

Magyar Reumatológia XXI. 22–26. 1980.

A Debreceni Orvostudományi Egyetem Tüdőgyógyászati Klinika (igazgató: Prof. Mihóczy László dr.),
Általános Belgyógyászat (vezető: Prof. Szegedi Gyula dr.) és Kórélettani Intézet (igazgató: Prof.
Kesztyűs Loránd dr.) közleménye

Monocita kemotaxis és limfokin aktivitás systemás lupus erythematosusban

LUKÁCS KATALIN dr., KÁVAI MÁRIA dr., SONKOLY ILDIKÓ dr.,
SIPKA SÁNDOR dr., DEZSŐ BALÁZS dr. és SZEGEDI GYULA dr.

Systemás lupus erythematosusban (SLE) a humorális immunitás zavara mellett károsodott a celluláris immunitás is, melyért újabb adatok szerint [9, 12] nemcsak a limfociták funkciózavara tehető felelőssé, hanem a monociták-makrofágok defektusa is. A mononukleáris fagociták számos fontos funkcióval bírnak az immunrendszerben. Szerepük van a testidegen anyagok antigénné válásában, az immunkomplexek (IC), fertőző ágensek, tönkrement sejtek eltávolításában [14]. A monociták-makrofágok nemcsak járulékos vagy effektor sejtek, az immunreakciókban szabályozó szerepük is van [15], valamint általánosan elfogadott nézet szerint elengedhetetlenek a limfokinek képzéséhez is [10].

A limfokinek a celluláris immunitás potenciális mediátorai [17]. Szerepük a késői típusú hiperszenzitivitásban, a protektív immunitásban, a sejtek közötti kölcsönhatásokban egyaránt megnyilvánul [3].

Mivel a mononukleáris fagociták in vivo migrációja és akkumulációja alapvető fontosságú a fenti funkciók ellátásához, indokoltnak tartottuk a monociták és limfokinek kemotaktikus aktivitásának vizsgálatát systemás lupus erythematosusban.

Betegek és módszerek

Betegek

20 SLE-ben szenvedő beteget vizsgáltunk, akik közül 19 nő és 1 férfi volt. Öt beteg aktív, 15 inaktív stádiumban volt a vizsgálat időpontjában. Betegeink a vizsgálatot megelőző héten gyógyszeres kezelésben nem részesültek. A kontroll vizsgálatokat 14 egészséges véradó monocitáin végeztük.

Monocita szeparálás

A monocitákat 10 ml, heparinnal alvadást gátló vérből szeparáltuk *Weston* és *mtsai* módszere szerint [24]. Ficoll-Uromiro grádiensen történő ülepítés, ismételt mosás után a sejteket 20 mM HEPES puffert és 10% foetal borjú szérumot tartalmazó 199 tápoldatban szuszpendáltuk. A mononukleáris leukocita szuszpenzió 50–60% monocitát tartalmazott. Valamennyi kemotaxis tesztben $0,5 \times 10^6$ monocitát alkalmaztunk 0,4 ml médiumban.

Kemotaktikus faktorkok

1. A komplement eredetű kemotaktikus faktort (C_5) 10 mg *E. coli* endotoxin (026, : B6, Difco), 10 ml normál AB szérum és 90 ml 199 tápoldat 37°C -on 30 percig történő inkubálásával nyertük. A további komplement aktiváció megelőzése érdekében az oldatot 30 percig 56°C -on tartottuk. Az így készített kemotaktikus faktor 8 hétig eltartható volt.
2. A limfokineket 9 kezeltlen, aktív stádiumban levő SLE-os beteg és 6 véradó limfocitáinak Con-A-val történő stimulálása útján nyertük [21] szigorúan standard körülmények között. A limfocitákat Ficoll-Uromiro grádiensen szeparáltuk szobahőmérsékleten, szérum hozzáadása nélkül. 800 g-vel 15 percig történő centrifugálás és kétszeri mosás után a szuszpenzió 90–95% mononukleáris sejtet tartalmazott. 4×10^6 sejtet tenyésztettünk $300 \mu\text{g}/10^7$ sejt Con-A jelenlétében 5% széndioxidot tartalmazó környezetben 24 óráig streptomycin és penicillin hozzáadása után. Az irodalomban elterjedt gyakorlatnak megfelelően a sejtmentes felülúszót Sephadex G-75 oszlopon kromatografáltuk a Con-A eltávolítása céljából. Az oszlop ekvibrálását és az eluálást 0,01 M-os, pH 7,4-es foszfát pufferral végeztük. 4 ml-es frakciókat gyűjtöttünk, melyek fehérjetartalmát spektrofotometriával vizsgáltuk $220 \mu\text{m}$ -en. A fehérjetartalmú frakciókat összegyűjtöttük, és előzetes dóziszfüggés vizsgálat után $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ fehérje koncentrációjú limfokineket alkalmaztunk mint kemotaktikus faktort.

