

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 25 Patienten mit den Diagnosen systemischer Lupus erythematodes und Sjögren-Syndrom über einen Zeitraum von 3 ½ Jahren untersucht. Die Patienten wurden aus dem Patientenkollektiv der Medizinischen Klinik der Charité mit dem Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie ausgewählt. Die Zustimmung der Ethikkommission für die vorliegenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit liegt vor.

3.1.1. Auswahl der Patienten mit Lupus erythematodes

Insgesamt wurden 13 Patienten mit der klinischen Diagnose LE über einen Zeitraum zwischen 1997 bis 2001, bezüglich der Anamnese und dem klinischen Verlauf beobachtet.

Routinemäßig, als Verlaufskontrolle und zum Angleichen der aktuellen Therapie wurden in unterschiedlichen Zeitabständen bei den Patienten Blutentnahmen durchgeführt.

Von den 13 Patienten waren 2 Männer und 11 Frauen. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug $38,84 \pm 12,62$ Jahre.

Die Altersverteilung der Patienten ist in Abbildung 1 dargestellt.

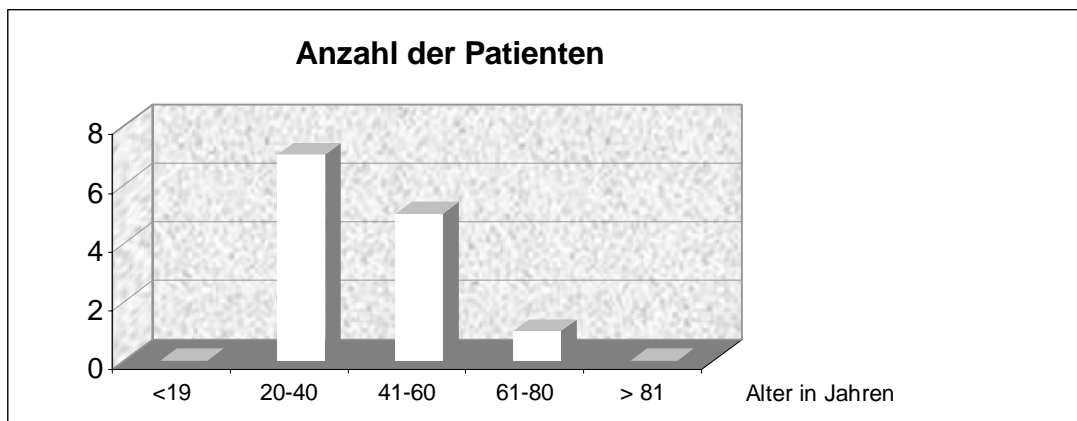


Abbildung 1 Altersverteilung der SLE- Patienten

Einschlusskriterien:

Nach den Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology (ACR), früher American Rheumatism Association (ARA), wird der SLE von anderen Krankheiten differenziert [43].

Es müssen hierbei mindestens 4 der aufgeführten 11 Kriterien erfüllt werden, um die Diagnose zu stellen. Dabei sollten die Kriterien 10 und 11 erfüllt sein.

Die Sensitivität dieser Kriterien wird mit 96 %, die Spezifität mit 96 % bis 99 % angegeben [98].

1. Schmetterlingserythem
2. Diskoider LE
3. Photosensitivität
4. Orale oder nasopharyngeale Ulzera
5. Nichterosive Arthritis an > 2 peripheren Gelenken mit Druckschmerz, Schwellung oder Erguss
6. Serositis: Pleuritis, Perikarditis
7. Nephritis: anhaltende Proteinurie >0,5 g/Tag oder der Nachweis zellulärer Zylinder im Urin
8. ZNS- Beteiligung: Krampfanfälle oder Psychosen
9. Zytopenie: hämolytische Anämie oder Leukopenie < 4000/ μ l oder Lymphopenie < 1500/ μ l , Thrombozytopenie < 100 000/ μ l bei Ausschluss einer Medikamenteninduktion
10. **Serologie I:** erhöhter Titer für Antikörper gegen native dsDNA, oder Nachweis von Sm-Antikörpern oder Nachweis von anti-Phospholipid-Antikörpern durch 1) erhöhte anti-Cardiolipin-AK (IgG oder IgM)
2) positives Lupus- Antikoagulans oder 3) falsch pos. Lues-Serologie
11. **Serologie II:** erhöhte antinukleäre Antikörper bei Ausschluss von Medikamenten, die einen Lupus auslösen können

Tab. 3 Klassifikationskriterien des ACR für den LE [43]

Nach der Ausprägung der Erkrankung bezüglich der subjektiven Symptome und der klinischen Parameter wurden die Patienten in je eine Gruppe mit diskoider Form des Lupus erythematoses und eine Gruppe mit im Vordergrund stehender systemischer Beteiligung eingeteilt.

