

Aus dem Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

UNTERSUCHUNGEN ZUM IMMUNPROFIL DER AUTOIMMUNHEPATITIS

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JANINA GEHL
aus Neumünster

Kiel, 2010

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Tiemann, Institut für Hämatopathologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Mundhenke, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2010

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 26.11.2010

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Historie	1
1.2	Pathogenese	5
1.3	Diagnostik	7
1.3.1	Original Score System.....	7
1.3.2	Simplifiziertes Score-System	8
1.3.3	Problem der Scoring Systeme und Fazit	11
1.3.4	Histologische Betrachtung der chronischen Hepatitis	12
1.3.5	Grading und Staging.....	12
1.3.6	Histologische Zeichen der AIH.....	15
1.3.7	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.2	Immunhistochemie	21
2.2.1	Herstellung der Schnittpräparate	21
2.2.2	EnVision™ Methode.....	21
2.2.3	Histofine® Methode.....	23
2.2.4	Antikörper	26
2.2.5	Auswertung	27
3	Ergebnisse	30
3.1	CD 8	30
3.2	CD 20	33
3.3	CD 138	35
3.4	Korrelation von Simplifiziertem Score System mit Staging und Grading.....	36
3.5	Autoantikörper im Vergleich zu Staging und Grading	37
3.6	Simplifiziertes Score System im Vergleich zu Transaminasen	38
3.7	Simplifiziertes Score System im Vergleich mit Originalem.....	39
4	Diskussion	42
5	Ausblick	47
6	Anhang	49
7	Literatur.....	58

1 Einleitung

Die Autoimmunhepatitis (AIH) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung unbekannter Ätiologie. Sie wurde um 1950 zuerst von Waldenström beschrieben und später von Kunkel et al. aufgegriffen. Zu den typischen klinischen Befunden zählen die Hepatomegalie und Splenomegalie sowie Zeichen der chronischen Lebererkrankung wie Palmarerytheme und sog. Spider naevi. Häufig ist die AIH mit anderen Autoimmunerkrankungen assoziiert [1].

Eine Diagnosestellung erfolgt in Zusammenschau von charakteristischen klinischen und serologischen Merkmalen wie der Bevorzugung des weiblichen Geschlechtes, die Erhöhung der γ -Globuline (besonders der Immunglobuline IgG), Assoziationen mit den genetischen Markern HLADR-3, HLADR-4 und HLA-B8, den Nachweis von verschiedenen Autoantikörpern (Antikörper gegen Kerne, Aktin, glatte Muskulatur, Leber-/Nierenmikrosomen [LKM], lösliches Leberantigen [SLA] und Leber/Pankreasantigen [LP]) sowie das Ansprechen auf eine immunsuppressive Therapie [2].

Im Rahmen der Diagnostik wird eine Leberstanzbiopsie durchgeführt, deren Beurteilung und Interpretation zur Entscheidungsfindung beiträgt. Dabei wird neben dem Entzündungs- und Fibrosegrad die Art der Nekrosen, die Lymphozyten- sowie die Plasmazellinfiltration sowie ihre Lokalisation und ihr Ausmaß beurteilt. Jedoch ist auch unter Berücksichtigung aller Parameter oft eine sichere histologische Diagnose nicht möglich.

Im Folgenden soll mit einem Überblick zur Autoimmunhepatitis begonnen werden, dem eine kurze Historie vorangestellt wird.

1.1 Historie

Bevor der Name der autoimmunen Hepatitis sich in die heutige Nomenklatur eingebürgert hatte, waren immer wieder neue Bezeichnungen für diese Lebererkrankung aufgetaucht. Diese Benennungen ergaben sich an neuen Befunden und Erkenntnissen. Zu Folgenden wird ein Überblick über die Geschichte der AIH anhand der Entwicklung ihrer Terminologie gegeben.

Zeitlicher Ablauf

Von 1930 bis 1940 wurden einige charakteristische Befunde und Symptome der AIH wie zum Beispiel die Hyperproteinämie und der Ikterus in Assoziation mit einer idiopathischen Leberentzündung beschrieben, aber nicht in Verbindung mit einem autoimmunen Geschehen gebracht. Dies geschah erst in den 50iger Jahren des 20. Jahrhunderts als Waldenström seine Ergebnisse zusammentrug. Er brachte die Zirrhose, die Plasmazell-Infiltration der Leber und die Hypergammaglobulinämie bei jungen Frauen in einen Zusammenhang. Auf dieser Grundlage forschten Kunkel et al. und andere Autoren weiter. Die Erkenntnis, dass es sich um eine immunologische Erkrankung handeln könnte, wurde auf klinische und labortechnische Ergebnisse nach Behandlung mit Kortikosteroiden zurückgeführt [1]. Seit 1953 war der Name der aktiven chronischen Hepatitis gebräuchlich. Das "chronisch" stand für den nicht nachweisbaren Herd des Entzündungsprozesses und das „aktive“ für den klinischen Schweregrad der Krankheit [3].

Mackey et al. entdeckten 1955 das so genannte Lupus Erythematodes Zellphänomen bei Patienten mit einer chronisch aktiven Hepatitis. Hierdurch wurde der Name der lupoiden Hepatitis geprägt. Weitere serologische Befunde, wie zum Beispiel die ausgeprägte lymphozytäre Infiltration der Leber, welche hinweisend auf eine intensive Immunantwort ist, unterstützten die Möglichkeit einer autoimmunologischen Natur der Erkrankung [1].

Mit Entdeckung von Autoantikörpern, beispielsweise gegen glatte Muskulatur oder gegen Zellkerne, und ihrer Verbindung zu der damals noch als lupoiden Hepatitis bezeichneten Erkrankung, wurde der Name 1960 abgelöst und durch den der autoimmunen chronischen aktiven Hepatitis ersetzt [3]. Das Konzept einer autoimmunen Hepatitis wurde durch neue Forschungsergebnisse unterstützt. Zusätzlich konnten die betroffenen Patienten durch die Bestimmung der spezifischen serologischen Befunde, die mit extrahepatitischen Auffälligkeiten assoziiert waren, der histologischen Erscheinungsbilder, welche entzündliche und nekrotische Merkmale aufwiesen, des Geschlechts und der Prognose in Subgruppen eingeteilt werden [1].

Mit der Entdeckung des Hepatitis B Virus und der durch Drogen induzierten Hepatitis in den frühen 70er Jahren kamen die Konzepte der klinisch entwickelten Subgruppen der autoimmunen Hepatitis ins Wanken. Erst Anfang der Achtziger wurde die Bedeutung der

immunologischen Mechanismen wieder in den Vordergrund gerückt. Die IgG-Antikörper gegen das Leber-Membran-Lipoprotein konnten sowohl im Serum als auch auf der Hepatozytenmembran von Patienten mit HBsAg-negativer chronisch aktiver Hepatitis nachgewiesen werden [1, 4].

Durch den verbesserten Nachweis von Autoantikörpern konnte die Präzision der Diagnostik gesteigert werden. Die Existenz von zusätzlichen Subgruppen wurde belegt. Nach Manns et al. werden diese durch das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern gegen Kerne (ANA), glatte Muskulatur (SMA)/ Aktin, Leber-Nieren Mikrosome (LKM) und lösliches Leberprotein (SLA) definiert. Bei Vorliegen eines seronegativen Befundes wird angeraten eine zusätzliche Bestimmung von seltenen Antikörpern wie ASPGR, LSP, LC1, LP, HHPM und Sulfatid durchzuführen. Durch den Nachweis der vier verschiedenen und diagnostisch relevanten Autoantikörper gegen Kerne, Aktin (vom IgG-Typ) sowie gegen LKM und SLA/LP kann bei mehr als 95% der Patienten die Diagnose einer autoimmunen Ätiologie bei entsprechenden klinischer/laborchemischer und histologischer Befundkonstellation gestellt werden [5].

Es zeigte sich jedoch, dass die drei durch Autoantikörper definierten Subgruppen [6] sich histologisch nicht unterscheiden lassen und auch gleichartig auf die Behandlung reagierten [7]. Daher wurde bislang kein Subtyp von der International Group of AIH als eigenständige Einheit bestätigt. Infolge dessen dient die Subtypen Klassifikation hauptsächlich der klinischen Differenzierung der AIH.

Die klinische Differenzierung der drei spezifischen Subgruppen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Drei Subgruppen der AIH [8]

Clinical Features	Type 1	Type 2	Type 3
Diagnostic autoantibodies	SMA ANA Antiactin	Anti-LKM P-450 IID6 Synthetic core motif peptides 254-271h	Soluble liver-kidney antigen Cytokeratins 8 and 18
Age	10 y-elderly	Pediatric (2-14 y) Rare in adults	Adults (30-50 y)
Women (%)	78	89	90
Concurrent immune disease (%)	41	34	58
Gamma globulin elevation	+++	+	++
HLA association	B8, DR3, DR4	B14, DR3, C4AQO	Uncertain
Steroid response	+++	++	+++
Progression to cirrhosis (%)	45	82	75

Die AIH Typ I ist die in Nordamerika und Europa am weitesten verbreitete Form der AIH [3], während die AIH Typ II, charakterisiert durch Antikörper gegen LKM1 (Leber-Nieren-Mikrosomen), gehäuft bei Kindern auftritt. Weiterhin ist bekannt, dass es bei einem Großteil der Patienten mit AIH II (82%) zu einer raschen Entwicklung einer Zirrhose kommt [9]. Die Typ III AIH ist die jüngste und zuletzt begründete Subklassifikation. Es wird aber von Czaja angeraten, die Eigenständigkeit dieser Subgruppe weiter zu erforschen [3].

Zusammenfassung

Die Autoimmunhepatitis ist nach heutigem Erkenntnisstand eine nekro-inflammatorische Lebererkrankung unbekannter Ätiologie. Sie kann bei Patienten jeden Alters auftreten, wobei eine Prädisposition des weiblichen Geschlechts vorliegt. Charakteristische Zeichen sind neben der spontanen Aktivität der Erkrankung, eine Hyperglobulinämie (IgG), spezifische zirkulierende Autoantikörper sowie das Ansprechen auf eine immunsuppressive Behandlung. Dennoch gibt es bis heute keinen biochemischen oder klinischen Test der eine Autoimmunhepatitis zweifelsfrei diagnostiziert.

1.2 Pathogenese

Der pathogenetische Mechanismus der AIH ist noch unbekannt. Vermutet wird eine genetische Prädisposition, da eine Prädominanz der AIH beim weiblichen Geschlecht und eine Assoziation mit bestimmten humanen leukozytären Antigenen (HLAs) beobachtet wird. Diese HLA Gene scheinen eine entscheidende Rolle als Prädispositionsfaktor für die AIH zu spielen. Besonders HLA B8, DR3 und DR4 sind in einer signifikant höheren Frequenz in verschiedenen Populationen der AIH zu finden. Es ist nicht auszuschließen, dass zukünftige Ergebnisse in diesem Bereich helfen können, die Ätiologie der AIH zu entschlüsseln oder die Behandlung weiter zu verbessern [10].

Des Weiteren wurden durch immunhistologische Studien der Phänotyp der Entzündungszellen, welche die Leber bei der AIH infiltrieren, identifiziert [11]. Bei der AIH dominieren die T-Lymphozyten das Bild. Ihre Mehrheit reagiert mit dem CD4 Helfer/Induktor Phänotyp und eine Minderheit mit dem CD8 zytotoxischen/suppressor Phänotyp. Andere Lymphozyten, wie die Killer/Natürlichen Killerzellen, welche mit CD16 bzw. CD56 vergesellschaftet sind, oder Makrophagen und B-Lymphozyten sind weniger vertreten. Verschiedene Möglichkeiten eines Angriffs des Immunsystems mit beinhaltender Hepatozyten Zerstörung ist in der Abbildung 1 dargestellt [11].

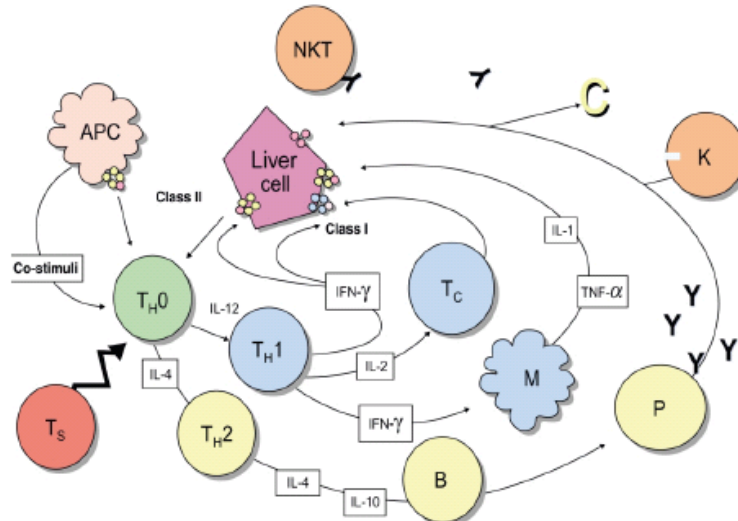


Abbildung 1: Das Szenario eines autoimmunen Angriffes auf eine Leberzelle. Ein spezifisches Autoantigenpeptid wird einer ungebundenen T-Helfer-Zelle (TH0) von einer Antigenpräsentierenden Zelle (APC) des HLA Klasse II Typs präsentiert. TH0 wird dadurch aktiviert und differenziert sich zu TH1 oder TH2. Diese Umwandlung ist abhängig von der Präsenz der Interleukine IL-12 (TH1) und IL-4 (TH2) sowie der Herkunft des Antigens. Die nun durch TH1 und TH2 hervorgerufenen Immunreaktionen werden modelliert durch die von ihnen produzierten Interleukine. So ist TH2 hauptsächlich verantwortlich für die Sekretion von IL-4 und IL-10 und es regt direkt die Antikörperproduktion der B-Zellen an. TH1 sezerniert IL-2 und Interferon-Gamma (INF- γ), welches die zytotoxischen T-Zellen (Tc) stimuliert, die Expression der Klasse I fördert und die Expression der Klasse II HLA Moleküle auf Hepatozyten induziert sowie Makrophagen aktiviert. Aktivierte Makrophagen geben wiederum das Interleukin 1(IL-1) und den Tumornekrosefaktor α (TNF- α) ab. Wenn nun die T-Suppressor-Zellen (Ts) nicht eingreifen, werden verschiedene Mechanismen getriggert. So zum Beispiel die Leberzellzerstörung durch die Aktivierung der Tc Zellen oder die durch TH1 freigesetzten Interleukine welche Makrophagen rekrutieren. Ebenfalls können die Killerzellen (K) angreifen, die durch die Autoantikörperbindung an der Oberfläche der Hepatozyten angelockt werden [11].

Autoantigene, beispielsweise die Reste von Zellmembranen, DNA-Fragmente oder körpereigene Proteine werden von den T-Lymphozyten und anderen Immunzellen fälschlicherweise als fremd erkannt. Wie bei einer natürlichen Abwehrreaktion schaltet sich nach der Erkennung die Immunantwort ein. Zytokine werden ausgeschüttet und somit die Zell-Zell-Kommunikation gefördert. Immer mehr Immunzellen werden angelockt, und die falschen Informationen weitergeleitet. B-Lymphozyten differenzieren sich zu Plasmazellen und beginnen mit der Produktion von Autoantikörpern (Autosensibilisierung), die ins Blut abgegeben werden. Mit dem Blut gelangen sie in den gesamten Körper und binden sich an

ihre spezifischen Antigene. Dort lagern sich die Antikörper an die Zielstrukturen der Autoimmunreaktion an und markieren diese Zellen für Fresszellen und CD8 T-Zellen als zu Beseitigende [11, 12, 13].

1.3 Diagnostik

Um die Diagnosefindung zu erleichtern, wurde 1992 von der International Autoimmune Hepatitis Group ein Score System entwickelt, welches im Folgenden näher erläutert wird [10].

Score-System

Dieses Punktesystem, welches eine objektive Bewertung ermöglicht basiert auf einer bereits 1992 von der International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) entwickelten Vorlage. Mit der Punkteauswertung wird zusätzlich eine Klassifizierung der Patienten erlaubt, die die Diagnosestellung der autoimmunen Hepatitis mit beschreibenden Attributen „mögliche“ oder „definitive“ AIH ergänzt [14]. Zahlreiche Studien belegen die Validität dieses Systems [15, 16, 17].

Im Jahr 2008 entwickelte die IAIHG eine vereinfachte Skala, indem sie die zwölf Komponenten auf vier dezimierte. Zu dieser Entscheidung kam es, da das alte System mit zu hoher Komplexität für den alltäglichen klinischen Gebrauch und unklaren Kriterien belegt war [18].

Nachfolgend werden die Anwendung und die Methodik des ursprünglichen und des Simplifizierten Scoring Systems beschrieben.

1.3.1 Original Score System

Die Diagnosestellung beginnt mit dem Ausschluss aller anderen Möglichkeiten, die zu einer chronisch-entzündlichen Erkrankung der Leber führen können. Des Weiteren werden serologische (spezifischer Autoantikörpernachweis) und laborchemische (Immunglobuline IgG) Befunde erhoben. Diese unterstützen bei einem Ansprechen des Patienten auf eine immunsuppressive Therapie die Diagnose der AIH. Kann auch durch eine zusätzliche

Leberbiopsie keine definitive Diagnose gestellt werden, wird anschließend das Scoring System der IAIHG zur Hilfe genommen, welches in Tabelle 2 dargestellt ist [2].

Wie aus dieser ersichtlich, führt der bereits oben erwähnte Ausschluss anderer chronischer Hepatiden zu einer bestimmten Punktevergabe. Neben dieser Komponente zählen die Geschlechtsspezifität, Alkoholkonsum, hepatotoxische Medikamente oder Blutprodukte, die Erhöhung der Gamma-Globuline, die genetische Prädisposition, der Nachweis von spezifischen Autoantikörpern, bestimmte histopathologische Kriterien sowie das Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie. Um eine definitive AIH zu bestätigen, muss ein Wert von über 15 Punkten vor Therapiebeginn oder 17 Punkten nach der Therapie erreicht werden. Für die Klassifikation der wahrscheinlichen AIH ist ein Wert von 10-15 vor oder von 12-17 Punkten nach Behandlung vorgesehen [2, 19].

1.3.2 Simplifiziertes Score-System

Im Gegensatz zum Original Scoring System, das auf die Parameter wie zum Beispiel Geschlecht, hepatotoxische Medikamente und Blutprodukte, Alkoholkonsum, Genetik und das Ansprechen auf die Therapie zurückgreift, werden im Simplifizierten lediglich Autoantikörper, virale Marker, Histologie und Immunglobuline (IgG) berücksichtigt.

Nachfolgend sind in Tabelle 3 die Bewertungskriterien des Simplified Scores nach der IAIHG dargestellt.

