

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Antikörper gegen Inter- α -Inhibitor

Die erste Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin, einen Sandwich-ELISA zu etablieren, durch den die Plasmakonzentration von I α I bestimmt werden kann. Für einen solchen Assay ist es nötig, zwei Antikörper mit derselben Spezifität zur Verfügung zu haben, die aber aus verschiedenen Tierspezies stammen. Deshalb wurde zunächst die Spezifität der beiden Antikörper (MAb 69.26 aus der Maus und PAb R-16 aus dem Kaninchen), die in dieser Arbeit verwendet werden sollten, im Immunblot untersucht.

3.1.1. Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 69.26

Der im Department of Medical Oncology des Rhode Island Hospital (Providence, R.I., USA) unter der Leitung von Dr. Yow-Pin Lim entwickelte MAb 69.26 der Klasse IgG1 war nach Immunisierung einer Maus mit humanem I α I hergestellt worden.

Um die Spezifität des MAb 69.26 zu demonstrieren, wurde ein Immunblot unter Verwendung von humanem Plasma als Antigenprobe angefertigt.

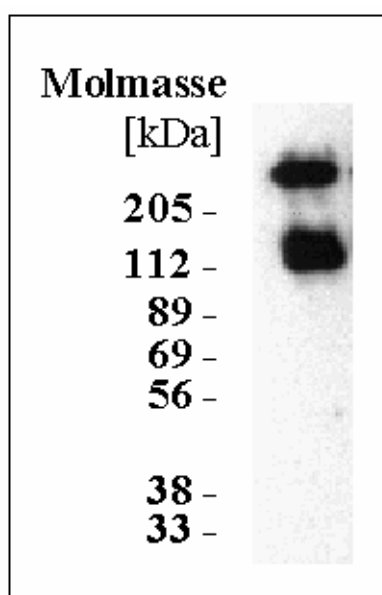


Abb. 1: Darstellung der vom MAb 69.26 im humanen Plasma erkannten Antigene durch Immunblot.

Immunblot mit MAb 69.26 als primären Antikörper nach SDS-PAGE. Als Probe wurden 35 μ g humane Plasmaproteine unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen auf einem 6%igen Gel aufgetragen.

Wie Abb. 1 zeigt, wurden im Plasma durch den MAb 69.26 unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen zwei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 125000 und 250000 erkannt. Diese Molekulargewichte entsprechen denen des Prä- α -Inhibitor

(125000) und des Inter- α -Inhibitor (250000). Diese Übereinstimmungen sprechen dafür, dass der MAb 69.26 ausschließlich Prä- α -Inhibitor und Inter- α -Inhibitor erkennt.

Um die Antigene, an die der MAb 69.26 bindet, weiter zu charakterisieren, wurden zunächst Plasmaproteine mit Hyaluronidase verdaut und anschließend im Immunblot mit MAb 69.26 als primären Antikörper eingesetzt, da sowohl Prä- α -Inhibitor als auch Inter- α -Inhibitor Proteoglykane sind.

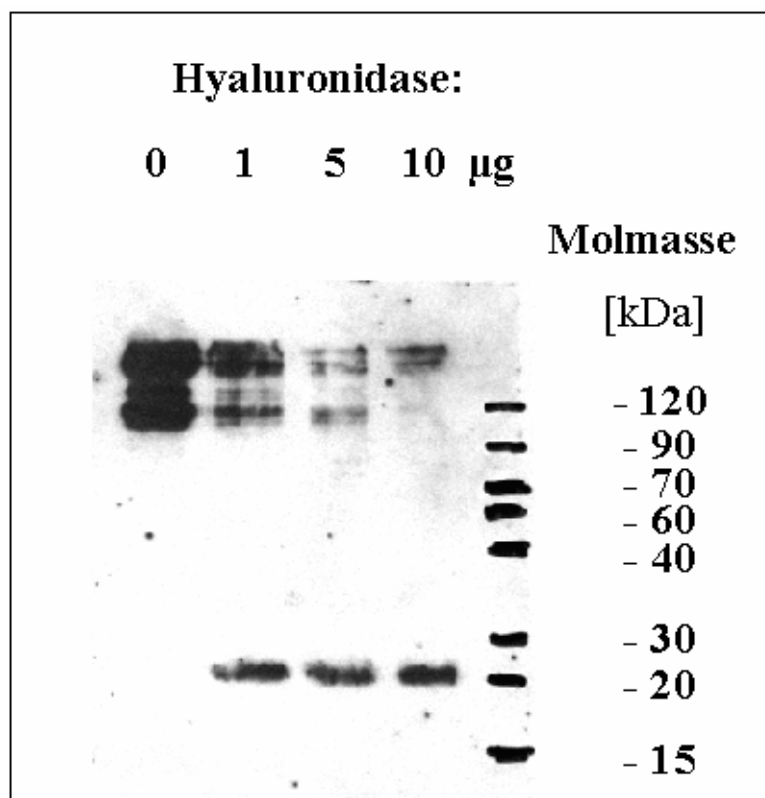


Abb. 2: Verdauung von I α I durch Hyaluronidase.

Immunblot mit MAb 69.26 als primären Antikörper nach SDS-PAGE. Jeweils 35µg humane Plasmaproteine wurden mittels unterschiedlicher Mengen (wie angegeben) Hyaluronidase für 30min verdaut und unter nicht-denaturierenden Bedingungen auf einem 10%igen Gel aufgetrennt.

Wie Abb. 2 zeigt, wurden im Immunblot der Plasmaprobe unter unverdauten Bedingungen zwei Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von 250000 und 125000 dargestellt. Mit zunehmender Menge an Hyaluronidase verschwanden diese hochmolekularen Banden jedoch, während eine immunpositive Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 25000 auftauchte. Dieses Molekulargewicht entspricht dem des Bikunin (der leichten Proteinkette des Prä- α -Inhibitor bzw. Inter- α -Inhibitor).

Die Immunblotergebnisse zeigen, dass durch die Verdauung mit Hyaluronidase die Prä- α -Inhibitor- und Inter- α -Inhibitor-Moleküle so gespalten werden, dass Bikunin freigesetzt wird, an welches der MAb 69.26 bindet.

Offensichtlich erkennt der MAb 69.26 ein Protein-Epitop, dass sich auf der leichten Kette (Bikunin) des Inter- α -Inhibitor bzw. des Prä- α -Inhibitor befindet.

Da folglich der MAb 69.26 nicht zwischen den beiden Proteinformen diskriminieren kann, werden im folgenden die Antigene Inter- α -Inhibitor und Prä- α -Inhibitor als Inter- α -Inhibitor (I α I) zusammengefasst.

3.1.2. Charakterisierung des polyklonalen Antikörpers R-16

Das im Department of Medical Oncology des Rhode Island Hospital (Providence, R.I., USA) unter der Leitung von Dr. Yow-Pin Lim entwickelte polyklonale Antiserum (PAb) R-16 war durch Immunisierung von Kaninchen mit humanem I α I hergestellt worden.

Um die Spezifität des PAb R-16 zu demonstrieren, wurde ein Immunblot unter Verwendung von humanem Plasma als Antigenprobe angefertigt.

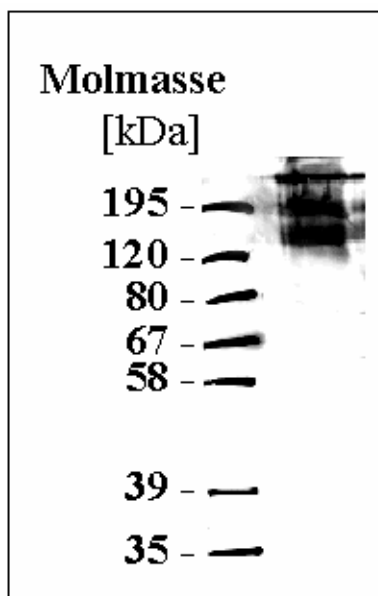


Abb. 3: Darstellung der vom PAb R-16 im humanen Plasma erkannten Proteine.

Immunblot mit PAb R-16 als primären Antikörper nach SDS-PAGE. Als Probe wurden 35 μ g humane Plasmaproteine unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen auf einem 6%igen Gel aufgetragen.

Wie Abb. 3 zeigt, wurden im Plasma durch den PAb R-16 unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen zwei Banden mit einem Molekulargewicht von etwa 125000 und 250000 erkannt. Diese Molekulargewichte entsprechen denen des Prä- α -Inhibitor (125000) und des Inter- α -Inhibitor (250000). Diese Übereinstimmungen sprechen dafür, dass auch der PAb R-16 monospezifisch Prä- α -Inhibitor und Inter- α -Inhibitor erkennt.

3.2. Reinigung von I α I aus humanem Plasma

Für die Durchführung des ELISA wurden größere Mengen von I α I als Standard benötigt. Hierfür wurde I α I in einem dreistufigen Reinigungsverfahren aus humanem Plasma isoliert.

3.2.1. Ionenaustausch-Chromatographie (DEAE)

Als erster Schritt zur I α I-Reinigung wurde humanes Plasma über eine Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE-Säule) aufgetrennt.

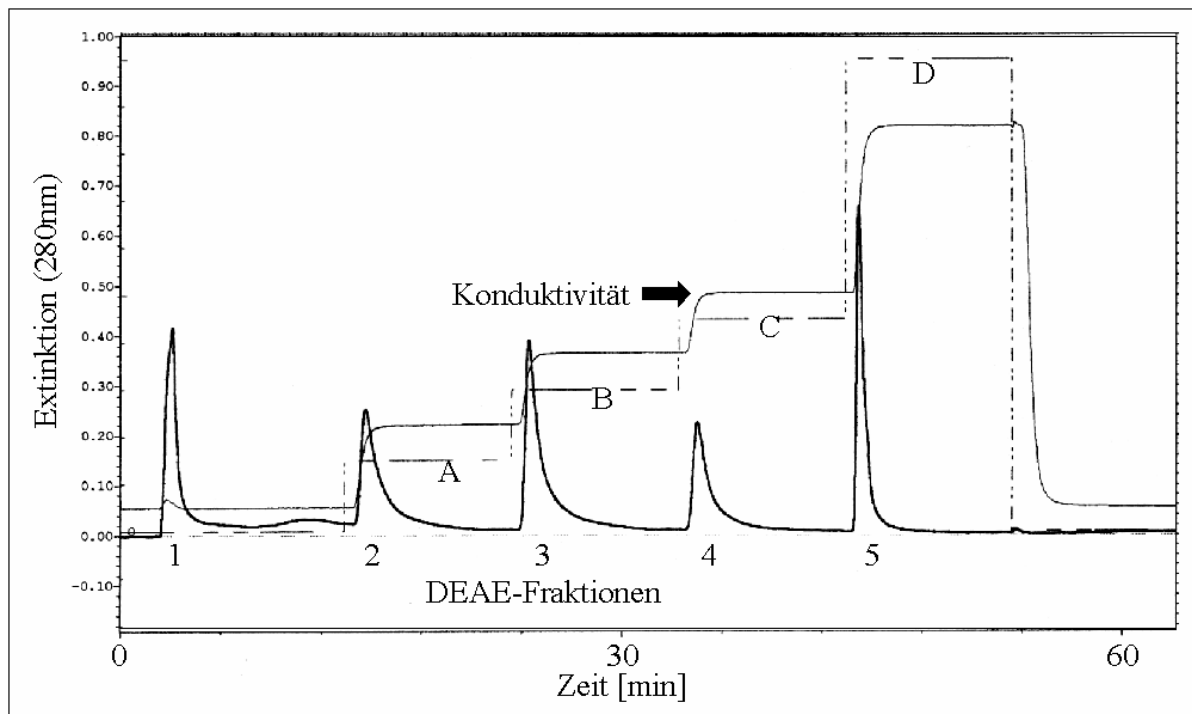


Abb. 4: DEAE-Chromatographie als erster Reinigungsschritt zur Isolierung von I α I.

