

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig - Maximilians - Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

**Wertigkeit von Anti – Citrullin – Antikörpern
in der
rheumatologischen Diagnostik**

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

vorgelegt von
Alexander Greiner
aus Sonneberg

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig – Maximilians – Universität zu München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Rudolf Gruber

Mitberichterstatter: PD Dr. H.M. Diepolder
PD Dr. D. Rapaport

Dekan: Prof. Dr. med. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2006

**gewidmet allen Patienten,
denen ich während meiner ärztlichen Tätigkeit
begegnen werde**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1. 1. Die Erkrankung Rheumatoide Arthritis
 - 1. 1. 1. Allgemeines zur RA
 - 1. 1. 2. Epidemiologie der RA
 - 1. 1. 3. Ätiologie und Pathogenese der RA
 - 1. 1. 4. Klinik der RA und Sonderformen
 - 1. 1. 5. Differentialdiagnostik
 - 1. 1. 6. Therapie
- 1. 2. Diagnose
- 1. 3. Autoantikörper in der rheumatologischen Diagnostik

2. Zielstellung

3. Patienten und Methoden

- 3. 1. Auswahl der Testseren
- 3. 2. Durchgeführte Tests

4. *Auswertung der Ergebnisse*

4. 1. Allgemeines

4. 2. Antikörper – ELISA

5. *Diskussion*

6. *Zusammenfassung*

7. *Literaturverzeichnis*

8. *Danksagung*

9. *Lebenslauf*

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

RA	=	Rheumatoide Arthritis
Ak	=	Antikörper
Ag	=	Antigen
Ig	=	Immunglobulin
AAK	=	Autoantikörper
CCP	=	cyclisches citrulliniertes Peptid
RF	=	Rheumafaktor
MTX	=	Methotrexat
ANA	=	antinukleäre Antikörper
BSG	=	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CRP	=	C – reaktives Protein
SLE	=	systemischer Lupus erythematoses
MRT	=	Magnet – Resonanz – Tomogramm
ELISA	=	Enzyme linked Immunosorbent Assay
TNF- α	=	Tumornekrosefaktor alpha
PAD	=	Peptidylarginin - Deaminase
IL	=	Interleukin

1. Einleitung

1. 1. Die Erkrankung Rheumatoide Arthritis

1. 1. 1. Allgemeines zur RA

Die RA ist eine chronisch entzündliche Systemerkrankung bisher noch ungeklärter Ursache. Der charakteristische Befund ist eine persistierende entzündliche Synovialitis, die zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führen kann. Sie betrifft üblicherweise die peripheren Gelenke in einer symmetrischen Anordnung. Kennzeichnend für die RA ist das Potential der synovialen Entzündung, Knorpeldestruktionen und Knochenerosionen mit konsekutiven Gelenkdeformitäten zu verursachen. Trotz seines destruktiven Potentials kann der Verlauf dieser Krankheit recht variabel sein. Einige Patienten weisen nur eine kurze Erkrankungsphase mit Beteiligung weniger Gelenke und minimaler Gelenkdestruktion auf, während andere eine rasch progressive Polyarthritis mit massiver Einschränkung der Gelenkfunktion zeigen. Fakultativ kann es aber auch zu extraartikulären Organmanifestationen kommen.

1. 1. 2. Epidemiologie der RA

Die Prävalenz der erwachsenen Bevölkerung beträgt weltweit etwa 1%. Am häufigsten tritt die RA im 4. Lebensjahrzehnt auf. Das Verhältnis von Frauen zu Männern beträgt 3:1 bis 4:1, wobei familiär die Krankheit gehäuft auftritt. Bis zu 70% der RA – Patienten „shared epitope“ positiv (bei Gesunden bis zu 25%). Des Weiteren haben Betroffene die HLA – DR 4 homozygot sind, einen schweren, erosiven Krankheitsverlauf und ein 7 – fach erhöhtes Risiko an RA zu erkranken. In Deutschland leben zurzeit 800000 – 1Mio. an RA erkrankte Menschen.

1. 1. 3. Ätiologie und Pathogenese

Wie läuft der Mechanismus ab, der die chronische Erkrankung unterhält und zur chronisch fibrosierenden Entzündung (Pannusbildung) führt? Dies ist nach wie vor die Kernfrage in der Pathogenese der RA. Ihre Ätiologie ist genauso unbekannt wie die der anderen Autoimmunopathien oder erworbenen Bindegewebserkrankungen. Einiges spricht dafür, dass eine immunologische Reaktion gegen körpereigene Substanzen (Autoimmunität) eine wichtige Rolle spielt. Normalerweise besteht eine Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Ag, diese könnte jedoch durchbrochen werden, wenn

- es zu einer größeren Zahl solcher autoreaktiven T – oder B – Lymphozyten kommt,

- körpereigenes Material, zum Beispiel durch Einwirken von Enzymen , so verändert wird, dass es antigenwirksam wird,
- autoreaktive B – Lymphozyten sich der Kontrolle der T – Suppressor – Lymphozyten entziehen oder durch einen „allogenen Effekt“ zur Produktion von AAK stimuliert werden,
- die normale Kontrollfunktion von T – Suppressor – Lymphozyten aus anderen Gründen ausfällt.

Es könnte sich aber auch ursprünglich gegen Viren – oder Bakterienantigene (hier vor allen Mycoplasmen, Ebstein – Barr – Virus, Zytomegalie -, Parvovirus, Staphylokokken, Streptokokken) gerichtete T – Lymphozyten handeln oder Ak die mit körpereigenen Ag reagieren, wenn diese untereinander identisch oder verwandt sind. Es kommt zu einer Autoimmunreaktion aufgrund von Kreuzreaktion (Antigenverwandtschaft) von T – Zell – Epitopen. Dieser Mechanismus spielt besonders beim rheumatischen Fieber eine wichtige Rolle. Ist durch eine dieser Möglichkeiten eine autoallergische Reaktion in Gang gekommen, kann es zur Chronizität der Erkrankung entscheidend beitragen („self perpetuation“), wie in Abbildung 1 ersichtlich.

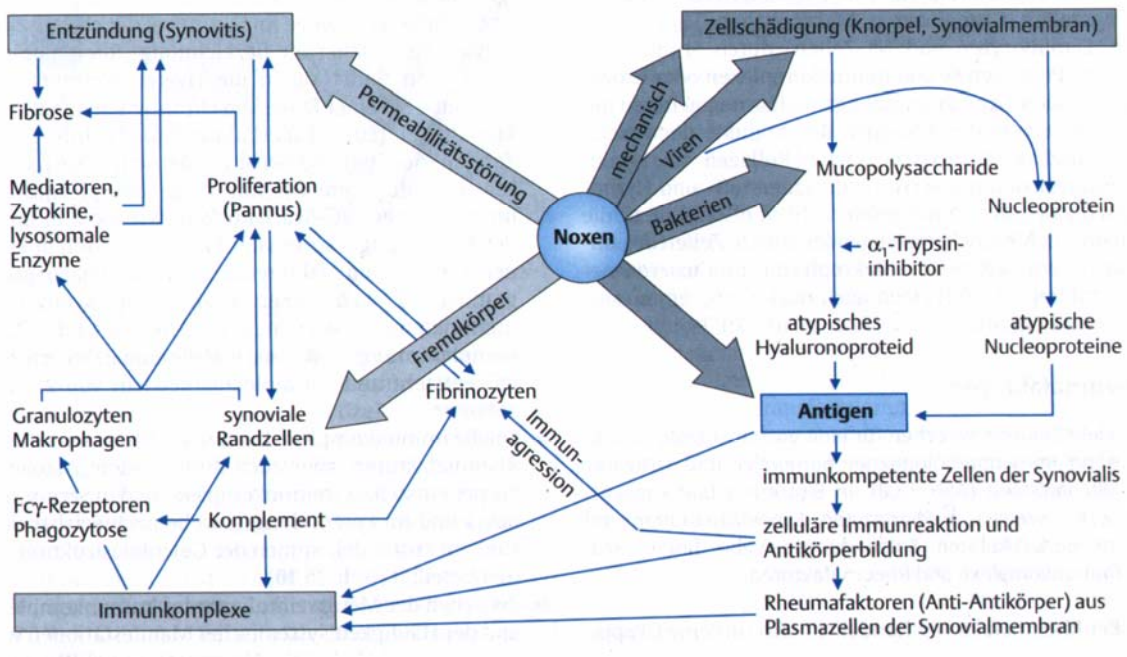


Abb. 1: Einfügen bekannter Befunde und begründeter Annahmen in einen hypothetischen Circulus vitiosus der chronischen Synovialitis bei RA (Quelle: Klinische Pathophysiologie, W. Siegenthaler, Thieme – Verlag, 2004)

Der Nachweis der Faktoren des C5 -, 6 – und 7 –Komplexes sprechen für eine Beteiligung des klassischen Wegs der Komplementaktivierung, die Verminderung des Koaktivators C3 für die Involvierung des alternativen Wegs. Das Komplement wird vor allem durch Immunkomplexe mit lokal gebildeten oder eingeschwemmten Rheumafaktor (RF) aktiviert. Dadurch kommt es zu einer direkten Aktivierung von Entzündungszellen über Fc – und C – Rezeptoren zum Beispiel auf Granulozyten, Monozyten beziehungsweise Makrophagen und natürlichen Killerzellen.

Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese der RA spielen die verschiedenen Enzyme. So sind die Enzyme der Glykolyse, des Tricarbonsäurezyklus erhöht. Auch sind in der Synovia knorpelzerstörende saure und neutrale proteolytische Enzyme enthalten. Zu den lysosomalen Enzymen mit kollagenolytischer Aktivität zählen zum Beispiel Matrixmetalloproteinasen, saure Osteoblastenphosphatase, Leucin, β - N - Acetylglucosaminidase, Protokollagen - Prolinoxidase. Hierbei sind von besonderer Bedeutung die knorpelzerstörenden Wirkungen der Elastase und der Matrixmetalloproteinasen. Sie konnten in Granulozyten an der Knorpel - Pannus - Grenze nachgewiesen werden. Elastase und Kollagenase wirken synergistisch bei der Zerstörung der Knorpelmatrix. Proteasen können außerdem ihrerseits Komplement aktivieren, Fibroblasten stimulieren und über die Destruktion von körpereigenen Material, zum Beispiel IgG oder IgM zur Demaskierung von Ag - Strukturen führen.

Zu den aktivierten Entzündungszellen zählen Granulozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Diese setzen durch Stimulation, zum Beispiel bei der Phagozytose von Immunkomplexen oder Exozytose, neben den erwähnten Enzymen weitere Entzündungsmediatoren frei. Dazu gehören die Produkte der Arachidonsäurekaskade, toxische, sowohl Kollagen - wie Hyaluronsäurestrukturen zerstörende Sauerstoff - und Hydroxylradikale sowie eine große Zahl von Zytokinen, die wiederum Mesenchymalzellen oder andere Zellen des Immunsystems aktivieren.

Bei der RA können die im Gelenk freigesetzten Zytokine nach ihrer pathologischen Funktion in 3 Gruppen unterteilt werden:

- Proinflammatorische Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, TNF) regulieren den Einstrom und die Aktivierung inflammatorischer Effektorzellen sowie die Proliferation von Chondrozyten und Fibroblasten.
- Autoinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) blockieren gezielt proinflammatorische Zytokine
- Antizytokinproteine (löslicher TNF oder IL-1-Rezeptor) können die Entzündung kontrollieren, indem proinflammatorische Zytokine abgefangen werden.

Im gesunden Gewebe liegt normalerweise ein Gleichgewicht dieser Zytokine vor, so dass einer Entzündung schnell entgegengesteuert werden kann. Bei einer stärkeren Verschiebung des Gleichgewichts kommt es zur RA.

Unter dem Einfluss des Entzündungsprozesses beginnt das Synovialgewebe zu wuchern und wird wie die Knorpelschicht mit Fibrin überzogen. Es entsteht ein zottenförmiges Granulationsgewebe, das Pannus genannt wird. Dieser wächst tumorartig in die Gelenkhöhle ein und zerstört ebenfalls Knochen und Knorpel.

Die Schlüsselrolle beim Entzündungsprozess nehmen IL-1 und TNF ein. Beide Zytokine können die Expression des anderen Zytokins induzieren und stimulieren die Synthese von Entzündungsmediatoren wie Cyclooxygenase 2 und Stickstoffmonoxid.