Tabelle 2: RIBA = »recombinant immunoblot assay«, SLA = lösliches Leberantigen, LSP = leberspezifisches Membranlipoprotein, LC1 = Leberzytosolantigen; LP = Leber-Pankreas-Antigen, HHPM = humanes Hepatozyten- Plasma-Membran-Antigen, ASGP-R = Asialoglykoproteinrezeptor [2]

Diagnosekriterien der Autoimmunhepatitis mit Bewertung

Geschlecht	
Weiblich	+2
Männlich	0
Biochemie	
Alkalische Phosphatase/GPT > 3,0	+2
Alkalische Phosphatase/GPT < 3,0	-2
Gesamtglobuline, Gamma-Globuline oder IgG über Norm	
> zweifach	+3
1,5-2,0	+2
1,0-1,5	+1
Autoantikörper Erwachsene (ANA, SMA, LKM-1)	
>1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
Antimitochondriale Antikörper positiv	-2
Virale Marker	
Anti-HVA-IgM, HBs-Ag oder Anti-HBc-IgM-positiv	-3
Anti- HCV-positiv im ELISA und (oder)RIBA	-2
HCV-RNS	-3
Keine Virusinfektion nachweisbar	-3
Andere Ätiologische Faktoren	
Anamnese für hepatotoxische Medikamente oder Blutprodukte	
Ja	-2
Nein	+1
Alkoholkonsum	
Männer <35g/Tag, Frauen < 25g/Tag	+2
Männer 50-80g/Tag, Frauen 40-60g/Tag	-2
Männer >80g /Tag, Frauen > 60g/Tag	-1
Genetik	
Andere Autoimmunerkrankungen beim Patienten oder erstgradigen Verwandten	+1
HLA-Phänotyp (B8-DR3 oder DR4)	+1
Autoantikörper	
Bei Patienten, die seronegativ für ANA, SMA und LKM-1 sind: jeder definierte festgestellte "Leberantikörper" (z.B. Antikörper gegen SLA, ASGPR, LSP, LC1, LP, HHPM und Sulfatid)	+2
Histologie	
Mottengfraß(Interface-)nekrosen, mit lobulärer Hepatitis und Brückennekrosen	+3
Mottenfraß(Interface-)nekrosen, ohne lobuläre Hepatitis oder Brückennekrosen	+2
Rosettenbildung	+1
Deutliche (dominierende) Plasmazellinfiltration	+1
Gallenwegsveränderung	-1
Veränderungen, die eine andere Ätiologie nahelegen	-3
Ansprechen auf die Therapie	
Komplett	+2
Kein Ansprechen	-2
Rezidiv während oder nach Absetzen der Therapie nach initial komplettem Ansprechen	+3

Tabelle 3: Die simplifizierte diagnostischen Kriterien der Autoimmunhepatitis [18, 20]

Variable	Cutoff	Points
ANA or SMA	≥ 1:40	1
ANA or SMA or LKM or SLA	≥ 1:80 ≥ 1:40 positiv	2*
IgG	> Upper normal limit	1
	> 1.10 times upper normal limit	2
Liver histology (evidence of hepatitis is a necessary condition)	Compatible with AIH	1
	Typical AIH	2
Absence of viral hepatitis	Yes	2

Score ≥ 6 : probable AIH

Score ≥ 7 : definite AIH

* Addition of points achieved for all autoantibodies (maximum, 2 points)

Die von der IAIHG als unabhängig eingestuft Kriterien (Histologie, Autoantikörpertiter, IgG und virale Marker) wurden durch Studien ermittelt und vergleichend mit anderen Werten ausgewertet. Es zeigte sich, dass eben diese Parameter zu einer hohen Spezifität des neuen Score Systems führen.

Mit einem Punktestand von sechs wird eine wahrscheinliche AIH diagnostiziert und mit einem Punktestand von gleich oder mehr als sieben eine definitive AIH.

Anzumerken ist, dass zur Erleichterung der Bewertung der histopathologischen Einteilung Dienes und Lohse [21] drei unterschiedliche Kategorien entwickelten: die atypische Histologie, die mit der AIH kompatibel und die typische Histologie der AIH. Unter die typische AIH fallen Interface Hepatitis, Rosetten Formation sowie lymphozytäre oder lymphoplasmazelluläre Infiltrate in portalen Gebieten, die sich bis in den Lobulus ausbreiten können. Die als kompatibel titulierte AIH zeigt Zeichen der chronischen Leberentzündung mit lymphozytischen Infiltraten, bei der nicht alle Merkmale der typischen Hepatitis nachzuweisen sind. Die atypische Bewertung wird gewählt, wenn die histologische Diagnose zusätzlich andere Ursachen einer chronischen Lebererkrankung offen lässt [18, 20].

1.3.3 Problem der Scoring Systeme und Fazit

Für beide Systeme gelten ähnliche Schwierigkeiten, welche von Hennes et al. [21] aufgezeigt werden. Die Forschungsgruppe unter Czaja empfiehlt, das alte System weiterhin bei Patienten zu nutzen, welche nur einige oder atypische Befunde der AIH aufzeigen; das vereinfachte neue System bei solchen, bei denen noch andere Immunerkrankungen zum Ausschluss stehen. Beide Vorgehensweisen unterstützen die klinische Diagnostik, können diese jedoch nicht ersetzen [18, 20].

Histopathologie

Die Histologie spielt eine entscheidende Rolle bei der Diagnose einer AIH. Wie bereits im vorherigen Abschnitt dargestellt, ist sie Bestandteil beider Scoring Systeme. Die Gewebegewinnung zur histopathologischen Befundung erfolgt durch eine Leberbiopsie. Die technischen Voraussetzungen für das weitere Vorgehen sind in Tabelle 4 dargestellt [22].

Tabelle 4: Technisches Vorgehen bei einer Leberbiopsie [22]

<p>A. Biopsie</p> <ul style="list-style-type: none"> - ausreichende Größe (Länge > 15mm, Durchmesser 1,2-1,8 mm) - sofortige adäquate Fixierung (neutralgepuffertes 2,5- bis 4 %ige Formaldehyd- lösung - 6,25- bis 10% Formalin) - vollständiger Untersuchungsauftrag einschließlich aller relevanten klinischen Fragestellungen und Daten sowie serologischen Parameter
<p>B. Bearbeitung und Beurteilung</p> <ul style="list-style-type: none"> - ausreichende Zahl an Schnittstufen (mindestens 8) - ausreichende Färbungen (zumindest HE-, Faser- und Eisenfärbung, empfohlen : (D-) PAS-Färbung) - vollständige Beurteilung und Berücksichtigung der Parameter Chronizität, Grading, Staging und Ätiologie

Da die Biopsiegröße einen direkten Einfluss auf die Zahl der erfassten Portalfelder besitzt, sollten die in der Tabelle angegebenen Werte nicht unterschritten werden. Sie garantieren die Aufnahme von mindestens zehn Portalfeldern. Durch die Verwendung größerer Nadeln kann es zu Komplikationen kommen. Die Fixierung des Präparats soll durch ein Standardfixans erfolgen. Für die richtige Beurteilung des Objektes ist es wichtig, dem Pathologen im Vorwege alle klinischen Parameter sowie die Anamnese des Patienten mitzuteilen [22].

Im Folgenden soll auf die sich anschließende histologische Klassifizierung mit Hilfe des Gradings und Stagings eingegangen werden, die vorab von einem Abschnitt über die histologischen Merkmale einer chronischen Hepatitis eingeleitet wird. Hieran schließt ein Überblick über das histologische Erscheinungsbild der AIH an, der durch die Aufzeigung von diagnostischen Problemen ergänzt wird.

1.3.4 Histologische Betrachtung der chronischen Hepatitis

Bei der chronischen Hepatitis kommt es zu einer charakteristischen Infiltration durch Entzündungszellen mit Degeneration und Nekrose von Hepatozyten. Diese Infiltrate setzen sich zusammen aus Lymphozyten, Plasmazellen und anderen unterschiedlichen antigenpräsentierenden Zellen, welche sowohl in den portalen Bereichen als auch in den Acini zu finden sind. Hier sind sie mit einer Hepatozytendegeneration vergesellschaftet. Die Nekrosen der Hepatozyten zeichnen sich durch eine herdförmige Anordnung aus, die einzelne Zellen oder kleine Gruppen beinhaltet. Vereinigen sich die Nekrosen, bedeutet dies, dass auch benachbarte Zellen untergegangen sind. Die zwischen ihnen entstehenden Verbindungen enthalten oft Entzündungszellen inklusive Makrophagen und Zelldebris. Im voranschreitenden Verlauf können sich zusammenfließende Nekrosen mit den vaskulären Strukturen vereinigen. Dieses Erscheinungsbild wird als sogenannte Brückennekrosen bezeichnet. Der Untergang von Hepatozyten an der Grenzfläche zwischen Parenchym und den entzündlichen verbindenden portalen Gebieten oder fibrösen Septen wird Mottenfraßnekrose oder neu Grenzflächenhepatitis genannt [23].

1.3.5 Grading und Staging

Das Grading wird definiert als ein Kriterium zur Beurteilung eines Biopsats und gibt das Ausmaß der entzündlichen Aktivität des zum Biopsiezeitpunkt bestehenden nekroinflammatorischen Gewebeschadens wieder. Da es sich hierbei lediglich um eine Momentaufnahme handelt, ist das Grading als eigenständiger Wert nicht von Bedeutung und sollte daher immer im Zusammenhang mit dem nachfolgend beschriebenen Staging betrachtet werden [22].

Das Staging bezeichnet das Ausmaß der Fibrose bzw. der Architekturstörung der chronisch entzündeten Leber [22]. Eine voranschreiten der Fibrose kann sich zu einer Zirrhose entwickeln, welche das irreversible Stadium der chronischen Hepatitis darstellt [23].

Sowohl für das Grading als auch für das Staging werden die von der DGVS vorgeschlagenen Score-Systeme nach Desmet et al. verwendet, die in Tabelle 5 und 6 aufgeführt sind.

Tabelle 5: Grading Score (nach Desmet et al.) [22]

Grad	verbal	analoger HAI-Score	Histologische Merkmale*
1	minimal	1-3	geringe portale Entzündungsinfiltration, keine oder minimale azinäre Parenchymzelluntergänge oder Entzündungszellinfiltrate
2	mild/ geringgradig	4-8	geringe oder mäßige portale Entzündungszellinfiltration, geringe, fokale Grenzzonenhepatitis, einzelne parenchymatöse Einzellnekrose, keine Gruppennekrosen
3	mäßig/mittelgradig	9-12	erhebliche (mäßige bis schwere) portale Entzündungszellinfiltration, erhebliche Grenzzonenhepatitis, zahlreiche azinäre Einzellnekrosen, evtl. Einzelne Gruppennekrosen, keine Brücken- oder panlobulären Nekrosen
4	schwer/ hochgradig	13-18	schwere portale Entzündungszellinfiltration und Grenzzonenhepatitis, schwere azinäre Entzündung mit Gruppennekrosen und evtl. Brücken- und panlobulären Nekrosen

Tabelle 6: Staging Score (nach Desmet et al. (abgeleitet nach Scheuer)) [22]

Score	verbal	histologische Merkmale
0	keine Fibrose	keine Faservermehrung
1	milde/ geringgradige Fibrose	portale Faservermehrung, keine Septen
2	mäßige/ mittelgradige Fibrose	inkomplette/komplette portoportale Fasersepten*, erhaltene Architektur
3	schwere/hochgradige Fibrose	septenbildende Faservermehrung mit Architekturzerstörung ** kein Anhalt für kompletten zirrhotischen Umbau
4	Fibrose	wahrscheinlicher*** oder definitiver zirrhotischer Umbau

* unabhängig von Zahl und Breite der Septen,** z.B. portozentrale Septen, Verschiebung der portalen/azinären Architektur (portal-zentralvenöser Abstand) *** z.B. ohne definitiven Nachweis vollständig bindegewebig separierter Pseudolobuli, aber aufgrund indirekter Zeichen (z.B. fragmentierte, „herausgebrochene“ Pseudolobuli) anzunehmen

Die Bewertungssysteme nach Desmet et al. sollen verbal (minimal, mild, mäßig, schwer) und numerisch (1-4) ausgedrückt werden.

Das angewendete Grading System ist eine Weiterentwicklung des so genannten Histological Activity Index (HAI), der von Knodell hervorgebracht wurde und in Tabelle 7 dargestellt ist.

Tabelle 7: Komponenten des HAI [23]

Komponente	Score-Rang
1. Periportale Nekrose mit oder ohne Brückennekrose	0-10
2. Intralobuläre Degeneration und fokale Nekrose	0-4
3. Portale Entzündung	0-4
4. Fibrose	0-4

Ishak et al. publizierten Modifizierungen der Grading und Staging Bewertungsrichtlinien, die sich jedoch aufgrund ihrer Komplexität und ihrer mäßigen Praktikabilität nicht in der Praxis durchsetzen konnten [22]. Diese werden in Tabelle 8 und 9 veranschaulicht.

Tabelle 8: modifizierter histologischer Aktivitätsindex (nach Ishak et al.) [22]

Gruppe	Kriterien	Score
A	periportale oder periseptale Grenzonenhepatitis (sog. Mottenfraßnekrose)	
	keine	0
	fokal, wenige Portalfelder	1
	fokal, Mehrzahl der Portalfelder	2
	kontinierlich um weniger als 50% der Portalfelder	3
	kontinierlich um über als 50% der Portalfelder	4
B	konfluente Nekrosen	
	keine	0
	fokal	1
	Zone-3-Nekrosen, wenige	2
	Zone-3-Nekrosen, zahlreiche	3
	Zone- 3- und einzelne portozentrale Brückennekrosen	4
	Zone-3- und multiple portozentrale Brückennekrosen	5
	panazinäre odeer multiazinäre Nekrosen	6
C	fokale kleinherdige lytische Nekrosen, Apoptosen und fokale Entzündungsherde**	
	keine	0
	bis 1 Herd pro Gesichtsfeld (10x Objektiv)	1
	2 bis 4 Herde pro Gesichtsfeld (10x Objektiv)	2
	5 bis 10 Herde pro Geischtsfeld (10x)	3
	mehr als 10 Herde pro Gesichtsfeld(10x)	4
D	portale Entzündung	
	keine	0
	gering, wenige oder alle Portalfelder	1
	mäßig, wenige oder alle Portalfelder	2
	mäßig / ausgeprägt, alle Portalfelder	3
	ausgeprägt, alle Portalfelder	4
maximaler Score**		18
*	angenähert, da mehrere Komponenten (s.HAI-Score) separat gewertet werden	
**	diffuse lymphozytäre Infiltrate in den Sinusoiden gehen nicht in den Score ein	

Tabelle 9: Staging Score (nach Ishak et al.) [24]

Modified staging: architectural changes, fibrosis und cirrhosis	
Change	Score
No fibrosis	0
Fibrous expansion of some portal areas, with or without short fibrous septa	1
Fibrous expansion of most portal areas, with or without short fibrous septa	2
Fibrous expansion of most portal areas, with occasional portal to portal (P-P) bridging	3
Fibrous expansion of most portal areas with marked bridging (portal to portal (P-P) as well as portal to central (P-C))	4
Marked bridging (P-P and/or P-C) with occasional nodules (incomplete cirrhosis)	5
Cirrhosis, probable or definite	6
Maximum possible score	6
Additional feature which should be noted but not scored: Intra-acinar fibrosis, perivenular ('chicken wire' fibrosis), Phlebosclerosis of terminal hepatic venules.	

Das Staging sowie das Grading haben eine prognostische Signifikanz und können die Behandlung des Patienten beeinflussen. Beispielsweise ergibt sich für eine chronische Hepatitis mit einem geringen Score Wert in ihrer Verlaufsform eine bessere Prognose als mit hohen Ergebnissen. Andererseits sollten Staging und Grading lediglich zur Ergänzung der klinischen Befunde fungieren [24].

Zusätzlich zu den histologischen Merkmalen einer chronischen Hepatitis hat die AIH eigene besondere Erkennungszeichen, die gehäuft auftreten und die klinischen Verdachtsdiagnosen bestätigen können. Aus diesem Grund sollen diese folgend aufgeführt werden.

1.3.6 Histologische Zeichen der AIH

Das histologische Erscheinungsbild der AIH entspricht dem einer chronischen Hepatitis mit einigen auf eine AIH hinweisenden Merkmalen [25]. Zu diesen Veränderungen gehört zum Beispiel die Grenzflächenhepatitis. Sie ist ein konstantes, aber nicht ausschlaggebendes Zeichen der AIH. Des Weiteren finden sich ergänzend dazu periportal gelegene lymphozytische und lymphoplasmazelluläre Entzündungsbereiche, aufgeblähte Hepatozyten

und/oder pyknotische hepatozytäre Einzelzellnekrosen. Die Grenzflächenhepatitis tritt allerdings nicht nur bei einer AIH auf, sondern kann auch beispielsweise mit einer viralen oder einer toxisch induzierten Hepatitis assoziiert sein. Zur Differenzierung zwischen einer viralen und einer autoimmunen Hepatitis eignet sich neben der klinischen Diagnostik das histologische Erscheinungsbild der hepatozellulären Nekrose in den Lobuli, die bei einer AIH häufiger vorkommen. Die ballonierende Degeneration der Hepatozyten kündigt eine lytische Nekrose an. Vereinigen sich diese Nekrosen, entstehen die bereits im Vorfeld erwähnten Brückennekrosen, die sich bis in die zentrolobulären Gebiete ausbreiten können. Die Nekrosen einer AIH zeigen eine zonenhafte Ausbreitung, die überwiegend periportal zu finden ist. Diese Lokalisation der Nekrosen unterscheidet die AIH ebenfalls von der viralen Hepatitis, welche durch eine herdförmige Streuung auffällt [23, 24, 26, 27].

Die Regeneration von Hepatozyten ist ein wesentlicher Teil der typischen Histopathologie, die sich durch zahlreiche blasse Färbungen auszeichnet und vor allem in der periportalen Region zu entdecken ist.

Die Lymphozyteninfiltration ist ein prägnantes Zeichen der AIH, sie wird von Dienes und Meyer zum Büschenfelde sogar als „Markenzeichen“ der AIH bezeichnet. Die Lymphozyteninfiltration scheint von den portalen Gebieten auf den Lobulus überzugreifen (Abbildung 2). Das Phänomen der Emperipolesis, das die Fähigkeit der Lymphozyten beschreibt, andere Zellen zu durchwandern und zu umwandern, wird als bedeutender Befund der AIH bezeichnet [28].

Eines der wichtigsten Kennzeichen der AIH ist die Plasmazellinfiltration, welche sowohl innerhalb der Grenzflächennekrose zu finden als auch über den Lobulus verteilt sind. Allerdings ist anzumerken, dass es auch AIH Befunde gibt, in denen die Abwesenheit von Plasmazellen zu verzeichnen ist [29]. Aus diesem Grund sehen Dienes et al. [30], da die Anwesenheit von Plasmazellen variabel ist, die Plasmazellinfiltration nicht als charakteristisches Merkmal einer AIH. Dennoch ist sie weiterhin in der histologischen Definition der AIH verankert und wird innerhalb des Score-Systems bedacht [2].

