz erforderlich.

Erst nachdem ein Fraktionssampler in das ÄKTA basic System integriert wurde, konnten täglich bis zu fünf Seren (Kontrollserum und vier Patienten) untersucht werden.

5.1.2. Reproduzierbarkeit der Messungen

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Messungen wurden die Intra-Assay-Varianzen für IgG-gesamt, IgG1 und IgG2 berechnet. Grundlage dafür waren die im Rahmen der Stabilitätsmessungen an zehn gesunden Probanden durchgeführten Analysen. Alle Untersuchungen wurden jeweils parallel in Proben mit bzw. ohne Superoxid-Dismutase (SOD) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind tabellarisch, graphisch in den Abbildungen 1 - 10 (Anhang).

Intra-Assay-Varianzen

Wegen der langen Analysendauer konnten in einer Meßreihe jeweils maximal 6 Proben mit SOD und 6 Proben ohne SOD gemessen werden.

Die geringe Probenanzahl, die von Analyse zu Analyse zunehmende Beladung der Säule mit Restprotein, sowie die lange Analysendauer und die damit veränderten Pufferlösungen lassen nur eine Einordnung als „Pseudo-Intra-Assay-Test“ zu.

Es zeigt sich, dass bei allen Messungen eine hohe Übereinstimmung der Resultate vorliegt. Besonders bei den Messungen von IgG-gesamt finden sich nur geringe Resultatabweichungen, unabhängig von der Zugabe von SOD. In den folgenden Tabellen sind jeweils von IgG-gesamt, IgG1 und IgG2 der Mittelwert (MW) in mg/ml, die 2-fache Standardabweichung (2s) und der Variationskoeffizient (VK) in % dargestellt.

- Bei den Untersuchungen der Proben **mit** SOD

findet sich die geringste Impräzision für IgG-gesamt. bei Proband 3 mit einem VK von 0.1 %, die größte Schwankungsbreite der Werte liegt sich bei Proband 9 mit einem VK von 1.6 % vor. Für IgG1 zeigt sich die geringste Varianz ebenfalls bei Proband 3 mit 0.2 %, die größte Varianz bei Proband 8 mit 11.9 %. Diese große Schwankungsbreite könnte auch durch einen Ausreißer bei der Analyse der Messung 24 Stunden nach Blutabnahme bedingt sein, eine Messwertkontrolle war nicht möglich, da zu wenig Material für eine Wiederholung vorhanden war. Für IgG2 liegt die geringste Varianz bei Proband 2 mit einem VK von 0.7 % und die größte Varianz bei Proband 9 mit einem VK von 8.3 %.

Tab. 4: Intra-Assay-Varianzen mit SOD

	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5	Prob. 6	Prob. 7	Prob. 8	Prob. 9	Prob. 10
IgG-ges.										
MW	7,21	13,61	12,42	10,30	12,88	9,69	8,73	11,50	11,67	11,52
2s	0,09	0,08	0,02	0,07	0,04	0,14	0,21	0,25	0,38	0,07
VK	0,7	0,3	0,1	0,3	0,2	0,7	1,2	1,1	1,6	0,3
IgG1										
MW	4,19	7,63	7,27	6,17	6,60	6,27	5,42	3,98	6,34	5,83
2s	0,07	0,07	0,03	0,07	0,14	0,06	0,14	0,95	0,38	0,31
VK	0,9	0,5	0,2	0,6	1,1	0,5	1,3	11,9	3,1	2,6
IgG2										
MW	1,99	3,31	3,15	2,83	2,54	1,97	1,59	4,21	2,45	3,46
2s	0,05	0,06	0,06	0,04	0,14	0,06	0,13	0,38	0,40	0,12
VK	0,9	0,9	1,0	0,7	2,7	1,7	4,1	4,5	8,3	1,8

- Bei den Messungen der Proben **ohne** SOD

ergibt sich ebenfalls die geringste Impräzision für IgG-gesamt bei Proband 5 mit einem VK von 0.2 %, die größte Varianz findet sich bei Proband 7 mit einem VK von 1.4 %. Für IgG1 zeigt sich die geringste Varianz bei Proband 4 mit 0.6 % , die größte Varianz bei Proband 8 mit 3.3 %. Für IgG2 liegt die geringste Varianz im Serum von Proband 1 mit 1.3% und die größte Varianz bei Proband 7 mit 8.1 %.

Tab. 5: Intra-Assay-Varianzen ohne SOD

	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5	Prob. 6	Prob. 7	Prob. 8	Prob. 9	Prob. 10
IgG-ges.										
MW	7,30	13,60	11,93	10,46	12,97	10,08	8,87	11,43	11,46	10,71
2s	0,10	0,18	0,07	0,08	0,04	0,06	0,25	0,17	0,28	0,09
VK	0,7	0,7	0,3	0,4	0,2	0,3	1,4	0,8	1,2	0,4
IgG1										
MW	4,20	7,64	7,41	6,47	6,70	6,21	5,29	3,96	6,40	5,98
2s	0,08	0,25	0,10	0,08	0,24	0,08	0,18	0,26	0,24	0,16
VK	0,8	1,6	1,3	0,6	1,8	0,7	1,7	3,3	1,9	1,3
IgG2										
MW	2,08	3,37	3,32	2,53	2,76	2,24	1,77	4,46	2,29	2,59
2s	0,06	0,13	0,22	0,11	0,11	0,08	0,29	0,29	0,14	0,19
VK	1,3	1,9	3,3	6,2	1,9	2,0	8,1	3,3	3,0	3,7

Inter-Assay-Varianzen

Zur Beantwortung der Frage, welche Abweichungen der Werte bei den Messungen von Tag zu Tag auftreten, wurden die Inter-Assay-Varianzen für IgG-gesamt, IgG1 und IgG2 berechnet. Grundlage dafür waren die im Rahmen der Stabilitätsmessungen an fünf gesunden Probanden durchgeführten Analysen zur Langzeitstabilität. Die Untersuchungen der bei minus 20°C bzw. bei minus 80°C tiefgefrorenen Seren wurden 1 Tag, 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und 12 Wochen nach Abnahme durchgeführt.

Die Einzelergebnisse sind im Anhang graphisch und tabellarisch dargestellt.

Ergebnisse bei Lagerung der Seren bei minus 20°C

- Bei den Untersuchungen der Proben **mit** SOD findet sich die geringste Impräzision für IgG-gesamt bei Proband 1 mit einem VK von 0.34 %, die größte Varianz findet sich bei Proband 5 mit einer Schwankungsbreite der Werte von 1.01 %. Für IgG1 zeigt sich die geringste Varianz bei Proband 4 mit 0.56 % , die größte Varianz bei Proband 3 mit einem VK von 1.18 %. Für IgG2 liegt die geringste Varianz im Serum von Proband 5 mit einem VK von 1.38 % und die größte Abweichung bei Proband 4 mit einem VK von 2.93 %.

Tab. 6: Inter-Assay-Varianzen, Lagerung minus 20°C mit SOD

	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5
IgG-ges.					
MW	7,23	13,64	12,26	10,30	12,91
2s	0,04	0,13	0,20	0,10	0,26
VK	0,3	0,5	0,9	0,5	1,0
IgG1					
MW	4,20	7,49	7,14	6,23	6,67
2s	0,08	0,13	0,17	0,06	0,13
VK	0,9	0,9	1,2	0,6	1,0
IgG2					
MW	2,02	3,38	3,14	2,72	2,56
2s	0,08	0,14	0,09	0,16	0,07
VK	1,9	2,0	1,5	2,9	1,4

- Bei den Messungen der Proben **ohne** SOD

ergibt sich die geringste Impräzision für IgG-gesamt bei Proband 3 mit einem VK von 0.3 %, die größte Varianz findet sich bei Proband 5 mit einer Schwankungsbreite der Werte von 0.9 %. Für IgG1 zeigt sich die geringste Varianz bei Proband 2 mit 0.5 % , die größte Varianz bei Proband 5 mit einem VK von 0.9 %. Für IgG2 liegt die geringste Varianz im Serum von Proband 1 mit 2.3 % und die größte Varianz bei Proband 4 mit einem VK von 4.5 %.

Tab. 7: Inter-Assay-Varianzen, Lagerung bei minus 20°C ohne SOD

	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5
IgG-ges.					
MW	7,24	13,64	11,92	10,42	12,92
2s	0,07	0,08	0,06	0,08	0,22
VK	0,5	0,3	0,3	0,4	0,9
IgG1					
MW	4,24	7,49	7,36	6,46	6,81
2s	0,06	0,06	0,08	0,12	0,12
VK	0,7	0,5	0,6	0,9	0,9
IgG2					
MW	2,06	3,37	3,06	2,44	2,73
2s	0,09	0,25	0,19	0,22	0,16
VK	2,3	3,7	3,2	4,5	2,9

Im Vergleich zu den Seren, die bei Kühlschranktemperatur gelagert wurden ergibt sich bei der Lagerung der Seren bei minus 20° C insgesamt eine geringere Schwankungsbreite der Werte.

Ergebnisse bei Lagerung der Seren bei minus 80°C

- Bei den Untersuchungen der Proben **mit** SOD

findet sich die geringste Impräzision für IgG-gesamt bei Proband 2 mit einem VK von 0.4 %, die größte Varianz findet sich bei Proband 3 mit einer Schwankungsbreite der Werte von 0.9 %. Für IgG1 zeigt sich die geringste Varianz bei Proband 2 mit 0.6 %, die größte Varianz bei Proband 5 mit einem VK von 1.5 %. Für IgG2 liegt die geringste Varianz im Serum von Proband 3 mit einem VK von 0.3 % und die größte Abweichung bei Proband 4 mit einem VK von 5.8 %.

Tab. 8: Inter-Assay-Varianzen bei Lagerung minus 80°C mit SOD

	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5
IgG-ges.					
MW	7,24	13,67	12,30	10,35	12,89
2s	0,07	0,10	0,22	0,07	0,11
VK	0,5	0,4	0,9	0,4	0,5
IgG1					
MW	4,21	7,61	7,15	6,28	6,61
2s	0,08	0,09	0,17	0,11	0,19
VK	1,0	0,6	1,2	0,9	1,5
IgG2					
MW	2,01	3,26	3,17	2,67	2,61
2s	0,07	0,38	0,02	0,20	0,07
VK	1,7	5,8	0,3	3,7	1,4

- Bei den Messungen der Proben **ohne** SOD

ergibt sich die geringste Impräzision für IgG-gesamt bei Proband 2 mit einem VK von 0.3 %, die größte Varianz findet sich bei Proband 5 mit einer Schwankungsbreite der Werte von 1.0 %. Für IgG1 zeigt sich die geringste Varianz bei Proband 4 mit 0.4 %, die größte Varianz bei Proband 2 mit 1.8 %. Für IgG2 findet sich die geringste Varianz im Serum von Proband 2 mit 0.4 % und die größte Varianz bei Proband 1 mit einem VK von 2.6 %.

Tab. 9: Inter-Assay-Varianzen bei Lagerung minus 80°C ohne SOD

	Prob. 1	Prob. 2	Prob. 3	Prob. 4	Prob. 5
IgG-ges.					
MW	7,25	13,69	11,98	10,39	12,92
2s	0,06	0,09	0,10	0,09	0,25
VK	0,4	0,3	0,4	0,5	1,0
IgG1					
MW	4,24	7,54	7,39	6,50	6,81
2s	0,15	0,11	0,09	0,05	0,06
VK	1,8	0,7	0,6	0,4	0,9
IgG2					
MW	2,03	3,28	3,18	2,56	1,97
2s	0,11	0,02	0,06	0,11	0,06
VK	2,6	0,4	0,9	2,2	2,3

Alle Varianzen liegen bei den Untersuchungen von IgG-gesamt und IgG1 deutlich unter 4 %, die Analysen von IgG2 zeigen, bedingt durch die geringe Konzentration von IgG2, eine größere Schwankungsbreite.

Im Vergleich zu den Seren, die bei Kühlschranktemperatur gelagert wurden ergibt sich auch hier insgesamt eine geringere Schwankungsbreite der Werte, wobei zu berücksichtigen ist, dass zur Berechnung der Intra-Assay-Varianzen die Seren von 10 Probanden untersucht wurden.

Inter-Assay-Varianz mit Poolseren

Für die Bestimmung der Präzision der Messungen von Tag zu Tag wurde am Beginn jeder Messreihe ein Poolserum an erster Position gemessen. Die Poolseren wurden in verschiedenen Wertelagen (low - normal - high) hergestellt. Dazu wurden verschiedene frische Seren aus dem Routinelabor gepoolt, vorsichtig homogenisiert und durch Zugabe von Seren mit hohen bzw. niedrigen IgG-Konzentrationen auf die gewünschte Wertelage eingestellt. Danach wurde der Pool in 1 ml-Proben aliquotiert und bei minus 20°C tiefgefroren. Dabei wurde auf die Zugabe von SOD als Stabilisator verzichtet, weil die entsprechenden Seren erst nach Abarbeitung der jeweiligen Anforderungen und unter Berücksichtigung der gewünschten Wertelage gepoolt werden konnten und die Zeitspanne, während der eine Zugabe von SOD erfolgen sollte (4 Std.) deutlich überschritten wurde.

In den folgenden Tabellen sind jeweils von IgG-gesamt, IgG1 und IgG2 der Mittelwert (MW) in mg/ml, die 2-fache Standardabweichung (2s) und der Variationskoeffizient (VK) in % dargestellt.

Es wurden Poolseren in unterschiedlichen Konzentrationen (low, normal, high) hergestellt, die im täglichen Wechsel in jeder Serie als Kontrolle gemessen wurden.

Tab. 10: Inter-Assay-Varianzen/Pool (n = 19)

	[mg/ml]	s	VK [%]
IgGgesamt	10,88	0,24	2,2
IgG1	5,61	0,12	2,1
IgG2	1,98	0,1	5,1

Wenn die Abweichungen zu den Poolkontrollen höher als 10 % zum jeweiligen Mittelwert waren, wurde das Analysensystem gründlich über mehrere Stunden zunächst mit einer 20 % Ethanol-Lösung und anschließend mit Basispuffer gespült. Zusätzlich wurde die verwendete Säule mit Citratpuffer gereinigt, um eventuelle Reste zu entfernen und anschließend mit Basispuffer wieder neutralisiert. Danach wurden die Messungen mit frischer Pufferlösung wiederholt.

Im Verlauf der Untersuchungen zeigte sich, dass durch relativ hohe IgG-Konzentrationen (>15mg/dl), die Säulen überfrachtet werden, die gebundenen Komplexe lassen sich nicht mehr vollständig eluieren. Es resultieren fehlerhafte Messungen, die Verschleppung wird auf alle nachfolgenden Proben der Analysenserie übertragen. Proben mit hohen IgG-Konzentrationen wurden deshalb entsprechend verdünnt und erneut gemessen. Allerdings wurde durch die hohen IgG-Konzentration die Säule meist irreversibel geschädigt und mußte erneuert werden. Dies bedeutete gleichzeitig einen Abbruch der laufenden Meßreihe und eine gründliche Spülung des Gerätesystems.

5.1.3. Stabilität der IgG-Subklassen

Um die Patienten nicht unnötig zu belasten, wurden die Untersuchungen zur Überprüfung der Stabilität mit Seren von zehn gesunden, klinisch unauffälligen Personen durchgeführt.

Die Messungen der IgG-Subklassen, die im Rahmen der Untersuchungen zur Kurzzeit- und Langzeitstabilität durchgeführt wurden, ergaben keinen eindeutigen Hinweis auf die Notwendigkeit der Zugabe von SOD als Stabilisator.

Kurzzeitstabilität

Zur Beurteilung der Kurzzeitstabilität wurde das Verhalten der Subklassen innerhalb eines Zeitraums von 48 Stunden überprüft. Die erste Messung erfolgte innerhalb von 60 Minuten nach Blutabnahme, weitere Analysen wurden nach 2 Stunden, nach 4 Stunden und nach 8 Stunden, sowie nach 24 und 48 Stunden durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen sowohl bei der Messung von IgG-gesamt als auch bei den Messungen der IgG-Subklassen keine tendenziellen Veränderungen, die auf eine Instabilität der IgG-Subklassen hinweisen würden. Insbesondere konnte kein unterschiedliches Verhalten der Subklassen in Seren mit SOD und in Seren ohne SOD festgestellt werden (siehe Anhang: Untersuchungen zur Kurzzeitstabilität, graphische und tabellarische Darstellung).

Langzeitstabilität

Im weiteren folgten die Untersuchungen zur Langzeitstabilität bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, um so eventuelle Veränderungen der IgG-Subklassen innerhalb eines Zeitraums von 12 Wochen feststellen zu können. Die Ergebnisse zeigen weder bei Seren, die bei minus 20° C tiefgefroren wurden, noch bei Proben, die bei minus 80° C gelagert wurden, eine Verschiebung der Wertelage, die als Hinweis auf einen Stabilitätsverlust interpretiert werden könnte. Bei allen Messungen konnten insbesondere keine Verschiebung der Ergebnisse (falsch erniedrigte IgG1-Werte, die durch die Instabilität der labilen Disulfidbrückenbindungen zustande kommen können) ermittelt werden, die eine Notwendigkeit der Zugabe von SOD als Stabilisator belegen. (siehe Anhang: Untersuchungen zur Langzeitstabilität, graphische und tabellarische Darstellung).

5.1.4. Durchführbarkeit anderer Methoden

Bestimmung der Subklassen am Nephelometer

Bei einem Teil der Seren wurde die Bestimmung der IgG-Subklassen zusätzlich nephelometrisch durchgeführt. Wegen der deutlich höheren Kosten nephelometrischer Analysen wurde auf die parallelen Untersuchungen zur Überprüfung der Stabilität verzichtet.

Reproduzierbarkeit der Werte

Die Ergebnisse der nephelometrischen Untersuchungen zeigten eine etwas größere Schwankungsbreite der Werte. Tabellarisch dargestellt sind jeweils von IgG-gesamt, IgG1 und IgG2 der Mittelwert (MW) in mg/ml, die 2-fache Standardabweichung (2s) und der Variationskoeffizient (VK) in %.

Die Auswertung der Inter-Assay-Varianzen aus den von Poolseren gewonnen Messdaten ergab bei der Bestimmung von IgG-gesamt einen VK von 6.8 %, für die Bestimmung von IgG1 einen VK von 5.4 % und bei IgG2 einen VK von 3.1 %.