100 μ l mit destilliertem Wasser verdünntes humanes Plasma wurde über eine aus zwei Disks CIM (Convective Interaction Media®) bestehende DEAE-Säule aufgetrennt. Die Elution erfolgte in einem vierstufigen Gradienten mit 75mM (A), 150mM (B), 225mM (C) und 500mM (D) NaCl. Mit der Durchlauffraktion standen schließlich fünf Fraktionen zur Analyse zur Verfügung.

Wie in Abb. 4 zu sehen ist, wurde durch dieses Verfahren eine Durchlauf- (Fraktion 1) und vier gradientenbedingte Eluatfraktionen (Fraktionen 2-5) gewonnen.

Um festzustellen, in welchen der fünf Fraktionen sich das gesuchte I α I befindet, wurde ein Immunblot mit MAb 69.26 als primärem Antikörper angefertigt.

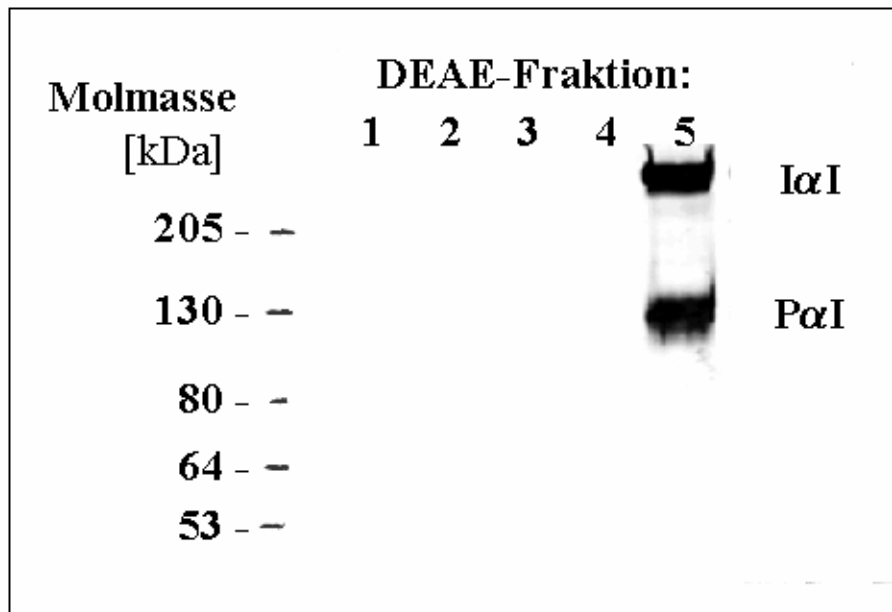


Abb. 5: Nachweis von IαI in den DEAE-Fractionen mittels Immunblot.

Immunblot mit MAb 69.26 als primären Antikörper nach SDS-PAGE. Als Proben wurden gleiche Proteinmengen (50µg) der fünf Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen auf einem 6%igen Gel aufgetragen.

Wie Abb. 5 zeigt, war IαI nur in der Fraktion 5 nachzuweisen. Deshalb wurde diese Fraktion mittels Zentrifugation in Centrifug-Röhrchen entsalzt und eingengt.

Um den Erfolg des ersten Reinigungsschrittes zu visualisieren und Verunreinigungen durch andere Proteine nachzuweisen, wurde von einem Gel eine Coomassiefärbung der IαI-haltigen Fraktion angefertigt, das parallel zu dem Immunblot aufgetrennt worden war. In dem Coomassie-gefärbten Gel konnten in der IαI-haltigen DEAE-Fraktion 5 zahlreiche Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), womit in dieser Fraktion neben IαI weitere Proteine vorhanden sind.

3.2.2. Hydroxylapatit-Chromatographie

Die Fraktion 5 der DEAE-Chromatographie, die neben I α I noch weitere Proteine enthielt, wurde über einer Hydroxylapatit-Chromatographie (HAC) weiter aufgereinigt.

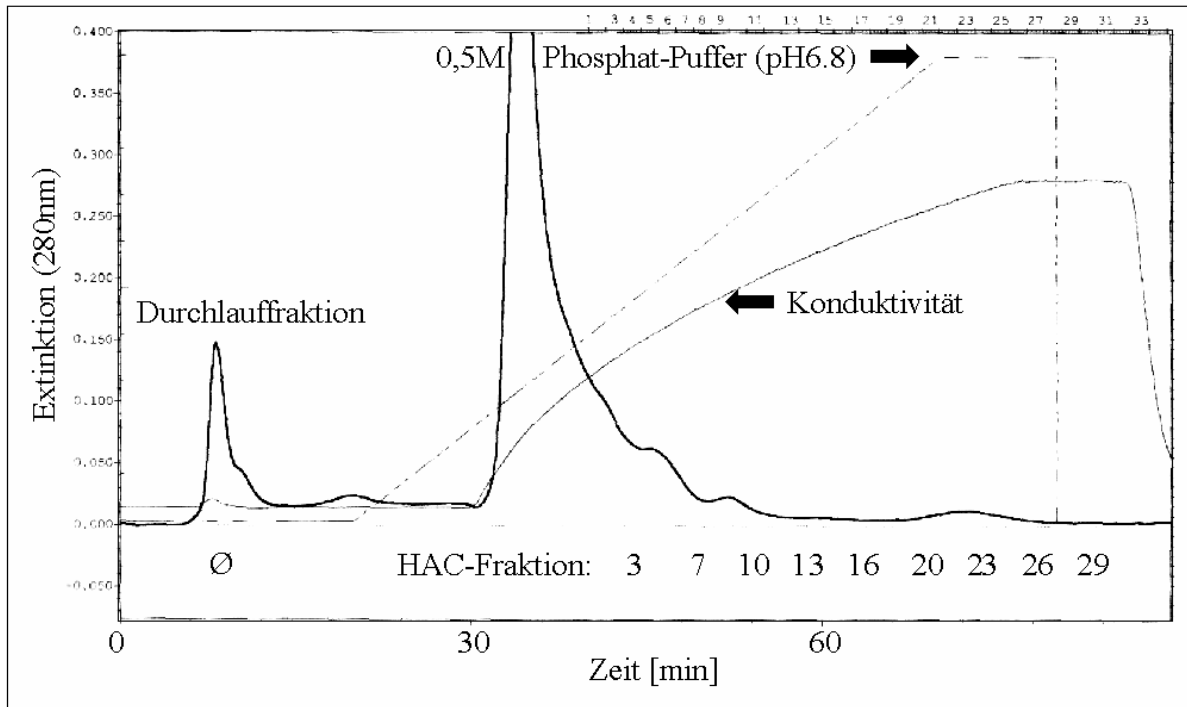


Abb. 6: HAC als zweiter Reinigungsschritt zur Isolierung von I α I.

5ml entsalzte und konzentrierte DEAE-Fraktion 5 wurde über eine CHT- (Ceramic-Hydroxylapatit-) Säule aufgetrennt. Zur Äquilibriumierung wurde 10mM Phosphat-Puffer (pH 6.8) und zur Eluation 500mM Phosphat-Puffer (pH 6.8) verwendet. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 10mM bis 500mM des Phosphat-Puffers.

Wie in Abb. 6 zu sehen ist, wurde durch die HAC der vorgereinigten I α I-Probe eine Durchlaufraction sowie 32 Eluatfraktionen gewonnen.

Um festzustellen, in welchen Fraktionen sich das gesuchte I α I befindet, wurden diese Fraktionen im Immunblot mit MAb 69.26 als primärem Antikörper analysiert.

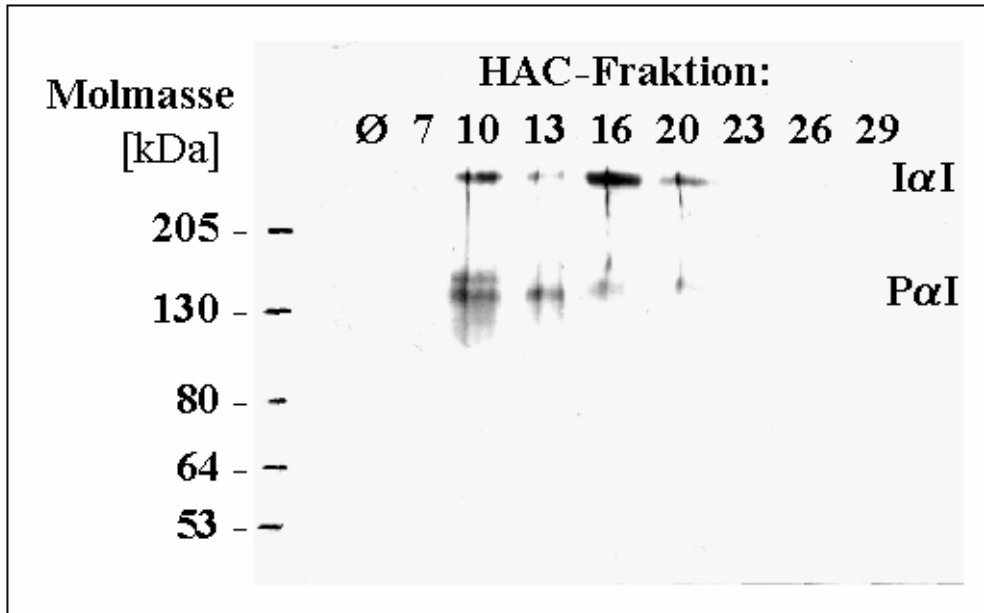


Abb. 7: Nachweis von I α I in den Fraktionen der HAC mittels Immunblot.