Als **Ausschlusskriterium** für die Aufnahme in diese Untersuchung sind bestehende Schwangerschaft und Stillzeit, aber auch das Vorliegen eines sogenannten „seronegativen“ Lupus erythematoses definiert.

3.1.2. Patienten mit Lupus erythematoses - Gruppe 1

In dieser Gruppe wurden 6 Patienten mit diskoider Form und geringer systemischer Beteiligung des Lupus erythematoses untersucht. Alle untersuchten Patienten sind Frauen.

Die Patienten zeigten eine Altersverteilung zwischen 25 und 63 Jahren, im Mittel $43,5 \pm 12,47$ Jahren.

	Name	Geschlecht	Alter	Erstdiagnose	Vorhandene ACR-Kriterien
1.	P.J.	w.	25 Jahre	10/98	1.,2.,5.,10.,11.
2.	L.A.	w.	42 Jahre	1979	2.,9.,10.,11.
3.	M.S.	w.	32 Jahre	1997	2.,5.,9.,10.,11.
4.	J.R.	w.	48 Jahre	1995	2.,5.,8.,10.,11.
5.	R.I.	w.	63 Jahre	1988	3.,5.,8.,9.,10.,11
6.	S.P.	w.	51 Jahre	01/96	1.,3.,9.,10.,11.
	X		43,5		
	SD		12,47		

Tab. 4 Patienten der LE-Gruppe 1

3.1.3. Patienten mit systemischen Lupus erythematoses – Gruppe 2

Die Gruppe 2 beinhaltet die 7 Patienten mit im Vordergrund stehender systemischer Ausprägung des LE, d.h. mit renaler oder pulmonaler Beteiligung, darunter waren 5 Patienten Frauen und 2 Patienten Männer.

Es wurden Patienten im Alter von 24 Jahren bis 53 Jahren untersucht, das durchschnittliche Alter lag hier bei $34,85 \pm 11,31$ Jahren. Der Nachweis z.B. der Nierenbeteiligung erfolgte durch das Vorliegen einer starken Proteinurie bzw. über das Ergebnis einer histologischen Untersuchung.

	Name	Geschlecht	Alter	Erstdiagnose	Vorhandene ACR-Kriterien
1.	H.A.	w.	51 Jahre	1983	5.,7.,9.,10,11
2.	P.S.	w.	28 Jahre	5/97	7.,9.,10.,11.
3.	S.M.	m.	24 Jahre	12/97	5.,9.,10.,11.
4.	V.K.	w.	53 Jahre	9/97	5.,7.,10.,11.
5.	B.O.	m.	30 Jahre	1/93	7.,9.,10.,11.
6.	K.S.	w.	24 Jahre	1996	5.,7.,9.,10.
7.	K.L.	w.	34 Jahre	9/98	1.,5.,10.,11.
	X		34,85		
	SD		11,31		

Tab. 5 Patienten der LE-Gruppe 2

3.1.4. Auswahl der Patienten mit Sjögren-Syndrom – Gruppe 3

Für diese Untersuchung wurden ebenfalls Patienten aus dem Bereich der Medizinischen Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité mit der Diagnose primäres Sjögren-Syndrom, gesichert durch die Anamnese und die klinischen Befunde, ausgewählt.

Insgesamt wurde der Krankheitsverlauf von 11 Patienten mit der Diagnose primäres Sjögren-Syndrom über einen Zeitraum von 3 ½ Jahren untersucht. In diesem Rahmen wurden zu unterschiedlichen Zeiten je nach Klinik Blutentnahmen zur Verlaufskontrolle und zur Anpassung der Therapie durchgeführt. Es wurde Patienten im Alter von 20 Jahren bis 78 Jahren in die Untersuchung einbezogen. Das durchschnittliche Alter der in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten betrug dabei $45,9 \pm 17,78$ Jahre. **Abbildung 2** zeigt die Altersstruktur der Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom.