Tab. 11: Inter-Assay-Varianzen/Pool (n = 19)

	[mg/ml]	s	VK [%]
IgGgesamt	12,87	0,87	6,8
IgG1	6,82	0,37	5,4
IgG2	4,53	0,14	3,1

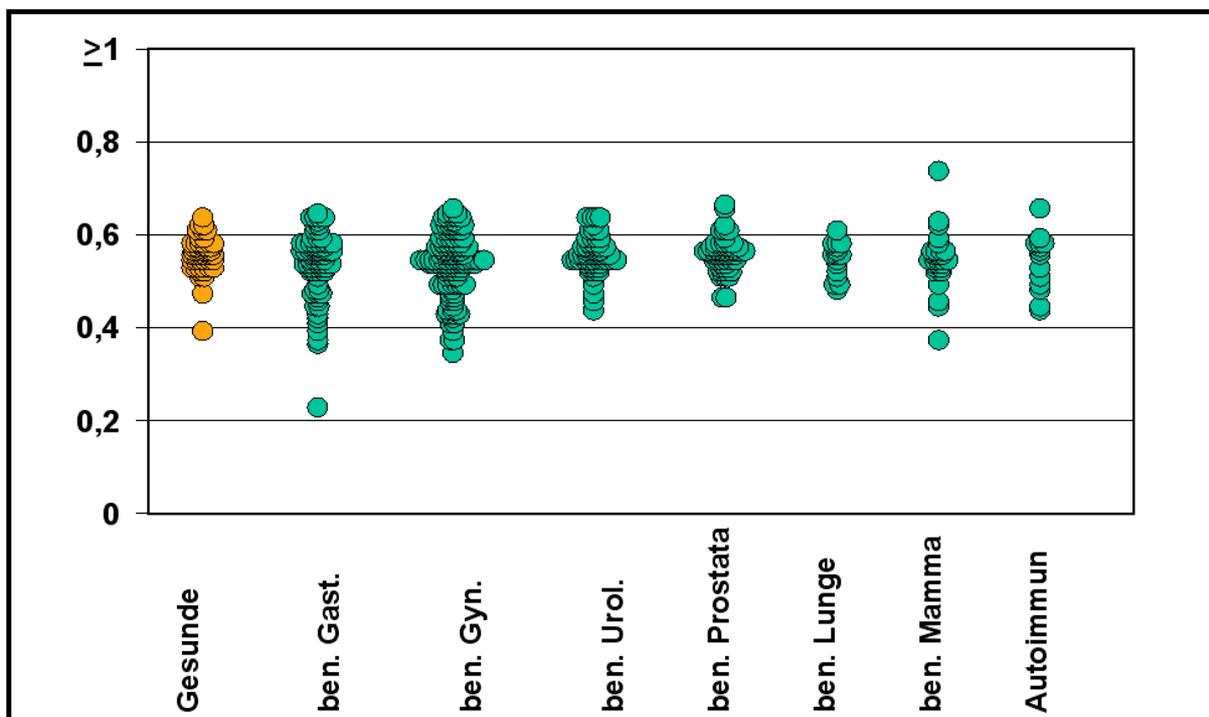
5.2. Ergebnisse der klinische Evaluierung

5.2.1 Verhalten der IgG-Subklassen bei benignen und malignen Erkrankungen

Graphische Darstellung der Werte

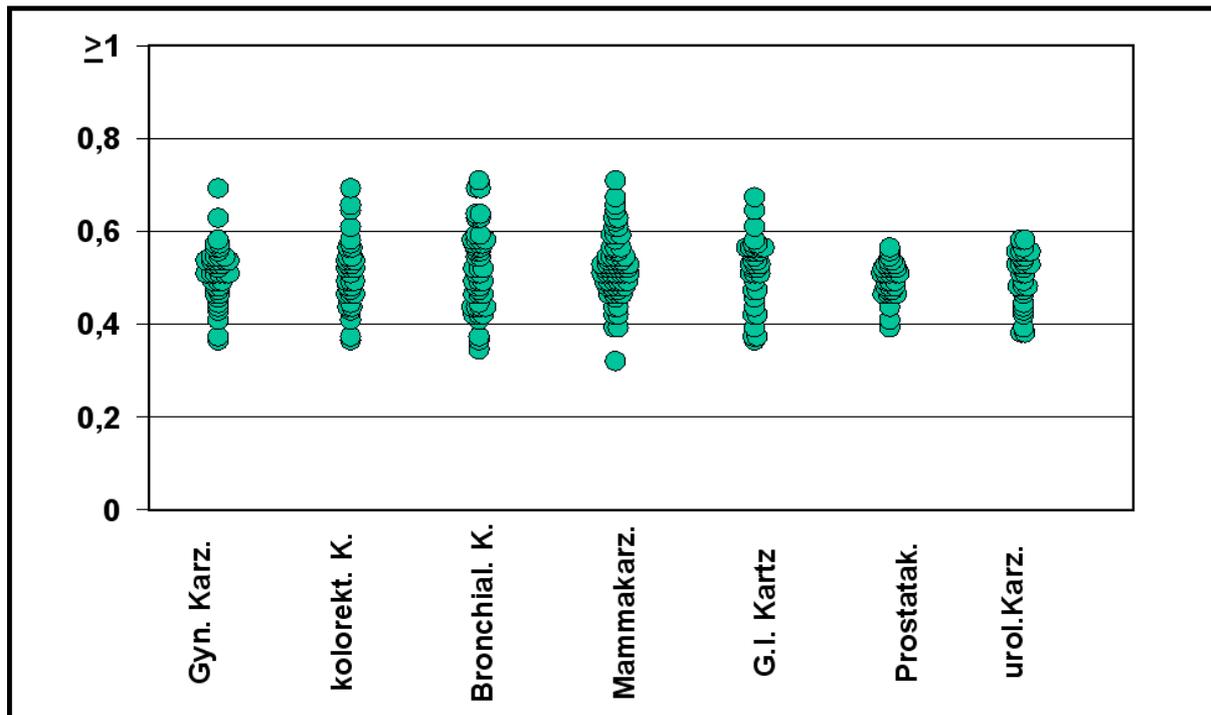
Bei der graphischen Darstellung der Verteilung der Werte bei **Gesunden** und bei **Patienten mit benignen Erkrankungen** wird deutlich, dass der IgG1-Anteil überwiegend in einem Bereich zwischen 50 und 60 % liegt, bei den Patienten mit benignen Erkrankungen fällt im Vergleich zu den Gesunden die größere Streubreite der Werte auf. Bei den benignen gastroenterologischen Erkrankungen zeigen insbesondere Patienten mit Cholelithiasis und entzündlichen Erkrankungen (Appendizitis, M. Crohn, Colitis ulcerosa) einen erniedrigten Anteil an IgG1, während sich bei Patienten mit (Pseudo)-Zysten und Verwachsungen meist IgG1-Werte im unteren Normbereich finden.

Abb 12: Werteverteilung bei Gesunden und bei Patienten mit benignen Erkrankungen



Die graphische Darstellung der Werteverteilung im Serum der **Patienten mit malignen Erkrankungen** zeigt, dass der IgG1-Anteil insgesamt niedriger liegt, die Mehrzahl der Ergebnisse befindet sich in einem Bereich zwischen 50 und 55 % – im Vergleich zu den Ergebnissen bei den Patienten mit benignen Erkrankungen finden sich auch häufiger Werte im Bereich zwischen 40 und 50 %. Auffällig ist insbesondere die Darstellung der Werte bei Patienten mit Prostatakarzinom – die meisten Werte liegen in einem Bereich zwischen 45 und 55 %, der Quotient IgG1/IgG liegt in keinem Fall über 60%.

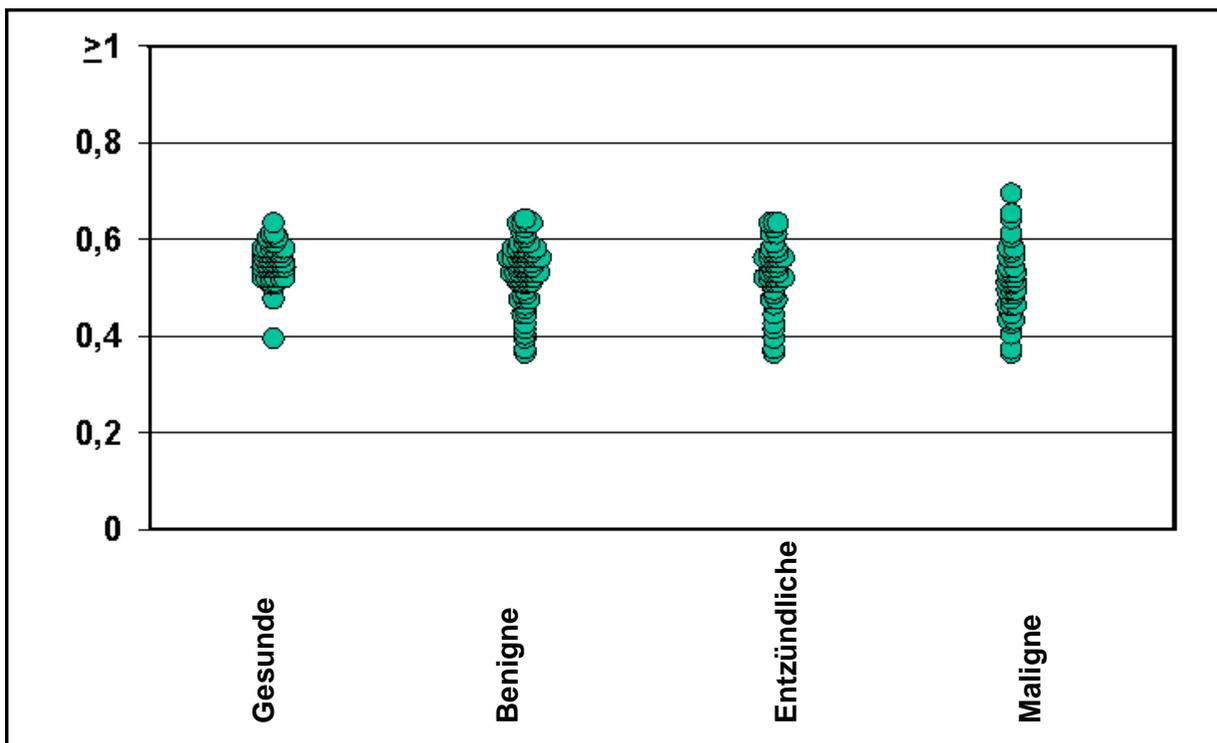
Abb. 13: Werteverteilung bei Patienten mit malignen Erkrankungen



Um die Aussagekraft der Veränderung der IgG-Subklassen bei Patienten mit benignen Erkrankungen bzw. malignen Erkrankungen besser einschätzen zu können, wurden die verschiedenen Organsysteme getrennt dargestellt.

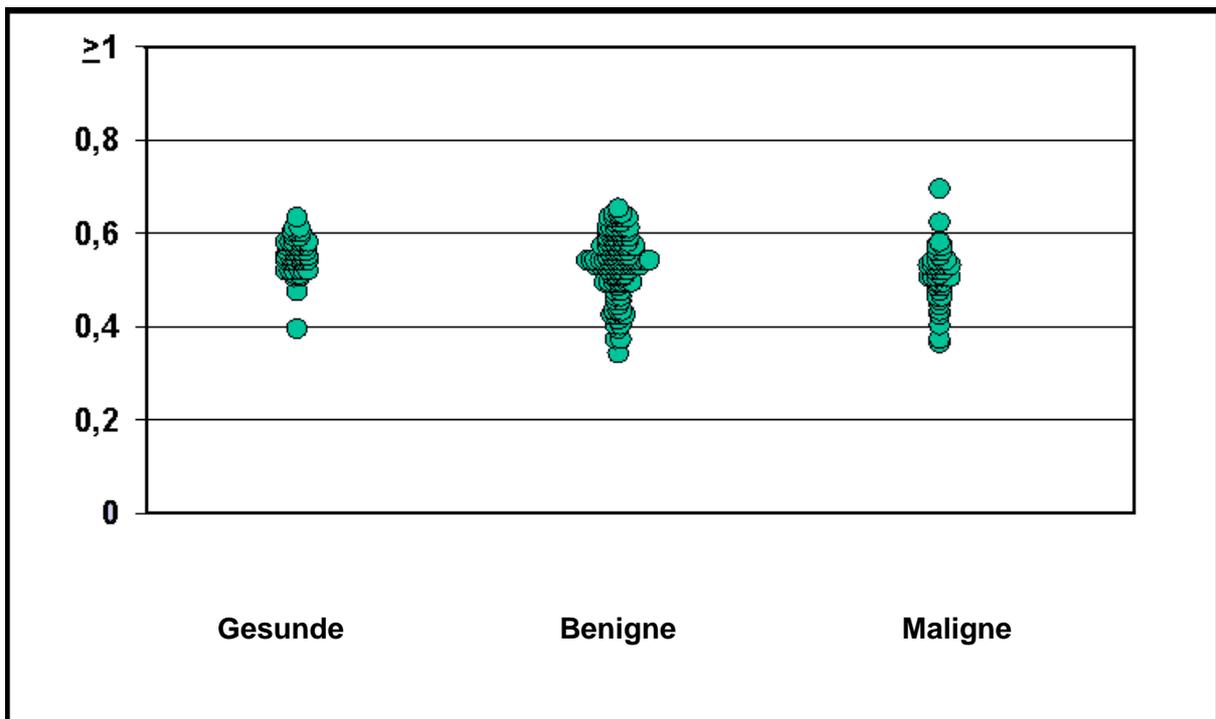
Bei der Untersuchung der Seren von Patienten mit benignen oder malignen Erkrankungen des **Gastrointestinaltraktes** findet sich eine breite Streuung der Werte. Die gesonderte Darstellung der benignen entzündlichen Erkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa, Cholezystolithiasis) zeigt keine Veränderung im Verhalten der Subklassen gegenüber den anderen benignen Erkrankungen. Durch die Bestimmung der IgG-Subklassen ergibt sich keine Differenzierungshilfe auf das Vorliegen einer benignen bzw. malignen Erkrankungen.

Abb. 14: Vergleich: Gesunde, benigne und maligne gastrointestinale Erkrankungen



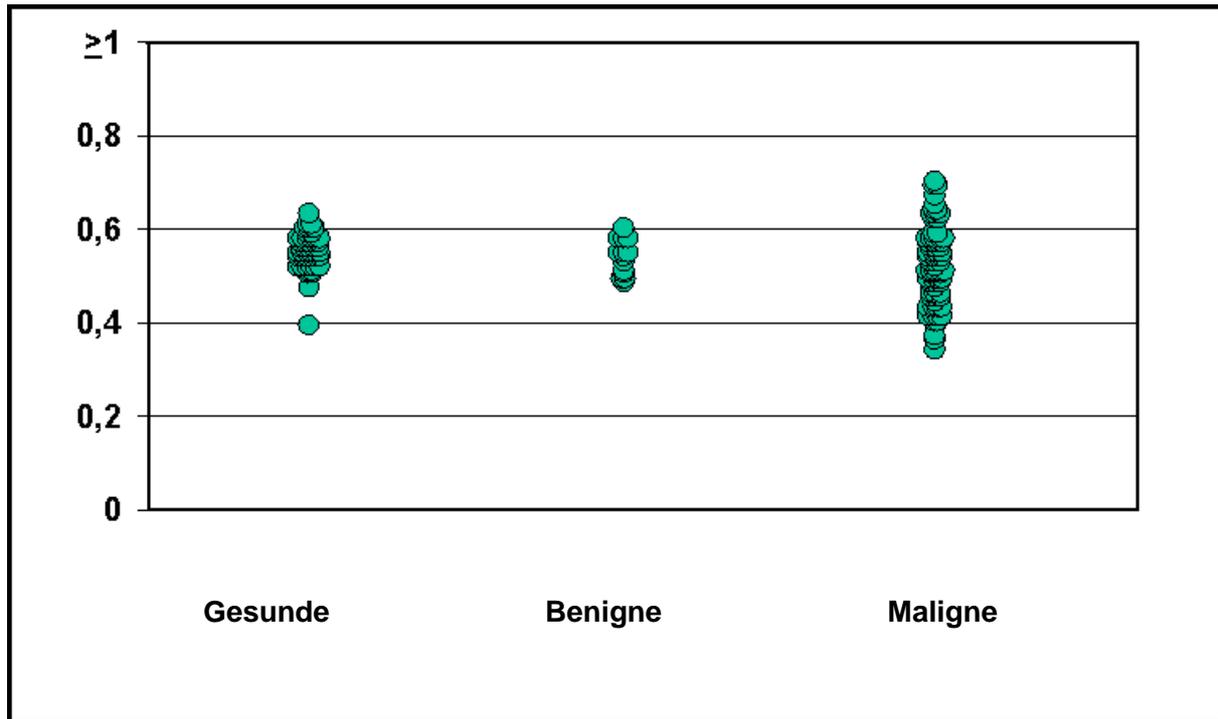
Bei der Darstellung der Ergebnisse bei Patientinnen mit **gynäkologischen Erkrankungen** zeigt die Verteilung der Punktwolken, dass der IgG1-Anteil sowohl bei den Patienten mit benignen Erkrankungen als auch bei Karzinompatientinnen einer breiten Streuung unterliegt. Auch bei den Patientinnen mit malignen Erkrankung werden Werte gefunden, die einen IgG1-Anteil deutlich über 60 % aufweisen.

Abb. 15: Vergleich: Gesunde, benigne und maligne gynäkologische Erkrankungen



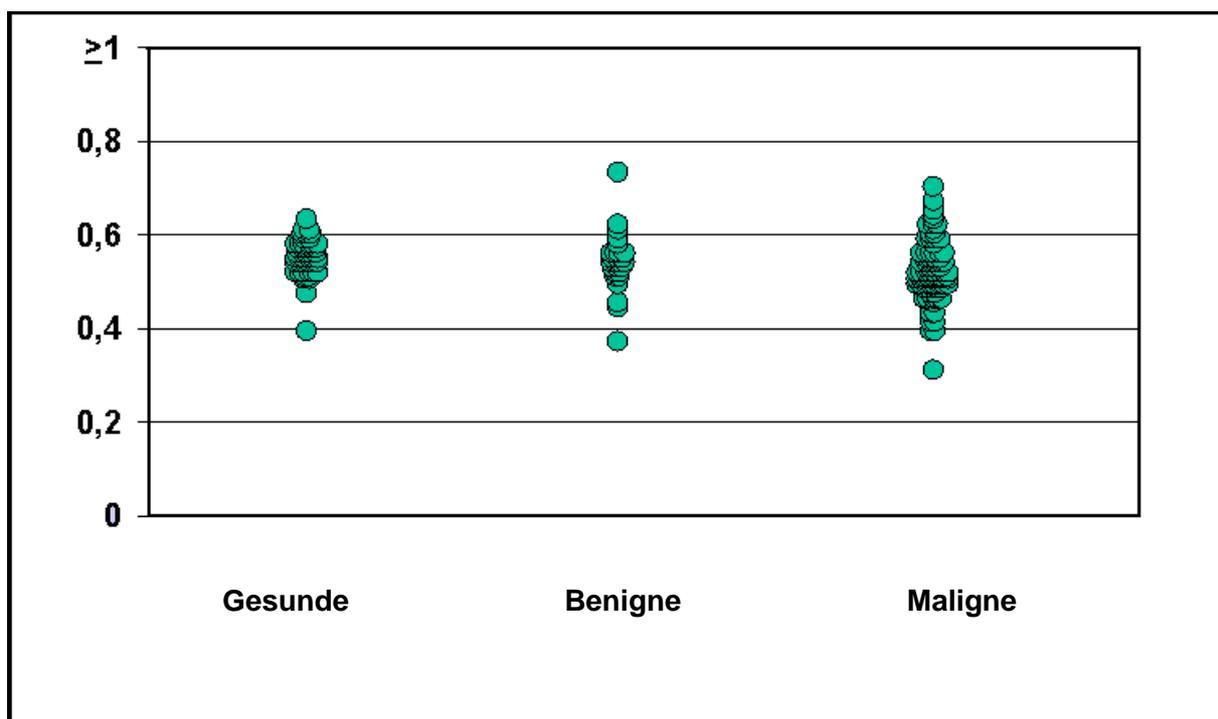
Das Verhalten der IgG-Subklassen bei benignen und malignen **Lungenerkrankungen** zeigt bei mehreren Patienten einen IgG1-Anteil im Normbereich. Daneben findet sich aber auch eine große Gruppe mit deutlich erniedrigten Werten. Die Werteverteilung bei den Patienten mit benignen Erkrankungen weist eine sehr geringe Streubreite auf, der niedrigste Wert liegt bei einem IgG1-Anteil von 47 %.

Abb. 16: Vergleich: Gesunde, benigne und maligne Lungenerkrankungen



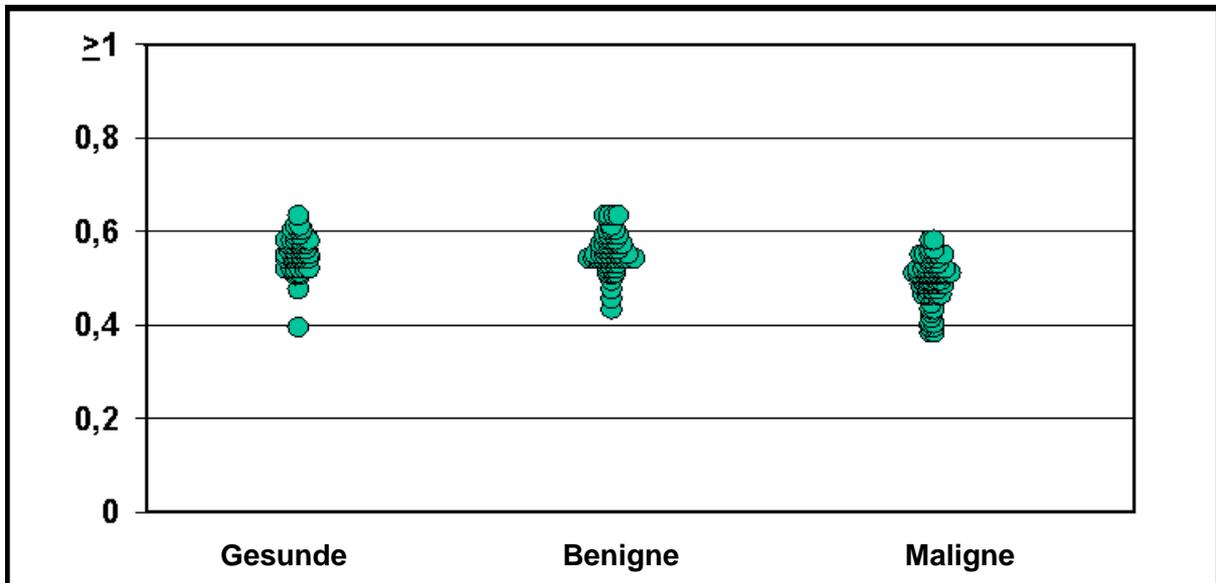
Bei der Darstellung der Ergebnisse von Patientinnen mit benignen und malignen **Mammaerkrankungen** zeigt die Darstellung der Punktwolken, dass eine Beurteilung der Dignität aufgrund des IgG1-Anteils nicht gegeben ist. Sowohl bei den Patienten mit benignen Erkrankungen auch bei Patientinnen mit Mammakarzinom liegen die meisten Werte in einem Bereich zwischen 50 – 55 %.