TNF wird von mononukleären Phagozyten produziert und wirkt bei der frühen Entzündungsreaktion entscheidend mit. TNF führt zur Knochen - und Knorpeldestruktion und zur Angiogenese, in dem der vaskuläre Endothelwachstumsfaktor vermehrt gebildet wird. Er wirkt auf verschiedene Zelltypen ein, so wird zum Beispiel bei Makrophagen die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen gesteigert. In Hepatozyten kommt es zur vermehrten Produktion von Akute - Phase - Proteinen, in Synoviozyten wird die Bildung von Metalloproteinasen gesteigert, was zur Knorpeldestruktion beiträgt. Makrophagen produzieren neben zahlreichen Zytokinen auch noch Komplementproteine und Thromoplastin. (1)

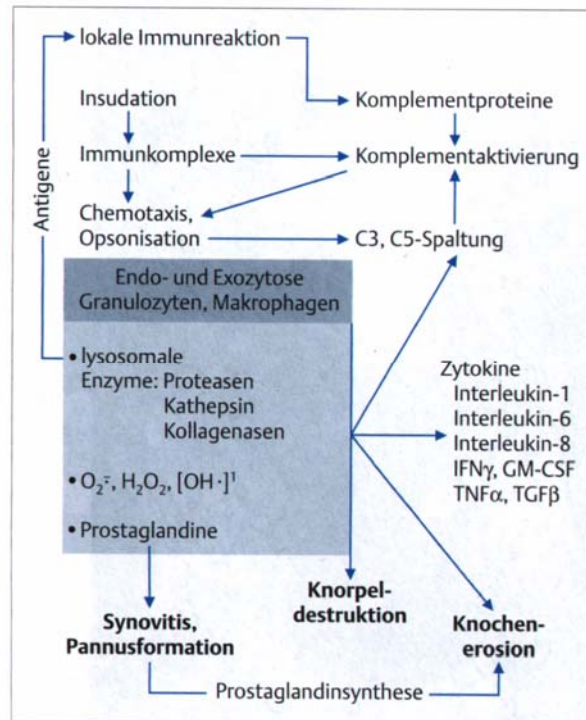


Abb. 2 Mechanismen der Gewebsschädigung im Gelenk bei chronischer RA
(Quelle: Klinische Pathophysiologie, W. Siegenthaler, Thieme – Verlag, 2004)

Entscheidend beteiligt sind auch immunpathologische humorale und zelluläre Mechanismen, wie zum Beispiel der Rheumafaktor. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Ak, die gegen menschliches Immunglobulin gerichtet sind und überwiegend der Klassen IgM – oder IgG angehören. Der RF findet sich häufig und in höherer Konzentration bei Menschen mit RA, aber auch in niedriger Konzentration bei Krankheiten wie Lues, Tuberkulose, Endokarditis und älteren gesunden Menschen. Er reagiert mit autogenem wie mit allogenem IgG und mit immunogenen Bruchstücken, wie sie zum Beispiel unter der Einwirkung lysosomaler Enzyme entstehen können. Diese RF liegen in den Phagozytengranula, zum Teil auch im Serum und in der Synovia als Immunkomplexe vor. (1)

1. 1. 4. Klinik der RA und Sonderformen

Charakteristischerweise ist die RA eine chronische Polyarthrit. Bei etwa zwei Drittel der Patienten stehen unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, nächtliches Schwitzen, subfebrile Temperaturen, Myalgien, Palmarerythem oder Pigmentverschiebungen im Bereich der Handrücken im Vordergrund. Diese Krankheitszeichen können über Wochen, sogar Monate persistieren und damit die Diagnosestellung entscheidend verzögern. Typisch für die RA ist eine chronische Synovialitis mit Pannusbildung und Knorpelzerstörung. Zu allererst sind oft die kleinen Gelenke, hier besonders die Finger betroffen. Die Gelenkveränderungen treten symmetrisch auf und schreiten zentripetal fort. Anfangs treten ein Bewegungsschmerz und eine Schwellung der Fingergrund- und proximalen

Interphalangealgelenke auf, welcher zum schmerzhaften Händedruck, dem Querdruckschmerz oder dem sogenannten Gaenslen – Zeichen führt. Ein weiteres Merkmal ist eine Muskelatrophie, die sich durch Einsinken der Interossealbereiche des Handrückens zeigt. Zu den Frühsymptomen gehören morgendliche Steifigkeit und Durchblutungsstörungen einzelner Finger. Die Morgensteifigkeit ist auf die abnorme chemische Zusammensetzung und das veränderte regulatorische Verhalten der Gelenkflüssigkeit sowie der Grundsubstanz im periartikulären Gewebe zurückzuführen.

Wichtig zu wissen ist, dass bei der RA die distalen Interphalangealgelenke II – V, BWS und LWS nicht betroffen sind. Auch das Karpaltunnelsyndrom und die Baker – Zyste können bei der RA auftreten. Beim Karpaltunnelsyndrom handelt es sich um Synovitiden der Sehnenscheiden unter dem Ligamentum carpi transversum. Diese können den Nervus medianus komprimieren, was zu Parästhesien von Daumen-, Zeige- und Mittelfinger sowie Atrophie des Daumenballens und Schmerzen im Kompressionsbereich führt. Die Baker – Zyste ist eine Hernie der Kniegelenkscapsel.

In 20% der Fälle finden sich sogenannte Rheumaknoten in Sehnen und subkutan, besonders an den Streckseiten der Gelenke. Histologisch imponiert ein palisadenförmig angeordneter Wall von Fibroblasten, Epitheliodzellen und mononukleären Zellen um den fibrinoiden Herd.

Bei akuten Schüben können zum Teil rötliche Halbmonde im Nagelbett, subunguale Blutungen und Nagelwuchsstörungen beobachtet werden.

Es treten auch extraartikuläre Manifestationen auf, die von unterschiedlicher klinischer Bedeutung sind.

ORGAN	ERKRANKUNG
Herz	Perikarditis und Herzklappenveränderungen, Myokarditis
Lunge	Pleuritis, Lungenfibrose, Lungenknötchen, Bronchiolitis
Leber	unspezifische Leberenzymerrhöhung, periportale Fibrose
Niere	leichte Glomerulopathie
Auge	Keratokonjunktivitis sicca, Epi –(Skleritis)
Gefäße	digitale Vaskulitis, Vaskulitis der Vasa nervorum (Polyneuropathie), vorzeitige Arteriosklerose

Tab.1: Extraartikuläre Manifestationen der RA

Von der RA gibt es Sonderformen, die sich nach Lebensalter und schwere der Erkrankung unterschieden werden:

Sonderform der RA	Charakteristika
Caplan – Syndrom	RA + Silikose (bei Grubenarbeitern)
Felty – Syndrom	schwere Verlaufsform im Erwachsenenalter mit Milz – und Lymphknotenschwellung, Granulozytopenie, HLA – DR4 in 95% der Fälle positiv
Alters – RA	beginnt nach dem 60. Lebensjahr, in 1/3 der Fälle akuter Beginn, anfangs oft mono – oder oligoartikulär, oft aggressiver Verlauf mit Gelenkzerstörung
Maligne Form	rasch destruierende Gelenkveränderungen, vaskulitisch bedingte extraartikuläre Organmanifestationen, massiv veränderte Entzündungsparameter (BSG, CRP, RF)

Tab.2: Charakteristika der Sonderformen der RA

Formen der juvenilen RA	Charakteristika
Morbus Still	Fieber, Polyarthritits, Exantheme, Polyserositis von Perikard und Pleura, Hepatosplenomegalie, Lymphknotenschwellung, Anämie, Leukozytose
Frühkindliche Oligoarthritis	meist Mädchen betroffen, bis 4 Gelenke befallen, bei 50% Iridozyklitis, RF negativ, ANA in 75% der Fälle positiv
Seronegative Polyarthritits	mehr als 4 Gelenke befallen, betrifft meist Mädchen
Seropositive Polyarthritits	Verlauf wie bei RA des Erwachsenen, RF positiv
HLA – B 27 assoziierte späte Oligoarthritis	meist Jungen betroffen, HLA – B 27 in 75% der Fälle positiv, RF negativ, Übergänge zum Morbus Bechterew möglich

Tab.3: Charakteristika der verschiedenen Formen der juvenilen RA

1. 1. 5. Differentialdiagnostik

Die RA ist besonders im Frühstadium von anderen Erkrankungen, vor allen des rheumatischen Formenkreises sehr schwer abzugrenzen.

ERKRANKUNG	BESONDERE MERKMALE
SLE	ANA↑↑
Sharp – Syndrom	anti - RNP
Panarteriitis nodosa	Biopsie
Psoriasisarthritis	typische Hauterscheinungen
Morbus Bechterew	HLA – B 27, Sakroiliitis, Wirbelsäulen – und Thoraxbeweglichkeit eingeschränkt
Reaktive Arthritis	nach urethritischen oder enteritischen Infekten mit Reiter - Syndrom: Arthritis, Konjunktivitis, Urethritis
Rheumatisches Fieber	ASL – Titer ↑
Lyme Arthritis	asymptomatisch, anamnestisch Zeckenbiß, Erythema migrans, Ak – Nachweis gegen Borrelia burgdorferi
Infektiöse Arthritis	Monarthritis mit Erregernachweis im Gelenkpunktat
Arthritis urica	Harnsäure ↑, vor allen Großzehengrundgelenk betroffen
Fibromyalgie	Tender points
Polyarthrose der Fingergelenke	Fingerend-, mittelgelenke betroffen, Daumensattelgelenk (Rhizarthrose)
Morbus Behcet	Iritis, orale und genitale Aphthen, Erythema nodosum, Arthralgien

Tab.4: Rheumatische Erkrankungen mit den wichtigsten Unterscheidungsmerkmalen

1. 1. 6. Therapie

Die Ziele der Therapie der RA sind:

1. Schmerzlinderung
2. Minderung der entzündlichen Aktivität
3. Hemmung der Gelenkdestruktion
4. Erhaltung der Gelenkfunktion
5. Verhinderung von weiteren Organkomplikationen

Sehr wichtig ist eine effektive Therapie in der Frühphase der RA, sie entscheidet oft über den weiteren Krankheitsverlauf. Der rheumatische Entzündungsprozeß muss in diesem Zeitraum wirkungsvoll unterdrückt werden, weil sonst Gelenkdestruktionen drohen.

Da die Ätiologie und Pathogenese noch unklar sind, ist die Therapie als palliativ anzusehen, mit dem Ziel, die Anzeichen und Symptome zu lindern. (2)

Einen wichtigen Bestandteil stellt die medikamentöse Therapie dar, hierbei werden 4 große Gruppen unterschieden. Die erste Gruppe bilden die nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAR), mit den beiden Untergruppen unselektive COX – 1 / 2 – Inhibitoren wie Azetylsalizylsäure, Ibuprofen , Diclofenac , Indometacin und die selektiven COX – 2 – Inhibitoren wie Rofecoxib, Celecoxib. Die Eigenschaft dieser Medikamente beruht auf der Aktivitätshemmung des Enzyms Cyclooxygenase und damit der Hemmung der Produktion von Prostaglandinen, Prostacyclinen und Thromboxanen, also eine analgetische, entzündungshemmende und antipyretische Wirkung. Nachteile sind vor allem gastrointestinale Nebenwirkungen, wie Magenschmerzen, Refluxbeschwerden oder Magen-, Duodenalulzera, welche bei den selektiven COX – 2 – Inhibitoren viel seltener sein sollen.

Die zweite Gruppe bilden die Glukokortikoide. Indikationen für diese Medikamente sind eine hochaktive RA mit einer Therapie bis zum Wirkungseintritt der Basistherapeutika und die hochaktive Alters – RA, die auch längerfristig mit einer sogenannte low – Dose Steroidtherapie behandelt werden kann.

Eine weitere Gruppe stellen die Basistherapeutika dar. Sie sollten so frühzeitig wie möglich eingesetzt werden, um Gelenkzerstörungen zu verhindern. Bei 50% - 70% der Fälle sind sie wirksam ohne dass man den genauen Wirkmechanismus kennt. Der Wirkungseintritt erfolgt verzögert nach 2 – 3 Monaten, bei MTX schon nach 4 Wochen. Nebenwirkungsbedingte Therapieabbrüche sind relativ häufig. Regelmäßige klinische – und Laborkontrollen zur Erfassung von Nebenwirkungen sind obligat. Zu den Basistherapeutika zählen:

- Alkylantien wie Cyclophosphamid, bei schweren Verläufen mit Versagen der übrigen Basistherapeutika
- Chloroquin, bei leichten erosiven Verlauf
- Sulfasalazin, bei leichten nicht erosiven Verlauf
- Immunsuppressiva wie Leflunomid, als Reservemittel, falls MTX nicht hilft
- Methotrexat (MTX): MTX ist ein Folsäureantagonist mit immunsuppressiver Wirkung, aber mit dem Risiko gastrointestinalen Nebenwirkungen und fetaler Missbildungen bei Schwangeren. Es ist das Mittel der Wahl bei mittelschwerer bis schwerer RA. Wichtig zu wissen ist, dass man am Tag der MTX – Einnahme kein NSAR einnehmen soll, weil dieses die MTX – Ausscheidung hemmt. (3, 4)

Die vierte Gruppe bildet die anti- TNF Therapie. TNF wird von aktivierten Monozyten und Makrophagen produziert. Er induziert die Produktion proinflammatorischer Zytokine, stimuliert Endothelzellen Adhaesionmoleküle zu exprimieren, welche Leukozyten in betroffene Gelenke locken. Außerdem wird die Synthese von synovialen Makrophagen, von Metalloproteinasen, Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten verstärkt, sowie die Proteoglykansynthese im Knorpel inhibiert. Dies alles trägt zur Synovitis und Gelenkdestruktion bei.

Die TNF- α -Blockade dagegen reduziert die Zell-Infiltration im Synovium durch Abnahme der Zell-Migration. Eine anti TNF Behandlung führt zur Abnahme der Expression der Adhaesionmoleküle im Synovium, reduziert die Anzahl der löslichen zirkulierenden Adhaesionmoleküle und vermindert die Anzahl der Chemokine in der Synovia. Beide, Chemokine und Adhaesionmoleküle sind entscheidend am Migrationsprozeß von Entzündungszellen in die Synovia involviert.

Die Hemmung des TNF- α kann auf 2 Arten erreicht werden, über IgG Fusionsproteine wie Etanercept oder TNF- α -Ak wie Adalimumab oder Infliximab.

Etanercept (Enbrel) ist ein dimeres Fusionsprotein, das aus zwei extrazellulären Liganden des menschlichen TNF - Rezeptors besteht, der mit einem Fc – Anteil menschlichen IgG verbunden ist. In den meisten Fällen wirkt es bereits in den ersten beiden Wochen, nahezu immer innerhalb von 6 – 8 Wochen. Positiv beeinflusst werden die Anzahl der geschwollenen und schmerzhaften Gelenke und deren Funktionskapazität.

Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Ak, der zu 75% aus menschlichen, zu 25% aus Maus-Peptid-Sequenzen besteht. Dieser Ak greift in die Synovium-Angiogenese ein so dass es zu einem reduzierten Zellverkehr zu den Gelenken und damit zur Gelenkschonung kommt. Infliximab darf jedoch nur in Verbindung mit MTX verschrieben werden, hierbei spielt Adenosin eine Rolle, welches die Produktion von TNF – α durch Makrophagen hemmt. Die Freisetzung dieses antiinflammatorischen wirkenden Adenosins ist ein wichtiger Mechanismus von MTX. Die Wirkung setzt sehr rasch ein, schon 48 Stunden nach einer Infusion ist eine deutliche Verminderung der Synoviazellen sichtbar.

Adalimumab ist der erste TNF- α -Ak, der nur aus humanen Sequenzen besteht. Er bindet spezifisch an TNF- α und interagiert nicht mit anderen homologen Proteinen der Tumornekrosefamilie. Adalimumab unterscheidet sich nicht von natürlichen IgG 1 und weist daher ein geringes immunogenes Potential auf. Er neutralisiert die biologische Funktion von TNF- α , indem er die Interaktion mit dem zellständigem p55 und p75-TNF- Rezeptor blockiert. Die Wirkung setzt sehr rasch ein, bei vielen Patienten zeigte sich bereits nach 2 Behandlungswochen ein positives Ansprechen. Die Reduktion der Symptome der RA hielt in bisherigen Untersuchungen bis zu 2 Jahre unverändert an.

Die wichtigsten Nebenwirkungen, die unter TNF- α -Blockern auftreten können, sind Verstärkung einer Herzinsuffizienz und das steigende Risiko opportunistischer Infektionen infolge der immunsuppressiven Wirkung.

Eine gleichzeitige Anwendung von Etanercept und Adalimumab ist nicht zu empfehlen, weil es zu einem erhöhtem Risiko schwerer Infektionen, sowie einem erhöhtem Risiko für Neutropenien kommen kann. (5, 6)

1. 2. Diagnose

Die Diagnose ist in der Frühphase der Krankheit schwierig zu stellen, wenn nur allgemeine Symptome wie intermittierende Arthralgien oder Arthritis in asymmetrischer Verteilung vorliegen.

1 – 2 Jahre nach Krankheitsbeginn zeigen sich die charakteristischen Auffälligkeiten der RA. Das typische Bild einer bilateralen, symmetrischen, entzündlichen Polyarthritis der kleinen Gelenke der oberen und unteren Extremität, mit Aussparung des Achsenskeletts unter Ausnahme der Halswirbelsäule, spricht für die Diagnose. (7)

Zu den Laboruntersuchungen gehören die immunologischen Befunde und die unspezifischen Entzündungszeichen. Zur letztern Gruppe gehören erhöhte BSG – und CRP – Werte, alpha – Globuline und gamma – Globuline können ebenso erhöht sein wie Kupfer im Serum. Außerdem können eine normo – oder hypochrome Entzündungsanämie, leichte Thrombozytose und Leukozytose, erniedrigtes Eisen im Serum und eine Erhöhung der Komplementfaktoren C₃, C₄ im entzündlichen Schub vorkommen

Zu den immunologischen Befunden siehe Kapitel 1.3.

Das American College of Rheumatology (ACR) hat 1987 Kriterien festgelegt, anhand derer die RA diagnostiziert werden kann. Von den folgenden 7 Kriterien müssen mindestens 4 erfüllt sein, um die Diagnose RA zu stellen. Die Kriterien 1 – 4 müssen für mindestens 6 Wochen 6 vorliegen.

7 Kriterien des American college of Rheumatology
1. Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1 h Dauer
2.Arthritis von 3 oder mehr Gelenkenbereichen: Weichteilschwellung oder Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereichen
3.Arthritis der Hand – oder Fingergelenke: Schmerzen + Schwellung von Handwurzelgelenken, proximalen Interphalangealgelenken (PIP) oder Metakarpophalangealgelenken (MCP)
4.Symmetrische Arthritis: Gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereichs beider Körperhälften
5.Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7.Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose und oder Erosionen (osteoarthrotische Veränderungen allein sind nicht ausreichend)

Tab.5: ACR – Kriterien von 1987

Klasse	Funktionskapazität
I	Vollständige Fähigkeit zur Verrichtung üblicher Aktivitäten des täglichen Lebens (Grundaktivitäten, Freizeitaktivitäten)
II	Fähigkeit zur Verrichtung der üblichen Grundaktivitäten des täglichen Lebens und beruflicher bzw. Hausarbeiten, jedoch Einschränkung bei Freizeitaktivitäten
III	Fähigkeit zur Verrichtung üblicher Grundaktivitäten des täglichen Lebens, jedoch Einschränkung bei beruflicher bzw. Hausarbeit und Freizeitaktivitäten
IV	Einschränkung der Fähigkeit zur Verrichtung üblicher Grundaktivitäten sowie bei beruflicher und Hausarbeit sowie Freizeitaktivitäten

Tab. 6: Die revidierten ACR – Kriterien von 1991 zur Klassifikation des globalen Funktionsstatus bei RA

1. 3. Autoantikörper in der rheumatologischen Diagnostik

Ein wichtiger Punkt für die Prognose der an RA erkrankten Patienten, ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Hierbei gilt, je früher die Krankheit erkannt wird, desto aggressiver kann man therapieren, um Komplikationen wie Knorpel – und Knochendestruktionen so gering wie möglich zu halten.

Die Diagnose der RA lässt sich auf drei verschiedenen Wegen stellen, radiologisch, klinisch und serologisch. Wenn radiologische Veränderungen zu erkennen sind, ist die Krankheit aber bereits manifest und hat somit wenig Aussagekraft für das frühe Stadium der RA. Ähnlich verhält es sich, wenn man die Diagnose nach den ACR – Kriterien stellt. Der schnellste Weg bei Verdacht auf RA besteht in der serologischen Diagnostik um zu einem Ergebnis zu kommen. Die Anforderungen an solch einem serologischen Marker sind:

- frühes Auftreten
- hohe Sensitivität
- hohe Spezifität
- gute prognostische Relevanz.

Seit der Entdeckung des antiperinukleären Faktors (APF) 1964 sind viele weitere AAK hinzugekommen, wie zum Beispiel dem Antikeratin – Ak. Problem vieler dieser AAK ist, dass sie entweder auch bei anderen AIK vorkommen, nicht oder nur selten in der Frühphase zu erkennen sind. (8)

Es gibt jetzt jedoch einen AAK, der die Anforderungen in der serologischen Diagnostik der RA zu erfüllen scheint, das cyclisch citrullinierte Peptid (CCP).

Es gibt einige AAK, die bei der RA vorkommen, aber auch bei anderen Autoimmunkrankheiten.

Anti – RA 33 – Ak: Sind Marker für die Frühform der RA, kommen aber auch bei 25% der SLE – Patienten vor, jedoch nicht bei Osteoarthritis, reaktiver Arthritis und Psoriasisarthritis. Sie werden bei 36% der RA – Patienten gefunden. (8)

Anticalpastatin: Calpain ist eine Calcium – abhängige neutrale Cystein – Proteinase. Substrate dieses Enzyms sind sehr verschieden, sie schließen Zytoskelettproteine, nukleäre Proteine, Zytokine, extrazelluläre Matrixproteine und Proteoglykane ein. Erhöhte Werte von extrazellulären Calpain in der entzündeten Synovia zeigen, dass Calpain von Synovialzellen produziert wird. Calpastatin ist ein natürlicher Inhibitor von Calpain. In 45% von RA – Seren, aber auch bei SLE, Myositis, Sklerodermie ist es gefunden worden. AAK, die sich gegen Calpastatin richten, können die Calpain – Aktivität erhöhen, steigern den Knorpelschaden und erhöhen die Schwere der Erkrankung. (8)

Sa – Protein: Es findet sich bei 40% der Patienten in der Frühphase und wird wahrscheinlich in Placenta, Milz und Pannusgewebe produziert. Patienten, die positive anti – Sa – Werte zeigen, waren überwiegend männlich mit einem schweren erosiven Verlauf. Es wurde auch eine hohe Übereinstimmung zwischen CCP – und Sa – AAK gefunden, die Bedeutung ist aber noch unklar. Es ist ein citrulliniertes Protein, welches häufig in rheumatisch veränderter Synovia vorkommt. (8-10)

Heavy – chain – binding – Protein (BiP): Dieses ubiquitär gebildete Chaperon – Protein ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Das Funktionieren von BiP ist essentiell für das Überleben der Zelle, so kann zum Beispiel eine Schädigung der Zelle durch eine Abnahme der BiP - Konzentration erkannt werden. Deshalb ist dieses Protein auch bei vielen Krankheiten niederreguliert. Während einer Schädigung wandert es vom Endoplasmatischen Retikulum zum Zellkern und zur Zelloberfläche. Hier kann es dann mit dem Immunsystem Kontakt aufnehmen. BiP bindet an die schweren Ketten von Ig und ist an der Antwort der zytotoxischen T – Zellen beteiligt. (8, 11, 12)

Bei RA – Patienten wird es in der entzündeten synovialen Membran überexprimiert und zwar durch eine Stimulation spezifischer T – Zellen.

Glucose – 6 – Phosphat – Isomerase: Dieses ubiquitär vorkommende Enzym ist am Rand der Synovia und in Endothelzellen von Arteriolen gefunden worden. Nach neueren Studien hat es sich aber nicht bestätigt, dass es eine Rolle im Entzündungsvorgang bei der RA spielt. (8)

Rheumafaktor: RF sind AAK verschiedener Immunglobulinklassen, die gegen das Fc – Fragment des IgG gerichtet sind. Sie treten in 70 – 80% der Fälle auf, dann spricht man von einer seropositiven RA. Der Nachweis erfolgt dadurch, dass sie in vitro Immunglobuline (Ig) der Klasse IgG agglutinieren, wenn diese an die Oberfläche von (Schaf-) Erythrozyten oder Latexpartikeln adsorbiert sind.

Der RF – Befund ist ohne klinische Kriterien für eine RA alleine nicht aussagekräftig, denn RF treten auch bei anderen rheumatischen Erkrankungen und gesunden Personen auf.

Mit zunehmender Titerhöhe steigt auch die diagnostische Spezifität des RF – Nachweises für die RA. Hohe Titer von RF bei der RA findet man häufiger bei rascher Progredienz von Gelenkdestruktionen und bei Patienten mit extraartikulären Manifestationen wie Rheumaknoten, Vaskulitis, Serositis oder Sicca – Syndrom.

Mit Hilfe des ELISA kann man die verschiedenen Ig – Klassen differenzieren. Da nur bei wenigen RA – Patienten IgA – oder IgG – RF ohne IgM – RF gefunden werden, ist mit der IgA – und IgG – RF – Bestimmung gegenüber einem sensitivem IgM – RF – Test allenfalls eine geringe Zunahme der diagnostischen Sensitivität für die RA um maximal wenige Prozent zu erwarten. IgA – RF weist zwar eine deutlich höhere Spezifität für RA gegenüber IgM – RF auf hat aber eine geringere Sensitivität. Dennoch bleiben auch bei Messung aller RF – Klassen ca. 10% der RA – Patienten seronegativ. Ein gleichzeitig für alle 3 RF – Klassen positives Ergebnis gilt, ähnlich wie die oben erwähnten hohen Titer, als vergleichsweise RA – spezifisch. van Boekel, 2002 #49;Thomas, 2000 #58}

Anti – CCP – Ak können schon in der Frühphase der RA gefunden werden und sind ein guter prognostischer Marker, bei der Unterscheidung zwischen erosiver und nicht erosiver RA. Ein Vorteil gegenüber AFA – Ak ist, dass sie deutlich einfacher nachgewiesen werden können. Anti – CCP ist, wie schon in vielen Studien gezeigt, ein sehr spezifischer und sensitiver Marker für die RA.

2. Zielstellung

Die sensitivste Labormethode in der Diagnostik der RA war bisher der RF mit dem Problem der eher geringeren Spezifität. Durch den Nachweis von Ak gegen citrulliniertes Peptid (Anti – CCP) mit Hilfe neu entwickelter ELISA – Systeme scheint nach bisherigen Ergebnissen verschiedener Autoren nun ein spezifischerer und möglicherweise auch sensitiverer Test in der Differentialdiagnostik der RA zur Verfügung zu stehen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 333 Seren von Patienten der Rheumaambulanz der LMU untersucht, mit dem Ziel, 3 verschiedene Anti – CCP – Tests (INOVA, GENERIC ASSAYS, EUROIMMUN) auf ihre diagnostische Wertigkeit im Vergleich zum RF (IgM-RF und IgA-RF) und im Hinblick auf die klinische Diagnose der RA zu testen.

Des Weiteren wurde untersucht, wie CCP - Titer mit verschiedenen Aktivitätsparametern wie RF, Leukozyten, CRP und BKS korrelieren.

3. *Patienten und Methoden*

3. 1. *Auswahl der Testseren*

Aus der Rheumaambulanz der LMU wurden Seren von 333 Patienten mittels ELISA – Testsysteme untersucht. Bei 87 Patienten konnte die Diagnose nach den ACR – Kriterien gestellt werden, weitere 23 Patienten hatten wahrscheinlich eine Frühform der RA.