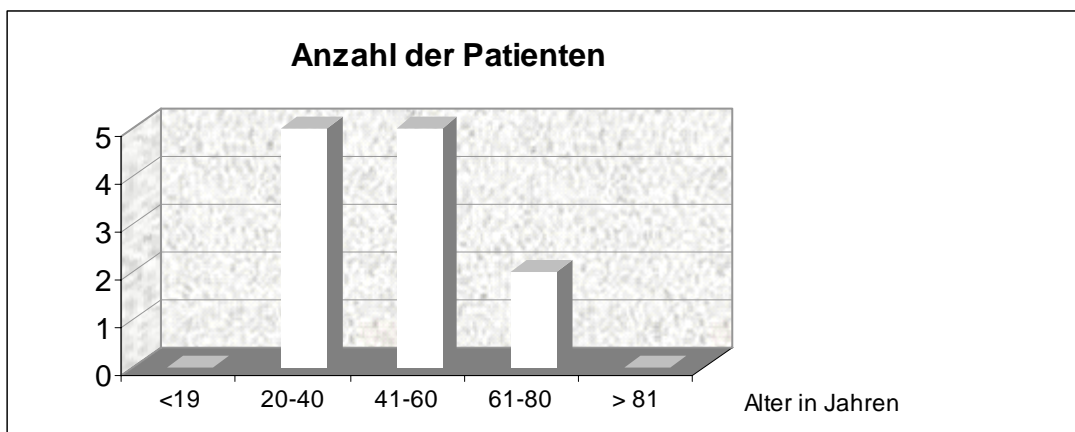


Abbildung 2 Alter der Patienten mit pSS

Einschlusskriterien:

Die Diagnose des primären Sjögren-Syndrom wurde anhand der derzeit geltenden Kriterien nach Vitali et. al. gestellt [105, 105a].

Die nachfolgende Tabelle stellt einen Überblick über die Kriterien zum Sjögren-Syndrom dar. Die Diagnose gilt als sicher, wenn mehr als 4 Kriterien zutreffen. Die Sensitivität liegt bei Anwendung dieser Kriterien bei 93,5 %, die Spezifität bei 94 % für das primäre Sjögren-Syndrom [105, 105a].

1. Okuläre Symptome

Definition: Vorhandensein von mindestens einem Symptom

- tägliche, anhaltende, lästige Augentrockenheit > 3 Monate
- wiederkehrendes Sandkorngedühl in den Augen
- Anwendung eines künstlichen Tränenflüssigkeitsersatzes > 3 mal täglich

2. Orale Symptome

Definition: Vorhandensein von mindestens einem Symptom

- tägliches Gefühl der Mundtrockenheit > 3 Monate
- wiederkehrende oder anhaltende Speicheldrüenschwellung im Erwachsenenalter
- häufiges Trinken erforderlich, um trockene Speisen schlucken zu können

3. Okuläre Befunde

Definition: Objektivierung des Augenbefalls durch ein positives Ergebnis in mindestens einem der beiden folgenden Tests:

- Schirmer-I-Test (≤ 5 mm in 5 Minuten)
- Bengalrotfärbung (≥ 4 nach Bijsterveld- Score)

4. Histopathologische Auffälligkeiten

Definition: „Focus score“ ≥ 1 bei der Biopsie der Speicheldrüsen der Lippenschleimhaut, Focus definiert als Ansammlung von mindestens 50 mononukleären Zellen, „Focus score“ definiert als Anzahl der Foci auf 4 mm² Drüsengewebe

5. Speicheldrüsenbefall

Definition: Objektivierung des Speicheldrüsenbefalls durch ein positives Ergebnis mindestens einem der 3 folgenden Tests:

- Speicheldrüsenzintigraphie
- Sialographie der Glandula parotidea
- Messung des unstimulierten Speichelflusses ($\leq 1,5$ ml in 15 Minuten)

6. Autoantikörper

Definition: Nachweis von mindestens einem der folgenden Autoantikörper im Serum:

- Anti-Ro/SS-A- oder Anti-La/SS-B-Antikörper
- antinukleäre Antikörper (ANA)
- Rheumafaktor

Tab. 6 Kriterien zur Diagnose des primären Sjögren-Syndrom [93]

Ausschlusskriterium hierbei war eine schon vorbestehende lymphoproliferative Erkrankung, AIDS, Sarkoidose und eine bestehende Schwangerschaft, sowie Stillzeit.

