

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Studiendesign

In die vorliegende prospektive Studie wurden über einen Zeitraum von 12 Monaten (August 2003 bis August 2004) alle Patientinnen zwischen der 15+0 und 20+6 SSW eingeschlossen, bei denen aus genetischer Indikation eine Amniozentese in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Abteilung für Pränatale Diagnostik und Therapie, Charité Mitte, Universitätsmedizin zu Berlin durchgeführt wurde und unsere Einschlusskriterien erfüllten. In das Untersuchungskollektiv konnten 385 Patientinnen aufgenommen werden. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité im Juni 2003 bewilligt.

Die Patientinnen wurden vor der Fruchtwasserentnahme sowie vor der Studienteilnahme über das Risiko einer durch die Amniozentese ausgelösten Fehlgeburt unterrichtet. Dieses Risiko wird an der Charité und vergleichbaren Perinatalzentren mit 0,5% angegeben (Wenstrom et al 1996). Die Studienteilnahme hat keinerlei Einfluss auf dieses Risiko. Nach Aufklärung über Zielsetzung der Studie, über Methoden und Risiken stimmten alle in die Studie eingeschlossenen Probandinnen der Teilnahme schriftlich zu. Zusätzlich wurden die Patientinnen darüber informiert, dass sie die Teilnahmeerklärung jederzeit ohne Angaben von Gründen widerrufen können, ohne dass sich hierdurch für sie Nachteile bei der medizinischen Versorgung ergeben würden.

Die Datenerhebung erfolgte durch einen standardisierten Fragebogen. Zusätzliche Informationen über die Schwangere wurden dem Mutterpass entnommen. Dabei handelt es sich um folgende geburtshilfliche Daten: Name und Geburtsdatum der Schwangeren, Gravidität und Parität, Anzahl der bisherigen Schwangerschaftsabbrüche, Aborte und Frühgeburten und das Gestationsalter zum Zeitpunkt der Amniozentese (entweder post menstruationem nach dem ersten Tag der letzten Menstruation bestimmt oder sonographisch durch Frühultraschall in der 10. bis 12. Schwangerschaftswoche). Des Weiteren wurden der zu erwartende Entbindungstermin und bisherige Operationen an der Zervix (Konisation, Cerclage) dokumentiert.

Die postpartale Datenerhebung erfolgte ebenfalls durch einen standardisierten Fragebogen, den die Probandinnen zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie erhielten und nach der Geburt ihres Kindes wieder an uns zurück sendeten. Darin wurde gefragt nach Geburtstermin, Gestationsalter zum Zeitpunkt der Entbindung (Schwangerschaftswoche- und Tag), Entbindungsklinik, Entbindungsmodus, Größe (in cm), Gewicht (in Gramm), Geschlecht, APGAR-Werten nach ein, fünf und zehn Minuten, dem Nabelschnur-pH, ob ein vorzeitiger Blasensprung bestand und ein Aufenthalt auf der Neonatologie nötig war.

### **3.2 *Einschlusskriterien***

Im Rahmen der vorliegenden unizentrischen prospektiven Studie erfüllten die in die Studie eingeschlossenen Patientinnen zum Zeitpunkt der Amniozentese folgende Einschlusskriterien:

- Amniozentese in der Abteilung für pränatale Diagnostik und Therapie, Charité Mitte, zwischen der 15+0. und 20+6. Schwangerschaftswoche,
- unauffällige Einlingsschwangerschaft
- unauffällige Fruchtwassermenge, kein Anhydramnion, Oligohydramnion oder Polyhydramnion
- punktiertes Fruchtwasser klar-gelblich, nicht blutig vermischt
- keine klinischen Anzeichen einer bestehenden intrauterinen Infektion oder sonstiger Infektionskrankheiten
- keine vorherige Amniozentese, Cordozentese oder Chorionzottenbiopsie innerhalb der bestehenden Schwangerschaft.

### **3.3 *Ausschlusskriterien***

Das Auftreten einer Frühgeburt oder Frühgeburtsbestrebungen bei Probandinnen führten zum Ausschluss aus der Studie. Ebenso wurden Kinder mit chromosomalen (z.B. Trisomien 18, Trisomien 21, Trisomien 22) oder strukturellen (z.B. Herzfehlbildungen) Auffälligkeiten bei der Studienanalyse nicht weiter berücksichtigt. Zusätzlich wurden die Patientinnen, die sich entweder gegen das Austragen der Schwangerschaft entschieden, oder bei denen es zum Abort

kam ebenfalls ausgeschlossen. Des Weiteren führte ein erneuter invasiver Eingriff am Uterus während der bestehenden Schwangerschaft zum Ausschluss.