Immunblot mit MAb 69.26 als primärem Antikörper nach SDS-PAGE. Als Probe wurde der Durchlauf (Ø) und etwa jede dritte Fraktion (ab Fraktion 7) unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen auf einem 6%igen Gel aufgetragen.

Wie Abb. 7 zeigt, war I α I deutlich in den Fraktionen 10-16 und noch schwach in der Fraktion 20 nachzuweisen. Deshalb wurden diese Fraktionen gepoolt und lyophilisiert. Anschließend wurde das Proteingemisch mittels Gelfiltration entsalzt, um den Salzgehalt wieder zu reduzieren, der durch das Lyophilisieren stark erhöht wurde.

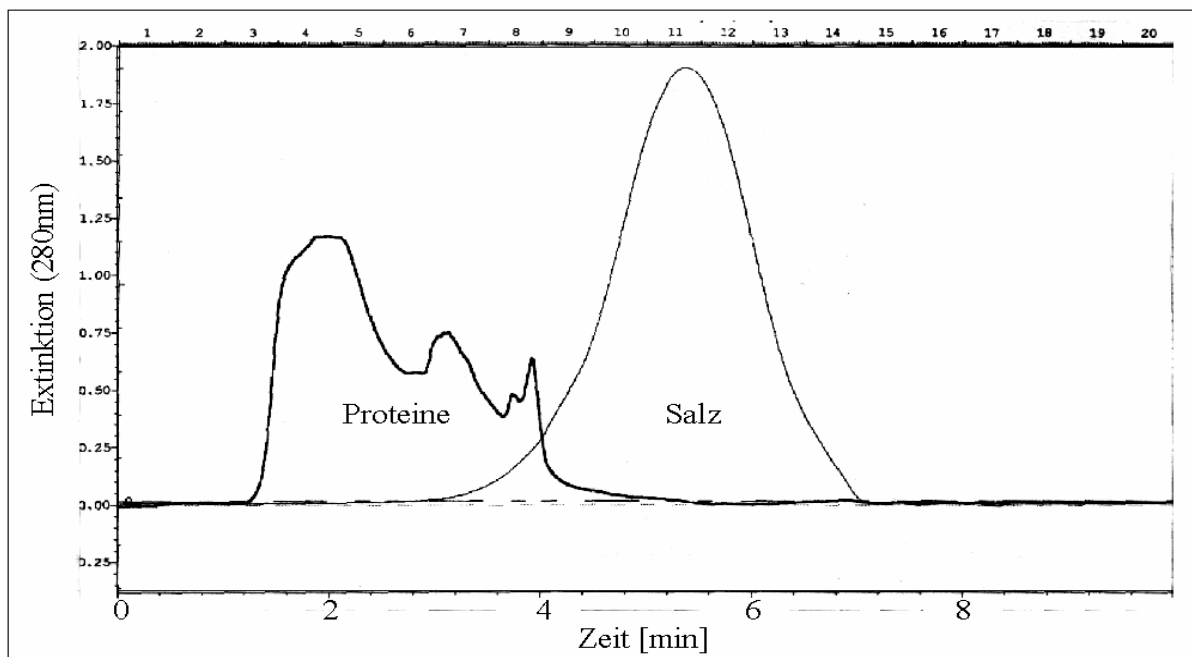


Abb. 8: Gelfiltration zum Entsalzen der I α I-positiven HAC-Fraktionen.

Die gepoolten und lyophilisierten Proben 10-20 der HAC-Chromatographie wurden mittels Gelfiltration aufgetrennt.

Wie Abb. 8 zeigt, enthalten die Fraktionen 3-8 der Gelfiltration fast sämtliche Proteine und nahezu kein Salz. Diese Fraktionen wurden gepoolt und lyophilisiert, um sie dem nächsten Reinigungsschritt zuzuführen.

3.2.3. Immunaffinitäts-Chromatographie

3.2.3.1. Reinigung von MAb 69.26 durch Protein A-Sepharose

Sowohl für den letzten Chromatographieschritt als auch für die Entwicklung und Durchführung des ELISA wurde MAb 69.26 in gereinigter Form benötigt.

Für die Reinigung des MAb 69.26 wurde Aszitesflüssigkeit von Mäusen verwendet, denen MAb 69.26-produzierende Hybridomzellen in die Bauchhöhle injiziert worden waren.

Die Reinigung von MAb 69.26 aus der Aszitesflüssigkeit geschah durch Affinitäts-Chromatographie über eine Protein A-Sepharose-Säule.

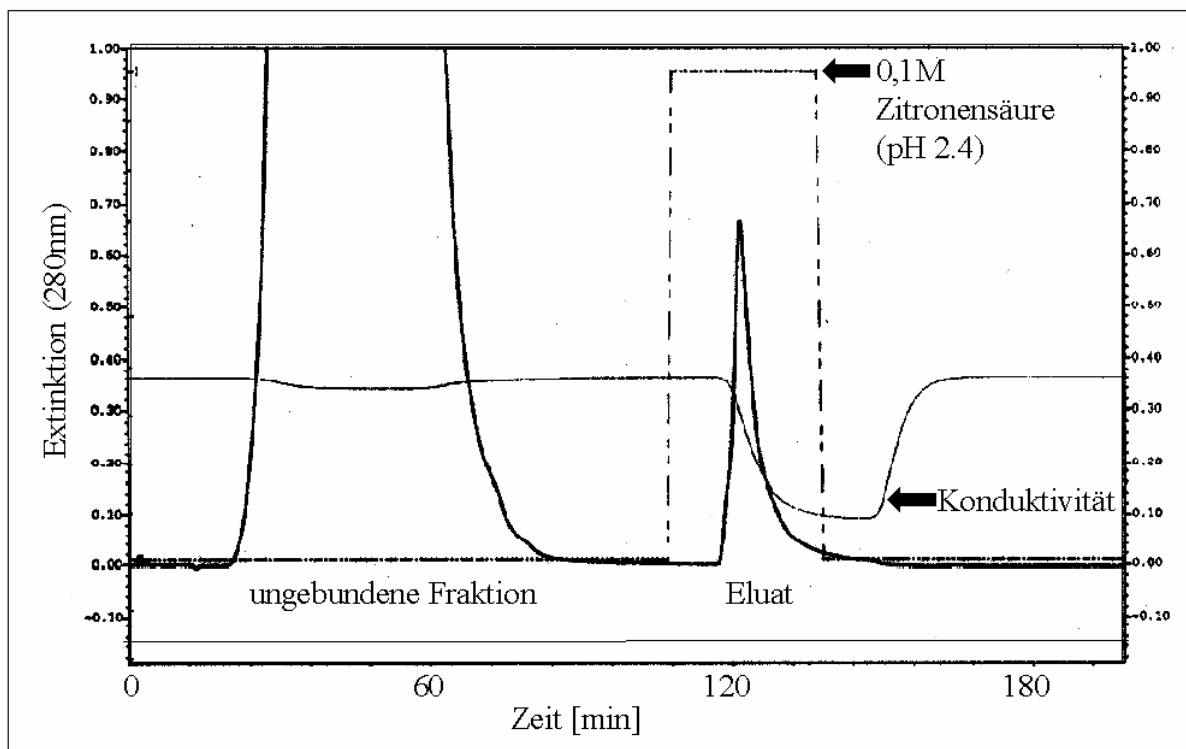


Abb. 9: Reinigung von MAb 69.26 aus Aszitesflüssigkeit über Protein A-Sepharose-Chromatographie.

1ml mit destilliertem Wasser verdünnte Aszitesflüssigkeit passierte eine 10ml Protein A-Sepharose 4 Fast Flow-Säule. Eluiert wurde mit 0,1M Zitronensäure (pH 2.4).

Wie in Abb. 9 zu sehen ist, konnte durch die Protein A-Sepharose-Chromatographie eine Durchlauf- und eine Eluatfraktionen gewonnen werden.

Das Immunglobulinhaltige Eluat wurde direkt nach Beendigung der Chromatographie mit 1M NaOH-Lösung neutralisiert.

3.2.3.2. Reinigung von I α I durch MAb 69.26-Sepharose

Für den letzten Reinigungsschritt von I α I wurden 320 μ g IgG des MAb 69.26 (gewonnen über Protein A-Sepharose-Chromatographie) an 0,5g (entspricht etwa 2ml) aktivierte CNBr-Sepharose gekoppelt. Bei diesem Kopplungsvorgang wurde eine Kopplungsrate von etwa 78% erreicht, was durch Proteinbestimmung von Ausgangslösung und Überstand ermittelt wurde. Die mit MAb 69.26-gekoppelte Sepharose wurde in eine Chromatographiekartusche gepackt und mit 0,1M Zitronensäure von nicht-kovalent gebundenen IgG gereinigt. Nach Äquilibrierung mit PBS erfolgte die Isolierung von I α I aus 1ml entsalzten HAC-Proben (Daten nicht gezeigt). Dabei konnten 300 μ g I α I gewonnen werden.

3.3. Entwicklung und Optimierung des Sandwich-ELISA

3.3.1. Nachweis der Bindungsaktivität von MAb 69.26 im ELISA

Um herauszufinden, ob MAb 69.26 auch dann noch an das Antigen binden kann, wenn er an die Festphase der Mikrotiterplatte gebunden ist, wurde ein Kompetitions-ELISA durchgeführt. Dabei wurde die Mikrotiterplatte zuerst mit gereinigtem I α I in Kopplungspuffer beschichtet. Anschließend wurden eine konstante Menge an MAb 69.26 zusammen mit gereinigtem I α I bzw. humanem Plasma (jeweils in einer seriellen Verdünnungsreihe) inkubiert. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgte mit einem Sekundär-Antikörpersystem und einem Chromogen. Dabei ist die Farbintensität um so geringer, je höher die I α I-Konzentration in der Testlösung ist, da MAb 69.26 sowohl an gelöstes I α I als auch an gekoppeltes I α I bindet (kompetitiver Vorgang).