Abb. 17: Vergleich: Gesunde, benigne und maligne Mammaerkrankungen



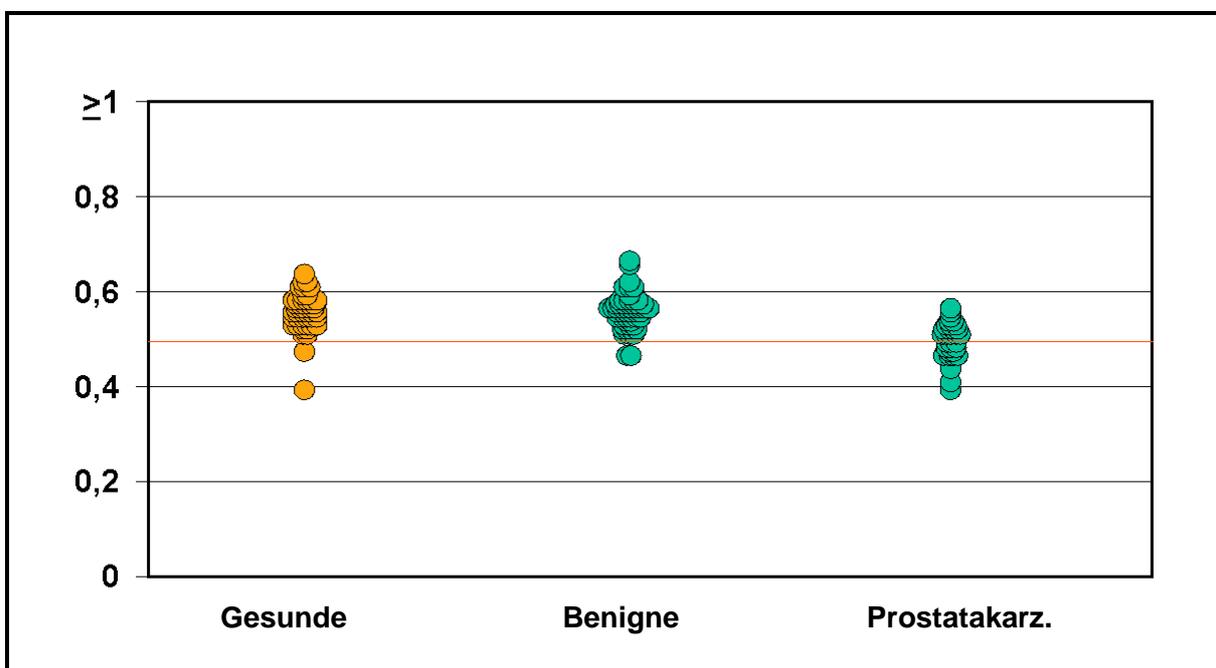
Bei den **urologischen Erkrankungen** zeigt sich, dass sich die Werte bei den Gesunden und den Patienten mit benignen Erkrankungen nur wenig unterscheiden. Im Vergleich dazu liegt der IgG1-Anteil der Patienten mit malignen urologischen Erkrankungen deutlich niedriger.

Abb. 18: Vergleich: Gesunde, benigne und maligne urologische Erkrankungen



Auf Grund der auffällig erniedrigten Werte bei den malignen urologischen Erkrankungen wurden aus dieser Gruppe die Patienten mit Prostatakarzinom und die von benignen **Prostataerkrankungen** Betroffenen gesondert dargestellt: Es zeigt sich, dass Patienten mit BPH oder Prostatitis in einem Wertebereich zwischen 50 – 60 % liegen. Karzinompatienten haben einen deutlich niedrigeren IgG1-Anteil, kein Wert liegt über 60 %.

Abb. 19: Vergleich: Gesunde, BPH und Prostatakarzinom



Tabellarische Darstellung der Werte

- bei **Gesunden**

In der Werteverteilung im Bereich der 95 % Perzentile liegt der Quotient IgG1/IgG bei den gesunden Probanden in einem Bereich zwischen 39 % - 63 %, der Median liegt bei 56 % (Tab. 12).

- bei **Patienten mit benignen Erkrankungen**

Hier findet sich im Vergleich zu den Gesunden eine breitere Streuung der Werte. Der Anteil von IgG1 liegt in einem Bereich zwischen 34 % - 73 %, der Median liegt bei den verschiedenen benignen Erkrankungen zwischen 54 % und 56 % (Tab.12).

Tab. 12: Verteilung von IgG1/IgG bei Gesunden und Patienten mit benignen Erkrankungen

Diagnose	Mean	Median	Bereich	95% Perzentile
Gesunde	0,55	0,56	0,39 – 0,63	0,61
ben. gast. Erkr.	0,53	0,55	0,22 – 0,64	0,63
ben. gyn. Erkr.	0,53	0,54	0,34 – 0,65	0,63
ben. urol. Erkr.	0,55	0,55	0,43 – 0,63	0,63
ben. Prostataerkr.	0,55	0,56	0,46 – 0,66	0,62
ben. Lungenerkr.	0,54	0,55	0,48 – 0,60	0,60
ben. Mammaerkr.	0,54	0,54	0,37 – 0,73	0,68
Autoimmunerkr.	0,54	0,56	0,43 – 0,65	0,65

- bei **Patienten mit malignen Erkrankungen**

Die Ergebnisse bei der Untersuchung der Patienten mit malignen Erkrankungen zeigen im Bereich der 95% Perzentile eine breite Streuung des Quotienten IgG1/IgGgesamt, der Anteil von IgG1 liegt zwischen 31 % und 70 %. Der Median unterscheidet sich deutlich von dem der Patienten mit benignen Erkrankungen: er

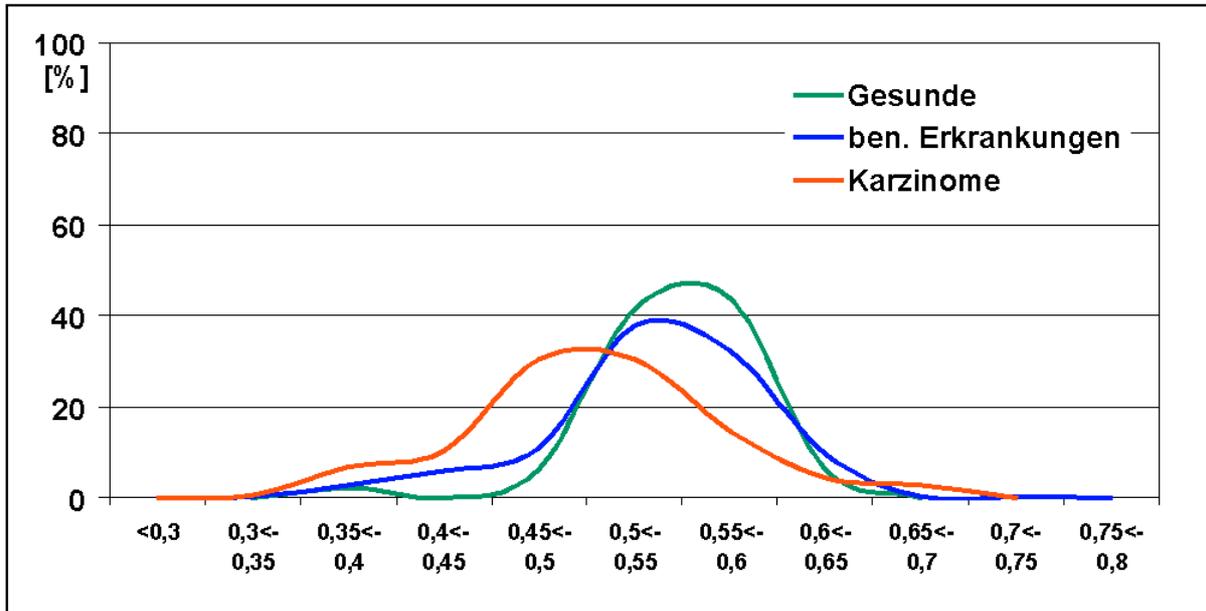
liegt bei fast allen Karzinompatienten bei 51 %, bei den Patienten mit Prostatakarzinom bei 50 % (Tab.13).

Tab. 13: Verteilung von IgG1/IgG bei Patienten mit malignen Erkrankungen

Diagnose	Mean	Median	Bereich	95% Perzentile
Gynaekol. Karzinome	0,51	0,51	0,36 – 0,69	0,61
Kolorekt. Karzinome	0,51	0,51	0,36 – 0,69	0,66
Bronchialkarzinome	0,52	0,51	0,34 – 0,70	0,69
Mammakarzinome	0,52	0,51	0,31 – 0,70	0,64
Gastroint. Karzinome	0,52	0,52	0,36 – 0,67	0,64
Prostatakarzinome	0,49	0,50	0,39 – 0,56	0,55
Urolog. Karzinome	0,49	0,51	0,38 – 0,58	0,58

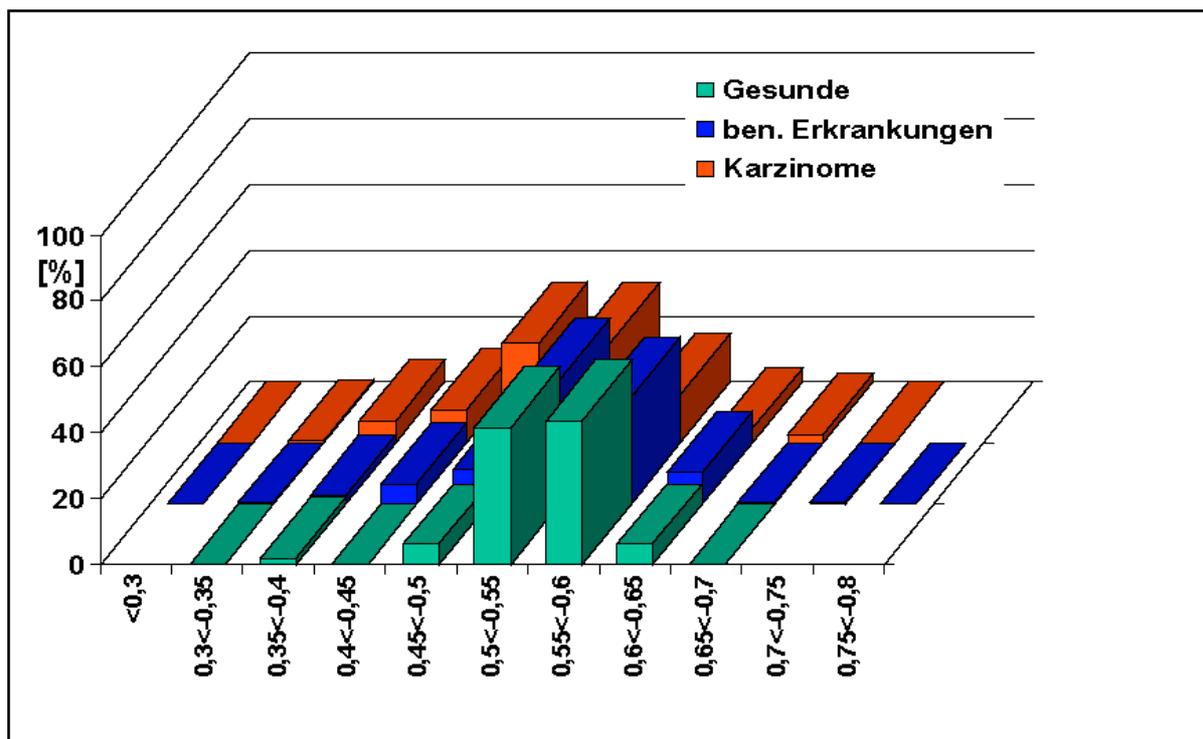
Nach der Darstellung der Verteilung des Quotienten IgG1/IgG-gesamt bei den einzelnen Organgruppen zeigt die Zusammenfassung aller Ergebnisse, dass im Kollektiv der Gesunden die Mehrzahl der untersuchten Seren einen IgG1-Anteil zwischen 55 % und 63 % aufweist. Die Werteverteilung bei den Patienten mit benignen Erkrankungen zeigt den überwiegenden Anteil der Werte in einem Bereich zwischen 50 % und 55 %, gleichzeitig wird deutlich, dass 20 % der Werte einen IgG1-Anteil unter 50 % ausweisen. Im Gegensatz dazu ist die Kurve der Patienten mit malignen Erkrankungen deutlich nach links verschoben, wobei insbesondere ein großer Anteil von Patienten mit sehr niedrigen Werten auffällt, gleichzeitig aber auch bei diesen Patienten mit malignen Erkrankungen solche gefunden werden, die einen hohen Anteil von IgG1 aufweisen.

Abb.20: Werteverteilung bei Gesunden und Patienten mit benignen bzw. malignen Erkrankungen



Die dreidimensionale Darstellung verdeutlicht den geringen Unterschied der Wertelage bei gesunden Personen und Patienten mit benignen Erkrankungen. Die Gruppe der Patienten mit malignen Erkrankungen weist häufig einen erniedrigten IgG1-Anteil auf. In allen drei Subkollektiven werden Ergebnisse im Bereich der ganz niedrigen Werte gefunden, ebenso wird dargestellt, dass bei einem Teil der Karzinompatienten hohe IgG1-Anteile gemessen wurden.

Abb.21: Werteverteilung (Säulen)



5.2.2. Methodenvergleich

Korrelation im direkten Methodenvergleich

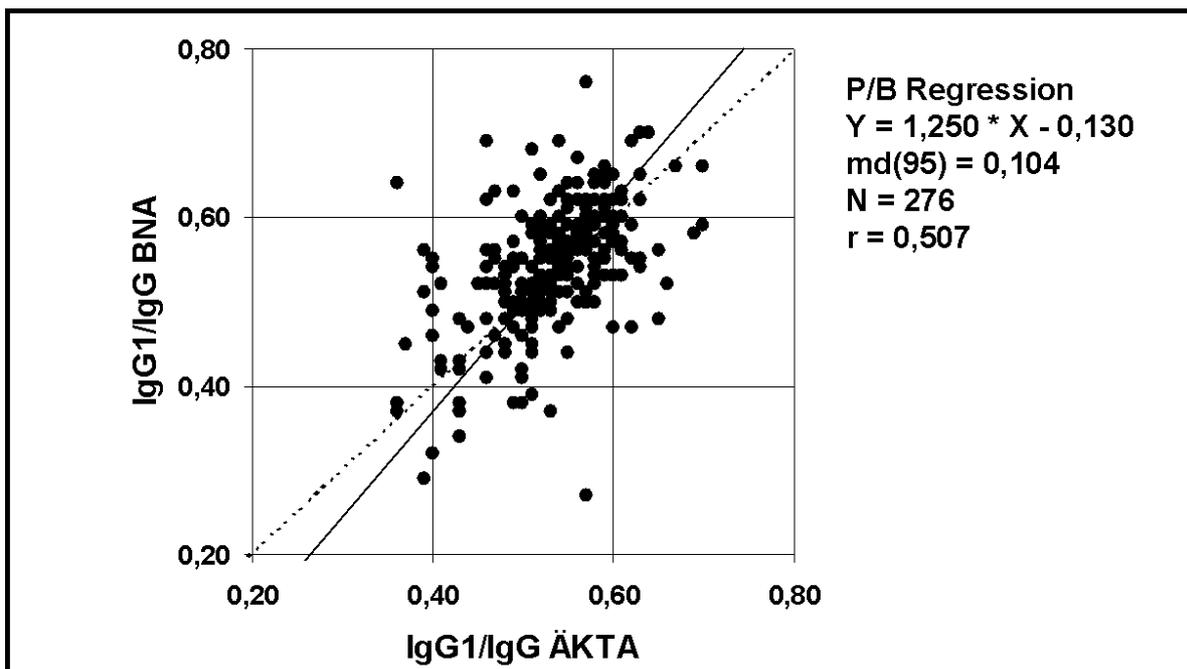
Eine hauptsächliche Fragestellung der Studie konzentrierte sich auf die Frage der Praktikabilität und der klinischen Routinefähigkeit der Affinitätschromatographischen Methode bei der Detektion von IgG-gesamt, IgG1 und IgG2. Als Vergleichsmethode wurde die Nephelometrie gewählt und ein Teil der Seren am BN II der Firma Behring parallel vermessen.

Als Bezugsgröße wurde die Affinitätschromatographie, (ÄKTA basic 10 XT) gewählt, die Gleichung der Regressionsgeraden ist dem Diagramm zu entnehmen.

Eine Korrelation in einem Methodenvergleich wird als gut bezeichnet, wenn der Korrelationskoeffizient größer als 0,9 ist.

Die Werteverteilung im Diagramm zeigt, dass starke Abweichungen auf beiden Seiten der Geraden vorkommen, die keiner mathematischen Gesetzmäßigkeit folgen. Dies kommt auch durch den niedrigen Korrelationskoeffizient $r = 0,507$ zum Ausdruck.

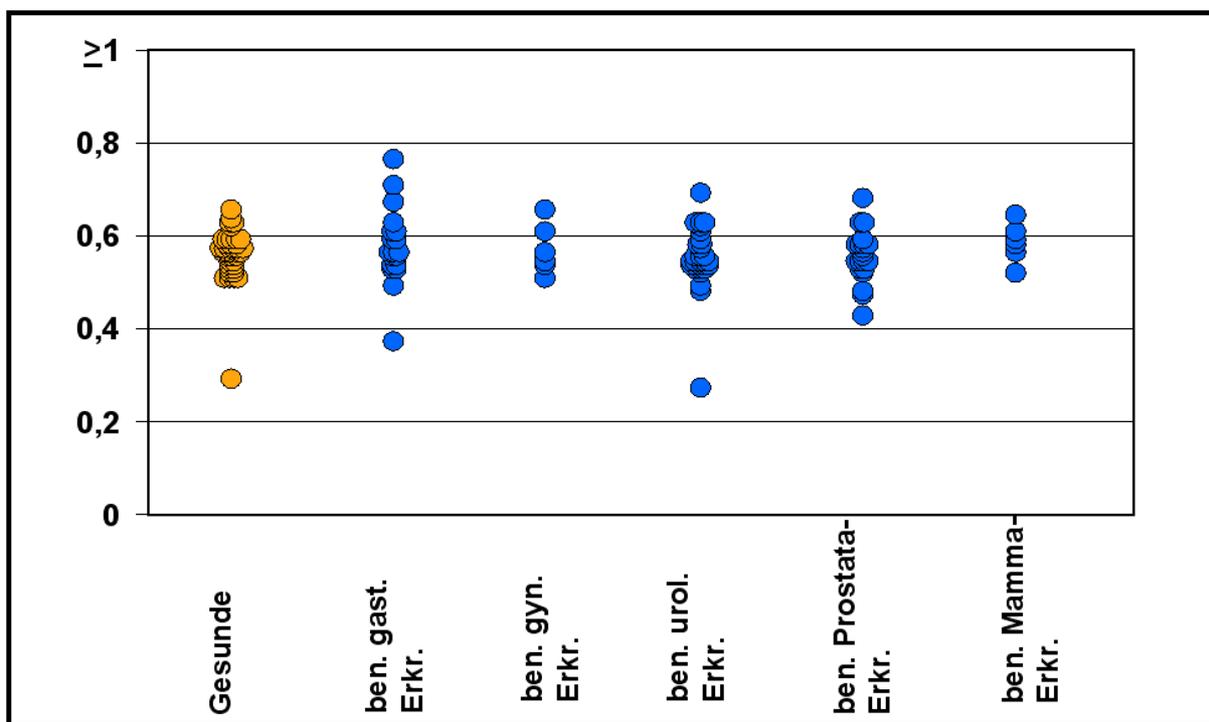
Abb 22: Methodenvergleich ÄKTA basic 10 XT / BN II



Ergebnis der nephelometrischen Messungen

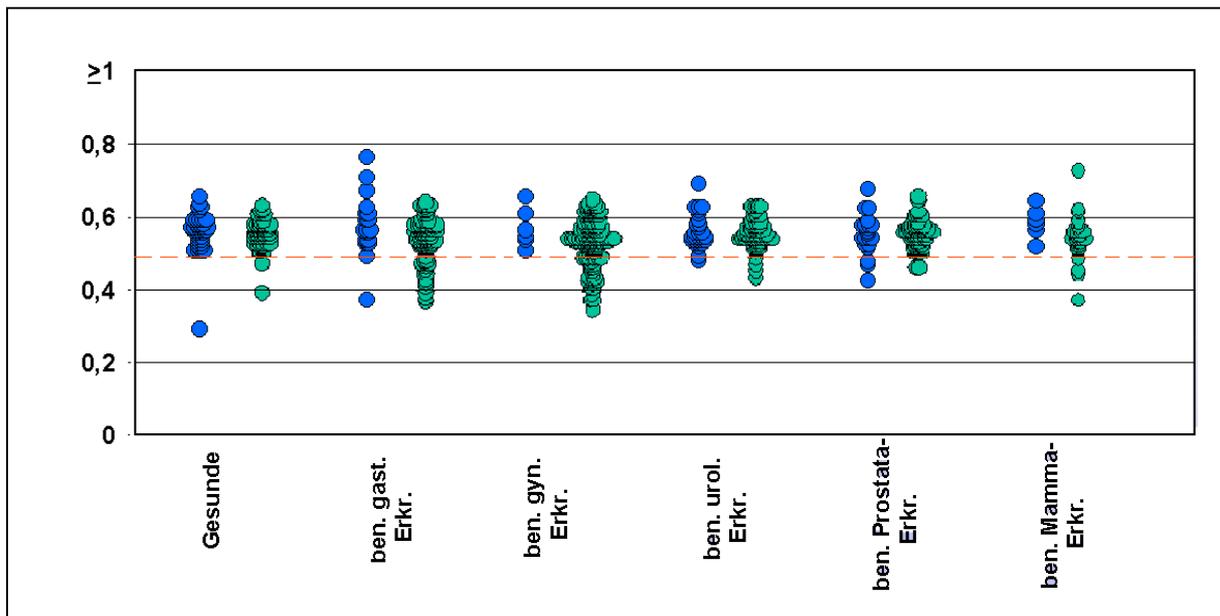
Die Werteverteilung bei den Patienten, die gleichzeitig nephelometrisch gemessen wurden, entspricht im wesentlichen den Ergebnissen der affinitätschromatographischen Messung. Die überwiegende Mehrheit zeigt Ergebnisse in einem Bereich zwischen 50 % und 60 %, die größte Streuung zeigt sich auch hier bei Patienten mit benignen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und bei Patienten mit benignen Prostataerkrankungen.

