

Untersuchungen über ADAMTS13 in Gerinnungsfaktorpräparaten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Tanja Falter
geb. in Stuttgart

Mainz, 2011

vom Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Datum der Disputation: 21.06.2011

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu verehren.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzungen der Arbeit	2
1.2	Literaturübersicht	4
	1.2.1 Hämostaseologie.....	4
	1.2.2 Bedeutung des von Willebrand-Faktor.....	6
	1.2.2.1 Von Willebrand-Faktor und Thrombozytenadhäsion.....	6
	1.2.2.2 Funktion des von Willebrand-Faktors.....	7
	1.2.2.3 Synthese und Struktur des von Willebrand-Faktors.....	8
	1.2.3 Das von Willebrand Syndrom (VWS).....	10
	1.2.3.1 Typisierung.....	10
	1.2.3.2 Symptomatik.....	12
	1.2.3.3 Diagnostik.....	13
	1.2.3.4 Mutationen.....	16
	1.2.3.5 Therapeutische Strategien.....	17
	1.2.4 Bedeutung der VWF-spaltenden Protease (ADAMTS13).....	18
	1.2.4.1 Funktion von ADAMTS13.....	19
	1.2.4.2 Synthese und Struktur von ADAMTS13.....	20
	1.2.5 Die thrombotischen Mikroangiopathien.....	22
	1.2.5.1 Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP)	23
	1.2.5.1.1 Geschichtlicher Hintergrund.....	24
	1.2.5.1.2 Pathophysiologie.....	25
	1.2.5.1.3 Typisierung.....	26
	1.2.5.1.4 Symptomatik.....	28
	1.2.5.1.5 Diagnostik.....	28

1.2.5.1.6	Therapeutische Strategien.....	29
1.2.5.1.7	Prognose.....	30
1.2.5.2	Das TTP-Like Syndrom.....	31
1.2.6	Gerinnungsfaktorkonzentrate.....	31
1.2.6.1	Herstellung der Gerinnungsfaktorkonzentrate.....	33
1.2.6.2	Herstellung der Plasmapräparate.....	37
1.2.6.2.1	Herstellung von Einzelspenderplasma.....	37
1.2.6.2.2	Herstellung von Fresh Frozen Plasma.....	38
1.2.6.2.3	Herstellung von solvent / detergent behandeltem Plasma (Octaplas®).....	38
2	Material und Methoden.....	41
2.1	Untersuchungssubstanzen.....	41
2.1.1	Normalkollektiv.....	41
2.1.2	Patientenkollektiv.....	41
2.1.3	Gerinnungsfaktorkonzentrate.....	41
	Haemate® P 1000, CSL Behring GmbH, Deutschland.....	41
	Wilate® 900, Octapharma GmbH, Langenfeld.....	42
	Immunate STIM plus 250 I.E. Immuno, Baxter AG, Wien.....	42
	Wilfactin 100 UI/ml, LFB Biomédicamentes, France.....	42
	Beriate® P 250, CSL Behring, Deutschland.....	42
	Kogenate® Bayer 1000 I.E., Bayer HealthCare AG, Deutschland.....	43
2.1.4	Plasmapräparate.....	43
	Solvent / detergent behandeltes Plasma.....	43
	Fresh Frozen Plasma.....	43
2.2	Methoden.....	44
2.2.1	SDS-Gelelektrophorese.....	44
2.2.1.1	Materialien.....	44
2.2.1.2	Methode.....	47

2.2.2 BCS-Methode nach Böhm.....	49
2.2.2.1 Materialien.....	51
2.2.2.2 Methode.....	52
2.2.3 Modifizierte Böhm-Methode.....	53
2.2.4 ELISA und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET).....	54
2.2.4.1 Technozym® ADAMTS13.....	54
2.2.4.1.1 Materialien.....	56
2.2.4.1.2 Methode.....	57
2.2.4.2 Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay.....	59
2.2.4.2.1 Materialien.....	61
2.2.4.2.2 Methode.....	62
2.2.4.3 Imubind® ADAMTS13 ELISA.....	62
2.2.4.3.1 Materialien.....	63
2.2.4.3.2 Methode.....	64
2.2.5 Bestimmung des ADAMTS13 Antikörpers.....	65
2.2.5.1 Materialien.....	65
2.2.5.2 Methode.....	65
2.3 Methodenvergleich.....	66
2.3.1 Versuchsaufbau.....	67
2.3.2 Versuchsergebnisse.....	68
2.3.2.1 BCS-Methode nach Böhm.....	70
2.3.2.2 Technozym® ADAMTS13.....	71
2.3.2.3 Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay.....	71
2.3.3 Methodenvergleich nach Passing und Bablok.....	72
2.3.4 Schlussfolgerung.....	74

3	Ergebnisse	75
3.1	Gerinnungsfaktorkonzentrate	75
	3.1.1 Haemate®P.....	76
	3.1.1.1 Gelelektrophorese.....	77
	3.1.1.2 ADAMTS13 Aktivität.....	78
	3.1.1.3 ADAMTS13 Antigen.....	83
	3.1.1.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13.....	86
	3.1.1.5 ADAMTS13 Antikörper.....	89
	3.1.2 Wilate®.....	89
	3.1.2.1 Gelelektrophorese.....	90
	3.1.2.2 ADAMTS13 Aktivität.....	91
	3.1.2.3 ADAMTS13 Antigen.....	96
	3.1.2.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13.....	100
	3.1.2.5 ADAMTS13 Antikörper.....	103
	3.1.3 Immunate STIM plus.....	104
	3.1.3.1 Gelelektrophorese.....	104
	3.1.3.2 ADAMTS13 Aktivität.....	104
	3.1.3.3 ADAMTS13 Antigen.....	108
	3.1.3.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13.....	108
	3.1.3.5 ADAMTS13 Antikörper.....	110
	3.1.4 Wilfactin®.....	111
	3.1.4.1 Gelelektrophorese.....	111
	3.1.4.2 ADAMTS13 Aktivität.....	112
	3.1.4.3 ADAMTS13 Antigen.....	119
	3.1.4.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13.....	123
	3.1.4.5 ADAMTS13 Antikörper.....	126
	3.1.5 Beriate®P.....	126
	3.1.5.1 Gelelektrophorese.....	126

3.1.5.2 ADAMTS13 Aktivität.....	127
3.1.5.3 ADAMTS13 Antigen.....	129
3.1.5.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13.....	129
3.1.6 Kogenate®.....	130
3.2 Fresh Frozen Plasma und solvent / detergent behandeltes Plasma.....	130
3.2.1 Gelelektrophorese.....	131
3.2.2 ADAMTS13 Aktivität.....	131
3.2.3 ADAMTS13 Antigen.....	138
3.2.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13.....	141
3.2.5 ADAMTS13 Antikörper.....	145
3.3 Vergleich Konzentrate und Plasmapräparate.....	146
3.3.1 ADAMTS13 Aktivität.....	146
3.3.2 ADAMTS13 Antigen.....	151
3.4 Differentialdiagnose der thrombotischen Mikroangiopathien.....	155
4 Diskussion.....	160
4.1 Methodenkritik.....	160
4.1.1 Methoden zur Bestimmung der ADAMTS13 Aktivität.....	160
4.1.2 Methoden zur Bestimmung des ADAMTS13 Antigen.....	171
4.2 Thrombotische Mikroangiopathien.....	173
4.3 Plasmapräparate.....	178
4.4 Gerinnungsfaktorkonzentrate.....	183
5 Zusammenfassung.....	188
6 Summary.....	192
7 Literaturverzeichnis.....	193
8 Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation.....	208
9 Lebenslauf.....	210

Abkürzungen

A	Aktives Zentrum
Abb.	Abbildung
ADAMTS13	A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 13
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALEXA	Fluorophor benannt nach Alex Haugland
Anti-	Antikörper gegen -
Anti-HBc	Antikörper gegen Hepatitis B core Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen Hepatitis B surface Antigen
aPTT	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit
B	Beriate [®] P
BaCl ₂	Bariumchlorid
BC	Behring Coagulation
BE	Bethesda Einheiten
CaCl ₂	Calciumchlorid
CB	Collagen Bindungsstelle
CBA	Collagen-Bindungs-Aktivität
cDNA	Copy desoxyribonucleic acid
CGLC	Konsensus-Sequenz von Disulfidisomerasen
Ch.-B.	Chargen-Bezeichnung
CK	Cystin knot
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products
CUB	Urinary epidermal growth factor and bone morphogenic protein
CV	Variationskoeffizient
Cys	Cysteinreiche-Domäne
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDAVP	1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin
DL	Detektionslimit
Dis	Disintegrine-Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid

Abkürzungen

Dnp	2,4-Dinitrophenyl
d-Pool	Denaturiertes Poolplasma
E. coli	Escherichia Coli
EHEC	Enterohämorrhagisches Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym linked immuno sorbent assay
F	(Gerinnungs-)Faktor
FFP	Fresh Frozen Plasma
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FVIII:Ag	Faktor VIII Antigen
FVIII:C	Von Willebrand-Faktor/ Faktor VIII Bindungstest
g/l	Gramm pro Liter
GP	Glykoprotein
H	Haemate [®] P
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAV	Hepatitis A Virus
HB	Hämoglobin
HbsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HELLP	Haemolysis, Elevated Liver enzyme levels, Low Platelet count
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	Meerrettichperoxidase
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
I.E.	Internationale Einheiten
IgA	Immunglobulin vom Typ A
IgG	Immunglobulin vom Typ G
Immu	Immunate STIM plus
K	Kogenate [®]
Kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
mg	Milligramm

Abkürzungen

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mg/m ²	Milligramm pro Quadratmeter
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilber
mmol	Millimol
mol	Mol
MW	Mittelwert
MP	Metalloprotease-Domäne
mRNA	messenger ribonucleic acid
N	Über Stickstoff verbundene Glycane
n	Anzahl
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
Nma	2-(N-methylamino)benzoyl
NP	Normalpool
(Konzentrat [®])P	Pasteurisiert
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PCR	Polymerase chain reaction
Pd	Plasma derived
PEI	Paul-Ehrlicher-Institut
PFA	Platelet Function Analyzer
pH	Hydrogen potential
P1	TTP Patient mit Antikörpern
P2	TTP Patient ohne nachweisbare Antikörper
POX	Peroxidase
PP	Propeptid
PPSB	Prothrombinkomple-Konzentrat (Prothrombin, Proconvertin, Stuart-Prower-Faktor, Antihämophiler Faktor B)
PS	Spezifische proteolytische Schnittstelle
Q1	Konfidenzintervall (25 %)
Q3	Konfidenzintervall (75 %)
r	Rekombinant
RFU	Relative Fluoreszenz Einheit
RGD-Sequenz	Bindungsstelle für Thrombozyten-Glykoprotein IIb / IIIa

Abkürzungen

RIPA	Ristocetin induzierte Plättchenaggregation
Risto.-Cofakt.-Akt.	Ristocetin-Cofaktor-Aktivität
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotationen pro Minute
S	Spacer-Domäne
s	Standardabweichung
s / d Plasma	Solvent / detergent Plasma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TF	Tissue Factor
TMA	thrombotische Mikroangiopathien
TMB	3,3',5,5`Tetramethylbenzidin Perbromat
TNBT	Tri(n-butyl)phosphat
TRALI	Transfusion-related acute lung injury
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSR	Thrombospondin typ (1 bis 8) repeat-Domäne
TTP	Thrombotisch thrombozytopenische Purpura
U	Units (Einheiten)
U.I.	Internationale Units (Entspricht I.E.)
ULM	Ultralange von Willebrand-Faktor Multimere
UL VWF M	Ultralange von Willebrand-Faktor Multimere
VHEC	Verotoxin-bildendes hämorrhagisches Escherichia coli
VW	von Willebrand
VWF	Von Willebrand-Faktor
VWF:Ag	Von Willebrand-Faktor Antigen
VWF:RCo	Von Willebrand-Faktor Ristocetin-Cofaktor-Aktivität
VWS	Von Willebrand Syndrom
W	Wilate®
WB	Western Blot
Wilf	Wilfactin®
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Einleitung

Die Medizin ist nicht ein Privileg der Neuzeit, sondern es gab bereits im Altertum eine hoch entwickelte Heilkunde, auf deren Kenntnisse wir uns in großen Teilen bis heute stützen. Neben Hippokrates, dem landläufig wohl bekanntesten Arzt der Antike, praktizierten und lehrten noch zahlreiche weitere bedeutenden Ärzte, die unser heutiges medizinisches Verständnis entscheidend prägen. Die meisten Gelehrten jener Zeit teilten die Überzeugung, dass grundlegende physiologische und vor allem auch anatomische Kenntnisse für jeden Arzt unumgänglich sind und daher Teil der Ausbildung sein müssen. Insbesondere die am Hof der Ptolemäerherrscher in Alexandria praktizierenden Ärzte Herophilus und Erasistratos revolutionierten die Medizin im Gebiet der Anatomie und Physiologie sowohl durch ihre Sektionen an menschlichen Leichen als auch durch Vivisektionen. Sie entdeckten unter anderem Hirn- und Rückenmarksnerven, unterschieden erstmals sensorische und motorische Nerven sowie Klein- und Großhirn. Erasistratos beschrieb zudem neben zahlreichem Anderen detailliert die Blutgefäße, erkannte die Herzklappen mit ihrer Funktion und nahm an, dass es eine anatomische Verbindung zwischen Venen und Arterien gibt.

Während die hellenistischen Vertreter die Möglichkeit zur Sektion als auch Vivisektion am menschlichen Körper hatten, mussten sich die späteren römischen Vertreter auf deren Vorarbeiten berufen oder Sektionen an Tieren durchführen. Einer der berühmtesten Forscher war Galen, der grundlegend Einfluss auf die Medizin nahm und dessen Spuren bis heute noch zu erkennen sind. Unter anderem durch seine ausgezeichneten diagnostischen Fähigkeiten und als hervorragender Sezierer erweiterte er das medizinische Wissen wie kaum ein anderer. Er vertrat insbesondere die These, dass nur mittels ausgezeichneter anatomischer Kenntnisse die Ursache einer Erkrankung erfasst und somit behandelt werden kann [1].

Wie richtig er mit dieser Einstellung liegt, erwies sich auch bei der Entdeckung der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP). Entdeckt bzw. erstmals beschrieben wurde die TTP 1924 durch Eli Moschowitz. Dieser konnte in der Sektion eines jungen Mädchens zahlreiche mikrovaskuläre Thromben in den Arteriolen nachweisen, die überwiegend aus Thrombozyten bestanden. Das Mädchen war in der Klinik mit schlagartig auftretenden petechialen Blutungen, Blässe, Fieber, Lähmungen, Haematurie und Koma eingewiesen worden und ist innerhalb kürzester Zeit an der bis dahin unbekannten Erkrankung verstorben [2]. Die klinischen Symptome der TTP wurden danach durch eine Pentade aus hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie, neurologischen Symptomen unterschiedlicher Ausprägung, renaler Dysfunktion und

Fieber festgelegt [3]. Heutzutage wird eher von einer Triade aus hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und neurologischen Symptomen gesprochen [4]. Unbehandelt führt die TTP in 90 % der Fälle innerhalb kürzester Zeit zum Tod, wodurch eine umgehende Behandlung zwingend erforderlich ist [3]. In den späten 70er Jahren wurde beobachtet, dass Patienten auf Spenderplasma besser ansprechen als auf Albuminlösungen, wodurch die Gabe von Plasma bzw. der Plasmaaustausch Eingang in die Behandlung der TTP fand [5]. 1991 konnte die Canadian Apheresis Study Group in einer großen prospektiven, randomisierten Studie die Überlegenheit der Plasmapherese gegenüber der Plasmainfusion zeigen [6]. Die Therapie ist jedoch mit vielen Nebenwirkungen behaftet, angefangen von allergischen Reaktionen wie Urticaria und Pruritus über Paraesthesien und Schüttelfrost bis hin zum, wenn auch geringen, Risiko der Virusinfektion [7, 8]. Die Plasmapherese stellt jedoch immer noch den Goldstandard in der Therapie der TTP dar. Dies ist unter anderem dem Umstand geschuldet, dass es bis zum heutigen Tag keine Alternative gibt.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Zur Plasmapherese stehen unter anderem mit Fresh Frozen Plasma und solvent/detergent behandeltem Plasma unterschiedliche Präparate zur Verfügung. Ziel dieser Behandlung ist es das fehlende oder durch Antikörper blockierte ADAMTS13 zuzuführen, Antikörper auszuwaschen und die Zahl der ultralangen von Willebrand-Faktor (UL VWF) Multimere zu verringern. Um dies gewährleisten zu können, müssen die Plasmapräparate eine hohe Menge an ADAMTS13 Antigen mit entsprechend hoher Aktivität aufweisen, selbst frei von Antikörpern sein und dürfen nur geringfügig bis gar keine ultralangen VWF Multimere enthalten. Diesbezüglich wurden zwei Plasmapräparate, Fresh Frozen Plasma (FFP) und solvent / detergent behandeltes Plasma (s / d Plasma) blutgruppenspezifisch auf die Faktoren ADAMTS13 Aktivität, Antigen, Antikörper und UL VWF Multimere untersucht. Die Kenntnis dieser Daten ist auch entscheidend um eine mögliche Alternative zu dieser Therapie zu finden. Die mit der Plasmapherese verbundenen Nebenwirkungen und deren Ausmaße sind unter anderem von dem eingesetzten Plasmapräparat abhängig. Nichtsdesto trotz ist kein Präparat nebenwirkungsfrei und die Therapie demzufolge immer eine große Belastung für den Patienten. Durchschnittlich werden bei den TTP Patienten an der Universitätsklinik in Mainz 27 Plasmapheresen, mit einem Austausch des 1,5fachen des Plasmavolumens über einen Zeitraum von ca. einem Monat durchgeführt [7]. Eine Alternative zu dieser Therapie könnte die Gabe von Präparaten mit annähernd gleicher ADAMTS13 Aktivität,

aber einem deutlich niedrigeren Volumen sein, das nur noch injiziert werden muss. Im Blickpunkt standen dabei die VWF/ Faktor VIII-haltigen Plasmakonzentrate. Sechs Faktorkonzentrate wurden auf ADAMT13 Aktivität, -Antigen, -Antikörper und UL VWF Multimere untersucht.

Die überprüften Präparate setzen sich aus drei VWF/ FVIII Konzentraten (Haemate[®]P, Immunate STIM plus und Wilate[®]), einem reinen VWF Konzentrat (Wilfactin[®]) und einem reinen Faktor VIII Konzentrat (Beriate[®]P) zusammen, die allesamt mittels Kryopräzipitation von Humanplasma gewonnen werden. Als negativer Standard wird das rekombinante Faktor VIII Konzentrat Kogenate[®] mit in die Untersuchungen aufgenommen. Durch das Herstellungsverfahren kann angenommen werden, dass außer den aufkonzentrierten Gerinnungsfaktoren auch andere Plasmabestandteile in größeren Mengen im Konzentrat enthalten sind. Zumal der VWF das Substrat von ADAMT13 darstellt und dessen Aktivierung und Verbindung zum VWF noch nicht restlos geklärt ist.

Durch die Untersuchung der Konzentrate soll die Möglichkeit ihres Einsatzes bei der TTP ermittelt werden. Die Injektion von ADAMT13 in Form eines Konzentrates in einem Volumenbereich von 2,5 ml bis 15 ml pro Dosis könnte eine enorme Erleichterung in der Therapie der TTP für den Patienten darstellen. Der TTP-Patient wäre wie ein Hämophilie- bzw. VWS-Patient in der Lage sich selbst sein Medikament zu injizieren, sei es als Prophylaxe oder in einer Notfallsituation. Zudem sind die Nebenwirkungen, sowohl in Bezug auf die Nebenwirkungen der Plasmapherese als auch auf das Plasmapräparat als solches, geringer. Neben dem möglichen Einsatz bei der TTP ist die ADAMT13 Aktivität und die Anwesenheit von UL VWF Multimeren für die Qualität des Präparates für von Willebrand Patienten entscheidend. Daher werden die Konzentrate auch im Hinblick auf ihre Qualität untereinander verglichen.

Neben der TTP werden auch weitere thrombotische Mikroangiopathien (TMA) in der Klinik nachgewiesen. Die Differenzierung der TMA gestaltet sich jedoch aufgrund der sich überschneidenden Symptomatik als schwierig. Zwar werden im Regelfall Fälle mit Beteiligung der Niere dem hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) zugeordnet und neurologischen Erscheinungen der TTP, doch kann eine genauere Zuordnung erst in Kombination mit klinischen Laborparametern getroffen werden. Patienten mit den typischen Symptomen für eine thrombotische Mikroangiopathie wurden hinsichtlich ihrer Laborparameter in der akuten Phase und in der Remission überprüft. Dabei sollten die Möglichkeiten zur Differenzierung der verschiedenen TMA und die Bedeutung von ADAMT13 für die Diagnostik untersucht werden. Des Weiteren wurden anhand der Patienten in Kombination mit den Plasmapräparaten und einer standardisierten Positivkontrolle die unterschiedlichen Bestimmungsmethoden für ADAMT13 validiert und auf ihre Eignung im klinischen Alltag getestet.

1.2 Literaturübersicht

1.2.1 Hämostaseologie

Mit der Hämostaseologie, der Lehre vom Gleichgewicht der Blutstillung, schuf der Hämatologe Rudolf Marx 1953 einen neuen Fachbereich, unter dem er sämtliche Störungen, die zu einer Blutungs- oder Thromboseneigung führen und Ungleichgewichte mit den daraus resultierenden Erkrankungen zusammenfasste. Er verwies damit auf die grundsätzliche Notwendigkeit diagnostischer als auch therapeutischer Maßnahmen [9].

Die Hämostase dient der Ausbildung stabiler Blutgerinnsel, die auf den Bereich der verletzten Gefäßwand begrenzt sind. Sie wird durch die Rekonstruktion des verletzten Gefäßes beendet. Man unterteilt die Hämostase in vier Phasen: Aktivierung, Gerinnselbildung, Regulation, Fibrinolyse und Thrombusreorganisation. Dabei greifen die verschiedensten Mechanismen ineinander [10]. So beruht die Blutstillung einerseits auf der Reaktion der Gefäßwand und der Thrombozyten andererseits aber auch auf der des plasmatischen Gerinnungssystems.

Kommt es zur Dysfunktion innerhalb eines Systems, kommt es zu Gerinnungsstörungen. Zu den angeborenen Blutgerinnungsstörungen durch Faktorenmangel gehören unter anderem Hämophilie A und B sowie das von Willebrand Syndrom [11, 12].

Blutstillung

Bei einer Verletzung der Endothelauskleidung der Gefäße lagern sich sofort Thrombozyten an das Kollagen. Die Plättchenadhäsion wird dabei durch den von Willebrand-Faktor vermittelt. Dieses großmolekulare Glykoprotein bindet sowohl an spezifische Rezeptoren auf der Plättchenmembran als auch an Kollagenfasern. Dadurch entsteht eine Art Brücke zwischen den subendothelialen Kollagen und den Thrombozyten, an der außerdem Fibronketin und Thrombospondin beteiligt sind.

Durch die Adhäsion erfolgt eine Konformationsänderung der aktivierten Thrombozyten von der scheibenförmigen in die dendritische Form. Durch die Ausbildung der Pseudopodien können sich die Thrombozyten eng zusammenlagern. Zusätzlich setzen die aktivierten Thrombozyten Botenstoffe aus ihren Granula frei. Die eigens freigesetzten Botenstoffe ADP und PAF wirken aggregationsfördernd auf die Thrombozyten, während das ausgeschüttete Serotonin und das aus Arachidonsäure entstandene Thromboxan A₂ zur Vasokonstriktion führen. Es bildet sich ein Thrombus, auf dessen Oberfläche Fibrinogen gebunden wird. Das Einrollen und Verkleben der Intima, sowie einen erhöhten

Außendruck wegen des in das Interstitium austretenden Plasmas führen zusätzlich zu einer Reparaturischämie [13].

Nach dieser ersten Blutstillung erfolgt die Blutgerinnung. Der von Willebrand-Faktor spielt hierbei als Träger des Gerinnungsfaktor VIII eine wichtige Rolle. Durch die nicht-kovalente Komplexbindung schützt er diesen vor raschem proteolytischen Abbau im Blut. Der Faktor VIII ist einer von vielen verschiedenen Gerinnungsfaktoren, die aktiviert werden. Am Ende der Blutgerinnung steht eine faserartige vernetzte Fibrinstruktur, die den Thrombus überlagert und diesen vollständig abdichtet [12, 14].

Aktivierung der Blutgerinnung

Zur selben Zeit wie die primäre Hämostase läuft die Aktivierung der sekundären Hämostase (Abb.1). Negativ geladene, calciumbindende Phospholipide werden von aktivierten, aggregierten Thrombozyten exponiert. Im Blut zirkulierende Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren werden über ihre calciumbindende G1a-Domäne gebunden. Die Gerinnungsfaktoren werden so auf der lokal begrenzten negativen Oberfläche konzentriert. Zudem wird durch den exprimierten membrangebunden Cofaktor, den sogenannten „tissue-factor“ und Faktor VII / VIIa-Rezeptor, die sekundäre Hämostase essentiell initiiert. Aus dem tissue-factor, Faktor VII / VIIa und Faktor X entsteht ein Multikomponenten-Startkomplex. Aus dem daraus resultierenden Produkt Faktor Xa entsteht zusammen mit Faktor Va und Prothrombin der initiale Prothrombinasekomplex, der geringe Thrombinmengen generiert. Diese geringe Menge an Thrombin dient einerseits der Aktivierung der Thrombozyten, die aktivierte Gerinnungsfaktoren aus ihren alpha Granula freisetzen (Faktoren XI, V) und andererseits der Umwandlung des Faktor VIII in seine aktive Form (Faktor VIIIa), der normalerweise an seinen Träger den VWF gebunden ist,. Durch den Tenase Komplex, bestehend aus Thrombozyten gebundenem Faktor IXa, Faktor VIIIa, Phospholipid und Calcium, wird Faktor X aktiviert. Faktor Xa ist essentiell zur Ausbildung des Prothrombinasekomplexes, der zu einem massiven Anstieg der Thrombinproduktion führt. Erst durch diese Aktivierung der eigentlichen Gerinnungskaskade wird genügend Thrombin gebildet, sodass es zur Fibrinbildung kommt. Die Blutgerinnung wird über die hochaffine Bindung und damit gleichzeitige Deaktivierung des Thrombins an Thrombomodulin in Anwesenheit von Protein C und S gestoppt [12, 15, 16].

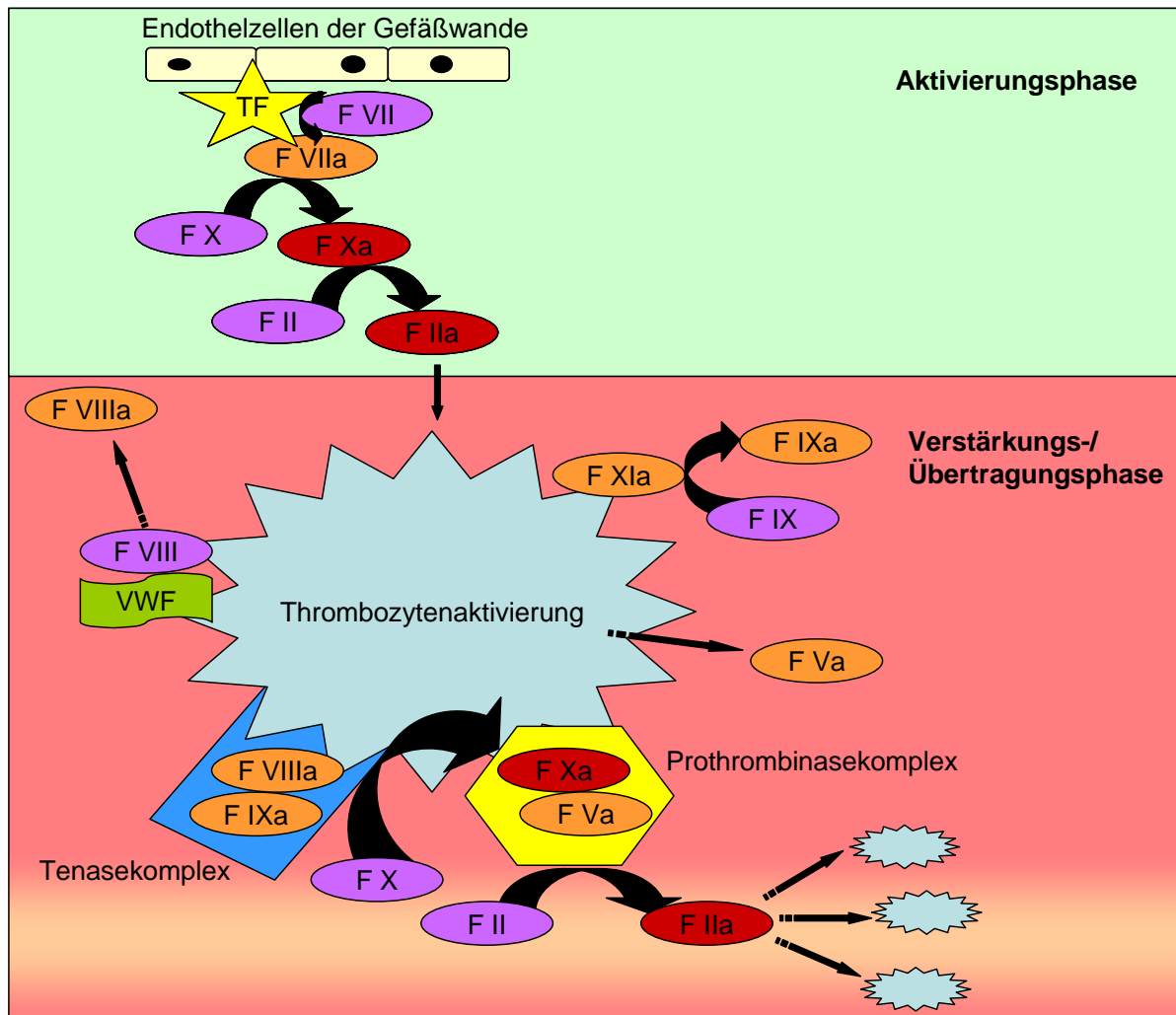


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gerinnung (nach Ahrens I. [16]). TF: Tissue Faktor, VWF: von Willebrand-Faktor, F. Faktor, a: aktiviert.

1.2.2 Bedeutung des von Willebrand-Faktor

1.2.2.1 Von Willebrand-Faktor und Thrombozytenadhäsion

Der initiale Schritt der Blutstillung ist die Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gewebsstruktur. Vermittelt wird dieser Schritt durch den Liganden von Willebrand-Faktor. Das Glykoprotein zirkuliert in unterschiedlich großen Multimereinheiten in globulärer Form im Plasma. Unter hohen Strömungsgeschwindigkeiten mit entsprechend hohen Scherkräften binden sich die VWF Multimere an Kollagen oder andere Komponenten der subendothelialen Matrix und entfalten sich dann. Solche Bedingungen herrschen vor allem bei Gefäßverengungen. Durch die Entfaltung der VWF Multimere werden die korrespondierenden Bindungsdomänen für den GP-Ib / IX-Komplex und andere

thrombozytäre Glykoproteine zugänglich. Es kommt zu Bindung zwischen der VWF Bindungsdomäne und dem GP-Ib / IX-Komplex der Thrombozyten.