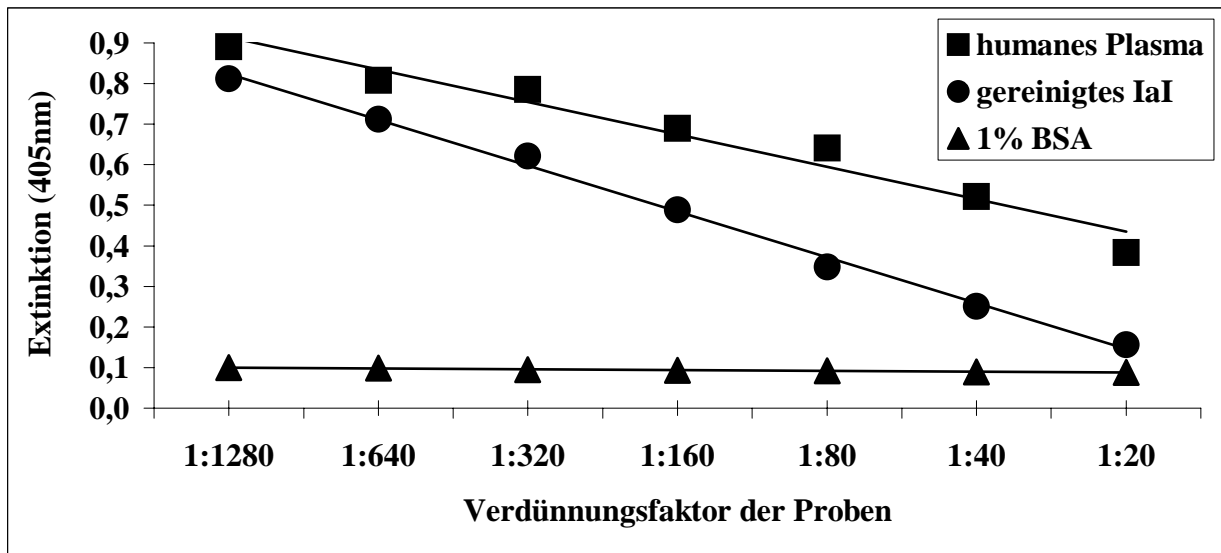


Abb. 10: Nachweis der Bindungsfähigkeit von MAb 69.26 im Kompetitions-ELISA.

Jeweils 0,4µg gereinigtes IαI wurde in Kopplungspuffer an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Eine Plasmaprobe und eine Probe gereinigtes IαI (1mg/ml) wurden anfänglich 1:100 verdünnt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt, bei der 1:20 bis 1:1280 verdünnt wurde. Jeweils 50µl Antigenlösung wurden mit 50µl MAb 69.26 in PBS-Lösung inkubiert.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

In Abb. 10 kann man eine Korrelation der IαI-Konzentration zur Extinktion erkennen. Offensichtlich erkennt MAb 69.26 IαI auch im ELISA.

3.3.2. Optimierung der Konzentration des biotinylierten Antiserums R-16

Zur Etablierung des ELISA wurde jeder Schritt des Protokolls in chronologischer Reihenfolge optimiert. Dabei wurden jeweils serielle Verdünnungsreihen des betreffenden Substrats angefertigt und im ELISA überprüft. Für den an der Mikrotiterplatte gebundenen Antikörper (MAb 69.26) erwies sich eine Konzentration von 125ng/Well als optimal (Daten nicht gezeigt). In Vorversuchen hatte sich eine Plasmaverdünnung von 1:500 bewährt (Daten nicht gezeigt), sodass für die seriellen Verdünnungsreihen bei der Optimierung des ELISA eine Grundverdünnung von 1:100 gewählt wurde, um bei serieller Verdünnung dieser Lösung sowohl den Bereich über als auch unter 1:500 beurteilen zu können.

Um herauszufinden, wie hoch die Konzentration des biotinylierten PAb R-16 im Sandwich-ELISA sein kann, ohne einen zu hohen Hintergrund zu erzeugen, wurden außerdem unterschiedliche Verdünnungen des PAb R-16 in diesem Optimierungsschritt des ELISA eingesetzt.

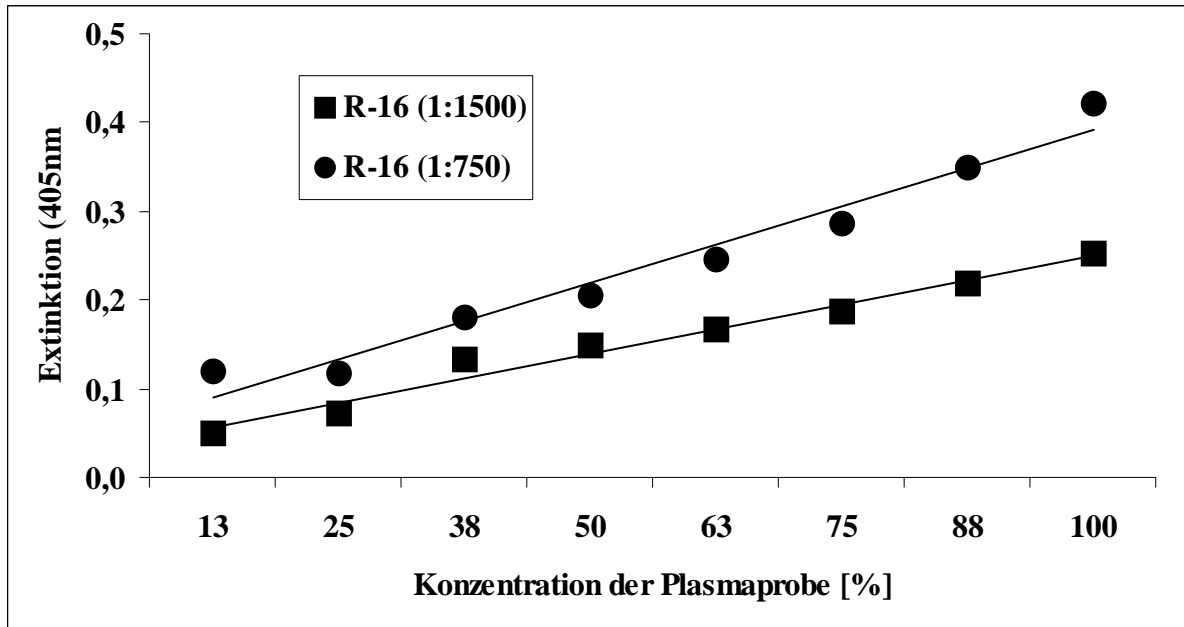


Abb. 11: Vergleich unterschiedlicher PAb R-16-Verdünnungen.

Jeweils 125ng/Well MAbs 69.26 wurden in Kopplungspuffer an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Eine Plasmaprobe wurde 1:100 verdünnt und anschließend in einer Verdünnungsreihe (Angaben in Prozent) zu je 50µl inkubiert. Es wurden zwei Verdünnungen (1:750 und 1:1500) des biotinylierten PAb R-16 eingesetzt.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Doppel-Bestimmungen dar.

Wie in Abb. 11 zu sehen ist, verläuft die Ausgleichsgerade für die Verdünnung von 1:1500 des PAb R-16 flacher als die Ausgleichsgerade für die geringere Verdünnung (1:750) an PAb R-16. Dadurch liegen die Extinktionen für unterschiedliche Plasmakonzentrationen an IαI bei der Verdünnung mit 1:750 weiter auseinander, ohne dass der Hintergrund zu sehr ansteigt. Daher wurde die Verdünnung 1:750 des biotinylierten PAb R-16 für die Durchführung des ELISA verwendet.

3.3.3. Optimierung der Konzentration der Streptavidin-Peroxidase

Um herauszufinden, wie hoch die Konzentration der Streptavidin-Peroxidase sein darf, ohne einen zu hohen Hintergrund zu erhalten, wurden in einem ELISA unterschiedliche Verdünnungen dieses Reagenz eingesetzt.

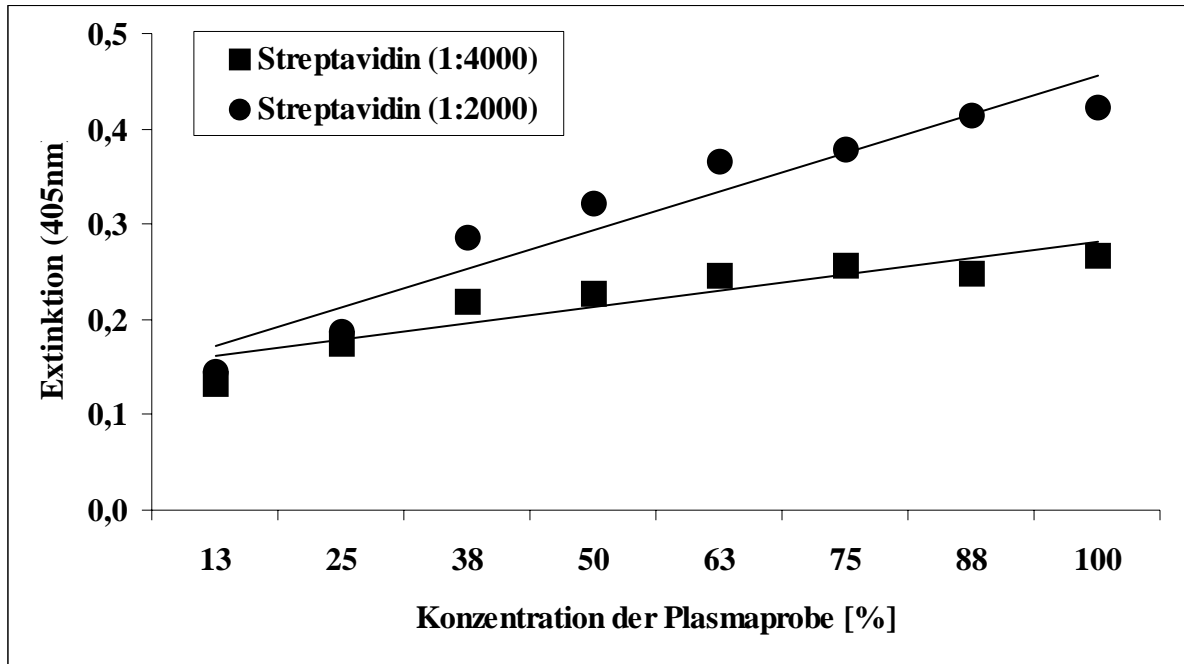


Abb. 12: Vergleich unterschiedlicher Streptavidin-Peroxidase-Verdünnungen.

Jeweils 125ng/Well MAb 69.26 wurden in Kopplungspuffer an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Eine Plasmaprobe wurde 1:100 verdünnt und anschließend in einer Verdünnungsreihe (Angaben in Prozent) zu je 50µl inkubiert. Danach wurde der ELISA mit je 50µl biotinylierten PAb R-16 inkubiert. Dieser Optimierungsschritt wurde mit zwei Verdünnungen der Streptavidin-Peroxidase (1:2000 und 1:4000 zu jeweils 50µl) durchgeführt.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Doppel-Bestimmungen dar.

Wie in Abb. 12 zu sehen ist, verläuft die Ausgleichsgerade für die stärkere Verdünnung (1:4000) des Streptavidin flacher als die Ausgleichsgerade der nicht so starken Verdünnung (1:2000).

Da bei der 1:2000-Verdünnung der Hintergrund kaum ansteigt, aber eine bessere Auftrennung der Extinktionen unterschiedlicher IαI-Konzentrationen stattfindet, wurde diese Verdünnung für die Durchführung des ELISA verwendet.