Kemotaxis teszt és értékelés

A kemotaxis teszthez általunk készített, egyszer használatos kamrákat alkalmaztunk [11], melyet $5 \mu\text{m}$ pórusnagyságú millipore filter (Sartorius Membranfilter, Göttingen) választott két részre.

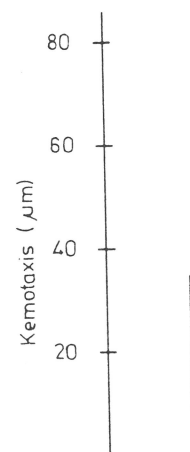
A kamra felső részében a félmillió kemotaktikus oldatot töltöttünk. A kamrát hematoxilinnal történő festés után értékelését alkalmaztuk [26], a kemotaxis értékelését.

Szérum és immunkomplex hatás vizsgálata

A szérum és IC monocita kemotaxis vizsgálatához kontroll szérumot, valamint 10 és 50×10^6 monocitával. Az IC-et SLE-precipitációval [27] és esetenként 10–20% szérumot tartalmazó frakciókból a 9,5 S komponens

Monocita kemotaxis

Az SLE-os betegek monocitáinak a kontroll monocitákhoz viszonyított kemotaxisát és a limfokinek hívójelként stádiumban levő betegek kemotaxisát vizsgáljuk (I. táblázat).



1. ábra. Húsz SLE-ben szenvedő betegek kemotaxisa komplement eredetű kemotaktikus limfocitákból származó faktort használva

Aktív és inaktív monociták

Aktív
n = 5

Inaktív
n = 15

Kontroll
n = 14

Prof. Mihóczy László dr.),
Intézet (igazgató: Prof.

pus erythematosusban

ILDIKÓ dr.,
GYULA dr.

zavara mellett károsodott
[2] nemcsak a limfociták
ok defektusa is. A mono-
rendszerben. Szerepük van
ek (IC), fertőző ágensek,
ok nemcsak járulékos vagy
is van [15], valamint
ek képzéséhez is [10].
[17]. Szerepük a késői
tek közötti kölcsönhatá-

akkumulációja alapvető
a monociták és limfokinek
tosusban.

1 férfi volt. Öt beteg aktív,
vizsgálatot megelőző héten
egészséges véradó monocitáin

eton és mtsai módszere szerint
teket 20 mM HEPES puffert
ok. A mononukleáris leukocita
tesztben $0,5 \times 10^6$ monocitát

endotoxin (026, : B6, Difco),
történő inkubálásával nyertük.
30 percig 56°C -on tartottuk.

és 6 véradó limfocitáinak
dard körülmények között.
nékleten, szérum hozzáadása
után a szuszpenzió 90–95%
 $100 \mu\text{g}/10^7$ sejt Con-A jelenlé-
gycin és penicillin hozzáadása
tes felülúszót Sephadex G-75
ekvibrálását és az eluálást
gyűjtöttünk, melyek fehérje-
tartalmú frakciókat összegyűj-
koncentrációjú limfokineket

alkalmaztunk [11], melyet
(engen) választott két részre.