Abgebaut und damit inaktiviert wird der von Willebrand-Faktor durch die Metalloprotease ADAMTS13 [12, 17-19].

1.2.2.2 Funktion des von Willebrand-Faktors

Der von Willebrand-Faktor spielt in der primären Hämostase eine entscheidende Rolle. So nimmt er die Schlüsselposition bei der Thrombozytenadhäsion als auch bei der Thrombozytenaggregation ein. Mit der A1- und der A3-Domäne kann er an subendotheliale Strukturen wie zum Beispiel Kollagen binden. Auf der anderen Seite ist er jedoch auch mit der A1-Domäne zur Wechselwirkung mit dem Glykoprotein (Gp)-Ib Rezeptor der Thrombozyten befähigt. Dadurch fungiert er als Bindeglied zwischen den Gefäßdefekten und den Thrombozyten. Im Hochdrucksystem und an Orten hohen Scherstress ist er auch Bindungspartner für die Thrombozytenaggregation, da er durch die Anwesenheit hoher Scherkräfte aktiviert wird. Das Blut kann annähernd mit einer newton'schen Flüssigkeit verglichen werden, woraus folgt, dass der Blutfluss in der Gefäßmitte am schnellsten ist und mit zunehmender Annäherung an die Gefäßwand abnimmt [18, 20]. Durch die physikalischen Gesetzmäßigkeiten der Rheologie strömt das Blut in Form einer Parabel durch die Gefäße, wodurch sich die verschiedenen Scherkräfte ausbilden. Durch den Geschwindigkeitsunterschied des Blutflusses zwischen Gefäßmitte und Gefäßrand entstehen Scherraten, die sich proportional zur Ausbildung der Scherkräfte am Gefäßrand verhalten [20]. In der Gefäßmitte besitzt das Blut die höchste Flussgeschwindigkeit ohne Scherkräfte. An der Gefäßwand hingegen drehen sich physikalischen Verhältnisse um, sodass es bei langsamen Flussgeschwindigkeiten zur Ausbildung hoher Scherkräfte kommt. Folglich bilden sich in kleinen Gefäßen und Arteriolen die größten Scherkräfte aus. Die Scherkräfte ermöglichen die Anheftung von Thrombozyten und anderen Blutzellen an der Gefäßwand. Auch der VWF reagiert auf die hohen Scherkräfte zum einen mit einer Förderung der Plättchenaggregation durch Anheftung an GP Ib - IX und GP IIb - IIIa zum anderen mit einer Konformationsänderung, die die A2-Domäne zugänglich für die Spaltung durch ADAMTS13 macht [20-22].

Die thrombozyten-vermittelnde Funktion korreliert mit der Größe der VWF Multimere.

Als zweite wichtige Aufgabe des VWF ist die Bindung des Faktor VIII zu sehen. Der Faktor VIII wird durch die Bindung an den VWF vor dem proteolytischen Abbau durch das Protein C-System oder Faktor Xa geschützt. Dabei können sowohl kleine VWF Multimere als auch die VWF Dimere Faktor VIII binden. Außerdem wird er durch den VWF an Stellen mit Endothelverletzungen transportiert, wo er ebenfalls benötigt wird.

Fehlt der VWF gänzlich wird auch der Faktor VIII rasch abgebaut. Es kommt zu ähnlichen klinischen Symptomen wie bei der Hämophilie A. Bei den anderen VWS-Typen korreliert der Faktor VIII-Spiegel mit dem des VWF und ist daher mehr oder weniger relevant [17-19].

1.2.2.3 Synthese und Struktur des von Willebrand-Faktors

Synthese

Der VWF wird von dem VWF Gen Chromosom 12p 178Kbp in den Endothelzellen und den Megakaryozyten gebildet [23]. Dabei beginnt der komplexe Syntheseweg mit der Transkription einer 8,5 Kilobasen große mRNA, welche in ein 2831 Aminosäuren großes Vorläufermolekül translatiert wird. Das entstehende primäre Translationsprodukt ist der sogenannte Prä-Pro-VWF. Im endoplasmatischen Retikulum werden unter Abspaltung des Präpeptids zwei VWF-Moleküle kovalent zu Dimere verknüpft. Die so entstandenen Pro-VWF-Moleküle werden in den Golgi-Apparat transportiert um dort zu hochmolekularen VWF Multimeren synthetisiert zu werden. Nach dem Abspalten des Propeptids wird der Großteil der hochmolekularen VWF Multimere in speziellen Speicherorganellen, den Weibel-Palade bodies gelagert. Die Weibel-Palade bodies der Endothelzellen verschmelzen durch Stimulation mit Thrombin, Serotonin und Histamin mit der Zellmembran und setzen die hochmolekularen VWF Multimere aktiv frei. Ein kleiner Anteil des VWF wird jedoch kontinuierlich sezerniert. Durch eine spezifische Protease (ADAMTS13) wird der VWF gespalten und liegt in unterschiedlich großen Multimere im Plasma vor [24-27].

Struktur

Der von Willebrand-Faktor ist aufgrund seiner modulartigen Zusammensetzung aus verschiedenen Domänen ein multifunktionelles Protein (Abb. 2). Grundsätzlich ist er aus A-/ B-/ C-/ D-Domänen aufgebaut, die nochmals unterteilt werden. Am Anfang der Sequenz befindet sich ein Signalpeptid (SP), gefolgt vom Propeptid und dem murenen VWF, der abgeschlossen wird von der Cystin knot (CK)-Domäne. Jeder Bereich erfüllt dabei unterschiedliche Aufgaben.

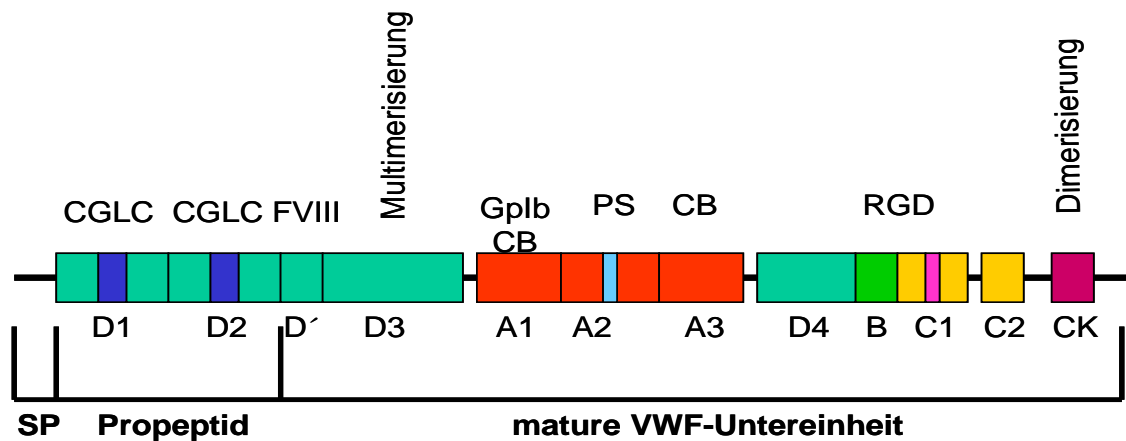


Abb. 2: Schematische Darstellung der Struktur des von Willebrand-Faktor Moleküls. SP: Signalpeptid, CGLC: Konsensus Sequenz von Disulfidisomerasen, FVIII: Bindungsstelle für Faktor VIII, Gp Ib: Bindungsstelle für Glykoprotein Ib, CB: Kollagenbindungsstelle, RGD-Sequenz: Gp IIa / IIb Bindungsstelle, CK: cystin knot-Domäne [25].

Als Träger von Faktor VIII besitzt der VWF für denselbigen eine Bindungsregion in der D'-Domäne. Zur Wechselwirkung mit den Glykoproteinen Ib und IIb / IIIa der Thrombozyten ist Domäne A1 bzw. C1 mit RGD-Sequenz vorhanden. Die Bindung mit dem Kollagen (CB) erfolgt über die Bindungsregionen in der A1- und A3-Domäne. Diese und die A2-Domäne binden ebenfalls Heparin.

Zur Ausbildung von Dimeren bzw. Multimeren sind die CK-Domäne (cystin knot) und die D1-D3-Domänen entscheidend. Mittels der am C-terminalen Ende befindlichen CK-Domäne dimerisieren, unter Ausbildung von Disulfidbrücken, zwei Pro-VWF Monomere. Die dimere Form ist die kleinste Einheit in der der VWF außerhalb des endoplasmatischen Retikulums vorliegt. Durch Polymerisierung der cysteinreichen N-terminalen Region in der D3-Domäne der Dimere kommt es zu VWF Multimeren. Das Propeptid wird nach erfolgter Multimerisierung abgespalten. Seine genaue Funktion ist zwar noch ungeklärt, aber es steht unzweifelhaft fest, dass es zur Multimerisierung erforderlich ist. Man vermutet, dass die Konsensus-Sequenz von Disulfidisomerasen in der D1- und D2-Domäne des Propeptids für die Multimerisierung an der D3-Domäne entscheidend sind.

Die unterschiedlich großen, jedoch aus gleichen Untereinheiten aufgebauten VWF Multimere können eine Molekülgröße von 500 kDa bis 20000 kDa erreichen [25, 26]. Damit stellt der VWF das größte, lösliche Protein dar [10, 18, 20, 24, 25, 27].

1.2.3 Das von Willebrand Syndrom (VWS)

Bei diesem Syndrom handelt es sich um eine angeborene plasmatische Blutgerinnungsstörung, die durch einen quantitativen oder qualitativen Defekt des von Willebrand-Faktors ausgelöst wird. In den meisten Fällen ist sie durch eine Genmutation bedingt, die autosomal dominant oder rezessiv vererbt wird und beide Geschlechter betrifft. Es gibt aber auch erworbene Formen des VWS, die jedoch sehr selten sind.

Erstmals beschrieben wurde diese Gerinnungsstörung von ihrem Namensgeber Erik Adolf von Willebrand 1926. Der finnische Internist beschrieb beispielhaft anhand einer Familie von den Åland-Inseln die „hereditäre Pseudohämophilie“, die sich gegenüber der „echten Hämophilie“ durch einen autosomalen Erbgang und verlängerte Blutungszeit bei jedoch verhältnismäßig normaler Gerinnungszeit unterschied.

Heute wird das VWS zu der häufigsten hämorrhagischen Diathese gezählt. Wobei die Prävalenz im skandinavischen Raum besonders hoch ist. Es wird geschätzt, dass die Prävalenz bei 800 / 100000 liegt. Jedoch nur 12,5 / 100000 zeigen Symptome und schwere Formen treten mit einer Häufigkeit $<0,3 / 1000000$ auf [10, 28].

1.2.3.1 Typisierung

Das von Willebrand Syndrom stellt eine sehr heterogene Blutererkrankung dar, die fast ausschließlich durch genetische Defekte hervorgerufen wird. Je nach Defekt und damit auftretendem Phänotyp wird das VWS klassifiziert. Dabei teilt man in drei Haupttypen ein, wobei der Typ 2 wiederum in vier Subtypen unterschieden wird. Die Klassifikation der Subtypen gilt jedoch noch nicht als abgeschlossen. In Tab. 1 ist daher die alte als auch die momentan gültige Einteilung zu sehen [29-31].

Typ 1: leichter quantitativer Defekt

Typ 2: qualitative Defekte

Typ 3: schwerer quantitativer Defekt (völliges Fehlen des VWF)

Das klinische Bild der von Willebrand Patienten mit Typ 1 und 2 ist sehr variabel, während das des Typs 3 im Regelfall sehr schwer ist.

Neue Klassifikation		Alte Klassifikation (nach Sadler)	Erbgang	Defekt
Typ	Subtyp			
1		I Thrombozyten normal, I Thrombozyten erniedrigt, I-1, I-2, I-3, IA	Autosomal dominant	Partieller quantitativer Defekt des VWF
2	A	IIA, IIB, I Thrombozyten unterschiedlich, IIC, IIC Miami, IID, IIE, IIF, IIG, IIH, II-I, IIA-1, IIA-2, IIA-3	Autosomal dominant oder Autosomal rezessiv	Qualitative Variante mit verminderter Interaktion des VWF mit Thrombozyten, die durch ein Fehlen großer Multimere verursacht wird
	B	IIB, I New York / Malmö	Autosomal dominant	Qualitative Variante mit erhöhter Affinität des VWF zum Glykoprotein Ib der Thrombozyten
	M	B, I Vicenza IC, ID	Autosomal dominant	Qualitative Variante mit verminderter Interaktion des VWF mit Thrombozyten, die nicht durch ein Fehlen großer Multimere verursacht wird
	N	FVIII Bindungsdefekt, Typ Normandie	Autosomal rezessiv	Qualitative Variante mit deutlich verminderter Affinität zum FVIII
3		III	Autosomal rezessiv	Kompletter quantitativer Defekt

Tab. 1: Alte und neue Einteilung des von Willebrand Syndroms mit entsprechender Zuordnung des Defektes und seinem Erbgang [32, 33].

Erworbenes VWS

Neben dem angeborenen VWS gibt es auch seltene Fälle des erworbenen VWS. Ursache können dafür Antikörper gegen den VWF, Absorption oder aber eine verstärkte Proteolyse sein, wobei auch andere noch unbekannte Mechanismen in Frage kommen. Beobachtet wurde ein erworbenes VWS bei Patienten mit soliden Tumoren (z.B. Wilms-Tumore), chronischer myeloischer Leukämie, Ehlers-Danlos-Syndrom, bei Patienten mit Herzklappenfehlern, Aortenstenosen, pulmonaler Hypertonie, Störungen der Hämodynamik und anderen Erkrankungen. Darüber hinaus konnte bei Patienten mit Diabetes mellitus, Leberzirrhosen, Hypertonie, Myokardinfarkten, fortgeschrittenen Arteriosklerosen und malignen Erkrankungen eine verstärkte Biosynthese festgestellt werden [32].

1.2.3.2 Symptomatik

Das klinische Bild des VWS ist sehr heterogen, und es gibt keinen so eindeutigen Zusammenhang zwischen den Laborparametern und der klinischen Symptomatik wie zum Beispiel bei der Hämophilie. Außerdem ist die Schwere der Symptomatik stark davon abhängig, welcher Typ vorliegt. Vor allem bei leichten Formen kann es hohe intraindividuelle Unterschiede geben. Im Vordergrund stehen vor allem Schleimhautblutungen, insbesondere Nasen- und Zahnfleischbluten, wie die nachfolgende Tabelle 2 über die Häufigkeit der Symptome zeigt [34].

Symptome	Häufigkeit in %
Epistaxis	68
Gingivablutungen	41
Hämatome	30
Menorrhagie	30
Gastrointestinale Blutungen	11
Nachblutungen nach kleineren Verletzungen	8
Postoperative Nachblutungen	8
Gelenkblutungen	4

Tab. 2: Blutungssymptome nach ihrer Häufigkeit bei von Willebrand Patienten nach Wahlberg [34].

Das erste Symptom des VWS ist oftmals die Epistaxis, die lebensbedrohliche Ausmaße annehmen kann. Aber auch Zahnfleischbluten, Tonsillenblutungen und gastrointestinale Blutungen kommen bei allen Schweregraden vor. Bei jungen Mädchen sind vor allem Menorrhagien und Metrorrhagien zu beobachten, die vor der Entwicklung von Substitutionspräparaten auch tödlich verlaufen konnten. Ebenfalls nach der Entbindung (23 %) kann es zu Blutungen kommen [35]. Wobei bei einer Vielzahl von VWS-Patientinnen während der Schwangerschaft FVIII:C und FVIII:Ag stark ansteigen bis zum Maximum am Geburtstermin, somit ist das Blutungsrisiko geringer.

Typisch für leichte Formen des von Willebrand Syndroms sind postoperative Blutungen, die zwei bis drei Tage nach der Operation auftreten. Daher sollten diese Patienten operativen Eingriffen ausschließlich in Zusammenarbeit mit einem Hämophiliezentrum unterzogen werden, da durch eine entsprechend durchgeführte Substitutionstherapie das Risiko minimiert werden kann. Gelenkblutungen wie bei Hämophilen können auftreten, aber nur bei der schweren Form des Typ 3 [10, 36].

1.2.3.3 Diagnostik

Die Diagnose des VWS wird vor allem labormedizinisch unter Berücksichtigung der klinischen Symptomatik und Familienanamnese gestellt. Wegen der großen Heterogenität des Syndroms und der Tatsache, dass der VWF ein Akute-Phase Protein ist und von vielen Faktoren beeinflusst wird, ist die Diagnostik erschwert. Zudem weist in nur 60 % der Fälle der aPTT-Wert auf das VWS hin. Da die allgemeinen Routinetests zur Diagnostik insbesondere bei leichten Formen wegen zu geringer Sensitivität nicht ausreichen, muss bei Verdacht auf VWS sofort die Spezialdiagnostik durchgeführt werden (Tab. 3).

Die Blutungszeit gibt ein Überblick über die Plättchenfunktion. So kann die Messung der Geschwindigkeit, mit der die Blutstillung eintritt eine Aussage über die primäre Hämostase machen. Bei der Bestimmung nach Ivy wird, nach Anlegen einer Blutdruckmanschette von 40 mmHg ein kleiner Schnitt von definierter Länge und Tiefe am Unterarm vorgenommen. Das Blut wird mit einem Tupfer abgenommen. Sobald am Tupfer kein Blut mehr zu erkennen ist, gilt die Blutung als gestillt. Die Zeit bis zur Blutstillung beträgt bei Gesunden 4 bis 6 Minuten. Diese Methode gilt allerdings als unpräzise, wenig sensitiv und nicht standardisierbar. Nur in den Fällen, in denen es keine andere Möglichkeit gibt, sich einen Überblick über die Plättchenfunktion zu verschaffen, ist sie unentbehrlich. Bei Verdacht auf VWS Typ 3 ist sie jedoch zu meiden, da es zu schweren Blutungen kommen kann.

Als Alternative zur Blutungszeit wird die sogenannte „in-vitro-Blutungszeit“, der so genannte Platelet Function Analyzer, gesehen. Durch den Platelet Function Analyzer (PFA-100) wird die Thrombozytenfunktion unter Einwirkung hoher Scherkräfte analysiert. So werden die Thrombozytenaggregation und Adhäsion an Kollagen im Citratplasma gemessen, wobei große VWF Multimere eine wichtige Rolle spielen. Die Messwerte sind daher sehr sensitiv auf das VWS, jedoch wenig spezifisch.

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPPT) gibt einen Hinweis auf die sekundäre Hämostase. Mit dieser Methode kann ein Gerinnungsfaktormangel aufgezeigt werden, der indirekt Auskunft über den VWF geben kann. Da jedoch erst bei weniger als 30 % der normalen VWF Konzentration der FVIII nicht mehr stabilisiert werden kann, kann dieser Wert auch bei Vorliegen eines VWS normal sein.

Die spezielle Diagnostik des VWSs umfasst die Messung der Faktoren VIII und IX, um eine Hämophilie A bzw. B auszuschließen.

Des Weiteren wird die Menge an VWF immunologisch erfasst (VWF:Ag) und Menge sowie Bindungsfähigkeit an Thrombozyten mittels der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (VWF:RCo) bestimmt. Bei der VWF:RCo Methode werden Thrombozyten zugeführt, die durch VWF in Anwesenheit von Ristocetin agglutiniert werden.

Einem ähnlichen Muster folgt die Ristocetin induzierte Plättchenaggregation (RIPA). In diesem Fall agglutiniert VWF in Anwesenheit von Ristocetin mit körpereigenen, vitalen Thrombozyten. Mit dieser Testmethode soll vor allem der Typ 2B nachgewiesen werden. Dieser Typ weist aufgrund seiner erhöhten Affinität zu Thrombozyten selbst bei niedrigen Ristocetinkonzentrationen (<0,5) eine „normale“ Aggregation auf. Andere ausgeprägte VWS Typen zeigen hingegen eine verminderte Aggregation.

Außerdem gibt es einen VWF-FVIII-Bindungstest (FVIII:C), der vor allem zur Identifizierung des Typs 2N und zur Abgrenzung der milden Hämophilie dient. Dazu wird der VWF immunologisch gebunden und nach Zugabe von markiertem FVIII photometrisch die Bindungsfähigkeit des VWF gegenüber FVIII ermittelt [37].

Test/Typ	Typ 1	Typ 2A	Typ 2B	Typ 2M	Typ 2N	Typ 3
Blutungszeit	↑ / normal	↑	↑	↑	normal	↑↑
PFA-100	↑ / normal	↑	↑	↑	normal	↑↑
aPTT	normal	normal	normal	normal	↑ / normal	↑
FVIII:C	↓ / normal	↓ / normal	↓ / normal	↓ / normal	↓↓	↓↓
VWF:Ag	↓	↓	↓ / normal	↓	normal / ↓	nicht nachweisbar
VWF:RCo	↓	↓	↓	↓	normal / ↓	nicht nachweisbar
RIPA	↓ / normal	↓	↑↑	↓ / normal	normal	nicht nachweisbar
Multimere	alle vorhanden, aber vermindert	große und / oder mittelgroße fehlen	große fehlen	alle vorhanden	alle vorhanden	nicht nachweisbar

Tab. 3: Durch Spezialtests erhaltene Laborparameter zugeordnet den entsprechenden von Willebrand Syndrom Typen [38, 39].

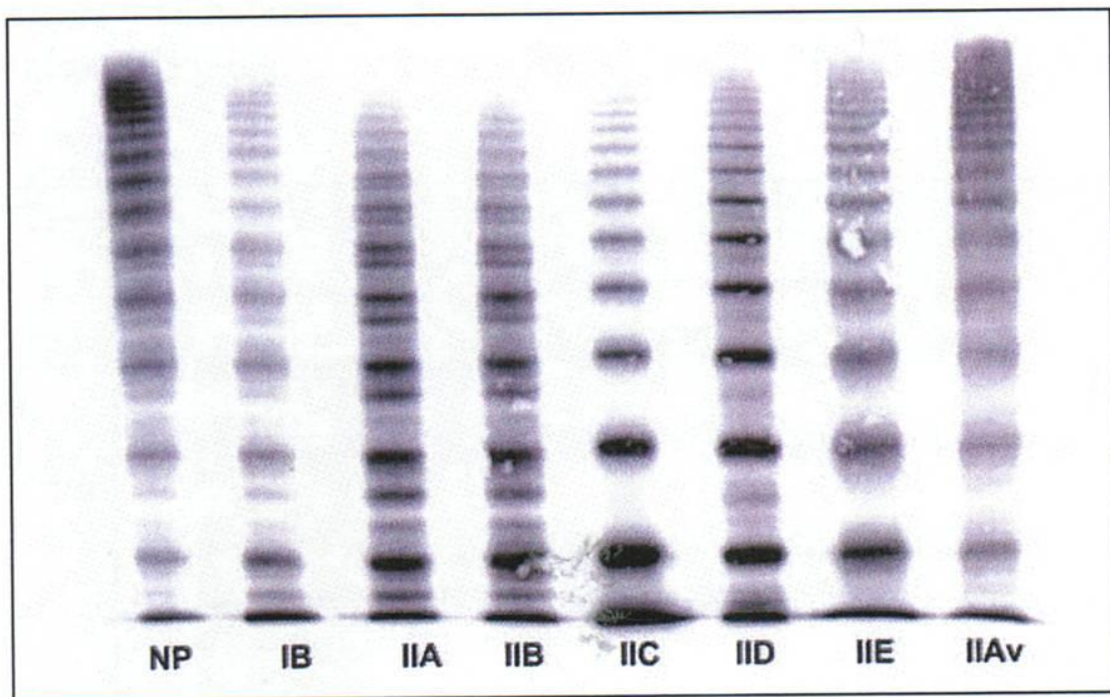


Abb. 3: Multimeranalyse der unterschiedlicher VWS Phänotypen (Schneppenheim R. (2004)).

Bis heute ist jedoch immer noch die Gelelektrophorese der Goldstandard der von Willebrand Diagnostik. Mit Hilfe der Gelelektrophorese werden die Multimermuster des VWF sichtbar gemacht. So ist anhand des Bandenmusters die Anwesenheit bzw. das Fehlen von kleinen (Bande 1-5), mittelgroßen (Bande 6-10) und großen Multimeren (Bande >10) nachweisbar. Diese Methode kann daher sowohl zur Diagnostik des VWS als auch zur Subtypenunterscheidung herangezogen werden (Abb. 3).

Als sichere Diagnosemethode zählt überdies die genetische Untersuchung [30, 31, 38, 40].

1.2.3.4 Mutationen

Um die verschiedenen Typen und Subtypen zu unterscheiden ist eine quantitative und qualitative Untersuchung des VWF nötig. Die SDS-Agarosegelelektrophorese kann die Subtypen unterscheiden. Zudem ist eine genetische Untersuchung empfehlenswert, um die Diagnose zu sichern. Mittlerweile ist es auch möglich den unterschiedlichen Phänotypen die entsprechenden genetischen Defekte zuzuordnen [10, 41].

Typ 1

Dies ist mit 70 % der häufigste Typ des VWS, aber gleichzeitig auch die leichteste Form. Durch verbesserte Visualisierungsmethoden und standardisierte Verfahren der Multimeranalyse muss diese Aussage jedoch vielleicht revidiert werden. So zeigten sich bei erneuter Überprüfung der Diagnose, dass viele vermeintliche VWS Typ 1 Patienten eigentlich dem Typ 2 zuzuordnen sind. Diese Tendenz war auch in einer europäischen Studie zur Typ 1 Diagnostik zu erkennen. Demnach wäre der Typ 2 mit 60 % am häufigsten.

Mutationen, die eindeutig dem Typ 1 zuzuschreiben sind, konnten bisher nur wenig gefunden werden. Vererbt wird dieser Typ wie die meisten anderen autosomal dominant.

Typ 2

Der VWS Typ 2 ist in erster Linie durch einen qualitativen Defekt des VWF gekennzeichnet. Meist ist auch eine Verminderung des VWF Antigens zu verzeichnen, jedoch treten auch Subtypen mit normalem bzw. sogar hohem VWF Antigen auf. Prinzipiell ist dieser Typ außerordentlich heterogen. Sowohl von seinen Mutationen, seinem klinischen Erscheinungsbild als auch seiner Vererbung.

So unterscheidet man erst einmal in strukturelle und funktionelle Defekte. Die strukturellen sind überwiegend durch abnorme VWF Multimere, die funktionellen durch Defekte einzelner Teilfunktionen gekennzeichnet.

Typ 3

Bei diesem autosomal rezessiv vererbten VWS-Typ fehlt der VWF komplett. Die Folge ist eine schwere Störung sowohl der primären als auch der sekundären Hämostase. Dadurch, dass auch der FVIII stark erniedrigt ist, zeigen sich im klinischen Bild auch ähnliche Symptome wie bei Hämophiliekranken. So treten neben den charakteristischen Schleimhautblutungen auch Gelenk- und Muskelblutungen auf.

Das Mutationsspektrum, das diesen Typ hervorruft, ist sehr breit und vielfältig. Am häufigsten treten Nonsense-Mutationen und kleine Deletionen auf. Selten vorkommende große Deletionen haben meist eine Bildung von Alloantikörpern nach Substitutionsgabe zur Folge [28]. Dies stellt ein schwerwiegendes Problem in der Behandlung dieser Patienten dar. Mittels einer molekularen Diagnostik können die entsprechenden Mutationen ermittelt werden und somit die Wahrscheinlichkeit der Antikörperbildung. Des Weiteren sind Missens-Mutationen beschrieben, die vor allem im Bereich der Dimerisierungs- und Multimerisierungsdomänen (D1-D3 und CK-Domäne) auftreten. Trotz des heterogenen Mutationsmusters, konnte eine für den Ostseeraum typische Mutation festgestellt werden. So zeigen immerhin 50 % der schwedischen, 75 % der polnischen und 10 bis 15 % der deutschen Typ 3 Patienten eine Einbasendeletion im Exon 18, während diese Mutation in anderen Ländern wie Großbritannien, Niederlande, Frankreich oder der Türkei nicht zu finden war.

1.2.3.5 Therapeutische Strategien

Das ursprünglich als Antidiuretikum vor allem bei Diabetes insipidus eingesetzte Desmopressin findet mittlerweile auch Anwendung in der Behandlung des VWS. Das synthetisch hergestellte Vasopressin-Derivat (1-Desamino-8-D-Arginin-Vasopressin, DDAVP) bewirkt eine kurzfristige Mobilisierung der körpereigenen, endothelialen VWF-Speicher. Der VWF Spiegel steigt somit auf das 3- bis 4fache an. Nachteil dieser Behandlung ist, dass nach 3- bis 5tägiger Verabreichung die körpereigenen VWF-Speicher erschöpft sind und bei Bedarf auf ein Substitutionspräparat umgestiegen werden muss. Desmopressin kann intravenös oder subkutan verabreicht werden. Die Dosierung beträgt dabei 0,2 bis 0,4 µg/kg KG. Die geringe Molmasse des Peptides ermöglicht aber auch die intranasal (Octostim[®]) Gabe, jedoch muss die Dosis dann auf 3 bis 4 µg/kg KG erhöht werden. Je nach Blutungsmanifestation ist die Desmopressingabe innerhalb von 12 Stunden zu wiederholen. Das Dosisintervall sollte immer nach klinischen Aspekten ausgewählt werden, da unerwünschte Wirkungen auftreten können. Dies sind unter anderem ein Anstieg der Herzfrequenz, Kopfschmerzen, Flush und Blutdruckabfall. Einer Hyponatriämie sollte mit entsprechender Flüssigkeitsbilanzierung unter stetiger Kontrolle

der Laborparameter entgegengewirkt werden. Vorsicht ist bei bestehenden Gefäßverschlusskrankheiten geboten. Kinder unter 3 Jahren sollten überhaupt nicht mit Desmopressin behandelt werden, da die Gefahr zerebraler Krampfanfälle besteht. Da jeder Patient unterschiedlich auf das Medikament reagiert (DDAVP-Versager) wird nach der Erstmanifestation des VWS ein DDAVP-Provokationstest vorgenommen. Dabei wird der VWF Spiegel vor und 30 min. nach der Infusion von Desmopressin (0,3 µg/kg KG über 30 min. in 50 ml isotonischer Kochsalzlösung) im Blut gemessen. Vor allem bei VWS Typ 1 ist diese Therapie gut einsetzbar. In begrenztem Maße trifft das auch auf den Typ 2A zu. Typ 3 zeigt aufgrund des völligen VWF-Mangels keine positive Wirkung auf Desmopressin. Bei Typ 2B und dem Pseudo-VWS ist die Verabreichung von Desmopressin kontraindiziert, da es dadurch zum Thrombozytenabfall kommt.