### **3.4 Materialgewinnung**

Nachdem die Patientinnen schriftlich ihr Einverständnis zur Studienteilnahme gegeben hatten, wurde das Fruchtwasser durch erfahrene Operateure gewonnen. Dabei wurde unter Verwendung einer 20G-Nadel und unter Ultraschallkontrolle durch einen transabdominalen Einstich die Fruchthöhle punktiert und 20 ml klare, gelbliche Amnionflüssigkeit aspiriert. Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert, um den Überstand von den zellulären Bestandteilen zu befreien. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand des Fruchtwassers portioniert, bei -86°C asserviert und erst wieder zur Zytokinbestimmung aufgetaut. Die Bestimmung erfolgte im Mittel innerhalb von 7 Tagen nach Entnahme.

### **3.5 Zytokinbestimmung**

Die Bestimmung der Zytokine IL-6, IL-8, LBP und TNF $\alpha$  aus dem Überstand der entnommenen Fruchtwasserproben wurde mit dem immunometrischen Assay am „IMMULITE“ der Firma DPC Biermann (Bad Nauheim, Deutschland) durchgeführt. Dabei erfolgte die Bestimmung mittels des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Es handelt sich hierbei um eine Methode zur Konzentrationsbestimmung einer Substanz in einer Lösung. Sie beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion: Die Substanz, deren Konzentration gemessen werden soll, wird an einen mit einem Enzym markierten (monoklonalen) Antikörper gebunden. Die hierbei entstehende Lichtemission wird mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

Es wurde ein sequentieller Festphasen-Chemielumineszenz-immunometrischer Assay verwendet, bei dem das zu bestimmende Fruchtwasser in ein Teströhrchen mit Antikörperbeschichteter Kugel pipettiert wird. In diesem Teströhrchen findet bei konstanten 37°C die gesamte Reaktion statt, inklusive Waschvorgang, Inkubation und Signalentwicklung. Bei dem verwendeten ersten Antikörper handelt es sich um einen für das zu bestimmende Interleukin spezifischen monoklonalen Antikörper, der mit dem Antigen (Zytokin) eine Verbindung eingeht.

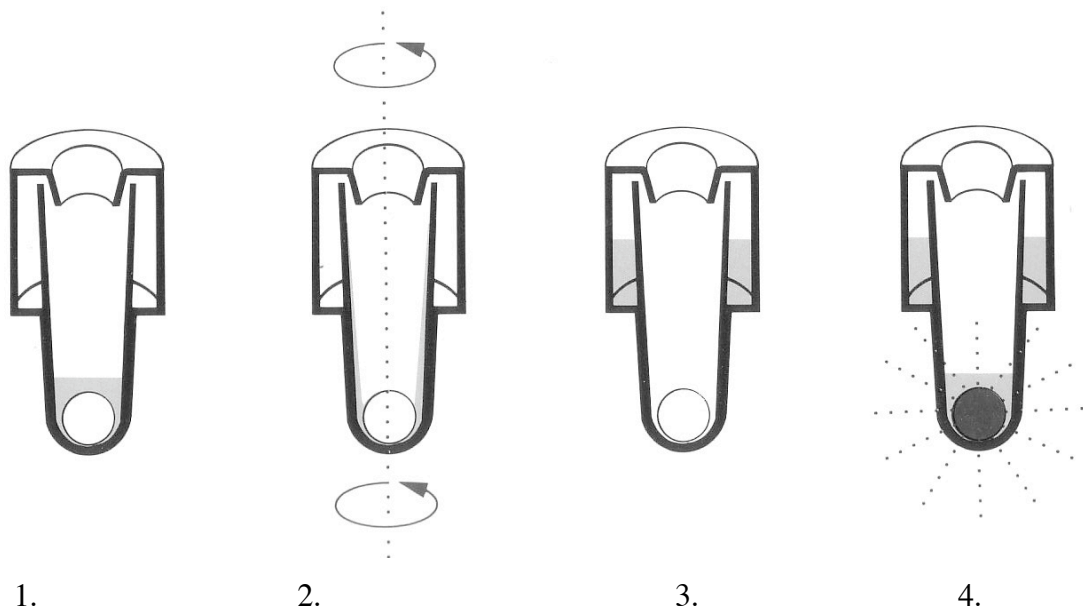
Dann wird der zweite, polyklonale, konjugierte Antikörper dazugegeben. Dieser bindet den gesamten Antigen-Antikörper-Komplex, wird nun im Teströhrchen gewaschen und von sämtlichen die Reaktionen störenden Substanzen befreit. Bei dem letzten Schritt erfolgt die Signalentwicklung durch die Chemielumineszenzreaktion. Dabei handelt es sich um eine Reaktion zwischen dem Antigen-Antikörper-Komplex und einem weiteren Substrat, dem Adamantylidioxetanphenylphosphat (ADPP). Durch Zerfall des Komplexes kommt es zu einer mit Hilfe eines Luminometers messbaren Lichtemission, die charakteristisch ist für bestimmte Konzentrationen des zu messenden Zytokins.