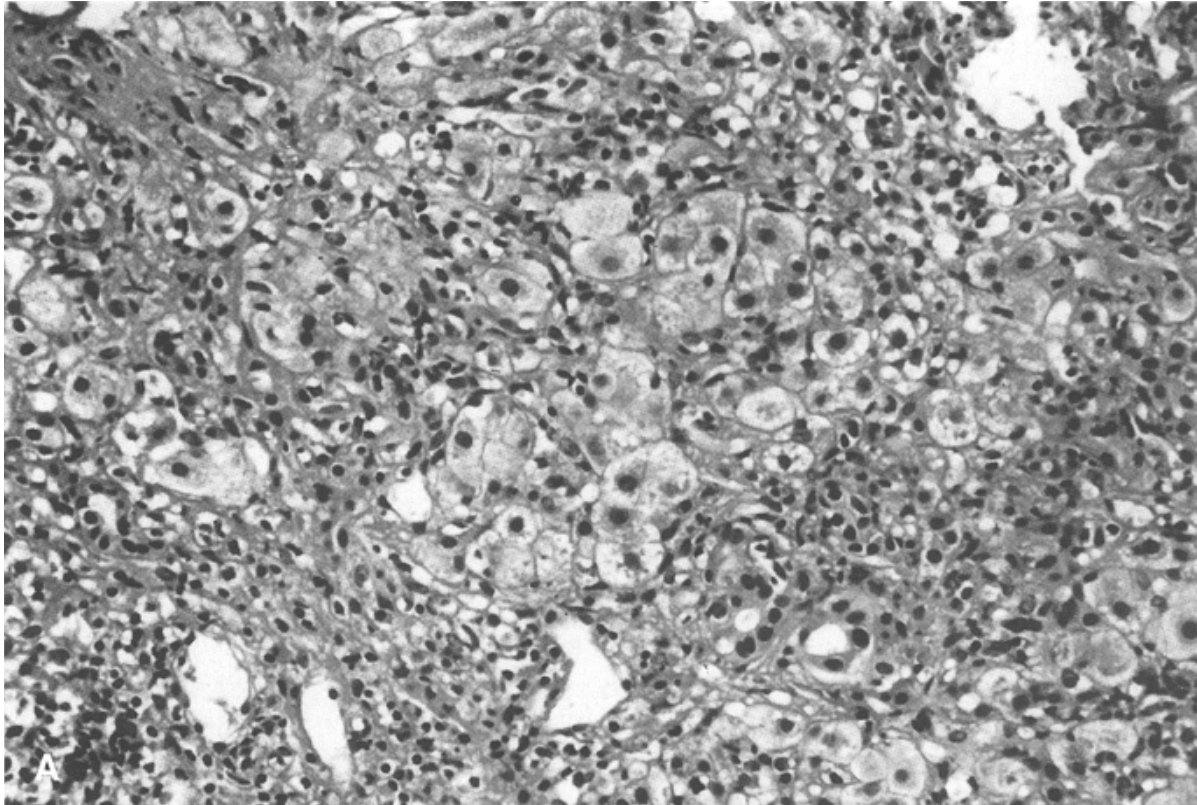


Abbildung 2: AIH mit starker Aktivität: periportales Gebiet mit dichten lymphozytischen Infiltrat [28]

Zusammenfassend sei hier noch einmal auf die International Autoimmune Hepatitis Group verwiesen, die anhand ihres Score Systems die verschiedenen histologischen Erscheinungsbilder bewertend zusammenstellte und der Häufigkeit des Auftretens entsprechend hohe Punkte versieht. Die im Score vertretenen histologischen Veränderungen sind die Grenzzonennekrose, mit oder ohne lobuläre Hepatitis, sowie die Abwesenheit von Gallengängläsionen, Granulomen, Metall-Depots und Befunde, die eine AIH differentialdiagnostisch ausschließen [31].

1.3.7 Fragestellung

Da es kein spezifisches diagnostisches Kriterium im histopathologischen Bereich gibt, sondern lediglich hinweisende Veränderungen, ist es wichtig, differentialdiagnostisch andere Erkrankungen sicher auszuschließen (Tabelle 10).

Tabelle 10 : Histologische Differentialdiagnosen der chronischen Hepatitis [25]

Histologic differential diagnosis
Autoimmune hepatitis disease
Autoimmune hepatitis
Primary biliary cirrhosis
Primary sclerosing cholangitis
Variant syndromes
Chronic Viral hepatitis
Chronic hepatitis B
Chronic hepatitis C
Chronic hepatitis D
Chronic hepatitis due to other viruses
Chronic drug induced hepatitis
Alpha-antitrypsin deficiency
Wilson's disease
Granulomatous hepatitis
Systemic lupus erythematosus
Graft-versus-host disease
Alcoholic steatohepatitis
Nonalcoholic steatohepatitis

Die von Bach et al. entwickelte Tabelle zeigt die Gegenüberstellung der spezifischen Zeichen für eine virale und autoimmune Hepatitis, die zur Orientierung genutzt werden kann [32].

Tabelle 11: Prävalenz von histologischen Merkmalen (Angaben in Prozent) [32]

Feature	chronic hepatitis C	Autoimmune chronic hepatitis
Piecemeal necrosis (a) (\geq grade 3)	10	81
Portal inflammation (b) (\geq grade 3)	48	24
Lymphoid follicles(a)	49	10
Bile duct damage(a)	91	40
Bile duct loss(a)	91	20
Lobular inflammation (\geq grade 3)	38	76
Steatosis (a)	72	19
Multinucleated giant hepatocytes (a)	6	29
Parenchymal collapse (a)	6	76
Numbers listed are percentages found		
(a) p - 0,01		
(b) p - 0,05		

Aus diesen Ausführungen wird die Bedeutung der histopathologischen Diagnose für die Sicherung einer AIH deutlich, gleichzeitig stellen sich auch die Limitationen dar. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob es möglich ist, durch die Verwendung von immunhistologischen Färbungen die histopathologische Diagnostik abzusichern. Angeregt durch andere Studien, in denen zum Beispiel durch eine IgG4 Färbung eine Differenzierung zwischen einer chronischen Alkohol induzierten und einer autoimmunen Pankreatitis ermöglicht wurde [38], wird im Rahmen dieser Arbeit die immunhistologische Expression von CD8, CD20, CD25, CD56, CD138 und IgG4 untersucht und die Befunde mit den histologischen Ergebnissen und ausgewählten serologischen Daten, wie den Autoantikörpern, IgG oder den Transaminasen der AIH Patienten korreliert. Des Weiteren werden ein Originales und Simplifiziertes Score System auf ihre Eignung für die Diagnostik überprüft und in Bezug zu den histologischen Ergebnissen gestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Für die Untersuchungen wurden Biopsate von Autoimmunhepatitis-Patienten verwendet. Die 26 Patienten, 5 männliche und 21 weibliche, wurden in der ersten Medizinischen Klinik des UKSH zu Kiel diagnostiziert. Nach dem anamnestischen Ausschluss einer von Alkohol, Drogen und/oder Medikamenten hervorgerufenen Hepatitis sowie weiteren Allgemeinerkrankungen, erfolgte die Befundung durch die Erhebung von klinischen, serologischen, laborchemischen und biochemischen Tests. Neben den Antikörpertitern (ANA, SMA, SLA, LKM) wurde ebenfalls der Immunglobulin G Anteil bestimmt. Ebenso musste der Ausschluss einer viralen Hepatitis gegeben sein. Werte wie die Bestimmung der Transaminasen (GOT, GPT) oder auch der alkalische Phosphatase führten bereits im Vorfeld zu der Verdachtsdiagnose einer Lebererkrankung.

Die histopathologische Beurteilung der entnommenen Biopsate wurde anhand von vorgegebenen Kriterien des Stagings und Gradings sowie charakteristischen Merkmalen einer AIH vorgenommen. Diese Kriterien orientieren sich an dem von Desmet/Scheuer entwickelten Grading und Staging. Diese erarbeiteten Scores werden verbal (minimal, mild, mäßig, schwer) und numerisch (1-4) genutzt. Die abschließende Bewertung mit einem „vereinbar mit einer AIH“ oder einem „typisch für AIH“ führte das Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein / Campus Kiel durch.

Alle 26 Patienten wurden unterstützend mit Hilfe des Originalen Scoring Systems der International Autoimmune Hepatitis Group diagnostiziert und wiesen eine Mindestpunktzahl von 15 auf.

Von den ursprünglich 38 vorhandenen Patienten blieben 26 für die Auswertung übrig. Die Gründe hierfür liegen zum Beispiel in der Aufbewahrungszeit der Biopsien im Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein / Campus Kiel, welche 10 Jahre beträgt. Aus diesem Grund konnten nur alle vorliegenden Autoimmunhepatitis Blöcke der Jahre 1997 bis 2007 verwendet werden. Beim Vorliegen mehrerer Biopsien eines Patienten über die Jahre hinweg wurden diese miteinbezogen und ausgewertet. Dieses geschah in sieben

Fällen. Als Kontrollkollektiv dienten 10 Patienten ohne pathologischen Leberbefund und 6 mit einer chronischen Hepatitis.

2.2 Immunhistochemie

2.2.1 Herstellung der Schnittpräparate

Von den ausgewählten Paraffinblöcken werden jeweils mit einem Rotationsmikrotom (Firma Leica, RM 2145, Wetzlar, Deutschland) 3µm dicke Schnitte hergestellt, die anschließend auf beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) gezogen werden. Abschließend trocknen die Präparate bei 37°C etwa 24 Stunden im Brutschrank (Firma Memmet).

2.2.2 EnVision™ Methode

Die EnVision™ Methode, bezogen auf die hier verwendeten Materialien, ist ein 2-Schritt-Detektionssystem der Firma Dako (Hamburg, Deutschland). Die Zusammensetzung des EnVision™ Polymer Konjugats beinhaltet ein Dextran-Polymer, welches die Sekundärantikörper und das Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) trägt. An das Polymer können ca. 70 Enzyme neben 10 Antikörpern gebunden sein [33].

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass dem Primärantikörper, welcher an das Antigen des Gewebes gebunden ist, mit dem EnVision™ Polymer inkubiert wird. Dieses ist in der folgenden Abbildung 3 dargestellt.

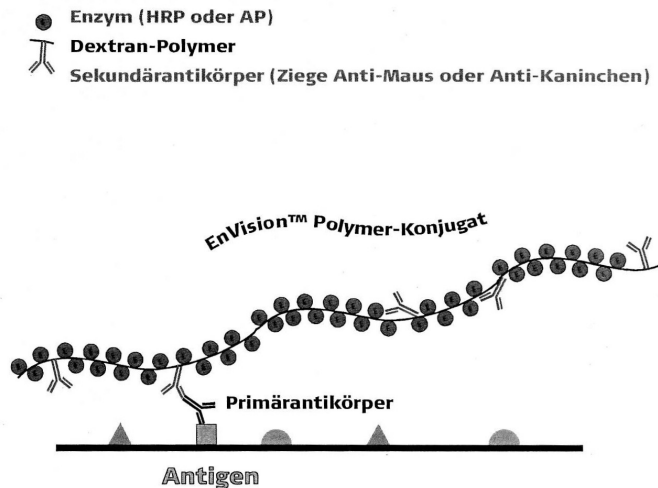


Abbildung 3: EnVision™ 2-Schritt-Detektionssystem (Firma Dako)

Durchführung

Zunächst werden die Schnitte zur Entparaffinisierung und Rehydrierung zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol gestellt. Nach einer absteigenden Alkoholreihe: 2x in 100% Ethanol mit Xylol im Verhältnis 1:1, 2x 100% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 2x 70% Ethanol, werden sie mit Aqua dest. gespült. Die hierfür verwendeten Materialien stammen aus dem hausinternen Depot.

In der Phase der Antikörperdemaskierung, die nur für die Antikörper CD20 und CD56 vorgenommen werden muss, kommen die Präparate in einen Kochpuffer von pH 7,8, der sich wie folgt zusammensetzt: TRIS-Base 2,5g (Firma Sigma), EDTA 5g (Firma Merck) Tri-Natrium-Citrat 3,2g (Firma Merck), 1l Aqua dest. (Firma Delta Select). Diese so genannte TEC- Stammlösung wird wiederum nochmals in einem Verhältnis von 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. In der Dako Pascal Druckkammer werden sie nun für 1 min bei 125°C demaskiert. Für den gesamten Vorgang in der Druckkammer (Temperaturerzeugung, Druckaufbau und Abkühlungsphase) wird eine Zeit von 45 Minuten benötigt.

Daran schließt sich für alle drei Antikörper, nachdem mit Aqua dest. gespült worden ist, eine Alkoholreihe (96% Ethanol, 2x 70% Ethanol) an, die in einem Gemisch von Methanol (100%; 250ml; Firma J.T.Baker) und H₂O₂ (30%; 5ml; Firma Merck) unterbrochen wird. Dieses soll die endogene Peroxidase im Gewebe hemmen, damit es später nicht zu falsch positiven Ergebnissen kommt. In weiteren Spülungen folgen 96% Ethanol, 70% Ethanol (2x) und Aqua dest.. Nun werden die Schnitte in einen Waschpuffer aus TRI-Base 9g (Firma Sigma), TRIS-

HCl 68,5g (Firma Sigma), NaCl 87,8g (Firma J.T.Baker), 10l Aqua dest. (Firma Delta Select) gestellt.

Damit ist die Färbephase, in der zuerst pro Schnitt 150µl Primärantikörper auf die Präparate appliziert werden, eingeleitet. Es liegt ein differenziertes Verdünnungsverhältnis für die einzelnen Primärantikörper vor, welches aus Tabelle 12 zu entnehmen ist. (Verdünnungslösung: Dako REAL™ Antibody Diluent).

Nach dreißig Minuten erfolgt eine dreimalige Spülung mit Waschpuffer, bevor die dreißigminütige Inkubation mit dem Polymer-Sekundärantikörperkomplex-Enzym-Komplex (Dako Cytomation, EnVision + ® System Labelled Polymer HRP Anti-Mouse) beginnt. Nachfolgend werden die Präparate erneut dreimal mit dem Waschpuffer gespült, um danach mit einer Färbemischung bestehend aus jeweils 20 µl Puffer, 20µl DAB (3,3'diaminobenzidin) und 20µl H₂O₂ (Hydrogenperoxidase) für 5 Minuten infiltriert zu werden. Alle drei Bestandteile der Färbung gehören zum „Substrat Kit for Peroxidase“ der Firma Vector. Folgend werden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen, um danach mit Mayers Hämalaulösung der Firma Merck (in einer Verdünnung mit Aqua dest.1:4) für 30-60 Sekunden die kernfärbende Gegenfärbung einzuleiten. Die fließende Bläuung der Schnitte geschieht durch Leitungswasser.

Nach einer aufsteigenden Xylolreihe (2x 70% Ethanol, 2x 96% Ethanol, 100% Ethanol, 100% Ethanol und Xylol (1:1), 4x Xylol) werden die Präparate mit Pertex (Firma Medite GmbH) behandelt und abschließend eingedeckt.

2.2.3 Histofine® Methode

Histofine® Simple stain MAX PO (R) der Firma NICHIREI BIOSCIENCES ist ein universelles Immun-Peroxidase Polymer, welches aus Aminosäuren besteht. Dieses Polymer ist mit Peroxidase und Ziege Anti-Kanninchen Ig, die auf F(ab`)- Fragmente reduziert sind, konjugiert. Die IgG-Fraktion wird aus immunisierten Ziegenserum aufgereinigt und enzymatisch zu F(ab`)-Fragmenten reduziert. Die Festphasenabsorption wird mit Humanserumprotein durchgeführt und die F(ab`)-Fragmente werden an das peroxidase markierte Aminosäurepolymer konjugiert. Das Prinzip der Histofine® Methode

basiert auf der Erstellung des Antigen/Antikörper/Universelle Immun-Peroxidase Polymerkomplexes, welcher mit einem Kanninchenprimärantikörper reagiert. Dieser ist an ein Antigen auf einem Gewebeschnitt gebunden. Ein farbiger Niederschlag, der die Stelle des nachzuweisenden Antigens markiert, spiegelt die enzymatische Aktivität des Komplexes wieder [34].

Durchführung

Die Durchführung entspricht der Envision® Methode. Lediglich in der Phase der Antikörperdemaskierung kommen die Präparate in einen Kochpuffer von pH 6. Die Vorbehandlungszeit im Dampfdrucktopf beträgt drei Minuten. Das Verdünnungsverhältnis für die Primärantikörper ist in Tabelle 12 angegeben.

Die Verdünnungen der Antikörper entsprechen dem institutsinternen Standard nach Austestung an Routinematerial. Zur Veranschaulichung sind die unterschiedlichen Färbungen aneinander liegender Schnitte desselben Portalfeldes in Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht über Primärantikörper, Hersteller, Verdünnung und Detektionssystem

Antikörper	IgG4	CD20	CD56	CD8	CD25	CD138
Hersteller	The Binding Site	Dako	Novocastra	Dako	Novocastra	Dako
Verdünnung	1:100	1:50	1:50	1:200	1:24	1:20
Detektionssystem	EnVision™	EnVision™	EnVision™	Histofine®	Histofine®	Histofine®

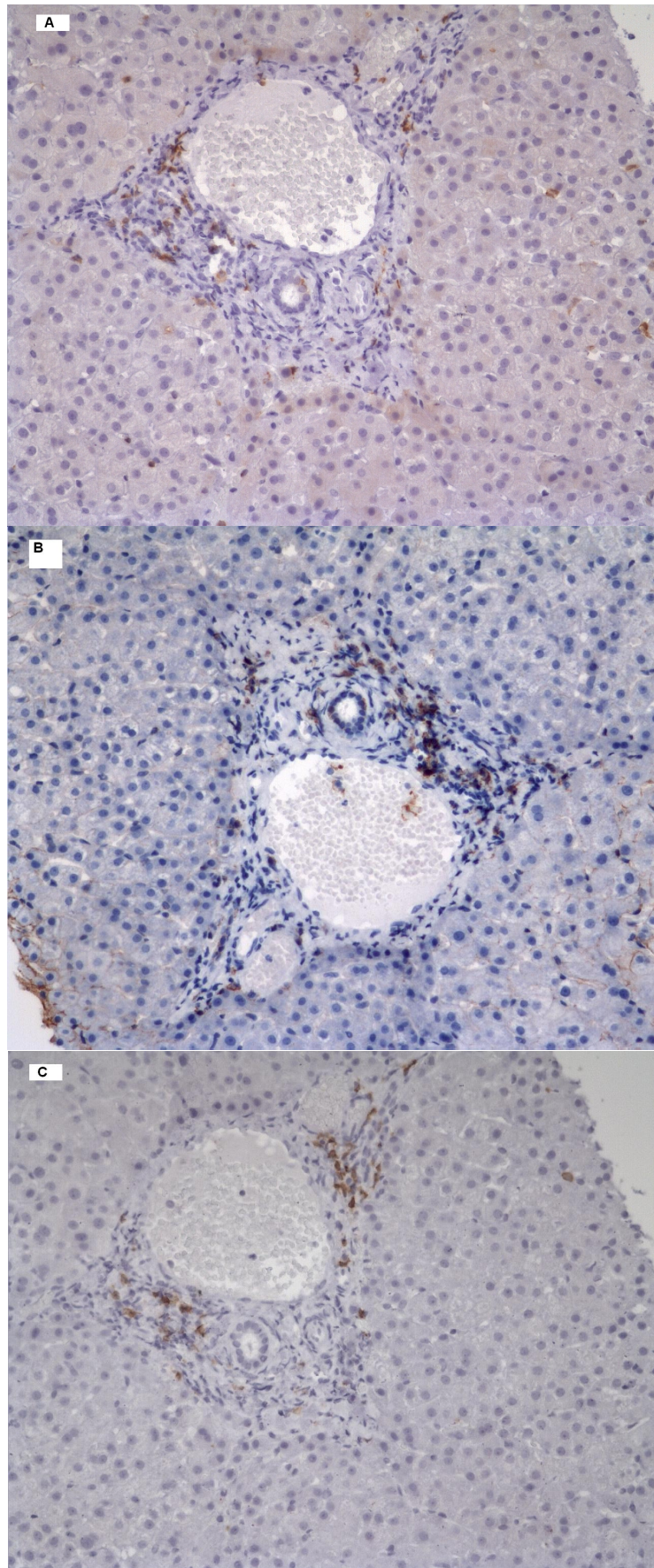


Abbildung 4: Färbungen CD8 (A), CD138 (B) und CD20 (C)

Die verwendeten 6 Antikörper sind Marker für bestimmte Entzündungsgeschehen und sollen kurz näher erläutert werden.

2.2.4 Antikörper

Die verschiedenen CD-Moleküle sind jeweils spezifisch für eine bestimmte Sorte oder Entwicklungsstufe von Zellen. Sie können als Marker verwendet werden, die dann durch monoklonale Antikörper erkannt und auf diese Weise nachgewiesen werden können. Die allgemein gültige Definition der benutzten Antikörper ist in der erarbeiteten Tabelle 13 aufgezeigt. Zusätzlich ist der verwendete Subtyp des IgG, IgG4, aufgelistet.