Die Patienten, die nicht für die Desmopressin-Therapie in Frage kommen, werden mit Plasmaderivate bzw. FVIII- bzw. VWF Konzentrate behandelt. Wobei ihr Einsatz nach Typ und Schweregrad erfolgt. Wegen seines hohen VWF Gehalts ist FFP zwar zur Therapie geeignet, jedoch wegen des hohen Volumens in seiner Anwendung beschränkt. Überdies ist das Risiko von Infektionen höher als bei den zum Teil doppelt- virusinaktivierten Konzentraten. Daher werden heute fast überwiegend virusinaktivierte Konzentrate eingesetzt. Dabei können intermediäre FVIII-Konzentrate, die einen genügend hohen VWF Gehalt - vor allem an hochmolekularen VWF – aufweisen, aber auch VWF Konzentrate eingesetzt werden. Hochgereinigte und rekombinante FVIII-Konzentrate sind wegen des fehlenden VWFs ungeeignet.

Bei Blutungen werden die Konzentrate mit einer Dosierung von 30 bis 50 I.E. / kg KG über 12 bis 24 Stunden verabreicht. Vor allem nach Operationen muss eine genügend lange Substitution erfolgen, um mögliche Nachblutungen zu verhindern [42-46].

1.2.4 Bedeutung der VWF-spaltenden Protease (ADAMTS13)

Die VWF-spaltende Protease wurde 2001 als 13tes Mitglied einer Familie von Metalloproteasen zugeordnet. Ihre Bezeichnung „**a** disintegrin and **m**etalloprotease with **t**hrombospondin-type 1 repeats **13**“ brachte ihr die Bezeichnung ADAMTS13 ein [47].

Die Protease wird hauptsächlich in der Leber produziert und in aktiver Form ins Plasma ausgeschüttet [48]. Wie ADAMTS13 reguliert wird, ist momentan noch ungeklärt. Wobei das Substrat VWF bei der Regulierung eine Rolle spielen könnte [49]. Zudem wird beschrieben, dass Interleukin 6, Thrombin, Plasmin und Leukozytenelastasen einen Einfluss auf die Proteolyse haben können [50]. In vitro ist eine Hemmung von ADAMTS13 durch Chelatoren (EDTA) und freies Hämoglobin beobachtet worden.

1.2.4.1 Funktion von ADAMTS13

ADAMTS13 ist, wie der VWF, aus mehreren Domänen aufgebaut (Abb. 5). Dabei erfolgt der Abbau von VWF in vivo unter Scherstress an der Peptidbindung Y1605-M1606 in der Domäne A2. Die kleinsten VWF Fragmente, die noch mit SDS-PAGE und Immunoblotting Methode detektierbar sind, haben eine Größe von 140 bis 176 kDa.

Die Wechselwirkung zwischen ADAMTS13 und seinem Substrat VWF ist sehr komplex. Das katalytische Zentrum (HEIGHSFGLD) von ADAMTS13 befindet sich in der Metalloprotease-Domäne. Der Bereich nach der Domäne ist ebenfalls für die Umsetzung des VWF von Bedeutung. Er interagiert mit dem VWF und erleichtert die Anlagerung des katalytischen Zentrums. So zeigten Untersuchungen, dass die TSR 5- bis CUB-Domänen eine hohe Affinität zur D4- bis CK-Domäne des VWF aufweisen. Der Bereich zwischen der DIS- und der Spacer-Domäne interagieren mit der A2-Domäne des VWF unterhalb der Spaltungsstelle.

Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die bei den thrombotischen Mikroangiopathien auftretenden Antikörper ebenfalls im Bereich der TSR- und CUB-Domänen binden und somit die Anlagerung des VWF verhindern können (Abb. 4).

Struktur von ADAMTS13	Aktivität (%)	Bindungs-Fähigkeit für TTP IgG
	100	+
	73	+
	41	+
	1,6	-
	0,3	-

Abb. 4: Vergleich von unterschiedlich langen ADAMTS13 Sequenzen auf ihre Fähigkeit den VWF umzusetzen und auf ihre Bindungsaffinität gegenüber IgGs [25].

In Gegenwart des VWF bewirkt Scherstress die Adhäsion von Thrombozyten an verletztes Endothel und die Aggregation der Thrombozyten. Zudem ist es erwiesen, dass Scherstress eine Konformationsänderung des VWF bewirkt, der diesen für ADAMTS13 angreifbarer macht. Diese ist jedoch nicht ADAMTS13 spezifisch, auch die Spaltung durch Leukozyten ist gesteigert. Die Aktivität zur Vermittlung der Thrombozytenaggregation wird aber gleichzeitig auch erhöht.

Der VWF bleibt direkt nach seiner Freisetzung erst einmal an der Endothelzelloberfläche und vermittelt die Anlagerung von Thrombozyten. Durch den Abbau von ADAMTS13 wird dieser Vorgang unterbunden bzw. begrenzt. Unterbleibt der Abbau des VWF durch ADAMTS13, kommt es zur vermehrten Interaktion von VWF und Thrombozyten. Es entstehen VWF-haltige, thrombozytenreiche Mikrothromben. Durch den vermehrten Thrombozytenverbrauch kommt es zu einer Thrombozytopenie und, aufgrund der mikrovaskulären Thrombi, zu einer mechanischen Zerstörung der Erythrozyten und damit zu einer hämolytischen Anämie. Diese klinischen Leitsymptome zeigen eine Mikroangiopathie an. Die TTP wird durch einen schweren ADAMTS13-Mangel gegenüber den anderen Mikroangiopathien differenziert.

ADAMTS13 ist zudem auch bei anderen Erkrankungen – hier jedoch zumeist moderat - vermindert. Bei einer Hepatopathie kann sogar eine schwere ADAMTS13 Defizienz auftreten. Daher ist zur Sicherung der Diagnose der TTP der Nachweise von UL VWF Multimeren wichtig [25, 26, 51, 52].

1.2.4.2 Synthese und Struktur von ADAMTS13

Eine cDNA von 4,6 kB stellt die Sequenz für die Protease ADAMTS13 dar. Diese besteht aus 1427 Aminosäuren und ist modulartig aufgebaut (Abb. 5). Die Protease besteht aus einem Signalpeptid (SP), einem kurzen Propeptid (PP), einer Metalloprotease-Domäne (MP), der Disintegrin-Domäne (Dis), einer „thrombospondin type 1 repeat“-Domäne (TSR1), einer cysteinreichen Domäne (Cys), einer Spacer-Domäne (S), sieben weiteren TSR1 (2 bis 8) und zwei CUB-Domänen (C1r/C1s, epidermaler Wachstumsfaktor, Knochenmorphogenetisches Protein).

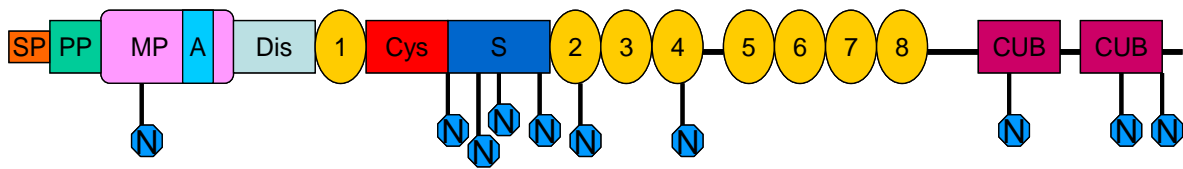


Abb.5: Schematisch Darstellung der Proteindomänen der Metalloprotease ADAMTS13, die von 29 Exons des ADAMTS13- Gens codiert wird. SP: Signalpeptid, PP: Propeptid, MP: Metalloprotease-Domäne, A: aktive Zentrum, Dis: Disintegrin-Domäne, 1 bis 8: thrombospondin Typ 1-Domänen, Cys: cysteinreiche Domäne, S: Spacer-Domäne, zwei CUB-Domänen, N: N-verbundene Glycane [25, 51].

Das aktive Zentrum (HEIGHSFGLEHD) befindet sich in der Metalloprotease Domäne und enthält als Kation Zink (und Calcium).

Das im Plasma befindliche ADAMTS13 kommt überwiegend aus den Sternzellen der Leber [48]. Aber auch andere Zellen exprimieren ADAMTS13, wenn auch in geringeren Mengen. So zum Beispiel renale Podocyten, tubuläre Zellen, vaskuläre Endothelzellen und Thrombozyten [53-55]. Die Konzentration von ADAMTS13 im Blut beträgt 1 µg/ml bzw. 5 nmol/l und ADAMTS13 hat eine Halbwertszeit von ein bis zwei Tagen [56]. Die Ausschüttung von ADAMTS13 wird wahrscheinlich durch inflammatorischen Cytokinen ausgelöst.

Die mature ADAMTS13 Einheit besteht aus 1353 Aminosäuren, hat jedoch statt dem zu erwartenden Molekulargewicht von 145 kD ein Molekulargewicht von 190 kD. Dies spricht für eine hohe Glykosylierung.

Das Disaccharid Glucose β1,3-fucose ist überwiegend an den TSR-Domänen des humanen ADAMTS13, die zehn N-verknüpften Glycane sind hingegen an der Metalloprotease-Domäne oder im Bereich der Spacer- und der CUB-Domäne gebunden. Sowohl die N- als auch die O-Glycosylierung sind entscheidend für die korrekte Faltung und die Ausschüttung von ADAMTS13. Die Umwandlung der Oligomannose N-Glycane im Golgi-Apparat in eine komplexere Form verdoppelt die Aktivität von ADAMTS13, die Verringerung von N-verknüpften Glycanen hat hingegen keinen Einfluss auf die Aktivität. Sie sind höchstwahrscheinlich nur für die korrekte Faltung der Protease entscheidend und nicht an der Interaktion von ADAMTS13 mit VWF beteiligt. Im Gegensatz dazu erhöhen die N-Glycane des VWF die Empfindlichkeit gegenüber dem enzymatischen Abbau durch ADAMTS13 [24-26, 51, 52].

1.2.5 Die thrombotischen Mikroangiopathien

Die thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die charakterisiert ist durch eine mikroangiopathische hämolytische Anämie und eine Thrombozytopenie als Folge von Thrombozytenaggregation. Des Weiteren können als Folge der Mikrothromben Ischämien oder Nekrosen unterschiedlichster Ausprägung in den verschiedenen Geweben bzw. Organen auftreten, die sich durch einen Laktatdehydrogenaseanstieg zeigen. Durch die okkludierte Mikrozirkulation kommt es außerdem zur mechanischen Schädigung der Erythrozyten, ersichtlich durch Fragmentozyten im Blutaussstrich. Klinisch können zudem Fieber, neurologische Symptome und / oder eine verschlechterte Nierenfunktion beobachtet werden.

Durch die Überschneidung der Symptomatik ist die Differenzierung der TMA schwierig. Anhand der Klinik wird eine Niereninsuffizienz meist einer HUS und neurologische Zeichen eher einer TTP zugeschrieben, eine eindeutige Aussage ist jedoch nur in Verbindung mit labordiagnostischen Parametern möglich. Darüber hinaus kann eine TMA auch mit anderen Erkrankungen oder Medikamenten verbunden sein. Die verschiedenen TMA und ihre Einteilung, erstellt nach Coppo et al. [57] auf Molekularbasis, ist in der folgenden Tabelle 4 dargestellt. Als wichtiges Einteilungskriterium wird die ADAMTS13 Aktivität gesehen [25, 26, 51, 52].

Schwerer ADAMTS13 Mangel**1. Primäre TTP**

Hereditäre TTP

Idiopathisch TTP

2. Sekundäre TTP

HIV,

Krebs,

Schwangerschaft / Wochenbett

Normale / Subnormale ADAMTS13 Aktivität**1. HUS**

HUS mit Enterobakterium

Atypische HUS mit Komplementdysfunktion

Atypische HUS mit *S. pneumoniae*

Atypische HUS mit Vitamin B12 Metabolismusstörungen

2. TTP-Like Syndrom**3. andere TMA Syndrome**

HIV

Bindegewebserkrankung

Assoziiert mit Krebs

Medikamenteninduziert Dosisabhängig: Cyclosporin, Chemotherapie

Hypersensitiv: Quinine, Ticlopidine, Clopidogrel

„idiopathisch“

4. HELLP Syndrom**5. bösartige arterielle Hypertonie, Antiphospholipid Syndrom, HIT, venöse Verschlusskrankheit, Verbrauchskoagulopathie**

Tab. 4: molekularbasierte Einteilung der thrombotischen Mikroangiopathien (nach Coppo et al. [57]).

1.2.5.1 Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP)

Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) stellt eine besonders schwere Form der thrombotischen Mikroangiopathien, charakterisiert durch multiples Organversagen, dar und endet unbehandelt in 90 % der Fälle tödlich. Die TTP wird mit einer Inzidenz von 3 bis 10 / mio als seltene Erkrankung eingestuft, ist aber nach heutigen Erkenntnissen nur viel zu selten diagnostiziert.

1.2.5.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

Die TTP wurde erstmals im Jahre 1924 durch den Arzt Eli Moschcowitz anhand einer 16jährigen Patientin beschrieben [2]. Diese verstarb binnen zwei Wochen nach dem abrupten Auftreten von petechialen Blutungen, Blässe, Fieber, Lähmungen, Haematurie und Koma. In der Autopsie zeigten sich zahlreiche mikrovaskuläre Thromben, die verstreut in den Kapillaren und Arteriolen vorzufinden waren und überwiegend aus Thrombozyten bestanden. Moschcowitz ging davon aus, dass ein stark agglutinierendes und hämolytisches „Gift“ Auslöser dieser Erkrankung ist. Nach ihrem Entdecker nannte man die Erkrankung vorerst Morbus Moschcowitz, heute umbenannt in thrombotisch thrombozytopenische Purpura. Amorosi und Ultmann [3] befragten 1966 TTP Patienten und etablierten fünf klinische / labordiagnostische Merkmale: mikroangiopathische hämolytische Anämie mit Fragmentozyten, Thrombozytopenie, neurologische Symptome, renale Dysfunktion und Fieber.

Moake et al. [58] beobachteten 1982 erstmals im Plasma von vier Patienten mit chronisch-rezidivierenden TTP während der Remission supranormale VWF Multimere, die denen direkt nach der Ausschüttung aus den Weibel-Palade-Bodies sehr ähnelten. Er hielt das Fehlen einer VWF-Depolymerase als ursächlich für das andauernde Auftreten von ultralarge VWF Multimeren.

1996 entdeckten Furlan et al. [21] und Tsai [59] gleichzeitig die VWF-spaltende Protease. Die identifizierte Protease spaltet den VWF an der Tyr842-Met843 Peptidbindung der maturen VWF-Untereinheit. Damit waren die in vivo gefundene VWF-Fragmente erklärbar. 1997 veröffentlichte Furlan et al., dass bei chronisch-rezidivierenden TTP Patienten ein Mangel dieser Protease vorliegt.

1998 konnte bei der Untersuchung eines Patienten mit sehr niedriger ADAMTS13 Aktivität ein IgG Antikörper gegen ADAMTS13 identifiziert werden, der zur Proteasedefizienz führt [60]. In zwei retrospektiven Studien mit großen Kohorten von TTP- und HUS-Patienten konnten bei den meisten Patienten mit akuter sporadischer TTP Autoantikörper gegen die VWF-spaltenden Protease nachgewiesen werden. In sechs Familien konnte das völlige Fehlen der Protease ohne das Vorkommen von Autoantikörpern aufgezeigt werden und 23 HUS Patienten hatten eine normale ADAMTS13 Aktivität [61].

Die VWF-spaltenden Protease wurde 2001 nach der Reinigung und Charakterisierung ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz als 13tes Mitglied einer Familie von Metalloproteasen zugeordnet. Ihre Bezeichnung als ADAMTS13 stammt von „a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-type 1 repeats 13“ [47]. Der Genort von ADAMTS13 ist auf Chromosom 9q34 lokalisiert worden [62] und die Expression von rekombinantem ADAMTS13 ist mittlerweile möglich [63].

1.2.5.1.2 Pathophysiologie

Nach der Erstbeschreibung durch Moschcowitz wurde nach der Ursache der TTP geforscht. In der Autopsie wurden zuerst die charakteristischen hyalinen Thromben gefunden und histologisch zeigte sich, dass diese von variabler Fibroblasten Infiltration und Endothelüberlagerung begleitet werden. Die Mikrothromben kommen in den Arteriolen und Kapillaren verschiedenster Organe, insbesondere im Hirn, Herz, Niere, Pankreas, Milz und Nebenniere vor und sind reich an Thrombozyten und VWF [25, 64]. Zum Verständnis der TTP muss man jedoch das Zusammenspiel zwischen VWF und Thrombozyten verstehen.

Der VWF wird in Form ultralanger Multimere aus dem Gefäßendothel ins Blut abgegeben und dort durch die Protease ADAMTS13 gespalten. Neben seiner Funktion als Träger des Faktor VIII, fungiert er als Ligand. Als solcher vermittelt er rezeptorabhängig die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten am verletzten Endothel und leitet somit die primäre Hämostase ein (Abb. 6).

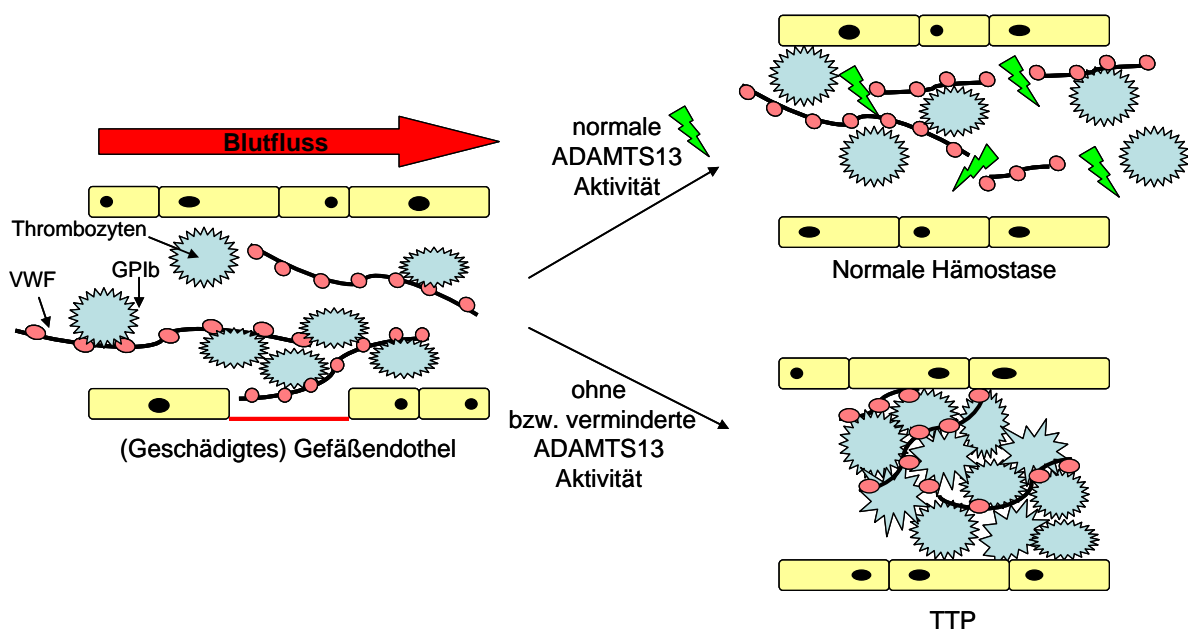


Abb. 6: Pathogenese der primären TTP begründet durch einen genetisch oder Antikörper bedingten Mangel an ADAMTS13 (nach Sadler [65]).

Bei der TTP kommt es aufgrund des ADAMTS13 Mangels an Orten mit hohem Scherstress in Anwesenheit von ultralange VWF Multimere zu einer netzartigen

Verlegung der Endstrombahn. Es bilden sich hyaline Thromben aus Thrombozyten und den genannten ultralangen VWF Multimeren (Abb. 6). Überdies kommt es in den betroffenen Bereichen zu Endothelschädigung, hämolytischer Anämie durch mechanische Zerstörung von Erythrozyten und zu einer Ischämie.

Diese pathophysiologischen Vorgänge führen zu denen in der Klinik beobachteten Symptomen der TTP [25, 26, 66].

1.2.5.1.3 Typisierung

Die TTP wird in zwei Hauptformen eingeteilt – die primäre und die sekundäre Form (Tab. 5). Die primäre Form der TTP wird nochmals unterteilt in hereditär und idiopathisch [66]. Diese Einteilung ist jedoch aufgrund stetig neuer Erkenntnisse nicht als endgültig zu betrachten.

Primäre TTP	Sekundäre TTP
Hereditär Upsaw –Shulman-Syndrom	Kollagenosen, Vaskulitiden
	Medikamentös induziert
	Schwangerschaft / Wochenbett
Idiopathisch	HIV
	Paraneoplastisch
	Transplantationsassoziiert

Tab. 5: Übersicht über die Einteilung der TTP (nach Hellmann, Hallek und Scharrer [66]).

Hereditäre TTP

Die hereditäre TTP ist auch unter der Bezeichnung Upshaw-Shulman-Syndrom bekannt und durch einen angeborenen Mangel bzw. das völlige Fehlen von ADAMTS13 gekennzeichnet. Hervorgerufen wird sie durch eine Mutation innerhalb des ADAMTS13 Gens. Viele dieser Genmutationen sind mittlerweile identifiziert und können der TTP zugeordnet werden. Dabei kommen sowohl doppelt als auch einfach heterozygote und in seltenen Fällen auch homozygote Träger der Mutation vor. Die einfach heterozygoten Träger bilden jedoch nicht das Bild der TTP aus. Die Mutationen sind ohne erkennbare Prädispositionsstelle über das gesamte ADAMTS13-Gen verstreut. Ein Zusammenhang zwischen Mutation und klinischer Symptomatik und Phänotyp kann nicht gemacht werden. Die Mutation wird autosomal-rezessiv vererbt und in den ersten zwei Lebensjahrzehnten diagnostiziert. Die Hälfte der Patienten hat ihren ersten Erkrankungsschub zwischen

Neonatalperiode und etwa dem fünften Lebensjahr, die andere Hälfte im jungen Erwachsenenalter. Danach verläuft die Erkrankung meist chronisch-rezidivierend. Es gibt aber auch Fälle, in denen eine ADAMTS13-Defizienz nicht zur Ausbildung der TTP Symptome bis ins Erwachsenenalter führte.

Autoantikörper sind bei dieser TTP Form nicht nachweisbar, sodass die Gabe von rekombinantem ADAMTS13 möglich ist. Eine 5 bis 10 % ADAMTS13 Aktivität reicht normalerweise aus um eine klinisch manifeste Erkrankung zu verhindern. Was letztendlich den akuten TTP Schub auslöst, ist bisher nur ungenügend aufgeklärt. Bekannt ist, dass eine Schwangerschaft Auslöser sein kann [29, 57, 66-68].

Idiopathische TTP

Die idiopathisch TTP ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Autoantikörper aus der Klasse der IgGs. Mittels Epitop-Mapping konnte festgestellt werden, dass die Antikörper in erster Linie an die cysteinreiche Region / Spacer-Domäne, aber auch an andere Domänen von ADAMTS13 mit unterschiedlicher Ausprägung binden (Abb. 4). Die IgGs verursachen somit den Funktionsverlust des Enzyms, da diese Region auch Bindungsstelle für die A2-Domäne des VWF darstellt. Der Nachweis von Autoantikörpern erfolgt über einen ELISA.

Trotz andauernder klinischer Remission können ein persistierender oder rekurrenter schwerer ADAMTS13 Mangel und Autoantikörper vorliegen. Daher werden weitere Auslöser für die Entstehung eines akuten TTP-Schubs vermutet [57, 66].

Sekundäre TTP

Die sekundäre TTP weist eine normale bzw. nur leicht erniedrigte ADAMTS13 Aktivität auf. Sie stellt auch eine autoimmunologische Erkrankung mit der Bildung von Autoantikörpern gegen ADAMTS13 dar. Im Gegensatz zur idiopathischen primären Form ist der auslösende Faktor zur IgG-Antikörperbildung jedoch bekannt. Eine Reihe von Erkrankungen oder Medikamenten werden als Ursache für die sekundäre TTP aufgeführt. Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel und Chinin), Chemotherapeutika (Mitomycin C, Pentostatin, Gemcitabin) und Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A und Tacrolimus) sind im Zusammenhang mit der Induzierung von TTP beschrieben. Die Ausbildung einer sekundären TTP ist auch mit Kollagenosen und Vaskulitiden möglich.

Schwangerschaft und Wochenbett stellen einen kritischen Zeitraum für die Manifestation einer TTP dar. Allein 7 % aller TTP Fälle wurden während der Schwangerschaft diagnostiziert und überdies ist es als auslösender Faktor bei hereditärer TTP bekannt. Des Weiteren sind HI Viren, maligne Erkrankungen und hämatopoetische Stammzelltransplantation in Verbindung mit TTP beschrieben [66].

1.2.5.1.4 Symptomatik

Die Thrombozytopenie mit variierender Schwere und eine Coombs-negative hämolytische Anämie sind die wegweisenden Parameter für die TTP. Zudem sind ein stark erhöhter Lactatdehydrogenase- (LDH) und indirekter Bilirubinspiegel sowie ein erniedrigter Haptoglobinspiegel zu verzeichnen. Aufgrund der Endothelschädigungen und der Bildung von Mikrothromben kommt es zur mechanischen Zerstörung von Erythrozyten, die sich in Form einer erhöhten Anzahl von Fragmentozyten im Blutaussstrich zeigen.

In der Klinik äußert sich die TTP durch typische petechiale Blutungen, ischämiebedingte neurologische Ausfälle oder Defizite, Kopfschmerzen sowie Halluzinationen, sensomotorische Ausfälle, Desorientierung und kardiale Beschwerden. Von Organversagen sind vor allem Hirn und Herz betroffen. Häufig kommt zu den genannten Symptomen noch Fieber dazu, verursacht durch eine Zytokinfreisetzung aufgrund der Endothelschädigung und Mikrothrombosierung der kleinen Gefäße [66].

1.2.5.1.5 Diagnostik

Die Diagnose der TTP wird nur durch die Messung der ADAMTS13 Aktivität gesichert. Die Unterscheidung zwischen einer hereditären oder durch Autoantikörper bedingten TTP erfolgt über den Nachweis der Antikörper gegen ADAMTS13 mittels ELISA. Außerdem ist eine SDS-Gelelektrophorese zur Prüfung auf UL VWF Multimere notwendig. Da diese Laborparameter nicht zur Routinediagnostik gehören und auch nur in speziellen Laboratorien durchgeführt werden, wird die Diagnose häufig über eine Kombination aus klinischem Erscheinungsbild und Routinelaborparametern gestellt (Tab. 6).

Mittels Haptoglobin, LDH, Bilirubin und freiem Hämoglobin kann eine Hämolyse, wie sie bei der TTP auftritt, nachgewiesen werden. Die Fragmentozyten im Blutaussstrich weisen auf Mikrothromben hin. Außerdem sind Petechien an Haut und Schleimhäuten zu erkennen und ein niedriger Thrombozytenwert labordiagnostisch nachweisbar.

Die klinischen Symptome sind nicht immer eindeutig und können zudem stark variieren. Sie können von unspezifischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen über starke abdominelle Schmerzen, Fieber und Nierenfunktionsstörungen bis hin zu mittelschweren bis schweren neurologischen Symptomen reichen. Die neurologischen Symptome sind in ihrem Erscheinungsbild ebenfalls sehr unterschiedlich und können Formen von Agitiertheit, fokale Ausfallerscheinungen bis hin zu komatösen Bewusstseinsstörungen und epileptischen Anfällen annehmen.

Bei einer idiopathischen TTP wird im Akutfall jedoch vor der Diagnosesicherung sofort die Therapie eingeleitet. Vor Beginn der Therapie erfolgt eine Blutentnahme, um im

Nachhinein die Diagnose endgültig zu sichern. Nur bei hereditären TTP Patienten, die klinisch stabil sind, kann das Ergebnis abgewartet werden, da hier eine Plasmasubstitution ausreicht [6, 39, 65, 67, 69].

Laborparameter	Symptome
Anämie	Petechiale Blutungen
Fragmentozyten >15 pro Mill.	Vigilanzstörungen
Freies Hämoglobin erhöht	Fokale neurologische Defizite
Haptoglobin erniedrigt	Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö
LDH erhöht	Kopfschmerzen
Indirektes Bilirubin erhöht	Vigilanz
Thrombozytopenie	Abdominelle Schmerzen
Proteinurie / Hämaturie	Fieber
Kreatinin erhöht	

Tab. 6: Labordiagnostische Befunde und klinische Symptome bei der TTP (nach Hellmann et al. [66]).

1.2.5.1.6 Therapeutische Strategien

Es gibt zwar Leitlinien zur Therapie, jedoch nur wenige prospektive, kontrollierte Studien, sodass die Therapieschemata meist auf Beobachtungsstudien beruhen. Heutzutage wird als Standardtherapie ein sofortiger Plasmaaustausch mittels Plasmapherese und FFP vorgenommen. Bis zur Anwendung der Plasmatherapie verlief die akute TTP jedoch in den meist Fällen tödlich. Das Verfahren der Plasmapherese ist der früher ebenfalls durchgeführten Plasmainfusion überlegen. In einer prospektiven, randomisierten Studie mit TTP Patienten, durchgeführt 1991 von der Canadian Apheresis Study Group [6], wurden der Plasmaaustausch und die Plasmainfusion gegenübergestellt. Dabei konnte eine höhere Überlebensrate in dem Patientenkollektiv mit Plasmaaustausch beobachtet werden (78 % gegenüber 63 %). Dieses Ergebnis wurde durch eine weitere Studie von Henon et al. [70] bestätigt. Wenn eine Plasmapherese jedoch nicht sofort durchgeführt werden kann, wird mit der Transfusion von 15 bis 30 ml/kg KG Plasma pro Tag begonnen. Aufgrund der hohen Mortalität bei der raschen Verschlechterung gilt die akute TTP bis heute als hämatologischer Notfall und bedarf einer sofortigen Therapie.

Ein Plasmaaustausch von 1 bis 1,5 Volumenbereichen pro Tag bis zwei Tage nach Normalisierung der Werte (LDH und Thrombozytenzahl) ist indiziert [69]. Dabei wird eine

hohe Dosis ADAMTS13 zugeführt bei gleichzeitiger Entfernung von UL VWF Multimeren und eventuell vorhandener Antikörper.

Bei ungenügendem Ansprechen auf die Plasmapherese (10 bis 20 % der Patienten) sollte diese auf 2x pro Tag erweitert und durch eine zusätzlich immunsuppressive Therapie ergänzt werden.

