

**Aus der Klinik für Allgemeine Innere Medizin
(Direktor: Prof. Dr. U. R. Fölsch)
im Universitätsklinikum Kiel Schleswig- Holstein, Campus Kiel
an der Christian- Albrechts-Universität zu Kiel**

**ANALYSE DER REFERENZWERTE
DER SERUMELEKTROPHORESE (SELP)**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**Vorgelegt von
HASSAN HOSSEIN ZADEH FARD
aus Karaj, Iran**

Kiel 2009

1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. d. Bruhn
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Gramatzki
Tag der Mündlichen Prüfung : 23. Juli 2009
Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 23. Juli 2009

Gez. Prof. Dr. Dr. Cascorbi
(Ausschussvorsitzender)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Gesichtspunkte	1
1.2	Bedeutung der Elektrophorese	2
1.3	Proteinaufbau	2
1.4	Plasmaproteinsynthese	4
1.5	Referenzbereiche	5
1.6	Diagnostische Bedeutung	6
1.7	Fragestellung dieser Arbeit	11
2.	Methodik	12
2.1	Probandenkollektiv	12
2.2	Untersuchungsmaterial	13
2.3	Probenentnahme	13
2.3.1	Technik der Blutentnahme	13
2.3.2	Lagerung, Vorbereitung der Patienten und Probanden und Transport des Blutes	14
2.4	Versuchsaufbau	15
2.4.1	Prinzip der Elektrophorese	15
2.4.2	Vorbereitung von Materialien	17
2.5	Untersuchungsablauf	19
2.6	Statistik	21

3.	Ergebnisse	22
3.1	Ziel der Arbeit	22
3.2	Durchführung	23
3.3	Verwendete statistische Verfahren	24
3.4	Analyse der Alterseinflüsse	26
3.5	Analyse der Geschlechtsabhängigkeit	35
3.6	Analyse der Normalverteilung	37
3.7	Tabelle der Ergebnisse	38
4.	Diskussion	40
4.1	Diskussion der Methodik	40
4.2	Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Studie	42
5.	Zusammenfassung	46
6.	Anhang	48
6.1	Literaturverzeichnis	48
6.2	Danksagung	49
6.3	Lebenslauf	50
6.4	Abkürzungen	51

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Gesichtspunkte

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der neuen Bestimmungsmethodik des Serumeiweißes mit Hilfe der Serum-Elektrophorese.

Es gibt viele Einflussgrößen wie z.B.: Körperlage, Alter, Geschlecht, Lebensgewohnheiten und Körpergewicht, die in der Präanalytik eine sehr wichtige Rolle spielen. Geographische Erbfaktoren sind von Bedeutung, z.B.: Alkoholdehydrogenesemangel bei Asiaten und Laktase-Mangel bei Arabern.

Die Ernährungsgewohnheiten und andere permanente Faktoren wie z.B.: Geschlecht, Rasse, Tagesrhythmus und langfristige Faktoren wie Alter, Lebensgewohnheiten und Klima können die Präanalytik beeinflussen.

Nachdem die Werte der Elektrophorese klinisch beurteilt wurden, hat man beobachtet, dass bei manchen Patienten die Werte außerhalb der üblichen Normwerte lagen, obwohl diese Patienten klinisch gesund waren.

Auf der anderen Seite wurde neben den vorgegebenen Normwerten von SEBIA empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Normwerte bestimmt.

Deswegen ist diese Studie durch Prof. Dr. Bruhn an mich weitergegeben worden, um die Normwerte für das Zentrallabor im Universitätsklinikum Kiel neu zu bearbeiten und neue Bestimmungsintervalle zu charakterisieren.

1.2 Bedeutung der Elektrophorese

Der Wortteil "phor" kommt aus dem Griechischen und bedeutet tragen. Der Wortteil "Elektro" gilt als eine Methode für das Anlegen einer elektrischen Spannung, also für den Aufbau eines elektrischen Feldes.

Synonym(e) : Zonenelektrophorese.

Definition: Die elektrophoretische Trennung von Probenkomponenten basiert auf unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld in einem bestimmten Trennmedium (aus: Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik, Seite 370)

Es ist eine Labortechnik, bei der gemischte Stoffe oder Teilchen voneinander getrennt werden, weil diese in einem elektrischen Feld verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten haben. Es gibt verschiedene Formen der Elektrophorese für unterschiedliche Substanzen, aber wichtig ist für das hier diskutierte Thema die Serumprotein-Elektrophorese, wodurch Serum-Proteine analysiert werden.

1.3 Proteinaufbau

Proteine bestehen aus Aminosäuren. Diese besitzen zwei funktionelle Gruppen, die für sie charakteristisch sind, und zwar Carboxyl- beziehungsweise Carbonsäuregruppen (-COOH) und die Aminogruppe (-NH₂).

Die Aminosäuren sind durch Carbonsäureamid-Bindungen zwischen Alpha-Carboxyl und Alpha-Aminogruppen miteinander verknüpft. Man nennt deshalb diese Art der Bindung auch Peptidbindung.

Peptide und Proteine werden durch Translation an Ribosomen synthetisiert. Proteine sind Ampholyte, das heißt sie haben gleichzeitig Eigenschaften von Säuren und von Basen.

Das liegt daran, dass die Carboxylgruppe in Form eines Anions vorliegt, so dass sie ein Wasserstoffion aufnehmen kann (Baseneigenschaften); die Aminogruppe liegt in Form eines Kations vor, also als NH_3^+ , so dass sie ein H^+ abgeben kann (Säureeigenschaften).

Die Proteine haben unterschiedliche Größen und Formen, welche durch vier Strukturen festgelegt sind:

Primäre, sekundäre, tertiäre und quartäre Strukturen.

Unter der primären Struktur versteht man die genetisch festgelegte Sequenz der Aminosäuren.

Die Sekundärstruktur entsteht durch Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der Kette oder zwischen benachbarten Ketten, wodurch die Aminosäuresequenzen in unterschiedlicher Weise stabilisiert werden. Es werden so folgende Strukturen gebildet: rechtsgängige oder linksgängige Alpha-Helix, Kollagen-Helix und Faltblattstruktur.

Als Tertiärstruktur bezeichnet man die räumliche Faltung der entstandenen Sekundärstruktur.

Die Faltung kommt durch unterschiedliche Bindungskräfte zustande. Es entstehen so verschiedene Proteinformen, wie beispielsweise Kugel und Ellipsoide.

Die Quartärstruktur entsteht dadurch, dass sich einzelne Proteinmoleküle durch nicht kovalente Wechselwirkungen zu symmetrischen Komplexen verbinden.

Die Proteine werden glykosyliert durch eine kovalente N-Bindung der Aminosäure Asparagin, Serin oder Threonin mit einem Kohlenhydratrest, der vorwiegend Mannose enthält.

Kohlenhydrate werden umgewandelt, so dass in endständiger Position häufig N-Acetyl-Neuraminsäure und präterminal Galaktose gebunden ist.

Ein Glykoprotein kann unterschiedliche Kohlenhydratketten binden und somit auch in unterschiedlichen Formen mit unterschiedlichen Nettoladungen vorkommen.

1.4 Plasmaproteinsynthese

Viele Plasmaproteine werden von der Leber gebildet. Die Immunglobuline werden in B-Zellen und das beta2-Mikrogobulin (HLA) von allen kernhaltigen Körperzellen produziert.

Diese werden nach Abbau zu Aminosäuren umgewandelt, und dieser Prozess läuft in fast allen Zellen ab, wie zum Beispiel in Hepatozyten, Gefäßen und Nieren. Über die Lebersinusoide gelangen die Proteine in die Leberzellen, aber auch in Nierenzellen durch Pinozytose in der Bürstensaummembran der Tubuluszelle sowie in die Endothelzellen der

Kapillaren. Sie haben als Einzelzellen wenig Beteiligung am Abbau, jedoch wegen der großen Oberfläche relativ große Bedeutung für diesen.

1.5 Referenzbereiche

Jedes Labor muss seine eigenen Referenzbereiche für die Serum-Elektrophorese erstellen, weil die Serum-Proteinelektrophorese mit verschiedenen Methoden nicht standardisiert ist. Die aktuellen Referenzbereiche des Universitätsklinikums Kiel sind im Folgenden angegeben:

Serumproteinelektrophorese

<u>Fraktionen</u>	<u>Norm-%</u>
Albumine	60,3 - 71,4
Alpha-1-Globuline	1,4 - 2,9
Alpha-2-Globuline	7,2 - 11,3
Beta-Globuline	8,1 - 12,7
Gamma-Globuline	8,7 - 16,0

Albumine: Die Aufgabe der Albumine besteht in der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks des Blutes und im Transport von Bilirubin, Hormonen und Pharmaka.

Alpha-1- Globuline: Sie sind akute Phase-Proteine.

Alpha-1-Lipoproteine transportieren Triglyceride und Cholesterin

Alpha-1-Antitrypsin

Alpha-1-Glykoprotein

Alpha-2-Globuline: Haptoglobin (Hämoglobin) ist ein Bestandteil des Alpha-2-Proteins, wie auch das Coeruloplasmin, dessen Aufgabe im Transport von Kupfer liegt. Weitere Bestandteile sind das Retinol-bindende Protein und das Alpha-2-Makroglobulin.

Beta-Globuline: Lipoproteine, die dem Transport von Triglyceriden und Cholesterin dienen.

Beta-2-Mikroglobulin (HLA)

Transferrin, welches für den Transport von Eisen verantwortlich ist

Hämopexin

C-reaktives Protein

Gamma-Globuline: Immunglobuline.

1.4 Diagnostische Bedeutung

Für manche Krankheiten, bei denen ein Verdacht auf Dysproteinämie vorliegt, wie zum Beispiel Hepatitis, Leberzirrhose, Verschlussikterus, kommt die Serumelektrophorese zum Einsatz. Durch photometrisch ausgewertete Bandenmuster können folgende Sachverhalte beurteilt werden:

1. Die relative Größe einzelner Eiweissfraktionen
2. Das Fehlen oder zusätzliche Auftreten einer Eiweissfraktion

3. Form und Lage der einzelnen Fraktion (aus Lehrbuch der Labormedizin, Seite 69)

Hemmende Einflüsse auf die Proteinsynthese haben Lebererkrankungen mit Verminderung des Parenchyms, Proteinmangelernährung, Hypothyreose, Diabetes mellitus und Alkoholismus.

Ursache einer gesteigerten Proteinsynthese sind: Entzündung, Hyperthyreose, Proteinverlustsyndrom und Vermehrung Immunglobulinbildender Plasmazellen (Plasmozytom).

Durch genetische Einflüsse kann auch die Proteinsynthese vermehrt oder vermindert sein, zum Beispiel Alpha-1-Antitrypsinmangel oder Antikörpermangelsyndrom.

Die Indikation zur Durchführung einer Serum-Eiweiß-Elektrophorese ist die Abklärung von Hypo- oder Hyper- sowie von Dysproteinämien. Durch diese Vermehrung oder Verminderung von unterschiedlichen Fraktionen können viele Erkrankungen nachgewiesen werden.

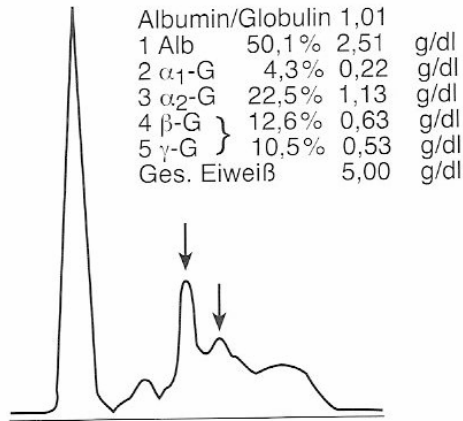
In der Tabelle A ist eine Übersicht über wichtige Störungen, die durch die Elektrophorese direkt oder indirekt diagnostizierbar sind, dargestellt.