Unter den untersuchten 11 Patienten mit der Diagnose primäres Sjögren-Syndrom waren 9 Frauen und 2 Männer.

Nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die untersuchten Patienten.

	Name	Geschlecht	Alter	Erst- diagnose	Nachweis von Auto- Antikörpern
1.	P.M.	w.	41 Jahre	5/97	Anti-Ro, ANA,
2.	E.K.	w.	52 Jahre	6/95	Anti-Ro/La,ANA,RF
3.	M.C.	w.	20 Jahre	7/97	ANA, RF
4.	K.M.	w.	78 Jahre	1978	ANA,Anti-Ro,RF
5.	R.T.	m.	37 Jahre	1994	ANA,Anti-Ro/La,RF
6.	M.K.	w.	33 Jahre	1995	ANA,Anti-Ro/La,
7.	L.C.	w.	58 Jahre	1990	ANA
8.	J.G.	w.	58 Jahre	1995	ANA
9.	E.T.	m.	43 Jahre	1987	ANA,Anti-Ro/La,RF
10.	H.H.	w.	75 Jahre	1995	ANA, RF
11.	J.L.	w.	28 Jahre	1995	ANA, RF
	X		45,9		
	SD		17,78		

Tab. 7 Patienten mit pSS

3.2. Materialgewinnung

Die Blutabnahme erfolgte jeweils morgens um 7.30 Uhr mittels einer Serummonovette. Anschließend wurde das Blut sofort bei 3000 U/min zentrifugiert, aliquotiert und bis zur Aufarbeitung bei < 20°C eingefroren.

3.3. Methodik zur Bestimmung von sCD14, sE-Selectin, sVCAM-1, sICAM-1

3.3.1. sCD14

Prinzip:

Die quantitative sCD14- Bestimmung erfolgte mittels Sandwich-Enzymimmunoassay (sCD14 Assay; IBL Hamburg).

Ein oligoklonaler Antikörper ist an einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Das in der Probe vorhandene sCD14 bindet spezifisch an diesen Antikörper. In einem zweiten Schritt wird ein weiterer monoklonaler, biotinkonjugierter Antikörper an einem zweiten Epitop des sCD14 gebunden.

Das zugegebene Streptavidin-Peroxidase-Konjugat bindet an diesen Komplex und mittels einer TMB-Substratlösung lässt sich über eine Farbreaktion die Konzentration an sCD14 ermitteln. Der zunächst blaue Farbkomplex zeigt nach Zugabe der Stopplösung einen gelben Farbumschlag, dieser kann photometrisch bestimmt werden und ist der Konzentration an freiem CD14 in der Probe proportional.

Vorbereitung und Reagenzien:

Mikrotiterplatte	mit oligoklonalem Antikörper gegen sCD14 beschichtet
Proben	auf Zimmertemperatur bringen, jede Probe 15 s vortexen, 1:101 mit Verdünnungspuffer verdünnen, 10 µl Probe + 1.000 µl Puffer
Waschpuffer	50 ml 20faches Konzentrat aus einem Phosphatpuffer und Tween, vor Gebrauch mit 950 ml Aqua dest. mischen
Verdünnungspuffer	lyophilisiert, enthält BSA, mit 40 ml gebrauchsfertigem Waschpuffer auflösen
Standard	lyophilisiert, in 0,5 ml Verdünnungspuffer lösen
Kontrollserum	lyophilisiertes Humanserum, 1:101 vorverdünnt, in