Diese sechs Antikörper wurden genutzt, da sie primär in Entzündungsinfiltraten vorkommen. Sie ermöglichen als Standardantikörper in der Pathologie eine genaue Charakterisierung der Zusammensetzung des Entzündungsinfiltrates. Außerdem könnten sie daher, wenn sie eine Relevanz zeigen, leicht Einzug in die Routinediagnostik der AIH finden.

Tabelle 13: Überblick über die verwendeten Antikörper und ihre Funktion [35, 36, 37]

CD	Zelltyp	Funktion des Proteins
CD8	CTL (cytotoxic lymphocyte = zytotoxische T-Zellen), suppressor Zellen	Korezeptor des T-Zell-Rezeptors im Zusammenhang mit MHC-I restringierter Antigenerkennung, wichtig für die positive Selektion im Thymus
CD20	Pan-B-Zell-Marker	B-Zell-Aktivierung, Regulation des B-Zell-Wachstums
CD25	Aktivierte T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen	Alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors, Aktivierung und Proliferation von T-Zellen, Thymozyten, NK-Zellen, B-Zellen und Makrophagen
CD56	NK-Zellen, zahlreiche neurale Gewebe	NCAM (natural cell-adhesion moleküle), zelluläre Interaktion des Nervensystems, Adhäsion der NK-Zellen an Zielzellen, wichtig für die Erkennung von „Selbst“ und „Nichtselbst“
CD138 (heparan sulfate proteoglycan; syndecan-1)	Integraler Bestandteil der Plasmamembran, Membrane, Plasmazellmarker, überwiegend anzutreffen bei Plasmazelltumoren,	Zellproliferation, Zellmigration und Zell-Matrix-Interaktion über extrazelluläre Zellmatrix-Proteine
IgG4	IgG Subtyp Plasmazelle	Antikörper

2.2.5 Auswertung

Folgende Sachverhalte werden untersucht:

- Reaktionsverhalten der Zellen auf die immunhistochemische Antikörperfärbung,
- gefärbte und ungefärbte Zellen bezogen auf die Diagnostik,
- gefärbte und ungefärbte Zellen bezogen auf ihre Lokalisation,
- gefärbte und ungefärbte Zellen im Zusammenhang mit Diagnostik und Lokalisation,
- gefärbte und ungefärbte Zellen in Bezug auf das Staging und Grading,
- gefärbte und ungefärbte Zellen in Bezug zu Autoantikörpern (ANA/SMA),

- gefärbte und ungefärbte Zellen in Bezug zu leberspezifischen Transaminasen (GOT und GPT),
- gefärbte und ungefärbte Zellen in Bezug zu Immunglobulinen (IgG),
- Punkteauswertung der im Rahmen des Simplifizierten Score Systems als „probable“ bewerteten AIHs im Vergleich zu gefärbten und ungefärbten Zellen,
- Punkteauswertung des neuen Score-Systems im Vergleich zum Staging und Grading,
- Punkteauswertung des neuen Score-Systems im Vergleich zu den Transaminasen (GOT und GPT),
- Autoantikörper in Bezug zum Grading und Staging.

Die nach dem Originalen Score System bewerteten Patienten wurden mit einer definitiven AIH befundet. Diese Patienten werden innerhalb dieser Arbeit nochmals nach dem neuen Simplifizierten Scoring System ausgewertet und anschließend in Bezug sowohl zu den relativen und absoluten Werten der gefärbten Zellen als auch zum Grading und Staging oder zu den Transaminasen gesetzt.

Patienten, die durch den Simplifizierten Score lediglich mit einer „wahrscheinlichen (probable)“ AIH diagnostiziert werden, finden in separaten Grafiken eine zusätzliche spezifische Betrachtung. Hier wird ein eventueller Zusammenhang zwischen diesen Patienten und den angefärbten Zellen in absoluten und relativen Werten erwartet.

Im Folgenden werden die Grafiken nach den institutsinternen gängigen Richtlinien ausgewertet.

Zur Auswertung wurden die Präparate mit Hilfe einer Kamera über ein Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss, Deutschland) digitalisiert. Als positiv wurden alle gefärbten Bereiche bewertet und im Anschluss ausgewertet. Zu diesem Zweck wurde ein Programm von Scion Image (Windows, USA) verwendet, welches mit einer manuellen Zählfunktion ausgestattet ist. Bei der Auswertung der Bilder wurde besonderes Augenmerk auf die Lokalisation der gefärbten Bereiche gelegt, welche in lobulär, perilobulär und portal eingeteilt wurden. Des Weiteren flossen in die Bewertung die bereits durch einen Pathologen beurteilten Staging und

Grading Befunde ein. Die klinischen und laborchemischen Werte wurden ebenfalls den gefärbten Zellen gegenübergestellt (Autoantikörper, IgG, Transaminasen (GOT, GPT)).

Der von der IAIHG neu entwickelte Simplifizierte Score konnte auf der Basis der klinischen und laborchemischen Werte erstellt werden.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden jeweils die Ergebnisse der einzelnen Antikörperfärbung vorgestellt. Es zeigte sich, dass verschiedene Reaktionsverhalten der Zellen auf die immunhistochemische Antikörperfärbung existieren. Die immunhistochemische Antikörperfärbung war lediglich bei den verwendeten Antikörpern CD8, CD20, CD138 erfolgreich, wohingegen es zu keiner Anfärbung der Zellen durch die Antikörper CD25, CD56 und IgG4 kam. Aus diesem Grund wird nur auf die durch die Antikörper CD8, CD20, CD138 erzielten Ergebnisse eingegangen.

3.1 CD 8

Eine Gesamtauswertung der Präparate für die Färbungen mit CD8, bezogen auf die drei verschiedenen Patientengruppen, die entweder mit einer AIH, einer Hepatitis anderer Genese oder keinem pathologischen Befund diagnostiziert wurden, ist in Abbildung 5 dargestellt. Trotz einer ersichtlichen Abstufung, bei welcher die AIH vor der Entzündung und der Gewebe ohne pathologischen Befund liegt, zeigt der Fehlerindikator (Standardabweichung), dass es aufgrund der Überschneidungen zu keiner hervorgehobenen Stellung der AIH kommt und daher eine eindeutige Diagnose für den Einzelfall nicht möglich ist.

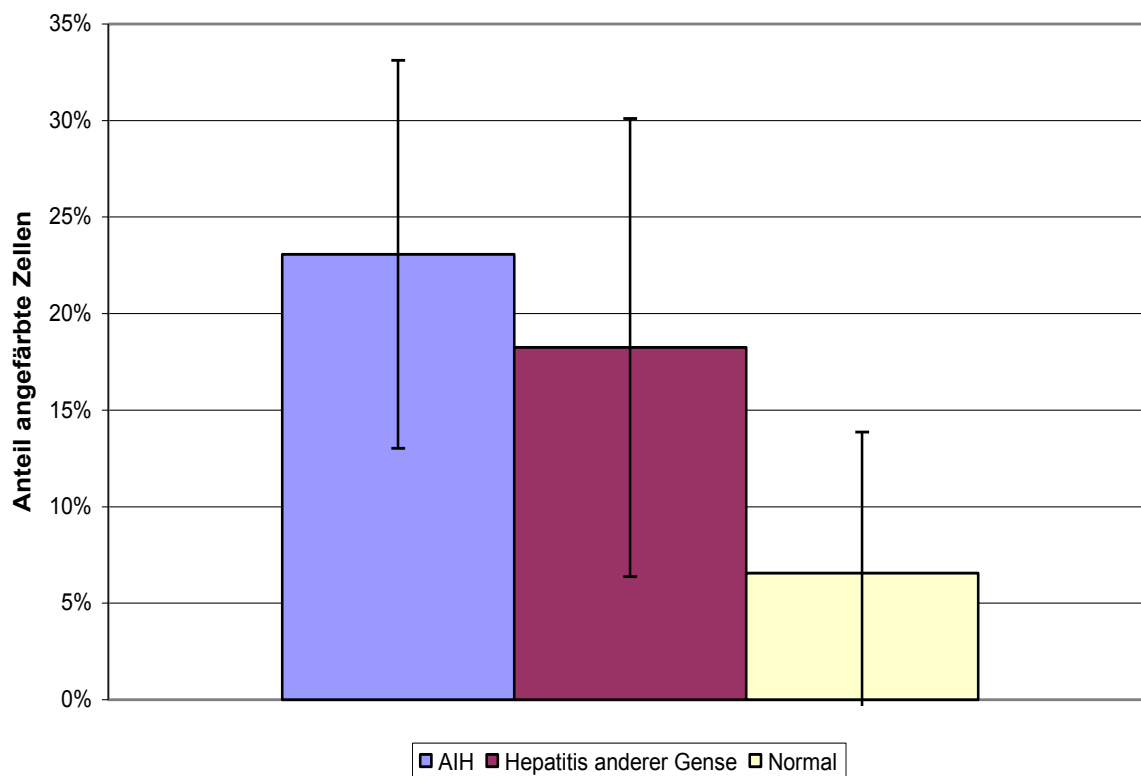


Abbildung 5: CD8, Färbung bezogen auf Diagnose

Aufgrund des vorangehenden Ergebnisses wurden im Anschluss die angefärbten Zellen weiter entsprechend ihrer Lokalisation (lobuläre, periportale und portale Gebiete) unterteilt. Abbildung 6 soll zeigen, ob in diesem Fall eine stärkere Abhängigkeit besteht. Bei der AIH als auch bei einer Leberentzündung existiert eine Abstufung innerhalb der Lokalisation. Letztlich zeigt sich, dass unter Berücksichtigung des zusätzlich aufgeführten Fehlerindikators zwischen der AIH und der Entzündung keine eindeutige Differenzierung möglich ist. Jedoch wird bei der alleinigen Betrachtung der Portalfelder ersichtlich, dass größere Differenzen bestehen als bei den anderen Feldtypen und geringere Überschneidungen der Fehlerindikatoren vorliegen.

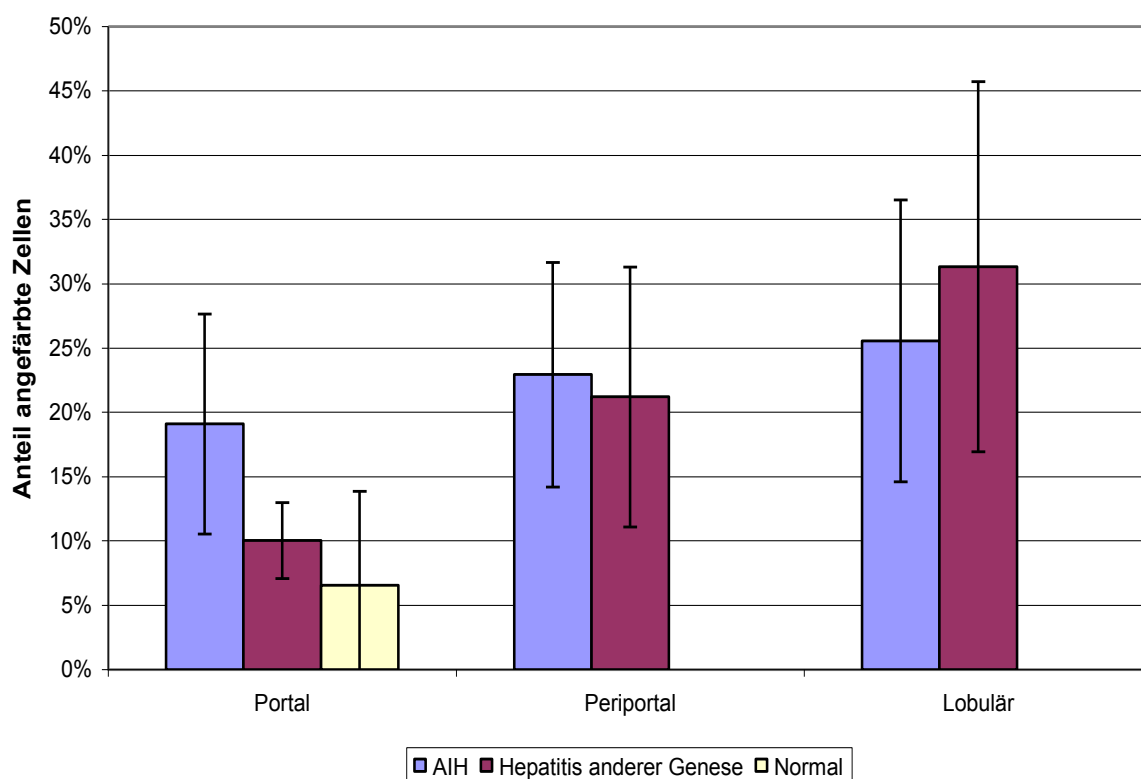


Abbildung 6: CD8, Übersicht nach Feldtyp

Im Rahmen der histologischen Untersuchung wurden die angefärbten Zellen in Bezug auf das Staging und Grading in relativen und absoluten Werten untersucht. Wie erwartet, kam es bei der Progression der Erkrankung absolut zu einem Anstieg der Anzahl der Entzündungszellen. Abgesehen davon zeigten sich keinerlei auswertbaren Auffälligkeiten (Abbildung A2).

Folgend wurde durch eine Kombination aus histologischen und serologischen Parametern bestimmter AIH Patienten versucht eine eventuelle Abhängigkeit zu finden. Es wird untersucht, ob ein Zusammenhang der relativen und absoluten Werte der angefärbten Zellen und den Autoantikörpern, welche für die Diagnostik einer Autoimmunerkrankung entscheidend sind, vorliegt (Abbildung A3). Selbiges Konzept wurde für die Transaminasen und die gefärbten und ungefärbten Zellen durchgeführt. Bei den Transaminasen handelt es sich um die leberspezifischen GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, und GPT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, welche im Rahmen einer Destruktion der Leberzellen ins Blutserum freigesetzt werden, und somit definitive Marker einer Lebererkrankung sind (Abbildung A4, A5). Das Immunglobulin G der einzelnen AIH Patienten wird mit den der gefärbten und ungefärbten Zellen verglichen, da eine Hypergammaglobulinämie ein weiteres Kriterium für

eine AIH darstellt (Abbildung A6). Nach eingehender Untersuchung aller Grafiken wird ersichtlich, dass keine Korrelation zwischen den serologischen Markern und der Antikörperfärbung CD8 existiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob das Simplifizierte Score System, welches unter anderem auf serologischen Markern und histologischen Gegebenheiten beruht, eine eventuelle Abhängigkeit zwischen den als „probable“ AIH eingestuften Patienten dieses Systems und ihren entsprechend gefärbten Zellen aufweist. Die Auswertung ließ keinen Zusammenhang zwischen dem Score und der Antikörperfärbung feststellen (Abbildung A7).

3.2 CD 20

Die gleiche Untersuchung wie bei der Antikörperfärbung CD8 wurde auch für CD20 durchgeführt. Dargestellt in Abbildung 7 sind die gefärbten und ungefärbten Zellen auf die Diagnostik bezogen. Anders als bei der Färbung CD8 ergibt sich für CD20 eine vermehrte Anfärbung der Zellen einer Hepatitis anderer Genese im Vergleich zu einer AIH. Dennoch muss auch hier wieder auf den Fehlerindikator hingewiesen werden, der verdeutlicht, dass CD20 ebenfalls keine explizite Differenzierung für den einzelnen Patienten zwischen einer Entzündung der Leber und einer AIH zulässt.

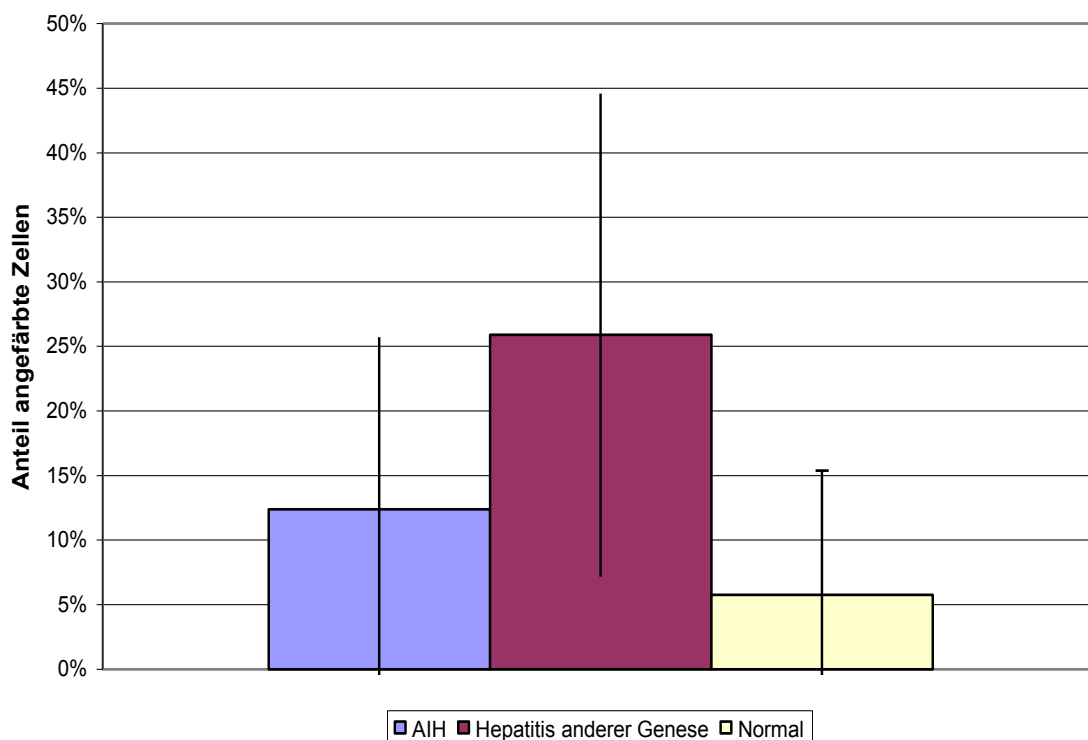


Abbildung 7: CD20, Färbung bezogen auf Diagnose

Die Abbildung 8 zeigt eine deutliche Abstufung zwischen der AIH und der Entzündung, die besonders im periportalem Bereich auftritt. Zusätzlich liegt nur eine geringfügige Überschneidung der Standardabweichung vor. Dieses kann eine stärkere Differenzierung zwischen einer AIH und einer Entzündung ermöglichen.

Die eventuelle Abhängigkeit zwischen den relativen und absoluten Werten der angefärbten Zellen in Bezug zum Grading und Staging wurde auch für CD20 untersucht. Ebenso wurden statt des Grading und Stagings, die Antikörper- bzw. die Transaminasen oder Immunglobulintiter verwendet. Auch hier kam es bei der Antikörperfärbung mit CD20 zu keiner Korrelation (Abbildung A9, A10, A11, A12, A13). Bei der Auswertung der „probable“ Patienten nach dem Simplifizierten Score System im Verhältnis zu ihren absoluten und relativen Werten konnten keine Zusammenhänge festgestellt werden (Abbildung A14).