Proteinfraction	Wichtige Proteine	Vermehrung	Verminderung
Albumine	Präalbumin, Albumin		Leberschaden, Nephrotisches Syndrom,
Alpha-1-Globuline	Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-1-sauerer Glykoprotein, Alpha-1-Lipoprotein	Entzündliche Erkrankungen	Leberzirrhose, Tumorerkrankung, chronisch entzündliche Erkrankung, Alpha-1- Antitrypsinmangel
Alpha-2-Globuline	Alpha2-Makroglobulin, Haptoglobin, Coeruloplasmin, Alpha-2-Lipoprotein,	Nephrotisches Syndrom, Akute Entzündung, Tumor- Erkrankung	Nephrotisches Syndrom, Leber- Zirrhose
Beta-Globuline	Transferrin, Beta-Lipoproteine, C-reaktives Protein	Nephrotisches Syndrom, Hyperlipidämie	Nephrotisches Syndrom,
GammaGlobuline	Immunglobuline	Monoklonale Gammopathie, Plasmozytom	Antikörpermangel- Syndrom

Tabelle A

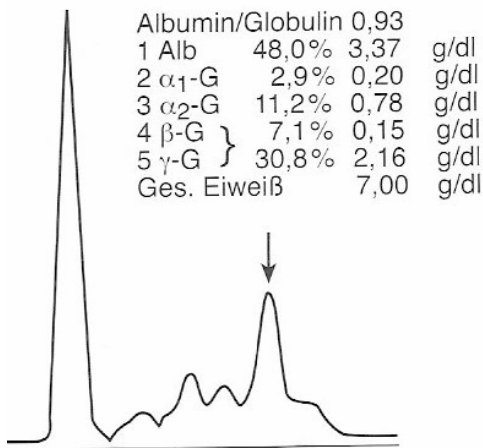
(Aus: Erster Schritt zum Hammerexamen, Seite 293)

Folgende Abbildungen (1 bis 7) zeigen typische Dysproteinämien:



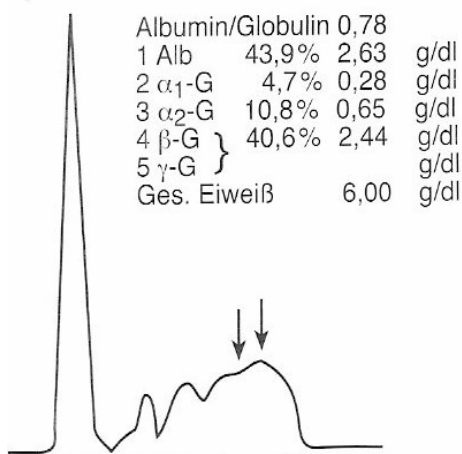
Charakteristische Veränderungen
Serumelektrophorese bei
nephrotischem Syndrom

(Abb. 1: Lehrbuch der Labormedizin, Seite 69)



Monoklonale Gammopathie IgM

(Abb.2: Lehrbuch der Labormedizin, Seite 69)

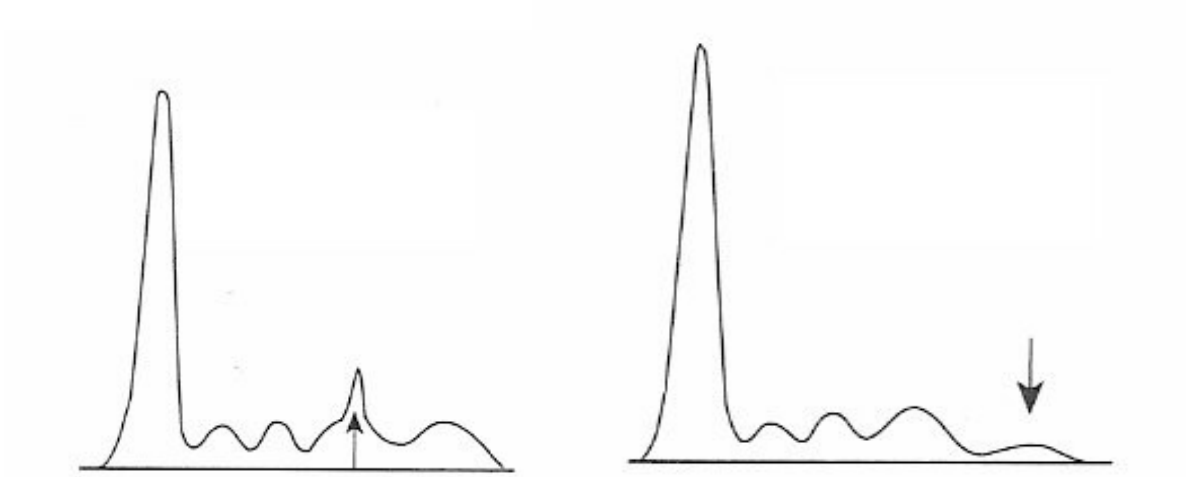


Charakteristische

Serumelektrophorese bei

Leberzirrhose

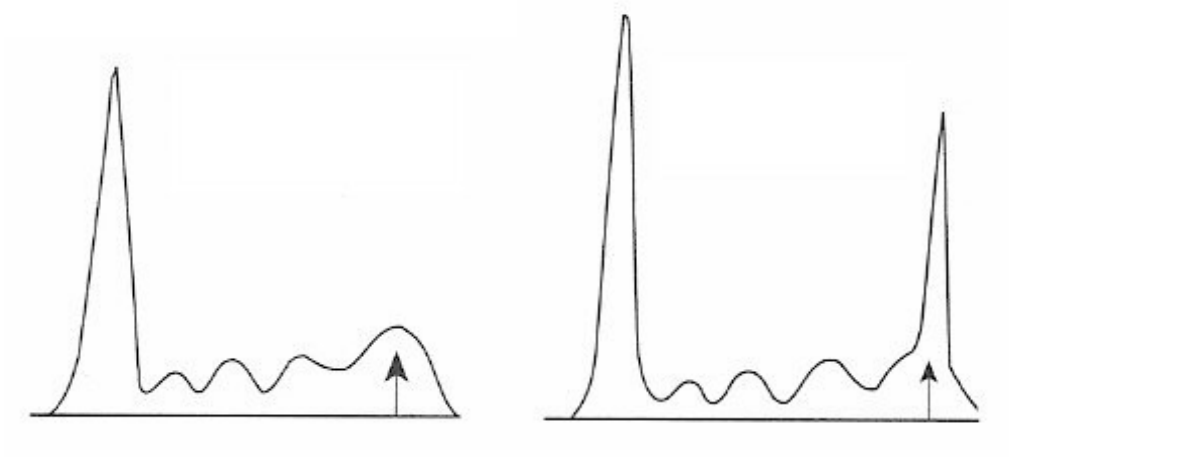
(Abb.3. Lehrbuch der Labormedizin, Seite 69)



Paraproteinämie im Beta-Bereich

Antikörper-Mangel-Syndrom

(Abb.4:Erster Schritt zum Hammerexamen, S. 294) (Abb.5: Erster Schritt zum Hammerexamen, S. 294)



Chronische Entzündung

Paraproteinämie im Gamma-Bereich

(Abb.6: Erster Schritt zum Hammerexamen, S. 294) (Abb.7: Erster Schritt zum Hammerexamen, S. 294)

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Aufgrund der oben geschilderten Gründe und der vielen Einflussgrößen für klinische Laborwerte ist zu erwarten, dass die Werte der Serum-Elektrophorese abhängig von Alter, Geschlecht und Rasse sind und in unterschiedlichen Gebieten Abweichungen im derzeitigen Normbereich vorkommen. Deswegen beschäftigt sich diese Arbeit mit der Frage, ob die Proteinwerte im Serum abhängig vom Alter und Geschlecht der hier untersuchten Kollektive sind oder nicht.

Ziel der Arbeit war eine Überprüfung der firmenseitig bereitgestellten Referenzwerte der einzelnen Fraktionen der Serumeiweißelektrophorese des Herstellers SEBIA. In der vorliegenden Untersuchung wurden eventuell vorhandene, bisher in der Ergebnisbetrachtung möglicherweise nicht ausreichend berücksichtigte physiologische Einflussfaktoren auf die quantitative bzw. prozentuale Zusammensetzung der jeweiligen Fraktionen analysiert. Die betrachteten Kriterien eines repräsentativen Vergleichskollektivs waren somit zum einen die Höhe der Werte insgesamt und zum anderen die differenzierte Betrachtung der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der einzelnen Fraktionen der Serumeiweißelektrophorese.

2. Methodik

2.1 Probandenkollektiv

Im Rahmen dieser Studie über SELP benötigte man 281 Proben von den Probanden, welche folgende Eigenschaften aufwiesen:

1. Spender und Spenderinnen, die in den letzten 2 Wochen keine bakteriellen Infekte hatten,
2. Spender und Spenderinnen, die keine Niereninsuffizienz, Lebererkrankungen oder ein Plasmozytom hatten,
3. Spender und Spenderinnen, die keine Medikamente nahmen,
4. Spender und Spenderinnen, die nicht Diabetiker sind und einen BMI=< 30 haben.

Von diesen 281 gesunden Probanden sind 141 weiblich und die anderen 140 männlich. Sie sind im Alter zwischen 18 und 68 Jahren. Diese beiden Gruppen werden dann noch mal in 5 Untergruppen unterteilt (18-28; 28-38; 38-48; 48-58; 58-68 Jahre). In jeder Gruppe hatten wir 28 Proben, um für jedes Alter und Geschlecht einen aussagekräftigen Referenzwert zu haben. Diese Proben sind von der Abteilung Transfusionsmedizin im Universitäts-Klinikum Kiel in einer freundlichen Zusammenarbeit bereitgestellt worden.

2.2 Untersuchungsmaterial

Serumröhrchen	281 Stück	Bestell- NR.4140	Firma: SEBIA
Agarose-Gels (gebrauchsfertig)	10 Gele	Bestell- NR.4140	Firma: SEBIA
Pufferstreifen (gebrauchsfertig)	10 Pack zu 2 Stück	Bestell- NR.4140	Firma: SEBIA
Verdünnungslösung (konzentriert)	1 Fläschchen, 60 ml	Bestell- NR.4140	Firma: SEBIA
Amidoschwarz- Färbelösung (konz.)	1 Fläschchen, 20 ml	Bestell- NR.4140	Firma: SEBIA
Applikatoren	2 Pack zu 10 Stück	Bestell- NR.4140	Firma: SEBIA

Tabelle B

2.3 Probenentnahme

2.3.1 Technik der Blutentnahme

Bei der venösen Blutentnahme, aber auch bei der Kapillarblutentnahme, sind Körperlage und Venenstauung wichtige Einflussgrößen. Zwei wichtige Grundregeln zur Blutentnahme lauten also:

Vor der Blutentnahme sollte der Patient mindestens 15 Minuten lang seine Körperlage beibehalten, und die Venenstauung vor der Blutentnahme

sollte möglichst kurz sein (aus: Klinische Chemie und Hämatologie, Seite 8)

Jede Blutentnahme bedingt eine Verletzung von Blutgefäßen. Es darf nur einwandfreies und steriles Material eingesetzt werden.