Die Wirksamkeit für Kortikosteroide, Vincristin, Cyclosporin A, Cyclophosphamid ist nicht belegt, dafür aber für Rituximab. Rituximab ist ein chimärer monoklonaler CD20-Antikörper, der selektiv gegen B-Zellen gerichtet ist und bei anderen Autoimmunerkrankungen gute Ergebnisse geliefert hat. Er wird bei refraktärer oder rezidivierender TTP mit nachweisbaren Antikörpern gegeben. Vorteile dieser Therapie sind ein gutes Sicherheitsprofil, ein geringer Plasmabedarf und die Vermeidung einer Immunsuppression. Eine wöchentliche Gabe von 375 mg/m² Rituximab über einen Zeitraum von 4 Wochen zeigt gute Ergebnisse. In Einzelfällen konnte sogar ein Ansprechen von therapierefraktären Patienten gezeigt werden. In jüngster Zeit wird darüber diskutiert, ob die häufigere Verabreichung von Rituximab effektiver ist und ob nicht auch die alleinige Applikation ohne Plasmapherese ausreicht. Um darüber eine Aussage zu treffen, sollten die momentan laufenden klinischen Studien abgewartet werden.

Erythrozytenkonzentrate sind nur bei schwerer Anämie indiziert und bei neurologischen Komplikationen wird eine Krampfprophylaxe eingesetzt. Sehr schwere Verläufe werden über drei Tage mit 1 mg Vincristin behandelt.

Früher wurde oftmals eine Splenektomie durchgeführt, die auch bei einigen Fällen zur Remission führte [71]. Dies wird jedoch heutzutage kritisch gesehen und sollte als Therapieoption refraktären oder rezidivierenden Patienten vorbehalten bleiben [39, 66, 67, 69, 72].

Ziel der TTP Therapie ist es die ULVWFM und die Antikörper zu beseitigen und ausreichende Mengen an ADAMTS13 zuzuführen.

1.2.5.1.7 Prognose

Mit der Einführung der Plasmapherese bei TTP Patienten konnte die Mortalität von 90 % auf heute 10 bis 20 % gesenkt werden [6].

Die Rückfallrate nach Plasmapherese beträgt 20 % bis 40 %, anderer Quellen [52] zufolge treten sogar bis zu >60 % Rezidive innerhalb eines Jahres nach dem ersten TTP Schub auf. Aber auch noch Jahre später ist ein Rückfall möglich. 20 % der Patienten sind therapierefraktär. Beobachtungen zeigen, dass Patienten mit einer ADAMTS13 Aktivität <10 %, häufiger Rezidive erleiden dafür aber eine schnellere Therapieansprechrates auf

Plasmapherese und eine geringere Mortalität aufweisen. Die erhöhte Mortalität der Patienten mit mittelschwerem ADAMTS13 Defizit gegenüber denen mit schwerem ADAMTS13 Mangel kann auch in einer erhöhten Anzahl an TTP Erkrankungen durch sekundäre Ursachen begründet sein. Ein hoher Antikörpertiter erhöht das Rezidivrisiko und Patienten mit einer Kombination aus einem Antikörpertiter >2 BE und einer ADAMTS13 Aktivität <10 % haben eine verkürzte Überlebenszeit. Die ADAMTS13 Aktivität und der Antikörpertiter haben also durchaus eine prognostische Relevanz [66, 67, 73, 74].

1.2.5.2 TTP-Like Syndrom

Das TTP-Like Syndrom wird häufig mit der sekundären TTP verwechselt. Es unterscheidet sich jedoch deutlich von dieser durch einen subnormalen bis normalen ADAMTS13-Spiegel und den fehlenden Nachweis von Antikörpern gegen ADAMTS13. Von der Symptomatik gleicht es der TTP und wird auch mittels Plasmapherese behandelt. Der auslösende Faktor ist noch nicht bekannt. Man vermutet allerdings einen Defekt innerhalb der Thrombozyten-VWF Kette. Im Gegensatz zur TTP ist hier nicht ADAMTS13 sondern wahrscheinlich ein anderes Enzym betroffen.

1.2.6 Gerinnungsfaktorkonzentrate

Seit 1970 sind für die Therapie und Prophylaxe des VWS (Gerinnungs-)faktorkonzentrate verfügbar. Seitdem werden immer mehr Faktorkonzentrate entwickelt und der Reinheitsgrad und die damit verbundene Faktorkonzentration sowie die Sicherheit stetig verbessert. Auf dem Markt befinden sich momentan humane Faktorkonzentrate (plasma derived, pd) als auch die gentechnisch erzeugten (rekombinant, r) FVIII- und FIX-Konzentrate.

Die Qualität der Faktorkonzentrate wird bestimmt durch das Ausgangsmaterial, dem Isolierungs- bzw. Herstellungsverfahren, der Gerinnungsaktivität, dem Reinheitsgrad des Konzentrates, dem Virusinaktivierungsverfahrens, der Immunogenität und der Art der Stabilisatoren [75].

Die aus humanem Plasma gewonnenen Gerinnungskonzentrate enthalten, abhängig vom jeweiligen Produkt, weitere Proteine unterschiedlicher Konzentration.

So sind vor allem das als Stabilisator zugefügte Albumin bzw. in neueren Produkten Zuckermoleküle vorhanden. Daneben können aber auch geringe Mengen an Fibrinogen,

Fibronektin, IgG- und IgA- Immunglobuline auftreten und in manchen Präparaten sind auch Antithrombin und Heparin nachweisbar [75].

Nach dem Ziel, welches mit der gewünschten Behandlung verfolgt wird, entscheidet sich die Indikation und die Dosierung des Gerinnungskonzentrats. Ziel kann zum Beispiel die Behandlung, aber auch die Verhütung einer Blutung sein. Des Weiteren spielen Faktoren wie das Lebensalter, der Schweregrad, Antikörperbildung, Häufigkeit und Ort der Blutung und vieles mehr eine Rolle [75].

Doch auch der ökonomische Aspekt bei stark ansteigenden Behandlungskosten muss berücksichtigt werden. So wird immer öfter die Effektivität den Kosten gegenüber gestellt. Vor allem bei den Gerinnungsstörungen wird auf den Verbrauch der Faktorkonzentrate geachtet, da sie im Vergleich zu anderen Krankheiten fast 93 % der Gesamtkosten ausmachen [10, 76, 77].

Der Einsatz von Gerinnungskonzentraten zur Substitution bedarf daher nicht nur differenzierte Kenntnisse über Herstellung, Pharmakologie und der Indikation des Präparates, sondern erfordert auch eine Therapie nach Maß [78].

Die Substitution von Faktorkonzentraten wird zur Behandlung oder Verhütung von Blutungen oder thromboembolischen Ereignissen bei Patienten mit hereditärem oder erworbenem Mangel an Gerinnungsfaktoren oder Inhibitoren eingesetzt.

Neben den humanen und den rekombinanten Faktorkonzentraten steht auch Frischplasma (Fresh Frozen Plasma, FFP) zur Substitution zur Verfügung. Es kommt vor allem dann zum Einsatz, wenn noch kein geeignetes Faktorkonzentrat existiert oder ein kombinierter Mangelzustand vorliegt. So genanntes PPSB-Konzentrat enthält die Faktoren des Prothrombinkomplexes (II, VII, IX und X als auch Protein C, S, und Z) und wird vorwiegend bei Patienten mit Antikörpern gegen FVIII gegeben [10, 75, 79].

Indiziert ist eine Substitution nach den Leitlinien der Bundesärztekammer [75] bei spontanen oder traumatischen Blutungen jeglicher Lokalisation, sofern sie ein minimales Ausmaß überschreiten. Zur Blutungsvorbeugung vor allem bei Kindern und Jugendlichen mit schwerer Hämophilie kann eine Dauerbehandlung in ärztlich überwachter Heimselbstbehandlung erfolgen. Diese hat zum Ziel hämophile Arthropathien weitestgehend zu verhindern. Auch bei operativen Eingriffen und bei körperlicher und psychischer Belastung erfolgt eine blutungsvorbeugende Behandlung [77].

Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren eines Gerinnungspräparates wird in Internationalen Einheiten (I.E.) angegeben. Definitionsgemäß ist eine Einheit eines Gerinnungsfaktors diejenige Aktivität, die in 1 ml Frischplasma, gepoolt aus mehreren gesunden Probanden, enthalten ist. Damit entspricht eine Einheit der Messgröße 100 % [75]. Die Angabe gilt dabei sowohl für Produkte die aus humanem Plasma gewonnen wurden als auch für rekombinant erzeugte. Nach der intravenösen Substitution von einer I.E. / kg KG kommt

es zum Anstieg des entsprechenden Faktors im Plasma um 1,5 % bis 2 %. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei schwerer Hämophilie der Anstieg nach der Erstinfusion auch nur um 1 % sein kann, da erst ein mal das Equilibrium zwischen Blut und extravasal Raum hergestellt werden muss [75].

Gerinnungspräparate werden hauptsächlich per Bolus oder als Kurzinfusion verabreicht. Um einen gleichmäßigen Plasmaspiegel zu erreichen, kann in klinischen Situationen auch eine kontinuierliche Infusion gegeben werden. Somit kann eine Reduktion der Gesamtdosis bei gleicher Wirksamkeit erzielt werden. Als Initialdosis werden 3 bis 4 I.E. / kg KG infundiert und die Erhaltungsdosis je nach gewünschtem Plasmaspiegel mit 1,5 bis 3 I.E. / kg KG angepasst. Problematisch bei kontinuierlichen Infusionen ist jedoch die Bildung von Antikörpern [10].

Prinzipiell sind die oben aufgeführten Werte Empfehlungen, die jedoch immer individuell an die Situation und den Patienten angepasst werden müsse. Einzeldosis, zeitlicher Abstand und die Dauer der Therapie hängen von vielen Parametern ab. So benötigen Kinder im Normalfall höhere Dosen pro kg KG. Das Ausmaß der Wundfläche und die Kompressionsmöglichkeit sowie der Fortschritt des Wundheilungsprozesses spielen eine Rolle. Überdies sind die patientenabhängigen Faktoren wie Antikörper, individuelles Ansprechen auf die Gerinnungsfaktorgabe, die Halbwertszeit und die klinische Situation des Patienten zu berücksichtigen [10, 75, 78].

1.2.6.1 Herstellung der Gerinnungsfaktorkonzentrate

Der extrazelluläre Bereich des Blutes bildet eine klare, gelbe Flüssigkeit, das Plasma. Neben dem Hauptbestandteil Wasser enthält es Elektrolyte, Proteine und niedermolekulare organische Substanzen. Die Proteine sind dabei mit 82 g/l die mengenmäßig größte Fraktion, die im Plasma gelöst vorliegt. Die überwiegend in der Leber synthetisierten Proteine werden mittels der klassischen Serum-(Plasma-) Elektrophorese in die Albuminfraktion sowie in die α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline und die Fibrinogenfraktion eingeteilt [13]. Mittels einer zweidimensionalen Elektrophorese kann eine weitere Auftrennung der Proteinfractionen in einzelne Proteine erfolgen. Schaut man sich eine solche Elektrophorese nach der Silberfärbung an, erkennt man anhand der Vielzahl von Banden, dass die Proteinfractionen aus vielen verschiedenen Proteinen bestehen. Momentan sind ca. 130 Plasmaproteine bekannt [10, 80]. Diese erfüllen die Funktionen eines unspezifischen Trägers, Vehikels, Puffers, Erzeugers des osmotischen Drucks, und dienen darüber hinaus der Abwehr, zur Nahrung als auch zur Blutgerinnung [13].

Um die Plasmaproteine zu gewinnen, nutzt man das Verfahren der Plasmafraktionierung (Abb. 7). Die Plasmafraktionierung stellt ein Verfahren zur Trennung, Isolierung und Darstellung der Plasmaproteine zur therapeutischen Nutzung dar. Die Grundlagen für dieses Verfahren wurden um 1945 durch den Amerikaner Edwin J. Cohn [81] gelegt. Dieser nutzt die Tatsache, dass bei Änderung des pH-Wertes und des Salzgehaltes die Plasmaproteine in der Kälte und unter Zusatz von Ethanol ausfallen. Somit wurden erstmals die einzelnen Fraktionen getrennt. Nach diesem Prinzip funktioniert auch die heutige Gewinnung von Plasmaproteinkonzentraten, wenn auch deutlich verbessert und weiterentwickelt.

Ausgangsprodukt für die Fraktionierung ist Plasma, welches entweder als Nebenprodukt bei Erythrozyten- und anderen Blutzellkonzentraten entsteht (Recovered Plasma) oder durch die Plasmapherese (Source Plasma) gewonnen wird.

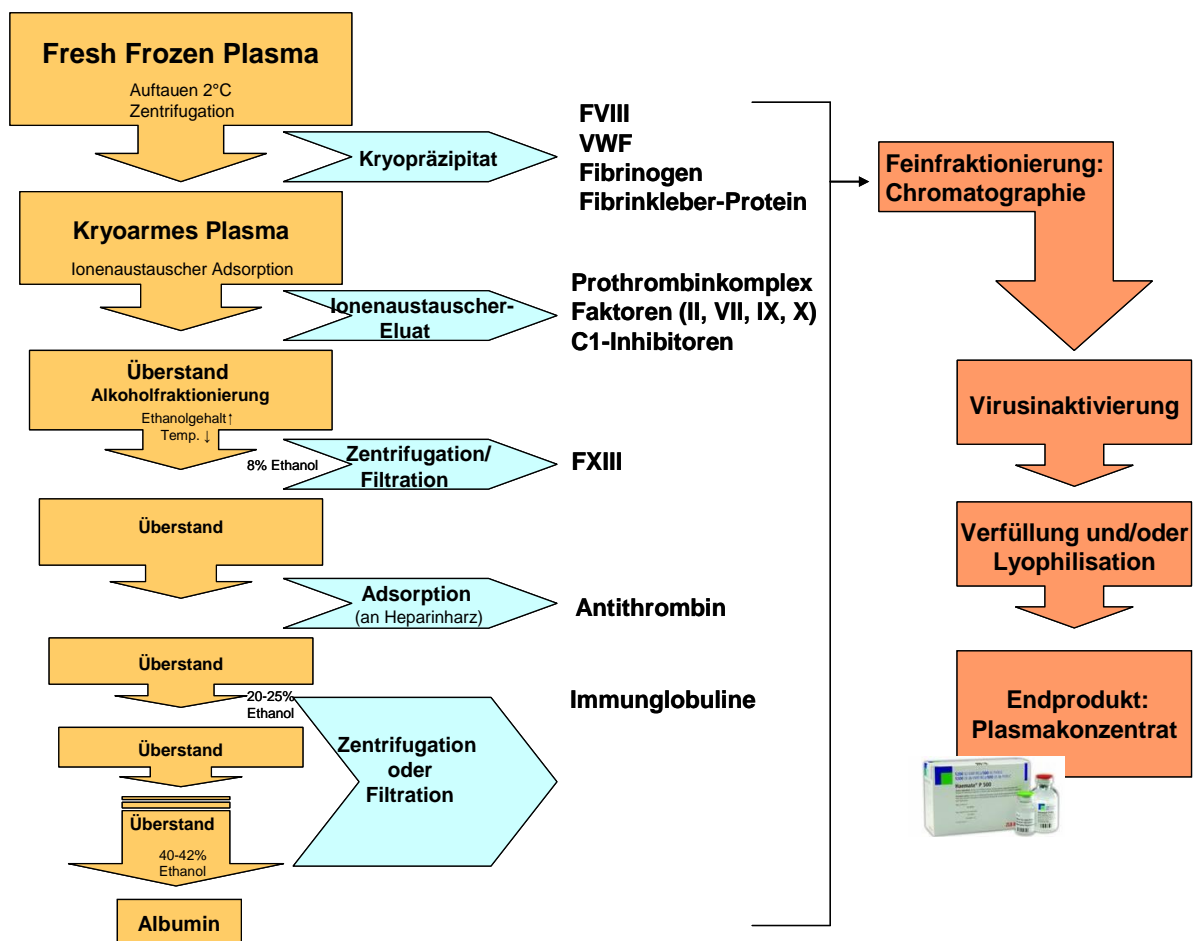


Abb. 7: vereinfachte Darstellung der Gewinnung von Plasmakonzentraten nach Cohn [81].

Fresh Frozen Plasma gewonnen von mehreren Spendern wird im leicht angetauten bzw. noch gefrorenen Zustand in einem temperierbaren Behälter vereinigt. Bei dem folgenden langsamen Auftauprozess lösen sich nicht sofort alle im Plasma befindlichen Proteine. Es entsteht ein trüber Niederschlag aus schlecht löslichen Proteinen, der sich Kryopräzipitat nennt und durch Abzentrifugation des Plasmas gewonnen werden kann. Die Qualität des Kryopräzipitat hängt im Wesentlichen von der Auftaugeschwindigkeit und dem Temperaturverlauf ab. Durch weitere Fällungen und chromatographische Reinigungsschritte werden die im Kryopräzipitat enthaltenen Proteine, Faktor VIII, von Willebrand-Faktor und Fibrinogen getrennt. Dabei hängt es von der Art des Reinigungsschrittes ab, ob man ein FVIII-VWF-Konzentrat, ein reines FVIII- bzw. ein VWF-Konzentrat erhält. Anschließend werden die Proteine mittels einer Ultrazentrifugation konzentriert.

Das abgesonderte, kryoarmer, jedoch immer noch proteinreiche Plasma wird danach weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen. Durch zwei weitere Adsorptionen (DEAE[®]-Adsorption und QAE[®]-Adsorption) werden die Faktoren des Prothrombinkomplexes und der C1-Inaktivator abgetrennt. Nach diesem Isolierungsschritt werden die übrigen, noch vorhandenen Proteine mit der Fraktionierung nach Cohn gewonnen. Hierbei wird die Temperatur des Plasmas bei stetig steigender Ethanolzufuhr unter 0 °C abgesenkt. Das bei bestimmten Ethanolkonzentration ausfallende, proteinspezifische Präzipitat wird vor erneuter Erhöhung der Ethanolkonzentration mittels Zentrifugation abgetrennt.

Ethanolkonzentration in %	Ausfallendes Protein
8	FXIII
20 - 25	Immunglobuline
40 - 42	Albumin

Das Präzipitat wird anschließend in einem Puffer aufgelöst und durch Fällung und chromatographische Verfahren aufgereinigt.

Die Herstellung von Gerinnungsfaktorkonzentraten beinhaltet überdies die Verringerung und vollständige Inaktivierung von Pathogenen in ein oder mehreren Schritten. Abschließend werden die Proteinlösungen abgefüllt und gefriergetrocknet. Vor der Verabreichung müssen die Plasmakonzentrate nur noch mit einem entsprechenden Lösungsmittel rekonstituiert werden und können dann als Injectabilia angewandt werden. Heutzutage liegt das Infektionsrisiko von Plasmaprodukten annähernd bei Null. Um diese Sicherheit der Plasmapräparate zu gewährleisten ist eine Reihe von Maßnahmen nötig.

1. Plasmaherkunft (die Plasmaspender werden nach strengen Kriterien ausgesucht und kontinuierlich ärztlich überprüft.)

2. Spenderauswahl (sowohl der Spender als auch seine Spende werden in regelmäßigen Abständen serologisch getestet)
 3. Überprüfung der Einzelspenden auf Infektionsmarker
 4. Quarantäne und „Look-Back-Verfahren“ (innerhalb von 2 bis 3 Monaten muss der Spender nochmals erscheinen und wird auf Infektionen untersucht. Zudem ist das Produkt auch nach der Auslieferung weiter verfolgbar und kann auch zurückgerufen werden.)
 5. Nukleinsäure-Amplifizierungs-Technik zum Virusnachweis (bei diesem Verfahren wird das Virus aus dem Plasma extrahiert und die gereinigte Virusnukleinsäure zusammen mit Polymerase und virusspezifischem Primer der PCR zugeführt. Dadurch wird eventuell vorhandene Virusnukleinsäure amplifiziert und kann anschließende mit Gelelektrophorese und Fluoreszenzdetektion sichtbar gemacht werden)
 6. Validierte Virusentfernungs- und Virusinaktivierungsschritte
- Dieser Punkt stellt den Hauptteil zur Sicherheit von Plasmaprodukten dar. Die verschiedenen Techniken, die dafür Einsatz finden sind in der folgenden Tabelle 7 aufgeführt. Dabei ist immer zu berücksichtigen, dass die Verfahren unterschiedliche Kapazitäten zur Inaktivierung oder Abreicherung von Viren besitzen. Mittels der europäischen CPMP-Guidelines der Arzneimittelzulassungsbehörden werden die Blut- und Plasmaproducte überprüft und ihre Qualität gesichert [10, 82].

Physikalische Methoden	Hitzebehandlung (trocken / feucht / Dampf / Pasteurisierung) Ionisierende Strahlung Licht (UV)
Entfernung infektiöser Partikel	Sterilfiltration Chromatographie Verteilung bei der Proteintrennung Ultrafiltration Nanofiltration
Biochemische und chemische Methoden	Immunpräzipitation Solvens / Detergens Nukleinsäuredenaturierende Verfahren
Kombinierte physiko-chemische Methoden	β -Propiolakton / UV Spezielle Substanzen (z.B. Flavonoide / Rutin) / Licht

Tab. 7: Maßnahmen zur Entfernung und Inaktivierung von Pathogen. Vor allem die Viren HI, Hepatitis A, Hepatitis B und Hepatitis C stehen dabei im Vordergrund.

1.2.6.2 Herstellung der Plasmapräparate

Um Zwischenfälle bei der Transfusion zu vermeiden wurden folgende Gesetze und Richtlinien erlassen und somit ein zwingendes Prüfverfahren [83] aufgestellt:

- 1) das Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens (Transfusionsgesetz),
- 2) Richtlinien der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich Instituts (PEI) zur Gewinnung von Blutprodukten für die Hämotherapie und für die Herstellung von Plasma für besondere Zwecke (Hyperimmuntherapie). Ebenso fließen die Stufenpläne und Bekanntmachungen des PEI zur Abwehr von Arzneimittelrisiken mit ein.
- 3) Empfehlungen des Europarates zur Herstellung, Anwendung und Qualitätssicherung von Blutkomponenten
- 4) Voten des Arbeitskreises Blut

Mit den Prüfverfahren sollen die transfusionsbedingten Infektionsübertragungen vermindert werden. Dazu muss in erster Linie der Spender umfangreich anamnestiziert (Risiko einer Infektionskrankheit beim Spender selbst oder in seiner Umgebung, Zuverlässigkeit des Spenders) und körperlich untersucht (Hinweise auf Zugehörigkeit zu Risikogruppen/ Drogenmissbrauch) werden [83]. Eine Reihe von Laboruntersuchungen zum Ausschluss transfusionsmedizinisch relevanter Infektionskrankheiten (new variant Creutzfeld-Jakob disease, HIV, Hepatitis-B und -C Virus, Parovirus B19, West Nile Virus, Severe acute respiratory syndrome virus, bakterielle Erkrankungen, Syphilis, Malaria und andere Parasitosen) können durchgeführt werden. Auf jeden Fall müssen jedoch Syphilis, HCV und HIV ausgeschlossen werden [84].

Gesunde Spender zwischen 18 und 68 Jahren (Erstspende bis 60 Jahre) können bei einem Hämoglobinwert ≥ 125 g/l (Frauen) bzw. ≥ 135 g/l (Männer) 450 bis 500 ml Vollblut spenden oder sich einer apparativen Plasmapherese unterziehen.

1.2.6.2.1 Herstellung des Einzelspenderplasmas

Einzelspenderplasma wird sowohl für die Herstellung von FFP zu Transfusionszwecken, als auch für die Weiterverarbeitung zu solvent / detergent behandeltem Plasma (s / d Plasma oder Octaplas®) und anderen Plasmasubstitutionspräparaten verwendet.

450 bis 500 ml Vollblut wird in einem geschlossenen Beutelsystem mit 63 bis 70 ml Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD) gemischt und anschließend mit einem Leukozytenfilter

depletiert. Das Beutelsystem wird mehrfach zentrifugiert und in Erythrozytenkonzentrat, Plasma und Buffy Coat mit Thrombozyten aufgetrennt. Durch maschinelle Auftrennung erhält man somit 200 bis 300 ml Plasma, das innerhalb von 3 bis 24 Stunden nach der Spende bei ≤ -30 °C tiefgefroren werden muss [83].

Bei der apparativen Plasmapherese wird das Vollblut des Spenders ebenfalls mittels Citrat antikoaguliert. Durch Separation oder Filtration wird das Vollblut extrakorporal in Plasma und Blutzellsuspension geteilt. Die Blutzellen werden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und dem Spender wieder zurückgeführt. Das Plasma wird hingegen in einem Plastikbehältnis gesammelt. Ca. 850 ml Plasma kann durch dieses Verfahren gewonnen werden. Anschließend wird das Plasma bei ≤ -30 °C tiefgefroren [83].

1.2.6.2.2 Herstellung von Fresh Frozen Plasma

Das aus Einzelspenderplasma gewonnene transfusionsfähige Fresh Frozen Plasma (FFP) wird nach einer viermonatigen Quarantäne freigegeben, sofern der Spender nach Ablauf der Quarantäne weiterhin seronegativ für anti-HIV1+2, HBsAg, anti-HCV und PCR negativ für HIV-RNA und HCV-RNA ist [85]. Trotz Quarantänelagerung und wiederholter Testung des Spenders bleibt ein nicht zu unterschätzendes Restrisiko für eine Infektion. Vor allem die Ansteckung mit HIV, HCV sowie HBV ist gegeben, wenn deren Viruskonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Testverfahrens liegen. HAV und Parovirus B19 können ebenfalls übertragen werden da FFPs nicht auf diese Viren getestet werden müssen [86]. Die fertigen FFP-Beutel enthalten ca. 250 ml Plasma.

1.2.6.2.3 Herstellung von solvent / detergent behandeltem Plasma (Octaplas®)

Ausgangspunkt für die technische Weiterverarbeitung zu solvent / detergent behandeltem Plasma stellt ein Plasmapool von etwa 380 kg Plasma. Dieser Pool wird aus Plasmaspenden, je nach Volumen der Einzelspenderplasmen, von 500 bis 1600 Spendern, gebildet [87]. Jedes Einzelspenderplasma wird bei diesem Verfahren vor der Weiterverarbeitung auf HAV-RNA, HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, HBV-DNA, anti-HCV, HCV-RNA, anti-HIV1 und 2, HIV-RNA und Parovirus B19-DANN geprüft. Das Einzelspenderplasma muss nach der Spende innerhalb von vier bis acht Stunden auf eine Kerntemperatur von ≤ -30 °C gebracht werden [88].



Abb. 8: Herstellung von solvent / detergent behandeltem Plasma (Octaplas®) [7].

Durch zügiges Auftauen der Einzelspenderplasmen wird eine Kryopräzipitation weitestgehend vermieden. Die aufgetauten Plasmen werden nun miteinander vermischt. Somit werden interindividuelle Schwankung an Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren ausglichen und seltene Antikörper, wie zum Beispiel transfusion-related acute lung injury (TRALI) auslösende Antikörper, unter die Nachweisgrenze verdünnt [88]. Des Weiteren findet eine Immunneutralisation statt, wobei im Pool befindliche Antikörper (z.B. Anti-Parovirus-B19-Antikörper oder Anti-HAV-Antikörper) andere potentiell im Poolplasma enthaltene Viren gebunden und neutralisiert werden (Einzelspenderplasmen mit hohen Parovirus B-19 Konzentrationen werden vorher ausgesondert). Die Behörden erkennen diesen Prozess der Viruseliminierung bei Poolplasma und Immunglobulinen an [89].

In einem nachfolgenden Verarbeitungsschritt wird der Pool mit einem Filter der Porengröße 1 µm filtriert um Zellen und Zellrückstände vollständig zu entfernen.

Anschließend folgt die solvent / detergent Behandlung mit 1 % Tri(n-butyl)phosphat (TNBT) als organisches Lösungsmittel und dem 1%igem Detergent Triton X-100. Die Behandlung wird bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durchgeführt und ist nach etwa 1 bis 1,5 Stunden abgeschlossen. TNBT und Triton X-100 zerstören zuverlässig lipidumhüllte Viren wie HBV, HCV, HIV 1+2, HTLV-I/II CMV. Nach Abschluss des s / d Verfahrens werden die Reagenzien mit Hilfe von Kastorölextraktion und Festphasenchromatographie aus dem Plasmapool entfernt. Es folgen weitere Filtrationsschritte mit Filtern von $1\text{ }\mu\text{m}$ und $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße. Diese Schritte reduzieren zusätzlich möglicherweise vorhandene behüllte und unbehüllte Viren im Plasma [83, 87].

Abschließend wird der Pool einer Sterilfiltration ($0,45\text{ }\mu\text{m}$ und $0,2\text{ }\mu\text{m}$) unterzogen, in 200 ml Beutel verpackt und bei -60 °C schockgefroren. Es folgen interne Chargen- und Qualitätskontrollen und eine externe Chargenfreigabe durch das Paul-Ehrlich-Institut [89].

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungssubstanzen

2.1.1 Normalkollektiv

Zur Erstellung des Normalpools erfolgte eine Blutabnahme bei 15 männlichen und 15 weiblichen gesunden Probanden im Alter zwischen 20 bis 60 Jahren. Mit Hilfe von Nadeln des Butterfly-Typs (Größe 0,8 mm) wurden 10 ml Citratblut durch Venenpunktion abgenommen. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4000 rpm wurde das Plasma im Überstand ab pipetiert, gepoolt und anschließend in 500 µl Portionen bei -20 °C eingefroren.

Das Normalkollektiv (Poolplasma) findet Anwendung als Positivkontrolle und interner Standard. Darüber hinaus wird zur Erstellung einer Kalibrationsreihe sowohl unbehandeltes als auch deaktiviertes Poolplasma (d-Pool) benötigt. Die Deaktivierung erfolgt durch eine 30minütige Hitzeinaktivierung im Wasserbad bei 60 °C.

2.1.2 Patientenkollektiv

Von Patienten der hämatologischen Ambulanz der III. medizinischen Klinik mit TTP, TTP-Like Syndrom, HUS bzw. VWS wurde auf gleiche Weise wie beim Normalkollektiv Citratplasma zu Untersuchungszwecken abgenommen und bei -20 °C eingefroren.

2.1.3 Gerinnungsfaktorkonzentrate

Alle Gerinnungsfaktorkonzentrate wurden von den jeweiligen Herstellern zur Verfügung gestellt.

Haemate[®]P 1000, CSL Behring GmbH, Deutschland

Ch.-B.: 49166911C

Aus Humanplasma gewonnenes Haemate[®]P 1000 enthält pro Produktflasche in Pulverform nominal 2400 I.E. von Willebrand-Faktor und 1000 I.E. Blutgerinnungsfaktor VIII.

Auflösung nach Herstellerangaben:

Nach Rekonstitution mit 15 ml Aqua ad iniectabilia enthält Haemate[®]P 1000 ca. 160 U/ml VWF und 66,6 U/ml Gerinnungsfaktor VIII.

Wilate® 900, Octapharma GmbH, Langenfeld

Ch.-B.: A929A181
A822A181A

Aus Humanplasma gewonnenes Wilate® 900 enthält pro Produktflasche in Pulverform nominal 800 I.E. von Willebrand-Faktor und 900 I.E. Gerinnungsfaktor VIII.