	0,5 ml Verdünnungspuffer lösen Konzentration ist im Qualitätszertifikat angegeben
Anti-sCD 14 monokl. Antikörper	konjugiert mit Biotin, konzentriert, 1:41 mit Verdünnungspuffer verdünnen
Enzymkonjugat	20fach konzentriert, Peroxidase an Streptavidin konjugiert, 1:101 mit Verdünnungspuffer verdünnen
TMB-Substratpuffer	gebrauchsfertiger Citratpuffer mit Wasserstoffperoxid und stabilisierenden Zusätzen
TMB- Substratlösung (Tetramethylbenzidin)	50fach konzentriert, 1:51 mit TMB-Substratpuffer verdünnen
TMB-Stopplösung	gebrauchsfertig, 1 M Schwefelsäure,
<u>Testdurchführung:</u>	je 50 µl Standards (unverdünnt), Kontrollserum und Patientenproben (verdünnt) pro Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren
	je 50 µl anti-sCD14 hinzupipettieren
	⇓
	Platte mit Klebefolie verschließen und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubieren
	⇓
	Überstand verwerfen, Platte jeweils dreimal mit Waschpuffer waschen, Inhalt ausleeren und die Platte auf saugfähiger Unterlage ausklopfen
	⇓
	je 150 µl Enzymkonjugat pro Vertiefung pipettieren,
	Platte erneut mit Klebefolie verschließen,

1 Stunde auf dem Orbitalschüttler inkubieren



Wiederholung des dreimaligen Waschvorganges,
vollständiges Ausleeren der Platte (siehe vorher)



200 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren
für 10-20 min bei Raumtemperatur inkubieren,



je 100 µl Stopplösung in der gleichen Reihenfolge
pipettieren

Stopp der Substratreaktion

Platte kurz schütteln, Extinktionsmessung bei 450 nm

Testauswertung:

Die Auswertung erfolgte mit einem computergestützten
Programm.

Referenzbereich:

1,4 – 4,5 µg/ml (93 gesunde Probanden)
Sensitivität < 0,5 ng/ml

3.3.2. sE-Selectin

Prinzip:

Für die Bestimmung der sE-Selectin- Konzentration in Patientenserum stand uns ein kommerzieller Sandwich-Enzymimmunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA) zur Verfügung. An einen monoklonalen Antikörper, welcher auf einer Mikrotiterplatte fest gebunden wurde, bindet das sE-Selectin aus der Patientenprobe. Ein zweiter enzym-gebundener monoklonaler Antikörper vervollständigt den Sandwich-Komplex. Alle ungebundenen Substanzen werden in einem Waschschrift entfernt. Das zugegebene Substrat entwickelt eine Farbreaktion, die Extinktion ist proportional zur sE-Selectin- Konzentration in der Probe.

Vorbereitung und Reagenzien:

Microtiterplatte

beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper

(Maus) gegen humanes sE-Selectin

Proben	Patientenseren auf Raumtemperatur erwärmt, 15 s vortexen, 1: 20 verdünnen, 10 µl Probe + 190 µl Verdünnungspuffer
Verdünnungspuffer	mit Konservierungsstoffen und blauem Farbstoff ergänzte Proteinbase
Waschpuffer	25 fach konzentrierter Puffer mit Zusätzen, vor Gebrauch 20 ml mit dest. Wasser verdünnen, um 500 ml Waschpuffer zu erhalten
sE-Selectin Standard	lyophilisiert, in 800 µl dest. Wasser lösen, max. 10 min vor Gebrauch, vorsichtig mischen,
sE-Selectin Konjugat	monoklonaler Antikörper gegen humanes sE-Selectin, gebunden an Meerrettichperoxidase, 250 µl in den Konjugatpuffer überführen, vorsichtig mischen
Konjugat-Puffer	11ml Puffer mit stabilisierenden Substanzen
sE-Selectin Kontrolle	lyophilisiert, enthält humanes Kontrollserum, in 500 µl dest. Wasser unmittelbar vor Gebrauch lösen, vorsichtig mischen, 1:20 Verdünnung mit Verdünnungspuffer herstellen
Substrat	Tetramethylbenzidinlösung, gebrauchsfertig
Stopp-Lösung	11 ml einer Säure-Lösung
<u>Testdurchführung:</u>	100 µl des verdünnten Konjugates in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren

je 100 µl Standard, verdünnte Kontrolllösung bzw.
verdünnter Probe entsprechend dazugeben



mit der Klebefolie die Platte verschließen und
1,5 h bei Raumtemperatur inkubieren



den Überstand aus der Platte entfernen, jede Vertiefung
6 x mit 300 µl Waschpuffer spülen, restliche Flüssig-
keit auf einer trockenen Unterlage vollständig entfernen



100 µl Substrat-Lösung in jede Vertiefung geben



Platte erneut verschließen und 30 min bei Raum-
temperatur inkubieren



100 µl Stopp-Lösung hinzugeben, dabei die Reihenfolge
des Pipettierens beibehalten



innerhalb von 30 min wird die Extinktion bei einer
Wellenlänge von 450 nm auf einem Microplatten-
reader gemessen, Referenzwellenlänge 620 nm

Testauswertung:

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte
mit Hilfe eines computergestützten Programms.