Die Staubinde wird eine Handbreit herzwärts der Punktionsstelle angelegt, dabei sollte der Staudruck zwischen 60 und 100 mmHg für eine Minute betragen. Zuerst wird die Zugangsstelle mit zugelassem Desinfektionsmittel besprüht und schließlich das Blut entnommen.

2.3.2 Lagerung sowie Vorbereitung der Patienten und Probanden, Transport des Blutes

Unter Blutserum versteht man jenen flüssigen Anteil des Blutes, den man erhält, wenn man aus einer geronnenen Blutprobe die zellulären Bestandteile, die mit den Blutplättchen und den Gerinnungsfaktoren zu einem so genannten Blutkuchen verbacken sind, durch Zentrifugieren abtrennt. Das Blutserum entspricht also dem Blutplasma abzüglich der Gerinnungsfaktoren (vor allem Fibrin).

Für die Serumherstellung wird das Blutröhrchen ohne Antikoagulans für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird es bei 3000 U/min zentrifugiert.

Das überstehende Serum wird in 15-ml-Röhrchen pipettiert und bis zur Verwendung für die nachfolgenden Versuche bei +4°C gelagert.

Für längere Lagerungen wird das Serum bei -20°C aufbewahrt.

Wichtig ist hierbei die eindeutige Kennzeichnung aller entnommenen Proben und der dazu gehörigen Anforderungsscheine zur fehlerfreien Identitätssicherung.

Für den Transport von humanmedizinischem Untersuchungsmaterial muss das Probengefäß (Primärverpackung) in ein Schutzgefäß (Sekundärverpackung) eingebracht werden. Schließlich wird in einer Versandhülle das Material von der Transfusionsmedizin in die klinische Chemie (Labor) gebracht.

2.4. Versuchsaufbau

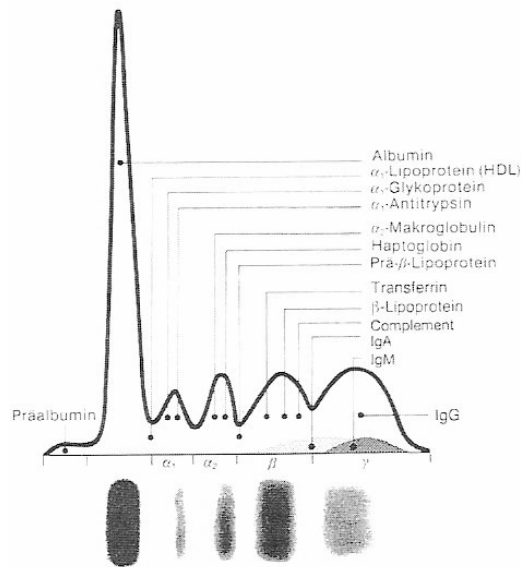
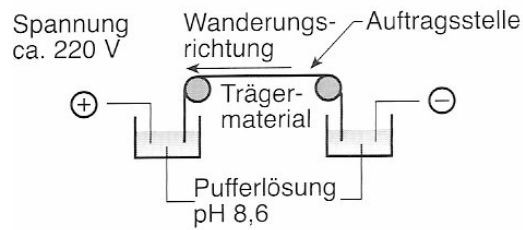
2.4.1. Prinzip der Elektrophorese

Die Proteinelektrophorese ist eine weit verbreitete Technik, die in klinischen Labors routinemäßig für das Screening von Serum auf Proteinanomalien verwendet wird. Sie basiert auf dem Prinzip der Zonenelektrophorese, die auf einem geeigneten Trägermedium durchgeführt wird.

Alle Proteine besitzen eine definierte elektrische Ladung (wie in Punkt 1.3 erklärt). Diese wird durch verschiedene Aminosäuren und daran gebundene Glykoproteine bestimmt.

Proteine, Nukleinsäuren oder Zellen laden sich in Abhängigkeit vom pH-Wert ihrer Umgebung negativ oder positiv auf und wandern in einem elektrischen Feld zur Anode bzw. Kathode (klinisch-Chemische Diagnostik, Seite 72).

Nachdem die Proteine mit einer alkalischen Pufferlösung (z.B. bei pH=8,6) vermengt wurden, wird eine Spannung angelegt und die Proteine bekommen eine negative Überschussladung und wandern in Richtung Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zur angelegten Spannung und umgekehrt proportional zum Radius der Proteinmoleküle (vgl. Abb.8). Serum wird routinemäßig auf barbitalpuffergetränkten Fertigfolien aus Celluloseacetat oder Agarosegel aufgetrent. Die elektrophoretische Auftrennungszeit beträgt bei Agarosefolien ca.25 min. Nach Fixation (= Denaturierung, um eine Diffusion der getrennten Proteine zu verhindern) werden die getrennten Proteinfractionen angefärbt. Nach Entfärbung mit Essigsäure/Methanol und Trocknung können die Pherogramme ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgt durch Inspektion und anschließend durch Densitometer bzw. Extinktionsregistriergeräte mit Integration im Durchlichtverfahren. Die Eiweißfraktionen werden in Relativprozenten und/oder unter Gesamteiweißgehalt als Konzentrationen ausgedrückt (Klinisch-chemische Diagnostik, Seite 72).



(Abb.8: Lehrbuch der Labormedizin, Seite 68)

Nach dem Trocknen wird das zur Elektrophorese verwendete Gel durch Amidoschwarz oder Ponceau-Rot gefärbt. Der Computer erstellt aus den entstehenden Banden ein Diagramm.

2.4.2 Vorbereitung von Materialien

Agarosegele: jedes Gel enthält Agarose (8g/l) und Tris-Barbital-Puffer (pH-Wert 9.2+ 0,1). Es ist gebrauchsfertig und wird bei Raumtemperatur (15–30°C) oder im Kühlschrank (2–8°C) aufbewahrt.

Pufferstreifen: Alle in Streifenform vorliegenden Pufferschwämme enthalten Trisbarbitalpuffer ($\text{pH} = 9,2 + 0,3$) und Natriumazid und sind gebrauchtfertig.

Die Pufferstreifen fungieren als Elektrophoresepufferreservoir und gewährleisten den Kontakt zwischen dem Gel und den Elektroden.

Verdünnungslösung: Diese Lösung enthält Zitronensäure ($\text{pH}=2$), das Amidoschwarz wird dadurch verdünnt.

Amidoschwarz-Färbelösung: Der Inhalt des Amidoschwarz-Konzentrates wurde mit 60ml Verdünnungslösung gelöst und mit destilliertem oder deionisiertem Wasser auf 300 ml Endvolumen aufgefüllt. Um das Amidoschwarz-Konzentrat ganz nutzen zu können, sollte man die Flasche mehrmals mit Wasser spülen. Diese Färbelösung enthält Zitronensäurelösung ($\text{pH} = 2$), Amidoschwarz (0.4 g/dl) und Ethylenglycol (6,7 %). Sie wird zum Färben der Agarose-Gele nach elektrophoretischer Trennung benötigt.

Applikatoren: Sie sind Einmalapplikatoren und für den Probenauftrag erforderlich.

Filterpapier: Dünnes Filterpapier zum Einmalgebrauch für das Absaugen der überschüssigen Flüssigkeit auf dem Gel.

Entfärbelösung: 50 ml Inhalt von einer Flasche Entfärbelösung (100 ml) soll mit destilliertem oder entionisiertem Wasser auf 5 Liter aufgefüllt

werden. Diese Lösung enthält Zitronensäure (0.5 g/ l). Sie ist nötig für das Auswaschen von überschüssiger Farbe, zur Entfärbung der Gelhintergrundfärbung und zum Spülen der Färbekammer nach dem Waschen.

Hydrasis-Waschlösung: Jede Flasche davon (80 ml) enthält Natriumazid (0,625) und nachdem man es mit 5 Liter destilliertem oder entionisiertem Wasser aufgefüllt hat, erhält man einen alkalischen Puffer (pH = 8,8 + 0,3). Er wird für die Reinigung des Färbemoduls in regelmäßigen Abständen eingesetzt.

2.5. Untersuchungsablauf

Das HYDRASIS System ist ein halbautomatisches Multiparameter-Gerät, das eine automatische Bearbeitung der HYDRAGEL Agarosegele in den nachstehenden Reihen durchführt:

- Elektrophoretische Migration
- Trocknen
- Färben
- Entfärben
- Endtrocknen

Zu den manuellen Schritten gehören die Handhabung der Proben und Gele sowie die Bedienung des Gerätes.

Zunächst werden die HYDRASIS-Probenapplikatoren auf eine ebene Unterlage gelegt, so dass die Nummern (Vertiefungen) nach oben zeigen.

Anschließend werden mit Hilfe von Pipetten in jede Vertiefung jeweils

10 μ l unverdünntes Serum hinzugefügt. Diese Applikatorenbedienung sollte insgesamt nicht länger als 2 Minuten in Anspruch nehmen. Schließlich wird der Applikator in die feuchte Kammer gelegt (5 Minuten), wobei die Zähne nach oben zeigen. Es ist besonders darauf zu achten, dass die Abdeckungen bei hochgestellten Elektroden/Applikatoren nicht zuschließen.

Bei dem Gerät wird das Programm (Protein 15/30 oder Protein 7) gewählt und die Perforation der Pufferstreifen in die Stifte des Elektrodenhalters eingeführt.

Für die Vorbereitung des Gels muss man zuerst das dünne Filterpapier auf die Oberfläche des Gels legen. Nachdem die überschüssige Feuchtigkeit entfernt ist, wird das Filterpapier entfernt. Währenddessen sollte man darauf achten, dass das Filterpapier nicht lange mit dem Gel in Kontakt bleibt, damit ein Austrocknen des Gels verhindert wird.

Es werden 200 μ L destilliertes oder entionisiertes Wasser in das untere Drittel des Rahmens gegeben. Danach wird das Gel an die untere Kante des Rahmens gelegt. Man sollte darauf achten, dass beim Rollen auf dem Wasser keine Luftblasen eingeschlossen werden.

Beim Zusammenklappen der Halter sollte man darauf achten, dass die Pufferstreifen keinen Kontakt mit dem Gel bekommen.

Nachdem man die Applikatoren aus der feuchten Kammer heraus genommen hat, sollte man darauf achten, sie nur am unteren Schutzrahmen anzufassen. Nach Abdeckung des Migrationsmoduls sollte man sofort die Migration starten. Es wird ein Gleichstrom von 20 Watt bei 20 Grad Celsius angelegt, bis nach etwa 7 Minuten 33 Volt/h erreicht sind. Anschließend wird der Halter angehoben, wodurch der Kontakt zu den Elektroden unterbrochen wird.

Zum Trocknen wird die Temperatur für 10 Minuten auf 65° Celsius erhöht. Sobald die Platte eine Temperatur von 50° Celsius erreicht hat, ertönt ein Signal und die Abdeckung ist entriegelt. Anschließend werden die Applikatoren für die weitere Bearbeitung herausgenommen. Elektroden und Gleitplatte werden dann mit einem feuchten Papier abgewischt.

Jetzt wird der Gelhalter geöffnet, flach hingelegt und das getrocknete Gel in die Ausführung des Gelhalters eingesetzt. Nun können wir den Gelhalter in den Färbemodus einsetzen. Dabei sollte man darauf achten, dass der Färbelösungsbehälter 300 ml Färbelösung und 1 Liter Entfärbelösung enthält.