3.3.4. Optimierung der Inkubationszeit des ELISA-Substrats

Um die Inkubationszeit zu bestimmen, die optimal für die Durchführung des ELISA ist, wurde ein bis zu diesem Durchführungspunkt optimierter ELISA unterschiedlich lang entwickelt.

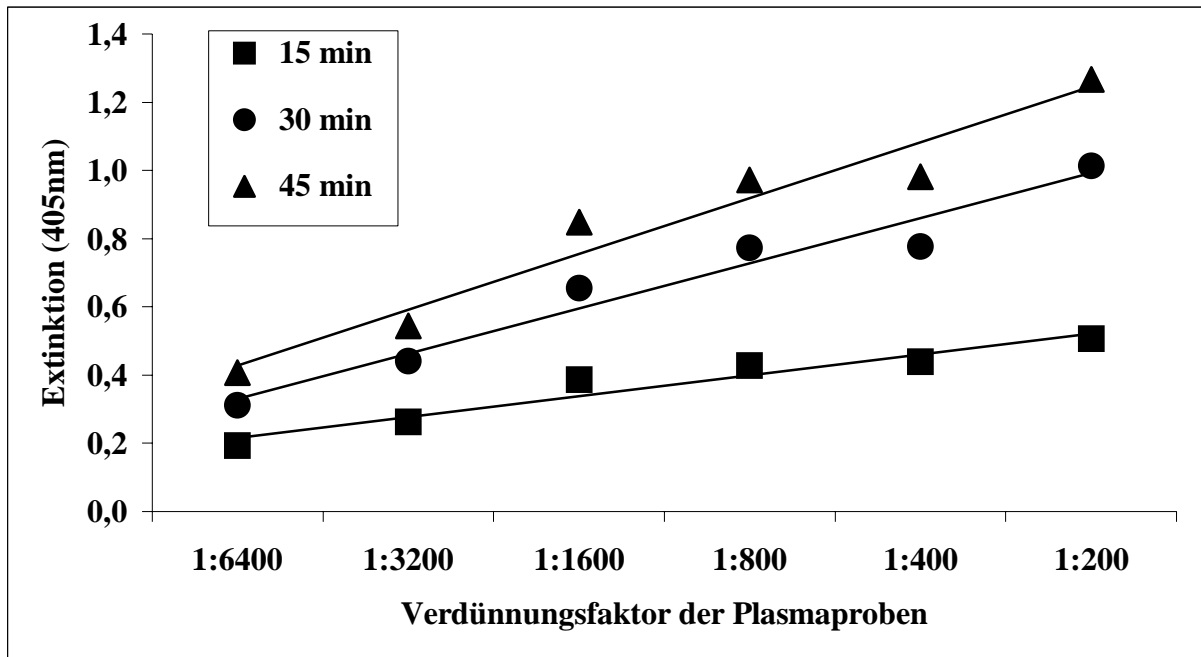


Abb. 13: Bestimmung der optimalen Inkubationszeit des ELISA-Substrats (ABTS).

Jeweils 125ng/Well MAb 69.26 wurden in Kopplungspuffer an eine Mikrotiterplatte adsorbiert. Eine Plasmaprobe wurde 1:100 verdünnt und anschließend in einer Verdünnungsreihe (siehe Ordinate) zu je 50µl inkubiert. Es wurden 50µl biotinylierter PAb R-16 (1:750) und anschließend 50µl Streptavidin (1:2000) inkubiert. Nach Inkubation mit ABTS wurde alle 15min die Extinktion in den Wells der Mikrotiterplatte abgelesen. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Doppel-Bestimmungen dar.

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, konnte bei allen Ansätzen mit zunehmender Inkubationszeit eine ansteigende Extinktion bestimmt werden. Dieser Anstieg war bei höheren IαI-Konzentrationen am deutlichsten.

Nach 45min Entwicklung des ELISA lagen die gemessenen Extinktionen bei den unterschiedlichen Plasmakonzentrationen an IαI weiter auseinander als bei kürzeren Inkubationszeiten, ohne dass der Hintergrund zu stark anstieg. Daher wurde der ELISA bei der Durchführung der Studie 45min mit ABTS entwickelt.

3.4. Quantifizierung von Inter-α-Inhibitor in Plasmaproben

3.4.1. Vorversuche

Um herauszufinden, welche Bedingungen die nicht-septische Kontrollgruppe zu erfüllen hat, um mit den Sepsisfällen vergleichbar zu sein, mussten mehrere Vorversuche durchgeführt werden. Dabei wurde untersucht, ob Neugeborene bereits peri- bzw. postnatal IαI produzieren

und ob sich gegebenenfalls die I α I-Konzentration in deren Plasma vom maternalen Plasma unterscheidet.

3.4.1.1. Inter- α -Inhibitor in maternalem im Vergleich zu neonatalem Plasma

Ein Hauptziel dieser Studie war es, den I α I-Plasmaspiegel von Neugeborenen zu bestimmen. Es war daher nötig, herauszufinden, ob das im neonatalen Plasma gemessene I α I von der Mutter stammt oder vom Neugeborenen selbst produziert wird. Hierzu wurden die I α I-Konzentrationen in Plasmaproben von zehn Müttern und ihren Neugeborenen mit Hilfe des Sandwich-ELISA analysiert und die Werte beider Gruppen miteinander verglichen.

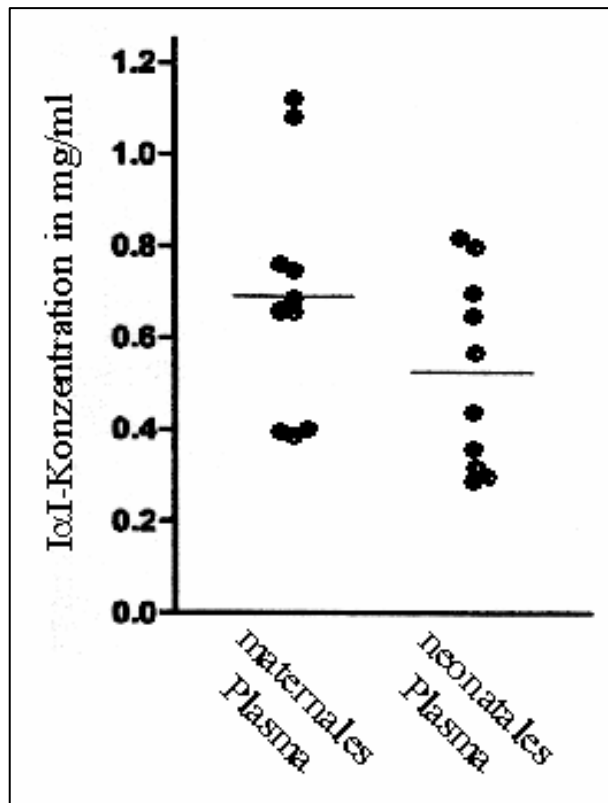


Abb. 14: Bestimmung der I α I-Konzentration in maternalem und neonatalem Plasma.

Bei zehn Mutter-Kind-Paaren wurden die I α I-Spiegel von Nabelschnurplasmaproben des Neugeborenen und von Blutproben der Mutter, die 1-8h nach der Geburt gewonnen worden waren, mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

Wie in Abb. 14 zu sehen ist, lagen die I α I-Konzentrationen im umbilikalen Plasma der Neugeborenen im Mittel etwas niedriger als im venösen Plasma der Mütter. Die mittlere I α I-Plasmakonzentrationen der Mütter betrug 0,69mg/ml mit einer Standardabweichung von 0,26mg/ml, während die Kinder im Mittel einen I α I-Spiegel von 0,53mg/ml mit einer Standardabweichung von 0,21mg/ml aufwiesen. Da der p-Wert mit 0,1325 größer als 0,05 war, waren die Mittelwerte beider Gruppen nicht signifikant verschieden.

Da die gruppenweise Darstellung aller $\text{I}\alpha\text{I}$ -Konzentrationen keinen Vergleich der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmakonzentrationen einzelner Mutter-Kind-Paare erlaubt, wurden in einem weiteren Schritt die zusammengehörigen Mutter/Kindwerte direkt gegenübergestellt.

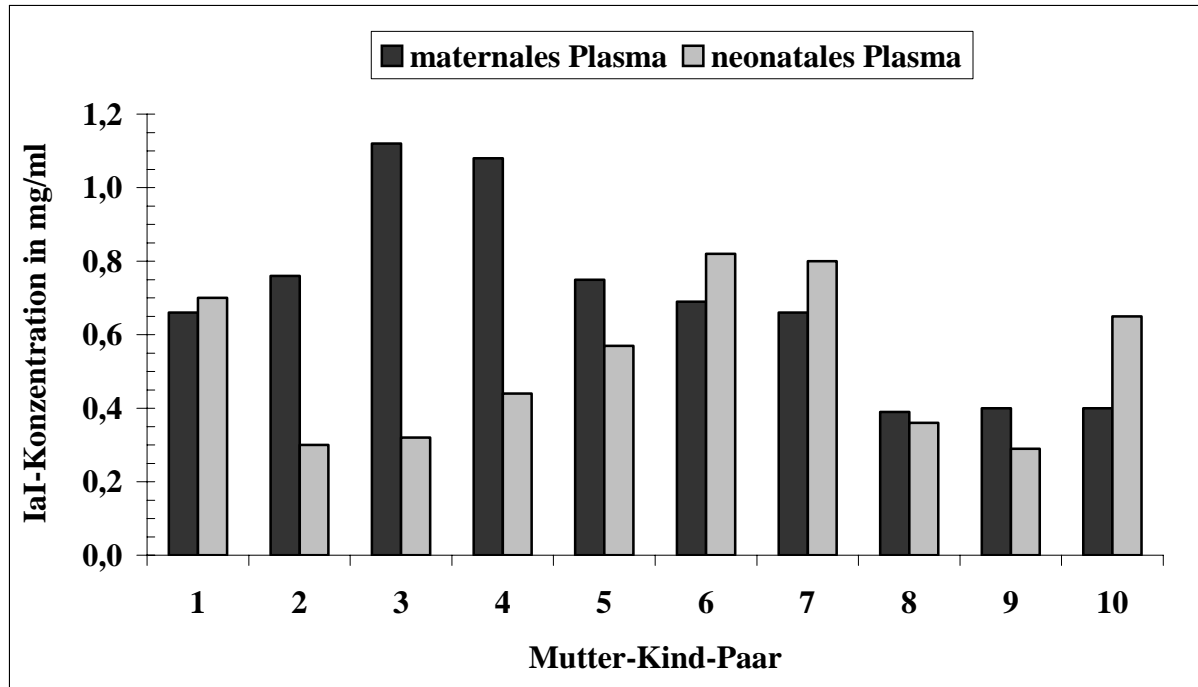


Abb. 15: Direkte Gegenüberstellung der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Konzentrationen in den Plasmaproben der Mutter-Kind-Paare.