Laborinterner Referenzbereich: 9,0-42,0 ng/ml (65 gesunde Probanden)

Sensitivität < 0,1 ng/ml

3.3.3. sVCAM-1

Prinzip:

Zur Messung der sVCAM-1 Konzentration in verschiedenen Patientenproben wurde ein kommerzieller Enzymimmunoassay (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwandt.

Dieser Assay beruht auf der Sandwich-Technik, bei der ein monoklonaler Antikörper auf einer Mikrotiterplatte fixiert ist. Das in der Probe enthaltene sVCAM-1 wird gebunden und ein zweiter enzym-gekoppelter polyklonaler Antikörper bindet an den zuvor gebildeten Komplex.

Die anschließende Substratzugabe führt zu einer Farbreaktion, die nach Beenden der Reaktion photometrisch gemessen werden kann und der vorhandenen Konzentration an sVCAM-1 in der Probe proportional ist.

Vorbereitung und Reagenzien:

Microtiterplatte	96 well Platte mit monoklonalem Antikörper (Maus) beschichtet
Proben	ca.45 min bei Raumtemperatur erwärmen, jede Probe 15 s vortexen, alle Proben 1:50 mit 245µl Verdünnungspuffer vorverdünnen,
Verdünnungspuffer	40ml gepufferte Proteinbase, mit stabilisierenden Zusätzen und einem Farbstoff
Waschpuffer	25 fach konzentriert, 20ml auf 500ml mit dest. Wasser auffüllen
sVCAM-1 Standard	lyophilisiert, mit einem Farbstoff, in 800µl dest. Wasser rekonstituieren, max. 10 min lösen, vorsichtig mischen
sVCAM-1 Konjugat	Konzentrat mit polyklonalem Antikörper (Schaf) gegen humanes sVCAM-1, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase, 250µl in den Konjugatpuffer überführen
Konjugatpuffer	11ml Puffer mit stabilisierenden Zusätzen
sVCAM-1 Kontrollserum	lyophilisiert, kurz vor Gebrauch in 500µl dest. Wasser lösen, anschließend 1:50 mit Verdünnungspuffer verdünnen,

Substrat	11ml einer Tetramethylbenzidin- Lösung
Stopp-Lösung	11ml einer Säure-Lösung
<u>Testdurchführung:</u>	<p>100µl Konjugat-Lösung in jede Vertiefung der Microtiterplatte pipettieren</p> <p>100µl Standard, verdünntes Kontrollserum und verdünnte Proben in entsprechende Vertiefungen hinzufügen</p> <p style="text-align: center;">⇓</p> <p>die Platte mit einer Klebefolie sorgfältig verschließen, 1,5 h bei Raumtemperatur inkubieren</p> <p style="text-align: center;">⇓</p> <p>den Überstand in den Vertiefungen dekantieren, mit 300µl Waschpuffer jede Vertiefung 6x waschen, restliche Flüssigkeit auf einer trockenen Unterlage entfernen</p> <p style="text-align: center;">⇓</p> <p>100µl Substrat-Lösung pipettieren</p> <p style="text-align: center;">⇓</p> <p>Platte erneut verschließen und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren</p> <p style="text-align: center;">⇓</p> <p>100µl in jede Vertiefung hinzugeben, gleiche Reihenfolge beachten</p> <p style="text-align: center;">⇓</p> <p>innerhalb von 30 min auf einem Mikroplatten-Reader die Extinktion bestimmen, Wellenlänge 450 nm, Korrekturwellenlänge 620 nm</p>
<u>Testauswertung:</u>	Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit

einem computergestützten Programm.

Referenzbereich: 395-714 ng/ml (105 gesunde Probanden)
Sensitivität < 2,0 ng/ml

3.3.4. sICAM-1

Prinzip:

Die Bestimmung von löslichem ICAM-1 erfolgte mit dem Sandwich- Enzymimmunoassay der Fa. R&D Systems (Minneapolis, USA).