Auflösung nach Herstellerangaben:

Nach Rekonstitution mit 10 ml herstellereigenes Lösungsmittel (Aqua ad iniectionabilia und 0,1 % Polysorbat 80) enthält Wilate® 900 ca. 80 U/ml VWF und 90 U/ml Gerinnungsfaktor VIII.

Immunate STIM plus 250 I.E. Immuno, Baxter AG, Wien

Ch.-B.: VNC3H047A

Aus Humanplasma gewonnenes Immunate STIM plus 250 I.E. Immuno enthält pro Produktflasche in Pulverform nominal 125 I.E. von Willebrand-Faktor und 250 I.E. Gerinnungsfaktor VIII.

Auflösung nach Herstellerangaben:

Nach Rekonstitution mit 5 ml Aqua ad iniectionabilia enthält Immunate STIM plus 250 I.E. Immuno ca. 25 U/ml VWF und 50 U/ml Gerinnungsfaktor VIII.

Wilfactin 100 UI/ml, LFB Biomédicamentes, France

Ch.-B.: 08L08117
08L05852
08L04234

Aus Humanplasma gewonnenes Wilfactin 100 UI/ml enthält pro Produktflasche in Pulverform nominal 1000 I.E. von Willebrand-Faktor

Auflösung nach Herstellerangaben:

Nach Rekonstitution mit 10 ml Aqua ad iniectionabilia enthält Wilfactin 100 UI/ml ca. 100 U/ml VWF.

Beriate®P 250, CSL Behring, Deutschland

Ch.-B.: 15475011C

Aus Humanplasma gewonnenes Beriate®P 250 enthält pro Produktflasche in Pulverform nominal 250 I.E. Gerinnungsfaktor VIII.

Auflösung nach Herstellerangaben:

Nach Rekonstitution mit 2,5 ml Aqua ad iniectionabilia enthält Beriate®P 250 ca. 100 U/ml Gerinnungsfaktor VIII.

Kogenate® Bayer 1000 I.E., Bayer HealthCare AG, Deutschland

Ch.-B.: ITA02PA

Rekombinanter Blutgerinnungsfaktor VIII enthält pro Produktflasche in Pulverform nominal 1000 I.E. Gerinnungsfaktor VIII.

Auflösung nach Herstellerangaben:

Nach Rekonstitution mit 2,5 ml Aqua ad iniectabilia enthält Kogenate® Bayer 1000 I.E. ca. 400 U/ml Gerinnungsfaktor VIII.

2.1.4 Plasmapräparate

Solvent / detergent behandeltes Plasma (Octaplas®) wurde von der Firma Octapharma GmbH, Langenfeld, bereitgestellt. Jeweils 50 ml jeder Blutgruppe der folgenden Chargen:

Blutgruppe A: A9271952/D

Blutgruppe B: A9272952/D

Blutgruppe AB: A9275952/D

Blutgruppe 0: A4502452/0

Fresh Frozen Plasma wurde von der Transfusionsmedizin Mainz durch Herrn Dr. R. Conradi zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde von den gebrauchsfertigen Transfusionsbeuteln die Verbindungsschläuche mit ca. 10 ml Plasma abgeschnitten und eingeschweißt. Folgende Chargen wurden verwendet:

Blutgruppen	A	B	AB	0
Chargen	0965977	0932185	0960994	0956523
	1018509	1018518	1087544	1018515
	1018505	1018519	1087570	1018541
	1018517	1018548	1087532	1018526
	1018545	1018511	1018639	1018501

Tab. 8: Die Chargen von FFP von den jeweiligen Blutgruppen, die innerhalb der Untersuchungen verwendet wurden.

2.2 Methoden

2.2.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wird angewendet, um qualitative und quantitative Informationen über das von Willebrand-Faktor Molekül zu erhalten. Insbesondere der strukturelle Aufbau des Moleküls lässt sich mit dieser Methode gut darstellen. Durch unterschiedliche Konzentrationen der Agarose lässt sich die Selektivität des Gels den Anforderungen entsprechend regulieren. So finden niedrig konzentrierte Agarosegele bevorzugt in der TTP-Diagnostik zur Detektion von ultralangen Multimeren Anwendung. Vor allem die Differenzierung zwischen ultralangen von Willebrand-Faktor Multimeren gegenüber kleineren von Willebrand-Faktor Multimeren ist diagnostisch wegweisend. Die höher konzentrierten Agarosegele hingegen spielen in der Diagnostik des von Willebrand Syndroms eine wichtige Rolle. Aufgrund des erhöhten Siebeffekts sind deutlich feinere Auftrennungen zwischen den einzelnen Molekülgrößen möglich. Nach dem Anfärben zeigt sich daher eine Tripletstruktur für die Moleküle einer Größenordnung in Form einer Hauptbande und zwei Satellitenbanden. Durch die Anzahl der Banden und ihrer Intensität, im Bezug zum Internen Standard, lässt sich somit sowohl eine Aussage über das Vorliegen eines von Willebrand Syndroms machen als auch eine genaue Typisierung vornehmen.

2.2.1.1 Materialien

Geräte

Feinwaage:	Sartorius
Rührplatte (& Magnetrührer):	RCT basic IKA LABORTECHNIK
pH-Meter:	Microprocessor pH-Meter, PH211 – Hanna Instruments
Mikrowelle:	SHARP
Texter:	VWR™ Mini Vortexer
Wasserbad:	Assistent WTE Var 3185
Elektrophoresekammer:	Multiphor II, Pharmacia Biotech
Elektrophoreseapparatur:	2197 Power supply, LKB-Bromma
Kühlung:	Julabo F12
Blottingkammer:	Model TRAS-Blot [®] Cell, BIO-RAD
Blottinggerät:	Consort EV 202 Electrophoresis Power supply
Rüttelplatte:	ROTAMAX 120, Heidolph

Hilfsmittel

Pipetten:	Eppendorf Reference 20 µl, 100 µl und 1000 µl Multipette® plus Eppendorf
Pipettenspitzen:	200 µl gelb und 1000 µl neutral Starlab, Nümbrecht Combitips 0,5 ml und 5 ml, Eppendorf
Tubes:	1,5ml Tubes, Eppendorf CELLSTAR® Tubes 50 ml
Tube Rack:	1,7 ml 80 Well Tube Rack, LIGHTLABS®
Bechergläser:	Schott AG
Filterpapier:	Schleicher & Schueller
Stoppuhr:	Abbott Diagnostics
Glasplatten:	260 x 125 mm, 3 mm Dicke

Chemikalien

Agarose, Typ VII, Sigma-ALDERICH®
 Anitserum: Dakopatts P-226
 Aqua ad iniectabilia, Delta Select
 Bromphenolblau,
 4-Chlor-1-Naphtol, Biochemica AppliChem
 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Sigma-ALDERICH®
 Essigsäure, ROTIPURAN® 100 % Carl Roth GmbH & CoKG
 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma-ALDERICH®
 Glycin, Carl Roth GmbH & CoKG
 Methanol, ROTISOLV® >99,95 % Carl Roth GmbH & CoKG
 Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH & CoKG
 Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), Carl Roth GmbH & CoKG
 Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), Carl Roth GmbH & CoKG
 Nitrocellulosemembran 200 * 100 mm, Schleier & Schueller
 Polyclonal Rabbit Anti-Human von Willebrand factor/ HRP, BIOZOL Diagnostica
 Propan-2-ol (F), Fischer Scientific
 Salzsäure (HCl) 2 mol/l, Merck KGaA
 Seakem® HGT (P) agarose, bma products
 Milchpulver (Skim Milk Powder), Fluka BioChemica
 Sodiumdodecylsulfat (SDS), Carl Roth GmbH & CoKG
 Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS), Carl Roth GmbH & CoKG
 Triton® X-100, SERVA®
 Wasserstoffperoxid (H₂O₂) 30 %, ROTIPURAN® Carl Roth GmbH & CoKG

Medien

Vor Versuchsbeginn sollten die Milch-, die Antigen- und die Färbelösungen immer frisch hergestellt und direkt verbraucht werden. Alle anderen Medien sind bei + 7 °C im Kühlschrank zwei Wochen unter vorheriger Kontrolle des pH-Wertes verwendbar.

Trenngelpuffer:	0,1 % SDS 0,375 mol/l TRIS in 500 ml Aqua ad iniectabilia mit HCl auf pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,1 % SDS 0,125 mol/l TRIS in 500 ml Aqua ad iniectabilia mit HCl auf pH 6,8
Probenpuffer:	10 mmol/l TRIS 1 mmol/l EDTA-Na ₂ 2 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 200 ml Aqua ad iniectabilia mit HCl auf pH 8,0
Elektrophoresepuffer:	4 l Aqua ad iniectabilia 0,1 % SDS 0,05 mol/l TRIS 0,384 mol/l Glycin mit HCl auf pH 8,35
Elutionspuffer:	3 l Aqua ad iniectabilia 21,75 g Na ₂ HPO ₄ 3,75 g NaH ₂ PO ₄ 0,05 % SDS mit NaH ₂ PO ₄ auf pH 7,4
Fixierlösung:	65 % Aqua ad iniectabilia 25 % 2-Propanol 10 % Essigsäure

Waschlösung 1:	0,05 mol/l TRIS in 5 l Aqua ad iniectabilia mit HCl auf pH 7,5
Waschlösung 2:	3 l von Waschlösung 1 0,9 % Natriumchlorid 1 % Triton
Milchlösung:	3 % Milchpulver in 100 ml Waschlösung 2
Antiserum:	200 µl Antiserum P-226 in 100 ml Waschlösung 2
Färbelösung 1:	75 mg 3,3-Diaminobenzidin (DAB) 1 ml Wasserstoffperoxid in 100 ml Waschlösung 2
Färbelösung 2:	50 mg 4-Chlor-1-Naphtol in 50 ml Methanol

2.2.1.2 Methode

Grundlage der angewendeten Methode sind die Untersuchungen und Methoden nach Bukh A. et al. [90] und Furlan M. et al. [21]. Zu Beginn werden die Proben und Poolplasma zügig im Wasserbad aufgetaut, danach je 20 µl jeder Probe mit 50 µl Probenpuffer versetzt und 30 Minuten im 60 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dadurch denaturieren die Proteine und mit dem SDS des Probenpuffers erfolgt eine Absättigung der Ladung. Für das Trenngel wird Agarose, Typ VII und Trenngelpuffer zusammen erhitzt und zwischen zwei 3 mm dicke Glasplatten gegossen. Die Glasplatten werden vorher mit Alkohol gereinigt und nach Einlegen einer U-förmigen Gummilippe, die das Auslaufen des Gels verhindert, mit Klammern seitlich zusammengehalten. Nach dem Erkalten des Trenngels wird der untere Teil der Gummilippe entfernt und mit Sammelgel einer Agarosekonzentration von 0,75 % (SeaKem[®] HGT (P)) aufgefüllt. Nach Abheben einer Glasplatte werden in das Sammelgel Taschen gestanzt, in die jeweils 25 µl Probe kommen. Die Glasplatten werden horizontal in die Elektrophoreseapparatur gelegt und über Filterpapier mit dem Elektrophoresepuffer verbunden. Dies verhindert das

Austrocknen des Gels und der Stromkreis wird geschlossen. Nach Anlegen von Strom (20 mA) erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Das Bromphenolblau zeigt dabei immer die Lauffront an. Nach 30 Minuten Laufzeit werden die Taschen mit Sammelgel gefüllt um den Stromkreis zu schließen und somit gerade Banden zu erhalten. Für eine genügende Auftrennung bedarf es einer Laufzeit von mindestens 22 Stunden.

Nach erfolgter Trennung der Multimere inkubiert das Gel 15 Minuten im Elutionspuffer, bevor es vorsichtig von der Glasplatte gelöst und auf einen Filter geschoben wird. Auf das Gel selbst wird nun blasenfrei die Nitrocellulosemembran aufgelegt und ein weiterer Filter, der das System nach außen abschließt. Dieses Schichtsystem wird vertikal in die mit Elutionspuffer gefüllte Elutionskammer gespannt. Das Multimermuster überträgt sich, durch eine von außen an die Kammer angelegte Spannung von 1200 mA, vom Gel auf die Nitrocellulosemembran. Nach zweistündiger Elution wird die Nitrocellulosefolie entnommen, in eine Schale auf der Rüttelplatte gelegt und vor der weiteren Verarbeitung 20 Minuten mit Fixierlösung behandelt. Durch den in der Fixierlösung enthaltenen Alkohol denaturieren die Proteinbanden vollständig und sind damit wasserunlöslich. Dadurch werden die Multimere für die restliche Versuchsdurchführung fest an die Membran gebunden. Nach der Behandlung mit Fixierlösung wäscht man dreimal gründlich mit Aqua dest. um das Ausflocken der Milchlösung zu verhindern. Innerhalb des 30minütigen Bads in Milchlösung werden sämtliche freie Stellen auf der Nitrocellulosemembran blockiert. Somit wird verhindert, dass das Antiserum an der Nitrocellulosemembran adsorbiert.

Nach dem Entfernen der Milchlösung und wiederholtem Waschen mit Aqua dest. lässt man die Antiserumlösung vier Stunden einwirken, wobei die Folie überall mit der Antiserumlösung bedeckt sein muss. Das Antiserum ist ein peroxidase-markierter Kaninchenantikörper (P-266), der spezifisch an den von Willebrand-Faktor bindet. Er markiert sämtliche von Willebrand-Faktor Multimere aller Größen auf der gesamten Folie. Vor dem Anfärben wird das Antiserum abgeschüttet und die Folie gründlich einmal mit Waschlösung 1 und zweimal mit Waschlösung 2 von jeglichen Antiserum- Rückständen, die die Färbung verfälschen könnte, befreit.

Beim Anfärben reduziert das Wasserstoffperoxyd aus der Färbelösung die Peroxidase des Antikörpers. Der freigewordene Sauerstoff bewirkt in Verbindung mit dem DAB eine Braunfärbung. Mit dem Zusatz von Färbelösung 2 wird die Färbung der Proteinbanden intensiviert. Nach dem Entfernen der Färbelösung kann die Nitrocellulosemembran getrocknet und ausgewertet werden.

2.2.2 BCS-Methode nach Böhm

Die BCS-Methode nach Böhm dient der indirekten ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung und kann zur ADAMTS13 Antikörpermessung herangezogen werden.

Prinzip der zweitägigen Methode ist die Reaktion des in der Probe befindlichen ADAMTS13 mit dem künstlich zugesetzten von Willebrand-Faktor. Je nach Menge und Aktivität der Protease ADAMTS13 wird der von Willebrand-Faktor unterschiedlich stark abgebaut (Abb. 9) [91]. Durch den Abbau verliert er die Fähigkeit mit Thrombozyten zu agglutinieren. Den Umstand seiner „Klebrigkeit“ gegenüber Thrombozyten macht man sich bei der Messung zu Nutzen.

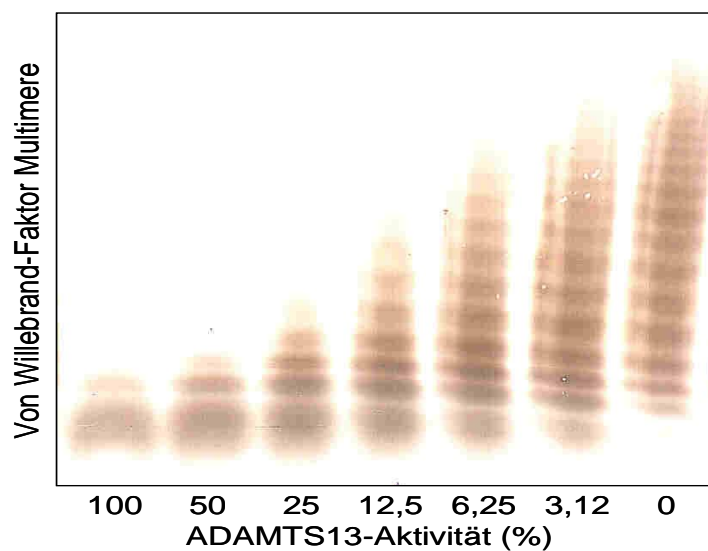


Abb. 9: Verschieden lange von Willebrand-Faktor Multimere bei unterschiedlicher ADAMTS13 Aktivität aufgetrennt in der SDS-Agarose-Gelelektrophorese [91].

Dem Probenansatz werden hochgereinigte Thrombozyten und Ristocetin zugesetzt. Das Antibiotikum Ristocetin verbessert, durch eine Veränderung des Bindungsepitops des Glykoprotein-Rezeptors Iba, die Bindungsfähigkeit von Thrombozyten gegenüber dem von Willebrand-Faktor. In Anwesenheit von Ristocetin lagern sich somit hochmolekulare von Willebrand-Faktor Multimere und Thrombozyten zusammen [9].

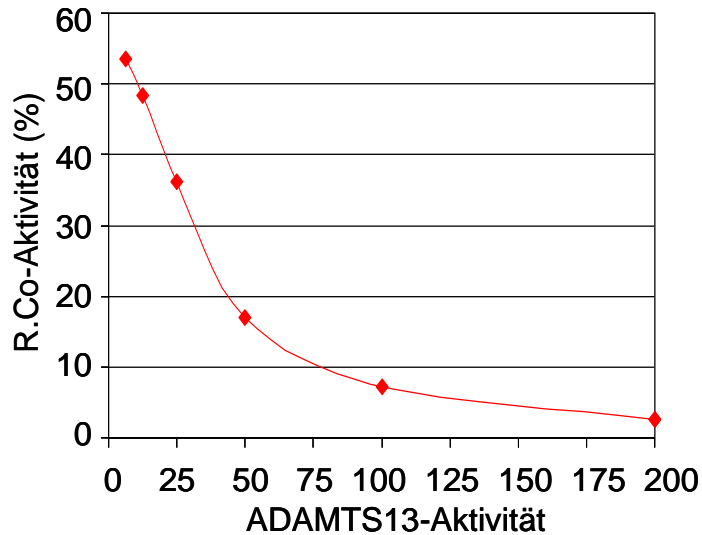


Abb. 10: ADAMTS13 Aktivität in Abhängigkeit von der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität [91].

Diese Agglutinate fallen aus und bewirken, dass sich der Ansatz aufklart. Liegt überwiegend niedermolekularer und somit funktionsloser von Willebrand-Faktor vor, bleibt die Flüssigkeit trüb. Die optische Dichte (Extinktion) wird photometrisch erfasst und mit der Kalibrationsgeraden verglichen (Abb. 10). Nachdem sich die „Klebrigkeit“ des von Willebrand-Faktors umgekehrt proportional zur ADAMTS13 Aktivität verhält, ist es möglich, aus den Messwerten die ADAMTS13 Aktivität zu errechnen (Abb. 9 und 11).

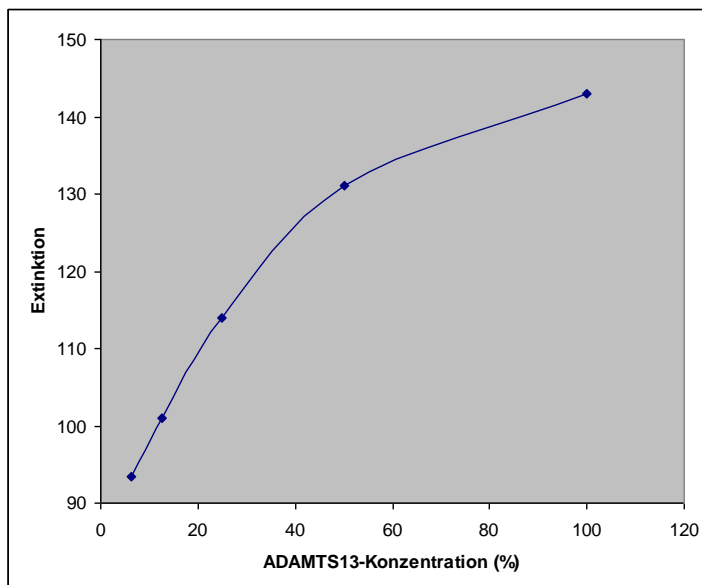


Abb. 11: Kalibrationskurve aus der gemessenen Extinktion gegen die ADAMTS13 Konzentration für die BCS-Methode nach Böhm.

2.2.2.1 Materialien

Geräte

pH-Meter:	Microprocessor pH-Meter, PH211 – Hanna Instruments
Wasserbad:	Assistent WTE Var 3185
Kryostat:	Julabo F12
Zentrifuge:	5415 R, Eppendorf
Feinwaage:	Sartorius
Rüttelplatte:	Heidolph Instruments TITRAMAX 100
Wärmeschrank:	Thermo ELECTRON CORPORATION, Heraeus Medical GmbH
BCS [®] System:	BCS Service Line Hämostase, Siemens HealthCare Diagnostics

Hilfsmittel

Pipetten:	Eppendorf Reference 20 µl, 100 µl und 1000 µl Multipette [®] plus Eppendorf
Pipettenspitzen:	100 µl und 1000µl Starlab Combitips 0,5 ml und 5 ml, Eppendorf
Tubes:	1,5 ml Tubes, Eppendorf CELLSTAR [®] Tubes 50 ml
Tube Rack:	1,7 ml 80 Well Tube Rack, LIGHTLABS [®]
Bechergläser:	Schott AG

Chemikalien

Aqua destillata, Delta Select
 Aqua ad iniectabilia, Delta Select
 Bariumchlorid (BaCl₂), p.A. MERCK
 BC von Willebrand-Reagenz, Siemens HealthCare Diagnostics
 Harnstoff, SIGMA[®]
 Pefabloc[®] SC (4-(2-Aminoethylbenzolsulfonylfluorid-hydrochloride), Merck KGaA
 Tris- Hydroxymethylaminomethan (TRIS), Carl Roth GmbH & CoKG
 Wilfactin 100 UI/ml, LFB Biomédicamentes, France

Medien

Reaktionspuffer:	12,5 ml 5 mmol/l TRIS-Puffer pH 8 3 mg Pefabloc® 156 µg 1 mol/l Bariumchlorid
TRIS-Urea Puffer:	15 g 5 mol/l Harnstoff ad 50 ml 5 mol/l TRIS-Puffer pH 8
Substratpuffer:	0,1 % Wilfactin® in TRIS-Harnstoff Puffer

2.2.2.2 Methode

Vor der Testdurchführung werden die Plasmaproben und das Poolplasma bei 37 °C im Wärmeschrank aufgetaut und die benötigten Medien hergestellt. 300 µl des Poolplasmas werden anschließend im 60 °C heißen Wasserbad deaktiviert (d-Pool). Zu Beginn wird mit Hilfe von Poolplasma und d-Pool eine serielle Verdünnung durchgeführt (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 %). Diese dient als Kalibrationsgerade, während eine weitere 50%ige Verdünnung von Poolplasma mit d-Pool als Interner Standard mitläuft.

Je 15 µl jeder Probe, im Doppelansatz, werden mit 300 µl Reaktionspuffer und 150 µl Substratpuffer versetzt. Die Ansätze werden kurz auf der Rüttelplatte gemischt und anschließend im Wärmeschrank 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Vor der Messung der Ansätze löst man das lyophilisierte BC-Reagenz, welches vor allem Ristocetin und hochgereinigte Thrombozyten enthält, mit 4 ml Aqua ad iniectabilia. Das gelöste BC VWF-Reagenz sowie die Ansätze werden zur Messung in Racks überführt und in das BCS-Gerät geschoben. Als erstes wird den Ansätzen der Kalibrationsgeraden BC-Reagenz durch das Gerät zugeführt. Sobald die Ergebnisse der Messung vorliegen, erfolgt die Analyse der Probenansätze. Je nach ADAMTS13 Aktivität liegen unterschiedlich lange von Willebrand-Faktor Multimere vor, die ihrerseits unterschiedlich mit Thrombozyten agglutinieren. Die sich daraus ergebenden Trübungsunterschiede werden photometrisch erfasst. Über die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und unter Einbeziehung der Kalibrationsgerade errechnet die Computersoftware die ADAMTS13 Aktivität in %.

2.2.3 Modifizierte Böhm-Methode

Für die Messung der ADAMTS13 Aktivität in VWF / FVIII Konzentraten kann nicht die herkömmliche Böhm-Methode herangezogen werden. Die Konzentrate werden nicht als Plasmaprobe angesehen. Grund dafür ist der hohe Gehalt an VWF in den Konzentraten. Stattdessen wurde ein Prinzip entwickelt, bei dem die Messung der Restaktivität des VWF:RCo in den Konzentraten detektiert wird. Man kann dadurch die Autoproteolyse in den Konzentraten beurteilen und erhält somit indirekt Aufschluss über die ADAMTS13 Aktivität.

Die abgewandelte Methode unterscheidet sich von der herkömmlichen Methode nach Böhm in der Zusammensetzung der Proben und des Puffers:

Probe:

3 Kategorien an Plasma:

- TTP-Plasma mit Antikörpern
- TTP-Plasma ohne nachweisbare Antikörper
- Normalplasma

Für die Messung werden bei einem Versuchsdurchlauf dieselben Plasmaproben für jedes Konzentrat verwendet.

Substratpuffer:

Die einzelnen zu untersuchenden Konzentrate wurden 1:20 verdünnt mit 5 mmol/l TRIS - 5 mol/l Harnstoffpuffer.

Reaktionspuffer:

(Siehe 2.2.2.1, unverändert)

Versuchsansatz:

Beispielhafter Ansatz für ein Konzentrat:

Plasmaprobe (15 µl)	Substratpuffer mit Konzentrat X (150 µl)	TRIS Puffer (300 µl)
TTP-Plasma mit AK	+	+
TTP-Plasma ohne AK	+	+
Normalplasma	+	+

Messung:

Die Messung am BCS-Gerät erfolgt ohne vorherige Erstellung einer ADAMTS13 Kalibrationsgerade. Es wird somit ausschließlich die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität gemessen.

Eine Beurteilung der Ergebnisse kann nur innerhalb eines Konzentrats erfolgen. Entscheidend sind die Unterschiede der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität in Abhängigkeit von der Plasmaprobe.

2.2.4 ELISA und Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

2.2.4.1 Technozym[®]ADAMTS13 (Technoclone)

Technozym[®]ADAMTS13 ist ein FRET-ELISA-Kit, welcher aufgrund seines Versuchsaufbaus sowohl ADAMTS13 Aktivität als auch Antigen misst.

Als Grundlage dient die Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) Methode. Bei diesem physikalischen Prozess kommt es durch Dipolwechselwirkungen zu einem Energietransfer zwischen Fluoreszenzmolekülen. Bei Anregung des Donor-Fluorophors verringert sich dessen Fluoreszenz und bewirkt eine Zunahme der Fluoreszenz des Akzeptor-Fluorophors (= Energietransfer).

Die kinetische Messung der Aktivität erfolgt mit Hilfe einer mit monoklonalen ADAMTS13-Antikörpern beschichteten Platte, die ADAMTS13 bindet. Das Substrat für die enzymatische Reaktion ist FRET-S-VWF73, das 73 Aminosäuren aus der VWF-Aminosäuresequenz enthält. FRET-S-VWF73 wird von ADAMTS13 zwischen den Peptiden Y1605 und M1606 gespalten. Als Donor-Fluorophor und Akzeptor-Fluorophor dienen zwei modifizierte Aminosäuren die mit 2-(N-methylamino)benzoyl (Nma) und 2,4-Dinitrophenyl (Dnp) substituiert wurden. Bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge von 340 nm kommt es beim ungespaltenen Substrat zu einem Energietransfer vom Donor (Nma) zum Akzeptor (Dnp). Erfolgt eine Spaltung durch ADAMTS13 kann der Energietransfer nicht stattfinden und das Donor-Fluorophor emittiert bei einer Wellenlänge von 450 nm (Abb. 12) [92].

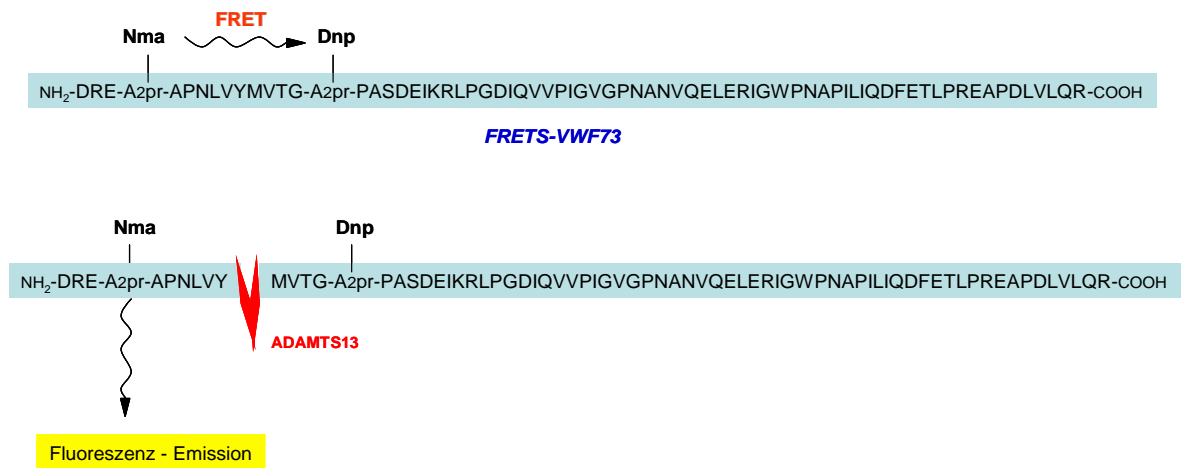


Abb. 12: Struktur von FRET-VWF73: 73 Aminosäuresequenz entspricht der VWF Aminosäuresequenz von D1596 bis R1668. Donor-Fluorophor: Q1599-A2pr(Nma), Akzeptor-Fluorophor: N1610-A2pr(Dnp). Untere Bildhälfte zeigt die Fluoreszenz-Emission des Donors nach Spaltung durch ADAMTS13 [92].

Wichtig für die Detektion der Fluoreszenz ist dabei auch die Gaineinstellung des Filters. Die Gaineinstellung wird reguliert durch die Verstärkerspannung des Detektors und gibt dessen „Empfindlichkeit“ an. Ist dies zu hoch oder zu niedrig, ist keine Unterscheidung der einzelnen Emissionen möglich.