Abb.23: Werteverteilung bei Gesunden und bei Patienten mit benignen Erkrankungen (BN II)



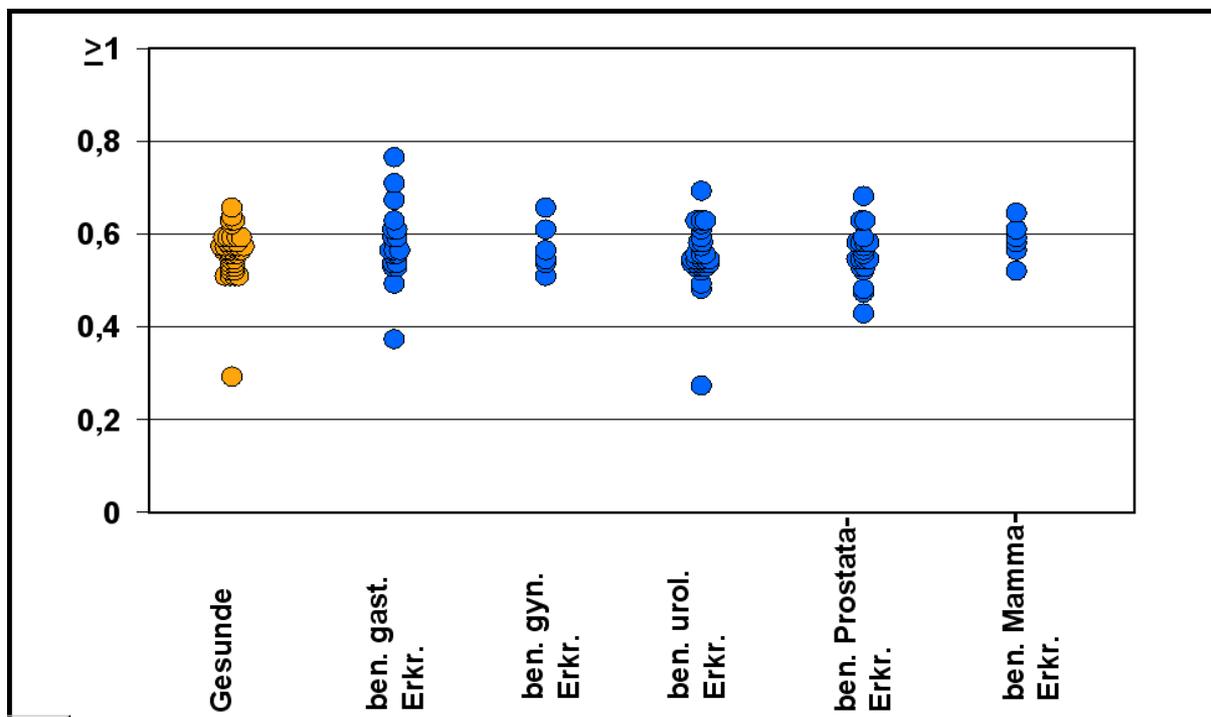
Zum direkten Vergleich beider Methoden wird die Werteverteilung der affinitätschromatographisch bzw. nephelometrisch ermittelten Ergebnisse nebeneinander dargestellt. Die am BN II gemessenen Proben liegen insgesamt etwas höher als die Vergleichswerte (ÄKTA).

Abb. 24: Gegenüberstellung Gesunde und benigne Erkrankungen (BN II blau / ÄKTA grün)



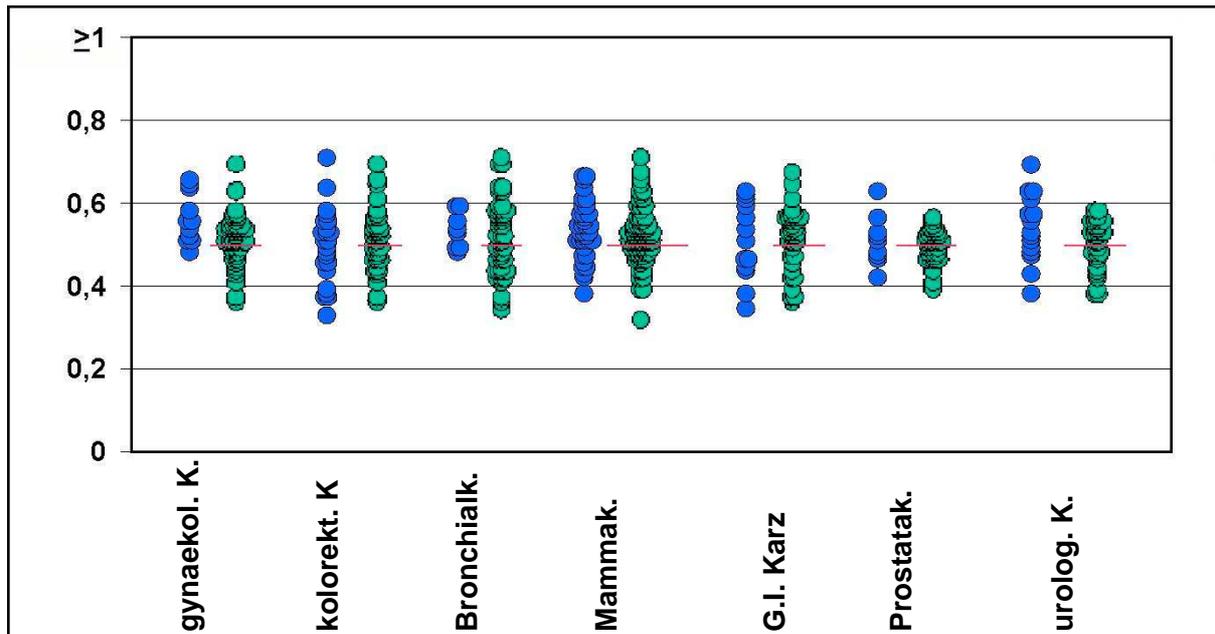
Auch die nephelometrische Untersuchung eines Teils der Seren von Patienten mit malignen Erkrankungen deckt sich mit den Ergebnissen der Affinitätschromatographischen Analysen.

Abb. 25: Werteverteilung bei Patienten mit malignen Erkrankungen (BN II)



Im Vergleich beider Methoden wird auch hier die Werteverteilung der affinitätschromatographisch bzw. nephelometrisch ermittelten Ergebnisse nebeneinander dargestellt. Bei den malignen Erkrankungen entspricht die Streuung der Werte, die am BN II gemessen wurden, den Vergleichswerten (ÄKTA).

Abb. 26: Gegenüberstellung maligne Erkrankungen (BN II blau / ÄKTA grün)



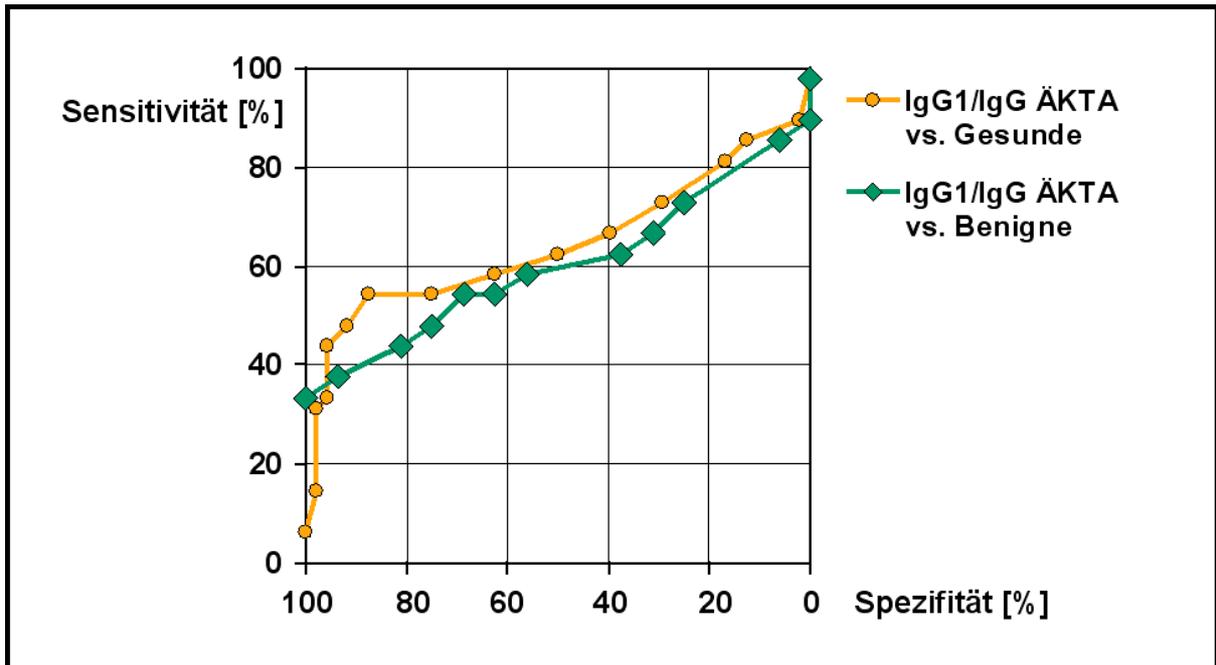
5.2.3. Abgleich der IgG-Subklassen mit etablierten onkologischen Biomarkern

Zur Darstellung der klinischen Aussagefähigkeit der ermittelten Meßwerte wurden für die einzelnen Organsysteme Sensitivität-Spezifitäts-Diagramme, sogenannte ROC-Kurven („receiver-operating characteristics“) berechnet.

Lungenkarzinom

Für das Lungenkarzinom ergibt sich in der Gegenüberstellung Gesunder und Patienten mit Lungenkarzinom ein flacher, fast diagonalen Kurvenverlauf. Diese Kurve ändert sich nicht wesentlich beim Vergleich Karzinompatienten und Patienten mit benignen Lungenerkrankungen.

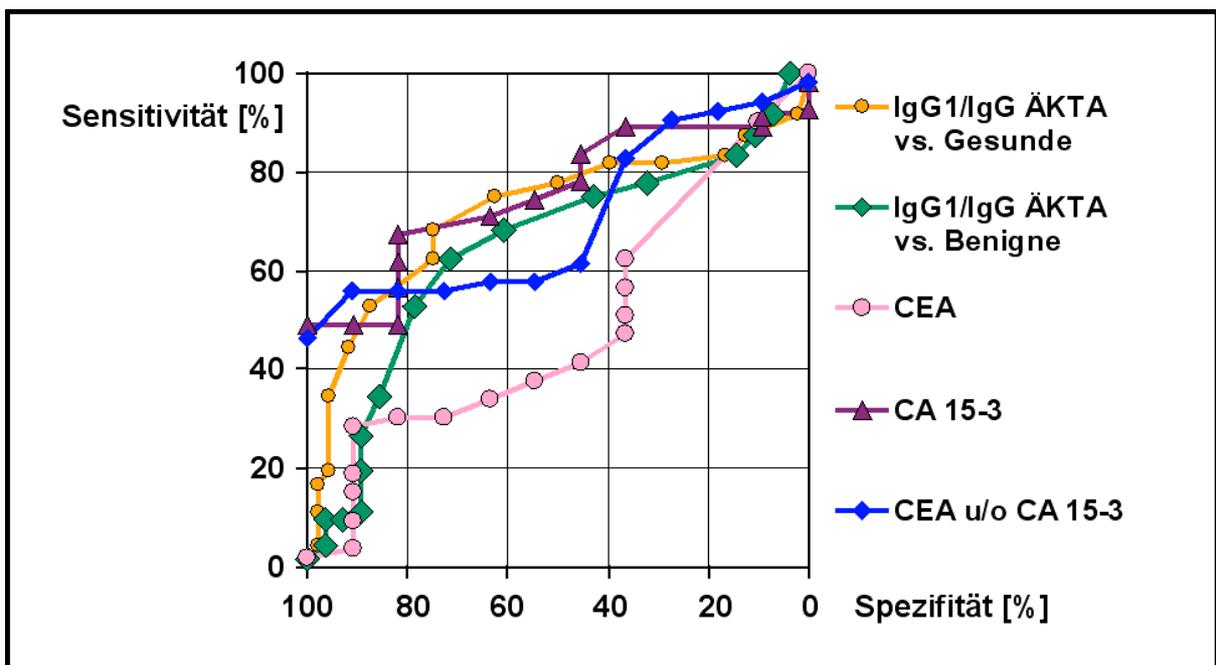
Abb. 27: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. Lungenkarzinom



Mammakarzinom

Der Kurvenverlauf beim Mammakarzinom stellt sich sowohl in der Gegenüberstellung zu den Gesunden als auch zu den Werten bei den benignen Erkrankungen deutlich steiler dar. Im Vergleich dazu zeigen die Tumormarker CEA eine flachere Kurve, CA 15-3 einen deutlich steileren Kurvenverlauf.

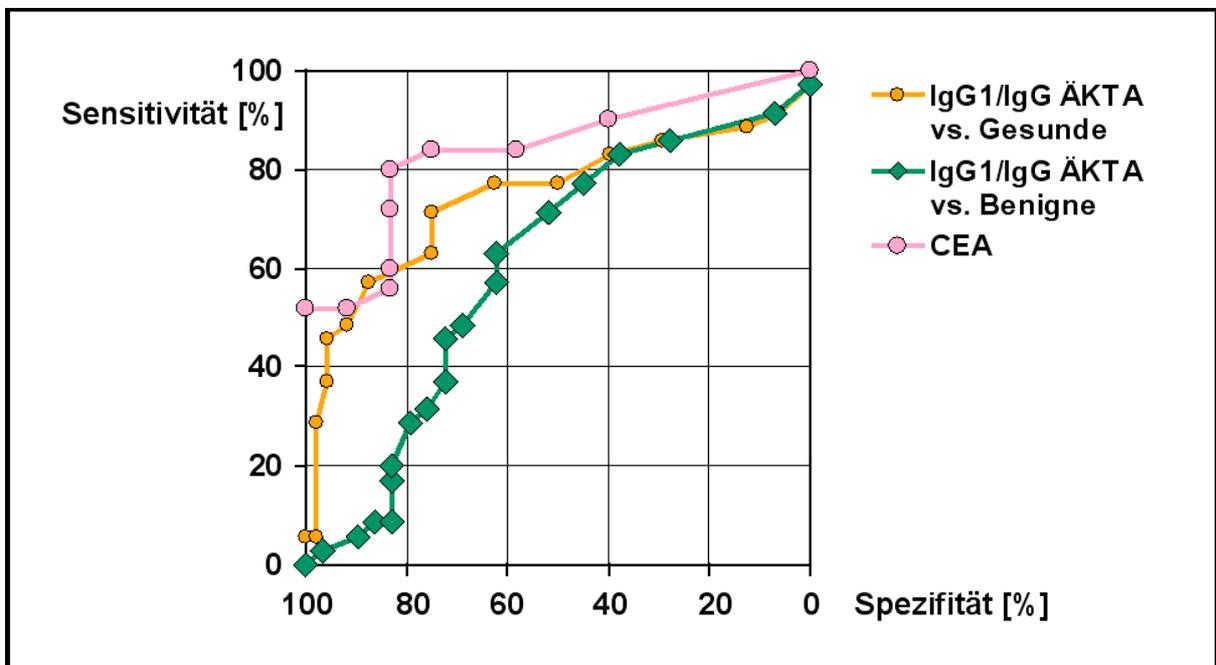
Abb 28: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. Mammakarzinom



Gastrointestinale Karzinome

Bei den gastrointestinalen Karzinomen ähnelt der Kurvenverlauf einer Geraden, es besteht kaum ein Unterschied zwischen den Kurven mit Gesunden und denen mit benignen Erkrankungen. Der Kurvenverlauf des Biomarkers CEA zeigt eine deutlich höhere Spezifität mit einem entsprechend steileren Kurvenverlauf.

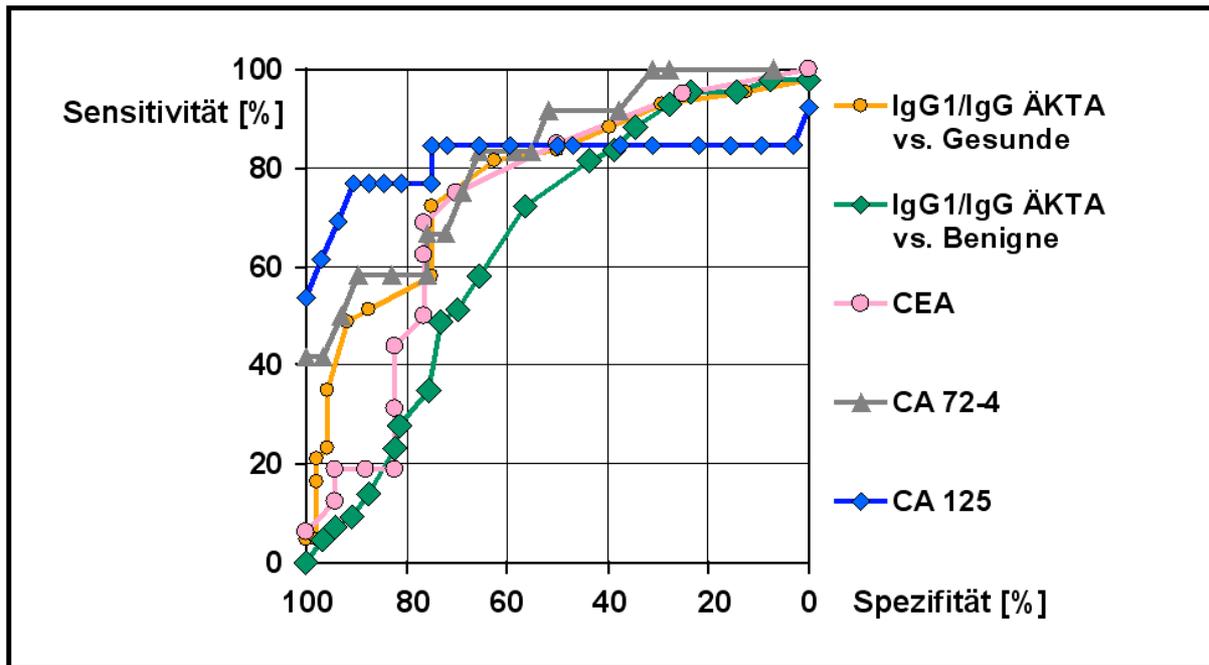
Abb 29: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. gastrointestinale Karzinome



Gynäkologische Karzinome

Für die gynäkologischen Karzinome ergibt sich jeweils ein deutlich besseres Sensitivitäts-Spezifitätsprofil. Der Kurvenverlauf der am Äkta ermittelten Subklassenwerte deckt sich vor allem im mittleren Teil im wesentlichen mit der Kurve von CEA. Mit dem Tumormarker CA 72-4 wird eine deutlich steilere Kurve erreicht und auch der Verlauf der Kurve von CA 125 ist dem Kurvenverlauf der Subklassen überlegen.