Zum Abschluss wird der Gelhalter aus dem Färbemodus herausgenommen und ein zusätzlicher Waschschrift mit dem Programm „Waschen 150 ENZ“ durchgeführt. Dadurch wird die überschüssige Farbe entfernt und damit der Hintergrund des Gels klarer dargestellt.

Schließlich wird mit einem Densitometer bei 570nm gemessen.

2.6. **Statistik**

Beim statistischen Teil dieser Arbeit wurde zuerst für jeden Probanden sorgfältig Spendernummer, Geschlecht, Geburtsdatum, Alter registriert. Jede einzelne Serumfraktion wurde in ein Excel-Arbeitsblatt übertragen.

Die statistische Auswertung wurde unter Anleitung von Herrn Diplom-Informatiker Hedderich vom Institut für medizinische Informatik und Statistik durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war eine Überprüfung der firmenseitig bereitgestellten Referenzwerte der einzelnen Fraktionen der Serumeiweißelektrophorese des Herstellers SEBIA. In der vorliegenden Untersuchung wurden eventuell vorhandene, bisher in der Ergebnisbetrachtung möglicherweise nicht ausreichend berücksichtigte, physiologische Einflussfaktoren auf die quantitative bzw. prozentuale Zusammensetzung der jeweiligen Fraktionen analysiert. Die betrachteten Kriterien eines repräsentativen Vergleichskollektivs waren somit zum einen die Höhe der Werte insgesamt und zum anderen die differenzierte Betrachtung der Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der einzelnen Fraktionen der Serumeiweißelektrophorese.

Der Anlass zur Überprüfung war, dass es im Vorfeld bei Einsendungen aus ambulanten bzw. bettenführenden Bereichen des UK Schleswig-Holstein, Campus Kiel in unserem Zentrallabor gehäuft leicht pathologische Ergebnisse in der quantitativen Zusammensetzung der einzelnen Eiweißfraktionen gab. Diese waren in den meisten Fällen weder in der klinischen noch in der weiteren, partiell sehr aufwendigen, laborseitigen Abklärung mit Hinweisen auf pathologische Begleitumstände assoziiert.

Somit wurden im Rahmen der laborinternen medizinischen Validation Zweifel an der uneingeschränkten Übertragbarkeit der firmenseitig vorgeschlagenen Referenzbereiche auf unser regionales Patientenkollektiv

vorgebracht. Möglicherweise sind, zumindest anteilig, die durch das Zentrallabor des UK S-H Campus Kiel registrierten Abweichungen von den firmenseitig übermittelten Referenzbereichen auch durch genetische Faktoren bei einer in der Regel in Norddeutschland geborenen Patientenpopulation verursacht. Die durch den Hersteller an französischen Blutspendern ermittelte Datenlage unterschied zum damaligen Zeitpunkt nicht zwischen den beiden Geschlechtern und bezog potentielle physiologische Veränderungen im Sinne von Alterseinflüssen nicht mit in die Auswertung ein.

3.2 Durchführung

Diese Problematik wurde mit der Firma SEBIA diskutiert, welche sich freundlicherweise bereiterklärte, für 300 Analysen Gele bereitzustellen, wobei letztendlich bei 281 Probanden die Serumproteinelektrophorese durchgeführt wurde.

Im kooperativen Zusammenwirken mit dem Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel wurden 281 Probanden alters- und geschlechtsabhängig in die Studie einbezogen. Beratend hinzugezogen wurde das Institut für Medizinische Informatik und Statistik im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Kiel, vertreten durch Herrn Diplom-Informatiker Jürgen Hedderich, der in exzellenter Weise die Betreuung und statistische Beratung sowohl im Vorfeld der Studie als auch in deren auswertender mathematischer Deskription übernahm.

Ursprünglich erfolgte die Einteilung unseres Spenderkollektivs nach Geschlechtern getrennt im Intervall von jeweils zehn Jahren. Es resultierten folglich fünf Gruppen. Ursächlich dafür war der Beginn der Spendefähigkeit im 18. Lebensjahr und das automatische Erlöschen der Spendefähigkeit mit Vollendung des 68. Lebensjahres. Im Nachhinein wurde zur besseren Übersicht die Gruppengröße 18.–29., 30.–39., 40.–49., 50.–59. und 60.–68. Lebensjahr gewählt.

Die Serumproben waren zum Zeitpunkt der Analyse maximal vier Tage alt, was die Herstellervorschriften komplett berücksichtigte. Die Daten wurden bezüglich Alters- und Geschlechtsabhängigkeit analysiert. Jedoch wurden auch summarische Übersichtstabellen erstellt.

3.3 Verwendete statistische Verfahren

In einer deskriptiven Statistik wurden Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie das 25., 50. (Median) und 75. Perzentil für die einzelnen Fraktionen der Serumeiweißelektrophorese errechnet. Diese wurden zum einen summarisch und in altersabhängigen Intervallen (18.–29., 30.–39., 40.–49., 50.–59., 60.–68. Lebensjahr) und analog auch getrennt nach Geschlechtern dargestellt.

Die Gesamtergebnisse unserer Studie wurden u.a. kumulativ zu Referenzbereichen (Mittelwert \pm zweifache Standardabweichung) zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der vom Hersteller übermittelten Referenzbereiche zu Beginn der Studie bzw. nach erfolgter Modifizierung

im August 2004 wurden diese Daten einander tabellarisch gegenübergestellt.

Die Verteilung der Messergebnisse wurde für Frauen und Männer getrennt als alterskorreliertes Punktwolkendiagramm dargestellt. Darin enthalten ist zur besseren Anschaulichkeit die Regressionsgerade (mittlere gestrichelte Linie) und es wurde das 95-Prozent-Prädiktionsintervall für Einzelbeobachtungen (obere bzw. untere gestrichelte Linie) eingefügt.

Nachfolgend fand unter Nutzung einer polynomialen Regressionsrechnung (polynomial regression fitting) eine nochmals spezifizierte Darstellung des Alterseinflusses auf die ermittelten Messergebnisse statt (durchgezogene schwarze Linie). Das Vorhersageintervall für Einzelbeobachtungen wurde erneut mit 95-prozentiger Sicherheit bestimmt (gestrichelte Linien). Bestehende physiologische Verläufe zeichnen sich durch dieses Verfahren im Sinne von Trends deutlicher ab.

Die grafische Darstellung der einzelnen Fraktionen in beiden Geschlechtern erfolgte mittels Boxplots.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests wurde festgestellt, dass die Daten normalverteilt sind. Zur statistischen Prüfung konnten daher parametrische Verfahren eingesetzt werden.

Der Vergleich der Altersgruppen anhand der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels ANOVA.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf Altersabhängigkeit geprüft, indem der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt wurde.

Mit dem U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon wurde geprüft, ob sich das männliche und weibliche Geschlecht in den einzelnen Fraktionen der Serumeiweißelektrophorese unterscheiden.

Bei allen verwendeten statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt.

3.4 **Analyse der Alterseinflüsse**

Beim männlichen Geschlecht fand sich eine leichte lineare Altersabhängigkeit bei der Albuminfraktion (Korrelationskoeffizient $r = 0,325$), bei der α_2 -Globulinfraktion (Korrelationskoeffizient $r = 0,2$) und bei der β -Globulinfraktion (Korrelationskoeffizient $r = 0,402$), während bei der Höhe der Fraktionen des α_1 -Globulins und des γ -Globulins kein linearer Zusammenhang zum Alter festgestellt werden konnte.

Für das weibliche Geschlecht konnte in Bezug auf die Höhe der einzelnen Fraktionen keine lineare Altersabhängigkeit nachgewiesen werden.

Albuminfraktion:

Die Regressionsgerade [Abb.9] zeigt, dass beim männlichen Geschlecht bei der Albuminfraktion eine leicht fallende Tendenz mit zunehmendem Alter besteht, während aus der polynomialen Regressionskurve [Abb.10] ersichtlich wird, dass die Werte der Albuminfraktion erst nach dem 50. Lebensjahr deutlich absinken. Die Ergebnisse aus der ANOVA stimmen damit überein, dass zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr ein signifikanter ($p = 0,001$) Abfall in der Albuminfraktion zu verzeichnen ist. Insofern ist zu erwägen, die Normalwerte für Albumin bei Männern altersspezifisch auszuweisen.

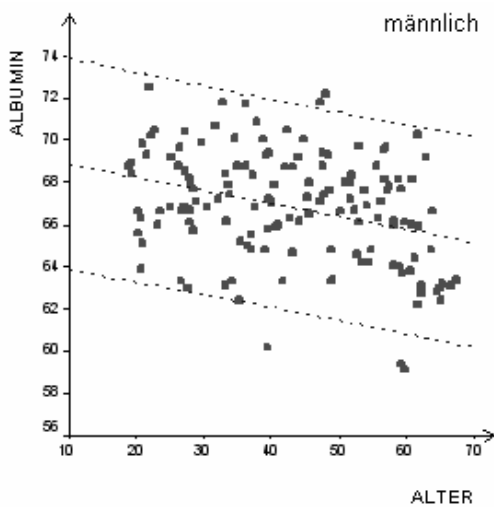


Abb.9

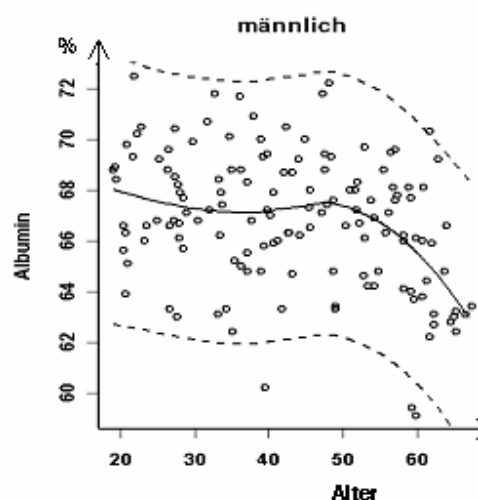


Abb.10

Wie beide Regressionsansätze [Abb. 11 und Abb. 12] zeigen, war bei Frauen dieses Phänomen der Altersabhängigkeit nicht nachweisbar.

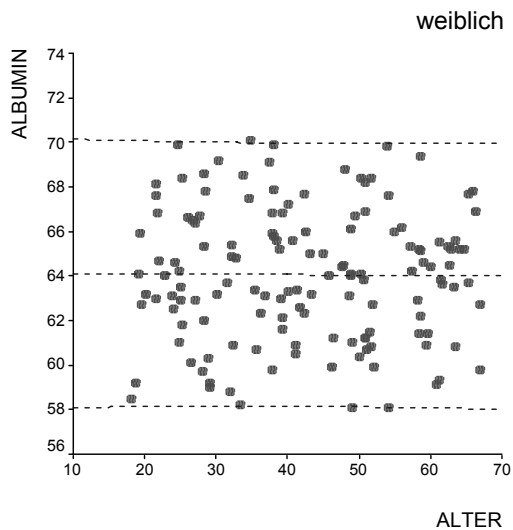


Abb.11

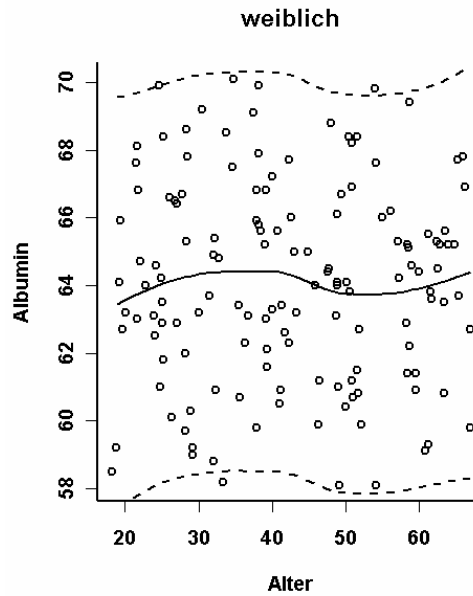


Abb.12

α 1-Globulinfraktion:

Bei den Männern fand sich in Bezug auf die α 1-Globulinfraktion keine statistisch signifikante Altersabhängigkeit, wie aus der linearen und der polynomialen Regression [Abb. 13 und Abb. 14] ersichtlich wird. Die ANOVA bestätigt dies.