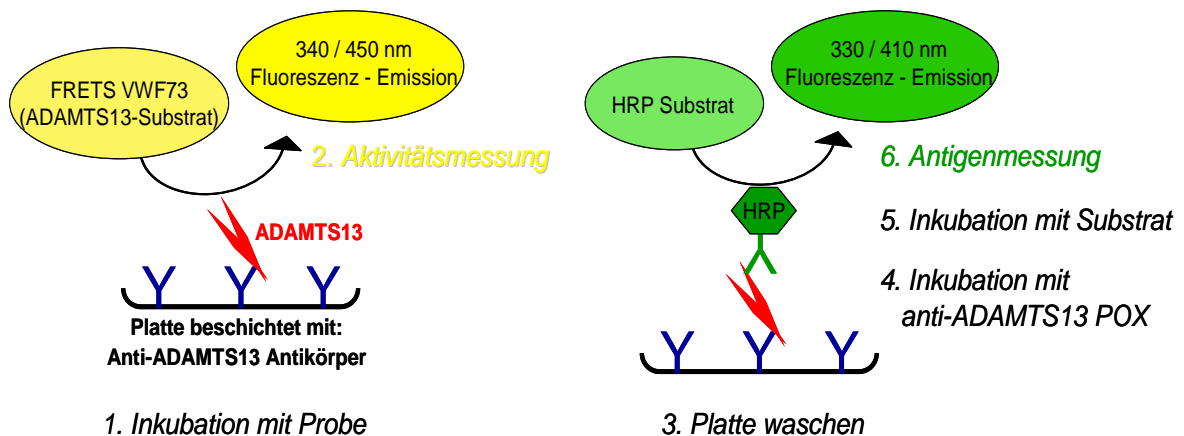


Abb. 13: Schaubild zum Testprinzip (Aktivität- und Antigenmessung) von Technozym® ADAMTS13 ELISA [93].

Der Nachweis des Antigens erfolgt daraufhin durch eine Endpunktmessung. Dabei muss zunächst der zweite Antikörper anti-ADAMTS13 POX an ADAMTS13 binden. Als

konjugierte Peroxidase am Antikörper dient HRP (Meerrettichperoxidase). Durch Zugabe des HRP-Substrats und gleichzeitiger Anregung bei einer Wellenlänge von 330 nm kommt es bei der Spaltung des Substrats zu einer Energieemission bei 410 nm (Abb. 13).

2.2.4.1.1 Materialien

Geräte

Fluoreszenz-Reader:	FLUOstar Omega BMG* LABTECH
Filter:	Extinktion: 340, 330; Emission: 450, 410 Aktivitäts-Gain: 1500; Antigen-Gain: 1400
Computer mit Software:	Messung: Omega control
Auswertung:	MARS Data Analysis, TECHNOZYM ADAMTS-13 Auswertesoftware
Rüttelplatte:	Heidolph Instruments TITRAMAX 100
Wärmeschrank:	Thermo ELECTRON CORPORATION, Heraeus Medical GmbH

Hilfsmittel

Pipetten:	Eppendorf Reference 20 µl, 100 µl und 1000 µl Multipette® plus Eppendorf Digitale Multichannel Pipette 50 – 300 µl, Flow Titerlek® Labsystems for Flow Laboratories
Pipettenspitzen:	200 µl gelb und 1000 µl neutral Starlab, Nümbrecht Combitips 0,5 ml und 5 ml, Eppendorf
Tubes:	1,5 ml Tubes, Eppendorf CELLSTAR® Tubes 50 ml
Tube Rack:	1,7 ml 80 Well Tube Rack, LIGHTLABS®
Bechergläser:	Schott AG
Stoppuhr:	Abbott Diagnostics

Chemikalien

Technozym®ADAMTS13, Technoclone, Österreich:

- Abklebfolien
- Aktivitätssubstrat
- Antigensubstrat
- 12 ELISA-Teststreifen mit jeweils 8 Testvertiefungen
- Inkubationspuffer

Kalibratoren (Standards 1-5)
Konjugat
Kontrollplasmen (hoch und niedrig)
Stabile Peroxidlösung
Stopplösung für Antigensubstrat
Waschpufferkonzentrat
Aqua destillata, Delta Select

Medien

Waschpuffer: Waschpufferkonzentrat 1 Volumenteil
 Aqua destillata. 9 Volumenteile

2.2.4.1.2 Methode

Alle Proben und die benötigten Testkomponenten werden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Für die Versuchsdurchführung werden die Plasmaproben in unbehandeltem Zustand verwendet. Sie sind somit unverdünnt. Zunächst erfolgt die Rekonstitution der Kalibratoren und Kontrollplasmen mit 500 µl Aqua dest.. Nach 15 Minuten Rekonstitutionszeit werden die Reagenzien 10 Sekunden gevortext und sind nun gebrauchsfertig.

Die Kalibratoren, Kontrollplasmen und Plasmaproben (jeweils 50 µl in Doppelbestimmung) werden jetzt zügig in die Testvertiefungen der ELISA-Teststreifen pipettiert. Dabei sind ein genaues, blasenfreies Pipettieren sowie eine sorgfältige Dokumentation der Reihenfolge der aufgetragenen Proben wichtig. Pro Versuchsdurchlauf verwendet man maximal 6 Teststreifen je 8 Testvertiefungen, also können insgesamt 48 Proben gemessen werden. Bei Raumtemperatur und mit Folie abgedeckt wird die ELISA-Platte auf dem Rüttler 120 Minuten inkubiert.

Unter Verwendung der Mehrkanal-Pipette wird die Platte mit Waschpuffer dreimal gewaschen und anschließend gut ausgeklopft. Währenddessen kann die Rekonstitution des Aktivitätssubstrats (FRETS-VWF73) mit 3 ml Aqua dest. erfolgen und nach 15 Minuten gemischt werden. Jeweils 50 µl Aktivitätssubstrat pro Testvertiefung werden mit der Multipette auf die gewaschene Platte pipettiert. Dabei ist zu beachten, dass das Aktivitätssubstrat unmittelbar nach der Rekonstitutionszeit zügig aufgetragen wird. Laut Herstellerangaben darf die Pipettierzeit 10 Sekunden pro Teststreifen nicht überschreiten. Die kinetische Messung, bei 30 °C und einer Filtereinstellung von 340/ 450 nm, muss sofort nach dem Pipettieren des Aktivitätssubstrats gestartet werden. Die Messung im Fluoreszenz-Reader dauert 15 Minuten. Dabei werden jede Minute die „relative

fluorescence units“ (RFU) gemessen. Bei korrekter Einhaltung des Plattenlayouts hinsichtlich der Kalibratoren, Kontrollplasmen und Doppelbestimmungen, können die Rohdaten aus dem MARS Data Analysis Programm entnommen und in die TECHNOZYM ADAMTS13 Auswertesoftware übertragen werden (Abb. 14).

Zunächst wird eine lineare Standardkurve erstellt:

x-Achse: ADAMTS13 Aktivität (%)

y-Achse: RFU/min (Steigung der Kinetikkurve)

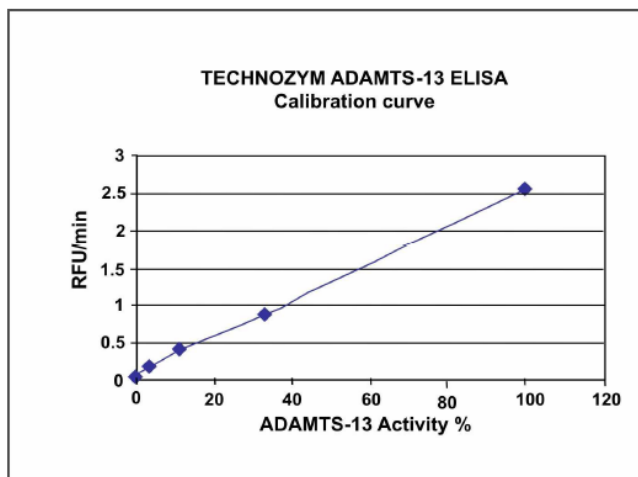


Abb. 14: ADAMTS13 Aktivität in Abhängigkeit von der Fluoreszenz [93].

Die Aktivitätswerte der Proben werden dann an der Standardkurve abgelesen. Die Kontrollwerte und der Variationskoeffizient der Doppelbestimmungen zeigen die Auswertbarkeit des Versuchsdurchlaufs an. Dabei sollte der Variationskoeffizient (CV) nicht über 15 % liegen. Bei den Messungen liegt die untere Nachweisgrenze der ADAMTS13 Aktivität bei 2 % und die obere bei 102,4 %.

Anschließend erfolgt, nach erneuter Waschung der Platte, die Antigenmessung. Dabei wird zunächst die Konjugatgebrauchslösung (anti ADAMTS13 POX) hergestellt, in dem man 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnt. Mit der Multipette werden in die Testvertiefung der Platte jeweils 50 µl Konjugatgebrauchslösung pipettiert. Es folgt eine Inkubation von 60 Minuten bei Raumtemperatur auf der Rüttelplatte. Nach einem weiteren Waschvorgang wird die Antigensubstrat Arbeitslösung (HRP-Substrat) in einem Verhältnis von 1 Volumenteil stabile Peroxidlösung und 9 Volumenteilen Antigensubstrat hergestellt. Davon werden je 50 µl in die Testvertiefungen pipettiert. Im Wärmeschrank wird jetzt die Platte mit frischer Abdeckfolie bei 37 °C für 15

Minuten inkubiert. Pro Testvertiefung wird jetzt 50 µl der fertigen Stopplösung pipettiert und die Platte 10 Sekunden geschüttelt. Anschließend erfolgt die Endpunktmessung bei 330/ 410 nm. Wie bei der Aktivitätsbestimmung kann die endgültige Auswertung mit der Technozym® ADAMTS13 Auswertesoftware vorgenommen werden (Abb. 15).

Die lineare Standardkurve zeigt an:

x-Achse: ADAMTS13 Antigenkonzentration (µg/ml)

y-Achse: relative fluorescence units (RFU)

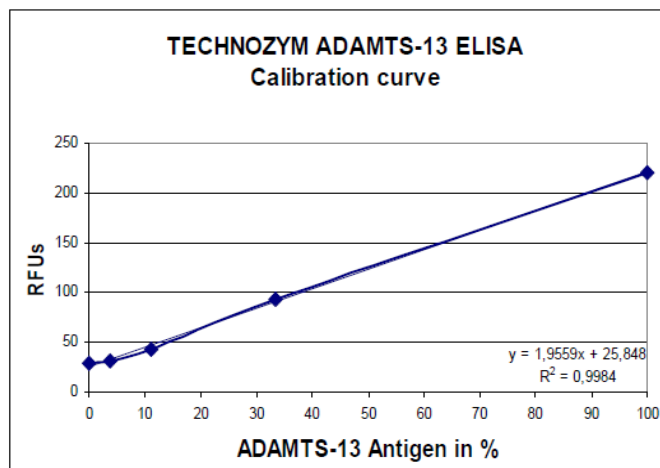


Abb. 15: ADAMTS13 Antigen in Abhängigkeit von der Fluoreszenz ADAMTS13 Aktivität in Abhängigkeit von der Fluoreszenz [93].

2.2.4.2 Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay (American Diagnostica)

Mit dem Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay wird mit Hilfe des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers in vitro die Menge an ADAMTS13 Aktivität bestimmt.

Das Testprinzip des Assays beruht auf denselben Grundlagen wie unter 2.2.4.1 beschrieben. Im Gegensatz dazu wurde hier jedoch ein anderes Substrat für die ADAMTS13 Aktivitätsmessung verwendet (Abb. 16). ALEXA488-VWF86 ist ein rekombinantes FRET Substrat, das auf dem Autoquenching von Fluorescein beruht. Bei der Herstellung des ALEXA488-VWF86 Substrats wurde die A2-Domäne des VWF-Proteins, D1596-R1668 (VWF73), gentechnisch so verändert, dass die Tyrosin-Methionin Schnittstelle von ADAMTS13 durch zwei Cysteine eingerahmt wird. Die Cysteine dienen als Andockstelle für die Fluorophor-Moleküle ALEXA488 (Donor und zugleich Akzeptor) [94].

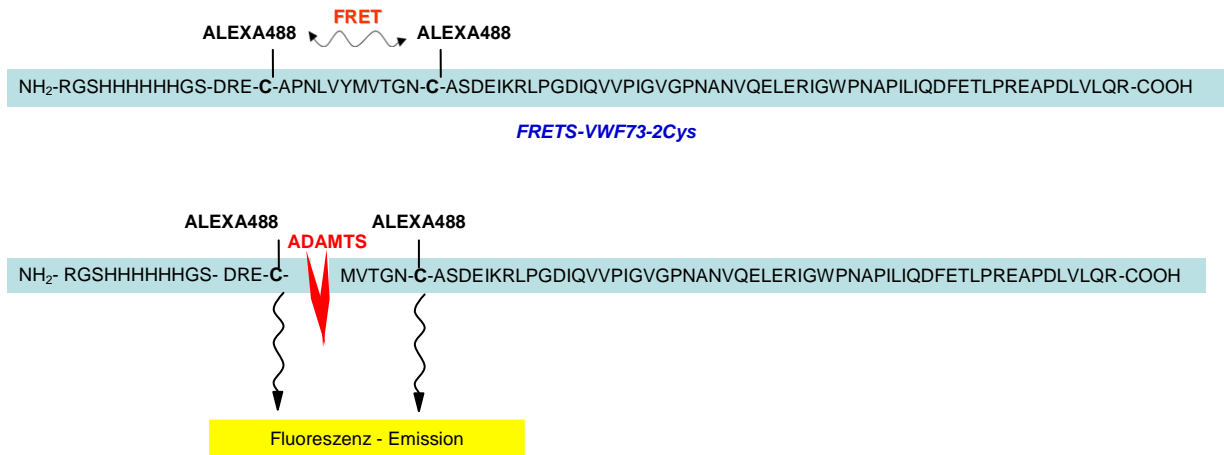


Abb. 16: Struktur von FRET-VWF86 von D1596 bis R1668. Zwei neuartige Cystein-Bindungsstellen für Fluoreszenzmoleküle wurden in das native VWF-Molekül (Beginn beider Aminosäuresequenz DRE) eingefügt: erstes Fluorophor an P28C (ALEXA488), zweites Fluorophor an Q1599 (ALEXA488). Aufgrund der rekombinanten Herstellung unterscheidet sich VWF86 Substrat von der nativen VWF Struktur durch elf zusätzliche Aminosäuren vor der DRE-Region. Die untere Bildhälfte zeigt die Fluoreszenz-Emission der Fluorophore nach Spaltung durch ADAMTS13 [94].

Die Fluorophore der ALEXA-Gruppe zeichnen sich durch ihre Leuchtstärke und ihre Stabilität in einem breiten pH-Bereich (von pH 4 bis pH 10) aus. Des Weiteren sind sie mit vielen gängigen Fluorimetern kompatibel und benötigen zur Auswertung lediglich eine geeignete Software und entsprechende Detektionsfilter (z.B. Extinktion ≥ 485 nm, Emission ≥ 535 nm) [95]. Die Besonderheit des ALEXA488-VWF86-Substrats liegt in seiner Eigenschaft des Self-Quenching: Extinktions- und Emissionsspektra des ALEXA488 überlappen, so dass eine Anregung des ALEXA488 gewährleistet wird [96]. Der Test ermöglicht sowohl eine kinetische Messung des ADAMTS13 Gehalts der Probe, sowie eine Messung durch die Endpunkt Methode. Welche Methode gewählt werden muss, hängt dabei von dem zur Verfügung stehenden Fluorimeter und dessen Leistung ab. Die Ergebnisse des Tests werden in Standardeinheiten (ng/ml) angegeben. Zur Messung wurde das Fluoroskan Ascent FL Fluorimeter genutzt. Es existiert bei diesem System kein vorgegebener Messbereich, da alle Werte aus der Standardkurve interpoliert werden können. Generell gültige Werte werden anhand der Kalibrationsgeraden definiert.

2.2.4.2.1 Materialien

Geräte

Fluorimeter:	Fluoroskan Ascent FL, Thermo Labsystems
Computer mit Software:	Fluoroskan
Wärmeschrank:	Thermo ELECTRON CORPORATION, Heraeus Medical
GmbH Rüttelplatte:	Heidolph Instruments TITRAMAX 100

Hilfsmittel

Pipetten:	Eppendorf Reference 20 µl, 100 µl und 1000 µl Multipette® plus, Eppendorf Digitale Multichannel Pipette 50 – 300 µl, Flow Titerlek® Labsystems for Flow Laboratories
Pipettenspitzen:	100 µl und 1000 µl Starlab Combitips 0,5 ml, 5 ml, 10 ml, Eppendorf
Tubes:	1,5 ml Tubes, Eppendorf CELLSTAR® Tubes 10 ml
Tube Rack:	1,7 ml 80 Well Tube Rack, LIGHTLABS®
Bechergläser:	Schott AG
Stoppuhr:	Abbott Diagnostics

Chemikalien

Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay, American Diagnostica:

- ADAMTS13 inaktiviertes Plasma
- ADAMTS13 Positivkontrolle
- ADAMTS13 Standard
- ALEXA488-VWF86 FRET Substrat
- Assaypuffer
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Fluoreszenz Mikrotiter Streifen (48 Testvertiefungen)

Aqua ad iniectabilia, Delta Select

2.2.4.2.2 Methode

Der Test wird mit der Endpunktmessung durchgeführt. Hierfür rekonstituiert man die mitgelieferten Reagenzien nach Herstellerangaben und bringt alle Plasmaproben zügig auf Raumtemperatur. Anschließend werden sieben ADAMTS13 Standards (120 µl) in 1,5 ml Tubes seriell verdünnt (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 0 %). Vor der Testdurchführung werden die Plasmaproben (30 µl) und die Positivkontrollen (30 µl) 1:2 mit ADAMTS13 inaktiviertem Plasma (30 µl) verdünnt und vorsichtig gemischt. Zuerst wird 80 µl Assaypuffer in jede Testvertiefung pipettiert und der Rest im Wärmeschrank auf 37 °C erwärmt. Je 20 µl ADAMTS13 Standard werden in Vertiefung A1 / A2 bis G1 / G2 und 20 µl der verdünnten Positivkontrolle in die Vertiefungen H1 / H2 pipettiert. Anschließend pipettiert man je 20 µl der verdünnten Plasmaproben in jeweils 2 Testvertiefungen (A3 / A4 bis H5 / H6), da eine Doppelbestimmung erfolgt.

Die Mikrotiterplatte wird in einen Fluoreszenzreader eingesetzt (Ex= 485 nm; Em= 535 nm; Cut-Off bei 530 nm, Temperatur 37 °C) und 3 Minuten im Fluoroskan inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wird das ALEXA488-VWF86 Substrat mit dem vorgewärmten Assaypuffer im Verhältnis 1:25 verdünnt und nach Abschluss der Inkubationszeit werden je 100 µl des verdünnten ALEXA488-VWF86 FRET Substrats in jede Testvertiefung pipettiert. Nach kurzem Schütteln erfolgt die Fluoreszenzmessung direkt beim Start der Reaktion (T=0). Anschließend wird die Platte für weitere 20 Minuten im Fluoreszenzreader bei 37 °C inkubiert und danach die Fluoreszenz erneut gemessen (T= 20). ALEXA488-VWF86 FRET Substrat wird von ADAMTS13 an seinen Tyr/Met Resten proteolytisch gespalten und die entkoppelten ALEXA Fluorophore führen zu einem Anstieg der Fluoreszenz, dabei wird RFU als Messeinheit angegeben. Die Differenz zwischen der ersten und der zweiten Messung (delta RFU) wird dabei für die Errechnung der ADAMTS13 Aktivität herangezogen. Die Konzentrationen der Standards in ng/ml werden gegen delta RFU aufgetragen, daraus ergibt sich eine Kalibrationsgerade. Mit deren Hilfe werden die Konzentrationen der Plasmaproben in ng/ml bestimmt, wobei die ermittelten Konzentrationen mit zwei multipliziert werden müssen, um die Konzentrationen der unverdünnten Positiv- und Plasmaproben zu erhalten.

2.2.4.3 Imubind[®] ADAMTS13 ELISA (American Diagnostica)

Mit dem Imubind[®] ADAMTS13 ELISA Kit wird die ADAMTS13 Antigen Menge bestimmt. Das Testprinzip beruht auf dem Mechanismus eines Doppel-Sandwich-ELISA. Hierbei wird das in der Probe befindliche ADAMTS13 an einen monoklonalen Fängerantikörper auf der Titerplatte gebunden. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird durch einen biotinylierten polyklonalen Detektionsantikörper markiert. Ein biotinylierter Zweitantikörper

bindet wiederum an den Detektionsantikörper. Die Farbreaktion zwischen dem Biotin der Antikörper und Streptavidin aus dem Konjugat wird durch eine Reaktion zwischen TMB und Meerrettichperoxidase verstärkt [97].

2.2.4.3.1 Materialien

Geräte

Spektralphotometer	MRX ^{TC} Revelation, DYNEX Technologies
Wärmeschrank:	Thermo ELECTRON CORPORATION, Heraeus Medical
GmbH Rüttelplatte:	Heidolph Instruments TITRAMAX 100

Hilfsmittel

Pipetten:	Eppendorf Reference 100 µl Multipette [®] plus, Eppendorf Digitale Multichannel Pipette 50 – 300 µl, Flow Titerlek [®] Labsystems for Flow Laboratories
Pipettenspitzen:	100 µl und 1000 µl Starlab Combitips 0,5 ml, 5 ml, 10 ml, Eppendorf
Tube Rack:	1,7 ml 80 Well Tube Rack, LIGHTLABS [®]

Chemikalien

Imubind[®]ADAMTS13 ELISA, American Diagnostica:

- Acetatabdeckfolie
- ADAMTS13-Standard
- Antikörperbeschichtete Microtiterstreifen, 96 Testvertiefungen
- Biotinylierter Detektionsantikörper (Anti-Human ADAMTS13 IgG)
- Enzymkonjugat (Streptavidin und Meerrettichperoxidase)
- Positivkontrolle
- Substrat (3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin Perborat (TMB))
- Testpuffer
- Waschpuffer

Aqua ad iniectabilia, Delta Select

2.2.4.3.2 Methode

Alle mitgelieferten Reagenzien werden nach Herstellerangaben rekonstituiert. Zuerst wird eine serielle Verdünnung des ADAMTS13 Standards zu 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,12 ng/ml und 0 ng/ml vorgenommen. Hierzu wird 200 µl des Standards in die Vertiefungen A1 / A2 und je 100 µl Testpuffer in die Vertiefungen B1 / B2 bis G1 / G2 pipettiert. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe werden 100µl des Standards aus der Testvertiefung A1 / A2 heraus pipettiert, in B1 / B2 gegeben und durch rütteln der Platte kurz gemischt. Diese Vorgehensweise wird bis einschließlich F1 / F2 wiederholt. Abschließend werden 100 µl Probe aus F1/F2 herausgenommen und verworfen. Die 100 µl Testpuffer in Testvertiefung G1 / G2 dienen als Nullwert.

In den folgenden Arbeitsschritten werden die Plasmaproben 1:20 mit Testpuffer verdünnt und je 100 µl Positivkontrolle bzw. verdünnte Plasmaprobe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend deckt man die Vertiefungen mit der Abdeckfolie ab und inkubiert bei 37 °C eine Stunde.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Probeninhalte aus den Vertiefungen entfernt. Mit jeweils 200 µl Waschpuffer wird viermal gewaschen, wobei ein Waschschrift drei Minuten dauert. Vor dem erneuten Befüllen der Testvertiefungen mit Waschpuffer klopft man die Mikrotiterplatte auf einem Papiertuch kräftig aus. Nach dem Waschen werden je 100 µl Detektions-Antikörper in jede Vertiefung pipettiert. Es folgt eine erneute Inkubation nach Abdecken mit Azetatfolie 30 Minuten bei Raumtemperatur auf der Rüttelplatte bei 250 rpm.

Anschließend wird der Waschvorgang wie oben beschrieben wiederholt. Für den folgenden Versuchsschritt pipettiert man 100 µl Enzym-Konjugat in jede Vertiefung. Nach Ablauf einer weiteren 30minütigen Inkubationszeit auf der Rüttelplatte bei Raumtemperatur wird das Enzym-Konjugat, wie oben beschrieben, ausgewaschen.

Unmittelbar nach dem letzten Waschschrift müssen 100 µl Substrat in die Testvertiefungen pipettiert werden. Der Reaktionsansatz inkubiert nach Abdecken mit Azetat-Folie 5 Minuten bei Raumtemperatur. Durch eine Farbreaktion färben sich die Vials blau. Zum Abstoppen der Reaktion werden 50 µl 0,5 M Schwefelsäure den Vertiefungen zugefügt und durch gleichmäßiges Schwenken verteilt. Innerhalb von 10 Minuten kann die Extinktion mit einem Spektralphotometer bei 450 nm Wellenlänge gemessen werden.

Die Standardkurve wird aus den Mittelwerten der gemessenen Extinktionswerte der einzelnen ADAMTS13 Standards, die gegen die entsprechenden ADAMTS13 Konzentration aufgetragen wurden, ermittelt.

Die ADAMTS13 Konzentration der verdünnten Plasmaproben wird aus der Standardkurve interpoliert. Da die Proben 1:20 verdünnt eingesetzt werden, müssen die Messergebnisse

mit 20 multipliziert werden, um die entsprechende ADAMTS13 Konzentration der ursprünglichen Probe zu erhalten:

$$\text{Plasmaprobe} = [\text{ADAMTS13}]_{\text{verdünnte Plasmaprobe}} \times 20$$

Thrombozyten oder Erythrozyten können das Plasma kontaminieren und den Test verfälschen. Daher ist auf die genau Verarbeitung des Plasmas zu achten. Ikterische und lipämische Proben können die Ergebnisse ebenfalls verfälschen.

2.2.5 Bestimmung des ADAMTS13 Antikörpers

Durch die ADAMTS13 Antikörpertestung können Autoantikörper gegen ADAMTS13 im Patientenplasma nachgewiesen werden. Antikörper gegen ADAMTS13 können durch verschiedene Pathomechanismen im Patienten gebildet werden.

Ziel der Methode ist der Nachweis einer reduzierten ADAMTS13 Aktivität in einer Probe, die sich aus Patientenplasma und inaktiviertem Patientenplasma zusammensetzt. Gemessen wird die Plasmaprobe mit der BCS-Methode nach Böhm [98].

2.2.5.1 Materialien

Siehe 2.2.2.1

2.2.5.2 Methode

Für die Antikörperbestimmung muss als erstes ein Teil des Patientenplasmas und des Poolplasmas deaktiviert werden. Für den Versuch in Doppelbestimmung werden 60 µl deaktiviertes Patientenplasma benötigt und ca. 300 µl deaktivierter Normalpool. Die Proben werden für 30 Minuten bei 60 °C im Wasserbad denaturiert und anschließend 10 Minuten bei 12000 rpm abzentrifugiert. Das dabei entstandene deaktivierte Plasma wird als d-Plasma gekennzeichnet.

Anschließend werden 35 µl des d-Patientenplasmas mit 35 µl Poolplasma gemischt, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und abschließend wieder bei 12000 rpm zentrifugiert. Aus diesem Überstand werden je zweimal 15 µl für die Aktivitätsbestimmung gebraucht. Als Kontrolle mit 50%iger Aktivität dient eine Probe aus 35 µl d-Pool und 35 µl Pool.

Zur Bestimmung der Restaktivität wird nun zu Beginn mit Hilfe von Poolplasma und d-Pool eine serielle Verdünnung durchgeführt (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 %).

Diese dient als Kalibrationsgerade, während die obengenannte 50%ige Verdünnung von Normalpool mit d-Pool als interner Standard mitläuft.

Je 15 µl jeder Probe, im Doppelansatz, werden mit 300 µl Reaktionspuffer und 150 µl Substratpuffer versetzt. Die Ansätze werden kurz auf der Rüttelplatte gemischt und anschließend im Wärmeschrank bei 37 °C 16 Stunden inkubiert.

Nach abgelaufener Reaktionszeit wird die Restaktivität der Proben, wie oben beschrieben, mit dem BCS-Gerät gemessen.

Der ADAMTS13 Antikörpertiter wird aus der Restaktivität der d-Patientenprobe und der Kontrolle errechnet:

$$\text{Antikörpertiter} = \frac{\text{Restaktivität von (d-Patientenlasma + NP)}}{\text{Restaktivität der Kontrolle (d-Pool + NP)}}$$

Der Antikörpertiter wird in Prozent umgerechnet und anhand der Prozente kann der Bethesda-Wert (BE) aus der Antikörpertiter-Tabelle entnommen werden. Die Hemmung der ADAMTS13 Aktivität um 50 % entspricht einer Bethesda Einheit. Klinisch werden Antikörpertiter mit >0,2 BE angegeben.

2.3 Methodenvergleich

Zur Messung der ADAMTS13 Aktivität stehen die unter 2.2.1, 2.2.4.1 und 2.2.4.2 beschriebenen Methoden zur Verfügung. Vor Versuchsbeginn wurde eine Methodvalidierung durchgeführt, in deren Kern ein Vergleich der einzelnen Methoden steht.

Inhalt und Ziel der Validierung ist es, aus der statistischen Beurteilung der Analysenwerte Rückschlüsse auf die Zuverlässigkeit der jeweiligen Methoden zu ziehen.

Folgende Qualitätsparameter zur Bestimmung der Zuverlässigkeit der Messmethoden standen zur Verfügung [99-101]:

- Präzision
- Richtigkeit
- Genauigkeit
- Robustheit
- Nachweisgrenze

Des Weiteren wurde die Brauchbarkeit der einzelnen Methoden überprüft und miteinander verglichen. Dabei werden die Rentabilitätskriterien nach Kny [102] herangezogen:

- Zeitaufwand (Personalkosten)
- Materialkosten
- Gerätekosten
- Aufwendigkeit der Versuchsdurchführung

Alle untersuchten Faktoren stellen Indikatoren für den Methodenvergleich dar und schaffen eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der angewandten Methoden.

2.3.1 Versuchsaufbau

Richtlinien zur Messprozedur

Nach der CLSI Guidline EP9 sollen für einen Methodenvergleich ca. 40 Proben in Doppelbestimmung gemessen werden, die sich über den gesamten Messbereich erstrecken. Die Messungen sollten an mehreren Tagen erfolgen, wobei jedoch die Proben mit den verschiedenen Methoden am selben Tag untersucht werden müssen.

Es ist darauf zu achten, dass die Konzentrationen der Proben über den ganzen Konzentrationsbereich verteilt sind. Ein besonderer Focus liegt jedoch bei den Konzentrationen im Bereich der oberen und unteren Nachweisgrenze [100, 101].

Gemäß dieser Richtlinie wurden Proben mit den folgenden zu erwartenden ADAMTS13 Konzentrationen ausgewählt:

- im niedrigen Konzentrationsbereich:
Patienten mit TTP (mit und ohne nachweisbare Antikörper),
- im physiologischen Bereich:
Patient mit TTP-Like Syndrom,
Patient mit hämolytisch urämischem Syndrom (HUS),
Normalpool
- im hohen physiologischen Bereich:
Fresh Frozen Plasma
Solvent / detergent behandeltes Plasma

Zudem wurde eine Referenzsubstanz mit vorgegebener ADAMTS13 Konzentration von 582 ng/ml (± 50 ng/ml) untersucht [97]. Die jeweiligen Proben wurden mit allen Methoden 15- bis 20mal in Doppelbestimmung über insgesamt sechs Wochen gemessen.