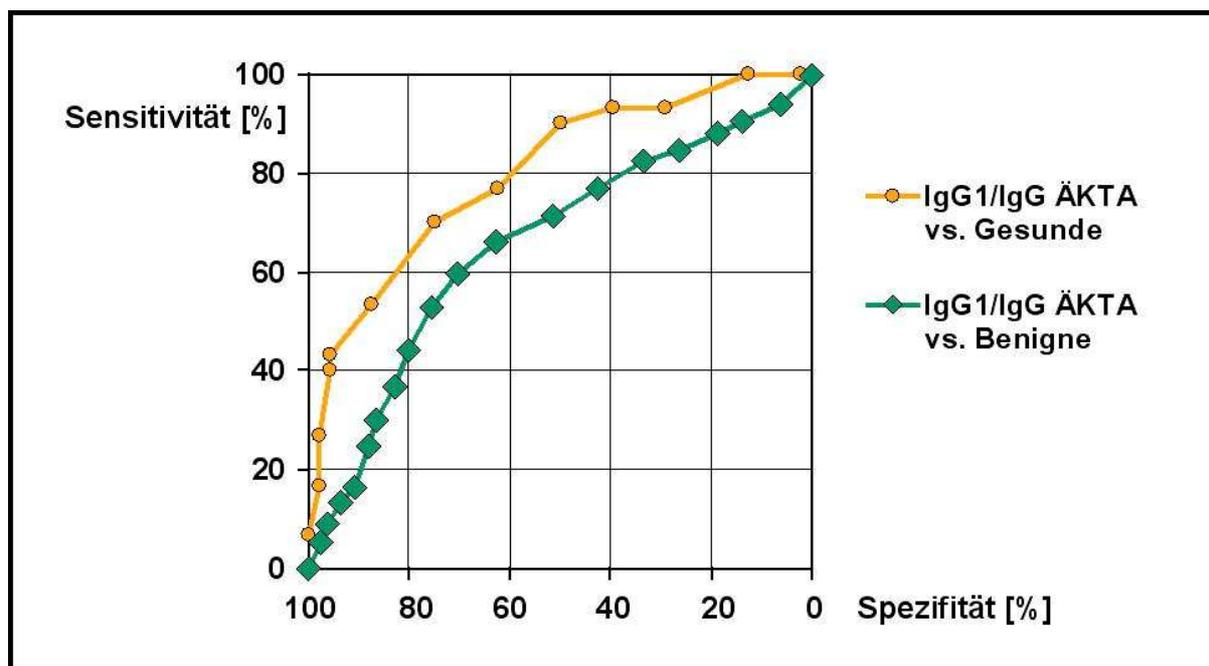
Abb 30: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. gynäkologische Karzinome



Urologische Karzinome

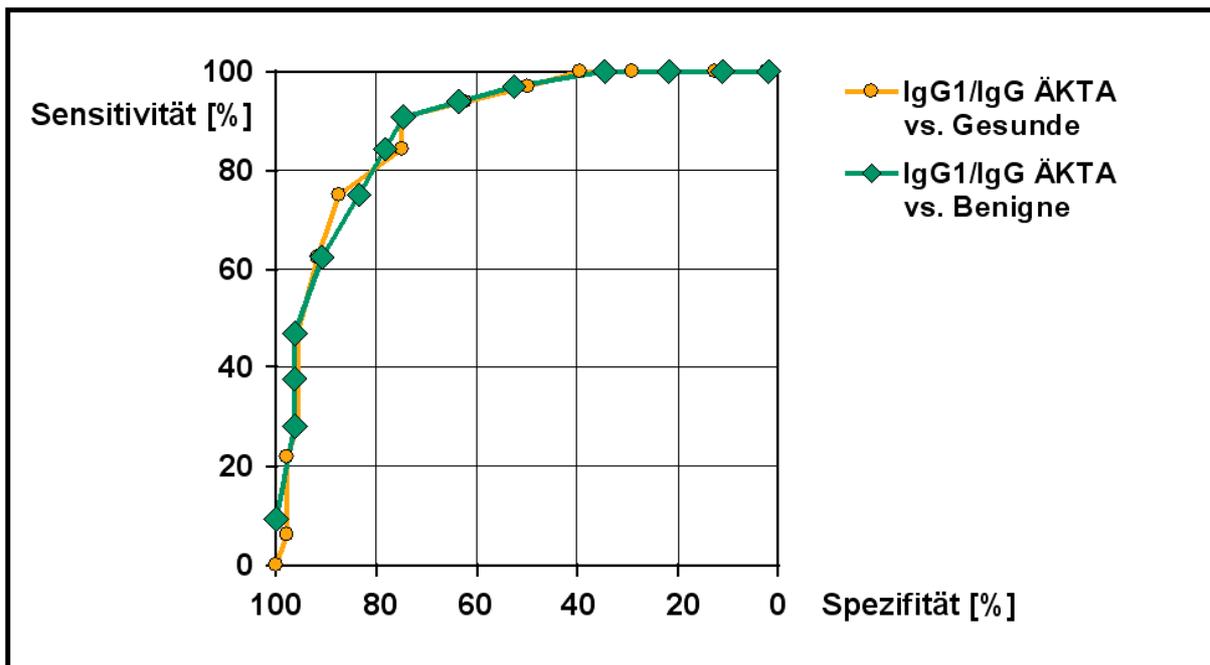
Die urologischen Karzinome lassen sich über den IgG-Subklassenshift nur sehr gering von den Patienten mit benignen urologischen Erkrankungen unterscheiden, etwas besser ist die Differenzierung gegenüber den Gesunden.

Abb 31: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. urologische Karzinome



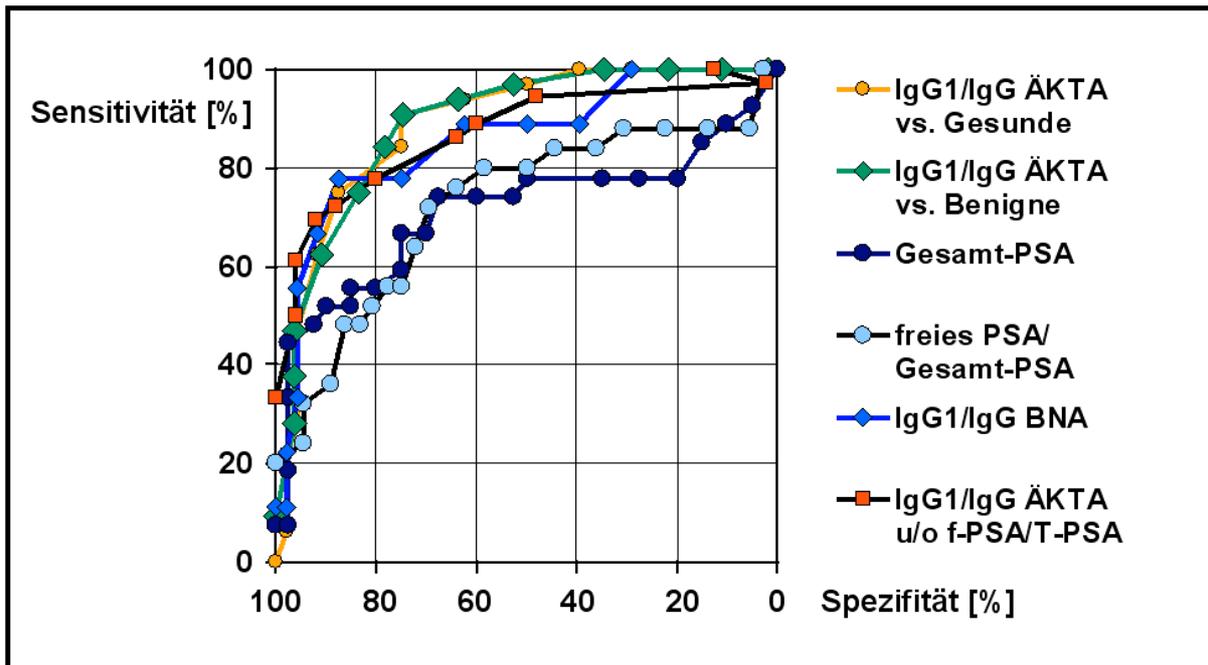
Bei den Prostatakarzinomen zeigt der Kurvenverlauf vs. Gesunde ein hohes Diskriminierungspotential; die Kurve Prostatakarzinom vs. benigne Prostataplasie verläuft dazu fast deckungsgleich.

Abb 32: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. Prostatakarzinome



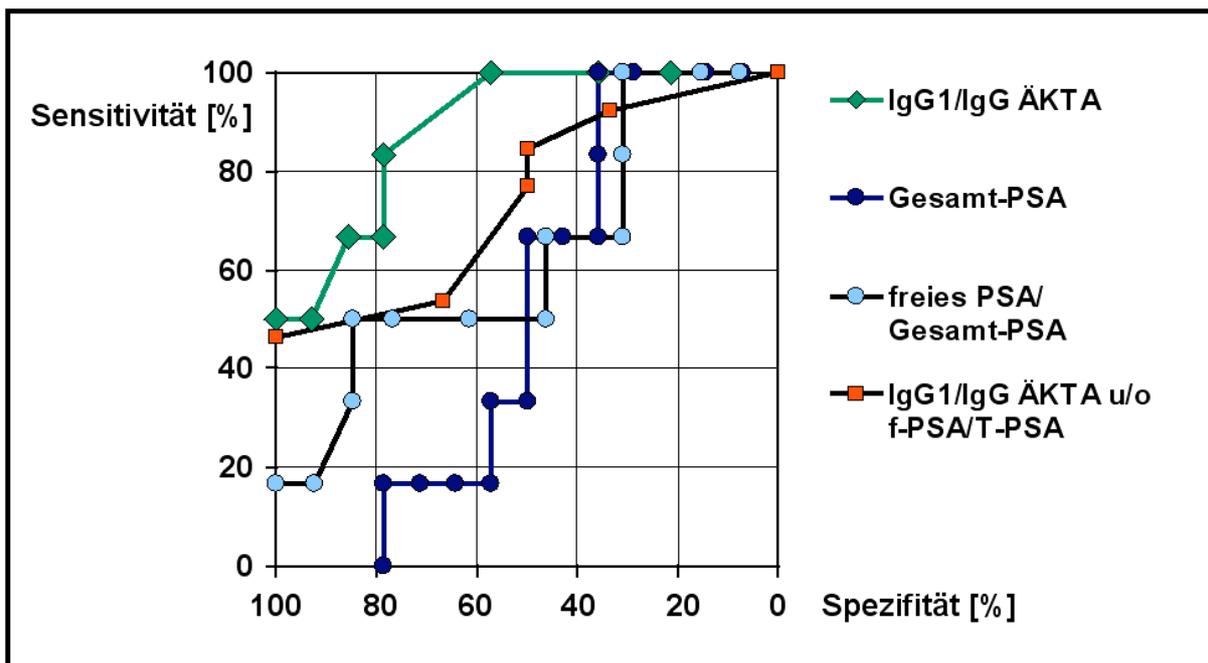
Die Kurve des Gesamt-PSA liegt unterhalb der Subklassenkurven. Durch die Kombination des PSA mit dem freien PSA lässt sich keine bessere Unterscheidung benigne/maligne gegenüber dem Gesamtwertebereich erreichen; auch die daraus resultierende Kurve liegt unterhalb der Subklassenkurve.

Abb 33: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. Prostatakarzinome, PSA, fPSA



Auch bei der Darstellung der Spezifität und Sensitivität in einem eingeschränkten Bereich mit Gesamt-PSA – Werten zwischen 4 – 10 ng/ml ergibt sich keine wesentliche Veränderung in den Kurvenverläufen.

Abb 34: ROC-Kurve: Gesunde bzw. Benigne vs. Prostatakarzinome, PSA, fPSA, eingeschränkter Bereich



6. Diskussion

6.1. Methodischer Teil

Maligne Tumore stehen an zweiter Stelle in der Rangfolge der häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland (2). Schon 1965 wurde von *Gold und Freedman* ein Carcinoembryonales Antigen (CEA) beschrieben, von dem man glaubte, eine tumorspezifische Substanz gefunden zu haben, mit Hilfe derer man mit hoher Sicherheit und sehr frühzeitig die Diagnose „maligne Proliferation“ stellen könne. Eingehende Forschungen auf diesem Gebiet zeigten bald, dass diese Substanz in erhöhter Konzentration bei Patienten mit benignen Erkrankungen und in niedriger Konzentration auch bei Gesunden nachgewiesen werden kann (7).

In den darauf folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere tumorassoziierte Antigene beschrieben, von denen jedoch keiner tumor- bzw. organspezifisch war.

Idealerweise sollte ein onkologischer Biomarker eine hohe diagnostische Spezifität (richtig-negatives Ergebnis bei Gesunden bzw. bei Patienten mit benignen Erkrankungen) sowie eine hohe Sensitivität (ab einem bestimmten Grenzwert nur bei malignen Tumoren nachweisbar) zeigen. Ein Marker, der diesen Anforderungen voll gerecht wird, kann wahrscheinlich nicht gefunden werden. Hilfreich wäre aber auch ein Tumormarker, der mehrere Organsysteme erfasst und dessen Sensitivität so hoch wäre, um mit Hilfe dieses Markers Screening-Untersuchungen bei asymptomatischen Personen durchführen zu können bzw. um die Primärdiagnose bei Patienten mit B-Symptomatik (Gewichtsverlust, Nachtschweiß, Fieber) zu verbessern. Mit einem solchen Test müsste also auch frühzeitig eine maligne Proliferation nachzuweisen sein. Neben der Forderung nach hoher Empfindlichkeit des Tests sollte eine möglichst kostengünstige, unkomplizierte und weitgehend automatisierte Testdurchführung möglich sein. Als weiterer Faktor sollte neben einem günstigen Preis-Leistungs-Verhältnis eine geringe Analysendauer und eine niedrige Impräzision gewährleistet sein.

Die affinitätschromatographische Bestimmung von IgG sowie der IgG-Subklassen und die Erfassung der typischen tumorassoziierten Veränderungen im Subklassenprofil schien einen Großteil dieser Erwartungen zu erfüllen.

Dabei zeigt der Subklassenshift, bestehend in einer Reduktion des Anteils von IgG1 zugunsten des steigenden prozentualen Anteils von IgG2 keine Organspezifität, da die Veränderung im Immunsystem stattfindet und nicht nach einer Substanz gesucht werden muß, die vom malignen Gewebe gebildet wird. In mehreren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Erwin Schauenstein/Graz (15, 31) wurde beschrieben, daß die affinitätschromatographisch erfaßbare Veränderung im Subklassenprofil teilweise schon vor dem eigentlichen Tumorwachstum beginnt. Dadurch wäre die Bestimmung der IgG-Subklassen allen anderen Methoden, sowohl den klassischen Tumormarkern als auch bildgebenden Verfahren überlegen.

Die Testdurchführung am ÄKTA basic 10 XT und die Kopplung an ein Unicorn – Auswertesystem sollte eine weitgehend automatisierte Testdurchführung gewährleisten und nur wenige manuelle Zwischenschritte erforderlich machen, wie z. B. die Vorbereitung und Bereitstellung der Pufferlösungen und die manuelle Auswertung der Chromatogramme.

Die Kosten für die einzelne Bestimmung können, wenn die gebrauchsfertigen Pufferlösungen selbst hergestellt werden, von Seiten des Material- bzw. Reagenzienbedarfs sehr niedrig gehalten werden. Dieser Aspekt ist besonders bei breit angelegten Screeninguntersuchungen ein wesentlicher Faktor.

Vor allem im Vergleich zu früher häufig eingesetzten radioimmunchemischen Testverfahren stellt die affinitäts-chromatographische Subklassenbestimmung eine Methode dar, die ohne Strahlenbelastung oder Kontaminationsgefahr für das Personal durchführbar ist. Auch die zunehmend an Bedeutung gewinnende Frage nach umweltfreundlicher Handhabung spricht für die Affinitätschromatographie. Sie erweist sich, vor allem im Vergleich zu der früher häufig eingesetzten radiale Immundiffusion nach Ouchterlony (17) als äußerst umweltfreundlich, da keine Abfallstoffe entstehen, die zusätzliche Entsorgungskosten produzieren.

Bei der vorliegenden prospektive Studie zeigte sich im Rahmen der **methodischen Evaluierung**, dass die affinitätschromatographische Subklassenbestimmung sehr zeitaufwändig ist und durch zahlreiche Störfaktoren beeinflusst werden kann.

Die Herstellung der Puffer erfordert von der Herstellung der Stammlösungen bis hin zu den gebrauchsfertigen Pufferlösungen zahlreiche manuelle Zwischenschritte. Die kurze Haltbarkeit der Pufferlösungen führt dazu, dass eine Messreihe nicht beliebig

erweitert werden kann: Während des Messvorgangs müssen die Pufferlösungen bei Raumtemperatur vorliegen. Die voraussichtlich benötigten Pufferlösungen werden am Vortag aus der Kühlung genommen, um dann bei Raumtemperatur zur Verfügung zu stehen; da eine Zugabe von frisch hergestelltem Puffer zu einer Extinktionsänderung führt (s. 3.1.1. Affinitätschromatographie / Herstellung und Verwendung der Pufferlösungen).

Eine Einschränkung der Routinetauglichkeit der Methode stellt auch der hohe Zeitaufwand bei der Gerätevorbereitung dar – hauptsächlich bedingt durch die aufwendigen Spülphasen. Die Untersuchung einer Probe erfordert einen Zeitaufwand von über 70 Minuten (21 Minuten für die Messung von IgG-gesamt, 50 Minuten für die Messung von IgG1 und IgG2). Tritt ein Fehler bei der Messung von IgG1 und IgG2 auf, sind durch den hohen Zeit- und Materialverbrauch meist auch die vorher durchgeführten Messungen von IgG-gesamt nicht mehr verwertbar.

Im klinischen Alltag sind insbesondere die Spülphasen, die jeweils vor und nach der eigentlichen Analysenserie durchgeführt werden müssen, sehr zeit- und personalintensiv und im Hinblick auf eine schnelle und damit kostengünstige Testdurchführung nicht vertretbar. Eine Möglichkeit zur wirtschaftlicheren Durchführung der Analysen würde sich anbieten, wenn insgesamt drei Geräte zur Verfügung gestellt werden: ein Gerät zur Messung von IgG-gesamt und – wegen der zeitgleichen Durchführung der Analyse - zwei Geräte zur Messung von IgG1 und IgG2. Zusätzlich werden auf die Weise mehrere Arbeitsschritte unnötig (Wechseln der Säulen und Pufferlösungen), insbesondere können die langwierigen Spülphasen reduziert werden, wodurch sich eine geringere Störanfälligkeit ergeben könnte.

Mit dem ÄKTA basic 10 XT – Analysensystem war, wie oben beschrieben, zunächst eine weitgehend automatisierte Meßmethode geplant. Es hat sich aber im Verlauf der Studie herausgestellt, dass die korrekte Auswertung der Chromatogramme durch Berechnung der AUC (area under the curve) in der klinischen Routineanwendung wegen der hohen Störanfälligkeit häufig nicht durchführbar ist. Die Fehler bei der Aufzeichnung der Subklassenpeaks führten dazu, dass die Trennung der Peaks von IgG2 und IgG1 nicht eindeutig festgelegt werden konnte – es ergaben sich für IgG2 falsch niedrige Werte, für IgG1 entsprechend falsch hohe Konzentrationen.

Auch bei niedrigen IgG2-Konzentrationen war der Anstieg des IgG2-Peaks häufig so gering, daß eine anschließende Auswertung nicht möglich war, insbesondere wenn am Ende dieses Peaks die Basislinie nicht exakt erreicht wurde.

Im Verlauf der Studie wurde deshalb die Methode modifiziert. Die Eluate wurden aufgefangen und nach Abschluß einer Meßreihe an einem externen Spektralphotometer gemessen.

Die auf diese Weise erhaltenen Ergebnisse zeigen eine gute Reproduzierbarkeit bei einer extrem niedrigen Impräzision.

Varianzberechnungen erlauben eine Aussage über die Vergleichbarkeit von Meßergebnissen einer Methode. Mit der Intra-Assay-Varianz überprüft man die Vergleichbarkeit von Ergebnissen innerhalb einer Meßreihe, mit der Inter-Assay-Varianz die Ergebnisse der Messungen an verschiedenen Tagen.

Die Veränderung im IgG-Subklassenprofil, die sich in einer Reduktion des prozentualen Anteils von IgG1 darstellt, erfordert eine möglichst präzise Messung der Einzelkonzentrationen, da in die Berechnung des Quotienten zwei Ergebnisse einfließen.

Insbesondere da die Unterschiede zwischen den untersuchten Kollektiven sehr gering sind, ist eine exakte Methode erforderlich, um differenzialdiagnostische Aussagen machen zu können.

Bei den Untersuchungen zur Stabilität hatte die Grazer Arbeitsgruppe um Erwin Schauenstein herausgefunden, dass die Zugabe von SOD innerhalb von vier Stunden nach Blutentnahme den Zerfall der labilen Disulfidbrücken verhindert. Im Gegensatz dazu belegen die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass sich weder bei den Messungen zur Kurzzeitstabilität (bis zu 48 Stunden nach Blutabnahme) noch bei den Messungen zur Langzeitstabilität (tiefgefrorene Seren, bis 12 Wochen nach Blutabnahme) ein Trend darstellt, der auf eine Instabilität der IgG-Subklassen hinweist.

Obwohl die in dieser Studie an 10 gesunden Personen durchgeführten Untersuchungen die Zugabe eines Stabilisators nicht unbedingt erforderlich erscheinen lassen, wurde den Patientenseren jeweils SOD als Stabilisator zugesetzt. Unter Routinebedingungen stellte sich jedoch heraus, dass sich aufwändige präanalytische Anforderungen besonders hinsichtlich der Zugabe des Stabilisators oder einer sofortigen Abarbeitung der Proben nicht zuverlässig einhalten lassen. Das Serum kann häufig nicht innerhalb von vier Stunden entweder eingefroren oder durch Zugabe von SOD stabilisiert werden, sodass vor allem bei Einsendematerial falsch niedrige IgG1-Werte und damit falsch positive Ergebnisse resultieren können.

Zur Frage der Durchführbarkeit anderer Methoden zeigt der Vergleich zwischen Affinitätschromatographie und Nephelometrie, dass die Impräzision des BN II etwas höher liegt.

Es ergibt sich bei der Affinitätschromatographie für die Seren mit SOD für IgG-gesamt ein Variationskoeffizient zwischen 0,1 % und 1,6 %. Für IgG1 beträgt die Varianz zwischen 0,2 % und 11,9 % und für IgG2 wurde ein Variationskoeffizient zwischen 0,7% und 8,3 % berechnet. Die höheren Werte für IgG2 ergeben sich aus der quantitativ sehr geringen Konzentration des IgG2.

Die nephelometrische Methode ergab höhere Variationskoeffizienten. Der Variationskoeffizient für IgG-gesamt betrug 6,8 %, für IgG1 wurde eine Varianz von 5,4 % und für IgG2 von 3,1 % berechnet.

Die Bestimmung von IgG-gesamt sowie der IgG-Subklassen am BN II der Firma Behring mit Antikörpern von The Binding Site erfolgt weitgehend automatisiert. Insbesondere die Bestimmung der IgG-Subklassen ist eine seit Jahren etablierte Untersuchung. Die Vorteile der Methode liegen in der unkomplizierten Probenvorbereitung, in der Präanalytik, der vollautomatisierten Methode und der kurzen Analysendauer.

Ein wesentlicher Nachteil ergibt sich aus dem im Vergleich zur affinitätschromatographischen Messung größeren Schwankungsbreite der Meßwerte. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zur Beurteilung des Subklassen-Shifts der Quotient IgG1/IgG beurteilt wird und somit jeweils zwei Messungen in die Berechnung mit einfließen.