Die an RA erkrankten Patienten hatten ein Durchschnittsalter von 58,6 Jahren, wobei die jüngste Patientin 19 Jahre alt war, die älteste 84 Jahre. In der Gruppe der Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen dagegen lag das Durchschnittsalter bei 54,8 Jahren, mit einer Altersverteilung von 13 - 90 Jahren.

In der RA – Gruppe war das weibliche Geschlecht mit 75,3% häufiger betroffen, in der Nicht – RA Gruppe betrug der Anteil der weiblichen Patienten 73,6%.

Alle Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, wurden durch die Ärzte der Rheumaambulanz über die Hintergründe der Studie aufgeklärt und mussten ihr Einverständnis geben, dass ihre Ergebnisse und Daten entsprechend ausgewertet werden durften.

3. 2. *Durchgeführte Tests*

Die ausgewählten Seren wurden in 3 verschiedene ELISA – Testsystemen untersucht:

- INOVA (Florenz/Italien)
- GENERIC ASSAYS (Dahlewitz/Deutschland)
- EUROIMMUN (Lübeck/Deutschland)

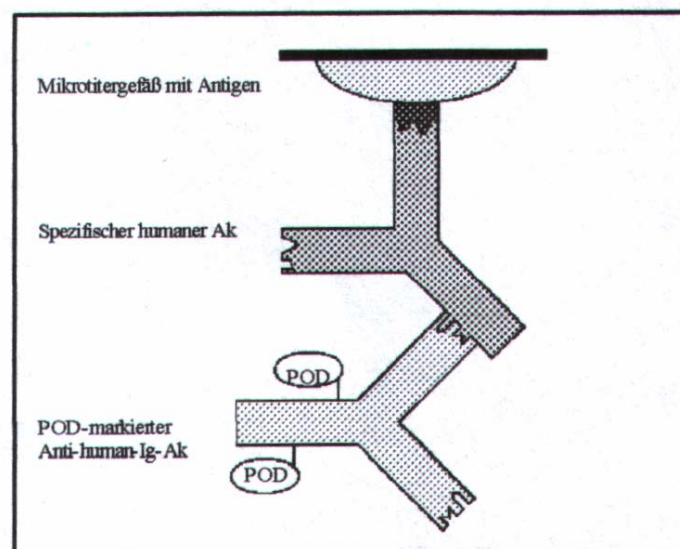


Abb. 6: Antikörper - ELISA

Testprinzip:

Als Festphase werden Polystyrol Mikrotiterstreifen mit synthetisch hergestellten cyclischen citrullinhaltigen Oligopeptiden verwendet.

Im ersten Inkubationsschritt binden sich bei positiven Proben die nachzuweisenden Ak aus dem verdünnten Patientenserum an die Festphasen – gebundenen Ag.

Im zweiten Inkubationsschritt werden diese Ak mit Peroxidase – markierten Anti – Human – Ak nachgewiesen.

Im dritten Inkubationsschritt werden die gebundenen Ak durch eine Farbreaktion mit einer Chromogen – Substratlösung dargestellt. Die Extinktion der entstehenden Farblösung ist proportional zur Ak – Konzentration im Patientenserum.

Testdurchführung:

A) INOVA:

1. Alle Reagenzien müssen vor dem Start auf Raumtemperatur gebracht werden.
2. 100 µl von der Patientenprobe, vom positiven und negativen CCP IgG ELISA in die entsprechenden Reagenzgefäße pipettiert und bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.
3. Die Reagenzgefäße werden entleert und mit 200 – 300 µl des Waschpuffers gewaschen, dies wird zwei – bis dreimal wiederholt.
4. In jedes Reagenzgefäß werden 100 µl des HRP Konjugats pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Reagenzgefäße werden entleert und mit 200 – 300 µl des Waschpuffers zwei – bis dreimal gewaschen.
6. 100 µl des TMB Chromogens in jedes Reagenzgefäß gegeben und für 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.
7. Nun werden 100 µl der Stopplösung in jedes Gefäß pipettiert.
8. Nach einer Stunde kann die photometrische Auswertung bei 450 nm stattfinden, als Referenzwellenlänge kann auch 620 nm benutzt werden.

Referenzbereich: < 20U/ml negativ , >59U/ml positiv, 20 – 59U/ml grenzwertig

B) GENERIC ASSAYS:

1. 100 µl des Verdünnungspuffers in Reagenzgefäße A₁, A₂, blank pipettieren.
2. 100 µl der Kalibratorkontrolle in Reagenzgefäße B₁, B₂, - F₁, F₂ pipettieren
3. 100 µl der negativen und positiven Kontrollproben in die Reagenzgefäße G₁, G₂ - H₁, H₂ pipettieren.
4. 100 µl der Patientenseren in die jeweiligen Reagenzgefäße auf der Mikrotiterplatte pipettieren.
5. Bei 37 Grad für 60 Minuten inkubieren.
6. Die Lösungen von der Mikrotiterplatte entfernen und mit 300 µl des Waschpuffers zwei – dreimal waschen.

7. 100 µl von der Konjugatlösung in jedes Reagenzgefäß geben.
8. Wieder für 60 Minuten bei 37 Grad inkubieren.
9. Die Konjugatlösung von der Mikrotiterplatte entfernen und mit 300 µl Waschlösung zwei – dreimal waschen.
10. 100 µl der Substratlösung in jedes Reagenzgefäß geben.
11. Für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
12. 100 µl Stopplösung in jedes Reagenzgefäß pipettieren.
13. Photometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Referenzbereich: <25 U/ml negativ, >50U/ml positiv, 25-50U/ml grenzwertig

C) EUROIMMUN:

1. 100µl Kalibrator / Referenzkontrolle, verdünnte Positiv – und Negativkontrolle oder verdünnte Patientenproben in jeweilige Reagenzgefäße geben.
2. 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Reagenzgefäße entleeren und anschließend dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer waschen.
4. Jeweils 100 µl Enzymkonjugat – Lösung (Alkalische – Phosphatase-markiertes AntiHuman – IgG) in die Reagenzgefäße pipettieren.
5. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Reagenzgefäße entleeren und dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer waschen.
7. Jeweils 100 µl Substratlösung in die Reagenzgefäße pipettieren.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Jeweils 100 µl Stopplösung in die Reagenzgefäße pipettieren.
10. photometrische Auswertung innerhalb von 1 Stunde nach dem Stoppen bei 450 nm Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge zwischen 620 und 650 nm.

Referenzbereich: < 5U/ml negativ , >5U/ml positiv

Das C – reaktive Protein wurde mit Hilfe der Immunturbidimetrie bestimmt. Der Referenzbereich lag für Erwachsene bei <0,5 mg/l.

Der IgM – RF wurde ebenfalls turbidimetrisch mit Latex – Verstärkung an einem Routineanalysengerät (ROCHE INTEGRA) bestimmt. Der IgA – RF wurde nach Anleitung des Herstellers mit einem kommerziellen ELISA (Orgentec, Mainz/Deutschland) bestimmt. Als positiv galt ein >10 IU/ml.

Die statistische Auswertung der Tests erfolgte unter Zuhilfenahme der Programme Excel, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Version 12,0) und Medcalc (Version 6.10.001).

Kernstück für den Methodenvergleich waren die Sensivität und Spezifität der 3 durchgeführten ELISA – Tests, sowie des RF.

Die Sensitivität gibt die Zahl der falsch negativen Ereignisse geteilt durch die Gesamtzahl aller negativen Ereignisse wieder.

Die Spezifität berechnet sich als Quotient aus den falsch positiven Ereignissen und der Gesamtzahl aller positiven Ereignisse.

Von einem signifikanten Test spricht man, wenn $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeines

Beim Vergleich der Raucher in beiden Patientenkollektiven ergaben sich keine Unterschiede (21,5% in RA – Gruppe / 20,9% in der Nicht – RA – Gruppe). Deutliche Unterschiede zeigten sich jedoch im regelmäßigen Alkoholkonsum. Waren es in der RA – Gruppe 23,7% tranken in der Nicht – RA – Gruppe 40,1% regelmäßig Alkohol.

Anzahl	Diagnosen
24x	Fingerpolyarthrose
16x	undifferenzierte Arthrose
13x	Psoriasisarthritis, Fibromyalgie – Syndrom
12x	unklare Arthralgien
9x	Systemischer Lupus erythematoses
7x	undifferenzierte Kollagenose
6x	Morbus Bechterew, undifferenzierte Vaskulitis
4x	degeneratives Wirbelsäulensyndrom, Polyarthrose
3x	reaktive Arthritis, Sakroiliitis, Polymyalgia rheumatica, Oligoarthritis, Gonarthrose, Sjögren - Syndrom
2x	chronisches Schmerzsyndrom, CREST – Syndrom, Insertionstendopathie, Morbus Reynaud, Morbus Wegner, Panarteriitis nodosa, seronegative Spondylarthropathie, Spondylarthrose, unklare Schwellung, Lyme Arthritis
1x	Arthropathie, Abszess, Bandscheibenprotrusion, Coxarthrose, Eisenmangel, fibromuskuläre Dysplasie, Fibromyalgia rheumatica, Hämangiom, Herberden – Arthrose, idiopathische Akroosteolyse, Morbus Scheuermann, Morbus Still, Mischkollagenose, Osteolyse, Osteomyelitis, Perichondritis, Periarthropathia humeroscapularis, , Sklerodermie, Schmidt – Syndrom, Arteriitis temporalis Sharp – Syndrom, Tenosynovitis stenosans, Plasmozytom, unklares Fieber, unklare Schmerzen, Athritis bei Colitis ulcerosa

Tab.7: Diagnosen der Nicht – RA Patienten

In der Gruppe von Nicht – RA Patienten waren 3 positive anti – CCP Ergebnisse zu verzeichnen, die Patienten waren an SLE, Osteoarthritis und undifferenzierter Spondylarthropathie erkrankt. Sie waren in allen 3 CCP – Tests positiv, auch für IgM – RF, negativ jedoch für IgA – RF und 2 von ihnen waren auch negativ für anti – Citrullin – Ak.

4. 2. Antikörper – ELISA

ROC – Kurven dienen der Sensitivitäts – und Spezifitätsbeschreibung. Man versucht dabei, die Sensitivität und Spezifität eines Labortests bei den verschiedenen Entscheidungsgrenzen in einer Kurve darzustellen. Die Fläche unter der Kurve ist das Maß für die Leistung des Labortests.

Die ROC – Analyse zeigt die Spezifität und Sensitivität für die 3 anti – CCP – Tests und den IgM – RF – Konzentrationen.

Nach Auswertung der Testergebnisse zeigte der IgM - RF die höchste Sensitivität, gefolgt von anti – CCP – Ak, anti – Citrullin – Ak und den IgA – RF. Der Unterschied zwischen IgM – RF und den 3 anti – CCP – Ak ist jedoch nicht signifikant. Die Spezifität hingegen war für anti – CCP – Ak am höchsten, gefolgt von IgA – RF, anti – Citrullin – Ak und IgM – RF.

Die Sensitivität für die Diagnose der RA kann durch die Kombination von anti – CCP – Ak und IgM – RF auf 89,9% erhöht werden. Im Gegensatz dazu konnte zum Beispiel die Kombination von anti – Citrullin – Ak und IgA – RF keine Erhöhung der Sensitivität erreichen.

In 56,3% der 87 definitiv an RA Erkrankten waren alle Ak – Assays positiv. Bei 10 Patienten (11,5%) mit der klinischen Diagnose der RA war der IgM – RF und bei 31 Patienten (35,6%) der IgA – RF negativ. Bei 4 (40%) von diesen IgM – RF negativen Patienten waren alle 3 anti – CCP – Tests positiv.