A kamra felső részében a félmillió monocitát tartalmazó sejtsuszpenziót, alsó részébe 1 ml kemotaktikus oldatot töltöttünk. A kamrákat 37°C -on 60 percig inkubáltuk, majd a membránokat hematoxilinnal történő festés után értékeltük. Értékeléshez az ún. vezérsejtek által megtett távolság mérését alkalmaztuk [26], a kemotaxis eredményét μm -ben adtuk meg.

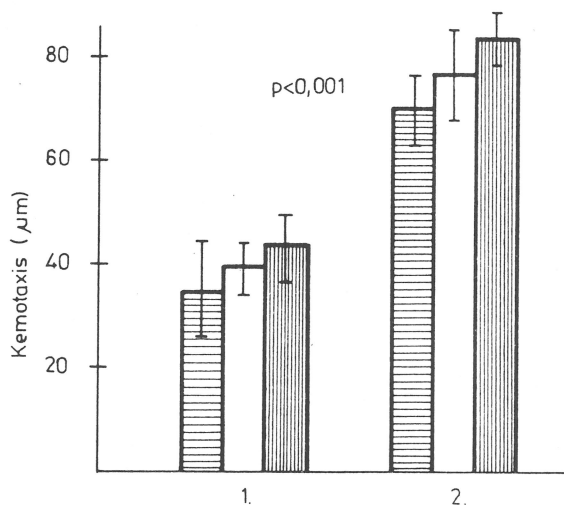
Szérum és immunkomplex hatás vizsgálata

A szérum és IC monocita kemotaxisra kifejtett hatásának vizsgálatához 1 ml hőinaktivált SLE-os és kontroll szérumot, valamint 10 és $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú IC-et inkubáltunk 37°C -on 30 percig $0,5 \times 10^6$ monocitával. Az IC-et SLE-os szérumból izoláltuk 2,8% (w/v) polietilén glikollal történő precipitációval [27] és esetenként 10–33% szaharóz grádiensen történő szedimentációval. A grádiensről visszanyert frakciókból a 9,5 S komponenst használtuk fel.

Eredmények

Monocita kemotaxis

Az SLE-os betegek monocitáinak kemotaktikus válaszkészsége szignifikánsan csökkent a kontroll monocitákhoz viszonyítva (1. ábra). A különbséget az endotoxin aktivált szérum és a limfokinek hívójelként történő alkalmazásakor egyaránt észleltük. Az aktív stádiumban levő betegek kemotaxisa szignifikánsan kisebb, mint az inaktív szakban levő betegeké (I. táblázat).



1. ábra. Húsz SLE-ban szenvedő beteg (1) és tizennégy egészséges kontroll (2) monocitáinak komplement eredetű kemotaktikus faktorra (húsz SLE-ban szenvedő beteg), kontroll limfokinre (egészséges kontroll) és SLE-os limfocitából származó limfokinre (SLE-os limfocitából származó limfokin) adott kemotaktikus válasza.

I. táblázat

Aktív és inaktív szakaszban lévő SLE-os betegek monocitáinak in vitro kemotaxisa (μm)

Aktív n = 5	26,8 ± 3,5	p < 0,02
Inaktív n = 15	41,5 ± 5,0	
Kontroll n = 14	69,0 ± 3,9	p < 0,001