Die in Abb. 15 gruppenweise Darstellung der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Konzentrationen wurden aufgeschlüsselt nach den zehn zusammengehörigen Mutter-Kind-Paaren dargestellt.

Wie man in Abb. 15 sehen kann, hatten sechs Mütter einen um 0,03-0,80mg/ml höheren $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel als die eigenen Kinder, während vier Neugeborene einen um 0,04-0,25mg/ml höheren $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel als ihre Mütter aufwiesen.

Vergleicht man den $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel zwischen Müttern und ihren Neugeborenen, so verhält er sich nicht einheitlich. Somit ist der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel von Neugeborenen offenbar unabhängig von dem $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel ihrer Mütter, was auf eine zum Zeitpunkt der Geburt eigenständige $\text{I}\alpha\text{I}$ -Produktion der Neugeborenen schließen lässt.

3.4.1.2. Inter- α -Inhibitor in Abhängigkeit vom Gestationsalter

Da viele Organsysteme bei der Geburt noch nicht ganz ausgereift sind und in den letzten Schwangerschaftswochen eine ausgeprägt Entwicklung und Reifung erfahren, war es wichtig

herauszufinden, ob das Gestationsalter Einfluss auf die $I\alpha I$ -Konzentration zum Zeitpunkt der Geburt hat.

Hierfür wurden vier Gruppen in Abhängigkeit vom Gestationsalter gebildet (24-28 Wochen, 29-32 Wochen, 33-37 Wochen und 38-42 Wochen). Von den Kindern dieser vier Gruppen wurden die $I\alpha I$ -Konzentrationen in Plasmaproben aus Nabelschnurblut mit Hilfe des Sandwich-ELISA analysiert und die Werte miteinander verglichen.

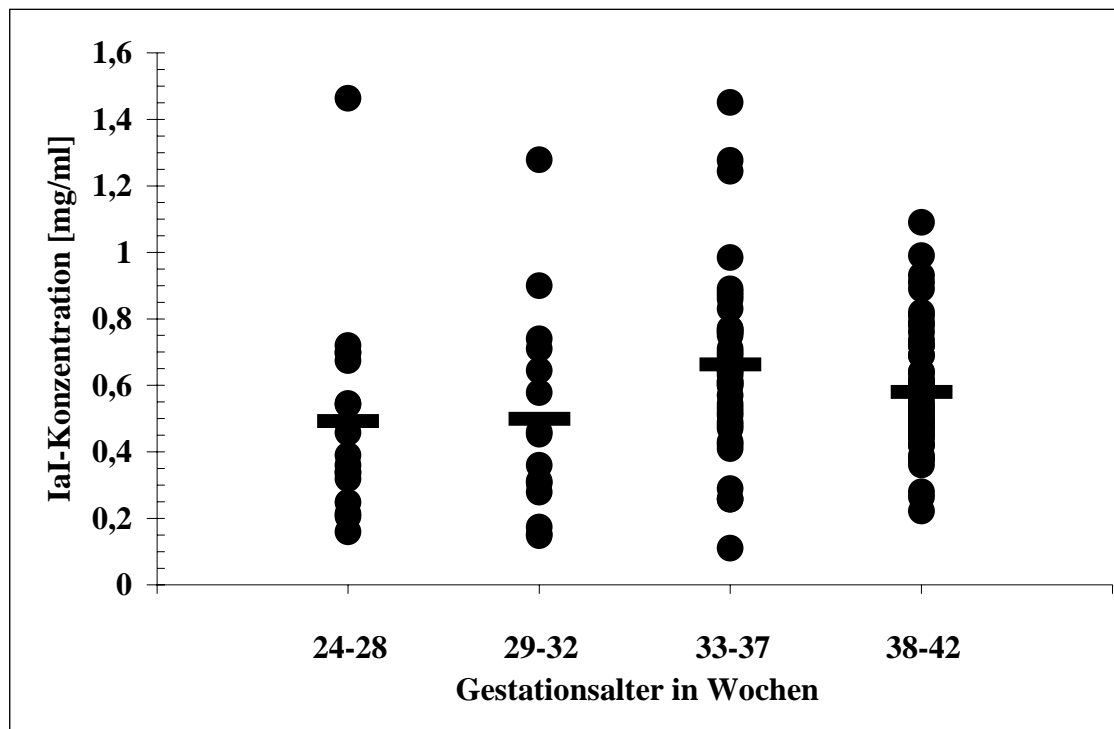


Abb. 16: Gegenüberstellung der $I\alpha I$ -Konzentrationen in umbilikalen Plasmaproben von Neugeborenen mit unterschiedlichem Gestationsalter.

Bei Neugeborenen unterschiedlichen Gestationsalters wurden die $I\alpha I$ -Plasmaspiegel von Nabelschnurblutproben mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die Neugeborenen wurden nach ihrem Gestationsalter vier Gruppen zugeteilt.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

Wie in Abb. 16 zu sehen ist, wiesen die $I\alpha I$ -Konzentrationen der Nabelschnurplasmaproben bei den vier Gruppen ähnliche Werte auf. Die mittlere $I\alpha I$ -Plasmakonzentration des Nabelschnurblutes der Gruppe 24-28 Wochen ($n=17$) betrug $0,49\text{mg/ml}$ bei einer Standardabweichung von $0,31\text{mg/ml}$, der Mittelwert der Gruppe 29-32 Wochen ($n=15$) ergab $0,50\text{mg/ml}$ bei einer Standardabweichung von $0,32\text{mg/ml}$, während bei der Gruppe 33-37 Wochen ($n=40$) im Mittel einen $I\alpha I$ -Spiegel von $0,66\text{mg/ml}$ bei einer Standardabweichung von $0,27\text{mg/ml}$ und bei der Gruppe 38-42 Wochen ($n=53$) ein Mittelwert von $0,58\text{mg/ml}$ bei einer Standardabweichung von $0,19\text{mg/ml}$ gemessen wurde. Da der p -Wert mit $0,1070$ größer als $0,05$ war, waren die Mittelwerte der vier Gruppen nicht signifikant verschieden.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigen, dass die I α I-Konzentration zum Zeitpunkt der Geburt unabhängig vom Gestationsalter ist, lediglich die Standardabweichungen wurden mit zunehmendem Gestationsalter immer geringer.

3.4.1.3. Inter- α -Inhibitor in umbilikalem im Vergleich zu peripherem Plasma

Da gesunden Neugeborenen nicht ohne weiteres Blut abgenommen werden darf und periphere Blutproben aus Routineuntersuchungen eher schwer zu erhalten sind, wäre es für den Ablauf der Studie günstig, wenn für die non-septischen Kontrollfälle Proben verwendet werden könnten, die aus gemischt-arterio-venösem Nabelschnurblut stammten. Deshalb musste zunächst gemessen werden, ob die I α I-Plasmakonzentrationen im umbilikalen Plasma denjenigen im peripher-venösen Plasma entsprechen. Daher wurden 41 Nabelschnurplasmaproben und 41 Plasmaproben von peripher-venösem Blut mit Hilfe des Sandwich-ELISA analysiert. Die Proben stammten von Neugeborenen, die ein Gestationsalter zwischen 26 und 40 Wochen (im Mittel 37 Wochen) hatten. Die peripheren Blutproben waren zwischen 2h bis spätestens 21h nach der Geburt gewonnen worden und stammten von Routineblutentnahmen.

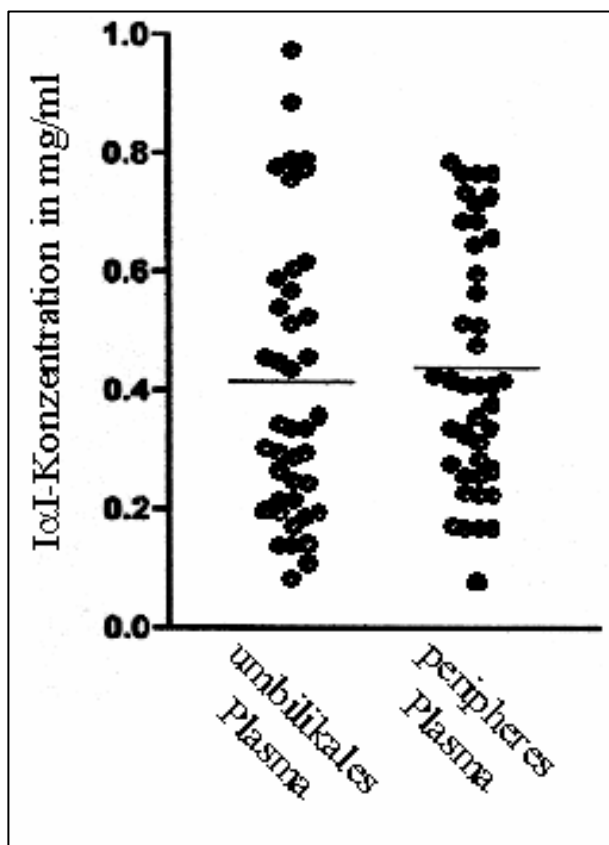


Abb. 17: Vergleich der I α I-Konzentration in umbilikalem und peripherem Plasma.

Bei 41 Neugeborenenpaaren wurden die I α I-Plasmaspiegel von Nabelschnurblutproben bzw. peripheren Blutproben mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die Paare wurden nach gleichem Gestationsalter zusammengestellt, und das periphere Blut wurde spätestens 21h (im Schnitt 2h) nach der Geburt gewonnen.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, lagen die I α I-Konzentrationen der Nabelschnurplasmaproben im Mittel etwas niedriger als die der Plasmaproben des peripheren Blutes. Die mittlere I α I-Plasmakonzentration des Nabelschnurblutes betrug 0,41mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,24mg/ml, während die peripheren (perinatalen) Blutproben im Mittel einen I α I-Spiegel von 0,44mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,21mg/ml aufwiesen. Da der p-Wert mit 0,5921 größer als 0,05 war, waren die Mittelwerte beider Gruppen nicht signifikant verschieden.

Bei den 41 Fällen dieser Studie unterschieden sich die I α I-Konzentrationen zwischen umbilikalen und peripheren Plasmaproben um 0,01-0,75mg/ml, wobei jeweils die Hälfte der umbilikalen Plasmaproben einen höheren bzw. niedrigeren I α I-Plasmaspiegel als die dazugehörigen Proben des peripheren Blutes aufwiesen.

Die Ergebnisse dieses Vorversuches deuten darauf hin, dass die I α I-Plasmakonzentration in umbilikalem und peripherem (perinatalem) Blut annähernd gleich ist, sodass in der eigentlichen Studie nach dem derzeitigen Stand der Vorversuche Plasmaproben umbilikalen Ursprungs hätten verwendet werden können.

