



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Entwicklung und Vergleich von Testsystemen zum Nachweis von Hirudin-Antikörpern

Autor: Angela Sellhorst
Einrichtung: I. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. J. Harenberg

R-Hirudin wird als aufgrund seiner starken direkten Thrombin hemmenden Wirkung therapeutisch eingesetzt. Aufgrund seiner Eiweißstruktur ist es denkbar, daß r-Hirudin eine Antikörperbildung induziert. Es werden Verfahren aufgezeigt, anhand derer Antikörper gegen r-Hirudin nachgewiesen werden können.

Antihirudin-Antikörper vom Kaninchen wurden mit PEG-Hirudin-gekoppelten Latexpartikeln versetzt und im Durchflußzytometer gemessen. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität für Latexbeads mit kovalent, jedoch nicht mit adsorptiv gebundenem PEG-Hirudin.

In einem Fluoreszenz-linked immunosorbant assay mit Fluoreszein-markiertem Antikörper war keine Korrelation zwischen der Konzentration des polyklonalen Antihirudin-Antikörpers vom Kaninchen und der Fluoreszenz nachweisbar, weil die unspezifische Bindung an die Mikrotiterplatte zu hoch war.

Über einen enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) mit Biotin-Markierung konnten Antihirudin-Antikörper vom Kaninchen konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Nachfolgend wurden Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT), die mit rekombinatem Hirudin behandelt wurden, auf die Expressierung von Antihirudin-IgG, -IgM, -IgA und -IgE untersucht, und die Ergebnisse mit einem Peroxidase-markierten ELISA-System verglichen. Von 8 kontrollierten Patienten entwickelten 7 einen oder mehrere Antikörper-Isotypen, die mit beiden Methoden nachweisbar waren. IgG wurden von 6 Patienten gebildet, IgM und IgA jeweils von 4 Patienten. IgE konnten bei keinem der Untersuchten nachgewiesen werden. Bei 2 Patienten wurden 3 Isotypen, bei 3 Patienten jeweils 2 Isotypen und bei weiteren 2 Patienten jeweils 1 Isotyp gemessen. Innerhalb von 2 Monaten nach Therapieende lagen bei allen Patienten die IgM wieder unterhalb der Nachweisgrenze, innerhalb von 2 Jahren waren auch IgG und IgA nicht mehr nachweisbar.

Aus den Ergebnissen läßt sich folgern, daß Hirudin eine antikörperinduzierende Wirkung im Menschen aufweist, und daß ein Nachweis von IgG, IgM und IgA sowohl über den Biotin-, als auch über den Peroxidase-markierten ELISA zu führen ist. Ob sich die Methoden darüber hinaus für einen Nachweis von IgE eignen, ist aus den vorliegenden Daten nicht sicher zu schließen. Die gemessenen Extinktionen liegen im Peroxidase-Test deutlich höher als im Biotin-Test, so daß mit dem Peroxidase-markierten ELISA schärfer zwischen positiven und negativen Patientenproben getrennt werden kann.