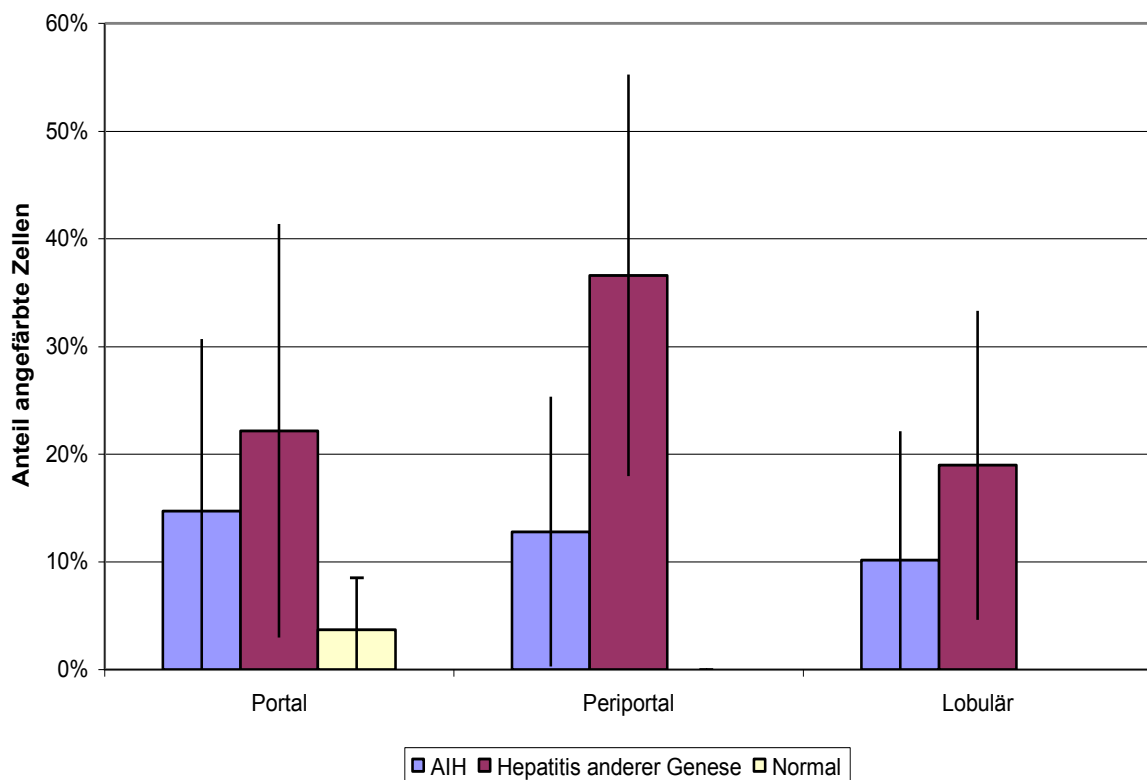


Abbildung 8: CD20, Übersicht nach Feldtyp

3.3 CD 138

Mit der Färbung durch CD138 zeigt sich ein ähnliches Bild zwischen den gefärbten und ungefärbten Zellen bezogen auf die Diagnostik (Abbildung 9) wie in Abbildung 5. Eine Abstufung, die von der AIH angeführt wird, ist zu erkennen. Dennoch zeigen auch hier die aufgeführten Fehlerindikatoren, die sich in Teilbereichen überschneiden, dass eine genaue Differenzierung zwischen einer Entzündung und einer AIH nicht möglich ist. Zusätzlich sei auf den großen Fehlerindikator im Bereich der „normalen“, nicht erkrankten, Patienten hingewiesen, welcher eine Differenzierung zwischen den Erkrankungen noch weiter erschwert.

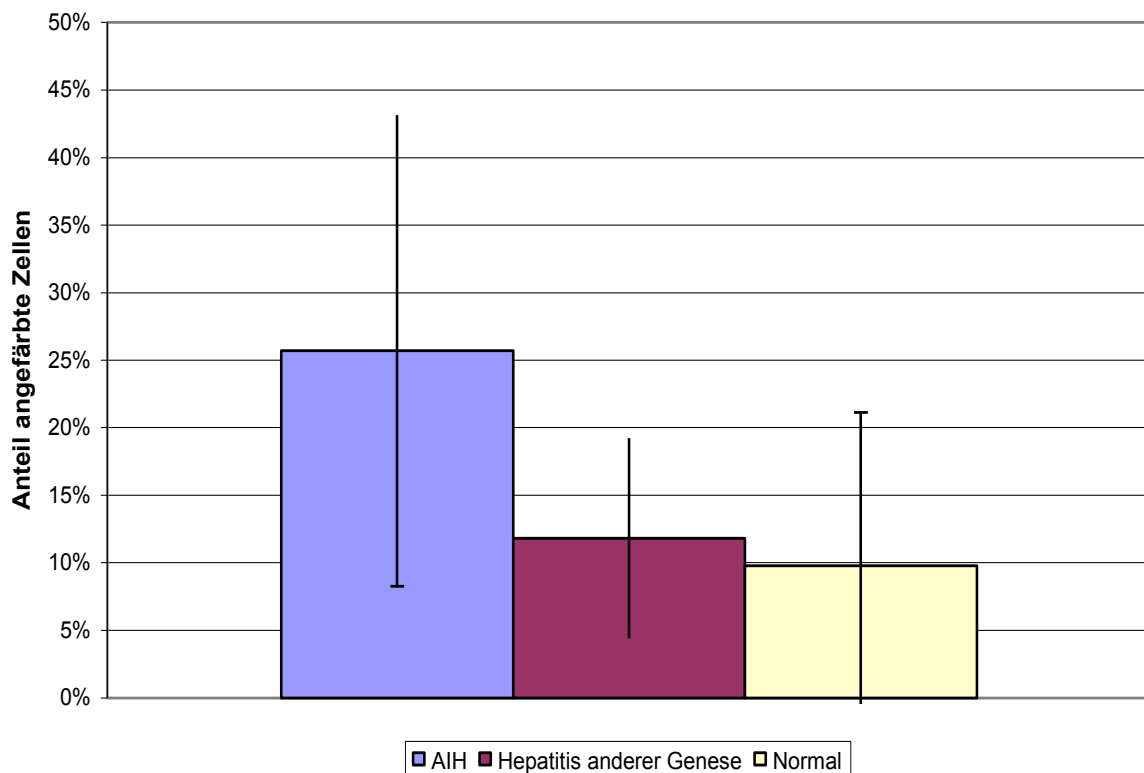


Abbildung 9: CD138, Färbung bezogen auf Diagnose

Eine Erweiterung wurde um die Betrachtung der Lokalisation vorgenommen (Abbildung 10). Innerhalb der Portalfelder kommt es hier bei einer Entzündung zu einer um den Faktor drei stärkeren Anfärbung der Zellen als bei einer AIH. Dennoch macht die hohe Standardabweichung, die ebenfalls für die „normalen“ Patienten innerhalb der Portalfelder sehr hoch ist, eine eindeutige Diagnose zwischen einer AIH und einer Entzündung nicht möglich. Gleiches gilt für den periportalen Feldtyp.

Die Auswertung des Grading und Stagings in Zusammenhang mit den reaktiven und absoluten Werten der angefärbten Zellen brachte keinen weiteren Aufschluss, genau wie die serologischen Marker (jeweils die Antikörper-, Transaminasen- und Immunglobulintiter), die wie bereits zuvor mit CD8 und CD20 mit den positiven Zellen zusammen untersucht wurden (Abbildung A16, A17, A18, A19, A20). Dazu wurden sie gegen die relativen und absoluten Werte der positiven Zellen aufgeführt. Folgend wurden auch bei CD138 keine Korrelationen zwischen den bei der AIH als „probable“ bezeichneten Patienten und ihren absoluten und relativen Werten der positiven Zellen gefunden (Abbildung A21).

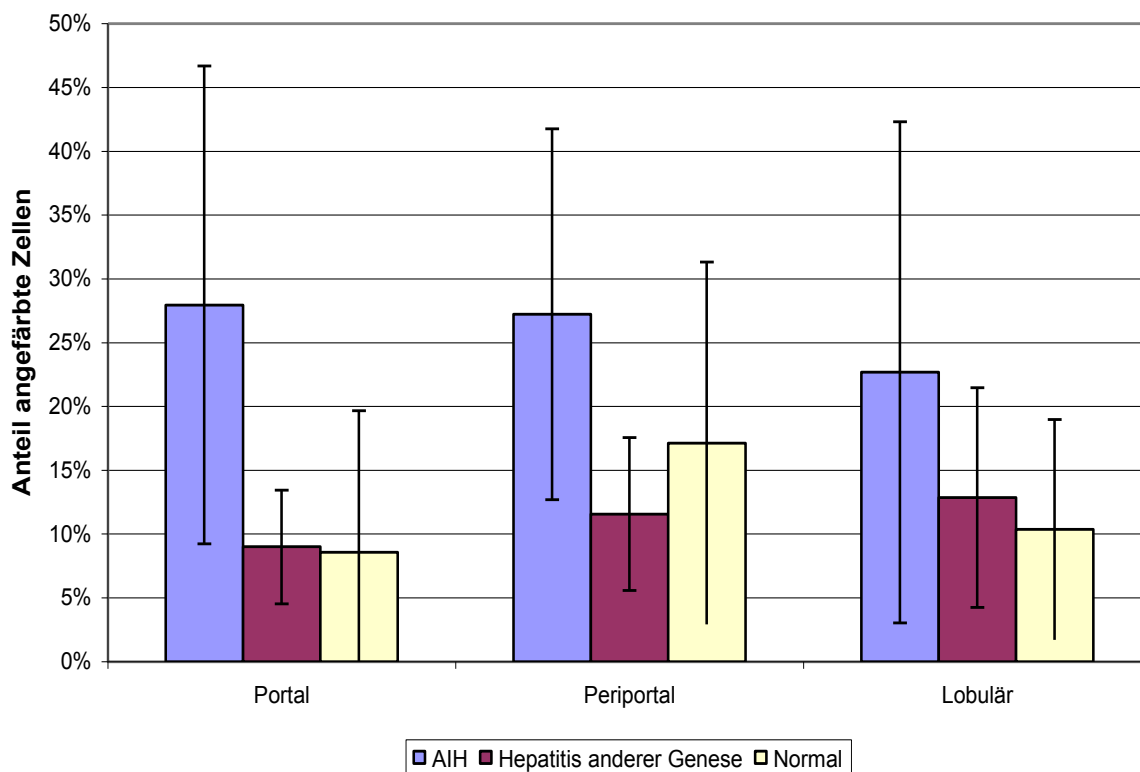


Abbildung 10: CD138, Übersicht nach Feldtyp

3.4 Korrelation von Simplifiziertem Score System mit Staging und Grading

Die Abbildung 11 soll eine eventuell vorhandene Korrelation zwischen den Punkten des Simplifizierten Score Systems für jeden AIH Patienten bzgl. des histopathologischen Stagings

und Gradings zeigen. Es existieren keine Anzeichen eines Zusammenhangs zwischen einem hohen oder niedrigen Score Wert und dem Staging oder Grading, dies zeigt sich zusätzlich besonders bei Patient 2 und 12 in einem hohen Score trotz eines geringen Grading und Stagings mit dem Wert 0.

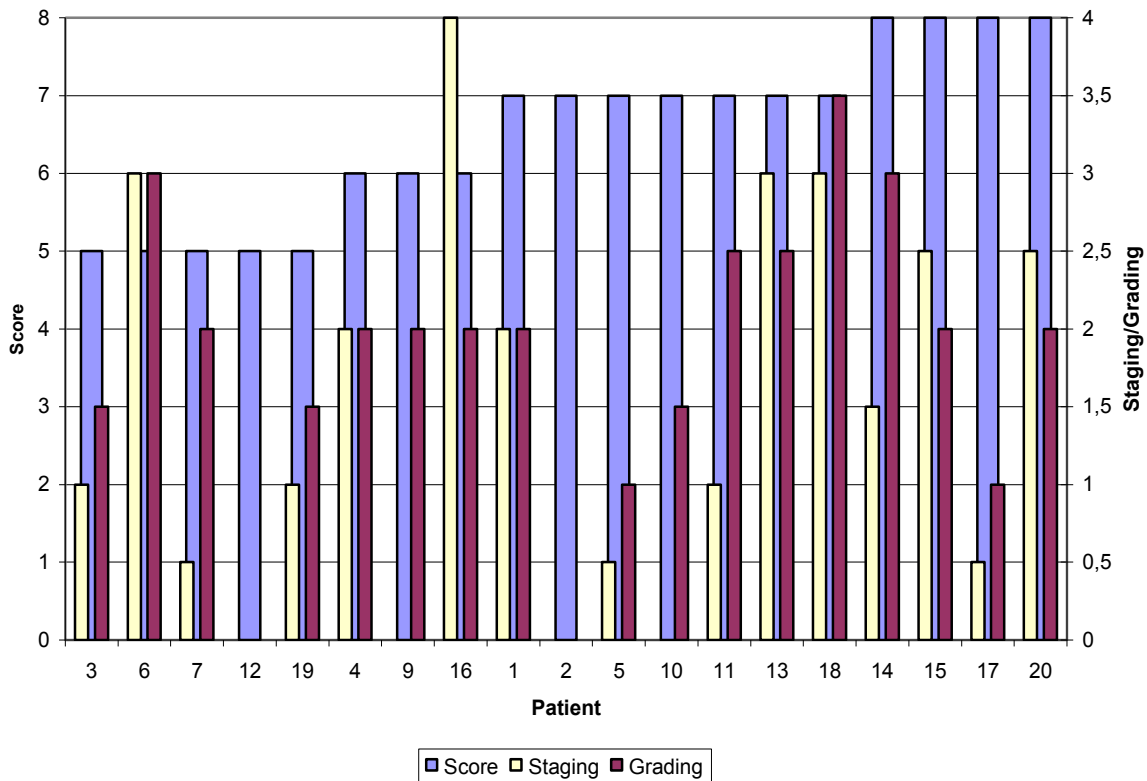


Abbildung 11: Score im Vergleich zu Staging und Grading

3.5 Autoantikörper im Vergleich zu Staging und Grading

Der Autoantikörpertiter wird dem Staging und Grading gegenüber gestellt (Abbildung 12). Es wurden alle Patienten bedacht, deren Referenzbereich bei $\geq 1:80$ liegt und damit eine pathologische Erhöhung aufweist. Dabei wurden die Autoantikörperwerte zur besseren Übersicht logarithmisch dargestellt. Es konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

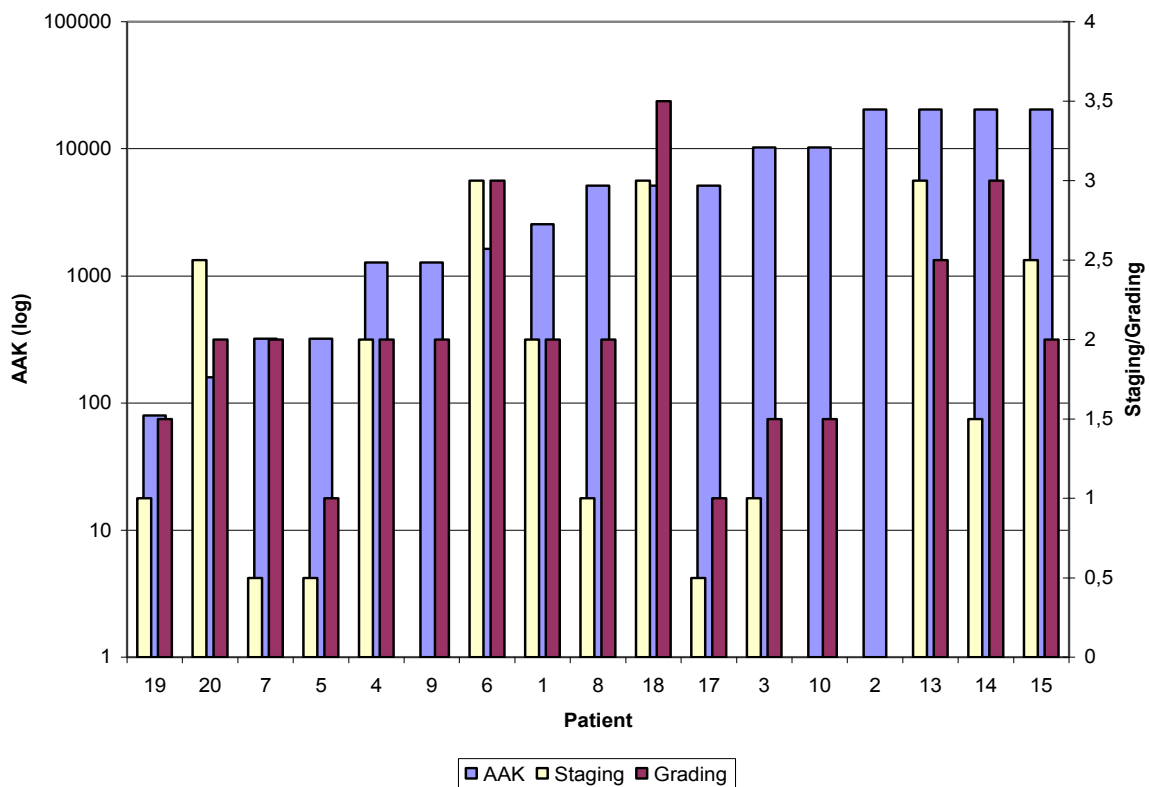


Abbildung 12: Autoantikörper (AAK) im Vergleich zu Staging und Grading

3.6 Simplifiziertes Score System im Vergleich zu Transaminasen

Die leberspezifischen Transaminasen GOT bzw. GPT werden hier mit der Punkteskala des Simplifizierten Score Systems verglichen. Die Werte der Transaminasen wurden zur besseren Veranschaulichung logarithmisch dargestellt. Auffällig ist, dass GPT und GOT Werte bei vielen Patienten in ähnlichen Bereichen liegen, jedoch nicht im Zusammenhang mit dem Score-System stehen (Abbildung13).

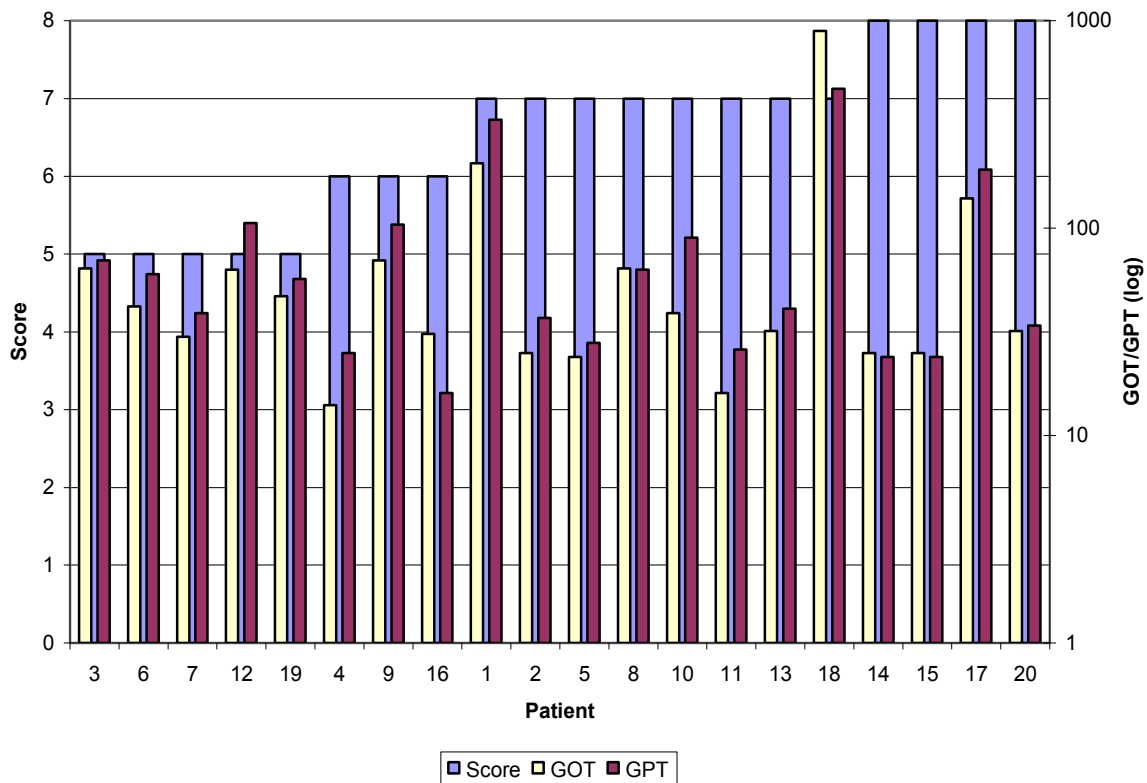


Abbildung 13: Score im Vergleich zu GPT und GOT

Des Weiteren ergaben sich im Verlauf der Arbeit folgende Ergebnisse, die nachfolgend eine Erwähnung verdienen:

3.7 Simplifiziertes Score System im Vergleich mit Originalem

Es wurde eine Tabelle 14 gemäß des Simplifizierten Score-Systems mit Patienten erstellt, die zuvor alle nach dem Originalen Score System mit einer AIH befundet wurden. Anhand der vorliegenden serologischen und histologischen Daten wurden gemäß des Simplifizierten Score Systems die Bewertungspunkte für jeden Patienten erhoben. Da zusätzlich weitere serologische Daten für alle Patienten vorlagen, wurde die Tabelle 15 um die Werte alkalische Phosphatase (AP), GGT, Autoantikörper AMA (Antimitochondrale Antikörper) und M2-Mitoblot erweitert. Hier zeigte sich, dass Patienten, die mit einem Score von 7 und somit mit einer „definitiven“ AIH bezeichnet werden, keine weiteren dieser serologischen Marker aufwiesen. Die mit einem Score von 5 oder 6 als „probable“ bezeichneten hingegen zeigten punktuell deutlich erhöhte Werte.