A szérum és IC hatása

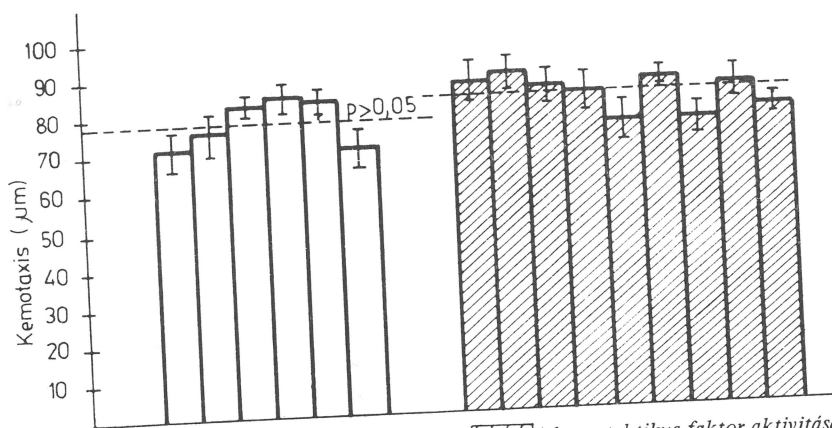
Az SLE-os szérum kifejezetten gátolta mind az SLE-os, mind a kontroll egyének monocita kemotaxisát, ugyanakkor a kontroll szérum által okozott gátlás minimális volt. Az SLE-os szérumból izolált IC, az SLE-os szérumhoz hasonlóan, erősen gátolta a kemotaxist (II. táblázat).

Az SLE-os és kontroll limfokinek kemotaktikus aktivitása

Mint az 1. ábrán látható az SLE-os betegek monocitáinak kemotaktikus válasza az SLE-os és kontroll limfokinek egyaránt csökkent. Ugyanakkor az SLE-os és kontroll limfociták által termelt limfokinek kemotaktikus aktivitása szignifikáns eltérést nem mutatott (2. ábra).

II. táblázat
SLE-os szérum és SLE-os szérumból izolált
IC hatása a monocita kemotaxisra

Teszt-oldat	Kontroll egyének SLE-os betegek monocita kemotaxisának gátlása	
Kontroll szérum	10,4 ± 2,6%	8,2 ± 2,0%
SLE-os szérum	35,5 ± 6,5%	22,5 ± 7,2%
10 µg/ml IC	29,7 ± 2,2%	29,7 ± 2,9%
50 µg/ml IC	40,9 ± 2,8%	31,0 ± 3,1%



2. ábra. Hat kontroll (□) és 9 SLE-os limfokin (▨) kemotaktikus faktor aktivitása kontroll monocitákra. A szaggatott vonal az átlagértékeket jelöli.

Megbeszélés

Landry [12] inaktív stádiumban levő SLE-os betegek monocita kemotaxisának vizsgálatakor, az ún. „lower surface count” módszert alkalmazva, nem talált szignifikáns különbséget a kontrollhoz viszonyítva. Vizsgálataink során az inaktív stádiumban levő betegek monocitáinak károsodását észleltük, és ez aktív szakban csak tovább fokozódott. Az eltérő eredményt az érzékenyebb értékelési mód magyarázza [25].

A kemotaxis károsodásának pontos magyarázatát nem ismerjük. Kísérleteink alapján feltehető, hogy a kemotaxis csökkenésében szerepe lehet a keringésben kóros mennyiségben jelenlevő immunkomplexek [8, 16] gátló hatásának, azonban nem zárható ki monocita ellenes antitestek [2] szerepe, valamint primer monocita defektus jelenléte sem. A kemotaxis érzékenyebb és reprodukálhatóbb módszer a limfokin produkció mérésére, mint más in vitro tesztek [1, 21]. A limfokinekkel végzett vizsgálatainkból

következtetés vonható le a T-li-
illetően is [3]. T-sejt reaktivitá-
törtétek vizsgálatok, így T-se-
termelés vizsgálata. Általában a
ennek okai összetettek. T-sejt-
tényezők, T-citotoxinok [4, 13]
károsodása is fennállhat. MIF
igazolni, hogy a gátló faktor
megfelelő akkor is, ha a bőrp-
SLE-os limfocitákból származ-
kimutatni nem tudtuk. Ez is
abnormalitásra nem kell SLE-
csökkent fagocita funkcióval
eredményezi permanens és kör-
mely tovább csökkenti a mor-
funkció defektus SLE-ban so-
kialakulásában, mint a limfokin

ÖSSZEFOGLALÁS: A sze-
monocita kemotaxisát és limf-
módosított Boyden-kamrát a
csökkent. A SLE-os szérum
Ugyanakkor limfokin aktivitá-
kontrollok között.