Ein monoklonaler Antikörper (Maus), spezifisch für sICAM-1 wurde auf eine Mikrotiterplatte gecoatet. Das in den Proben enthaltene sICAM-1 bildet mit dem immobilisierten Antikörper einen Komplex, an welchen ein zweiter enzymgekoppelter monoklonaler Antikörper ebenfalls an sICAM-1 bindet. Das zugegebene Substrat wird durch das Antikörper-gebundene Enzym umgesetzt, die dabei entstehende Farbreaktion wird photometrisch gemessen und ist der sICAM-1 Konzentration proportional.

Vorbereitung und Reagenzien:

Microtiterplatte	beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper gegen sICAM-1
Proben	alle Proben auf Raumtemperatur bringen, jede Probe 15 s vortexen, die Proben wurden 1:20 vorverdünnt, d.h. 10 µl Probe + 190 µl Verdünnungs-puffer
Verdünnungspuffer	42 ml pufferte Proteinbase, mit einem Farbstoff-Zusatz
Waschpuffer- Konzentrat	auf Raumtemperatur erwärmen, 20 ml Konzentrat auf 500 ml dest. Wasser auffüllen

sICAM-1 Standards	lyophilisiert, mit 800 ml dest. Wasser rekonstituieren, bis 10 min bei Raumtemperatur lösen, anschließend vorsichtig mischen, Konzentration wie angegeben
sICAM-1 Kontrollserum	lyophilisiert, mit 500 ml dest. Wasser bis 10 min bei Raumtemperatur lösen, 20 x konzentriert, 15 µl + 285 µl Verdünnungspuffer um eine 1:20 Verdünnung herzustellen
sICAM-1 Konjugat	konzentriert, 250 µl der rekombinanten Antikörperlösung in Konjugat-Puffer überführen, vorsichtig mischen, der Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt
sICAM-1 Konjugatpuffer	11 ml Puffer mit stabilisierenden Lösungen zum Verdünnen des Antikörper-Konjugats
Substrat	11 ml Tetramethylbenzidin-Lösung mit stabilisierenden Zusätzen
Stopp-Lösung	11 ml einer H ₂ O ₂ - Lösung
<u>Testdurchführung:</u>	100 µl verdünntes Konjugat in jede Vertiefung der Microtiterplatte pipettieren
	je 100 µl Standard, verdünntes sICAM-1 Kontrollserum oder verdünnte Probe in die entsprechenden Vertiefungen hinzufügen
	⇓
	Platte sorgfältig mit einer Klebefolie verschließen, 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren
	⇓
	den Überstand dekantieren, 6 x mit je 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung füllen, anschließend den Überstand auf einer trockenen Unterlage vollständig entfernen

⇓

sofort 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung pipettieren

⇓

Platte verschließen und 30 min bei Raumtemperatur inkubieren

⇓

100 µl Stopp-Lösung pro Vertiefung pipettieren, gleiche Reihenfolge

⇓

innerhalb von 30 min Extinktionsmessung bei 450 nm
Korrekturmessung bei 620 nm

Testauswertung: Die Auswertung erfolgte mittels computergestütztem Programm.

Referenzbereich: 229 – 410 ng/ml (131 gesunde Probanden)
Sensitivität < 0,35 ng/ml

3.4. Statistische Analysen

Die arithmetischen Mittelwerte und ihre Standardabweichungen wurden für alle gemessenen Parameter in den einzelnen Gruppen berechnet. Wegen der unterschiedlichen Probenanzahl (4-25) bei einzelnen Patienten wurde jeweils die Mittelwerte berechnet und aus diesen dann der Mittelwert für die entsprechende Gruppe gebildet.

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Programms SAS-System Version 8.2. /STAT durchgeführt. Um die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Parametern darzustellen, wurde der Pearsonsche Korrelationskoeffizient (SAS procedure KORR) bestimmt.

In der Verlaufsdarstellung wurden Regressionsanalysen ebenfalls mit dem Programm SAS/STAT REG durchgeführt. Die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte wurden mit Hilfe des Programms SAS-System Version 8.2 (SAS MEANS/TTEST procedures) berechnet.