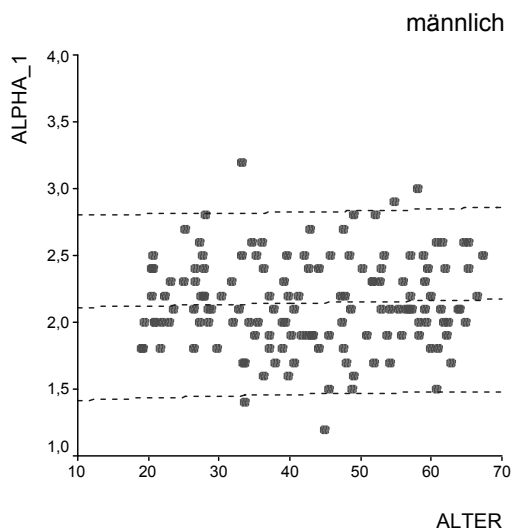


Abb.13

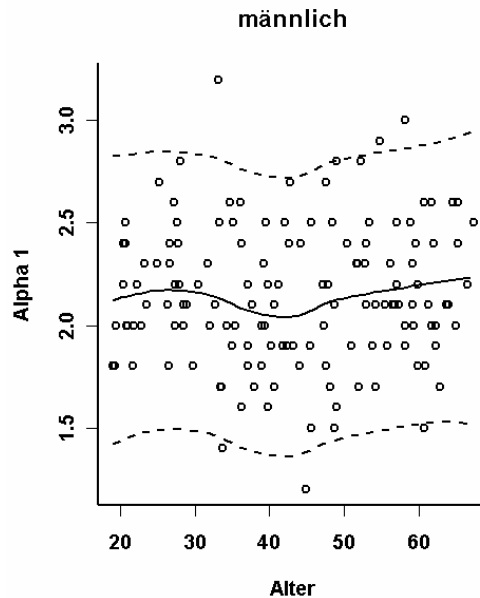


Abb. 14

Die lineare Regression zeigt bei den Frauen einen leichten Abfall mit zunehmendem Alter, die polynomiale Regressionskurve weist einen klaren Trend zur Reduktion der α 1-Globulinfraktion zwischen dem 18. bis ca. 30. Lebensjahr auf, der sich in schwächerer Ausprägung bis zum ca. 50. Lebensjahr fortsetzt und dann in einen leichten Anstieg übergeht [Abb.15 und Abb.16]. Laut ANOVA handelt es sich hierbei aber nicht um signifikante Unterschiede in den Altersgruppen.

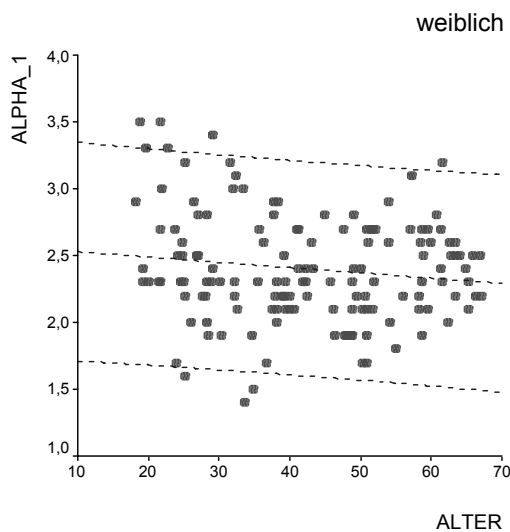


Abb.15

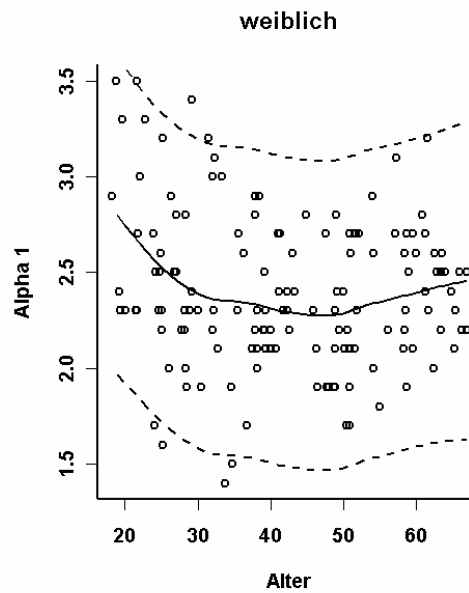


Abb.16

α 2-Globulinfraktion:

Für beide Geschlechter zeigt die lineare Regression [Abb.17] und [Abb.19] mit zunehmendem Alter eine leicht steigende Tendenz der α 2-Globulinfraktion.

Aus der polynomialen Regression wird ersichtlich, dass bei den Männern bis zum 45. Lebensjahr ein leichter Abfall und anschließend ein Anstieg der α 2-Globulinfraktion zu verzeichnen ist [Abb.18]. Bei den Frauen fällt die Kurve zunächst bis zum Alter von 35 Jahren und steigt dann wieder an [Abb.20].

Laut ANOVA bestehen signifikante Unterschiede in den Altersgruppen (Männer $p = 0,014$, Frauen $p = 0,021$), so dass die Referenzwerte altersabhängig betrachtet werden sollten.

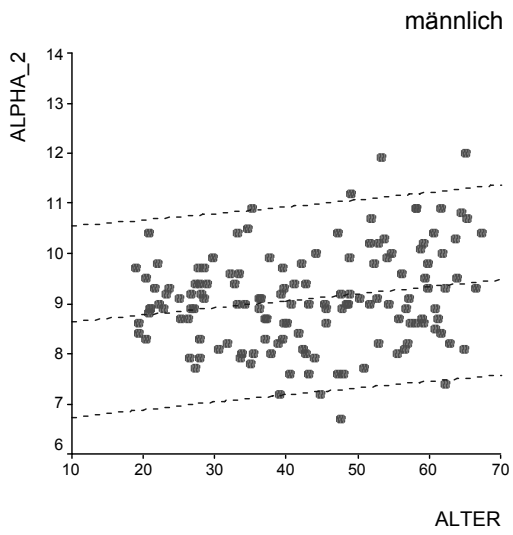


Abb.17

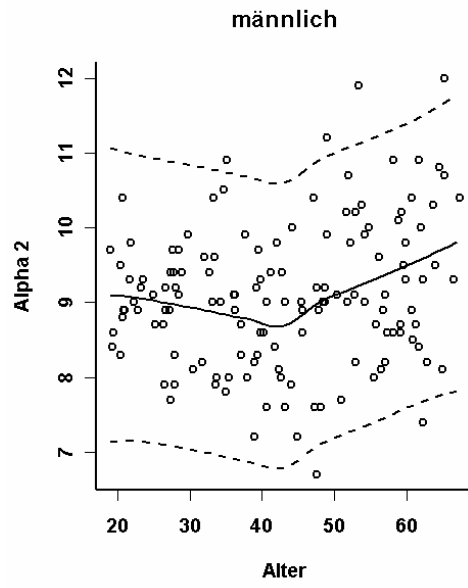


Abb.18

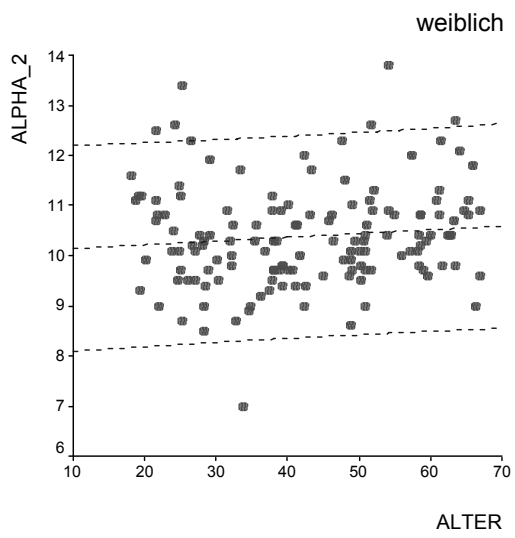


Abb.19

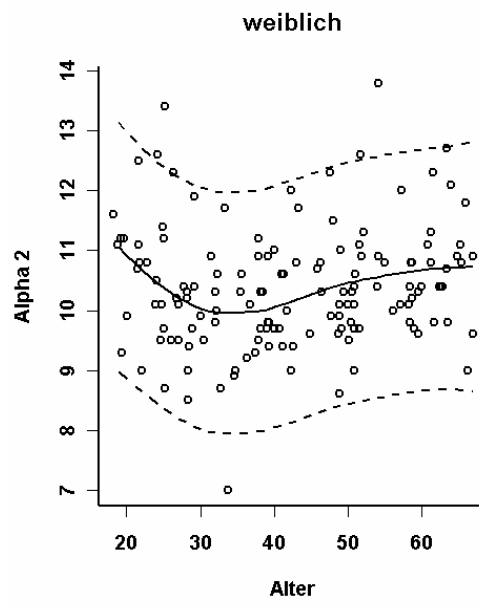


Abb.20

β -Globulinfraktion:

Aufschlussreich war das Ergebnis der Analyse der β -Globulinfraktion für das männliche Geschlecht. Es zeigte sich ein konstanter, nahezu linearer Anstieg der Werte, der sich vom 18. bis zum 68. Lebensjahr erstreckte. Die polynomiale Regressionskurve stimmt fast mit der Geraden aus der linearen Regression überein [Abb.21]. Auch die Ergebnisse der ANOVA sprechen für einen signifikanten Unterschied ($p < 0,0001$) in den Altersgruppen. Insofern würde die Ausweisung von Referenzbereichen in altersabhängigen Bereichen, z.B. zehnjährlichen Intervallen, für die β -Globulinfraktion bei Männern besonders sinnvoll sein.

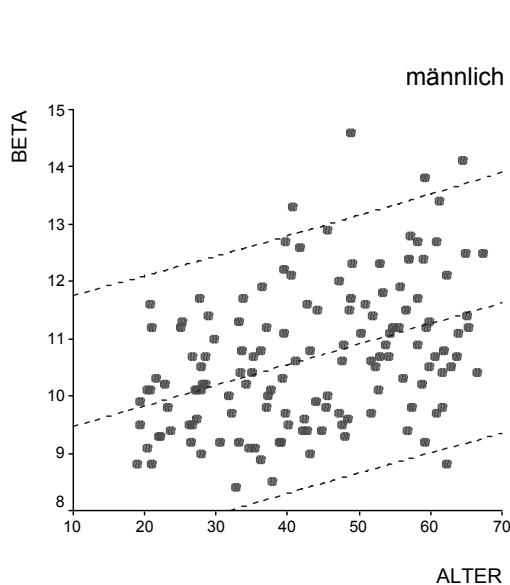


Abb.21

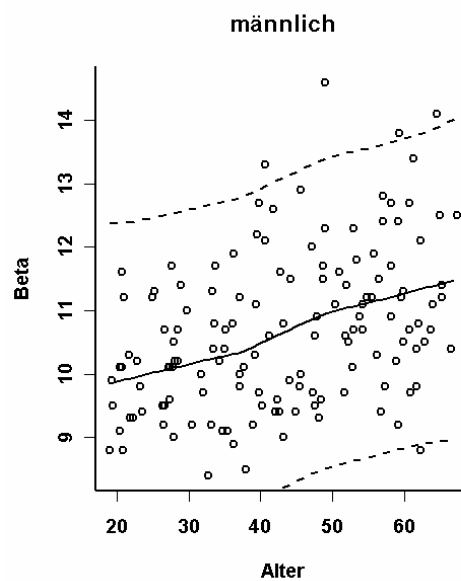


Abb.22

Aus [Abb.23 und Abb.24] wird ersichtlich, dass die β -Globulinfraktion bei Frauen keine Altersabhängigkeit aufweist. Dies wird durch die ANOVA bestätigt.