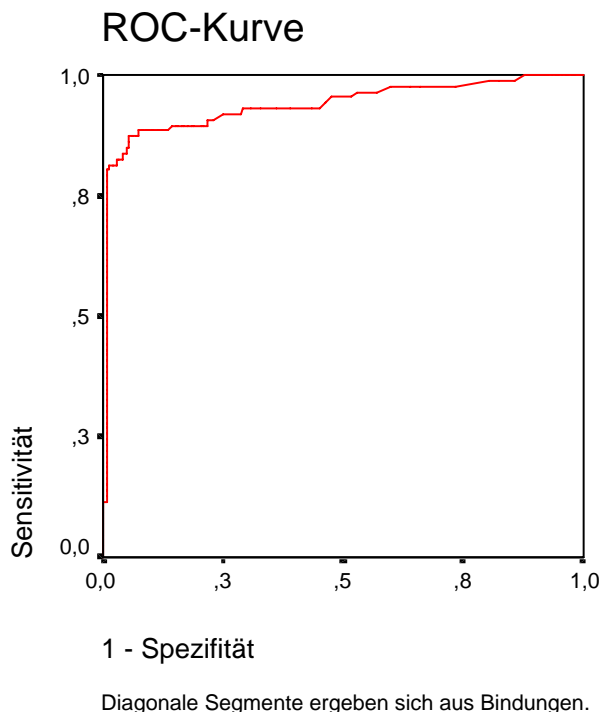


Abb. 7: ROC – Kurve für den CCP – Test von EUROIMM

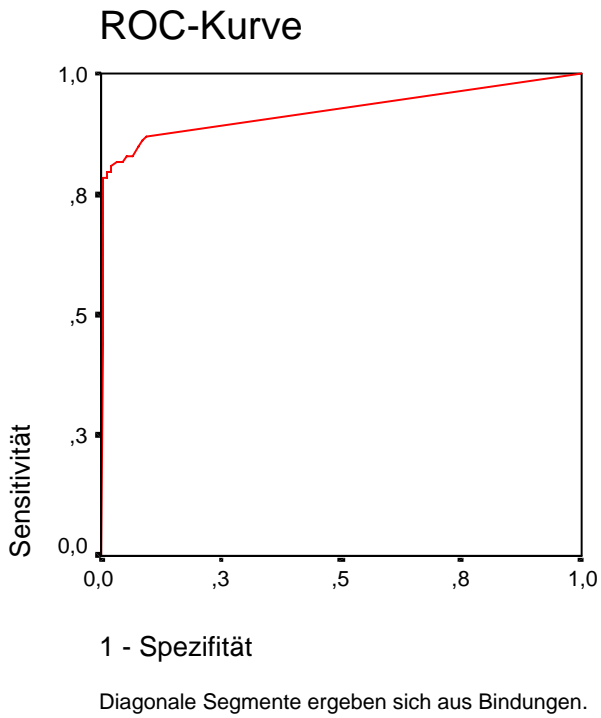


Abb.8: ROC – Kurve für den CCP – Test Generic Assays

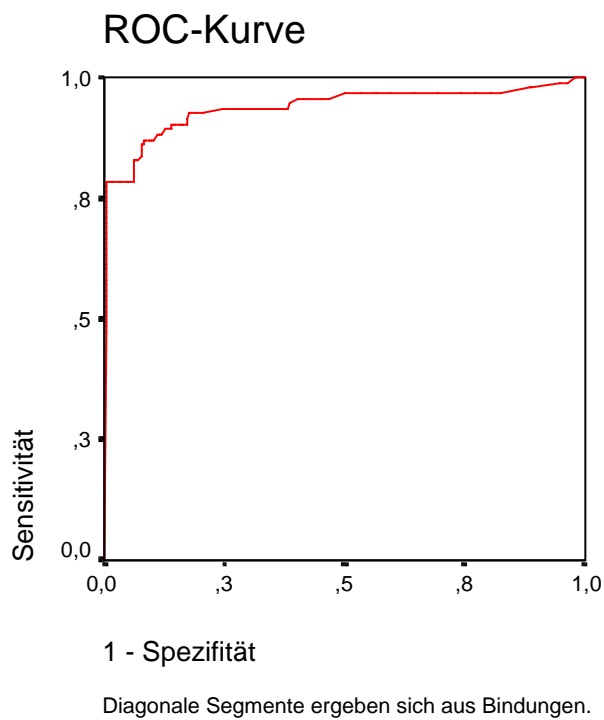


Abb. 9: ROC – Kurve für CCP – Test von INOVA

ROC-Kurve

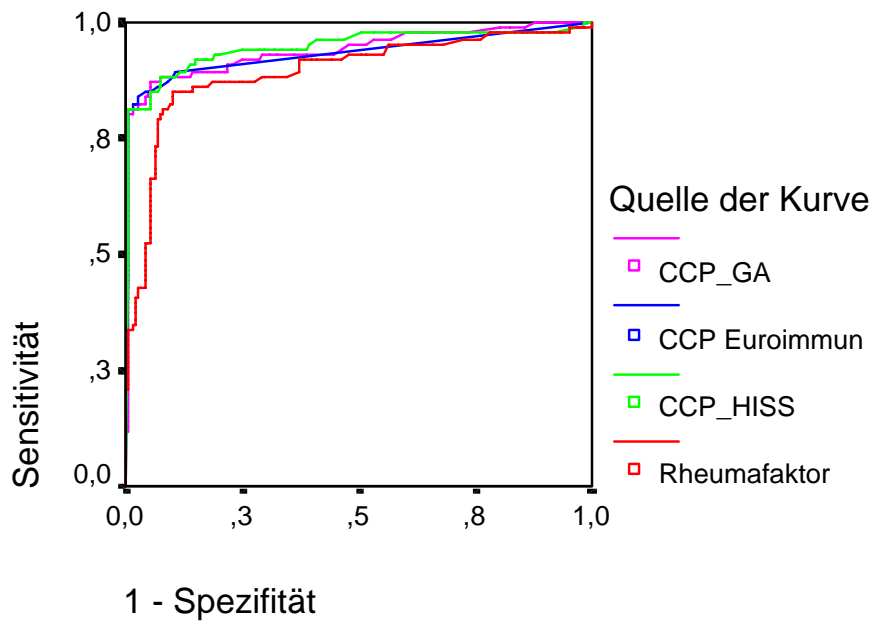


Abb. 10: Vergleich der ROC – Kurven der 3 CCP – Tests und des RF

Die Abb. 5 – 8 zeigen die verschiedenen ROC – Kurven anhand denen man die Signifikanz der einzelnen Tests durch den Vergleich der eingeschlossenen Fläche berechnen kann.

Fläche unter der Kurve

Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Standardfehler ^a	Asymptotische Signifikanz ^b	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
Rheumafaktor	,894	,025	,000	,846	,942
CCP_HISS	,945	,019	,000	,908	,982
CCP Euroimmun	,933	,021	,000	,892	,974
CCP_GA	,939	,019	,000	,902	,976

Bei der bzw. den Variable(n) für das Testergebnis: Rheumafaktor, CCP_HISS, CCP Euroimmun, CCP_GA liegt mindestens eine Bindung zwischen der positiven Ist-Zustandsgruppe und der negativen Ist-Zustandsgruppe vor. Die Statistiken sind möglicherweise verzerrt.

- a. Unter der nichtparametrischen Annahme
- b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

Tab.8: Flächenberechnung der einzelnen ROC – Kurven: Durch Auswertung der obenstehenden Tabelle ergeben sich folgende Werte: für den RF betrug die Fläche 0,894 von 1, für den CCP – INOVA 0,945, den CCP – EUROIMMUN 0,933 und für den CCP – GA 0,939.

Aus Tabelle 7 lässt sich erkennen, dass der CCP – INOVA die größte Fläche einnimmt, der RF das schlechteste Ergebnis liefert. Betrachtet man jedoch das asymptotische 95% Konfidenzintervall wird deutlich, dass sich die Werte der Unter – und Obergrenze aller 4 Tests überschneiden. Daraus lässt sich ableiten, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den RF und den CCP – Tests, aber auch zwischen den einzelnen CCP – Tests gibt. Dennoch kann man mit 95%iger Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die CCP – Tests den RF in der rheumatologischen Diagnostik überlegen sind, weil die Unter – und Obergrenze im asymptotischen 95% Konfidenzintervall deutlich höher liegen im Gegensatz zum RF, auch weil alle 3 CCP – Tests eine deutlich größere Fläche einschließen.

Test	Spezifität	Sensitivität
EUROIMMUN	98 %	81%
GENERIC ASSAYS	98%	81%
INOVA	97%	80%
IgM-RF	82%	86%
IgA-RF	94%	63%
Citrullin	92%	77%
CCP + IgM-RF	81%	90%

Tab.9: Vergleich der 3 CCP – Tests untereinander, mit dem IgM-RF, IgA-RF und Citrullin sowie der Kombination von CCP + IgM-RF hinsichtlich Spezifität und Sensitivität.

Zur RA – Gruppe wurden alle Patienten gezählt, die sicher an RA und wahrscheinlich an RA erkrankt waren. Trennt man jedoch diese beiden Gruppen noch auf und berechnet die Sensitivitäten für beide Gruppen einzeln, ergeben sich nachfolgende Werte. Bei den CCP – Tests von INOVA und GENERIC ASSAYS wurden die grenzwertigen Ergebnisse jeweils nicht berücksichtigt.

CCP - Test	Sicher RA	Wahrscheinlich RA
EUROIMMUN	87,3%	54,5%
GENERIC ASSAYS	89,4%	55,0%
INOVA	87,3%	50,0%
IgM-RF	85,6%	72,7%

Tab.10: Vergleich der Sensitivitäten der CCP – Tests und des RF bei Patienten die sicher an RA erkrankten, mit denen die wahrscheinlich von der RA betroffen waren

Die Patienten, die sich in der Gruppe der wahrscheinlich an RA erkrankten Personen befanden, müsste man zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal nachtesten, um eine definitive Diagnose zu stellen. Für die Patienten, die später eine manifeste RA ausbilden, hätte man somit Werte in einer sehr frühen Phase der Erkrankung und könnte damit Aussagen über die Sensitivität der 3 verschiedenen CCP – Tests in der Frühphase der RA machen.

Die Analyse der serologischen Parameter der Krankheitsaktivität wie BSG, CRP und Leukozytenzahlen zwischen anti – CCP – positiven und anti – CCP – negativen Patienten mit RA zeigte keine signifikanten Differenzen. Es war außerdem keine Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der anti – CCP – Titer erkennbar. Wir konnten eine geringe, aber signifikante Korrelation zwischen IgM – RF – Titer und anti – CCP - Ak – Titer finden ($r=0,2$; $P=0,03$). Es gab jedoch keine signifikante Korrelation zwischen anti – CCP, IgA – RF, IgM – RF oder anti – Citrullin – Ak – Tests mit BSG, CRP oder Leukozytenzahlen.

	Leukozyten in g/L	BSG in mm/h	CRP in mg/L
CCP negativ (n=9)	8,4	26,3	16,9
CCP positiv (n=78)	8,6	28,3	18,6
P	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 11: Unterschiede in den serologischen Parametern der RA-Patienten die CCP positiv oder CCP negativ waren

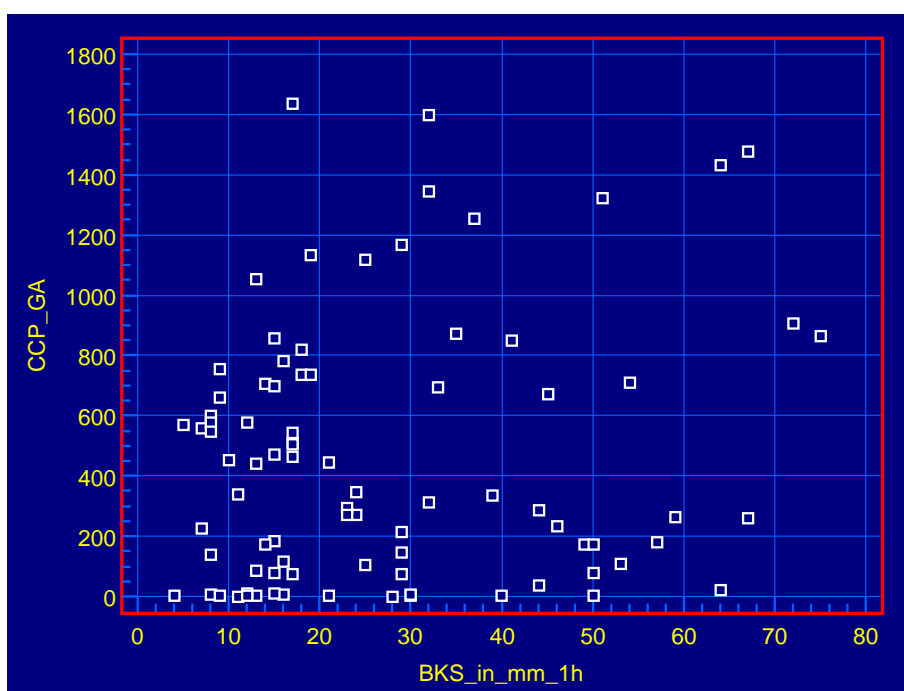


Abb. 11: Scatter – Diagramm für die Korrelation zwischen CCP – Test von Generic – ASSAYS und der BKS nach der ersten Stunde, $r = 0,16$; $P = 0,15$

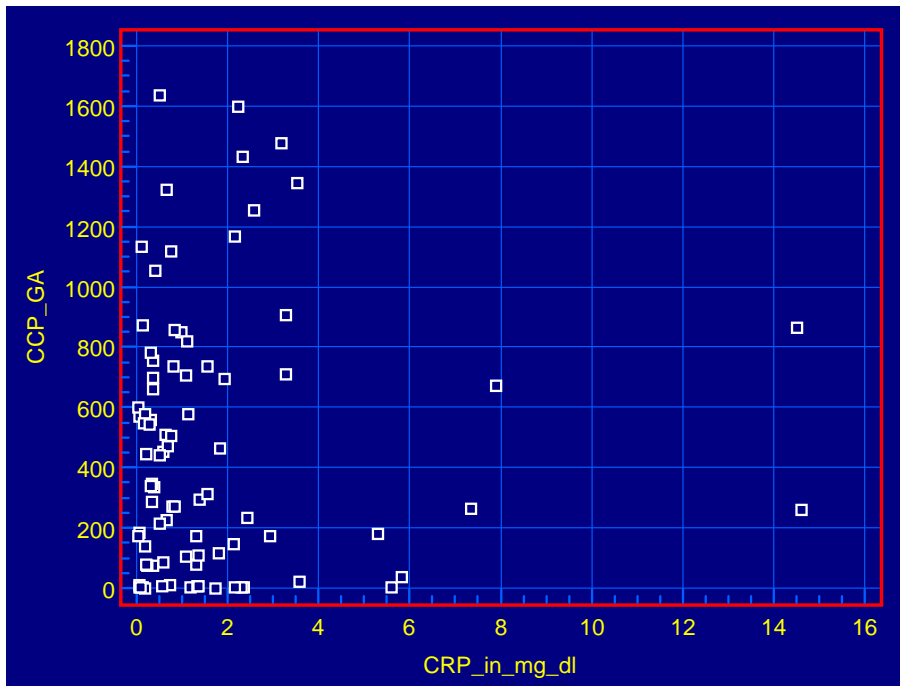


Abb. 12: Scatter – Diagramm für die Korrelation zwischen CCP – Test von GENERIC ASSAYS und den CRP – Werten, $r=0,04$; $P= 0,69$