IRODALOM: 1. Altman, L.
leukocyte chemotaxis in thermal
Emmerich, T. E., Sturge, J. C.,
systemic lupus erythematosus.
Preston, P. M., Wolstencroft, R.
response. Mononuclear phagocyte
Blackwell Scientific Publication
Szegedi, Gy., Szabó, G., Fekete
erythematosus sera on T and
Goldman, J. A., Litwin, A., Ad-
antigens in systemic lupus ery-
Cousar, J. B.: A relationship be-
function and severity of system
D. A., Garrett, M. A., Craig, J.
lupus erythematosus, rheumat-
Kawai, M., Dankó, K., Kalmár,
using their uptake by macroph-
Lukács, K., Sonkoly, I., Pálóc-
function in autoimmune diseas-
R. B., Holden, H. T.: Stimul-
soluble tumor associated anti-
1244 (1977). — 11. Lukács,
chemotaxis vizsgálata egyszer-
Phagocyte function and cell-
113, 147 (1977). — 13. Mess-
systemic lupus erythematosus
immunoregulation by macroph-
Nelson) p. 235., Academic Pr-
J. Immunol. 7, 719 (1977).
radioassay of soluble circulat-
(Lond.), 248, 156 (1974). —
products. Clin. exp. Immunol.

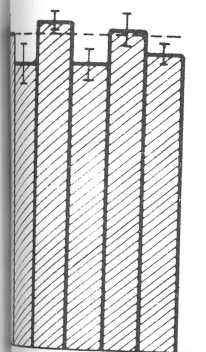
os, mind a kontroll egyének
okozott gátlás minimális volt.
haszonlóan, erősen gátolta a

inak kemotaktikus válasza az
akkor az SLE-os és kontroll
ása szignifikáns eltérést nem

blázat
lalt

betegek
gátlása

2,0%
7,2%
2,9%
3,1%



ktikus faktor aktivitása kontroll
et jelöli.

monocita kemotaxisának
zva, nem talált szignifikáns
z inaktív stádiumban levő
an csak tovább fokozódott.
za [25].

erjük. Kísérleteink alapján
ringésben kóros mennyiség-
azonban nem zárható ki
ocita defektus jelenléte sem.
er a limfokin produkció
el végzett vizsgálatainkból

következtetés vonható le a T-limfocita funkciót és a limfocita-monocita kollaborációt illetően is [3]. T-sejt reaktivitásra vonatkozóan in vivo és in vitro rendszerekben egyaránt történtek vizsgálatok, így T-sejt meghatározás, bőrpróbák, mitogén stimuláció, MIF termelés vizsgálata. Általában a T-sejtek működési rendellenessége mutatható ki [6, 17], ennek okai összetettek. T-sejtszám csökkenés [7], immunkomplexek, humorális gátló tényezők, T-citotoxinok [4, 13] mellett számításba jön az is, hogy a T-limfociták endogén károsodása is fennállhat. MIF termelésre vonatkozó korábbi vizsgálataink azt látszottak igazolni, hogy a gátló faktoroktól megtisztított limfociták MIF termelése PPD-re megfelelő akkor is, ha a bőrpróba PPD-vel szemben negatív [22]. Jelen kísérleteinkben az SLE-os limfocitákból származó limfokinek kemotaktikus aktivitásának csökkenését kimutatni nem tudtuk. Ez is arra utal, hogy limfokin termeléssel kapcsolatos endogén abnormalitásra nem kell SLE-ban számítani. Ugyanakkor a károsodott kemotaxis a csökkent fagocita funkcióval együtt [9] az immunogén molekulák elégtelen eltávolítását eredményezi permanens és kóros mértékű antitest és patogén immunkomplex termeléssel, mely tovább csökkenti a monocita funkciókat SLE-ben. Mindezek alapján a monocita funkció defektus SLE-ban sokkal inkább szerepet játszik a kóros immunreaktivitás kialakulásában, mint a limfokin termelés károsodása.