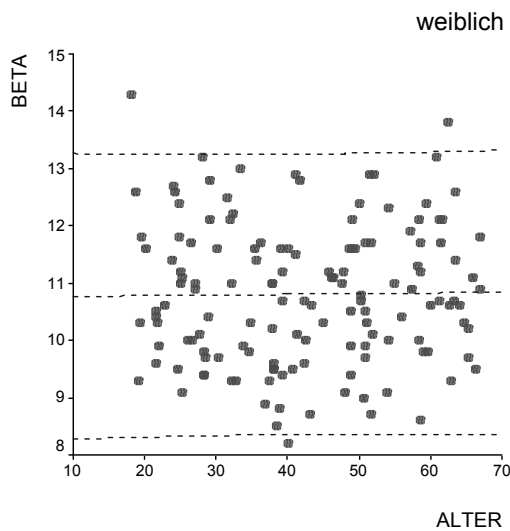


Abb.23

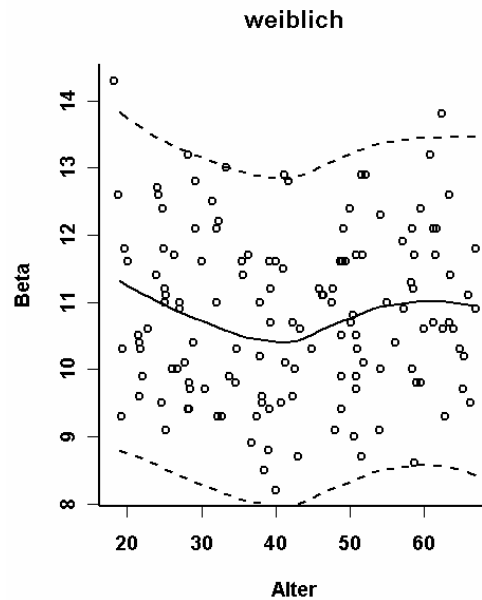


Abb24

γ -Globulinfraktion:

Bei der γ -Globulinfraktion konnte für Männer keine Altersabhängigkeit festgestellt werden. Bei Männern sind die Werte bis zum ca. 45. Lebensjahr relativ konstant, danach leicht ansteigend [Abb.25 und Abb.26]. Es handelte sich hierbei allerdings um einen Trend, der durch die ANOVA nicht bestätigt werden konnte.

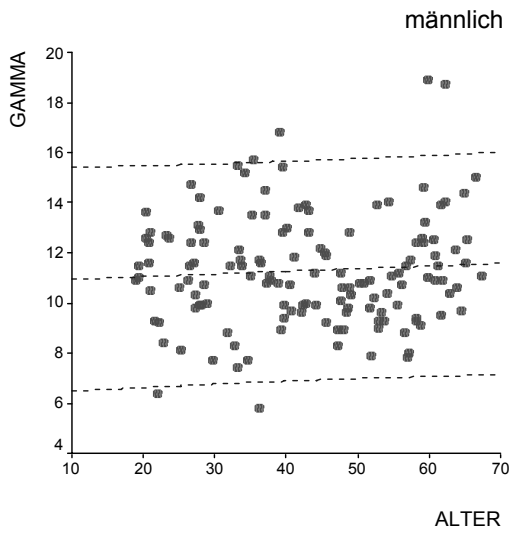


Abb.25

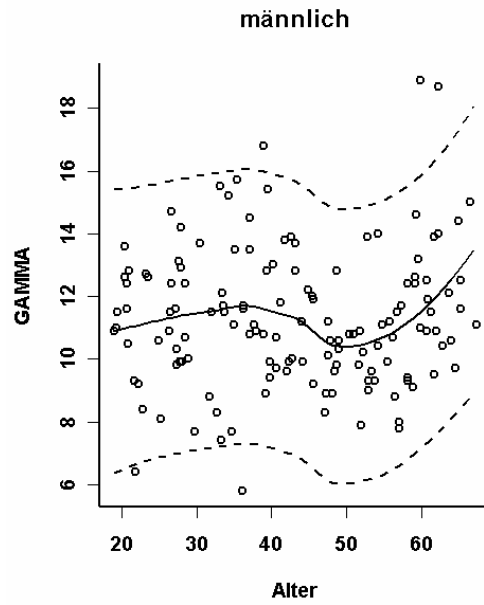


Abb.26

Bei den Frauen war die Höhe der γ -Globulinfraktion bei zunehmendem Alter weitgehend konstant [Abb.27 und Abb.28], was den Ergebnissen der ANOVA entsprach.

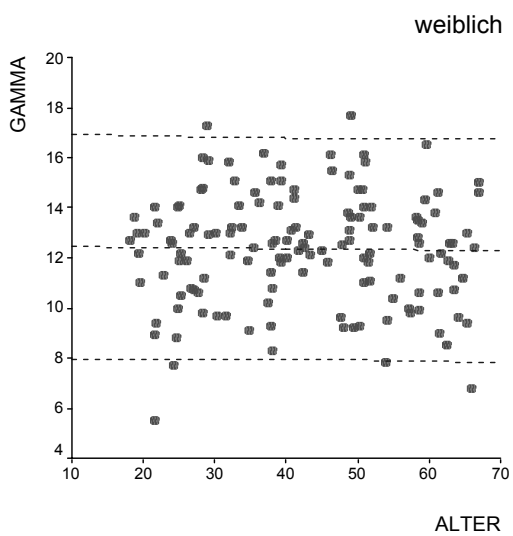


Abb.27

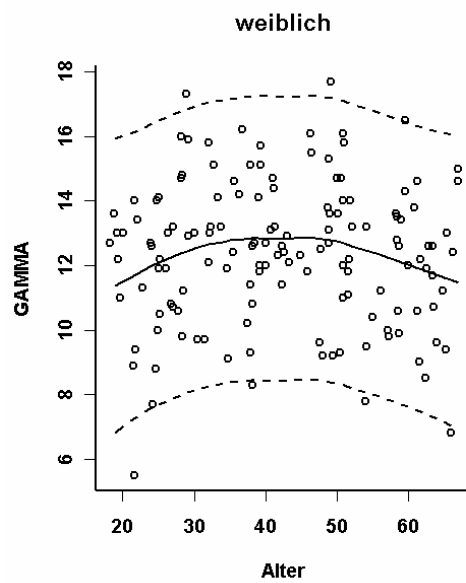


Abb.28

3.5 Analyse der Geschlechtsabhängigkeit

Bei den Fraktionen Albumin, α 1-Globulin, α 2-Globulin und γ -Globulin konnte ein signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zwischen dem männlichen und weiblichen Geschlecht festgestellt werden, so dass folgende Berechnungen für beide Geschlechter getrennt erfolgten:

Wie in Abbildungen 29 bis 33 dargestellt ist, wurden für die Albuminfraktion beim männlichen Geschlecht höhere Werte ermittelt als beim weiblichen Geschlecht, während für die α 1-Globulin-, α 2-Globulin- und γ -Globulinfraktion bei den Männern niedrigere Werte als bei den Frauen festzustellen waren. Im β -Anteil der Serumeiweißelektrophorese ließ sich hingegen kein Geschlechtsunterschied nachweisen.

.

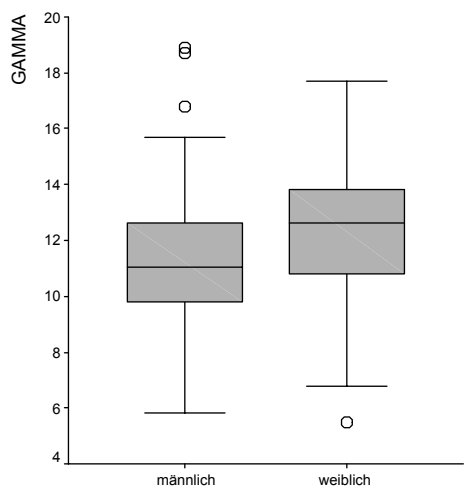
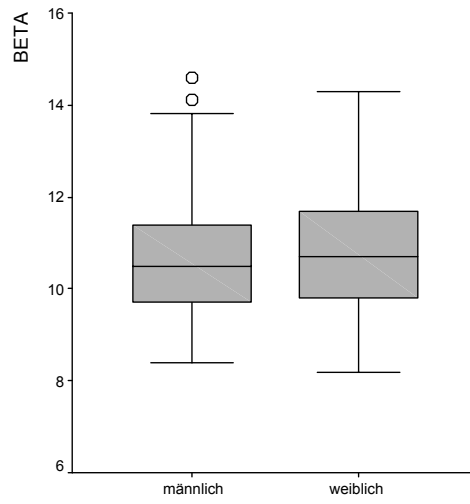
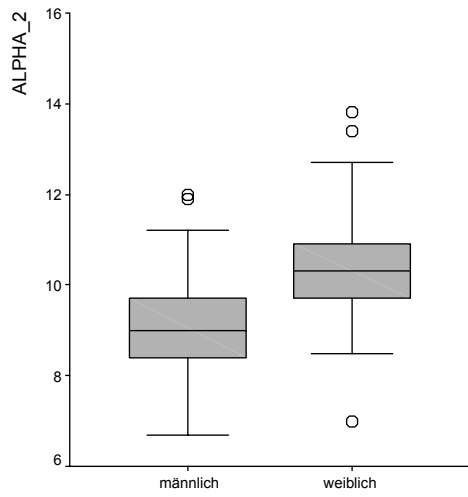
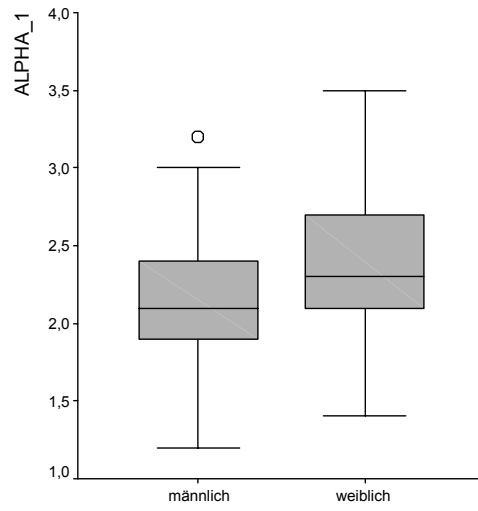
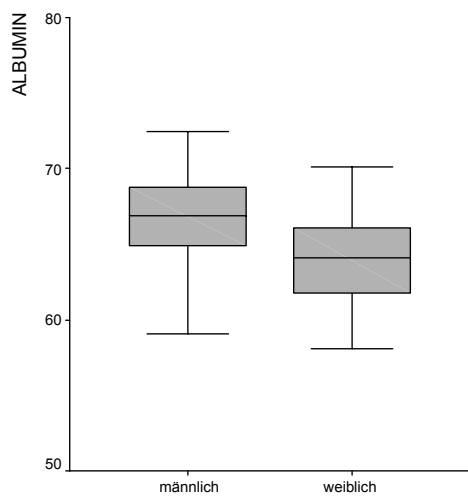


Abb. 29 bis Abb.33

3.6 Analyse der Normalverteilung

Bei vorliegenden den deskriptiven Statistiken Tabelle C und D ist zu beobachten, dass es keine großen Standardabweichungen gibt und dass kein Hinweis auf große Streuung vorliegt. Alle Daten befinden sich in bestimmten Intervallen, es handelt sich um eine Normalverteilung. Außerdem liegen die Maximal- und Minimalwerte dicht beieinander. Daher sind sie relevant, um eine Aussage zu treffen.