### ***3.6 Eichung, Intraassay, Interassay und Besonderheiten des Immulite-Systems***

Die Eichung der Methode auf dem „IMMULITE“ der Firma DPC Biermann erfolgt mit mitgelieferten Kalibratoren. Die Justierung der Eichkurven wird entweder alle 2 Wochen oder vor Benutzung einer neuen Kitcharge vorgenommen. Um die Präzision der Methode zu überprüfen und um zufällige Fehler zu erkennen, wurde der Intraassay bestimmt. Der Variationskoeffizient (VK) wurde von der Firma DPC Biermann geliefert und von unserem Labor zur eigenen Kontrolle in Fruchtwasserproben überprüft. Der Intraassay war  $\leq 5\%$ , der Interassay war  $\leq 10\%$ . Diese Werte liegen innerhalb der angegebenen Streubreite 2s. Die Messbereiche sind von der Firma BPC Biermann mitgeliefert worden und reichen bei:

- IL-6 von 2 bis 1000 pg/ml
- IL-8 von 2 bis 7500 pg/ml
- TNF $\alpha$  von 1,7 bis 1000 pg/ml
- LBP von 0,2 bis 200  $\mu$ g/ml

Das Besondere des Immulites als automatisiertem System besteht darin, dass die spezifischen Antikörper auf beschichteten Kugeln in Röhrchen vorliegen, welche als gemeinsamer Reaktionsraum für die Antigen-Antikörper-Reaktion dienen. Durch den in Abbildung 5 schematisch dargestellten Mechanismus kommt es zur fast vollständigen Trennung zwischen Waschflüssigkeit und Antigen-Antikörper-Komplex. Dies führt zu einer hohen Präzision des Assays.



**Abbildung 5:** Funktionsweise des Immulite Systems

entnommen aus der Produktionsbeschreibung der Firma DPC Biermann, Bad Nauheim

1. Die Proben (Fruchtwasser) und Reagenzien (enthält den Antikörper) werden automatisch in die Testeinheit pipettiert und bei konstanten 37°C inkubiert. Dabei werden die Zytokine aus der Fruchtwasserprobe an die Antikörper-beschichtete Kugel gebunden.
2. Anschließend wird die Testeinheit während des Waschvorgangs bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Dabei wird die Flüssigkeit abgepresst und vollständig in den dafür vorgesehenen integrierten Kragen abgegeben.
3. Eine Serie von Waschvorgängen entfernt das ungebundene Material von der mit dem Antigen beschichteten Kugel. Hier haften nun Antigen-Antikörper-Komplexe.
4. Nach Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates (ADPP) in die Testeinheit wird die Lichtemission mit Hilfe eines Luminometers gemessen.

Durch die enzymamplifizierte Chemilumineszenz verstärkt sich die Emission um das 100-fache im Vergleich zu herkömmlichen Systemen und ermöglicht dadurch eine höhere Sensitivität.

### **3.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der vorliegenden Studie erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism, Version 4.0 für Macintosh (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien).

Zur deskriptiven Statistik metrischer Daten wurden, wenn keine Normalverteilung vorlag, der Median, der minimale und der maximale Wert, die 25%- und 75%-Perzentile bestimmt. Lag jedoch eine Normalverteilung vor, wurde der Mittelwert, sowie  $\pm$  der Standardabweichung (SD) angegeben.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde eine Varianzanalyse mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezogen auf ein Merkmal wurde angenommen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% lag ( $p < 0,05$ ). Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% festgesetzt.