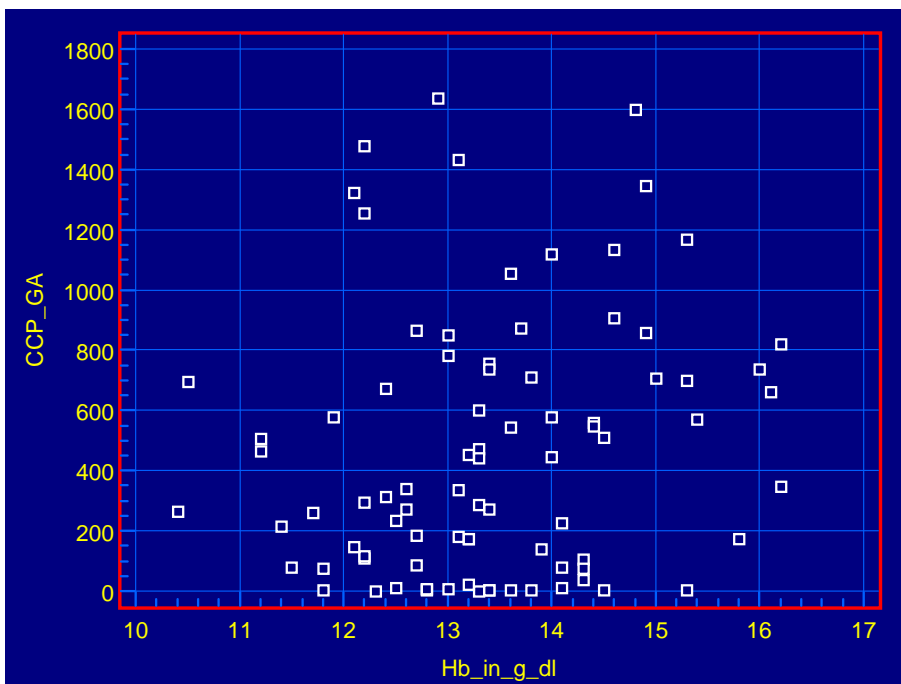


Abb. 13: Scatter – Diagramm für die Korrelation zwischen CCP – Werten von GENERIC – ASSAYS und dem Hämoglobinwerten, $r=0,18$; $P=0,1$

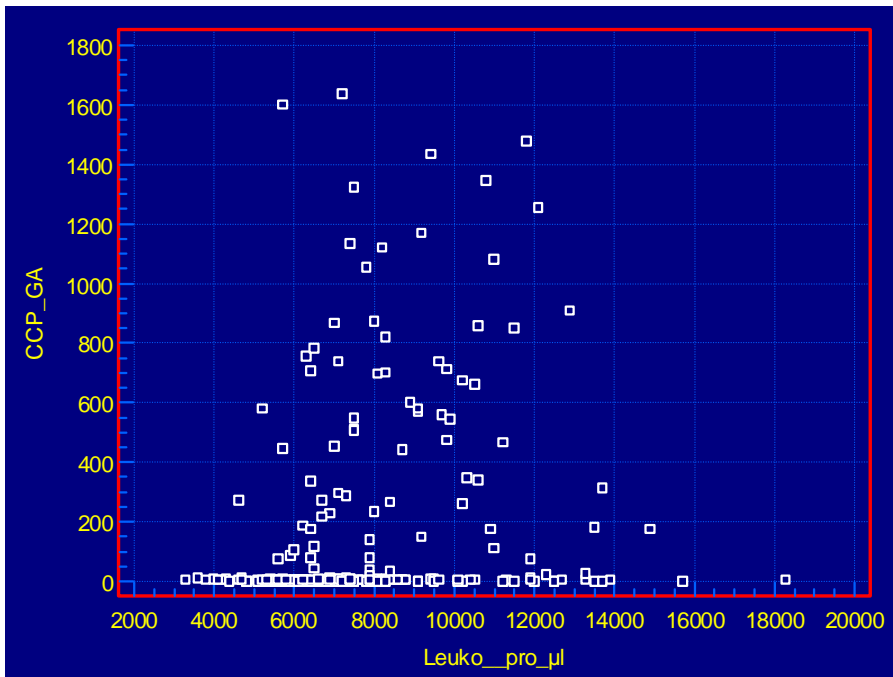


Abb.14 : Scatter Diagramm für die Korrelation CCP – Werten von GENERIC ASSAYS und den Leukozytenzahlen, $r=0,06$; $P=0,56$

Wie aus den Abb. 9 – 12 ersichtlich, korreliert der CCP – Test von GENERIC ASSAYS weder mit den Entzündungszeichen (BKS nach der ersten Stunde, CRP), noch mit den Hämoglobinwerten und Leukozytenwerten.

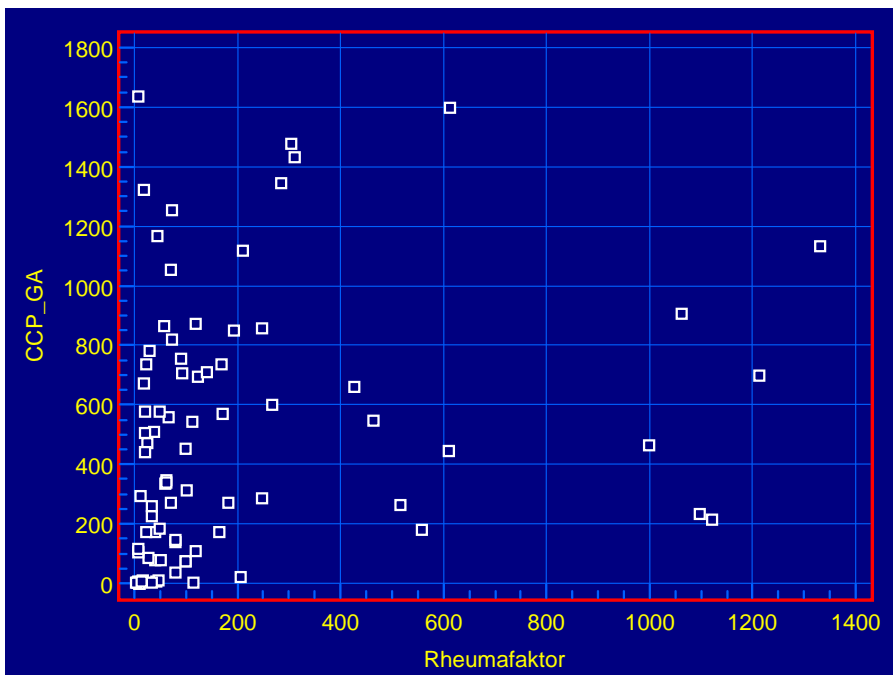


Abb. 15 : Scatter – Diagramm für die Korrelation zwischen CCP – Werten von GENERIC ASSAYS und dem Rheumafaktor

Der Anti – CCP – Titer korreliert nur schwach mit dem IgM - RF ($r = 0,2$, $P = 0,03$).

5. Diskussion

Die RA ist durch eine Synovialitis, die zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führen kann charakterisiert. Wodurch diese entzündlichen Prozesse ausgelöst werden und wie ihr genauer Mechanismus ist, bleibt noch ungeklärt. Aufgrund dieser Tatsache ist es auch schwierig, einen entsprechenden Screening – Test zu entwickeln, der schon die Frühveränderungen sicher erkennt. Der IgM - RF, bisher der sicherste Test, hat das Problem, dass er auch bei anderen Erkrankungen, sogar bei Gesunden erhöhte Werte zeigt. Der nun entwickelte anti – CCP – ELISA ist ein deutlicher Fortschritt in der RA – Diagnostik, denn er zeigt eine deutliche höhere Spezifität als der Rheumafaktor.

Deshalb ist es sehr bedeutungsvoll früh therapeutisch zu intervenieren, um die Krankheitsprogression zu stoppen und Gelenkschäden vorzubeugen. Dies kann aber nur geschehen, wenn die RA von anderen Formen der Arthritis v.a. im Frühstadium abgegrenzt werden kann. (13, 14) Zuerst zeigte Schellekens, dass die diagnostischen Möglichkeiten durch anti – CCP – Ak die Spezifität steigern, im Gegensatz zum IgM – RF. (15)

Diese Arbeit ist unseres Wissens die erste, welche 3 kommerziell erhältliche anti – CCP – Tests (CCP 2) der zweiten Generation und einen anti – Citrullin – Ak – Test mit IgM – RF und IgA – RF vergleicht. (16)

1964 wurde der APF von Nienhuis und Mandema (8) entdeckt. Er wird in keratohyalinen Granula von buccalen Mukosazellen nachgewiesen. APF wird bei 40 – 90% der Patienten mit manifester RA gefunden, aber nur bei 30% in der Frühphase. Die Präsenz von APF war assoziiert mit dem Auftreten von Knochenerosionen an den Händen. Er kann durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Der APF – Test ist jedoch schwierig durchzuführen, deshalb hat er sich nie richtig durchgesetzt. (17)

1979 hat Young (8) den Anti – Keratin - Ak beschrieben. Er benutzte dafür unfixierte Kryostatschnitte aus dem Oesophagus von Ratten. AKA wird genau wie APF durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Er wird in 37 – 59% der RA – Patienten gefunden, bevor die Diagnose klinisch gesichert werden konnte. AKA zeigte keine Korrelationen mit Gelenkdestruktionen, nur mit Entzündungsparametern wie CRP. Schellekens und Gibril – Neuhauser (15, 17) zeigten dann, dass beide AAK an ein spezifisches Substrat binden, modifiziertes Arginin = Citrullin. Die Aminosäure Citrullin kommt auch in Vimentin, Sa – Antigen, Fibrin, welches von Synovialzellen von RA – Patienten gebildet wird, vor. Es besteht aus (Pro-)filaggrin – Epitopen. Der Anti – Filaggrin – Ak geht bei der RA den klinischen Symptomen voraus, Titer und Präsenz hängen von der Krankheitsaktivität ab. Ein Nachteil des AFA – Tests besteht in der schwierigen Ag – Präparation.

Anti – CCP produzierende B-Zellen wurden in der Synovialflüssigkeit gefunden (18) Dies ist ein lokaler Prozeß, der durch ein citrulliniertes Substrat getriggert wird, welches im Synovium präsentiert wird. B- Lymphozyten von RA positiven Patienten aus der Synovialflüssigkeit bilden spontan Anti – CCP – Ak, periphere B – Lymphozyten aus Blut oder bei Anti – CCP negativen Patienten machen dies nicht. Dies legt eine von Ag ausgehende CCP – spezifische Reifung von B – Lymphozyten beim Entzündungsprozeß der RA nahe. Van Jaarsveld (19, 20) fand heraus, dass positive Resultate des anti – CCP – ELISA in der Frühphase der RA mit einem schweren radiologischen Schaden nach 3 Jahren Krankheit korrelierten, egal ob der RF positiv war oder nicht. Die anticitrullinierten Peptid – Ak können in einer sehr frühen Phase der Krankheit in Erscheinung treten, sie zählen zu den Frühkriterien der RA. Anti – CCP – Ak sind ein guter prognostischer Marker, denn sie erlauben eine Unterscheidung zwischen

erosiver und nicht erosiver RA. RA – Patienten, die anti – CCP positiv sind, entwickeln radiologisch nachgewiesen größere Gelenkschäden. (8-10, 12, 21-29)

Nach neueren Erkenntnissen von Vossenaar wird anti – CCP nicht nur in B – Zellen der Synovialflüssigkeit produziert, sondern auch im Knochenmark, aber nur bei CCP positiven Patienten. Bei RA – Patienten ist die IgG – anti – CCP Konzentration in der Synovialflüssigkeit höher als im Serum (7,5 fach). Er konnte eine klare Korrelation zwischen anti – CCP Konzentrationen in Synovialflüssigkeit und Serum nachweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass anti – CCP von peripheren Zellen nur gebildet werden kann, wenn eine Stimulation mit dem CD40 – Ligand und IL – 10 oder anti – CD3 aktivierten T – Zellen vorliegt. (18)

Der Prozess der Citrullinierung in Säugetierzellen scheint eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen. Citrullinierte Proteine sind essentieller Bestandteil der Antigen – Determinante, welche AAK bei der RA erkennen.

Dieser Umwandlung können sich viele Proteine unterziehen, so zum Beispiel das Protein Filaggrin (filament – aggregierendes Protein). Filaggrin wird in einer späten Stufe der Differenzierung von Epithelzellen produziert, zuerst als ein phosphoryliertes Precursor – Protein, das Profilaggrin. Dieses besteht aus 10 –12 homologen, aber nicht identischen Filaggrin – Wiederholungen.