2.1.2 Versuchsergebnisse

Aus den ermittelten Messdaten aller Proben wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung gebildet. Durch die vom Hersteller festgelegte Angabe der ADAMTS13 Aktivität der Positivkontrolle konnte im Bezug auf die angegebenen 582 ng/ml ± 50 ng/ml zusätzlich die Richtigkeit und die Genauigkeit bestimmt werden. Die Daten sind in der folgenden Tabelle 9 dargestellt.

Methoden	Proben	Mittelwert (ng/ml)	Standard-Abweichung	Richtigkeit	Genauigkeit
BCS- Methode nach Böhm	Positiv- kontrolle	548,52	$\pm 109,30$	51,48	-8,58
	TTP mit AK	049,25	$\pm 009,23$		
	TTP ohne AK	098,35	$\pm 037,73$		
	HUS	540,29	$\pm 164,86$		
	TTP-Like Syndrom	373,10	$\pm 137,63$		
	FFP	649,73	$\pm 014,32$		
	s / d Plasma	542,03	$\pm 017,05$		
	Konzentrate	-	-		

Fortsetzung Tabelle 9 folgende Seite

Methoden	Proben	Mittelwert (ng/ml)	Standard- Abweichung	Richtigkeit	Genauigkeit
Technozym® ADAMTS13	Positiv- kontrolle	506,25	126,97	93,75	-15,63
	TTP mit AK	021,67	018,36		
	TTP ohne AK	043,79	017,53		
	HUS	582,41	180,61		
	TTP-Like Syndrom	574,66	124,96		
	FFP	567,46	021,48		
	s / d Plasma	593,50	018,08		
	Konzentrare	020,23	005,09		
Methoden	Proben	Mittelwert (ng/ml)	Standard- Abweichung	Richtigkeit	Genauigkeit
Actifluor™ ADAMTS13	Positiv- kontrolle	631,81	± 052,33	31,81	5,30
	TTP mit AK	040,55	± 012,11		
	TTP ohne AK	082,06	± 302,94		
	HUS	766,87	± 085,71		
	TTP-Like Syndrom	508,56	± 085,37		
	FFP	719,95	± 199,65		
	s / d Plasma	766,13	± 157,20		
	Konzentrare	078,30	± 148,42		

Tab. 9: Die statistischen Qualitätsparameter der BCS-Methode nach Böhm, der Actifluor™ADAMTS13 Methode und der Technozym®ADAMTS13 Methode.

Außerdem wurden Faktoren wie Zeit, Materialkosten, benötigte Messgeräte, Schwierigkeitsgrad bzw. Aufwand der Methode sowie der Messbereich und die Einheiten der erhaltenen Ergebnisse für die einzelnen Methoden miteinander verglichen. Diese Rentabilitätskriterien sind unter Tabelle 10 aufgelistet.

Methode	Zeit (Stunden)	Material- kosten (16 Proben)	Messgeräte	Aufwand/ Schwierig- keit	Messbereich und Einheit
Actifluor™ ADAMTS13 American Diagnostica	1	422,33	Fluorimeter	Einfach	22 bis 720 ng/ml
Technozym® ADAMTS13 Technoclon	3	374,85	BMG Omega Fluorimeter	Relativ einfach	2 bis 104,6 %
BCS- Methode nach Böhm	19	160,00	BCS-Gerät	schwierig	6,2 bis 100 %

Tab. 10: Gegenüberstellung der Rentabilitätskriterien der Methoden.

2.3.2.1 BCS-Methode nach Böhm

Diese Methode zeigt die beste Präzision bei ADAMTS13 Aktivitäten an der unteren Nachweisgrenze. Dieser statistische Wert muss jedoch differenziert betrachtet werden, da die Nachweisgrenze bei 6,2 % höher als bei den anderen Methoden liegt. Somit ergibt sich eine geringere Variabilität der niedrigen Werte (Tab. 9 und 10).

Die Präzision lässt mit steigender ADAMTS13 Aktivität nach. Dies ist mit dem Verlauf der Standardkurve zu erklären. Das Verhältnis zwischen gemessener Extinktion und ADAMTS13 Konzentration in % verläuft nicht linear, wodurch man eine Standardkurve erhält. Zu Beginn führen Konzentrationsänderungen zu einem starken Anstieg der Extinktion, während bei Änderungen im hohen Konzentrationsbereich nur noch ein geringer Anstieg der Extinktion messbar ist (2.2.1). Die Genauigkeit und die Richtigkeit sind gut und mit dem des Actifluor™ ADAMTS13 Kits fast identisch.

Diese Methode misst im Gegensatz zu den beiden anderen die ADAMTS13 Aktivität nicht direkt, sondern indirekt, wodurch sie störanfälliger wird. Das verwendete BCS-Gerät ist auf die Messung der VWF-Ristocetin-Cofaktor-Aktivität ausgelegt. Durch die Erweiterung des Versuchsaufbaus kann die ADAMTS13 Aktivität bestimmt werden, jedoch potenzieren

sich dadurch mögliche Fehlerquellen. Dies ist zum einen darauf begründet, dass sämtliche Reagenzien vor jedem Versuchsansatz frisch hergestellt werden. Außerdem können Chargenunterschiede des Wilfactin[®] im Substratpuffer zu Schwankungen der Messergebnisse führen. Diese werden zum einen durch einen unterschiedlichen VWF-Gehalt als auch durch variable ADAMTS13 Eigenaktivität (3.1.4) hervorgerufen. Die Inkubationszeit von 14 bis 16 Stunden wurde experimentell von M. Böhm (2004) [98] bei der Einführung der Methode ermittelt. Durch abweichende Inkubationszeiten zwischen 16 bis 20 Stunden könnten Aktivitätsschwankungen begründet sein. Als weitere Fehlerquelle sind die Chargenunterschiede des für die Messung benötigten BC VW-Reagenz von Dade Behring zu nennen, begründet durch die Herstellung aus Humanspenden.

Trotz geringer Materialkosten ist diese Methode bei der Kosten-Nutzen-Analyse im Vergleich zu den anderen Methoden schlechter. Dies liegt an einem sehr hohen Zeitaufwand und einer anspruchsvollen Versuchsdurchführung. Erst bei einer hohen Frequenz an Messungen lohnt es sich, diese Methode durchzuführen.

2.3.2.2 Technozym[®] ADAMTS13

Die Präzision des Technozym[®]ADAMTS13 Kits ist in hohen Aktivitätsbereichen gegenüber dem Actifluor[™]ADAMTS13 Kit zwar unterlegen, aber annähernd gleich mit der BCS-Methode nach Böhm. Im Aktivitätsbereich an der Nachweisgrenze zeigt die Methode eine hohe, bei TTP-Formen mit einer messbaren geringen ADAMTS13 Aktivität die höchste Präzision. Richtigkeit und Genauigkeit sind den anderen beiden Methoden unterlegen. Das Preis-Leistungsverhältnis des Kits ist sehr gut, da sowohl Aktivität als auch Antigen mit Hilfe desselben Kits nacheinander bestimmt werden können. Somit kann ein direkter Bezug zwischen der Aktivität und der Menge des Enzyms ermittelt werden.

Der hohe Arbeitsaufwand und die hohen Anschaffungskosten des benötigten Gerätes ergeben hingegen ein schlechtes Kosten-Nutzen-Verhältnis. Außerdem treten Störungen bei der Messung auf, wenn gleichzeitig hohe VWF-Konzentrationen vorliegen. Möglicher Grund hierfür könnte die Konkurrenz zwischen VWF Multimeren der Probe und dem Aktivitätssubstrat FRETs-VWF73 um die ADAMTS13 Bindungsstelle sein.

2.3.2.3 Actifluor[™] ADAMTS13

Der Actifluor[™]ADAMTS13 Kit zeigt eine hohe Präzision bei den mittleren als auch bei den hohen ADAMTS13 Aktivitätswerten. Im sehr niedrigen Bereich ist die Präzision im Vergleich unterlegen. Bezüglich Richtigkeit und Genauigkeit weist das Kit die besten Ergebnisse auf. Außerdem ist dies die einzige der drei Methoden, bei der das Ergebnis in

Standardeinheiten (ng/ml) angegeben wird. Dadurch ist aber auch ein Vergleich der Methodenergebnisse untereinander erschwert. Durch eine interne Validierung wurde jedoch ein Umrechnungsfaktor von 7,2 ermittelt. Die Handhabung des Kits ist ausgesprochen einfach und klar. Zudem ist die Versuchsdurchführung innerhalb einer halben Stunde abgeschlossen und die anschließende Auswertung kann mit einem Standardfluorimeter erfolgen. Aufgrund der dadurch geringen Personalkosten ist der Kosten-Nutzen-Faktor trotz der höheren Materialkosten am besten.

2.3.3 Methodenvergleich nach Passing und Bablok

Mittels eines speziellen Regressionsverfahrens nach Passing und Bablok werden jeweils zwei Methoden miteinander verglichen.

Bei diesem Regressionsverfahren wird davon ausgegangen, dass beide Messreihen nicht ohne Fehler sind, die Verteilung der Messwerte nicht zwangsläufig der Normalverteilung entspricht, die Varianz nicht über den gesamten Konzentrationsbereich konstant ist und mögliche Ausreißer nicht immer als grobe Messfehler angesehen werden [103]. Wichtig ist dabei die Abweichung der beiden Methoden am „Entscheidungspunkt“ (Bias).

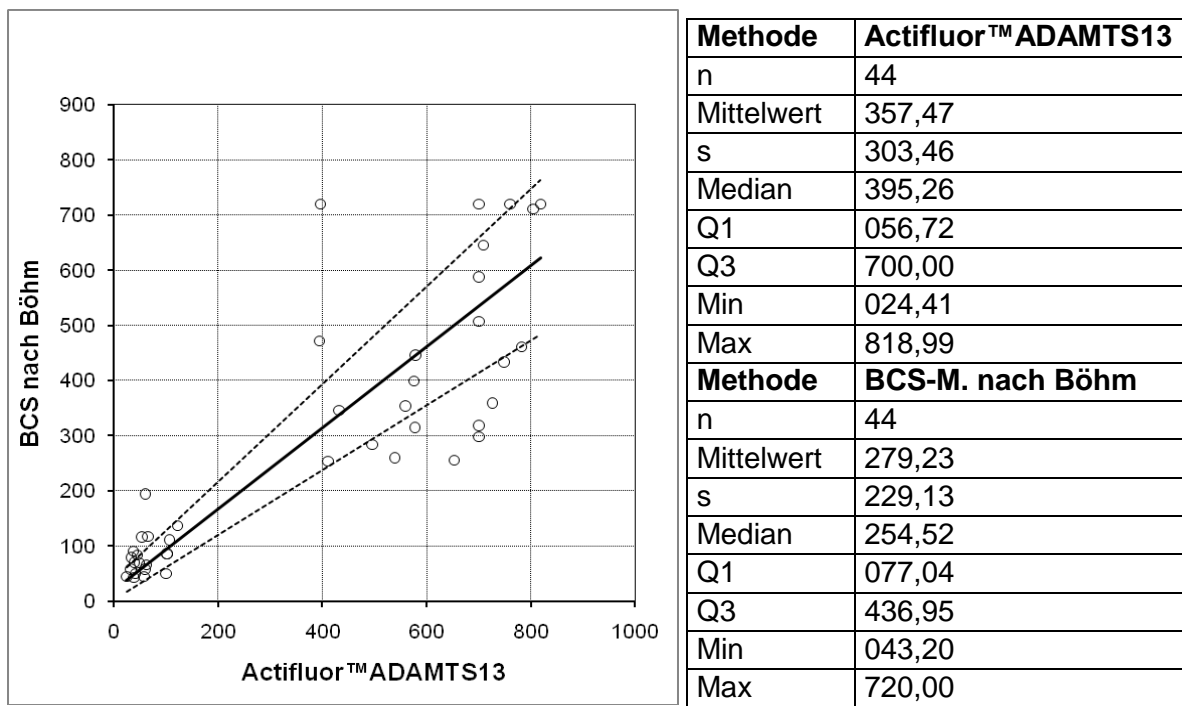


Abb. 17: Passing-Bablok Regression von der BCS-Methode nach Böhm und Actifluor™ ADAMTS13. Die Steigung der Regressionsgerade beträgt 0,74 und der Schnittpunkt mit der y-Achse ist bei 20,38. Daraus ergibt sich die Gleichung: $f(x)=0,74x + 20,38$.

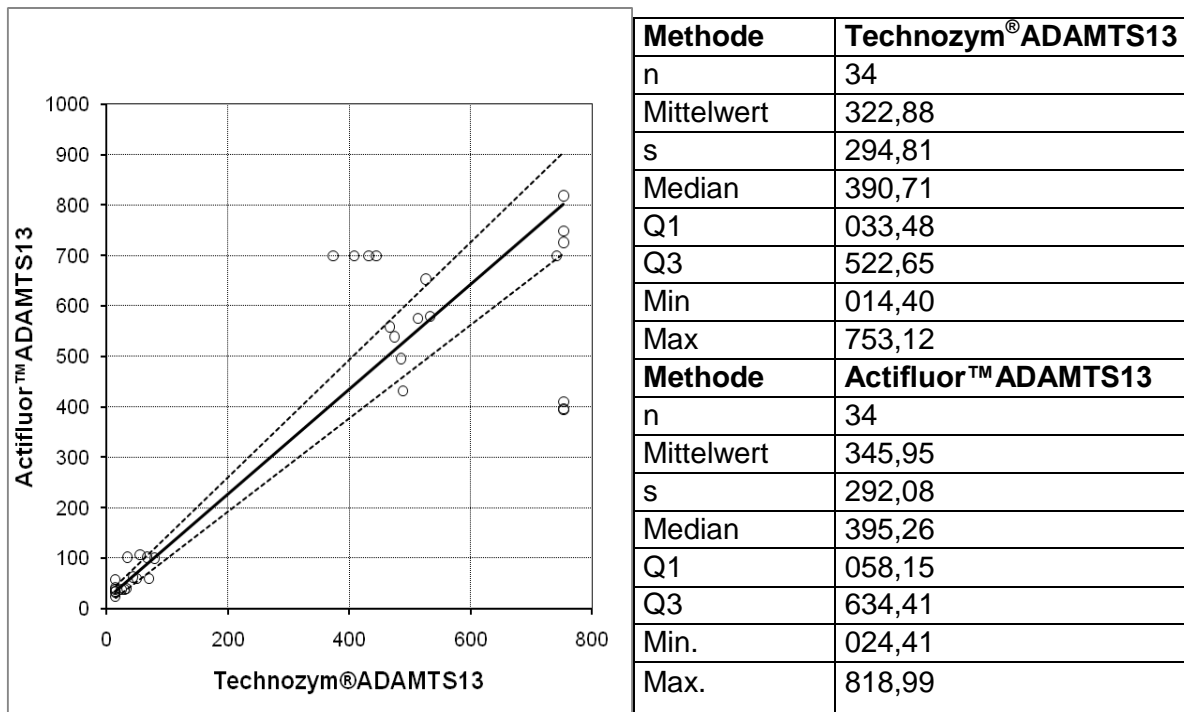


Abb. 18: Passing-Bablok Regression von Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13. Die Steigung der Regressionsgerade beträgt 1,04 und der Schnittpunkt mit der y-Achse ist bei 18,12. Daraus ergibt sich die Gleichung: $f(x)=1,04x + 18,12$.

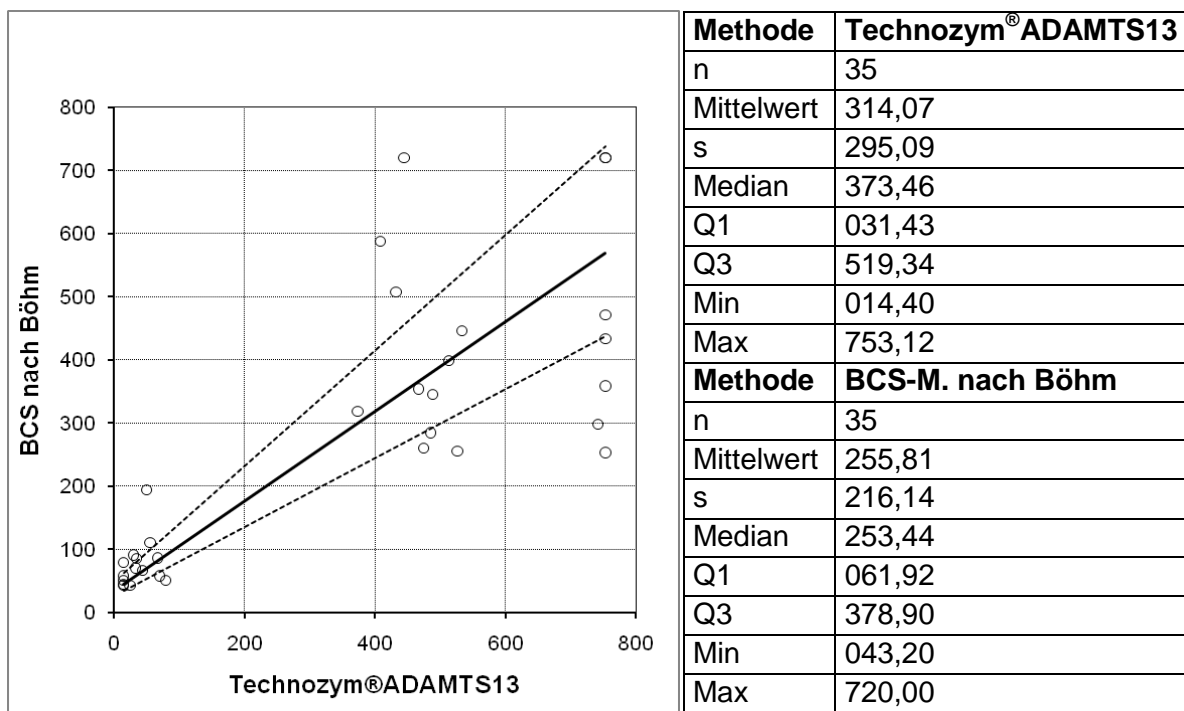


Abb. 19: Passing-Bablok Regression von der BCS-Methode nach Böhm und Technozym®ADAMTS13. Die Steigung der Regressionsgerade beträgt 0,71 und der Schnittpunkt mit der y-Achse ist bei 34,40. Daraus ergibt sich die Gleichung: $f(x)=0,71x + 34,40$.

An Hand der Regressionsanalyse erkennt man, dass Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13 die größte Übereinstimmung der Messwerte aufweisen. Die Regressionsgerade weist mit der Steigung 1,04 einen nahezu optimalen Wert auf, ist jedoch um den Wert 18,12 an der y-Achse nach oben verschoben. Daraus kann man folgern, dass Actifluor™ADAMTS13 leicht höhere Werte für dieselbe Probe misst als Technozym®ADAMTS13. Bei Messwerten im höheren ADAMTS13 Aktivitätsbereich variieren diese stärker als im niedrigen Aktivitätsbereich. Dies wird durch die Form des Konfidenzintervalls um die Regressionsgerade beschrieben.

Der Vergleich von Actifluor™ADAMTS13 und der BCS-Methode nach Böhm liefert solide Werte. Die Steigung der Regressionsgeraden von 0,74 zeigt, dass bei der BCS Methode nach Böhm niedrigere Werte zu erwarten sind als bei der Messung derselben Probe mit Actifluor™ADAMTS13. Die Messwerte variieren stärker um die Regressionsgerade und es sind mehr Messwerte außerhalb des Konfidenzintervalls zu erkennen.

Die größten Unterschiede bei der Regressionsanalyse weisen die BCS-Methode nach Böhm und Technozym®ADAMTS13 auf. Sowohl die Verschiebung des y-Achsen Schnittpunkts um 34,4 als auch die Steigung von 0,71 zeigen die stärkste Abweichung vom Idealwert. Des Weiteren ist hier das Konfidenzintervall am größten und die Anzahl der Werte außerhalb des Intervalls am höchsten, insbesondere im höheren ADAMTS13 Aktivitätsbereich.

2.3.4 Schlussfolgerung

Durch diesen Methodenvergleich konnte bewiesen werden, dass alle drei Methoden, trotz ihrer Vor- und Nachteile, für die Analytik der ADAMTS13 Aktivität geeignet sind. Alle Methoden können sicher die pathologischen Werte von den normalen unterscheiden.

Je nach zu erwartendem ADAMTS13 Aktivitätsbereich der Probe sind unterschiedliche Methoden zu bevorzugen. Im hohen Bereich liefert der Actifluor™ADAMTS13 Assay, im niedrigen Bereich die BCS-Methode nach Böhm die präzisesten Werte.

Vorteil der FRET's Methoden ist die direkte Aktivitätsmessung. Vor allem die Ergebnisse in Standardeinheiten (ng/ml) des Actifluor™ADAMTS13 Assays erlaubt eine präzise und sehr genaue Messung. Bei Technozym®ADAMTS13 kann außerdem noch die Antigen-Messung parallel durchgeführt werden und gibt somit Informationen über die direkte Korrelation zwischen Aktivität und Antigen an.

3 Ergebnisse

3.1 Gerinnungsfaktorkonzentrate

Es wurden Gerinnungsfaktorpräparate mit unterschiedlichen Konzentrationen an VWF und / oder Faktor VIII (Tab. 11) auf ihre ADAMTS13 Aktivität und ADAMTS13 Antigen untersucht. Des Weiteren wurde das VWF Multimermuster dargestellt und auf die Anwesenheit von ultralangen VWF Multimeren sowie auf ADAMTS13 Antikörper getestet. Zur Messung der ADAMTS13 Aktivität ist die BCS-Methode nach Böhm und die beiden FRET-Assays Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13 verwendet worden. Diese Methoden kamen auch bei der Bestimmung der ADAMTS13 Antikörper zum Einsatz.

ADAMTS13 Antigen wurde mittels Technozym®ADAMTS13 und Imubind®ADAMTS13 ELISA bestimmt.

Die VWF Multimere wurden mit der SDS-Gelelektrophorese dargestellt. Mit einer Agarosekonzentration von 1 % wurde auf ultralange VWF Multimere getestet und mit einer Konzentration von 1,6 % bzw. 2 % wurde die Multimerstruktur untersucht.

Die aus Humanplasma gewonnenen Konzentrate Haemate®P, Immunate STIM plus und Wilate® enthalten in unterschiedlichen Mengen sowohl Faktor VIII als auch VWF.

Wilfactin® (mittlerweile als Wilfact® auch in Deutschland zugelassen) beinhaltet hauptsächlich VWF und die Konzentrate Kogenate® und Beriate®P sind reine Faktor VIII Konzentrate. Kogenate® stellt das einzige untersuchte rekombinante Präparat dar.

Damit die Konzentrate trotz der unterschiedlichen Mengen an Faktor VIII und VWF verglichen werden konnten, wurden die jeweiligen Verdünnungen so gewählt, dass Konzentrationen von 16 U/ml und 2 U/ml im Bezug auf den VWF entstanden. Beriate®P bildet dabei eine Ausnahme, da hier die Konzentration wegen des Fehlens des VWF auf den Faktor VIII bezogen wurde. Zudem sollten mit der Messung der Verdünnungen mögliche Interaktionen, zum Beispiel durch den hohen VWF Anteil, aufgedeckt werden und außerdem wurden die ADAMTS13 Messergebnisse der unverdünnten Probe damit überprüft. Nachdem für die vorliegende Arbeit die ADAMTS13 Konzentration und Aktivität der unverdünnten Konzentrate von Bedeutung waren und für die oben genannten Punkte nur wenige Messwerte der Verdünnungen ausreichen, sind die Verdünnungen aus Kostengründen sparsam untersucht worden.

Die Konzentrate und die dazugehörigen Angaben wurden von den jeweiligen Herstellern freundlicher Weise zur Verfügung gestellt.

Präparat	Hersteller	Ausgangsmaterial	Virusinaktivierung	VWF	FVIII
Haemate®P	CSL Behring GmbH	Humanplasma	Pasteurisierung	2400 I.E. 160 U/ml	1000 I.E. 66,6 U/ml
Immunate STIM plus	Baxter AG	Humanplasma	solvent / detergent; feuchte Hitze	125 I.E. 25 U/ml	250 I.E. 50 U/ml
Wilate®	Octapharma GmbH	Humanplasma	solvent / detergent; feuchte Hitze	800 I.E. 80 U/ml	900 I.E. 90 U/ml
Wilfactin®	LFB Biomédicamentes	Humanplasma	solvent / detergent; Filtration; trockene Hitze	1000 I.E. 100 U/ml	-
Kogenate®	Bayer	rekombinant (Baby-Hamster-Nieren-Zellen)	solvent / detergent	-	1000 I.E. 400 U/ml
Beriate®P	CSL Behring GmbH	Humanplasma	Pasteurisierung	-	250 I.E. 100 U/ml

Tab. 11: Auflistung der zu untersuchenden Konzentrate mit herstellender Firma, Ausgangsmaterial, Virusinaktivierungsverfahren sowie Inhaltsstoffen und ihrer Konzentration im Lyophilisat (I.E.) und nach Auflösung mit Puffer / Aqua ad iniectionabilia (U/ml).

3.1.1 Haemate®P

Haemate®P enthält den höchsten Anteil an VWF und FVIII und weist nach Auflösung in 15 ml Aqua ad iniectionabilia die Konzentration von 160 U/ml VWF und 66,6 U/ml FVIII auf. Ausgehend von dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe mit Aqua ad iniectionabilia erstellt, die sich auf die Hauptkomponente, den VWF, bezieht. Die Verdünnungsstufen sind 50 %, 25 %, 10 % und 1,25 %. Dies entspricht einer Konzentration des VWF von 80 U/ml, 40 U/ml, 16 U/ml und 2 U/ml.

3.1.1.1 Gelelektrophorese

Für die Erstellung der Multimeranalyse wurde Haemate[®]P in einer Konzentration von 5 U/ml und 2 U/ml hergestellt. Mittels eines 1%igen Agarosegels wurde die Aufgetragene Haemate[®]P Probe hinsichtlich der VWF Struktur dargestellt und mit einem 1,6%igen Agarosegel auf UL VWF Multimere getestet.

Im 1,6 % Agarosegel zeigten sich nach der Anfärbung die Multimerbanden mit den für den VWF typischen Satellitenbanden (Abb. 20).

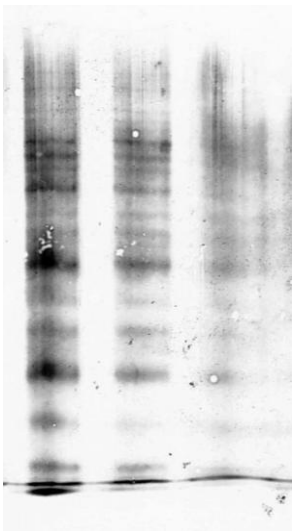


Abb. 20: Haemate[®]P mit 5 U/ml und 2 U/ml in einem 1,6 % Agarosegel neben unverdünntem Normalpool (von links nach rechts).

Im 1%igen Agarosegel sind deutlich größere Mengen an UL VWF Multimere zu identifizieren. Dies ist durch die Banden oberhalb der letzten erkennbaren Bande des Normalpools und an dessen Intensität erkennbar (Abb. 21).

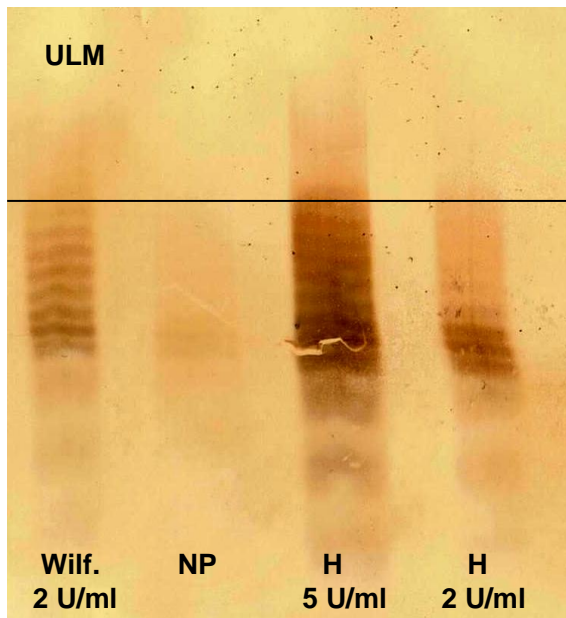


Abb. 21: 1%iges Agarosegel mit (von links nach rechts) Wilfactin[®] 2 U/ml zum Vergleich, Normalpool als Standard und Haemate[®]P 5 U/ml und 2 U/ml. ULM: ultralange VWF Multimere, Wilf.: Wilfactin[®], NP: Normalpool, H: Haemate[®]P.

3.1.1.2 ADAMTS13 Aktivität

Modifizierte BCS-Methode nach Böhm

Indirekt kann über die VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität auf die ADAMTS13 Aktivität zurück geschlossen werden. Drei Ansätze, einer mit Plasma eines TTP Patienten mit Antikörpern, einer mit Plasma eines TTP Patienten ohne nachweisbare Antikörper und einer mit Normalpool wurden mit einer definierten Menge Haemate[®]P versetzt. Nach fünf Messungen zeigt sich eine durchschnittliche Ristocetin-Cofaktor-Aktivität für den Ansatz TTP mit Antikörper von 40,9 %, für den mit TTP ohne nachweisbare Antikörper von 19,78 % und für den mit Normalpool von 11,64 % (Abb. 22). Daraus kann für Haemate[®]P auf eine ADAMTS13 Aktivität zurück geschlossen werden.

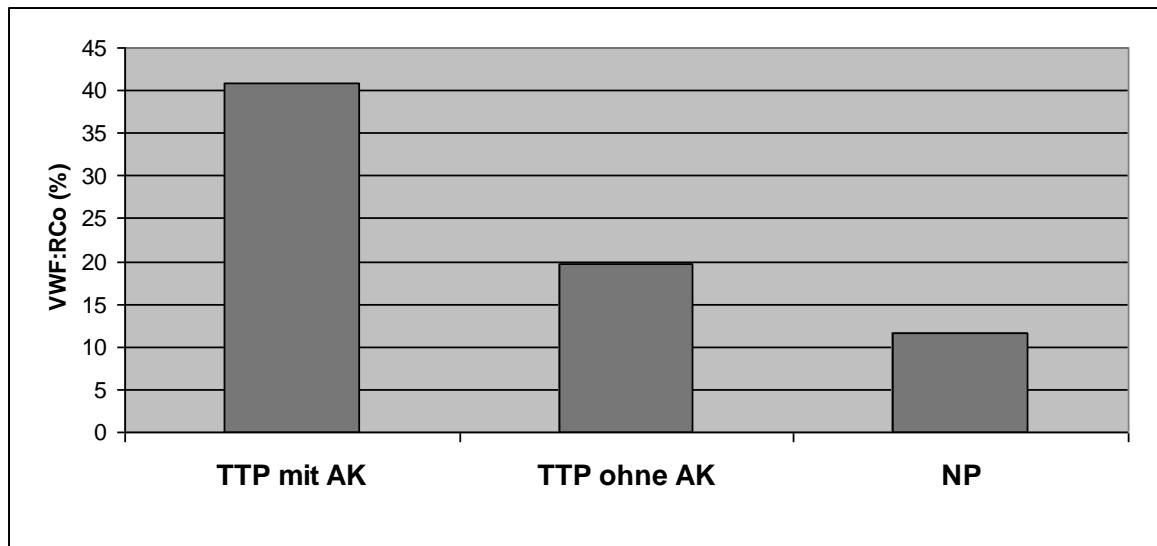


Abb. 22: Durchschnittliche Ristocetin-Cofaktor-Aktivität von unverdünntem Haemate[®]P gemessen in einem Ansatz von TTP mit Antikörpern (AK), einem Ansatz von TTP ohne Antikörpern und einem Ansatz mit Normalpool (NP).