3.4.1.4. Inter- α -Inhibitor in perinatalem im Vergleich zu postnatalem Plasma

Da viele Organe einschließlich der Leber zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht vollständig entwickelt sind und daher nicht ihre volle Funktion ausüben können, ist zu vermuten, dass auch die I α I-Produktion der Leber bei der Geburt noch nicht voll ausgebildet ist.

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde in 41 perinatalen (peripher-venösen) und 22 postnatalen (peripher-venösen) Plasmaproben, die 2-74 Tage (im Mittel 28 Tage) nach der Geburt gewonnen wurden, die I α I-Konzentration mit Hilfe des Sandwich-ELISA bestimmt. Das Gestationsalter der Neugeborenen, bei denen die perinatalen Plasmaproben gewonnen worden waren, lag zwischen 26 und 40 Wochen (im Mittel bei 36 Wochen), während die Neugeborenen für die postnatalen Plasmaproben ein Gestationsalter zwischen 22 und 37 Wochen (im Mittel bei 29 Wochen) aufwiesen.

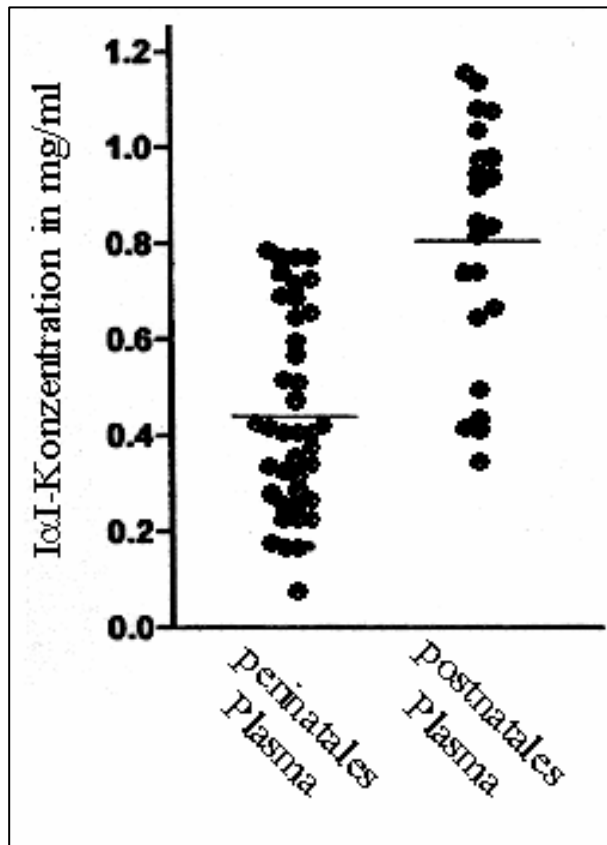


Abb. 18: Bestimmung der IαI-Konzentration in perinatalem und postnatalem Plasma.

Bei 41 Neugeborenen wurden die IαI-Plasmaspiegel von perinatal gewonnenen Blutproben und bei 22 Neugeborenen die IαI-Plasmaspiegel von 2-74 Tage nach der Geburt (postnatal) gewonnenen Blutproben mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

Wie Abb. 18 zeigt, lagen die IαI-Konzentrationen der perinatalen Plasmaproben im Mittel deutlich niedriger als die der Proben aus postnatalem Plasma. Die mittlere IαI-Plasmapkonzentration des perinatalen Blutes betrug 0,44mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,21mg/ml, während die postnatalen Plasmaproben im Mittel einen IαI-Spiegel von 0,80mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,25mg/ml aufwiesen. Bei einem p-Wert unter 0,0001 waren die Mittelwerte beider Gruppen signifikant verschieden.

Um den Verlauf der postnatalen Entwicklung des IαI-Plasmaspiegels weiter zu charakterisieren, wurde die IαI-Konzentration in drei aufeinander folgenden Plasmaproben eines Neugeborenen bestimmt, die wenige Stunden nach der Geburt, nach einem Lebenstag bzw. nach drei Lebenstagen gewonnen worden waren. Bei dem Neugeborenen handelte es sich um ein Frühgeborenes mit einem Gestationsalter von 28 Wochen und einem Geburtsgewicht von 980g. Damit lag das Gestationsalter dieses Neugeborenen im unteren Bereich der Perinatal-Gruppe und zwischen dem Median und dem Mittelwert der Postnatal-Gruppe.

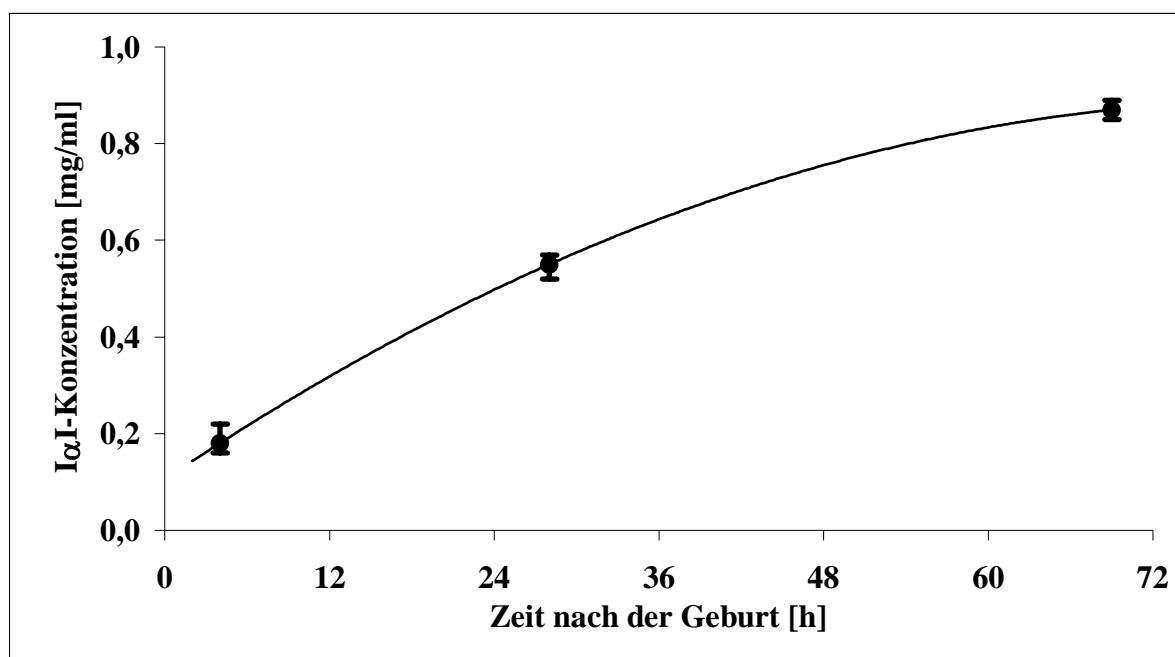


Abb. 19: Längsschnittstudie zur Bestimmung des postnatalen IαI-Plasmaspiegels am Beispiel eines Neugeborenen.

Bei dem Neugeborenen wurden 4h, 28h und 69h nach der Geburt Blutproben entnommen. Mittels Sandwich-ELISA wurde der IαI-Plasmaspiegel in den drei Proben bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen als Punkte der Ausgleichskurve und als Fehlerindikatoren die maximalen Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert.

Wie in Abb. 19 zu sehen ist, stieg der IαI-Plasmaspiegel in diesem Neugeborenen von 0,18mg/ml (4h nach der Geburt) innerhalb von 24h auf 0,55mg/ml und innerhalb weiterer 41h auf 0,87mg/ml an. Somit lag der Ausgangswert der IαI-Plasmakonzentration noch unter dem Mittelwert der Perinatal-Gruppe, während er innerhalb von etwa drei Tagen auf einen Wert über dem Mittel der Werte der Postnatal-Gruppe anstieg.

Offensichtlich ist die IαI-Produktion in der Leber zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht voll ausgeprägt. Nach der Geburt kommt es zu einer rapiden Zunahme der Expression, sodass drei Tage post partum der IαI-Plasmaspiegel deutlich ansteigt. Da die Sepsis der Neugeborenen dieser Studie zwischen dem 1.-58. (im Mittel am 21.) Lebenstag diagnostiziert wurde, konnten keine perinatalen (umbilikal), sondern nur postnatale (in dieser Studie zwischen dem 2.-74. (im Mittel am 28.) Lebenstag) Plasmaproben als Negativkontrollen verwendet werden, d.h. dass nicht auf die vom Neugeborenen einfacher zu bekommenden Nabelschnurproben zurückgegriffen werden konnte.

3.4.2. Korrelation von I α I-Plasmaspiegel und Sepsis

3.4.2.1. Inter- α -Inhibitor im Plasma von Neugeborenen bei Sepsis

Im Focus dieser Arbeit sollte die Fragestellung bearbeitet werden, ob sich die Konzentration von I α I im Plasma von Neugeborenen mit einer Sepsis von nicht-septischen Neugeborenen unterscheidet.

Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurde I α I in 59 postpartalen Plasmaproben nicht-septischer Neugeborener und in 19 Plasmaproben septischer Neugeborener mit Hilfe des Sandwich-ELISA quantifiziert. Die Plasmaproben der septischen Neugeborenen stammten von Proben, die zur mikrobiologischen Sicherung der Sepsis verwendet worden waren und sind daher mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung gleichzusetzen. Die Sepsis trat bei diesen Neugeborenen zwischen dem 1. bis 58. Lebenstag auf. Die Plasmaproben der Kontrollgruppe wurden zwischen dem 2. bis 74. Lebenstag gewonnen.

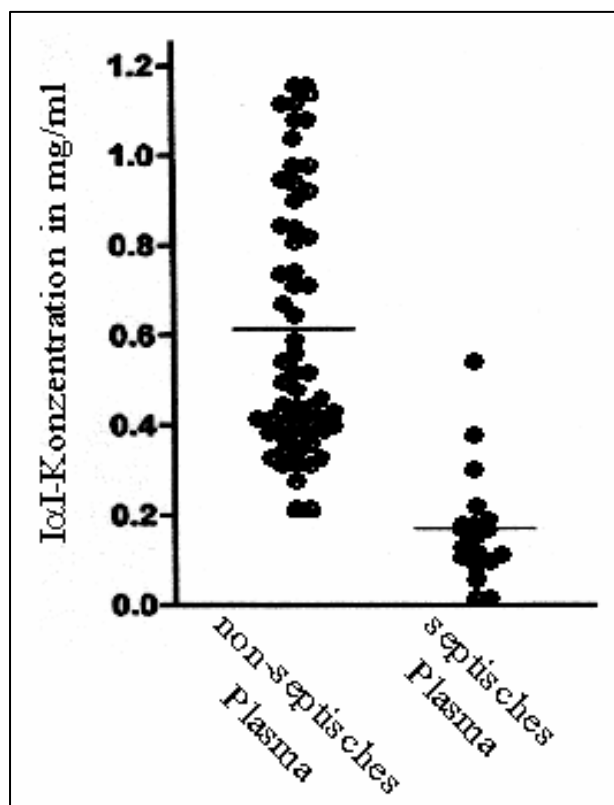


Abb. 20: Bestimmung der I α I-Konzentrationen im Plasma non-septischer und septischer Neugeborener.