ÖSSZEFOGLALÁS: A szerzők systemás lupus erythematosusban szenvedő betegek monocita kemotaxisát és limfokin aktivitását vizsgálták leading front módszerrel, általuk módosított Boyden-kamrát alkalmazva. A betegek monocita kemotaxisa szignifikánsan csökkent. A SLE-os szérum és a belőle izolált IC egyaránt gátolta a kemotaxist. Ugyanakkor limfokin aktivitásban nem volt különbség a SLE-os betegek és az egészséges kontrollok között.

IRODALOM: 1. Altman, L. C., Furukawa, C. T., Klebanoff, S. J.: Depressed mononuclear leukocyte chemotaxis in thermally injured patients. *J. Immunol.* 119, 199 (1977). – 2. Arend, W. P., Emmerich, T. E., Sturge, J. C., Starkebaum, G. A.: Monocyte-reactive antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.* 20, 1049 (1977). – 3. Dumonde, D. C., Kelly, R. H., Preston, P. M., Wolstencroff, R. A.: Lymphokines and macrophage function in the immunological response. *Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology* (ed. R. Furth) p. 675., Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne (1975). – 4. Gergely, P., Szegedi, Gy., Szabó, G., Fekete, B., Petrányi, Gy.: Effects of lymphocytotoxins of systemic lupus erythematosus sera on T and B lymphocytes. *Acta. Med. Acad. Sci. Hung.* 32, 43 (1975). – 5. Goldman, J. A., Litwin, A., Adams, L. E., Krueger, R. C., Hess, E. V.: Cellular immunity to nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. *J. clin. Invest.* 51, 2669 (1972). – 6. Horwitz, D. A., Cousar, J. B.: A relationship between impaired cellular immunity humoral suppression of lymphocyte function and severity of systemic lupus erythematosus. *Amer. J. Med.* 58, 829 (1975). – 7. Horwitz, D. A., Garrett, M. A., Craig, A. H.: Serum effects on mitogenic reactivity in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and scleroderma. *Clin. exp. Immunol.* 27, 100 (1977). – 8. Kávai, M., Dankó, K., Kalmár, E., Francia, I., Szegedi, Gy.: Radioassay of soluble immune complexes using their uptake by macrophage Fc receptors. *Immunology*, 32, 617 (1977). – 9. Kávai, M., Lukács, K., Sonkoly, I., Pálóczi, K., Szegedi, Gy.: Circulating immune complexes and monocyte Fc function in autoimmune diseases. *Annn. rheum. Dis.*, 38, 79 (1979). – 10. Landolfo, S., Herberman, R. B., Holden, H. T.: Stimulation of mouse MIF production from MSV-immune lymphocytes by soluble tumor associated antigen: requirement for histocompatible macrophages. *J. Immunol.* 118, 1244 (1977). – 11. Lukács, K., Szabó, G., Kávai, M., Szegedi, Gy.: Monocytic random migratio és chemotaxis vizsgálata egyszer használatos kamrákkal, *Orv. Hetil.* 120, 657 (1979). – 12. Landry, M.: Phagocyte function and cell-mediated immunity in systemic lupus erythematosus. *Arch. Dermatol.* 113, 147 (1977). – 13. Messner, R. P., Kennedy, M. S., Jelinek, J. C.: Antilymphocyte antibodies in systemic lupus erythematosus. *Arth. Rheum.*, 18, 201 (1975). – 14. Nelson, D. S.: Nonspecific immunoregulation by macrophages and their products. *Immunobiology of the macrophage* (ed. D. S. Nelson) p. 235., Academic Press, N. Y. (1976). – 15. Neuman, C., Sorg, C.: Immune interferon. *Eur. J. Immunol.* 7, 719 (1977). – 16. Onyewotu, I. I., Holborow, E. J., Johnson, G. D.: Detection and radioassay of soluble circulating immune complexes using guinea pig peritoneal exudate cells. *Nature. (Lond.)*, 248, 156 (1974). – 17. Pick, E., Turk, J. L.: The biological activities of soluble lymphocyte products. *Clin. exp. Immunol.* 10, 1 (1972). – 18. Rosenthal, C., Franklin, E.: Depression of