Zur Beantwortung der im Rahmen der **klinischen Evaluierung** gestellten Frage zum Verhalten der IgG-Subklassen bei verschiedensten benignen und malignen Erkrankungen wird die Werteverteilung der Subkollektive beurteilt:

In der Gruppe der gesunden Personen wurden 48 Proben untersucht. Nach Berechnung des Quotienten (IgG1/IgG-gesamt) ergab sich eine breit gestreute Werteverteilung von 39 % - 63 %; der Median lag bei 56 %. Im Vergleich zu verschiedenen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Erwin Schauenstein/Graz Werten liegt der Quotient IgG1/IgG-gesamt gesunder Personen deutlich niedriger.

Auch im Kollektiv der von benignen Erkrankungen betroffenen Personen findet sich - ähnlich wie bei den gesunden Personen – eine breite Streuung der Werte. In der Beurteilung aller Patienten mit benignen Erkrankungen liegt der Quotient IgG1/IgG-gesamt in einem Bereich zwischen 34 % und 73 %, der Median liegt zwischen 54 % und 56 %.

Die niedrigsten Werte wurden in der Gruppe der Patienten mit benignen gynäkologischen Erkrankungen ermittelt, auch bei den benignen gastrointestinalen Erkrankungen finden sich häufig Werte < 55 %. Die geringste Streuung der Werte ergibt sich bei Patienten mit benignen Lungenerkrankungen, allerdings ist hier nur eine geringe Fallzahl untersucht worden (n = 16).

Werteverteilung im Kollektiv der malignen Erkrankungen

Bei den Patienten mit malignen Erkrankungen liegt der Median bei den Affinitätschromatographischen Messungen zwischen 50 % und 52 %.

Der Wertebereich ist auch bei den malignen Erkrankungen in allen Unterkollektiven breit gestreut. Der Quotient IgG1/IgG liegt in einem Bereich zwischen 31 % und 70 %. Die niedrigsten Werte wurden bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom gefunden. Auffällig ist das Unterkollektiv der Patienten mit Prostatakarzinom. Es zeigt sich hier eine Werteverteilung in einem deutlich engeren Bereich, insbesondere wurden in dieser Gruppe keine Werte über 58 % gefunden.

In der Darstellung der Verteilungskurven der Werte von gesunden Individuen, Patienten mit benignen Erkrankungen und Tumorpatienten wird deutlich, dass sich

alle Kurven weit überlappen und kein Bereich gefunden werden kann, in dem ein eindeutiger Grenzwert für tumorfreie und tumorkranke Patienten festgelegt werden könnte.

Dennoch läßt sich klar darstellen, daß die Kurvenverläufe, die sich aus den Werten der Gesunden und der Patienten mit benignen Erkrankungen ergeben, nahezu deckungsgleich verlaufen, während die Kurve der Patienten mit Tumorerkrankungen deutlich weiter nach links verschoben ist.

Um die ermittelten Quotienten IgG1/IgG bei der Gruppe der Gesunden und der Gruppe der Patienten mit benignen Erkrankungen der Werten der Patienten mit Tumorerkrankungen gegenüber stellen zu können, wurden die Werte in Form von Dot Plots graphisch dargestellt. Es läßt sich deutlich erkennen, dass die Werte bei den malignen Erkrankungen niedriger liegen als bei den Gesunden und den Patienten mit benignen Erkrankungen.

Allerdings zeigt sich auch in dieser Darstellung, dass sowohl bei den Gesunden als auch bei den Patienten mit benignen Erkrankungen stark erniedrigte IgG1/IgG-Quotienten gefunden werden. Dabei fällt auf, dass im Kollektiv der benignen Erkrankungen häufig bei Patienten mit Colitis ulcerosa sowie Patienten mit einer Cholezystolithiasis niedrige Werte gefunden werden.

ROC-Kurven

ROC-Kurven zeigen einen idealen Kurvenverlauf, also eine hohe Spezifität eines Tumormarkers, wenn die Kurve entlang der Ordinate steil verläuft, sich der oberen linken Ecke annähert und sich dann asymptotisch einer Parallele der Abszisse nähert.

Für das Lungenkarzinom ergibt sich bei der Beurteilung der ROC-Kurve Gesunde versus Karzinompatienten ein schlechtes Diskriminanzvermögen. Die Kurve mit dem benignen Referenzkollektiv verläuft nahezu deckungsgleich. Die Subklassenbestimmung erscheint somit in der Diagnostik des Lungenkarzinoms wenig hilfreich zu sein. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auf eine Differenzierung nach der Histologie der Lungenkarzinome verzichtet.

An der Klinik für Thoraxerkrankungen Heidelberg-Rohrbach wurde eine Studie an 435 erwachsenen Patienten mit chronischen bronchopulmonalen Entzündungen (148 Patienten mit chronischer oder chronisch obstruktiver Bronchitis, 72 Patienten mit Bronchiektasen, 44 Personen mit interstitiellen Lungenparenchymerkrankungen und 171 Personen mit Sarkoidose) durchgeführt. Die Veränderungen im Spektrum der IgG-Subklassen wurden mit einer gleichen Zahl alters- und geschlechtsentsprechender gesunder Personen verglichen. Dabei zeigte sich, dass bei den Patienten mit entzündlichen Lungenerkrankungen in hoher Frequenz eine begleitende Dysregulation der IgG-Subklassen vorlag. Die Subklassenverschiebung ging meist mit einer Erhöhung von IgG1 und IgG3 einher; allerdings ergab sich besonders in der Gruppe der Patienten mit Sarkoidose eine andere Form der Subklassenverschiebung: Bei sehr niedrigen IgG1-Werten wurden ausgeprägte IgG2-Erhöhungen ohne wesentliche Verschiebungen im IgG3- und IgG4-Bereich gefunden.

Bei der Untersuchung der Subklassenveränderungen beim Mammakarzinom beschreibt *Schauenstein et al.* einen besonders signifikanten Shift, der schon in frühen Stadien der Tumorerkrankungen nachweisbar war (10, 31). Die Ergebnisse, die in der vorliegenden Studie ermittelt wurden, zeigen in der Darstellung der Sensitivität und Spezifität, dass von den herkömmlichen, etablierten Tumormarkern besonders CA 15-3 den Subklassen deutlich überlegen ist.

Die Beurteilung der Subklassenveränderungen bei Patienten mit Karzinomen des Gastrointestinaltraktes zeigt anhand der ROC-Kurven, die jeweils den Verlauf einer Diagonale haben, dass die Bestimmung der Subklassen keinen diagnostischen Vorteil bringt.

Bei den gynäkologischen Karzinomen lässt sich aus dem Kurvenverlauf der einzelnen Marker erkennen, dass CA 125 das beste Diskriminanzvermögen aufweist und als Marker der ersten Wahl bei der Erkennung von serösen Ovarialkarzinomen der Subklassenbestimmung überlegen ist.

Auch für urologische Karzinome entspricht die Kurve der Gesunden versus Karzinompatienten weitgehend der Kurve des urologischen Referenzkollektivs. Wie sich schon in der graphischen Darstellung der Punktwolken erkennen lässt, zeigt

sich auch dort aufgrund der weiten Überlappung, dass man differenzialdiagnostisch durch die Bestimmung der IgG-Subklassen keine zusätzliche Sicherheit gewinnt.

Im Verlauf der Studie stellte sich heraus, dass die Häufigkeit der richtig positiven Ergebnisse bei den Prostatakarzinomen besonders hoch zu sein schien. Deshalb wurde diese Gruppe aus dem Kollektiv der Patienten mit urologischen Karzinomen herausgenommen und einer Referenzgruppe mit benignem Prostataadenom gegenübergestellt.

Die Kurve des affinitätschromatographisch ermittelten IgG1/IgG-Quotienten entspricht einem fast idealen Kurvenverlauf. Die nephelometrisch ermittelten Werte liegen geringfügig unterhalb dieser Kurve, ergeben aber insgesamt einen vergleichbaren Kurvenverlauf oberhalb der PSA-Kurve. Auch in der Kombination von PSA mit dem freien PSA (fPSA) zeigt die Spezifitäts-/Sensitivitätskurve ein gegenüber den Subklassen schlechteres Diskriminanzvermögen.

Insbesondere im differenzialdiagnostisch wichtigen und schwierigen Bereich des PSA mit Werten zwischen 4 – 10 ng/ml, in dem derzeit neben der zusätzlichen Bestimmung von fPSA eine histologische Abklärung über eine Stanzbiopsie angestrebt wird, zeigt der Subklassenshift – bei allerdings geringer Fallzahl in diesem Unterkollektiv - ein besseres Sensitivitäts-/Spezifitäts – Profil als PSA oder der Quotient fPSA/PSA.

Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, dass die Fragestellung der vorliegenden Studie sich auf Veränderungen im Subklassenprofil bei benignen und malignen Erkrankungen konzentrierte. Erst am Ende der Studie stellte sich heraus, dass sich der Subklassenshift beim Prostatakarzinom besonders signifikant darstellt. Die hier gefundenen Ergebnisse müssen anhand einer deutlich größeren Fallzahl sowie durch Verlaufskontrollen bestätigt werden.

7. Zusammenfassung

Im Verlauf der vorliegenden prospektiven Studie wurden über 1000 Seren affinitätschromatographisch untersucht. Da keine Vorselektion der Patientenserum vorgenommen wurde, konnte nur ein Teil der untersuchten Proben in die Auswertung einfließen.

Schon bei den im Rahmen der methodischen Evaluierung durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, dass methodische Schwächen die Tauglichkeit für einen Einsatz in der klinischen Routineanwendung herabsetzen. Insbesondere sprechen der hohe zeitliche Aufwand sowohl bei der Herstellung der Pufferlösungen als auch bei der eigentlichen Messung und die damit verbundene personalintensive Betreuung gegen eine Anwendung in klinischen Alltag.

Für die affinitätschromatographische Methode spricht die bereits von der Grazer Arbeitsgruppe beschriebene äußerst geringe Impräzision, die eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Werte zulässt.

Bei den Untersuchungen zur Stabilität konnte die Notwendigkeit der Zugabe eines Stabilisators nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Zugabe von SOD ist nach unseren Ergebnissen nicht dringend erforderlich, wenn die Seren innerhalb von 24 Stunden verarbeitet bzw. eingefroren werden.

Die parallele Untersuchung eines Teils der Seren zeigte, dass die Bestimmung der IgG-Subklassen am BN II eine größere Fehlerbreite aufweist. Trotzdem belegt die Auswertung der Intra-Assay-Varianzen eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der Werte, sodass auch ein Einsatz dieser Methode möglich erscheint.

Bei der anschließenden **klinischen Evaluierung** der IgG-Subklassen haben die Untersuchungen an einer großen Zahl von Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen sowie die Bestimmung der Subklassen in einem gesunden Referenzkollektiv einen signifikanten Unterschied zwischen Tumorpatienten und Gesunden bzw. Patienten des entsprechenden Referenzkollektivs bestätigt. Gleichzeitig fand sich bei den bereits etablierten Tumormarkern bei Tumoren fast aller untersuchten Organsysteme ein besseres Diskriminanzvermögen im Vergleich zur Subklassenbestimmung.

Im Verlauf der Studie kristallisierte sich heraus, dass der Subklassenshift besonders signifikant bei Patienten mit Prostatakarzinom zu sein scheint. In diesem Subkollektiv wurde eine Reduktion des Anteils von IgG1 gefunden, während die gleichzeitige Bestimmung von PSA unauffällige Werte zeigte. Auch die zusätzliche Bestimmung des freien PSA und die Ermittlung des Quotienten fPSA/PSA zeigte nicht die Spezifität, die durch die alleinige Bestimmung der IgG-Subklassen erreicht wurde. Dieses Ergebnis konnte auch durch nephelometrische Analysen (Behring Nephelometer) mit Antikörpern der Firma The Binding Site an einem Unterkollektiv bestätigt werden.

Die in dieser Studie an einer relativ kleinen Fallzahl ermittelten Ergebnisse müssen durch eine weitere Studie an einem deutlich größeren Kollektiv sowie durch Verlaufsuntersuchungen bestätigt werden.

Erst dann wird sich herausstellen, ob die Bestimmung der Subklassen im Serum von Patienten mit Verdacht auf Prostatakarzinom die erwartete hohe Sensitivität bestätigt. Besonders bei der Primärerfassung gerade in sehr frühen Stadien wäre die Erfassung der Veränderungen im IgG-Subklassenprofil eine weitere wertvolle differenzialdiagnostische Hilfestellung.

Wenn sich das hier gefundene Sensitivitäts/Spezifitäts-Profil bestätigt – und dies insbesondere bei frühen Stadien des Prostatakarzinoms – könnte sich der IgG - Subklassenshift als wertvoller Zusatzparameter bei der Differenzialdiagnose benigner und maligner Prostataerkrankungen erweisen.

8. Literatur

- 1) Anderhuber W, Steinschifter W, Schauenstein E, Gotschuli A, Habermann W, Fischer M, et al.
The IgG1/G2 subclass shift: a sensitive tissue nonspecific marker for malignancy. Diagnostic performance with squamous cell carcinoma of the head and neck. Br J Cancer 1999; 79: 1777-81
- 2) Becker N, Frentzel-Beyme R, Wagner G.
Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland
Springer Verlag (1984)
- 3) Burmester G-R, Pezzutto A.
Taschenatlas der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 4) Deutsch E, Geyer G, Wenger R.
Laboratoriumsmedizin: Normalbereich der Ergebnisse und Interpretation abnormer Befunde
3. Auflage. Basel/München: Karger, 1992
- 5) Duhamel RC, Schur RH, Brendel K, Meezan E.
pH-gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose. 2nd European Congress on Senology. Vienna, Austria (1994)
- 6) Fateh-Moghadam A, Stieber P.
Kriterien zum Einsatz von Tumormarkern.
Fortschritte der Medizin 6/64-67, 7/82-84, 9/107-108 (1996)
- 7) Gold P, Freedman S.O.
Specific carcinoembryonic antigens of human digestiv system.
J.Exp. Med. 122, 467-481
- 8) Hasholzner U, Baumgartner L, Stieber P, Meier W, Reiter W, Fateh-Moghadam A.
Clinical significance of the tumourmarkers CA 125 and CA 72-4 in Ovarian Carcinoma. International Journal of Cancer 69, 329-334, (1996)

- 9) Konsensuswerte der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin, der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie und des Verbandes der Diagnostica-Industrie e.V. (VDGH)
Clin Lab 1995; 41: 743-748

- 10) Kronberger L Jr., Weblacher M, Estelberger W, Hauser H, Schauenstein E, Schauenstein K, et al.
Pre- and postoperative analysis of serum IgG1 in patients with benign and malignant breast diseases.
In: Kubista E, Staffen A, Zielinski Ch, editors. 2nd European Congress on Senologie. Bologna: Monduzzi Editore, International Proceedings Division, 1994:479-85

- 11) Lamerz R, Stieber P, Fateh-Moghadam A.
Tumor markers in cancer of the liver
Diagn. Oncol. 1(1991) 363 – 372

- 12) Meier W, Stieber P, Baumgartner L, Hasholzner U, Fateh-Moghadam A.
10 years experience with the tumor marker CA 125 in ovarian cancer. A critical review.
In Current tumor diagnosis, applications, clinical relevance, research-trends.
Klapdor R (Hrsg.)
Zuckschwerdt Verlag, München, 811-815 (1994)

- 13) Meier W, Stieber P, Fateh-Moghadam A, Hepp H.
Stellenwert der Rezidivoperation beim Ovariakarzinom unter besonderer Berücksichtigung des Tumormarkers CA 125.
In: Praktische Onkologie IV.
Schmid L, Wilmanns W (Hrsg).
Zuckschwerdt Verlag, München, 24 (1994)

- 14) Manke H-G.
Erworbene IgG-Subklassendysregulation bei Erwachsenen mit chronischen Entzündungen der Bronchien und des Lungenparenchyms.
Klinik für Thoraxerkrankungen, Heidelberg-Rohrbach

- 15) Maninger K, Schauenstein K, Weblacher M, Tillian H, Schauenstein E.
Shift in IgG-subclasses – a sensitive early marker for malignant proliferation in tumor bearing rats as a representative model for human cancer. Cancer Mol Biol 1994.

- 16) Morell A, Skvaril F, Barandun S.
IgG–Subklassen der menschlichen Immunglobuline. Immunochemische, genetische, biologische und klinische Aspekte.
Institut für klinisch-experimentelle Tumorforschung Universität Bern, Tiefenauspital, Bern (1975)
- 17) Ouchterlony, Ö. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)
- 18) Reiter W, Stieber P, Reuter C, Hasholzner U, Baumgartner L, Fateh-Mogadam A.
Untersuchungen zur methodischen und klinischen Wertigkeit eines neuen CA 72-4 Enzymimmunoassays.
Laboratoriumsmedizin 19, 203-209 (1995)
- 19) Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Cramer C, Fateh-Mogadam A.
Sensitivity and prognostic significance of CA 72-4, CEA-, CA 19-9-serumlevels in untreated patients with gastric carcinoma.
Tumordiagnostik und Therapie 16, 98-101 (1995)
- 20) Reiter W, Stieber P, Reuter C, Nagel D, Lau-Werner U, Pahl H, Fateh-Mogadam A.
Preoperative serum levels of CEA, CA 19-9 and their prognostic significance in colorectal carcinoma.
Anticancer Research 17 (4B), 2935-2938 (1997)
- 21) Reiter W, Stieber P, Schmeller N, Nagel D, Fateh-Mogadam A.
Alpha 1-antichymotrypsin-PSA (ACT-PSA): a useful marker in a differential diagnosis of benign hyperplasia and cancer of prostate?
Anticancer Research 17 (6D), 4767-4770 (1997)
- 22) Reiter W, Stieber P, Schmeller N, Nagel D, Hofmann K, Fateh-Mogadam A.
Total and free PSA: a methodical and clinical evaluation of five assays.
Anticancer Research 17 (6D), 4759-4765 (1997)
- 23) Reiter W, Stieber P, Schmeller N, Nagel D, Jansen HM, Schambeck C, Fabricius PG, Pahl H, Mattes M, Constable H, Fateh-Mogadam A.
The ratio of free to total prostate specific antigen: an advantageous addition in the differential diagnosis of benign hyperplasia and cancer of prostate?
Anticancer Research 17 (4B), 2987-2997 (1997)

- 24) Reiter W, Stieber P, Schmeller N, Nagel D, Schambeck C, Fateh-Mogadam A. Is free prostate-specific antigen helpful in the differential diagnosis of benign hyperplasia and cancer of the prostate?
Tumor-Biology 18 (2), 80-87 (1997)
- 25) Renz H.
Stellenwert der Immunglobulin-G (IgG)-Subklassenbestimmung im Rahmen des Immundefektscreenings.
Universitätsklinikum Rudolf Virchow/Berlin
- 26) Roitt I, Brostoff J, Male D.
Kurzes Lehrbuch der Immunologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart
Taschenatlas der Immunologie
- 27) Satow K, Arenz B, Kusenbach G, Reinhard D.
IgG-Subklassendefekte als Ursache schwerer rezidivierender Atemwegsinfekte.
Monatszeitschrift Kinderheilkunde 134:459-462 (1986)
- 28) Sauer H.
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge – Mammakarzinome
Schriftenreihe Tumorzentrum München (1998)
- 29) Schauenstein E, Dachs F, Reiter M, Gombotz H, List W.
Labile disulfide bridges in the IgG1- und free SH-groups in the IgG2 -subclass in blood serum of patients suffering from benign und malignant diseases.
Biol Chem Hoppe Seyler 1989;370:159-63
- 30) Schauenstein E, Dachs F, Reiter M, Gombotz H, List W. Labile Labile disulfide bonds and free thiol groups in human IgG.
I. Assignment to IgG1 and IgG2 subclasses.
Int Arch Allergy Appl Immunol 1986; 80: 174-179
- 31) Schauenstein E, Lahousen M, Steinschifter W, Estelberger W, Schauenstein K.
Selective decrease in serum immunoglobulin G1: a tissue nonspecific tumor marker detecting early stages of gynecological malignant disease with high efficiency.
Cancer 1996; 78:511-6

- 32) Schauenstein E, Rabl H, Steinschifter W, Hirsch C, Estelberger W, Schauenstein K.
Selective decrease of serum immunoglobulin G1 as a marker of malignant transformation in colorectal tissue.
American Cancer Society 1997; 1482-1486
- 33) Schauenstein E, Reiter M, Gombotz H, List W.
Labile disulfide bonds and free thiol groups in human IgG.
II. Characteristic changes in malignant diseases corresponding to shifts of IgG1 and IgG2 subclasses.
Int Arch Allergy Appl Immunol 1986; 80: 180-184
- 34) Stieber P, Fateh-Moghadam,
Sensible Use of Tumormarkers. Dtsch: Tumormarker und ihr sinnvoller Einsatz.
ISBN 3-926725-07-9 dtsch/eng.
J. Hartmann Verlag Marloffstein-Rathdberg (1993)
- 35) Stieber P, Untch M, Sauer H.
Stellenwert der Tumormarker beim Mammakarzinom.
Der Gynäkologe 32, 695-704 (1999)
- 36) Weblacher M, Leitsberger A, Maninger K, Estelberger W, Schauenstein K, et al.
A decrease in reactive disulfide bonds of serum IgG signals a characteristic change in the IgG subclass pattern of rats bearing experimental tumors.
Int Arch Allergy Immunol 1993;102:36-340-6
- 37) Wick M, Fateh-Moghadam A
Proteindiagnostik
J.Hartmann Verlag Heßdorf-Klebheim (1996)
- 38) Zamcheck N.
Carcinoembryonic Antigen: Quantitative Variations in Circulating Levels in Benign and Malignant Digestive Tract Diseases.
Adv Intern Med 1974; 19:413