Bei 59 nicht-septischen Neugeborenen und 19 Neugeborenen mit einer Sepsis wurde der I α I-Plasmaspiegel mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Die Plasmaproben der non-septischen Kontrollgruppe wurden am 2. bis 74. Lebenstag und die Plasmaproben der Sepsisfälle wurden am 1. bis 58. Lebenstag gewonnen.

Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen dar.

Wie Abb. 20 zeigt, waren die I α I-Konzentrationen der Plasmaproben nicht-septischer Neugeborener im Mittel deutlich höher als die der Plasmaproben septischer Neugeborener. Die mittlere I α I-Plasmakonzentration der nicht-septischen Neugeborenen betrug 0,61mg/ml bei einer Standardabweichung von 0,29mg/ml, während die septischen Neugeborenen im

Mittel einen $\text{I}\alpha\text{I}$ -Spiegel von $0,17\text{mg/ml}$ bei einer Standardabweichung von $0,13\text{mg/ml}$ aufwiesen. Bei einem p-Wert unter $0,0001$ waren die Mittelwerte beider Gruppen signifikant verschieden.

Da man in dieser allgemeinen Darstellung keine Möglichkeit hat, eine Korrelation zwischen der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Konzentration und dem Erreger der Sepsis zu bestimmen, wurde außerdem eine Aufschlüsselung der Sepsisfälle nach dem Erreger vorgenommen.

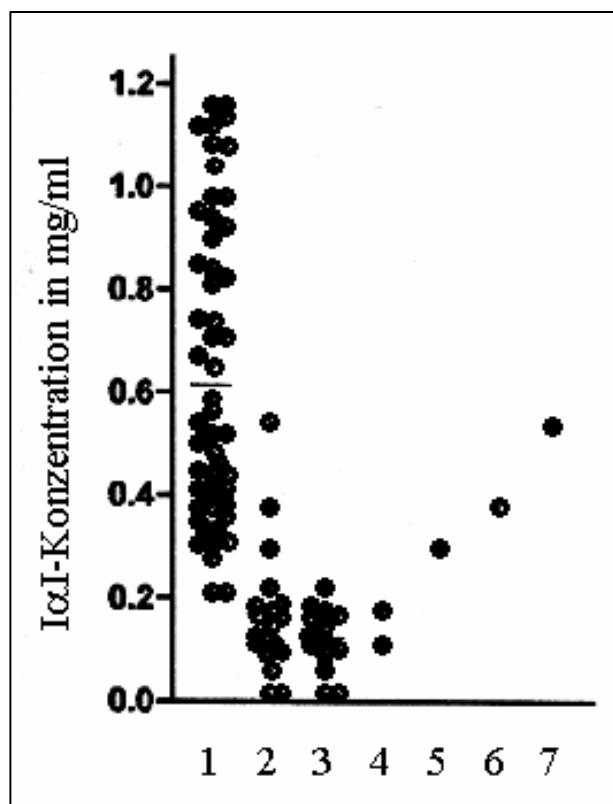


Abb. 21: Korrelation zwischen der $\text{I}\alpha\text{I}$ -Konzentration im Plasma und dem Erreger der Sepsis.

Die einzelnen Gruppen stellen die $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmakonzentration, der durch einen bestimmten Erreger verursachten Sepsis dar.

- 1: non-septische Kontrollgruppe
- 2: alle Sepsisfälle

Sepsis verursacht durch:

- 3: Staphylokokken
- 4: Escherichia coli
- 5: unbekannter Erreger
- 6: Klebsiella oxytoca
- 7: Candida parapsilosis

Wie in Abb. 21 zu sehen ist, waren die drei höchsten $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmakonzentrationen in der Sepsisgruppe der Neugeborenen gemessen worden, deren Sepsis durch Klebsiella oxytoca, Candida parapsilosis bzw. einem im Rahmen der Studie nicht-identifizierten Erreger verursacht worden war, während die Neugeborenen mit einer durch Staphylokokken bzw. Escherichia coli verursachten Sepsis einen deutlich niedrigeren $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegel aufwiesen. Offenbar hängt die Intensität der Abnahme des $\text{I}\alpha\text{I}$ -Plasmaspiegels von der Art des Sepsiserregers ab.

3.4.2.2. Inter- α -Inhibitor im Plasma einzelner Sepsisfälle (Longitudinalstudie)

Um festzustellen, ob sich der Verlauf einer Sepsis bei Neugeborenen auch in der I α I-Plasmakonzentration widerspiegelt, wurden von vier Neugeborenen, bei denen eine Sepsis diagnostiziert worden war, über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen bis zu acht Plasmaproben gewonnen und mit Hilfe des Sandwich-ELISA die I α I-Konzentration bestimmt. Bei allen vier Fällen gab es darüber hinaus noch mindestens eine Plasmaprobe, die wenige Tage vor Diagnosestellung der Sepsis gewonnen worden war und im Sandwich-ELISA eingesetzt werden konnte.

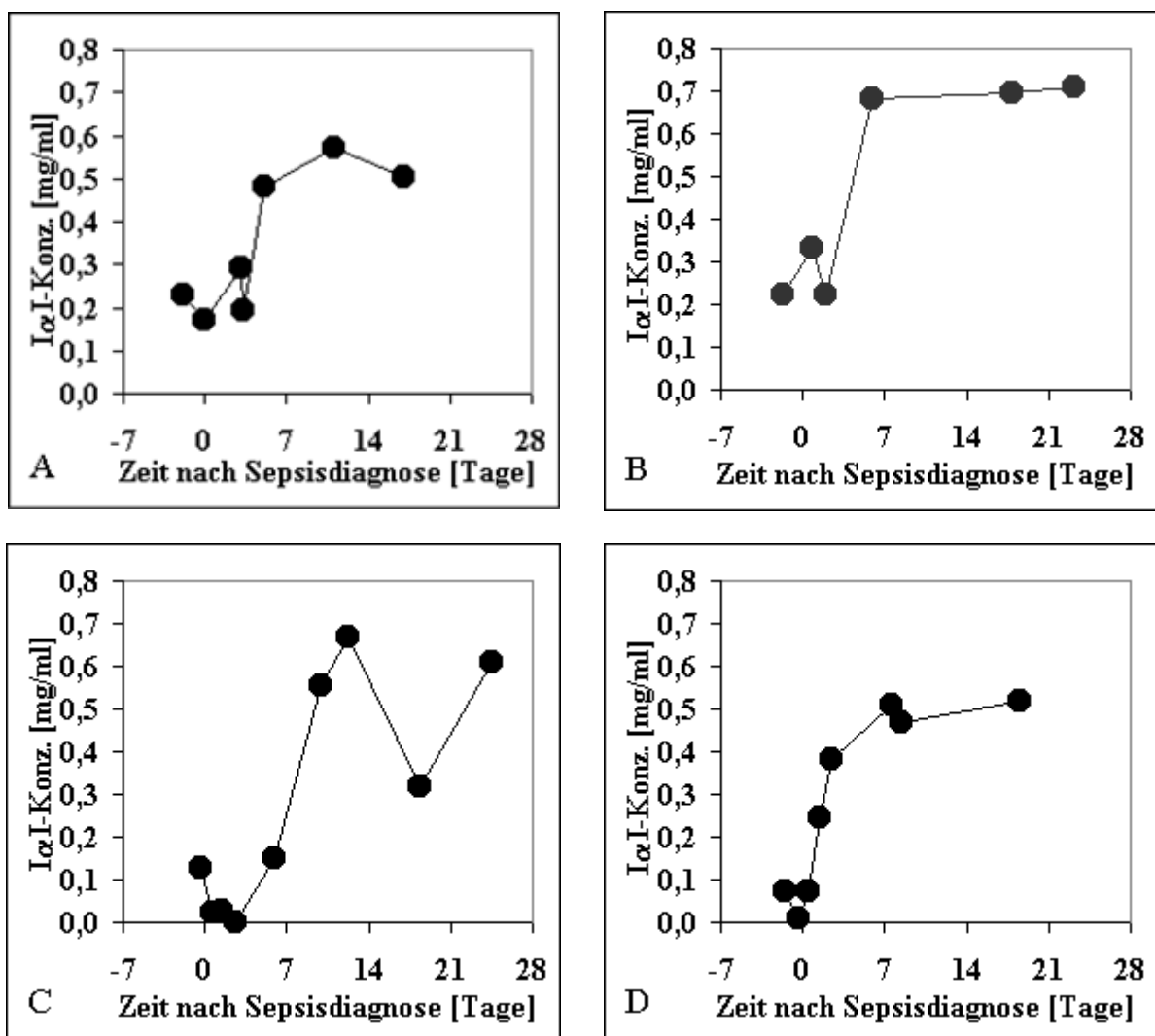


Abb. 22: Längsschnittstudie septischer Neugeborener.

In einem Zeitraum von bis zu vier Wochen wurden von vier Neugeborenen (A, B, C und D) Plasmaproben gewonnen und mittels des Sandwich-ELISA die I α I-Konzentration analysiert. Zum Zeitpunkt 0 (Tage) wurde eine Sepsis diagnostiziert.

Wie Abb. 22 zeigt, wiesen alle vier Neugeborenen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine I α I-Konzentration von weniger als 0,3mg/ml auf. Initial war in drei von den vier Fällen (A, C und D) zunächst eine Abnahme der I α I-Konzentration zu erkennen. Innerhalb von etwa einer Woche nahm bei allen vier Fällen die I α I-Konzentration deutlich zu. In drei Fällen (A, B und D) pendelte sich die I α I-Plasmakonzentration dann relativ konstant bei einem Wert zwischen 0,5-0,7mg/ml ein. Im Fall C kam es am langsamsten zu einem Anstieg der I α I-Konzentration, wobei in der dritten Woche nach Diagnosestellung der Sepsis die I α I-Plasmakonzentration nochmals deutlich abfiel.

Alle vier Neugeborenen mit einer Sepsisdiagnose erhielten ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung (Tag 0) eine antibiotische Therapie, um den jeweiligen Sepsiserreger möglichst frühzeitig zu eliminieren. Offensichtlich stieg die I α I-Plasmakonzentration mit fortschreitender Genesung an und korreliert so mit dem Verlauf der Erkrankung.