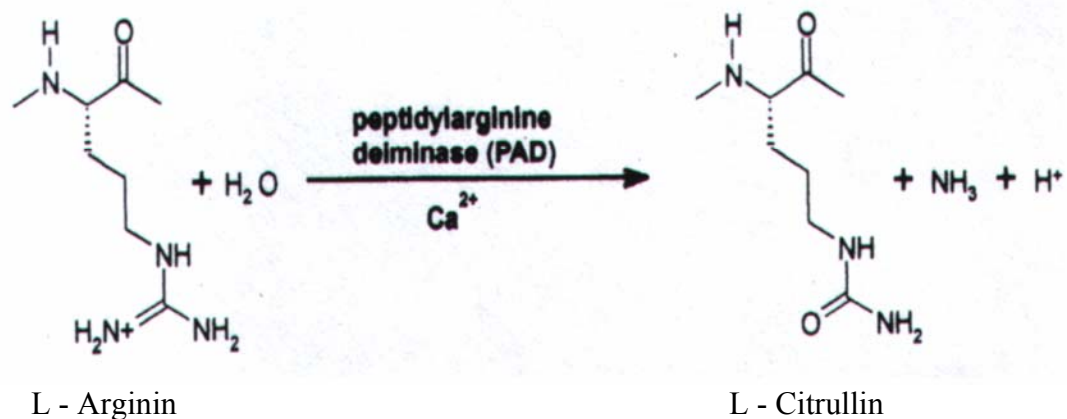


Abb. 16: Enzymatische Umwandlung von Arginin durch PAD zu Citrullin (Quelle: nach Arthritis Research, W. van Venrooij, 2000)

Citrullin gehört nicht zu den 20 genetisch codierten Aminosäuren, es kann nur durch posttranskriptionale Umwandlung aus Arginin entstehen. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, ist die Peptidylarginin – Deiminase (PAD). Es gibt 5 verschiedene Typen der PAD, welche verschiedene Lokalisationen aufweisen:

- Typ 1: Epidermis, Uterus
- Typ 2: verschiedene Gewebe
- Typ 3: Haarfollikel, Epidermis
- Typ 4: Knochenmark, Blutzellen (Eosinophile, Neutrophile)
- Typ 5: periphere Blutzellen

Von diesen 5 Typen spielt der Typ 4 bei der RA eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu den ersten drei Typen, welche im Zytosol lokalisiert sind, ist Typ 4 im Nukleoplasma vorhanden und unter normalen Bedingungen jeweils inaktiv. Für die Aktivierung der PAD ist Calcium nötig. Die normale Calcium – Konzentration im Zytosol und Nukleoplasma ist für eine PAD – Aktivierung jedoch zu niedrig. Im entzündeten Synovium gehen viele Zellen durch Apoptose und Nekrose unter. Während des Zelluntergangs nimmt jedoch die Membrandurchlässigkeit zu, so kann es zu einer Erhöhung der Calcium – Konzentration intrazellulär kommen, welche dann zur PAD – Aktivierung führt, weil hierbei durch oxidativen Stress PAD – Enzyme freigesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit der PAD – Aktivierung besteht darin, dass durch Membrandefekte der absterbenden Zelle die PAD nach extrazellulär gelangt und durch die dort höhere Calcium – Konzentration zur Citrullinierung von extrazellulären Proteinen wie Fibrin führt. Die PAD 4 kommt in hämatopoetischen Zellen vor, so dass es während der Entzündung der Synovia zu einer Aktivierung kommen kann. Oestrogene erhöhen die PAD – Aktivität, was vielleicht auch erklärt, warum deutlich mehr Frauen als Männer von der RA betroffen sind. (30, 31)

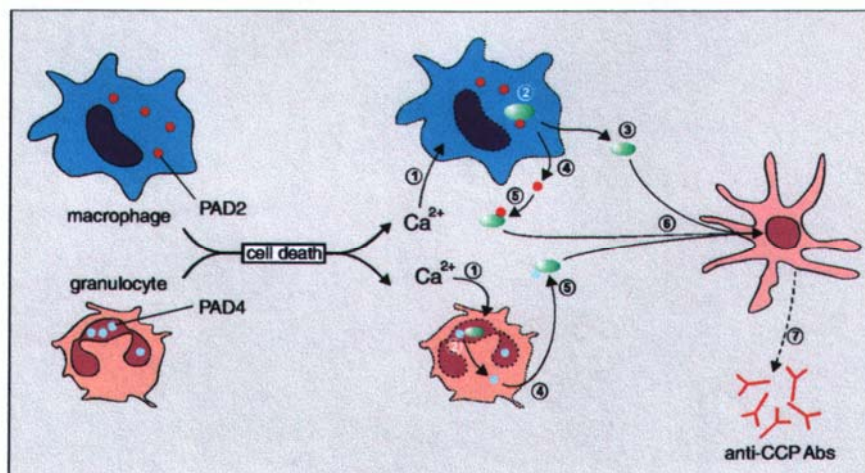


Abb. 17: Citrullinierung von Proteinen durch Zelltod
(Quelle: nach Immunol. Rev., E. Vossenaar)

Bei der Umwandlung von Arginin zu Citrullin kommt es zu einem geringen Verlust des Molekulargewichts von einem Dalton und zu einem Verlust der positiven Ladung. In Säugetierzellen sind einige citrullinierte Proteine bekannt, wie zum Beispiel Filaggrin, Keratin, Vimentin, Fibrinogen oder Fibrin. Durch die während der Apoptose citrullinierten Peptide kann es wie zum Beispiel bei Vimentin zu morphologischen Veränderungen der absterbenden Zelle kommen. Citrullinierte Proteinfragmente werden dem Immunsystem präsentiert und es kommt zu einer spezifischen Immunantwort. Die daraus resultierenden

AAK erkennen die entsprechenden AAG und solche opsonierten Zellen rufen eine proinflammatorische Antwort hervor.

Bei den genetischen Faktoren spielt HLA DR4 (HLA BRB1*0401) eine wichtige Rolle. Peptide, die Citrullin enthalten, jedoch nicht Arginin können von *0401 Major – Histokompatibilitätskomplex erkannt werden. Diese Citrullin spezifische Interaktion ist die Basis der Citrullin spezifischen Immunantwort.

Die wahrscheinlichste Hypothese ist, dass eine kleine Entzündung durch Krankheitserreger zum Zelltod führt und dadurch die Citrullinierung von Proteinen bewirkt. Diese citrullinierten Proteine werden als Ag präsentiert und führen zur Aktivierung von T – Zellen. Die eigentliche Krankheit manifestiert sich als systemische Erkrankung erst Jahre später.

Citrullinierte Proteine sind nicht spezifisch für die RA, auch bei akuter oder chronischer Arthritis kommt es zum Beispiel zur Citrullinierung von Proteinen wie Fibrin. Die Ak – Antwort ist jedoch spezifisch für die RA. (15, 24, 29-33)

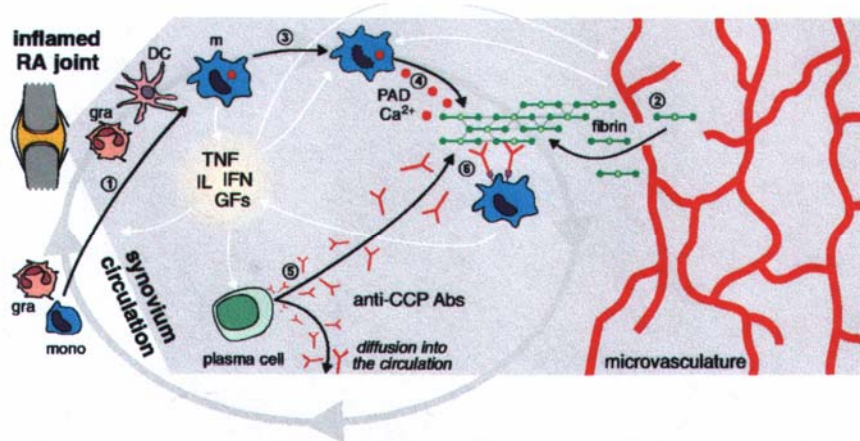


Abb.18: Mögliche Rolle von Anti-CCP-Ak bei der Pathophysiologie der RA (Quelle: nach Immunol. Rev., E. Vossenaar): Inflammatorische Zellinfiltrate und das entzündete RA – Synovium werden aktiviert und produzieren Entzündungsmediatoren (TNF, Interferon). Die kleinsten Gefäße des Synoviums werden hypoxisch und es kommt zu Mikroinfarkten. Fibrinogen kann dadurch ins Synovium gelangen und sich zu Plaques von extrazellulärem Fibrin zusammenlagern. Durch die Mikroinfarkte können des Weiteren freie Radikale entstehen, dies wiederum kann den Zelltod zur Folge haben.

So können nun inaktive PAD – Enzyme die Zelle verlassen und durch die extrazellulär hohen Konzentrationen von Calcium aktiviert werden, welches die Citrullinierung von extrazellulären Proteinen zur Folge hat.

Anti – CCP – Ak werden im Synovium produziert und können nun die citrullinierten Proteine binden. Die so gebildeten Immunkomplexe können von Entzündungszellen über den Fc – Rezeptor erkannt werden und wiederum Zellen aktivieren. So aktivierte Zellen produzieren Zytokine im Synovium. Dieser Kreisprozeß unterhält somit ständig die Entzündung.

Durch die Deimination kann in Proteinen die Sekundärstruktur, Protein – Protein – Interaktionen verändert werden, es kann zum Verlust von ionischen Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen kommen, was im Endeffekt den Verlust der biologischen Funktion bedeuten kann. (34)

Verschiedene Studien, die sich auch mit der Sensivität und Spezifität beschäftigt haben, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Gruppe	Sensitivität	Spezifität
Van Boekel et al. 2001	68 – 75%	98%
Schellekens et al. 2000	48%	96%
Goldbach – Mansky et al. 2000	41%	91%
Lee et al. 2003	66%	90,4%
Bas et al 2002	68%	96%
Alexander Greiner CCP - INOVA	80%	97%
CCP – EUROIMMUN	81%	98 %
CCP – GA	81%	98%

Tab.12: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des CCP in verschiedenen Studien

In den oben erwähnten Studien ergeben sich Sensitivitäten von 41% - 75% und Spezifitäten von jeweils über 90%. Vergleicht man diese Werte mit der hier vorliegenden Arbeit, erkennt man höhere Sensitivitäten, die im Bereich von 80% - 81% liegen und Spezifitäten oberhalb von 97%.

Diese Unterschiede können verschiedene Gründe haben. Zum Einem wurden die niedrigsten Werte für die Sensitivitäten in Studien gefunden, die schon 3 oder 4 Jahre zurück liegen, also noch in der Anfangsphase der CCP – Tests, natürlich ist es auch abhängig, ob die erste Generation (CCP 1) oder die zweite Generation (CCP 2) des Tests verwendet wurde. Bei direkten Vergleichen zeigte CCP 2 eine höhere Sensitivität. Es könnte somit ein Unterschied in der Weiterentwicklung und damit der Qualität der CCP – Tests vorliegen. Ein anderer wichtiger Punkt ist die Art der Diagnosestellung, das heißt zählen auch die Patienten zur RA – Gruppe, die wahrscheinlich an RA erkrankt sind oder nicht? Außerdem hängt es natürlich von den Patientenpopulationen und Studienendpunkten ab. In dieser Arbeit wurden zur RA – Gruppe all jene gerechnet, bei denen die Diagnose RA sicher nach den ACR - Kriterien gestellt werden konnte, aber auch solche, die wahrscheinlich an RA erkrankt waren.

Eines wird jedoch aus allen Studien ersichtlich, dass der CCP – Test hochspezifisch für die RA ist.

Im Rahmen der Labordiagnostik wurden schon viele AAK auf ihre Sensitivität und Spezifität getestet. Es gibt wenige Ak, die hilfreich sind, eine frühe Diagnose und Prognose zu stellen. Zu ihnen gehören der IgM - RF (Nachteil, kommt auch bei anderen AIK, Gesunden vor), anti – Sa, anti – AFA, anti – BIP und anti – CCP. Vielversprechend dabei waren die Ergebnisse des anti – AFA – Tests, jedoch besteht hier die Schwierigkeit in der Ag – Präparation. Hierin zeigt sich nun der Vorteil des anti – CCP – ELISA, welcher ziemlich einfach durchzuführen ist und im Vergleich zu den oben erwähnten Tests auch die höchsten Werte in Sensitivität und Spezifität besitzt.

In dieser Arbeit wurden auch die 3 zurzeit kommerziell erhältlichen anti – CCP – ELISA untereinander verglichen. Es ergaben sich dabei fast identische Werte in Bezug auf Sensitivität und Spezifität. Im Vergleich zum IgM - RF ergaben sich zwar keine signifikanten Unterschiede, dennoch ergaben sich eine höhere Spezifität, aber eine leicht erniedrigte Sensitivität der anti – CCP - ELISA. Vergleicht man jetzt die Sensitivitäten der Patienten, bei denen die Diagnose anhand der ACR – Kriterien gestellt wurde, zeigten sich fast identische Werte bei IgM – RF und den 3 Anti – CCP – Tests. Bei den Patienten, die wahrscheinlich in

der Frühphase diagnostiziert wurden, zeigte sich der IgM - RF mit 72,7% den Anti - CCP - Tests deutlich überlegen. (16)

Bei den verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten aller Ak (anti - CCP - Ak, Anti - Citrullin - Ak, IgM - RF, IgA - RF), zeigte nur die Kombination von IgM - RF mit anti - CCP - Ak eine erhöhte Sensitivität (90%). Im Gegensatz zu anderen Studien (15, 35, 36) konnten wir einen zusätzlichen Effekt in der Diagnostik der RA bei Kombination von anti - CCP - Ak mit IgM - RF finden.

In 40% aller seronegativen Patienten (IgM - RF) RA - Patienten konnten anti - CCP - Ak nachgewiesen werden. Interessant war auch zu sehen, dass alle anti - CCP - Ak positiven Patienten artikuläre Manifestationen der Krankheit hatten.