cell-mediated immunity in systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.* 8, 207 (1973). – 19. Senyk, G., Hadley, W. K., Atlas, M. R., Talal, N.: Cellular immunity in systemic lupus erythematosus. *Arthr. Rheum.* 17, 553 (1974). – 20. Sipka, S., Szilágyi, T.: Effects of lymphokines on fibrinolysis and kinin generation in human plasma. *Acta allerg.* 32, 139 (1977). – 21. Snyderman, R., Pike, M.: Chemotaxis of mononuclear cells. *In vitro methods in cell-mediated immunity* (ed. B. R. Bloom and J. R. David) p. 651., Academic Press, N. Y. (1976). – 22. Szegedi, Gy.: Immunological investigations in systemic lupus erythematosus. *Panminerva Med.* 20, 9 (1978). – 23. Territo, M. C., Cline, M. J.: Monocyte function in man. *J. Immunol.* 118, 187 (1977). – 24. Weston, W. L., Dustin, R. D., Hecht, S. K.: Quantitative assays of human monocyte-macrophage function. *J. Immunol. Methods* 8, 213 (1975). – 25. Wilkinson, P. C.: Methods of measurement of the chemotactic response and inaccuracies in measurement. *Chemotaxis and inflammation* (ed. P. C. Wilkinson) p. 48., Churchill Livingstone, Edinburgh and London (1974). – 26. Zigmond, S. H., Hirsch, J. G.: Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factors. *J. Exp. Med.* 137, 387 (1973). – 27. Zubler, R. H., Lange, G. Z., Lambert, P. H., Miescher, P. A.: Detection of immune complexes in unheated sera by a modified ^{125}I -C₁q binding test. *J. Immunol.* 116, 232 (1976).

Лукач К., Каваи М., Шонколи И., Шипка М., Дежё Б., Сегеди Д. б.: Химиотаксис моноцитов и активность лимфокиназы при системной красной волчанке

Авторы исследовали химиотаксис моноцитов и активность лимфокиназы больных системной красной волчанкой, используя модифицированную камеру Бойдена.

Химиотаксис моноцитов у больных сигнификантно снижен. Сыворотка системной красной волчанки и изолированный из нее IC одинаково тормозили химиотаксис. В то же время по активности лимфокиназы не выявлена разница между больными системной красной волчанкой и здоровыми людьми контроля.

Lukács, K., Kávai, M., Sonkoly, I., Sipka, S., Dezső, B., Szegedi, Gy.: *Monocyte chemotaxis and lymphokin activity in SLE*

Chemotaxis and lymphokin activity of monocytes of SLE patients are investigated by leading front method by the use of Boyden chamber's procedure modified by the authors. Chemotaxis of patients' monocytes is significantly reduced. Both sera or IC isolated from sera of SLE patients caused an inhibition of chemotactic motility. Simultaneously no difference was found in lymphokin activities between SLE patients and healthy controls.

Dr. Katalin Lukács, Dr. Mária Kávai, Dr. Ildikó Sonkoly, Dr. S. Sipka, Dr. B. Dezső und Dr. Gy. Szegedi: *Monozyten Chemotaxe und Lymphokin Aktivität beim Lupus erythematoses dissimminatus*

Die Verfasser untersuchten die Monozyten Chemotaxe und Lymphokin Aktivität bei an Lupus erythematoses dissimminatus leidenden Patienten mit Hilfe der „leading front“ Methode, in von ihnen modifizierten Boyden Kammern. Die Monozyten Chemotaxe der Patienten nahm signifikant ab. Das LED-Serum und die daraus isolierten IC hemmten in gleicher Weise die Chemotaxe. Gleichzeitig war kein Unterschied in der Lymphokin Aktivität zwischen den LED Patienten und gesunden Kontrollfällen nachweisbar.