Immunprofil der Autoimmunhepatitis

Tabelle 14: Auswertung nach Simplifiziertem Score System

Pat.	ANA or SMA titers ≥ 1:80 [1:]	LKM ≥1:40	SLA = positiv	Score	IgG > 10% über UNL	Score	Leber histologisch: compatibel	Score	Leber histologisch: typical	Score	Ausschluss of viral hepatitis	Summe ingesamt
1	2560	negativ	negativ	2	24,58	2	+	1	-	0	2	7
2	20480	negativ	negativ	2	/	/	-	0	+	2	2	7
3	10240	negativ	negativ	2	/	/	+	1	-	0	2	5
4	1280	negativ	negativ	2	/	/	-	0	+	2	2	6
5	320	negativ	negativ	2	/	/	-	0	+	2	2	7
6	1640	/	negativ	2	/	/	+	1	-	0	2	5
7	320	negativ	/	2	/	/	+	1	-	0	2	5
8	5120	negativ	negativ	2	29,01	2	+	1	-	0	2	7
9	1280	negativ	negativ	2	/	/	+	1	-	0	2	6
10	10240	negativ	negativ	2	21,56	2	+	1	-	0	2	7
11	/	negativ	positiv	2	3936	2	+	1	-	0	2	7
12	20480	negativ	negativ	2	/	/	+	1	-	0	2	5
13	20480	negativ	negativ	2	28,3	2	+	1	-	0	2	7
14	20480	negativ	negativ	2	24,88	2	-	0	+	2	2	8
15	20480	negativ	negativ	2	24,88	2	-	0	+	2	2	8
16	/	negativ	negativ	k.A.	22,71	2	-	0	+	2	2	6
17	5120	negativ	negativ	2	26,13	2	-	0	+	2	2	8
18	5120	negativ	negativ	2	30,44	2	-	1	+	0	2	7
19	80	negativ	positiv	2	/	/	+	1	-	0	2	5
20	160	negativ	negativ	2	21,9	2	-	0	+	2	2	8

Immunprofil der Autoimmunhepatitis

Tabelle 15: Simplifiziertes Score System: Zusätzliche Daten

Pat.	Summe insgesamt	AMA positiv	M2 Mitoblott	Histopathologisch (Zusätzliche Verdachtsdiagnosen)	GGT	AP	Bewertung	GGT	Bewertung
1	7	/	/	/		/	/	/	/
2	7	/	/	/		/	/	/	/
3	5	1:320	positiv	/		92	-	18	-
4	6	/	positiv	/		236	++	35	+
5	7	/	/	/		/	/	/	/
6	5	1:640	negativ	/		182	+	97	++
7	5	1:1280	positiv	PBC Verknüpfung		96	-	65	++
8	7	/	/	/	/	/	/	/	/
9	6	/	/	PBC,PSC,Overlap		82	-	90	++
10	7	/	/	/	/	/	/	/	/
11	7	/	/	/	/	/	/	/	/
12	5	1:20480	positiv	PBC		255	++	242	++
13	7	/	/	/	/	/	/	/	/
14	8	/	/	/	/	/	/	/	/
15	8	/	/	/	/	/	/	/	/
16	6	negativ	negativ			75	-	31	-
17	8	/	/	/	/	/	/	/	/
18	7	/	/	/	/	/	/	/	/
19	5	/	/	PSC		89	-	117	++
20	8	/	/	/	/	/	/	/	/

4 Diskussion

Die Autoimmunhepatitis ist eine Erkrankung, für die es bis heute keinen biochemischen oder klinischen Test gibt, der eine sichere Diagnose ermöglicht. Zur Verbesserung und Absicherung der Diagnose wurde 1992 von der International Autoimmune Hepatitis Group ein Score System entwickelt [10]. Innerhalb dieses Systems werden verschiedene histopathologische Erscheinungsbilder hinsichtlich ihrer diagnostischen Relevanz bewertet. Dennoch bleibt das Problem bestehen: Es gibt keine spezifischen histologischen Merkmale für die AIH [25]. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, ob die Möglichkeit besteht, durch den Einsatz von immunhistochemischen Markern die histopathologische Diagnostik der autoimmunen Hepatitis zu verbessern. Ferner sollte eine mögliche Korrelation zwischen immunhistologischen und histopathologischen Parametern sowie klinischen Daten überprüft werden.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Antikörper CD8, CD20, CD25, CD56, CD138, IgG4 verwendet. Der fehlende Nachweis von CD 56, CD25 und IgG4 zeigt, dass Zellen mit der Expression dieser Antikörper bei der AIH nicht auftreten. Diese Information ist relevant für folgende Forschungsprojekte auf diesem Gebiet, da hier bereits ein Ausschluss dieser Zellen vorgenommen werden kann. Die Verwendung speziell von IgG4 wurde vorgenommen, da ein Auftreten in anderen Autoimmunerkrankungen wie der autoimmunen Pankreatitis oder der Cholangitis zu verzeichnen ist. Von daher wurde ein eventuelles Auftreten in der AIH vermutet. Da es zu keiner Anfärbung kam, ist das Vorliegen eines anderen IgG-Subtyps bei der autoimmunen Hepatitis wahrscheinlich, denn die Hypergammaglobulinämie stellt ein wichtiges diagnostisches Kriterium der AIH dar [38]. Dahingehend sollten sich Untersuchungen auf die Überprüfung einer Anwesenheit von IgG1-3 exprimierenden Zellen anschließen. Allerdings ist hierzu zu erwähnen, dass die Anitmitochondralen Antikörper (AMA), welche primär auf eine PBC schließen lassen, sich überwiegend aus den IgG3 und IgG2 rekrutieren [39]. Hier wäre interessant, ob bei einem Nachweis von IgG2-3, da normalerweise keine AMAs mit einer AIH vergesellschaftet sind, sondern überwiegend ANA und SMA, dennoch ein Zusammenhang mit einer AIH vorliegt.

Durch die Antikörperfärbungen CD8, CD20 und CD138 konnte gezeigt werden, dass Zellen, welche diese Antikörper exprimieren, in der AIH existieren. Dennoch konnte keine eindeutige Korrelation zwischen den gefärbten Zellen und der Diagnose festgestellt werden. Aus diesem

Grund wurde auch die Lokalisation der angefärbten Zellen betrachtet. Zwar lassen sich auch hier keine deutlichen Differenzierungen zwischen einer AIH und einer Hepatitis anderer Genese innerhalb einer Färbung vornehmen, aber auffällig ist, dass bei der Färbung CD8 bei einer Autoimmunhepatitis die doppelte Anzahl an Zellen innerhalb der Portalfelder als bei einer Entzündung angefärbt wurden. Zusätzlich liegen die Überschneidungen der Fehlerindikatoren nur etwa bei 15 %. Dieses ist aus Abbildung 6 auf Seite 32 zu ersehen. Für CD 20 ließ sich ein ähnlicher Zusammenhang betrachten. Hier wurden bei den Entzündungen annähernd 2,5 mal so viele Zellen innerhalb der Periportalfelder als bei einer AIH als positiv gewertet. Die Überschneidung der Fehlerbalken liegt hier bei ca. 20% (Abbildung 8). Im Vergleich dazu fällt für CD138 auf, dass die innerhalb der Portalfelder angefärbten Zellen bei den Hepatiden anderer Genese um ca. Faktor drei höher sind als bei den AIHs (Abbildung 10). Dennoch lässt ein großer Fehlerbalken eine Differenzierung, wie sie eventuell bei der Färbung CD8 oder CD20 möglich scheint, nicht zu. Obwohl die Lokalisation der positiven Zellen in dieser Arbeit noch nicht zu einem eindeutigen Ergebnis führen, welches bei der Diagnostik einer AIH helfen kann, könnten diese Beobachtungen in einer separaten Studie mit anderen Patienten nochmals gezielt weiterverfolgt und überprüft werden. So könnte beispielsweise eine gezielte Nachprüfung der Antikörperfärbung CD20 bezogen auf die Lokalisation der angefärbten Zellen im periportalen Bereich und einem annähernd gleichen Ergebnis wie in Abbildung 8 zu einer Weiterentwicklung des Score-Systems im Rahmen der histologischen Betrachtung führen. Dieses annähernd gleiche Ergebnis hätte zur Folge, dass bei einer Antikörperfärbung mit CD20 lediglich die periportalen Bereiche betrachtet werden müssten. Dieses könnte über einen generellen Punktverlust im histologischen Bereich des Scoring Systems in die Diagnostik mit einfließen.

Im Rahmen der histologischen Diagnostik sowohl einer AIH als auch einer Hepatitis anderer Genese wurden Grading und Staging Befunde erhoben, um die Progression der jeweiligen Erkrankung zu beurteilen. Die Erwartung, dass bei steigenden Grading- und Stagingbewertungen auch die Anzahl der positiven Zellen steigt, konnte lediglich für die absoluten Werte annähernd bestätigt werden (Abbildung A2, A9, A16). Dennoch blieben erhoffte Besonderheiten aus bzw. konnten auf das Datenmaterial zurückgeführt werden. So konnte gezeigt werden, dass weder Grading noch Staging einen Bezug zu den relativen oder absoluten Zahlen der positiven Zellen haben. Andererseits sei hier angemerkt, dass die Exaktheit der Bewertung der verschiedenen Entzündungs- und Fibrosegrade auch subjektiven

Gesetzmäßigkeiten unterliegen kann. Beispielsweise spielen die Erfahrung des auswertenden Pathologen, das Biopsat oder auch der Gewebeausschnitt, der sowohl Zeichen des einen als auch des anderen Stadiums in sich vereinen kann, eine Rolle.

Anschließend wurden diagnostisch wichtige serologische Daten in Verbindung zu den einzelnen Färbungen gesetzt. Hierfür wurden immunoserologische Marker gewählt, wie die Autoantikörper [6], die leberspezifischen Transaminasen, GOT und GPT, welche wie das Immunglobulin IgG in Form einer Hypergammaglobulinemia Merkmale einer chronischen Lebererkrankung sind [27]. Die deshalb verwendeten Autoantikörper, die Transaminasen und die IgG wurden ins Verhältnis zu den relativen und absoluten Werten der entsprechenden AIH Patienten gesetzt. Für die Kombination mit den Autoantikörpern ANA/SMA und den relativen und absoluten Werten der angefärbten Zellen erhoffte man sich wenigstens einen Musterverlauf, der steigende Autoantikörpertiter mit vermehrten positiven Zellanhäufungen beinhaltet. Doch weder dieses noch andere nennenswerte Beobachtungen zeigten sich für CD8, CD20 oder CD138. Dies lässt darauf schließen, dass die Autoantikörper nicht in Bezug zu den CD8, CD20 oder CD138 exprimierenden Zellen stehen (Abbildung A3, A10, A17). Auch die Transaminasen GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, und GPT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, welche im Rahmen einer Destruktion der Leberzellen ins Blutserum freigesetzt werden und somit definitive Marker einer Lebererkrankung sind, lassen keine Korrelation mit diesen Zellen zu. Es lagen dieselben Musterverlaufvorstellungen wie zuvor bei den Antikörpern vor, nämlich dass steigende Titer auch vermehrte Zellanfärbungen nach sich ziehen. Auch hier zeigten die Untersuchungen lediglich das Ergebnis, dass die Anfärbung der Zellen die CD8, CD20 oder CD138 unabhängig von den Transaminasen agieren. Selbige Erwartungen und Ergebnisse sind auch bei den Immunglobuline zu finden (Abbildung A4-A6, A11-A13, A18-A20). Dennoch lässt sich abschließend feststellen, dass trotz ausreichender Prüfung der vorhandenen Werte eine weitere Verfolgung neuer Ergebnisse zwecks weiterführender Studien nicht indiziert ist und dass diese serologischen Marker unabhängig von den Antikörperfärbungen CD8, CD20 und CD138 sind.

Im Verlauf der Arbeit ließ sich erkennen, dass einige der zuvor nach dem Originalen Score System als Patienten mit einer definitiven AIH befundet wurden, nach dem neuen Simplifizierten System lediglich eine „probable“ AIH aufwiesen. Aus diesem Grund wurden bei diesen Patienten die relativen und absoluten Werte für gefärbte Zellen der Score

Bewertung gegenübergestellt. Es bestätigte sich nicht, dass Patienten mit denselben Scorebewertungen annähernd gleiche relative bzw. absolute Werte ihrer angefärbten Zellen erzielen. Auch hier zeigt sich, dass das Simplifizierte Score System und die Antikörperfärbungen CD8, CD20 und CD138 unabhängig von einander sind (Abbildung A7, A14, A21).

Dementsprechend wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, die einen Vergleich zwischen den Bewertungspunkten des Simplifizierten Score System bezogen auf die Autoantikörpern oder Transaminasen ermöglichen sollen. Hohe Punktzahlen wurden mit hohen Transaminase bzw. Antikörperwerten assoziiert. Es lässt sich festhalten, dass Autoantikörper ein Bestandteil des Simplifizierten Score Systems sind und die leberspezifischen Transaminasen im Rahmen einer Leberdestruktion auftreten, jedoch kein hoher Punktwert einen hohen Autoantikörper- oder Transaminasentiter nach sich zieht.

In Erwartung, dass bei ansteigenden Grading und Staging Werten der AIH Patienten ebenfalls ein Anstieg ihrer Autoantikörper resultieren würde, wurden diese übereinander aufgeführt. Es konnte belegt werden, dass kein Zusammenhang zwischen dem Grading und Staging der AIH und ihren Autoantikörpern besteht.

Daher besteht eher die Möglichkeit einer eventuellen falsch positiv gewerteten Diagnostik. Es konnte gezeigt werden, dass das Simplifizierte Score System trotz geringerer Detailliertheit bezüglich Anzahl der Bewertungskriterien sowie geringerer Differenzierungen innerhalb einzelner Kriterien eine genauere Unterscheidung zwischen Patienten mit einer AIH und solchen mit einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC), einer primär biliären Zirrhose (PBC) oder einem Overlap Syndrom, welches die Überschneidung zwischen AIH, PBC und PSC darstellt, zulässt. Patienten, die durch den Simplifizierten Score mit einem Wert von 5-6 Punkten eingestuft wurden, welches eine „probable“ AIH beschreibt, wurden, waren mit dem Originalem System als „definitive“ AIH eingestuft worden. Die Überprüfung der Validität erfolgt durch weitere klinische Parameter wie der alkalischen Phosphatase (AP), GGT, den Autoantikörpern AMA und M2-Mitoblot. Diese Parameter erlauben eine Abgrenzung zu den oben genannten Differentialdiagnosen. Diese Werte wurden für die als „probable“ eingestuften Patienten kontrolliert und mit den ergänzenden histopathologischen Anmerkungen, die sich während der Befundung der Pathologen ergaben, verglichen. Es zeigte

sich, dass für die nach dem Originalen Score als definitive AIH eingestuften Patienten, die allerdings nach dem Simplifizierten Score lediglich einer „probable“ AIH angehören, entsprechende Verweise auch in der histopathologischen Bewertung auf eine mögliche PBC, PSC oder ein Overlap-Syndrom existieren. Es zeichnet sich also die Möglichkeit einer eindeutigeren Differenzierung zwischen AIH und PBC beziehungsweise PSC für das Simplifizierte Score System ab. Aus unseren Analysen erscheint es daher sinnvoll, zukünftig in das Bewertungssystem des Simplifizierten Scores weitere Werte wie die alkalische Phosphatase, GGT, die Antikörper M2-Mikroblot und AMA aufzunehmen, um eine genauere Diagnostik bezüglich der „probable“ AIH zu gewährleisten. Abschließend ist hier anzumerken, dass sich das Originale System im klinischen Alltag in der Ablösung durch das Simplifizierte befindet, da es trotz der geringeren Zahl an zu untersuchenden Kriterien, dennoch zu einem, wie sich auch in dieser Arbeit zeigte, repräsentativen Ergebnis kommt.

5 Ausblick

Das Bestreben, eine Autoimmunhepatitis direkt diagnostizieren zu können ohne Ausschlusskriterien anwenden zu müssen, wird weiterhin bestehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es für die Antikörper Färbungen CD25, CD56 und IgG4 zu keiner Reaktion bzgl. der Färbung kommt. Für CD25 und CD56 bedeutet diese einen Ausschluss der mit ihnen in Verbindung stehenden Zellen für die Autoimmunhepatitis. Im Rahmen der Hypergammaglobulinämie, welche ein diagnostisches Kriterium einer AIH darstellt, zeigt diese Untersuchung, dass ein anderer Subtyp für IgG vorliegen muss als IgG4. Hier besteht die Möglichkeit, dass sich mit dem Auffinden des Subtyps die Diagnostik erheblich erleichtern lässt, wie es bei der autoimmunen Pankreatitis in Studien gezeigt wurde. Dort ist es bereits in einem Teil der Fälle möglich, zwischen einer durch Alkohol induzierten chronischen Pankreatitis und einer autoimmunen durch eine Antikörperfärbung mit IgG4 zu unterscheiden. Hier sei angemerkt, dass auch IgG4 negative AIP Fälle existieren. In diesem Bereich sollten also weitere Studien folgen, da sich hieraus eine große diagnostische Hilfe entwickeln könnte.

Die Untersuchung der Expression von CD8, CD20 und CD138 lassen vermuten, dass eventuell aufgrund der Lokalisationen eine weitere Eingrenzung möglich sein könnte. Hierzu sollten weitere Studien angefertigt werden.

Trotz der bisherigen Forschungsergebnisse gelang es noch nicht, eine definitive Diagnostik für die Autoimmunhepatitis auch auf histologischer Ebene zu entwickeln. Der momentane Kenntnisstand erlaubt lediglich eine auf Basis von Ausschlusskriterien getroffene Diagnose. Auch unsere Untersuchungen lassen keinen Zusammenhang zwischen Antikörperprofil und den geprüften serologischen Markern (Antikörper, Transaminasen und Immunglobuline), dem histologischen Grading und Staging sowie den Bewertungsergebnissen des Simplifizierten Score Systems erkennen. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass keine Korrelation zwischen dem Simplifizierten Score System und dem Grading und Staging bzw. den Transaminasen GOT und GPT besteht. Dieser Ansatz zur Erleichterung der Diagnostik der AIH erweist sich damit als nicht praktikabel.