Rantapää - Daalquist et al. (25) zeigten, dass anti - CCP - Ak und IgM - RF eine hohe Vorhersagekraft hatten, mit anti - CCP - Ak jedoch die höchste bestand. Bas et al (22) zeigte eine Assoziation zwischen IgA - RF und anti - CCP - Ak mit klinischen Zeichen der Krankheitsaktivität. Die hohe Prävalenz von anti - CCP - Ak bei RA - Patienten mit starker Krankheitsaktivität und gesicherten radiologischen Veränderungen, auch bei IgM - RF negativen Patienten zeigt, wie sinnvoll die Kombination von anti - CCP - Ak mit IgM - RF in der Frühdiagnostik ist. Vencovsky et al (37) zeigten, dass Patienten mit erosiver RA einen höheren Anteil positiver anti - CCP - Ak als IgM - RF hatten.

Ein spezielles Interesse in unserer Arbeit galt der Korrelation von anti - CCP - Ak mit serologischen Markern der Krankheitsaktivität wie BSG, CRP und Leukozytenzahlen. BSG und CRP sind mit der Anzahl der geschwollenen Gelenke und der Schmerzhaftigkeit klinische Kriterien der Krankheitsaktivität und des ACR. Wir konnten keinen Zusammenhang zwischen Krankheitsdauer oder Patientenalter mit anti - CCP - Ak finden. Beim Vergleich der Leukozyten-, BKS-, CRP- und Hämoglobinwerte zwischen CCP positiven an RA erkrankten und CCP negativen an RA erkrankten Patienten ergaben sich jeweils keine signifikanten Unterschiede. Das zeigt, obwohl die CCP positiven Personen eigentlich einen schweren erosiven Verlauf haben sollen, keine wesentlichen Unterschiede, v. a. bei den Entzündungsparametern (BKS, CRP). Gründe hierfür können natürlich zum Einem in einer guten Therapie oder aber auch in den unterschiedlichen Phasen der Krankheit liegen, je nach dem, ob der Patient gerade einen schweren Krankheitsschub durchmacht oder nicht. (16)

Diese Ergebnisse unterstützen die Anregung, dass der anti - CCP - Test im Rahmen der RA - Routinediagnostik anstelle des IgM - RF verwendet werden soll oder aber anti - CCP + RF zusammen, um die Sensitivität nochmals zu verbessern.

Die hohe Spezifität von > 95% ist ein großer Vorteil des anti - CCP im Gegensatz zum Beispiel zum IgM - RF. Dies zeigt also, dass anti - CCP fast nur bei an RA erkrankten Personen vorkommt. Die Sensitivität ist natürlich von verschiedenen Größen abhängig, zum Beispiel ob die Krankheit sich noch in einem Frühstadium befindet oder ob schon starke krankheitsbedingte Veränderungen sichtbar sind. Da der genaue Erkrankungsmechanismus der RA noch nicht geklärt ist, ist es auch schwierig, einen Test zu entwickeln, der eine genauso hohe Sensitivität wie Spezifität hat. Aber im Vergleich zu anderen AAK bei der RA hat das anti - CCP die mit Abstand höchsten Werte für die Spezifität.

Im Endeffekt ist der IgM - RF wichtig als Screening Marker in der Diagnostik der RA. Aber die zweite Generation der anti - CCP - Ak hat eine vergleichsweise hohe Sensitivität, jedoch eine höhere Spezifität. Um die Diagnose der RA in einer präselektionierten Patientengruppe zu stellen, sollte der hochspezifische anti - CCP - Ak - Test als Erster durchgeführt werden.

Der Gebrauch von IgM – RF und IgA – RF kann bei anti – CCP – negativen Patienten eingesetzt werden. Bei Patienten, die IgM – RF negativ sind, ist die Bestimmung von anti – CCP – Ak sehr nützlich, um die Diagnose RA zu sichern.

Anti – CCP ist der beste diagnostische Marker, er erlaubt eine Früherkennung der Krankheit und somit eine gezielte antirheumatische Therapie. Dies ist gerade für Patienten wichtig, die noch keine radiologischen Veränderungen aufweisen.

6. Zusammenfassung

Die RA ist die häufigste chronisch entzündliche Systemerkrankung. Ihre Ursache ist nach wie vor unbekannt. Es gibt viele Hypothesen, zum Beispiel könnte es sich um eine Reaktion auf ein infektiöses Agens handeln. Eine Autoimmunpathogenese gilt als gesichert, doch sind die einzelnen Reaktionsabläufe zum Teil noch hypothetisch. Typisch ist eine Zerstörung des Knorpels, was zu einer Hypertrophie der Synovialis führt und somit das Gelenk zerstört.

In der Labordiagnostik war bisher der RF (gehört auch zu den 7 ACR – Kriterien) die sicherste Methode eines RA – Nachweises. Durch die Entwicklung des anti – CCP – ELISA steht nun ein spezifischerer Test zur Verfügung.

Bei der Korrelation der CCP – Werte mit den Entzündungsparametern wie BKS, CRP oder mit dem IgM – RF, Hämoglobin und Leukozyten zeigte sich nur, dass CCP schwach mit dem IgM - RF korreliert. Es ergab sich kein Hinweis, dass CCP – Titer als Aktivitätsparameter genutzt werden könnten.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Seren von 333 Patienten der Rheumaambulanz der LMU untersucht. Es ergaben sich zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen dem RF und den 3 anti – CCP – ELISA, dennoch zeigten alle 3 anti – CCP – ELISA eine höhere Spezifität, jedoch geringere Sensitivitäten im Gegensatz zum RF.

7. Literaturverzeichnis

1. Siegenthaler W. Klinische Pathophysiologie, 2004.
2. Mutschler E. Arzneimittelwirkungen. Frankfurt/Main, 2001.
3. Karow T. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 2003.
4. Forth H, Hentschler W. Allgemeine und spezifische Pharmakologie und Toxikologie, 1998.
5. Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP. Tumor Necrosis Faktor a Blockade Reduces the Synovial Cell Infiltrate Early After Initiation of Treatment, but Apparently Not by Induction of Apoptosis in Synovial Tissue. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48:2155-2162.
6. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, L.W. M, Weisman MH, Birbara CA, et al. Adalimumab, a Fully Human Anti-Tumor Necrosis Faktor a Monoclonal Antibody, for the Treatment of Rheumatoid Arthritis in Patients Taking Concomitant Methotrexate. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48:35-45.
7. Fauci A. Innere Medizin, 1999.
8. van Boekel M, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, Van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 2002;4:87-93.
9. Hitchon C, El-Gablawa HS. Immune features of seronegative and seropositive arthritis in early synovitis studies. *Current Opinion in Rheumatology* 2002;14:348-353.
10. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, et al. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res.* 2000;2:236-243.
11. Bläß S, Union A, Raymackers J, Schumann F, Ungethüm U, Müller-Steinbach S, et al. The Stress Protein BiP Is Overexpressed and Is a Major B and T Cell Target in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2001;44:761-771.
12. Steiner G, Smolen JS. Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance. *Arthritis Res.* 2002;4:1-5.
13. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes, Schellekens GA, et al. Early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Res. Clin. Rheumatology* 2005;19:55-72.
14. Lindqvist E, Eberhardt K, Bendtzen K, Heinegard D, Saxne T. Prognostic laboratory markers of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004.
15. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte L, Van Venrooij WJ. Citrulline is an Essential Constituent of Antigenic Determinants Recognized by Rheumatoid Arthritis-specific Autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 1998;101:273-281.
16. Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:295-303.
17. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JMW, Breedveld FC, et al. The Diagnostic Properties of Rheumatoid Arthritis Antibodies Recognizing A Cyclic Citrullinated Peptide. *Arthritis & Rheumatism* 2000;43:155-163.
18. Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC, Raats JM, van Venrooij WJ, Tak PP. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2004;50:3485-94.
19. van Jaarsveld CH, ter Borg EJ, Jacobs JW, Schellekens GA, Gmelig-Meyling FH, van Booma-Frankfort C, et al. The prognostic value of the antiperinuclear factor, anti-citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:689-97.

20. van Jaarsveld CH, Jacobs JW, van der Veen MJ, Blaauw AA, Kruize AA, Hofman DM, et al. Aggressive treatment in early rheumatoid arthritis: a randomised controlled trial. On behalf of the Rheumatic Research Foundation Utrecht, The Netherlands. *Ann Rheum Dis* 2000;59:468-77.
21. Baeten D, Peene I, Union A, Meheus L, Sebbag M, Serre G, et al. Specific Presence of Intracellular Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis Synovium. *Arthritis & Rheumatism* 2001;44:2255-2262.
22. Bas S, Perenger TV, Seitz M, Tiercy JM. Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-keratin antibodies and IgM rheumatoid factors. *Rheumatology* 2002;41:809-814.
23. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Gibrat-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, et al. The Major Synovial Targets of the Rheumatoid Arthritis-Specific Antifilaggrin Autoantibodies Are Deiminated Forms of α - and β -Chains of Fibrin. *The Journal of Immunology* 2001;166:4177-4184.
24. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis* 2003;62:120-126.
25. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48:2741-2749.
26. Saraux A, Berthelot J, Devauchelle V, Bendaoud B, Chales B, Le Henaff C, et al. Value of Antibodies to Citrulline-Containing Peptides for Diagnosing Early Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology* 2003;30:2535-2539.
27. Union A, Meheus L, Humbel RL, Caonrad K, Steiner G, Moereels H, et al. Identification of citrullinated Rheumatoid Arthritis-Specific Epitopes in Natural Filaggrin Relevant for Antifilaggrin Antibody Detection by Line Immunoassay. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46:1185-1195.
28. Vittecoq O, Incaugarat B, Jouen-Beades F. Autoantibodies recognizing citrullinated rat filaggrin in an ELISA using citrullinated and non-citrullinated recombinant proteins as antigens are highly diagnostic for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunology* 2004;135:173-180.
29. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Palmblad K, WJ vV. Anti-CCP antibodies, a highly specific marker for (early) rheumatoid arthritis. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2004;4:239-262.
30. Vossenaar ER, Nienhuis S, Helsen M, Van Venrooij WJ. Citrullination of Synovial Proteins in Murine Models of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2003;48:2489-2500.
31. Van Venrooij WJ, Pruijn G. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:249-251.
32. Utz PJ, Gensler T, Anderson P. Death autoantigen modifications, and tolerance. *Arthritis Res.* 2000;2:101-114.
33. Yamada R, Suzuki A, Chang X, Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase type 4: identification of a rheumatoid arthritis-susceptible gene. *TRENDS in Molecular Medicine* 2003;9:503-508.
34. Hida S, Miura NN, Adachi Y, Ohno N. Influence of arginine deimination on antigenicity of fibrinogen. *Journal of Autoimmunity* 2004;5.
35. Vallbracht I, Rieber J, Oppermann M. Diagnostic and clinical value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies compared with rheumatoid factor isotypes in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1079-1084.

36. Lee DM, Schur PH. Clinical Utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003;62:870-874.
37. Vencovsky J, Machacek S, Sedova L. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:427-430.
38. Greiner A, Kellner H, Plischke H, Gruber R. Anti cyclic-citrullinated-peptide (CCP) antibody titers are not correlated with serologic parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Dis* 2004;63, Suppl. 1:189 (Abstract).
39. Greiner A, Kellner H, Plischke H, Schattenkirchner M, Gruber R. Methodenvergleich von drei verschiedenen Immunoassays zum Nachweis von Anti-Citrullin-Antikörpern in der rheumatologischen Diagnostik. *Zeitschr Rheumatol* 2003;62:PD0-40 (Abstract).
40. Greiner A, Plischke H, Gruber R. Association of anti-cyclic-citrullinated-peptide (CCP) antibodies with serologic parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Rev* 2004;3:S 79 (Abstract).

eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

16. Greiner A, Plischke H, Kellner H, Gruber R. Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti-citrullin antibodies, and IgM and IgA rheumatoid factors with serological parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1050:295-303.

Abstracts:

38. Greiner A, Kellner H, Plischke H, Gruber R. Anti cyclic-citrullinated-peptide (CCP) antibody titers are not correlated with serologic parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheumatic Dis* 2004;63, Suppl. 1:189 (Abstract).
39. Greiner A, Kellner H, Plischke H, Schattenkirchner M, Gruber R. Methodenvergleich von drei verschiedenen Immunoassays zum Nachweis von Anti-Citrullin-Antikörpern in der rheumatologischen Diagnostik. *Zeitschr Rheumatol* 2003;62:PD0-40 (Abstract).
40. Greiner A, Plischke H, Gruber R. Association of anti-cyclic-citrullinated-peptide (CCP) antibodies with serologic parameters of disease activity in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Rev* 2004;3:S 79 (Abstract).

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Schlöndorff danke ich herzlich für die Möglichkeit, an seiner Klinik die Arbeit durchzuführen.

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn PD Dr. Rudolf Gruber für die außerordentlich wertvolle Beratung und Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Rheumatologielabors M. Siwy, B. Danne, J. Partzsch gilt mein herzlicher Dank für die tatkräftige Mithilfe bei der Durchführung der zahlreichen Tests.

9. Lebenslauf

Name: **Alexander Greiner**

Geburtsort: Sonneberg

Familie: Eltern Axel und Dr. Annelore Greiner
Bruder Christian, 20 Jahre, Medizinstudent

Grund- und Realschule: 1984-1992 Dr. Georg Klaus Oberschule

Gymnasium: 1992-1996 1. Staatliches Gymnasium Sonneberg, Abitur 1996

Zivildienst: 1996-1997 bei der Stadt Steinach

Medizinstudium: 1997-2005 an der LMU München
PJ im Klinikum Großhadern (Innere Medizin, Chirurgie,
Orthopädie)

Dissertation: 2002 – 2005

Assistenzarzt: seit 22.4. 2005 Assistenzarzt der Inneren Medizin im
Krankenhaus Sonneberg