	2,5 Perzentile	5 Perzentile	10 Perzentile	90 Perzentile	95 Perzentile	97,5 Perzentile
Albumine	59,100%	59,800%	60,900%	69,380%	70,090%	70,690%
Alpha1-globuline	1,505%	1,700%	1,800%	2,800%	3,000%	3,200%
Alpha2-globuline	7,600%	7,900%	8,200%	11,180%	11,900%	12,300%
Beta-globuline	8,705%	9,000%	9,220%	12,480%	12,890%	13,295%
Gamma-globuline	7,700%	8,300%	9,100%	14,700%	15,700%	16,195%

Tabelle C

	N		s	min	max	25.Perzentile	50. Perzentile	75. Perzentile
Albumine	281	65,427%	3,1139%	58,1%	72,5%	63,200%	65,700%	67,800%
Alpha1-globuline	281	2,273%	0,3967%	1,2%	3,5%	2,000%	2,200%	2,500%
Alpha2-globuline	281	9,743%	1,1792%	6,7%	13,8%	9,000%	9,700%	10,400%
Beta-globuline	281	10,732%	1,2306%	8,2%	14,6%	9,750%	10,600%	11,600%
Gamma-globuline	281	11,828%	2,2707%	5,5%	18,9%	10,050%	11,900%	13,200%

Tabelle D

In einer deskriptiven Statistik (Tabelle E, F) wurden Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie das 25., 50. (Median) und 75. Perzentil für die einzelnen Fraktionen der Serumweißelektrophorese errechnet.

	N	Mittelwert	s	min	max	25. Perzentile	50. Perzentile	75. Perzentile
Albumine	140	66,809%	2,6146%	59,1%	72,5%	64,850%	66,850%	68,800%
Alpha1-globuline	140	2,144%	0,3427%	1,2%	3,2%	1,900%	2,100%	2,400%
Alpha2-globuline	140	9,909%	0,9604%	6,7%	12,0%	8,400%	9,000%	9,700%
Beta-globuline	140	10,657%	1,2315%	8,4%	14,6%	9,700%	10,500%	11,400%
Gamma-globuline	140	11,292%	2,2045%	5,8%	18,9%	9,800%	11,050%	12,600%

Tabelle E: Deskriptive Statistik bei männlichen Gruppen

	N	Mittelwert	s	min	maxi	25. Perzentile	50. Perzentile	75. Perzentile
Albumine	141	64,055%	2,9661%	58,1%	70,1%	61,700%	64,100%	66,150%
Alpha1-globuline	141	2,400%	0,4056%	1,4%	3,5%	2,100%	2,300%	2,700
Alpha2-globuline	141	10,384%	1,0173%	7,0%	13,8%	9,700%	10,300%	10,900
Beta-globuline	141	10,805%	1,2295%	8,2%	14,3%	9,800%	10,700%	11,700
Gamma-globuline	141	12,360%	2,2170%	5,5%	17,7%	10,800%	12,600%	13,900%

Tabelle F: Deskriptive Statistik bei weiblichen Gruppen

3.7 Endergebnisse:

Bei dieser statistischen Arbeit bin ich zu dem Ergebnis gekommen, dass die Proteinfractionen im Serum alters- und geschlechtsabhängig sind.

Unter den Tabellen G und H wurde der Normbereich geschlechtsspezifisch für jede Altersgruppe bestimmt.

	Albumin		Alpha 1-Globuline		Alpha 2-Globuline	
vor August 2004	60.3% - 71.4%		1.4 %-2.9%		7.2%- 11.3%	
nach August2004	59.8 %- 72.4%		1 %- 3,2%		7.4% - 12.6%	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
<30	63.3% -72%	57.7% - 70.1%	1.6% -2.7%	2,1% -3%	7.8% -10.2%	8.2 %- 12.8%
30 - 40	61.4% -72.9%	58 %- 71.2%	1.3 %- 2.9%	1.4%-3.3%	7.1 %- 10.7%	8.1% - 11.7%
40 - 50	62.7% -72.1%	58.7 %-68.9%	1.2 %- 2.9%	1.7% - 2.9%	6.7 %- 10.8%	8.5% - 12.1%
50 - 60	61.3% - 71.3%	57.7% - 70.2%	1.6 %- 2.8%	1.6% - 3.1%	7.4 %- 11.4%	8.6 %- 12.4%
> 60	59.8% -69.6%	58.7% - 69.2%	1.5% -2.8%	1.9% - 3%	7.1% - 12%	8.9% - 12.7%

Tabelle G

	Beta-Globuline		Gamma-Globuline	
vor August 2004	8.1% - 12.7%		8.7% - 16%	
nach August 2004	7.5% - 12.9%		8% - 15.8%	
	Männlich	Weiblich	Männlich	Weiblich
<30	8.4% - 11.7%	8.4% - 13.5%	7.2% - 14.9%	7.3% - 16.9%
30 - 40	8% - 12.4%	8% - 13%	6.2% - 17.1%	8.2% - 17%
40 - 50	7.9% - 13.7%	8.3% - 13%	7.7% - 14.1%	9% - 16.9%
50 - 60	9.1% - 13.2%	8.4% - 13.2%	6.3% - 15.5%	8.1% - 16.7%
> 60	8.5% - 14%	8.7% - 13.6%	10% - 16.8%	7.1% - 16.1%

Tabelle H

In der Tabelle I sind die Ergebnisse angegeben, die man als Normalwerte aus diesen Ergebnissen für Erwachsene in Norddeutschland herausgerechnet hat. Die Normalwerte sind mit ± 2 Standardabweichungen berechnet worden. Die vorgegebenen Normalwerte von SEBIA vor und nach August 2004 sind dazu geschrieben.

	Vor Aug 2004	Nach Aug 2004	Neue Ergebnisse der CAU
ALBUMIN	60.3% -71.4%	59.8% -72.4%	59.2% -71.67%
ALPHA-1-GLOBULINE	1.4 %-2.9%	1.0% -3.2%	1.48%-3.07%
ALPHA-2- GLOBULINE	7.2 %-11.3%	7.4 %-12.6%	7.38% -12.10%
BETA- GLOBULINE	8.1 %-12.7%	7.5 %-12.9%	8.3 % -13.2%
GAMMA- GLOBULINE	8.7 %-16%	8.0% -15.8%	7.3 %-16.4%

Tabelle I

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Unter Elektrophorese versteht man im Allgemeinen die Wanderung von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Im engeren Sinn bezeichnet man damit Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Relation der verschiedenen Proteinfractionen in Körperflüssigkeiten. Neben der physikalischen Trennung der Eiweiße aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung werden hierbei die Anfärbung der Proteinfractionen und die photometrische Auswertung eingeschlossen.

Infolge ihres amphoteren Charakters können die Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert der sie umgebenden Lösung als Anionen oder als Kationen auftreten. Als isoelektrischen Punkt eines Proteins definieren wir den pH-Wert, bei dem die Moleküle durchschnittlich gleich viele positive und negative Teilladungen besitzen, die Gesamtladung also Null ist. Bei diesem pH-Wert wandert das Protein im elektrischen Feld nicht (aus: Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg, Seite 30)

Da alle Serumproteine mehr Mono-Amino-Dicarbonsäuren (Asparaginsäure, Glutaminsäure) als basische Aminosäuren (Arginin, Lysin, Histidin) enthalten, liegen ihre isoelektrischen Punkte im schwach sauren pH-Bereich:

Albumin pH 4,6, Proteine der α -Globulin-Fractionen pH 4,8, Proteine der β -Globulin-Fraktion pH 5,2, Proteine der γ -Globulin-Fraktion pH 6,4.

Oberhalb dieser pH-Werte sind alle Serumproteine negativ geladen. Bei pH 8,6 trägt das Albumin die größte negative Überschussladung und wandert im elektrischen Feld am weitesten in Richtung Anode, die γ -Globuline mit der geringsten negativen Nettoladung zeigen die kürzeste Wanderungstrecke. Ein alkalischer pH-Wert (z.B. pH 8,6) ist in der heutigen Routinediagnostik am häufigsten im Einsatz.

Die Beweglichkeit eines Proteins im elektrischen Feld hängt nicht nur von seiner Ladung, sondern auch von der Größe und Form des Moleküls sowie den Versuchsbedingungen ab (pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, Feldstärke, Temperatur usw.).

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist direkt proportional der angelegten Spannung und der Ladung und umgekehrt proportional des Radius der untersuchten Teilchen.

Die Trennung der Serumproteine im elektrischen Feld stellt also eine Differenzierung aufgrund unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften dar. Aus der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit kann daher nicht auf chemische Einheitlichkeit geschlossen werden. Während das Serumalbumin eine homogene Substanz darstellt, sind die übrigen abtrennbaren Fraktionen durch zufällige, jedoch reproduzierbare Überlagerungen verschiedener Proteine mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften entstanden.

Der Objektträger mit transparentem Elektrophoresematerial wird in das Auswertegerät eingelegt, in dem nun die Elektrophorese zwischen einer stabilisierten Lichtquelle und einer Photozelle durchgezogen wird. Die Registrierung der Extinktion erfolgt kontinuierlich, so dass sich das typische Elektrophorese-Diagramm mit fünf verschiedenen Proteinfractionen darstellt: Albumin, α 1-Globuline, α 2-Globuline, β -Globuline, γ -Globuline.

Bezüglich der Normbereiche sind die Ergebnisse in gewissen Grenzen von der verwendeten Methodik, dem Trägermaterial und dem zur Anfärbung der Proteine benutzten Farbstoff abhängig. Hierdurch erklärt es sich, dass die in der Literatur angegebenen Normbereiche beim Vergleich verschiedener Methoden und verschiedener Hersteller voneinander abweichen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse der vorliegenden Studie

Serumprotein-Elektrophoresen werden zur Diagnostik von Dysproteinämien durchgeführt. Die Auftrennung der Serumproteine erfolgt bei alkalischem pH-Wert aufgrund der Nettoladung, dem isoelektrischen Punkt und dem Molekulargewicht der Proteine. Die Indikation ist die Diagnose und Verlaufsbeurteilung von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen, Protein-Verlust-Syndrome (Nierenerkrankungen, gastrointestinale Erkrankungen, Hauterkrankungen, Exsudate und Transsudate), monoklonale Gammopathien sowie Abklärungen von erhöhten Blutsenkungsreaktionen, Proteinurien und Erhöhung oder Erniedrigungen des Gesamteiweißes im Serum.