Zusätzlich bestätigt die Arbeit bereits durchgeführte Studien zum Simplifizierten Score [18, 20], die zeigten, dass dieser sich nicht nur durch seine leichte Handhabung im klinischen

Alltag bewehrt, sondern auch im Rahmen der Differenzierung zwischen AIH und anderen Erkrankungen erfolgreich ist. Es sollte darüber nachgedacht werden, einheitlich das Originale Score System durch das Simplifizierte im klinischen Gebrauch zu ersetzen.

6 Anhang

CD8

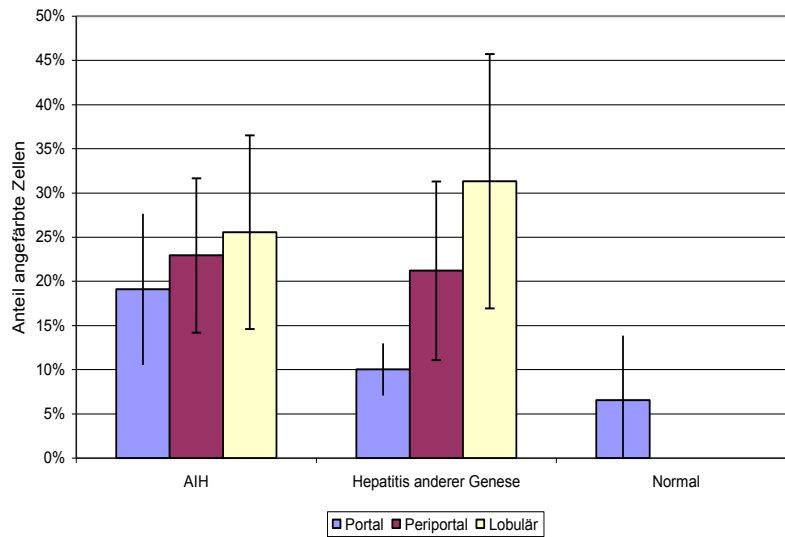


Abbildung A1: CD8, Übersicht nach Diagnose

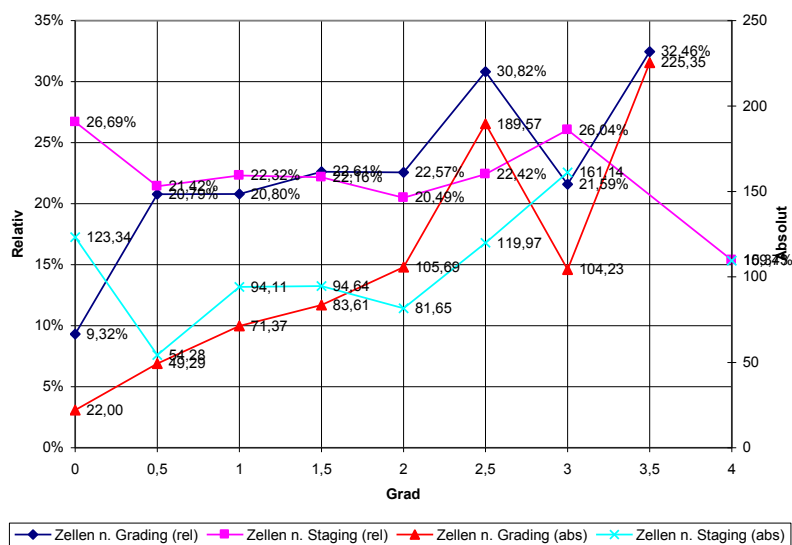


Abbildung A2: CD8, gefärbte Zellen über Fibrose- und Entzündungsgrad

Immunprofil der Autoimmunhepatitis

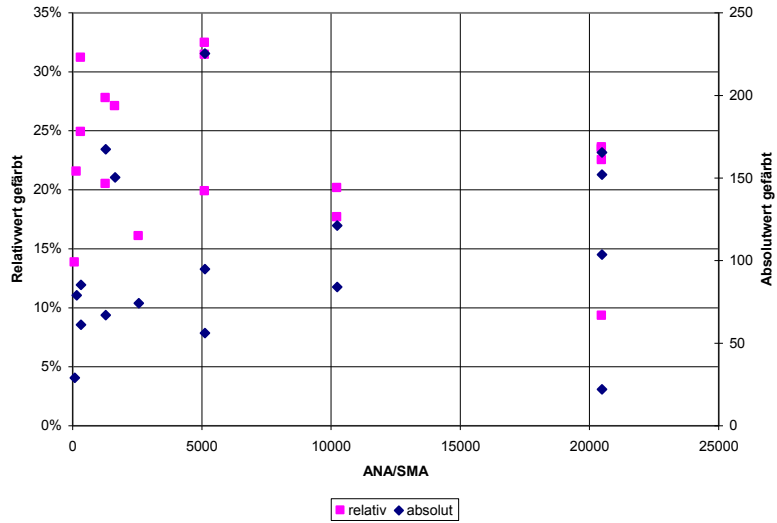


Abbildung A3: CD8, gefärbte Zellen über Antikörper

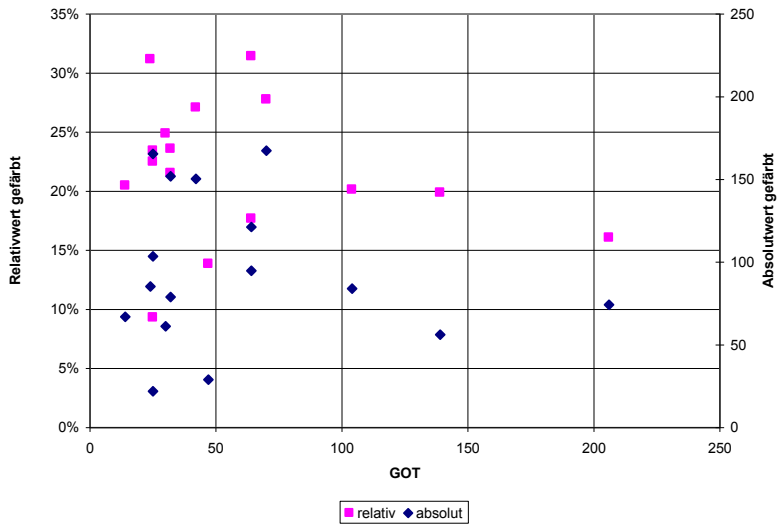


Abbildung A4: CD8, gefärbte Zellen über Transaminase

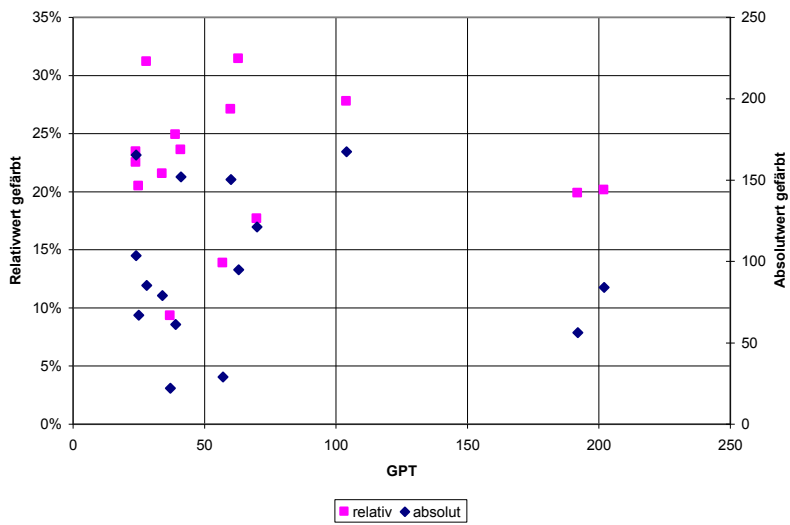


Abbildung A5: CD8, gefärbte Zellen über Transaminase

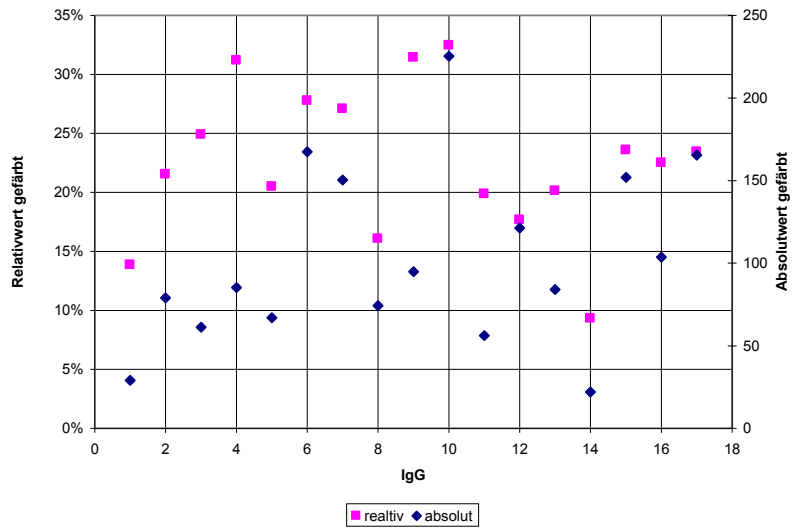


Abbildung A6: CD8, gefärbte Zellen über Immunglobulin

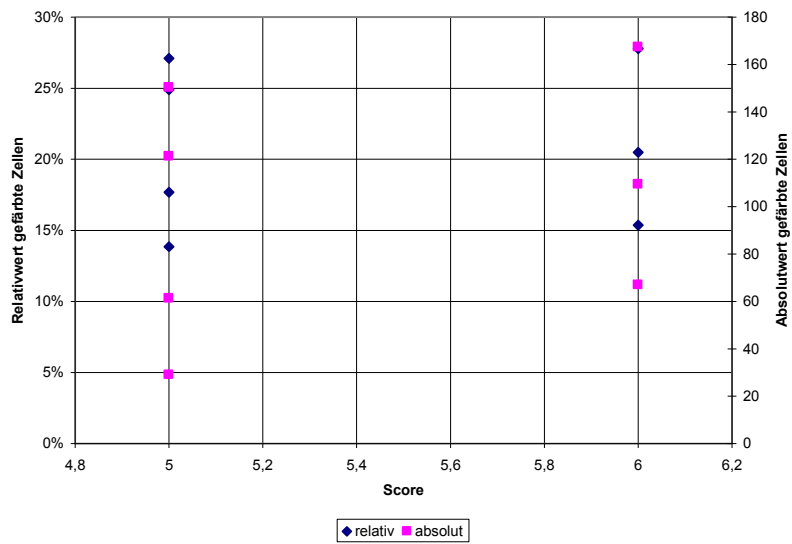


Abbildung A7: CD8, gefärbte Zellen über Score (probable AIH)

CD20

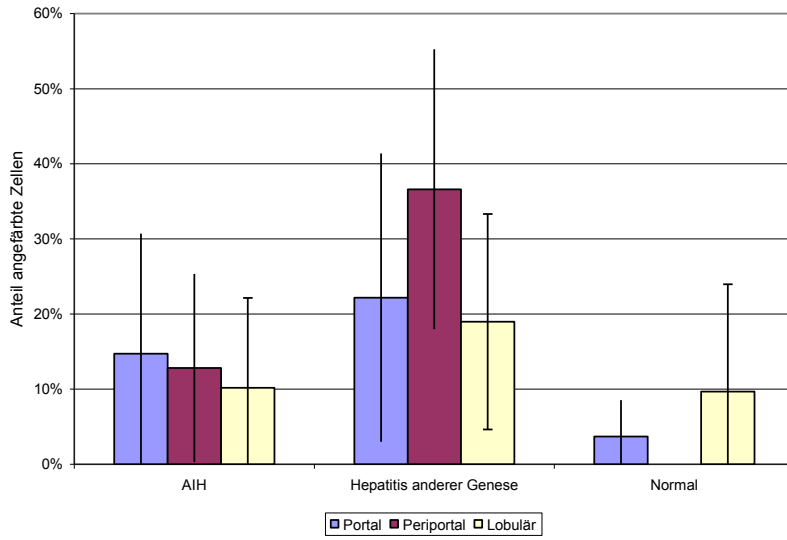


Abbildung A8: CD20, Übersicht nach Diagnose

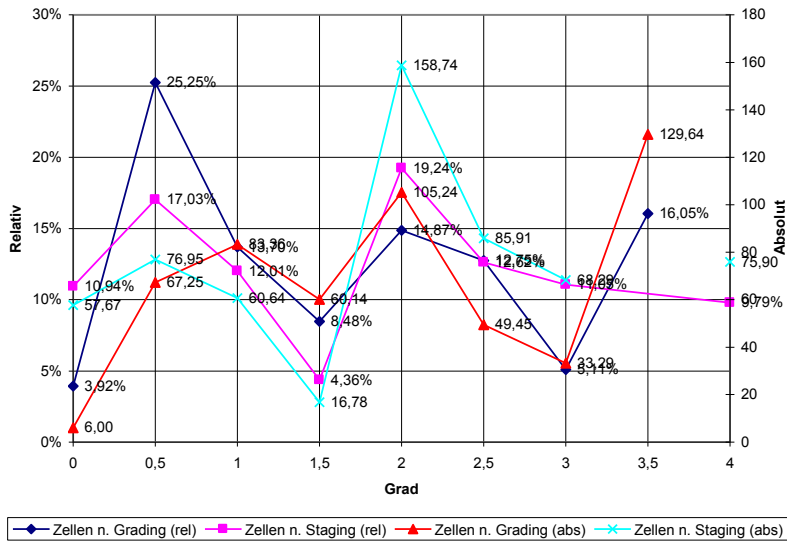


Abbildung A9: CD20, gefärbte Zellen über Fibrose- und Entzündungsgrad

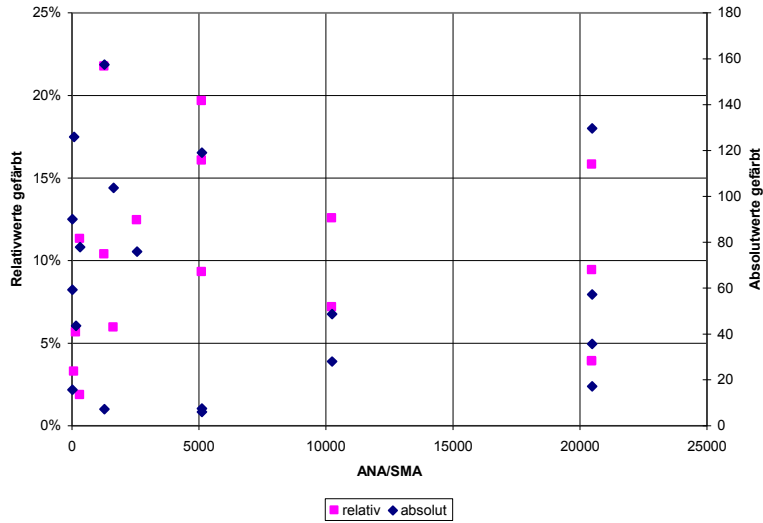


Abbildung A10: CD20, gefärbte Zellen über Antikörper

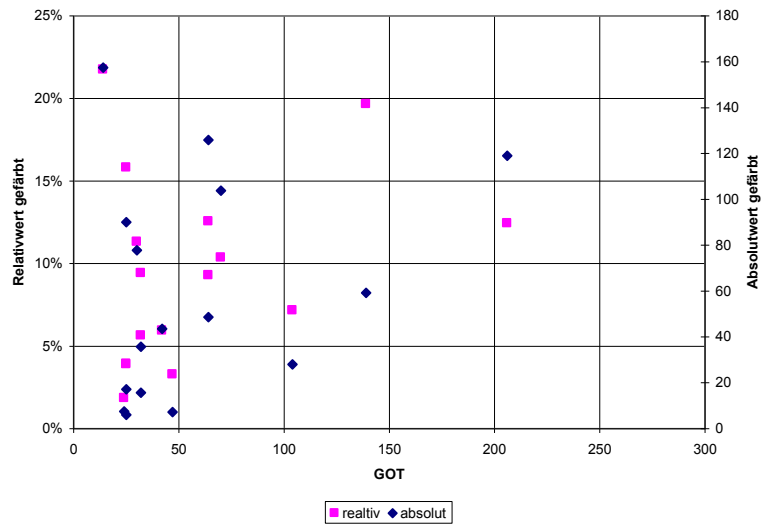


Abbildung A11: CD20, gefärbte Zellen über Transaminase

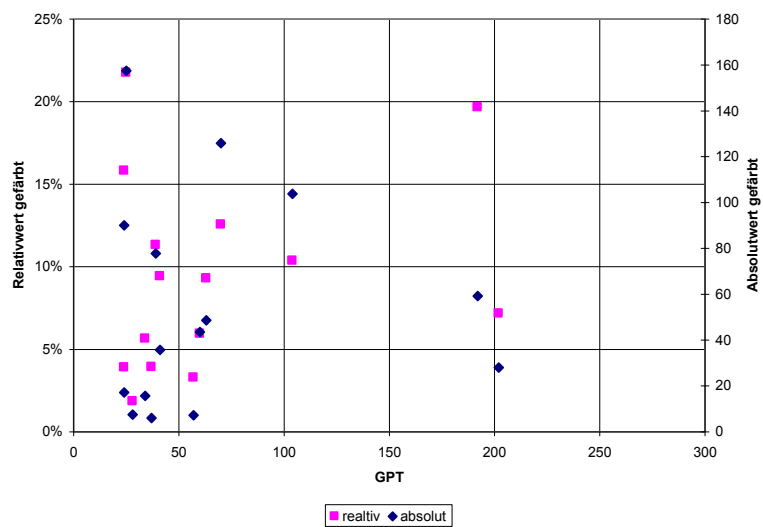


Abbildung A12: CD20, gefärbte Zellen über Transaminase

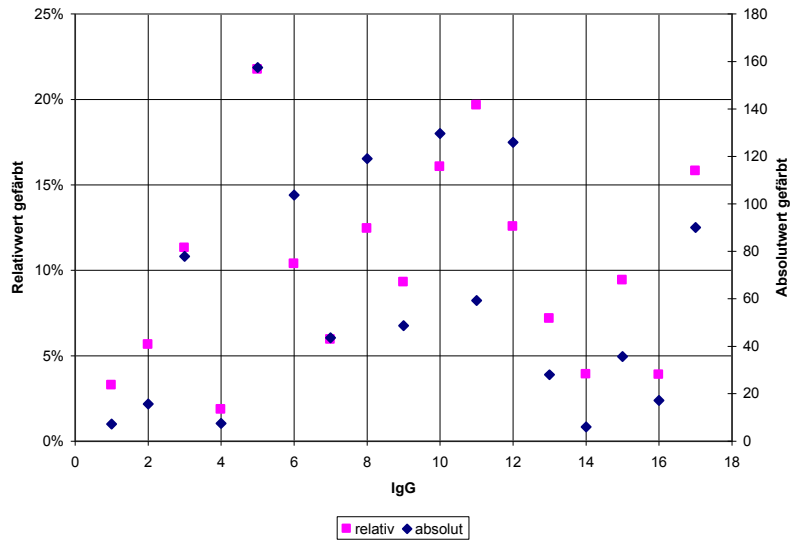


Abbildung A13: CD20, gefärbte Zellen über Immunglobulin

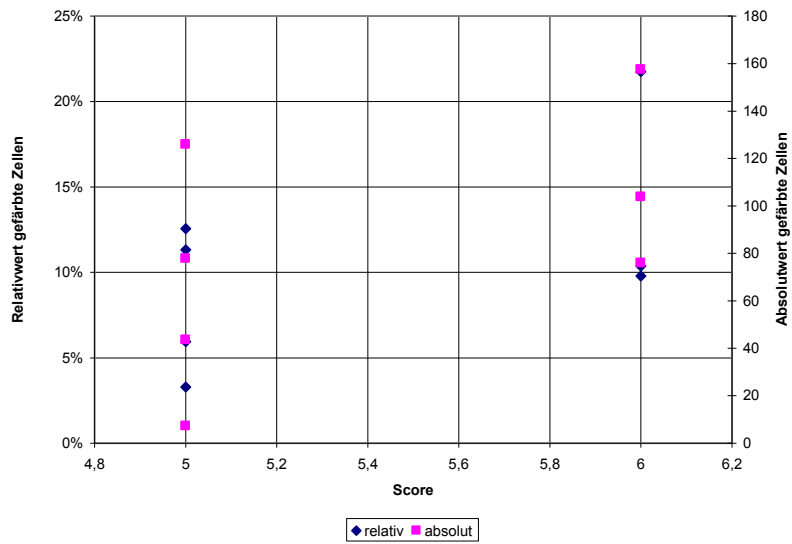


Abbildung A14: CD20, gefärbte Zellen über Score (probable AIH)