9. Anhang

Tab 5: Pool normal

	pool	äkt Gges.	äkt G1	äkt G2	G1/Gges	G2/Gges	SOD	temp
1	400441	11,19	5,58	2,11	0,50	0,19	1	-20
2	400441	11,27	5,54	1,98	0,49	0,18	1	-20
3	400441	11,36	5,54	1,98	0,49	0,17	1	-20
4	400441	10,91	5,51	2,02	0,51	0,19	1	-20
5	400441	11,01	5,58	2,23	0,51	0,20	1	-20
6	400441	11,04	5,58	1,86	0,51	0,17	1	-20
7	400441	10,77	5,58	1,98	0,52	0,18	1	-20
8	400441	11,08	5,51	2,06	0,50	0,19	1	-20
9	400441	10,89	5,51	2,06	0,51	0,19	1	-20
10	400441	10,97	5,48	1,98	0,50	0,18	1	-20
11	400441	10,91	5,48	1,94	0,50	0,18	1	-20
12	400441	10,91	5,54	1,91	0,51	0,18	1	-20
13	400441	11,04	5,62	2,02	0,51	0,18	1	-20
14	400441	11,01	5,54	2,04	0,50	0,19	1	-20
15	400441	10,73	5,54	2,06	0,52	0,19	1	-20
16	400441	10,97	5,38	1,92	0,49	0,18	1	-20
17	400441	11,08	5,51	1,96	0,50	0,18	1	-20
18	400441	11,12	5,62	2,03	0,51	0,18	1	-20
19	400441	11,01	5,58	2,04	0,51	0,19	1	-20
20	400441	11,04	5,58	1,86	0,51	0,17	1	-20
21	400441	10,87	5,58	1,98	0,51	0,18	1	-20
22	400441	11,08	5,51	2,06	0,50	0,19	1	-20
23	400441	11,05	5,51	2,06	0,50	0,19	1	-20
24	400441	11,13	5,89	1,98	0,53	0,18	1	-20
25	400441	10,89	5,51	2,06	0,51	0,19	1	-20
26	400441	10,97	5,48	1,98	0,50	0,18	1	-20
27	400441	10,91	5,48	1,94	0,50	0,18	1	-20
28	400441	10,91	5,54	1,91	0,51	0,18	1	-20
29	400441	11,04	5,62	1,98	0,51	0,18	1	-20
30	400441	11,08	5,58	1,98	0,50	0,18	1	-20
31	400441	11,01	5,58	2,23	0,51	0,20	1	-20
32	400441	11,04	5,58	1,86	0,51	0,17	1	-20
33	400441	10,88	5,58	1,98	0,51	0,18	1	-20
34	400441	11,08	5,51	2,06	0,50	0,19	1	-20
35	400441	10,91	5,51	2,06	0,51	0,19	1	-20
36	400441	11,13	5,69	1,98	0,51	0,18	1	-20
37	400441	11,08	5,55	1,92	0,50	0,17	1	-20
38	400441	11,08	5,55	2,04	0,50	0,18	1	-20
39	400441	11,04	5,39	2,04	0,49	0,18	1	-20
40	400441	10,89	5,51	2,06	0,51	0,19	1	-20
41	400441	10,97	5,48	1,98	0,50	0,18	1	-20
42	400441	10,91	5,48	1,94	0,50	0,18	1	-20
43	400441	10,91	5,54	1,91	0,51	0,18	1	-20
44	400441	11,01	5,58	2,23	0,51	0,20	1	-20
45	400441	11,04	5,58	1,86	0,51	0,17	1	-20
46	400441	10,92	5,58	1,98	0,51	0,18	1	-20
47	400441	11,08	5,51	2,06	0,50	0,19	1	-20
48	400441	11,04	5,51	2,06	0,50	0,19	1	-20
49	400441	11,13	5,79	1,98	0,52	0,18	1	-20
50	400441	10,89	5,73	1,86	0,53	0,17	1	-20

Tab 6: Pool normal

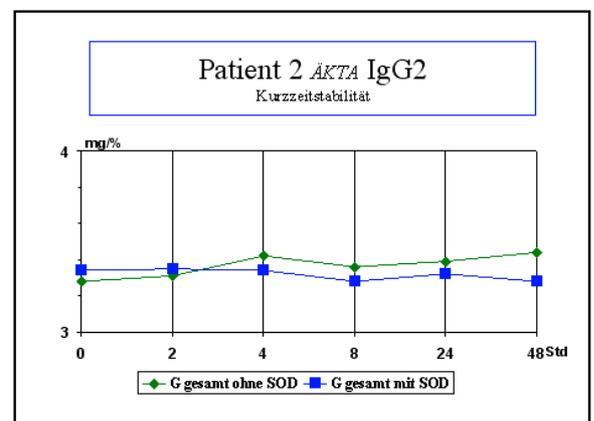
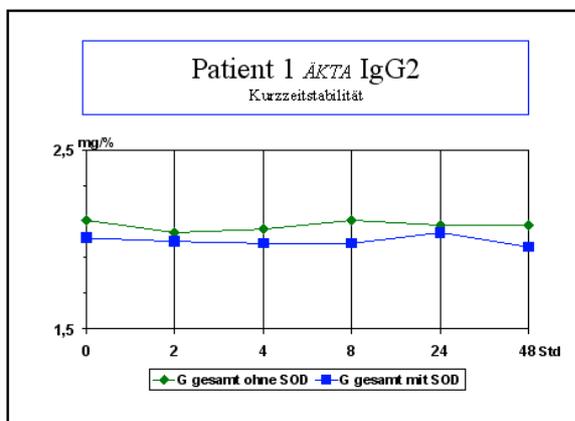
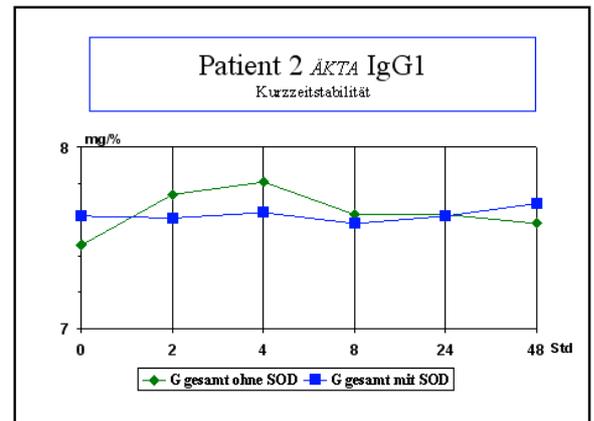
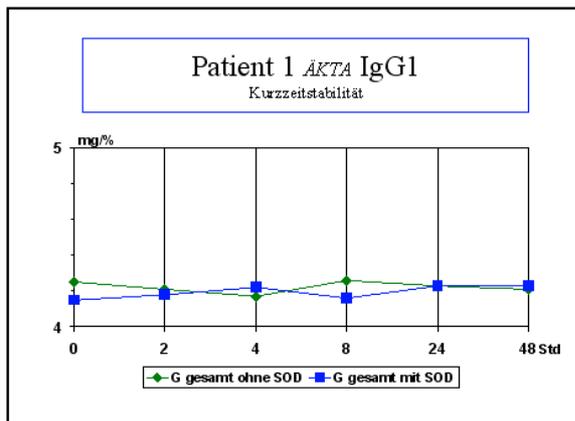
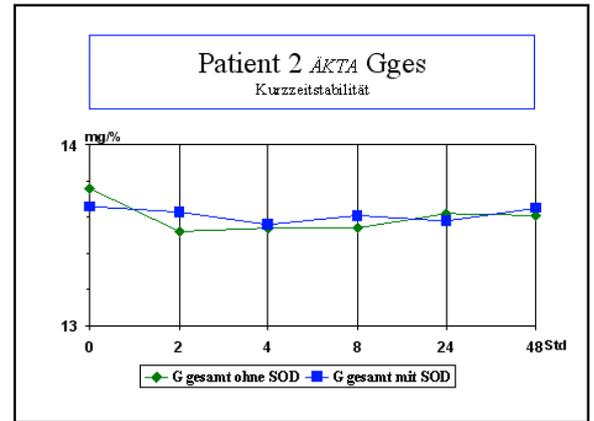
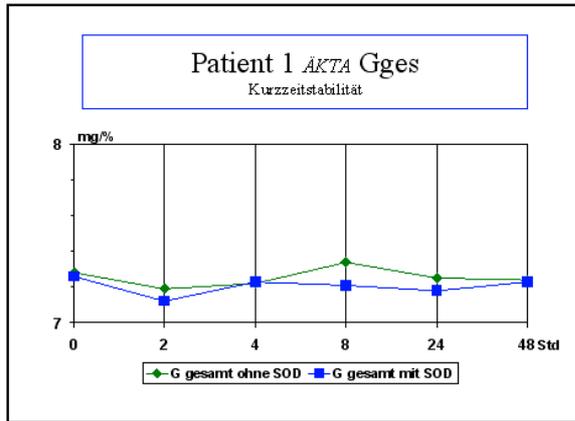
	pool	äktä Gges.	äktä G1	äktä G2	G1/Gges	G2/Gges	SOD	temp
51	400441	10,89	5,58	2,11	0,51	0,19	1	-20
52	400441	10,96	5,58	2,11	0,51	0,19	1	-20
53	400441	11,05	5,88	1,86	0,53	0,17	1	-20
54	400441	10,56	5,58	1,98	0,53	0,19	1	-20
55	400441	10,73	5,58	1,98	0,52	0,18	1	-20
56	400441	10,92	5,58	1,98	0,51	0,18	1	-20
57	400441	10,92	5,58	1,98	0,51	0,18	1	-20
58	400441	10,92	5,58	1,98	0,51	0,18	1	-20
59	400441	10,69	5,58	1,98	0,52	0,19	1	-20
60	400441	10,81	5,58	1,87	0,52	0,17	1	-20
61	400441	10,79	5,58	1,98	0,52	0,18	1	-20
62	400441	10,79	5,58	1,98	0,52	0,18	1	-20
63	400441	10,71	5,42	1,98	0,51	0,18	1	-20
64	400441	11,13	5,58	1,98	0,50	0,18	1	-20
65	400441	11,27	5,58	1,98	0,50	0,18	1	-20
66	400441	11,03	5,89	1,98	0,53	0,18	1	-20
67	400441	10,83	5,73	1,98	0,53	0,18	1	-20
68	400441	10,92	5,69	2,11	0,52	0,19	1	-20
69	400441	10,74	5,69	1,98	0,53	0,18	1	-20
70	400441	11,04	5,73	1,98	0,52	0,18	1	-20
71	400441	10,96	5,58	2,11	0,51	0,19	1	-20
72	400441	11,05	5,69	2,11	0,51	0,19	1	-20
73	400441	11,09	5,58	2,08	0,50	0,19	1	-20
74	400441	11,26	5,61	2,23	0,50	0,20	1	-20
75	400441	11,21	5,69	2,08	0,51	0,19	1	-20
76	400441	11,13	5,58	2,23	0,50	0,20	1	-20
77	400441	11,31	5,69	2,36	0,50	0,21	1	-20
78	400441	11,13	5,73	2,73	0,51	0,25	1	-20
79	400441	11,06	5,69	2,73	0,51	0,25	1	-20
80	400441	10,96	5,58	2,23	0,51	0,20	1	-20
81	400441	11,05	5,74	2,11	0,52	0,19	1	-20
82	400441	11,17	5,58	1,86	0,50	0,17	1	-20
83	400441	11,15	5,89	2,19	0,53	0,20	1	-20
84	400441	11,07	5,58	2,28	0,50	0,21	1	-20
85	400441	10,87	5,74	2,28	0,53	0,21	1	-20
86	400441	10,79	5,89	1,79	0,55	0,17	1	-20
87	400441	10,84	5,74	2,08	0,53	0,19	1	-20
88	400441	10,97	5,74	2,03	0,52	0,19	1	-20
89	400441	11,02	5,43	2,03	0,49	0,18	1	-20
90	400441	11,09	5,36	2,48	0,48	0,22	1	-20
91	400441	11,05	5,58	2,11	0,50	0,19	1	-20
92	400441	10,89	5,51	2,06	0,51	0,19	1	-20
93	400441	10,97	5,48	1,98	0,50	0,18	1	-20
94	400441	10,91	5,48	1,94	0,50	0,18	1	-20
95	400441	10,91	5,54	1,91	0,51	0,18	1	-20
96	400441	11,06	5,52	2,03	0,50	0,18	1	-20
97	400441	10,96	5,58	2,23	0,51	0,20	1	-20
98	400441	11,05	5,74	2,11	0,52	0,19	1	-20
99	400441	11,17	5,58	1,86	0,50	0,17	1	-20

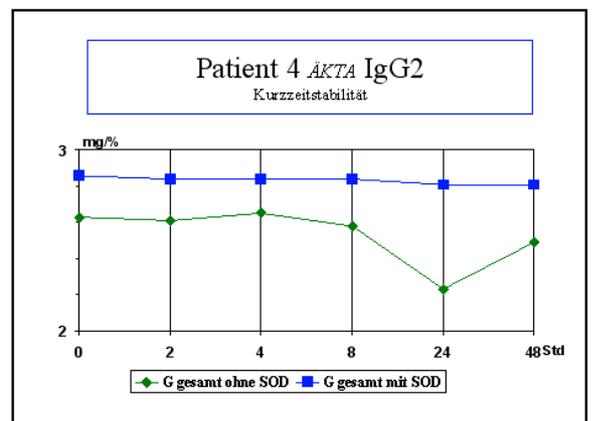
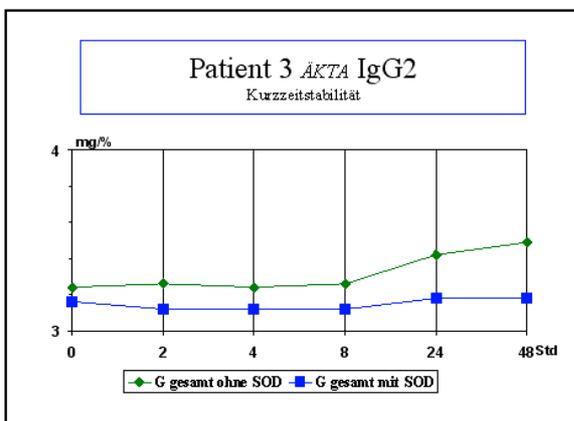
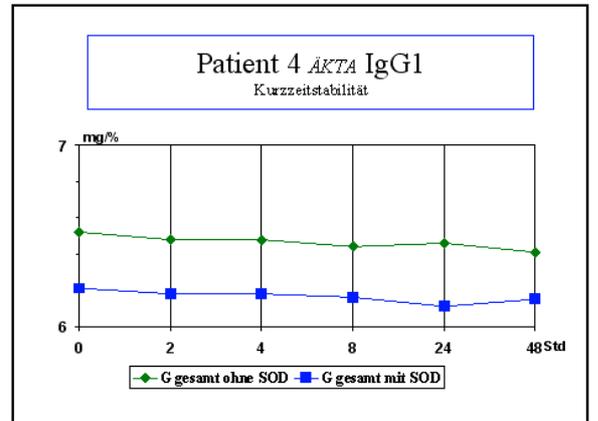
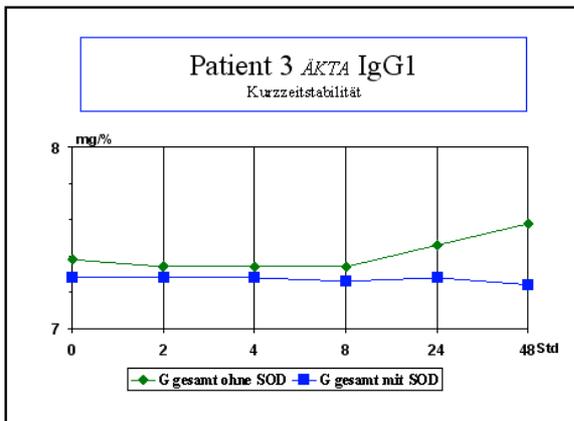
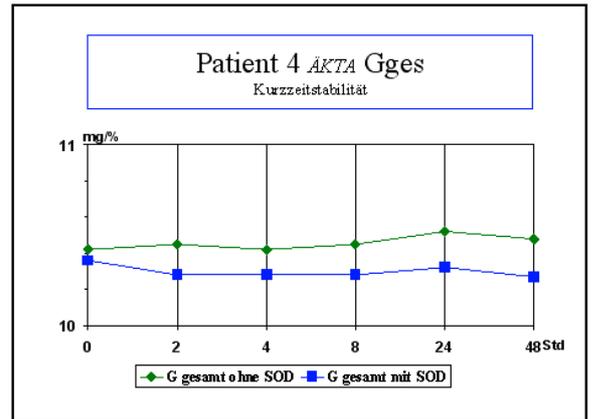
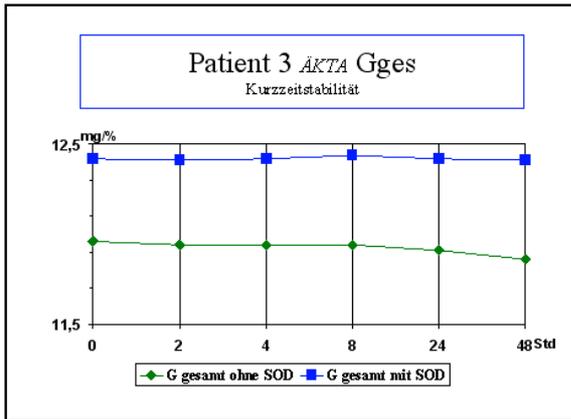
Tab 7: Pool high