Dysproteinämien sind also quantitative oder qualitative Veränderungen der Proteinzusammensetzung des Serums und stehen in enger Beziehung zu einer großen Zahl von Krankheiten. Dysproteinämien sind in der Serumelektrophorese vorwiegend dann erkennbar, wenn Proteine und Proteingruppen betroffen sind, die bei Krankheitsprozessen gekoppelt im Sinne der Vermehrung oder Verminderung reagieren wie Albumin, Akute-Phase-Protein, die Gruppe Transthyrethyretin-, Transferin und Immunglobuline (aus: Labor und Diagnose, Seite 935).

Aus dem Vorliegen einer Dysproteinämie und dem Muster des Elektropherogramms (Konstellationstyp) sind jedoch folgende Feststellungen möglich: Zuordnungen von Erkrankungen oder Krankheitsgruppen zu charakteristischen Konstellationstypen, Erkennung des Aktivitätsstadiums einer Erkrankung, Verlaufsbeurteilung des Krankheitszustandes (aus: Labor und Diagnose, Seite 936). Auch wird die Serumelektrophorese häufig als Suchreaktion für monoklonale Gammopathien eingesetzt.

Die Durchführung der Serumelektrophorese ist nicht standardisiert. Jedes Labor muss daher seine eigenen Referenzbereiche erstellen. Mit diesem Ziel wurde auch die hier vorgelegte Studie durchgeführt.

Verminderte Albuminkonzentrationen im Serum können Hinweise auf eine verminderte Synthese bei einem leichten Proteinmangel sein, wie er z.B. im höheren Lebensalter bei verminderter Ernährung auftreten könnte. Grundsätzlich ist also die Albuminverminderung älterer Männer möglicherweise Folge einer etwas verminderten Eiweißzufuhr, auch wenn

die Albumin-Werte noch im Normbereich liegen. Natürlich kann auch eine – wenn auch nur geringgradige – Verminderung der Leber-Syntheseleistung Albuminverminderungen mit zunehmendem Lebensalter bewirken, auch wenn hier die Normalwerte weiterhin eingehalten werden.

Die Verminderung von Immunglobulinen kann durch verminderte Synthese, vermehrten Verlust oder Hyperkatabolismus von Immunglobulinen bedingt sein. Die Vermehrung von Immunglobulinen beinhaltet eine Vermehrung von Antikörpern. Das Spektrum der Erkrankungen, die eine Antikörpervermehrung verursachen, ist weit und umfasst Infektionen, chronische Lebererkrankungen und Kollagenkrankheiten. Insofern können auch hier altersabhängig chronische biologische Veränderungen beispielsweise entsprechende Vermehrungen oder Verminderungen von Immunglobulinen herbeiführen. Eine altersabhängig verminderte Synthese von γ -Globulinen, ein vermehrter Verlust von Globulinen oder ein Hyperkatabolismus können Immunglobulinverminderungen hervorrufen, die auch wiederum im Rahmen von Alterungsprozessen nur geringgradig sein können, so dass zwar die Werte weiterhin im Normalbereich verbleiben, dennoch altersabhängig mäßiggradige Veränderungen eintreten können.

Die vorangehend vorgetragenen Aspekte betrafen also die in unserem Ergebnisteil vorgetragenen Veränderungen und ihre möglichen Ursachen im Sinne altersabhängiger Verstärker oder verminderter Syntheseraten bestimmter Serumproteine. Natürlich kann man sich in gleicher Weise auch altersabhängig auftretende Verlustraten vorstellen, beispielsweise im Bereich der Eiweißausscheidung über die Nieren, die zwar wiederum noch

im Bereich der Norm liegen, jedoch zu den geschilderten Veränderungen führen können.

Darüber hinaus sind selbstverständlich die hier beschriebenen Veränderungen einzelner Altersgruppen oder auch die geschilderten Veränderungen zwischen Männern und Frauen durchaus relevant und unter biologischen Gesichtspunkten auch interessant. Dennoch wären unter statistischen Gesichtspunkten signifikant größere Gruppen im Hinblick auf eine statistische Signifikanz von stärkerer Aussagekraft. Die Relevanz der hier gemachten Aussagen können also dadurch erheblich verstärkt werden, dass die jeweils einer Gruppe zugeordneten Probandenzahlen signifikant erhöht würden.

5 Zusammenfassung:

Nach der Durchsicht der Serumelektrophoresedaten gesunder Probanden wurde festgestellt, dass die Serumproteine einiger Probanden außerhalb der Normwerte liegen.

Auf der anderen Seite wurde neben den vorgegebenen Normwerten von SEBIA empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Normwerte bestimmt.

Die selektive Auswahl des gesunden Probandenkollektivs erfolgte nach festgelegten Kriterien. Insgesamt 281 Probanden, davon 141 weibliche und 140 männlich und alle im Alter von 18 bis 68 Jahren. Diese beiden Gruppen werden dann noch mal in 5 Untergruppen unterteilt (18–28; 28–38; 38–48; 48–58; 58–68 Jahre). In jeder Gruppe hatten wir 28 Probanden, um für jedes Alter und Geschlecht einen aussagekräftigen Referenzwert zu haben. Nach sorgfältiger Blutentnahme und Zentrifugation wurden die Serumproben vorbereitet.

Durch Elektrophorese können Serumproteine aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladungen im alkalischen pH-Wert (z.B. pH 8,6) aufgetrennt werden.

Für jeden Probanden hat man dann mit dieser Technik die einzelnen Serumproteinfraktionen photometrisch bestimmt.

Die Serumproteinfraktionen werden in Albumin, Alpha-1-Globuline, Alpha-2-Globuline, Beta-Globuline, Gamma-Globuline eingeteilt.

Ziel der Auswertung war es herauszufinden ob es einen geschlechts- und altersabhängigen Zusammenhang der einzelnen Probandengruppen gibt.

Das Ergebnis innerhalb der Probandengruppen war eine Normalverteilung, die keine große Standardabweichung und keine große Streuung zeigte. Bei

den Männern bestand im Altersvergleich ein linearer Zusammenhang in den Albumin-, alpha2-Globulin- und beta-Globulinfraktionen. Dies war bei den Frauen nicht festzustellen.

Bei Analyse der Geschlechtsabhängigkeit hat man in den Proteinfractionen Albumin, alpha1-Globulin, alpha2-Globulin und gamma-Globulin einen signifikanten Unterschied festgestellt.

Am Ende habe ich neu berechnete Werte der CAU mit ± 2 Standardabweichungen in der Tabelle angegeben.

<u>Fraktionen</u>	<u>Normbereich</u>
Albumin	59.2% - 71.67%
Alpha-1 Globuline	1.48% - 3.07%
Alpha-2 Globuline	7.38% - 12.10%
Beta Globulina	8.3% - 13.2%
Gamma Globulina	7.3% - 16.4%

Außerdem wurden die Daten mit den von SEBIA vorgegebenen Referenzwerten gegenüber gestellt und verglichen.

Die Relevanz der hier gemachten Aussagen kann also erheblich dadurch verstärkt werden, dass die jeweils einer Gruppe zugeordneten Probandenzahlen signifikant erhöht würden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Lehrbuch der Labormedizin(1. Auflage)-Verlag: Schattauer, Stuttgart, 1999 – hrsg. von Prof. Dr. Hans D. Bruhn- Prof. Dr. Ulrich R. Fölsch - ISBN 3-7945-1856-x
2. Labor und Diagnose(5. Auflage)- hrsg. von Lothar Thomas- Verlag: TH Bocks, Frankfurt am Main, 2005- ISBN 3-9805215-5-9
3. Erster Schritt zum Hammerexamen (1. Auflage) – Verlag: URBAN UND FISCHER 2005– hrsg. Von M. Bchta, D. Höper, A. Sönnichen- ISBN 3-437-42543-9
4. Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg (2. Auflage)- Verlag: Thime Stuttgart- New York - hrsg. von Jürgen Hallbach- ISBN 3-13-106342-4
5. Klinische Chemie und Hämatologie (6. Auflage)- Verlag: Thieme Stuttgart- New York 2006- hrsg. Klaus Dörner - ISBN :3-13-1297-16-6
6. Lexikon der medizinischen Laboratoriumsdiagnostik – Verlag: Arndt-Springer Heidelberg 2006- hrsg. Gressner- ISBN : 3-540-23660-0
7. Klinisch-chemische Diagnostik- Verlag: Gustav Fischer Jena, Stuttgart 1993 – hrsg. von Gerhard Müller- ISBN 3-334-60431-4
8. Klinische Chemie und Mikroskopie(6. Auflage)-Verlag: Springer Berlin Heidelberg New York- hrsg. Wrint Rick- ISBN 3-540-08219-05

6.2 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. H. D. Bruhn, für die Angabe des Themas der Doktorarbeit und die Anleitung zu den experimentellen Untersuchungen, für die vielen Korrekturen und die Unterstützung bei dem Verfassen der Doktorarbeit.

Zusätzlich danke ich besonders Herrn Dr. Stephan Lentz für die hervorragende Zusammenarbeit und Geduld bei der Planung und die vielen Hinweise.

Des Weiteren danke ich Herrn Diplom-Informatiker Hedderich für die großartige Unterstützung von Anfang an und die Hilfe bei den Statistikdarstellungen.

Danken möchte ich auch dem Institut für Transfusionsmedizin für die Zusammenarbeit und Bereitstellung der Serumproben von Probanden.

Weiteren Dank möchte ich Frau Müller und Frau Gurr für die Hilfe im chemischen Labor und bei der Bedienung des Elektrophoresegerätes von SEBIA aussprechen.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium und die Promotion ermöglichten.

6.3 **Lebenslauf**

Am 13.05.1968 wurde ich in einem Stadtteil von Karaj, Provinz Teheran als Sohn von Frau Kiaie und Herr Hossein Zadeh Fard geboren.

Im Juni 1986 habe ich die Abschlussprüfung für das Abitur an der Oberschule, Shahid Rajaie, in meiner Geburtsstadt bestanden.

Nach dem Bestehen der Aufnahmeprüfung war ich von 1987 bis 1990 Student.

Im Juni 1990 bekam ich ein Abschlussdiplom für die Ausbildung des medizinischen Hilfspersonals an der Universität für medizinische Wissenschaften und hygienisch-therapeutische Dienste an der Teheraner Universität für das Studium des Fachbereichs Operationssaal (Operationspfleger).

Von Oktober 1990 bis Februar 1993 habe ich meinen Wehrdienst abgeleistet.

Von 1993 bis 1995 war ich als studentische Hilfskraft in unterschiedlichen Krankenhäusern tätig und außerdem als Geschäftsleiter einer Firma beschäftigt.

Am 28.12.1995 reiste ich nach Deutschland und besuchte dort bis 1996 einen Deutschkurs.

Im Juni 1997 schloss ich das Studienkolleg für ausländische Studierende an der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn ab.

Im Wintersemester 1997/98 begann ich das Studium der Medizin an der medizinischen Universität in Kiel (CAU).

Im Januar 2007 beendete ich mein praktisches Jahr im Universitäts-Klinikum Kiel.

Im Oktober 2008 habe ich den Abschluss für mein Medizinstudium an der CAU erhalten.

Im März 2009 habe ich das iranische Examen für das Medizinstudium abgeschlossen.

Im Juli 2009 habe ich die mündliche Doktorprüfung an der CAU bestanden.

6.4 Abkürzungen

S:	Standardabweichungen
Abb.:	Abbildung
N:	Anzahl von den Probanden und Patienten
SELP:	Serum-Elektrophorese
CAU:	Christian-Albrechts-Universität
HLA:	Histokompatibilitäts-Antigen
U/min:	Umdrehung pro Minute
ANOVA:	Analysis of variance