CD138

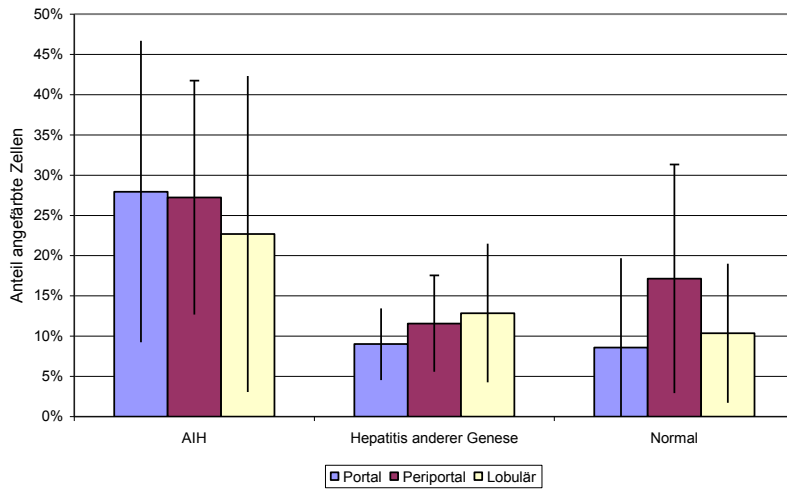


Abbildung A15: CD138, Übersicht nach Diagnose

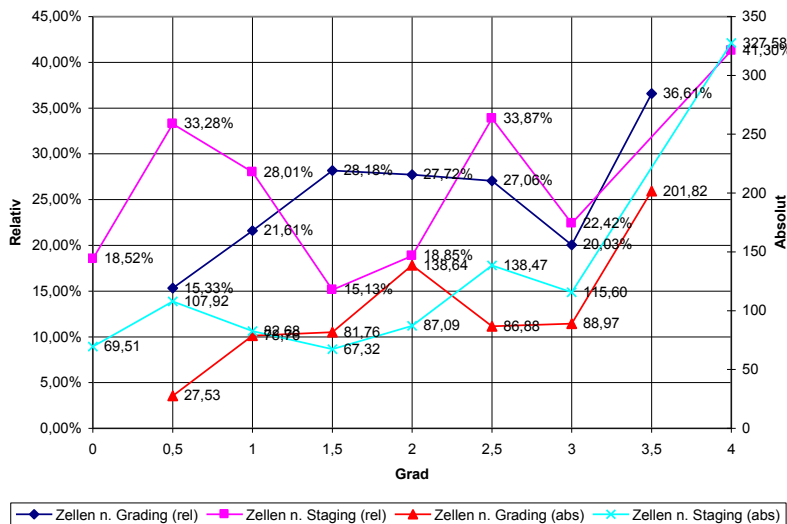


Abbildung A16: CD138, gefärbte Zellen über Fibrose- und Entzündungsgrad

Immunprofil der Autoimmunhepatitis

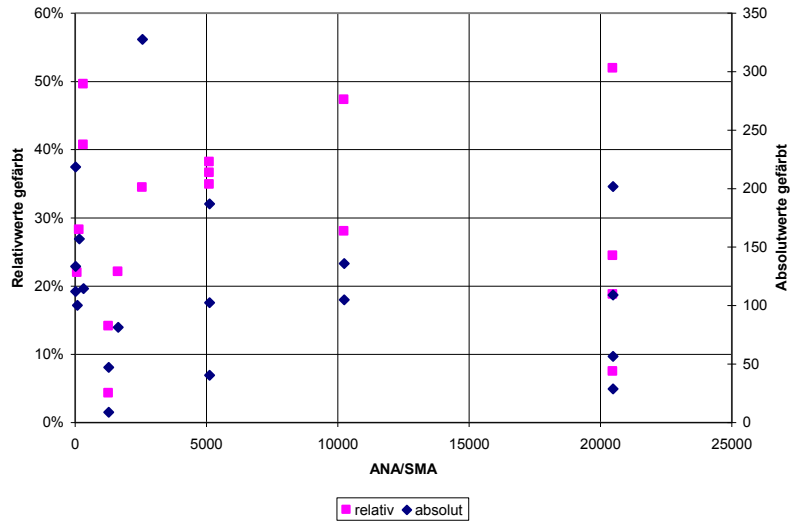


Abbildung A17: CD138, gefärbte Zellen über Antikörper

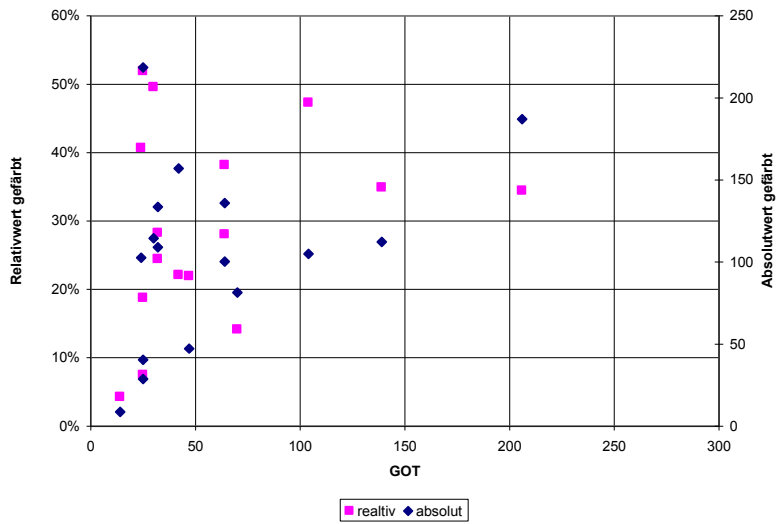


Abbildung A18: CD138, gefärbte Zellen über Transaminase

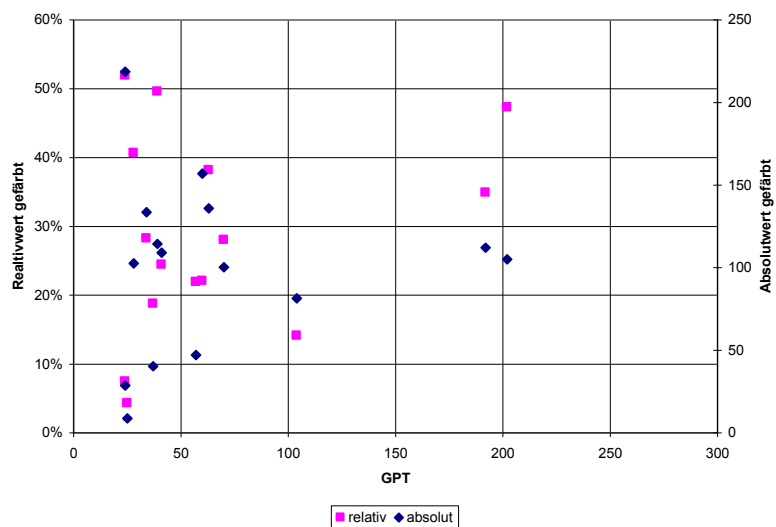


Abbildung A19: CD138, gefärbte Zellen über Transaminase

Immunprofil der Autoimmunhepatitis

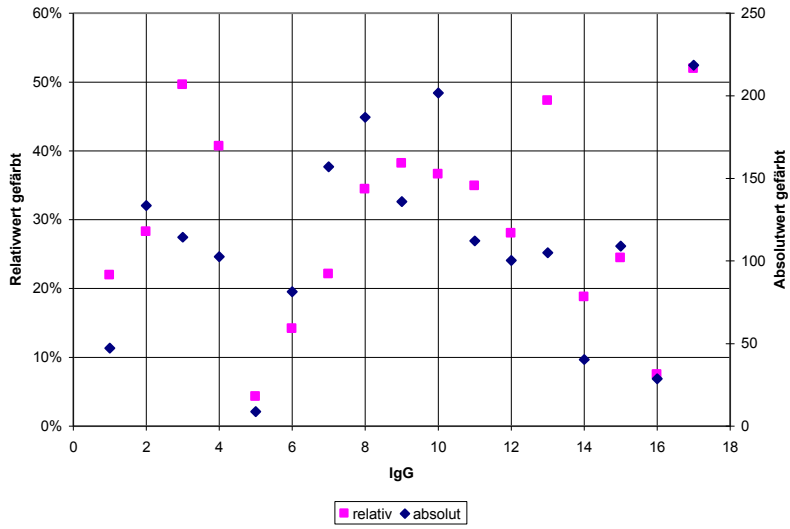


Abbildung A20: CD138, gefärbte Zellen über Immunglobulin

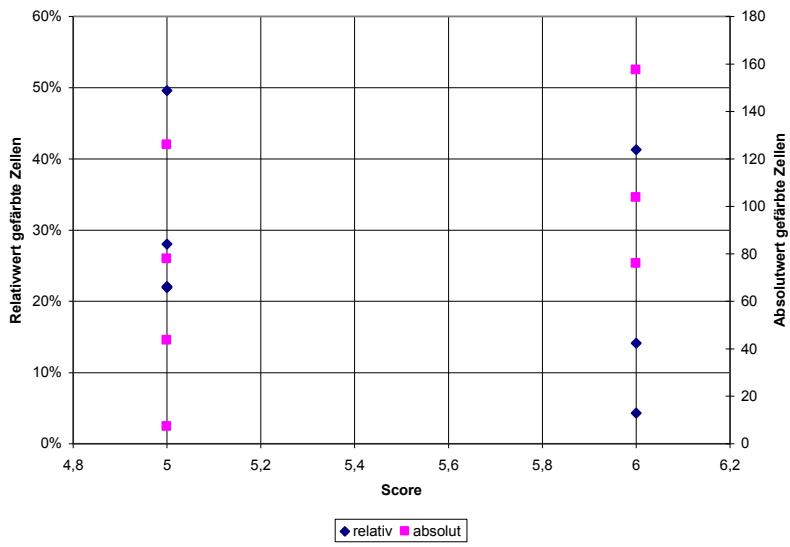


Abbildung A21: CD138, gefärbte Zellen über Score (probable AIH)

7 Literatur

1. Czaja A.J.: Natural history, clinical features, and treatment of autoimmune hepatitis. *Seminars in Liver Disease*, Vol.4 (1984) No.1: 1-12
2. Beuers U., Wiedmann K. H., Kleber G. et al.: Therapie der autoimmunen Hepatitis, primär biliären Zirrhose und primär sklerosierenden Cholangitis. Konsensus der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten für die Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, *Z. Gastroenterol* (1997);35:1042-1049
3. Czaja A.J.: Chronic active hepatitis: the challenge for a new nomenclature. *Ann Intern Med.* (1993); 119: 510-517
4. Gerken G., Manns M., Ramadori G. et al.: Liver membrane autoantibodies in chronic active hepatitis: studies on mechanically and enzymatically isolated rabbit hepatocytes. *J Hepatol* (1987);5:65-74
5. Manns M.P., Rambusch G.(zum Beitrag): Diagnostik der Autoimmunhepatitis. *Med Klin* (1999);94,Nr.5: 279-80
6. Manns M.P., Gerken G., Kyriatsoulis A. et al.: Characterization of new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* (1987); i:292-294
7. Czaja A.J.: Drug therapy in the management of type1 autoimmune hepatitis. *Drugs*, (1999); 57:49-68
8. Czaja A.J.: Autoimmune hepatitis. In: *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*. 6th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Company (1998):1265-1274.
9. Homberg J.-C., Abuaf N., Bernard O. et al.: Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of 'autoimmune' hepatitis. *Hepatology* (1987); 7:1333-1339
10. Teufel A., Galle P.R., Kanzler S.: Update on autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* (2009);15(9):1035-1041
11. Vergani D., Vergani G.M.: Autoimmune hepatitis. *Autoimmunity Reviews* 2 (2003); 241-247
12. Meyer zum Büschenfelde K.-H., Lohse A.W., Manns M. et al.: Autoimmunity and liver disease. *HEPATOLOGY* Vol.12(1990) No.2:354-360
13. Diamantis I., Boumpas D.T. et al.: Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmunity Reviews* 3 (2004):207-214

14. Alvarez F., Berg P.A. et al.: International Autoimmune Hepatitis Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatologie* (1999);31:929-938
15. Czaja A.J., Carpenter H.A.: Validation of scoring system for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Digestive diseases and sciences*, Vol.41 (1996); No.2: 305-314
16. Bianchi F.B., Cassani F. et al.: Impact of International Autoimmune Hepatitis Group scoring system in definition of autoimmune hepatitis- an Italian experience. *Dig Dis Sci*; Vol.41 (1996); No.1: 166-170
17. Koay L.-B. et al.: Type 1 autoimmune hepatitis in Taiwan diagnosis using the revised criteria of the International Autoimmune Hepatitis Group. *Dig Dis Sci* (2006); 51:1978-1984
18. Czaja A.J., Hennes E.M. et al.: Simplified criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *HEPATOLOGY* (2008);48, No.1: 169-176
19. Czaja A.J.: Autoimmune hepatitis: evolving concepts and treatment strategies. *Dig Dis Sci*, Vol. 40(1995), No. 2 : 435-456
20. Czaja A.J.: Performance parameters of the diagnostic scoring systems for autoimmune hepatitis. *HEPATOLOGY*(2008), Vol.48 ,No.5: 1540-1548
21. Dienes H., Erberich H., Dries V. et al.: Autoimmune hepatitis and overlap syndromes. *Clinics in Liver Disease*, Volume 6, Issue 2, Pages 349-362
22. Schirmacher P., Dienes H.P. et al.: Biopsische Diagnostik der chronischen Hepatitis- Ergebnisse einer evidenzbasierten Konsensuskonferenz der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP), der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) und des Kompetenznetzes Hepatitis (HepNet). *Z Gastroenterol* (2004); 42:175-185
23. Desmet V.J., Manns M. et al.: Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *HEPATOLOGY* Vol.19 (1994), No.6: 1513-1520
24. Ishak K., Baptista A. et al.: Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* (1995); 22: 696-699
25. Krawitt E.L.: Clinical features and management of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* (2008);14(No.21):3301-3305
26. Czaja A.J.: Autoimmune chronic active hepatitis- a specific entity? The negative argument. *J Gastroenterol Hepatol* (1990); 5:343-351
27. Burgart L.J., Batts K.P., Ludwig J. et al.: Recent-onset autoimmune hepatitis: biopsy findings and clinical correlations. *Am J Surg Pathol* (1995); 19(No.6): 699-708
28. Meyer zum Büschenfelde K.-H., Dienes H.-P.: Autoimmunhepatitis: definition-classification-histopathology-immunopathologie. *Virchows Arch* (1996) 429:1-12

29. Czaja A.J., Carpenter H.A.: Sensitivity, specificity and predictability of biopsy interpretations in chronic hepatitis. *Gastroenterology* (1993); 105: 1824-1834
30. Dienes H.P., Popper H. et al.: Histologic features in autoimmune Hepatitis. *Z. Gastroenterol* (1989); 27: 325-330
31. Te H.S., Koukoulis G. et al.: Autoimmune hepatitis: a histological variant associated with prominent centrilobular necrosis. *Gut* (1997); 41: 269-271
32. Bach N., Thung S.N., Schaffner F.: The Histological features of chronic hepatitis C and autoimmune hepatitis: a comparative analysis. *HEPATOLOGY* (1992), Vol. 15, No. 4: 572-577
33. Boenisch T. et al.: Immunchemische Färbemethoden. Dako North Amerika, Inc. Carpinteria, CA, USA, 3., Handbuch, unveränderte Auflage 2006: 34-41
34. Gebrauchsanweisung Histofine® Simple Stain MAX PO (R) April 2007, Nichirei Biosciences
35. Böcker, Denk, Heitz: Pathologie, Urban&Fischer Verlag, München, Jena
36. Wojciech Gorczyca, Flow Cytometry in Neoplastic Hematology: Morphologic-Immunophenotypic Correlation. Genzyme Genetics, inform a healthcare, NY, USA
37. Fuchs R.: Maligne Lymphome: Diagnostik Therapie, 2007, Workshop adelaid 2004 St.-Antonius-Hospital Eschweller
38. Zhang L., Notohara K., Levy M.J. et al.: IgG4-positive plasma cell infiltration in the diagnosis of autoimmune pancreatitis. *Modern Pathology* (2007); 20 (issue 1): 23-28
39. Linnemann M.: Autoimmunerkrankung II: primäre biliäre Cirrhose und AMA. *bioscientia* (2003); Bericht 70 :1-11

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pathologie im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein / Campus Kiel, unter der Leitung von Prof. Dr. Christoph Röcken.

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Günter Klöppel für die Ermöglichung dieser Arbeit, die zur Verfügung gestellten verschiedenen Arbeitsplätze sowie die Nutzung der Datenbanken.

Frau PD Dr. Katharina Tiemann danke ich für ihre stets wohlwollende Unterstützung und ihre wertvollen Anregungen. Sie war maßgebend an der Realisierung und Förderung dieser Arbeit beteiligt. Zusätzlich stand sie jederzeit für fachliche Fragen, auch am Wochenende, zur Verfügung.

Für die sehr gute Kooperation im Rahmen der Patienten-Recherche und der Auswertung der klinischen Daten bedanke ich mich bei Oberarzt Dr. Rainer Günther der Klinik für Allgemeine Innere Medizin des Campus Kiel.

Bei Frau Pacena möchte ich mich an dieser Stelle für die Hilfestellungen und Unterweisungen in die medizinisch technischen Gerätschaften bedanken, durch welche die Durchführung dieser Arbeit erst möglich war.

Meinem Freund, Andreas Behn, möchte ich ganz besonders für seine Unterstützung, auch im Rahmen der Realisierung der Reinschrift dieser Arbeit und für die zahlreichen Diskussionen danken.

Weiterer Dank gilt allen Freunden und meiner Familie, die in persönlicher Hinsicht die Entstehung dieser Dissertation gefördert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Janina Gehl
Geburtsdatum:	17.08.1983
Geburtsort:	Neumünster
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

Seit 10/2009	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Promotionsemester
09/2003 – 07/2009	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Studium der Zahnmedizin
08/1994 – 06/2003	Immanuel-Kant-Schule Neumünster Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
07/1990 – 07/1994	Grund- und Hauptschule Wasbek