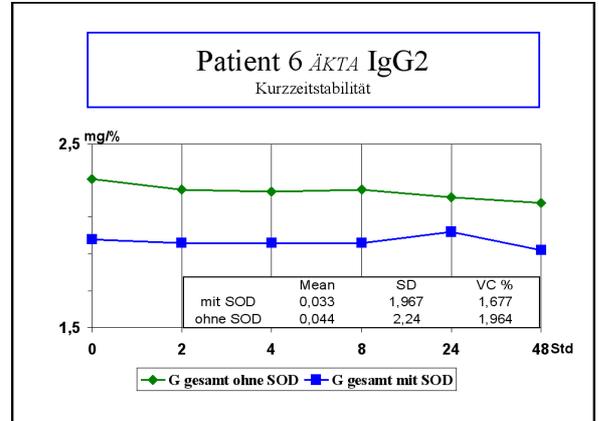
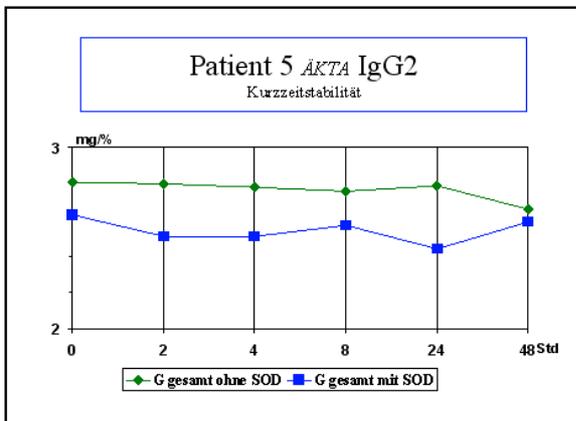
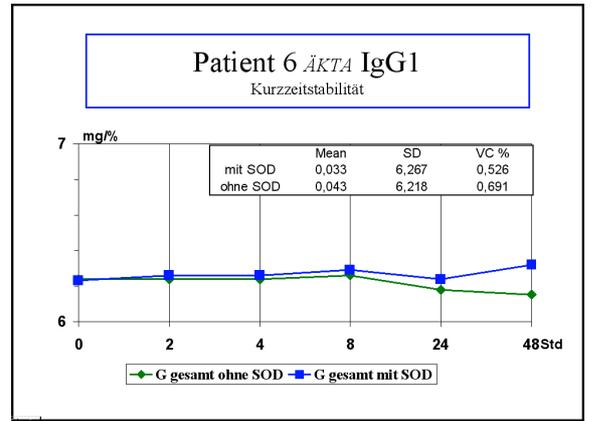
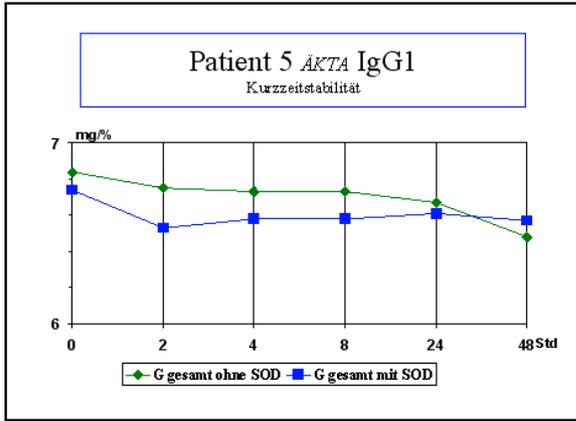
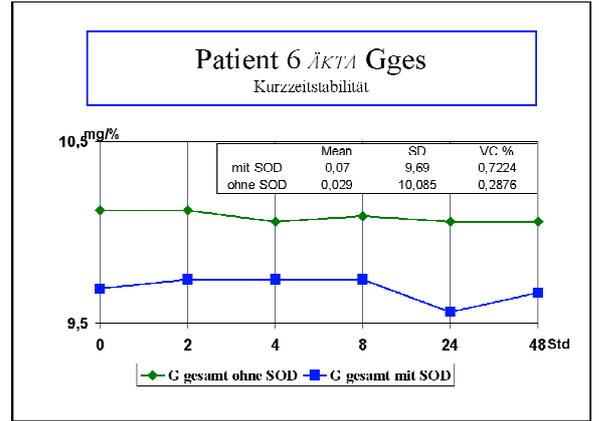
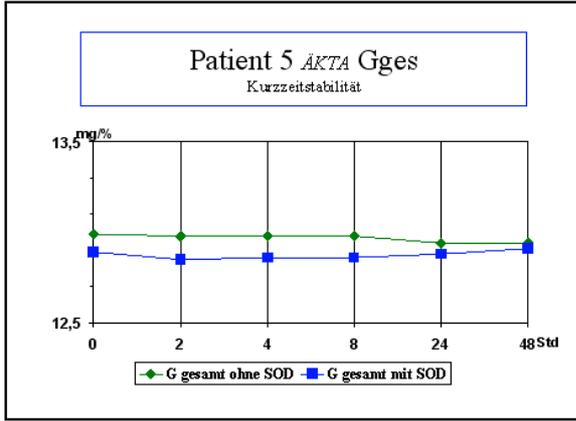
	pool	ähta Gges.	ähta G1	ähta G2	G1/Gges	G2/Gges	SOD	temp
1	400442	13,44	6,56	3,12	0,49	0,23	1	-20
2	400442	13,41	6,71	3,08	0,50	0,23	1	-20
3	400442	13,41	6,73	3,08	0,50	0,23	1	-20
4	400442	13,38	6,73	3,32	0,50	0,25	1	-20
5	400442	13,32	6,93	3,12	0,52	0,23	1	-20
6	400442	13,38	6,84	3,17	0,51	0,24	1	-20
7	400442	13,44	6,84	3,22	0,51	0,24	1	-20
8	400442	13,41	6,88	3,26	0,51	0,24	1	-20
9	400442	13,47	6,84	3,12	0,51	0,23	1	-20
10	400442	13,41	6,78	3,16	0,51	0,24	1	-20
11	400442	13,38	6,78	3,16	0,51	0,24	1	-20
12	400442	13,32	6,73	3,16	0,51	0,24	1	-20
13	400442	13,32	6,71	3,12	0,50	0,23	1	-20
14	400442	13,32	6,71	3,16	0,50	0,24	1	-20
15	400442	13,29	6,68	3,21	0,50	0,24	1	-20
16	400442	13,32	6,68	3,21	0,50	0,24	1	-20
17	400442	13,38	6,68	3,12	0,50	0,23	1	-20
18	400442	13,32	6,64	3,08	0,50	0,23	1	-20
19	400442	13,48	6,84	3,21	0,51	0,24	1	-20
20	400442	13,42	6,79	3,17	0,51	0,24	1	-20
21	400442	13,47	6,65	3,17	0,49	0,24	1	-20
22	400442	13,47	6,68	3,12	0,50	0,23	1	-20
23	400442	13,52	6,68	3,08	0,49	0,23	1	-20
24	400442	13,47	6,64	3,08	0,49	0,23	1	-20
25	400442	13,41	6,81	3,32	0,51	0,25	1	-20
26	400442	13,41	6,78	3,36	0,51	0,25	1	-20
27	400442	13,38	6,81	3,32	0,51	0,25	1	-20
28	400442	13,38	6,78	3,28	0,51	0,25	1	-20
29	400442	13,41	6,78	3,26	0,51	0,24	1	-20
30	400442	13,32	6,78	3,26	0,51	0,24	1	-20
31	400442	13,28	6,64	3,26	0,50	0,25	1	-20
32	400442	13,28	6,57	3,21	0,49	0,24	1	-20
33	400442	13,47	6,65	3,21	0,49	0,24	1	-20
34	400442	13,41	6,63	3,16	0,49	0,24	1	-20
35	400442	13,41	6,63	3,16	0,49	0,24	1	-20
36	400442	13,47	6,59	3,16	0,49	0,23	1	-20
37	400442	13,41	6,81	3,29	0,51	0,25	1	-20
38	400442	13,41	6,78	3,29	0,51	0,25	1	-20
39	400442	13,41	6,78	3,32	0,51	0,25	1	-20
40	400442	13,41	6,75	3,28	0,50	0,24	1	-20
41	400442	13,38	6,84	3,28	0,51	0,25	1	-20
42	400442	13,38	6,81	3,24	0,51	0,24	1	-20
43	400442	13,41	6,81	3,24	0,51	0,24	1	-20
44	400442	13,38	6,81	3,19	0,51	0,24	1	-20
45	400442	13,38	6,78	3,19	0,51	0,24	1	-20
46	400442	13,32	6,74	3,19	0,51	0,24	1	-20
47	400442	13,29	6,65	3,19	0,50	0,24	1	-20
48	400442	13,41	6,74	3,16	0,50	0,24	1	-20
49	400442	13,41	6,74	3,21	0,50	0,24	1	-20
50	400442	13,41	6,74	3,19	0,50	0,24	1	-20
51	400442	13,38	6,68	3,24	0,50	0,24	1	-20

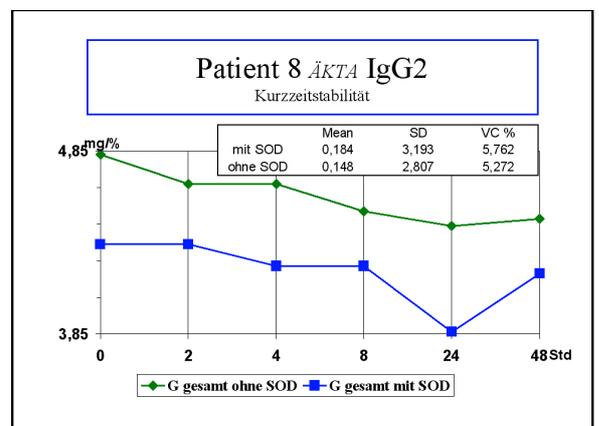
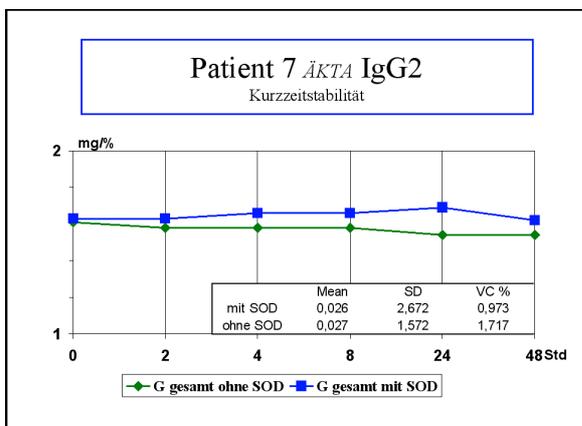
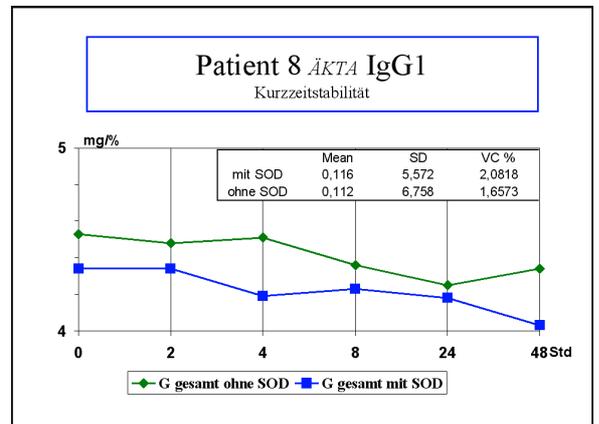
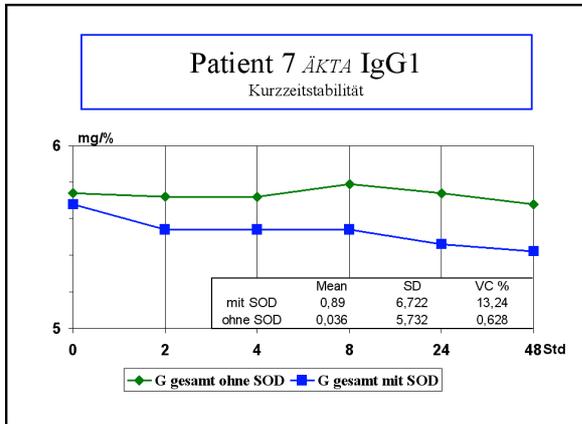
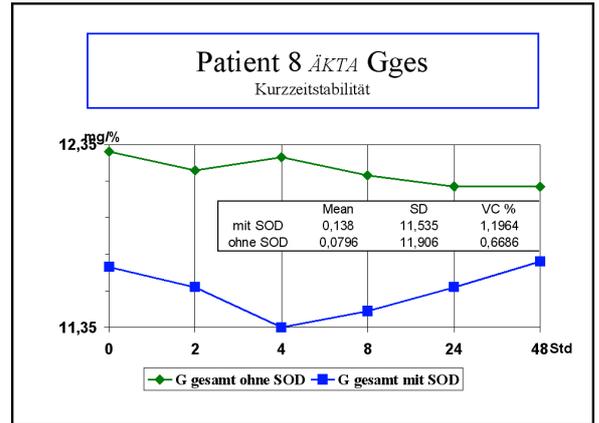
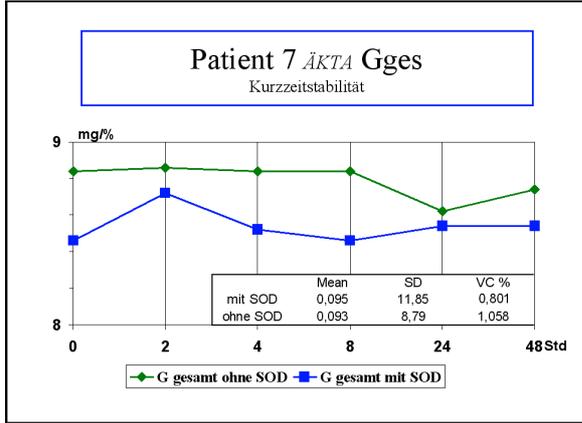
Tab 8: Pool low

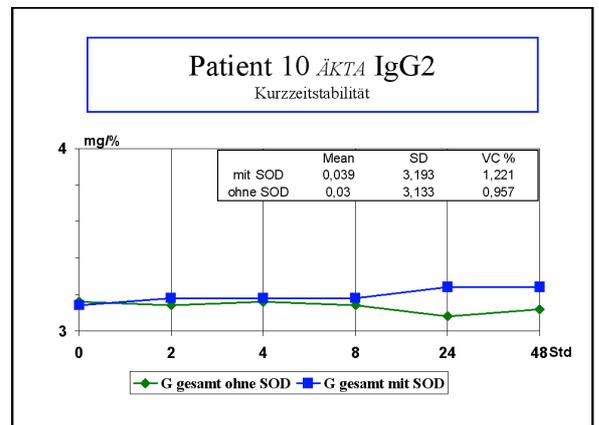
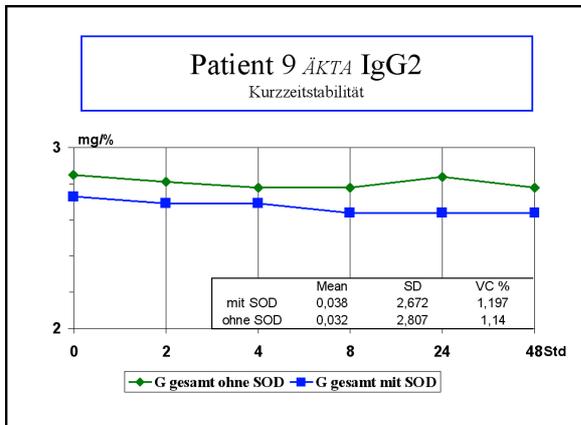
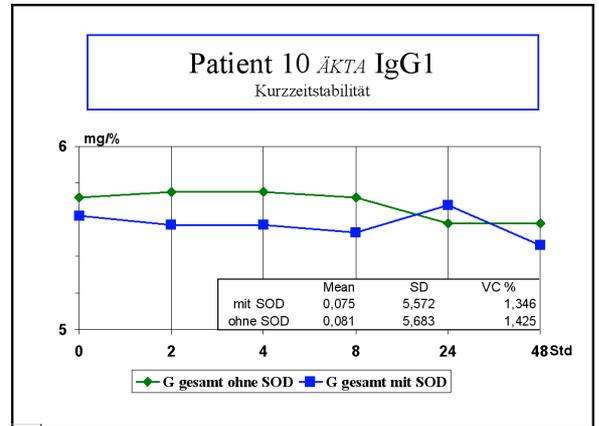
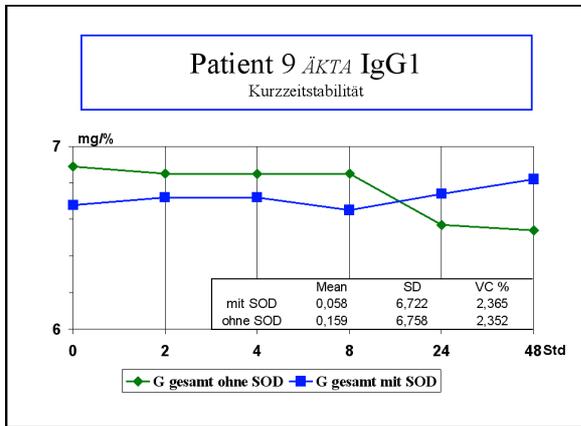
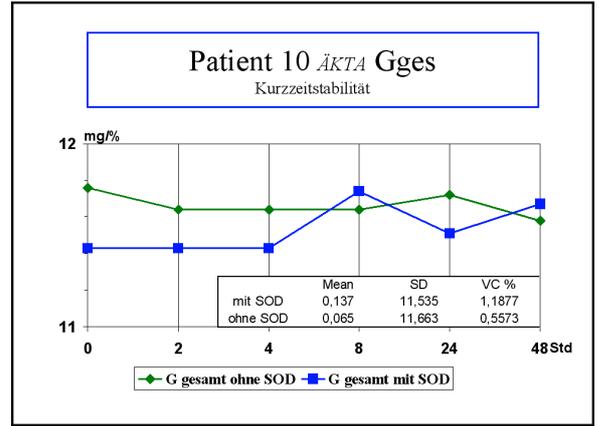
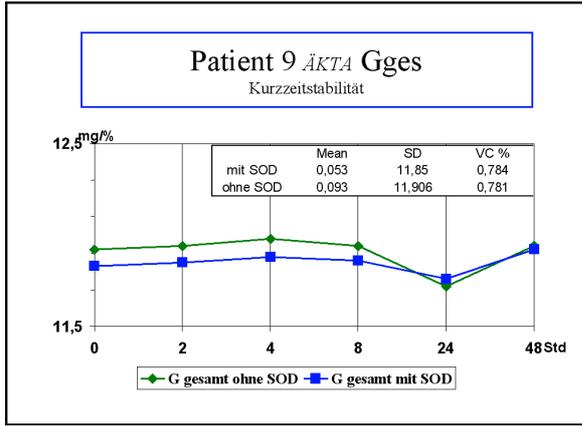
	pool	äktä Gges.	äktä G1	äktä G2	G1/Gges	G2/Gges	SOD	temp
1	400443	8,16	4,28	1,98	0,52	0,24		-20
2	400443	8,14	4,25	1,91	0,52	0,23		-20
3	400443	8,14	4,25	1,98	0,52	0,24		-20
4	400443	8,14	4,28	1,98	0,53	0,24		-20
5	400443	8,11	4,28	1,94	0,53	0,24		-20
6	400443	8,14	4,28	1,94	0,53	0,24		-20
7	400443	8,14	4,25	1,98	0,52	0,24		-20
8	400443	8,11	4,28	1,74	0,53	0,21		-20
9	400443	8,04	4,23	1,91	0,53	0,24		-20
10	400443	8,11	4,19	1,91	0,52	0,24		-20
11	400443	8,11	4,19	2,02	0,52	0,25		-20
12	400443	8,14	4,28	1,98	0,53	0,24		-20
13	400443	8,11	4,34	1,98	0,54	0,24		-20
14	400443	8,11	4,28	1,94	0,53	0,24		-20
15	400443	8,11	4,19	1,94	0,52	0,24		-20
16	400443	8,07	4,25	2,06	0,53	0,26		-20
17	400443	8,04	4,23	1,98	0,53	0,25		-20
18	400443	8,07	4,25	1,98	0,53	0,25		-20
19	400443	8,04	4,34	1,94	0,54	0,24		-20
20	400443	8,07	4,34	1,96	0,54	0,24		-20
21	400443	8,07	4,34	1,98	0,54	0,25		-20
22	400443	8,07	4,34	1,94	0,54	0,24		-20
23	400443	8,11	4,34	1,94	0,54	0,24		-20
24	400443	8,11	4,25	1,94	0,52	0,24		-20
25	400443	8,14	4,25	1,86	0,52	0,23		-20
26	400443	8,14	4,19	1,92	0,51	0,24		-20
27	400443	8,14	4,03	1,92	0,50	0,24		-20
28	400443	8,07	4,25	1,98	0,53	0,25		-20
29	400443	8,04	4,19	1,98	0,52	0,25		-20
30	400443	8,07	4,19	2,02	0,52	0,25		-20
31	400443	8,11	4,19	1,98	0,52	0,24		-20
32	400443	8,11	4,34	1,94	0,54	0,24		-20
33	400443	8,11	4,28	1,86	0,53	0,23		-20
34	400443	8,11	4,28	1,91	0,53	0,24		-20
35	400443	8,07	4,28	1,98	0,53	0,25		-20
36	400443	8,07	4,28	1,98	0,53	0,25		-20
37	400443	8,11	4,28	1,98	0,53	0,24		-20
38	400443	8,11	4,28	1,98	0,53	0,24		-20
39	400443	8,07	4,25	1,96	0,53	0,24		-20
40	400443	8,14	4,25	1,92	0,52	0,24		-20
41	400443	8,17	4,28	1,96	0,52	0,24		-20
42	400443	8,07	4,19	1,92	0,52	0,24		-20
43	400443	8,14	4,19	1,92	0,51	0,24		-20
44	400443	8,14	4,19	1,84	0,51	0,23		-20
45	400443	8,14	4,23	1,98	0,52	0,24		-20
46	400443	8,14	4,23	2,02	0,52	0,25		-20
47	400443	8,17	4,19	1,98	0,51	0,24		-20
48	400443	8,02	4,23	1,96	0,53	0,24		-20
49	400443	8,04	4,23	1,98	0,53	0,25		-20
50	400443	8,07	4,28	1,98	0,53	0,25		-20











10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum München - Großhadern - der Ludwig-Maximilians-Universität München (Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel) durchgeführt.

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel für die Überlassung des Themas und die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Klinische Chemie.
- Frau Dr. med. Petra Stieber für die umfassende Betreuung und Unterstützung, sowie die Vermittlung von Grundlagen zum wissenschaftlichen Arbeiten.
- Frau Dr. med. Ute Hasholzner für ihre ausgesprochen kollegiale Hilfestellung und tatkräftige Unterstützung in Form von hilfreichen Ratschlägen und fruchtbaren Diskussionen.
- Frau Dr. rer. nat. Dorothea Nagel für ihre kenntnisreiche Beratung und Unterstützung in statistischen Fragen und der Auswertung der Daten.
- Der Firma PAA Laboratories GmbH für die organisatorische und finanzielle Betreuung.
- Der Forschungsgruppe Schauenstein, insbesondere Frau Dr. Steinschifter für die fachliche Betreuung.
- Frau Karin Hofmann für den EDV-Support und den Mitarbeiterinnen des Bereichs Immunologie für ihre Unterstützung bei der Vermessung der Proben mit den unterschiedlichen Methoden.
- Chris für seine Hilfe, seine Tipps, seine geduldige Unterstützung und Hilfsbereitschaft.
- Meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld und ihre verständnisvolle Unterstützung.

11. Lebenslauf

Am 03. Juni 1954 wurde ich, Renate Schönbach, als erste Tochter meiner Eltern, Günter Schönbach und seiner Ehefrau Rosel Schönbach, in Aschaffenburg geboren.

Von 1960 bis 1966 besuchte ich die Grundschule, anschließend bis 1971 die Realschule in Aschaffenburg.

Nach dem Abschluss der mittleren Reife folgte eine Ausbildung im Labor des Krankenhauses Aschaffenburg. 1973 bis 1975 besuchte ich die Lehranstalt für technische Assistent(innen) am Stadtkrankenhaus Offenbach. Von 1975 bis 1998 arbeitete ich als medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin.

In dieser Zeit begann meine Weiterbildung.

Ab 1981 besuchte ich das Abendgymnasium für Berufstätige in München. 1986 erfolgte der Abschluß mit der allgemeinen Hochschulreife.

Von 1987 bis 1996 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Von Mai 1998 bis Oktober 1999 war ich als Ärztin im Praktikum im Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München tätig.

Erteilung der Approbation am 15. Dezember 1999

Danach arbeitete ich bis Oktober 2000 als Assistenzärztin im Fachgebiet Laboratoriumsmedizin im Institut für Klinische Chemie des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München, anschließend war ich von 2001 bis 2003 im Rahmen der Facharztweiterbildung in der Laborarztpraxis Dr. Kragenings/Dr. Römmler tätig.

Ab August 2003 arbeitete ich bis Oktober 2006 als Assistenzärztin der Medizinischen Klinik des Krankenhauses Schongau und bin derzeit als Praxisassistentin in einer Allgemeinarztpraxis tätig.