Technozym[®] ADAMTS13

An 11 Messtagen wurde die ADAMTS13 Aktivität mit dem Technozym[®] ADAMTS13 Kit für die unterschiedlich konzentrierten Haemate[®]P Proben ermittelt (Tab. 12). Der aus den Einzelmessungen errechnete Mittelwert ist in Abhängigkeit von den Konzentrationen in Abbildung 22 graphisch dargestellt.

Die ADAMTS13 Aktivität, die mit dem Technozym[®] ADAMTS13 Kit für Haemate[®]P ermittelt wurden, liegt mit durchschnittlich 12,3 % im unteren Aktivitätsbereich. Die höchste gemessene ADAMTS13 Aktivität beträgt 24,15 %, die niedrigste 5,18 %. Die übrigen Werte liegen überwiegend im Bereich zwischen 10 % bis 15 %.

Tendenziell nimmt die Enzymaktivität mit zunehmender Verdünnung ab, jedoch zeigt sich bei Betrachtung der Einzelmessungen in einigen Fällen auch eine Zunahme der Aktivität trotz einer höheren Verdünnung. Die Standardabweichung wurde für die Konzentrationen berechnet, bei denen sechs oder mehr Messungen durchgeführt wurden. Bei 160 U/ml beträgt sie $\pm 5,0$, bei 80 U/ml $\pm 4,6$, bei 16 U/ml $\pm 3,2$ und bei 2 U/ml $\pm 1,0$. Die Präzision bei den sehr niedrigen ADAMTS13 Aktivitäten ist damit sehr gut, muss aber kritisch betrachtet werden, da die Aktivitäten am untersten Messbereich des Kits liegen. ADAMTS13 Aktivitäten unter 2,00 % werden nicht weiter differenziert, sondern mit $\leq 2,00$ % angegeben.

Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse in %					
1	24,15				02,00	2,00
2	15,12	13,91			11,30	2,00
3	10,26	07,79			06,48	2,63
4	16,19	02,00			04,96	4,53
5	07,18	13,42	7,58	5,47		
6	10,49	07,13	2,00	2,00		
7	12,38	02,00			02,00	2,27
8	09,63	04,50			02,00	
9	12,64				02,55	2,00
10	05,18	2,44	2,00		02,00	
11	11,79	6,91			02,90	
MW	12,3	6,7	3,9	3,7	4,0	2,6
s	± 5,0	± 4,6			± 3,2	± 1,0

Tab. 12: Messergebnisse des Technozym®ADAMTS13 Kits für die ADAMTS13 Aktivität von Haemate®P in unterschiedlichen Konzentrationen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

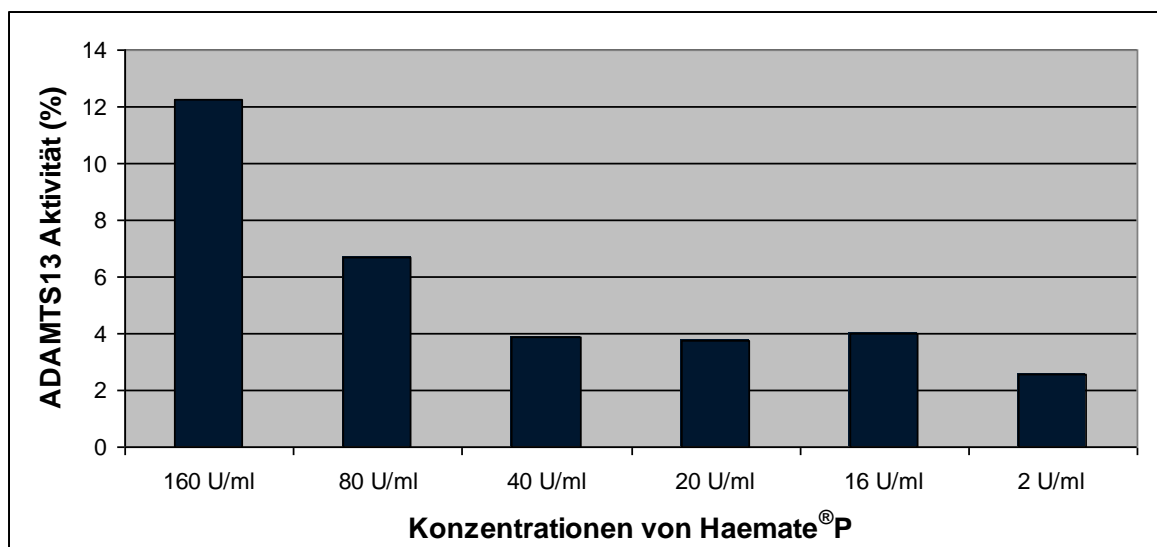


Abb. 22: Durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität von Haemate®P in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

Um später einen Vergleich mit den Ergebnissen des Actifluor™ADAMTS13 Kits vornehmen zu können, werden die Mittelwerte der jeweiligen Verdünnungen von Haemate®P in Standardeinheiten (ng/ml) umgerechnet.

Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
MW (ng/ml)	88,6	48,2	28,1	26,6	28,8	18,7

Actifluor™ADAMTS13

Die verschieden konzentrierten Ansätze wurden mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit auf die ADAMTS13 Aktivität an sechs verschiedenen Tagen untersucht. Dabei wurden teilweise pro Kit mehrere Versuchsansätze derselben Konzentration gemessen. Dadurch sollten intra- und interindividuelle Schwankungen minimiert werden. In der nachfolgenden Tabelle 13 sind die einzelnen Messwerte mit Mittelwert und Standardabweichung aufgeführt:

Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	40 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse in ng/ml				
1	447,93	279,53		7,06	0,00
2	617,25				
3	481,67				
4	500,17				
5	429,43				
6	485,94				
7	480,60				
8	593,08				
9	328,24	307,51	171,80	50,30	
10	334,87				
MW	470,0	293,5	171,8	28,7	0,0
s	± 93,5				

Tab. 13: Messergebnisse des Actifluor™ADAMTS13 Kits für die ADAMTS13 Aktivität von Haemate®P in unterschiedlichen Konzentrationen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

Das folgende Diagramm (Abb. 23) zeigt die Mittelwerte der ADAMTS13 Aktivitätsmessung für die Verdünnungsreihe von Haemate[®]P:

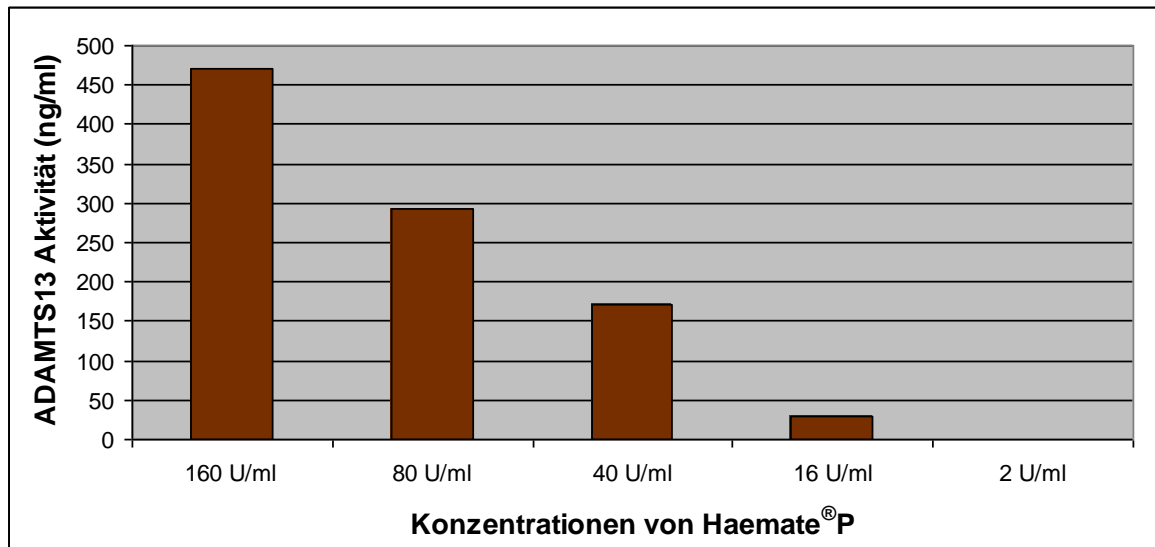


Abb. 23: Durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität von Haemate[®]P in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen mittels Actifluor[™]ADAMTS13 Kit.

Unverdünntes Haemate[®]P zeigte bei der Messung mit dem Actifluor[™]ADAMTS13 Kit eine ADAMTS13 Aktivität von durchschnittlich 470 ng/ml. Die einzelnen Messwerte schwankten dabei zwischen 328,24 ng/ml und 617,25 ng/ml. Die Standardabweichung für die erhobenen Messdaten beträgt $\pm 93,5$. Betrachtet man die Enzymaktivität innerhalb der Verdünnungsreihe, kann eine Abnahme der ADAMTS13 Aktivität beobachtet werden; wobei die gemessenen Enzymaktivitäten für die Verdünnungen von 50 % und 25 % tendenziell über und ab 10 % unter der theoretischen Enzymaktivität liegen. Rechnet man die in ng/ml gemessenen Ergebnisse in % um, (Methodenteil 2.3.2.3) ergeben sich folgende Aktivitäten:

Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	40 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
MW (%)	65	41	24	4	0

3.1.1.3 ADAMTS13 Antigen

Technozym®ADAMTS13

Mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit wurde außer der ADAMTS13 Aktivität auch ADAMTS13 Antigen derselben Probe bestimmt. Dadurch ist es unter anderem möglich, die erhobenen Parameter direkt zu vergleichen. Folglich wurden, identisch zur ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung, an 11 verschiedenen Messtagen ADAMTS13 Antigen der unterschiedlich konzentrierten Haemate®P Proben ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 aufgelistet:

Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse in µg/ml					
1	1,43	1,20			0,20	0,02
2	1,43	1,43			0,32	0,04
3	1,43	1,15			0,20	0,02
4	1,43	1,43			0,18	0,02
5	1,43	1,43	1,37	0,37		
Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse in µg/ml					
6	1,43	1,43	0,91	0,26		
7	1,43	1,32			0,11	0,02
8	1,49				0,28	
9	1,59	0,85			0,35	0,02
10	1,49				0,38	
11	0,88	0,90	0,92		0,92	
MW	1,41	1,24	1,07	0,32	0,33	0,02
s	0,2	0,2			0,2	0,01

Tab. 14: Messergebnisse des Technozym®ADAMTS13 Kits für ADAMTS13 Antigen von Haemate®P in unterschiedlichen Konzentrationen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

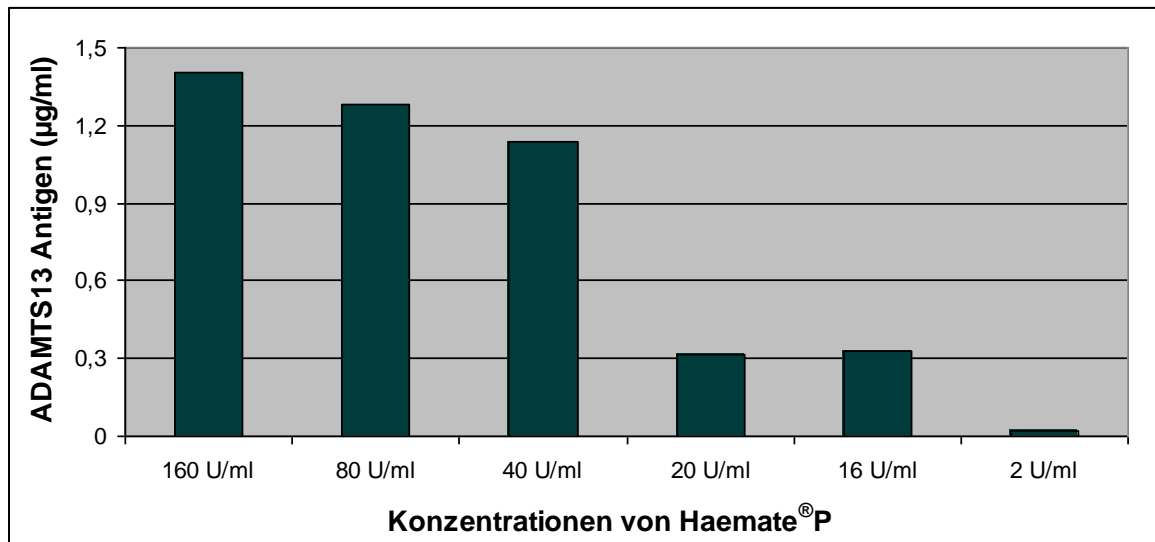


Abb. 24: Durchschnittliches ADAMTS13 Antigen von Haemate®P in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

Die ADAMTS13 Antigen Messungen ergaben für Haemate®P durchgehend Werte (durchschnittlich 1,4 µg/ml) im hohen physiologischen Bereich. Dabei muss beachtet werden, dass der Test bis 1,59 µg/ml messen kann. Werte über der Messgrenze wurden mit $\geq 1,59$ µg/ml angegeben, was einmal der Fall war.

Der hohe Antigenspiegel nahm bei den 50%igen (1,24 µg/ml) und 25%igen (1,07 µg/ml) Ansätzen kaum ab. Erst die Verdünnungen mit 20 U/ml (0,32 µg/ml), 16 U/ml (0,33 µg/ml) und 2 U/ml (0,02 µg/ml) Haemate®P wies eine deutlich geringere Menge an ADAMTS13 auf. Die Standardabweichung ist bei allen Messungen mit 0,2 bzw. 0,01 bei der höchsten Verdünnungsstufe sehr gering. Die Präzision ist demzufolge sehr hoch.

Die Abnahme der ADAMTS13 Aktivität und des ADAMTS13 Antigenspiegel verhält sich bei allen Verdünnungsstufen proportional zueinander. Eine große Diskrepanz herrscht jedoch zwischen der ADAMTS13 Aktivität, ermittelt mit Technozym®ADAMTS13, im direkten Vergleich zum ADAMTS13 Antigen (Abb. 25). Während ADAMTS13 Antigen hohe, physiologische Werte selbst bei den ersten zwei Verdünnungsstufen aufweist, ist die ADAMTS13 Aktivität mit 12,3 % in der unverdünnten Probe bereits im unteren Bereich.

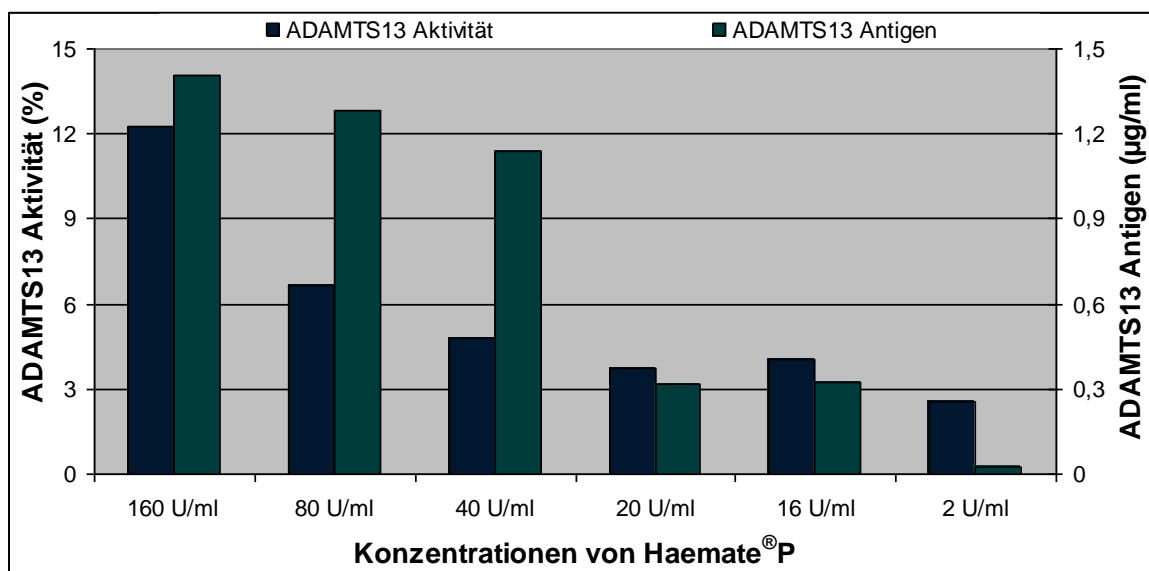


Abb. 25: Gegenüberstellung der mittleren ADAMTS13 Aktivität und des mittleren ADAMTS13 Antigens von Haemate® P in Abhängigkeit von der Konzentration. Beide Parameter gemessen mittels Technozym® ADAMTS13 Kit.

Imubind® ADAMTS13 ELISA

Der Imubind® ADAMTS13 ELISA weist für Haemate® P im Schnitt ein ADAMTS13 Antigen von 0,5 µg/ml auf und liegt damit bei 50 % im Bezug zum unverdünnten Standard. Das ADAMTS13 Antigen nahm bei diesem Test mit zunehmender Verdünnung überproportional stark ab. So war bei 80 U/ml nur noch 0,14 µg/ml ADAMTS13 Antigen nachweisbar (Tab. 15). Graphisch verdeutlicht wird diese starke Abnahme in der Abb. 26.

Konzentrationen	160U/ml	80U/ml	16U/ml	2U/ml
Messungen	Ergebnisse in µg/ml			
1	0,50	0,17	0,03	0,02
2	0,52	0,10		
3	0,46	0,13		
MW	0,50	0,14	0,03	0,02

Tab. 15: Einzelne Messergebnisse für ADAMTS13 Antigen und der daraus resultierende Mittelwert für die jeweiligen Verdünnungsstufen gemessen mittels Imubind® ADAMTS13 ELISA.

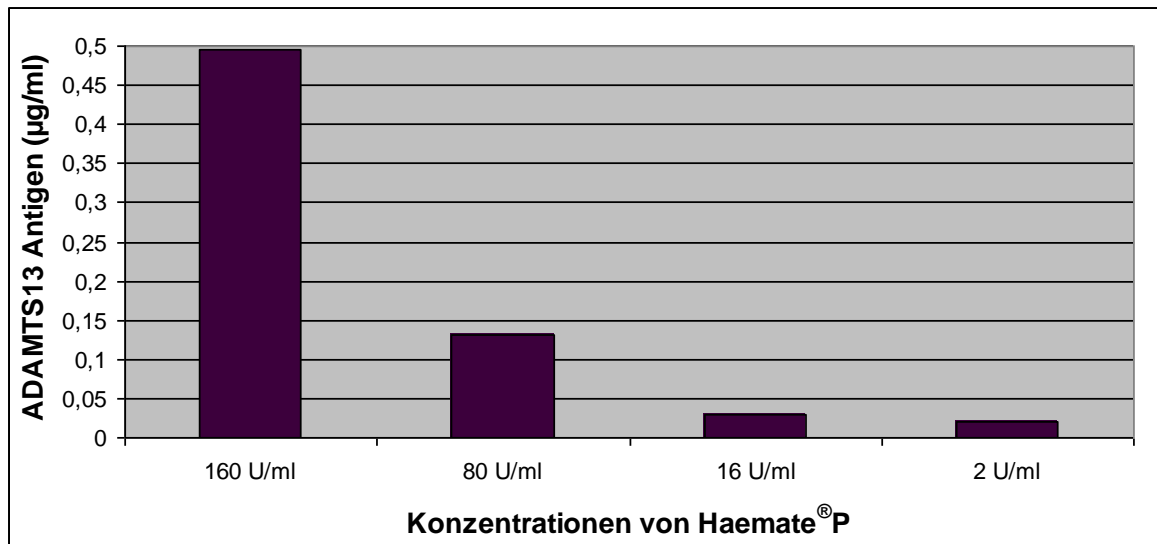


Abb. 26: Mittlere ADAMTS13 Antigenspiegel für die verschiedenen Konzentrationen von Haemate®P ermittelt mit dem Imubind®ADAMTS13 ELISA.

3.1.1.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13

Stellt man die Mittelwerte für die einzelnen Verdünnungsstufen, einmal gemessen mit Technozym®ADAMTS13 und das andere Mal mit Actifluor™ADAMTS13, einander gegenüber, ist im Schnitt eine deutlich höhere ADAMTS13 Aktivität mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit für die selbe Probe gemessen worden als mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit (Abb. 27). Die Abnahme der Aktivität mit der Zunahme der Verdünnung ist jedoch bei beiden Messmethoden zu erkennen. Als Einheit wurde die Standardeinheit (S.I.) in (ng/ml) gewählt. Demzufolge wurden die Messergebnisse des Technozym®ADAMTS13 Kits durch Multiplikation mit dem Umrechnungsfaktor angepasst (2.3.2.3).

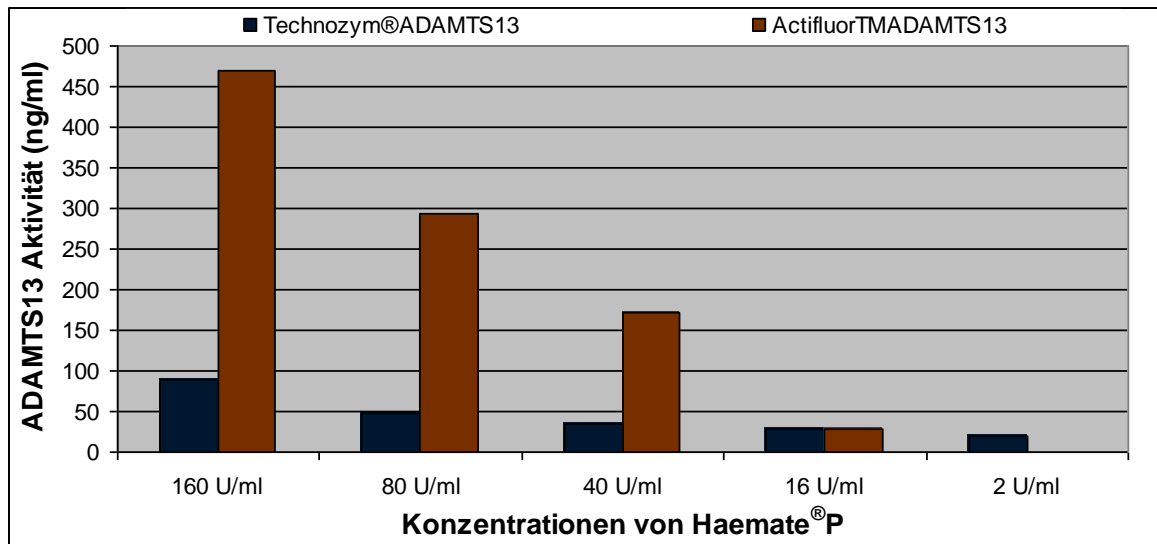


Abb. 27: Mittelwerte von der Messung mit Technozym®ADAMTS13 Kit (blau) und der mit Actifluor™ADAMTS13 Kit (orange) der Verdünnungsreihe von Haemate®P.

Bei der Gegenüberstellung der Antigen Bestimmungsmethoden ist gegenüber den Aktivitätstests ein umgekehrtes Bild zu verzeichnen. Der Technozym®ADAMTS13 Kit zeigt hier deutlich höhere Antigenwerte als der von American Diagnostica angebotene Imubind®ADAMTS13 ELISA (Abb. 28). Gemeinsam ist ihnen jedoch, dass die gemessenen Werte beide Male im physiologischen Bereich zu finden sind.

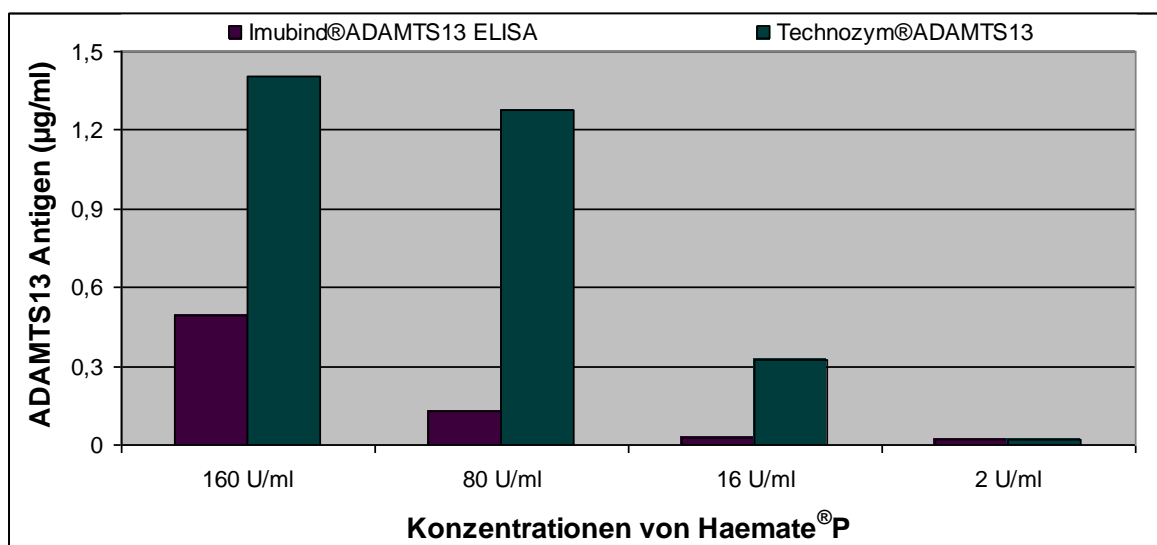
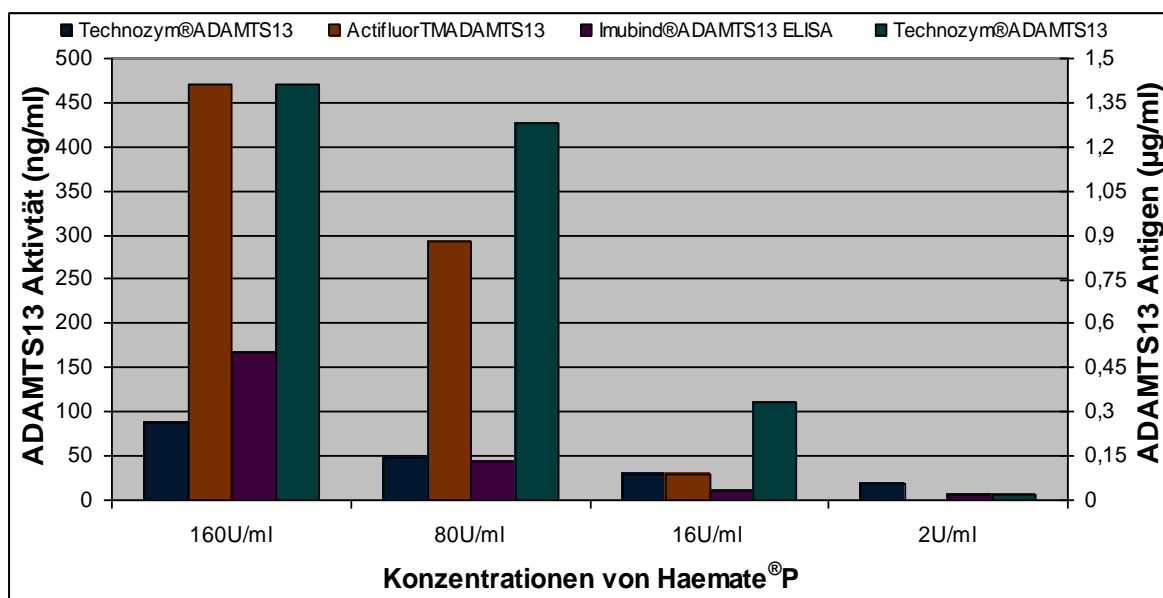


Abb. 28: Mittelwerte der ADAMTS13 Antigenbestimmung mit dem Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila), dem Technozym®ADAMTS13 Kit (grün) für Haemate®P bei den verschiedenen Verdünnungsstufen.

Um allgemein die ADAMTS13 Aktivität mit dem ADAMTS13 Antigen zu vergleichen, wurden alle Mittelwerte der ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung von Technozym®ADAMTS13 und Actifluor™ADAMTS13 (Abb. 27) sowie die Ergebnisse für das ADAMTS13 Antigen aus Technozym®ADAMTS13 und Imubind®ADAMTS13 ELISA (Abb. 28) in einem Diagramm (Abb. 29) zusammengefasst.



Konzentrationen	160 U/ml	80 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messmethoden				
Technozym®ADAMTS13	88,3 ng/ml	48,1 ng/ml	29,0 ng/ml	18,5 ng/ml
Actifluor™ADAMTS13	470,0 ng/ml	293,5 ng/ml	28,7 ng/ml	0 ng/ml
Technozym®ADAMTS13	1,40 µg/ml	1,30 µg/ml	0,30 µg/ml	0,02 µg/ml
Imubind®ADAMTS13 ELISA	0,50 µg/ml	0,10 µg/ml	0,03 µg/ml	0,02 µg/ml

Abb. 29: Graphischer und tabellarischer Vergleich der durchschnittlich gemessenen ADAMTS13 Aktivitäten (Technozym®ADAMTS13 Kit (blau) und Actifluor™ADAMTS13 Kit (orange)) gegenüber dem durchschnittlichen ADAMTS13 Antigenwerten (Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila), Technozym®ADAMTS13 Kit (grün)) von Haemate®P bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

Der Vergleich (Abb. 29) verdeutlicht die Unterschiede zwischen den verschiedenen Messmethoden für die Antigen- und die Aktivitätsbestimmung.

Der Actifluor™ADAMTS13 Kit von American Diagnostica misst im unverdünnten Ansatz Aktivitätswerte im niedrigen Normalbereich, und die Aktivität nimmt annähernd proportional zur Verdünnung ab. Der Antigentest (Imubind®ADAMTS13 ELISA) von

American Diagnostica weist ebenfalls niedrige Normwerte auf, wobei die Abnahme der Antigenwerte ebenfalls mit der Konzentrationsabnahme korreliert.

Der Technozym[®] ADAMTS13 Kit von Technoclone, der ADAMTS13 Aktivität und Antigen im selben Ansatz bestimmt, zeigte eine sehr niedrige ADAMTS13 Aktivität und im Gegensatz dazu aber einen sehr hohen ADAMTS13 Antigenspiegel. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung folgen annähernd proportional der Verdünnung, die Antigenwerte hingegen nicht. Im unverdünnten und im 50%igen Ansatz war kaum eine Abnahme des Antigenlevels zu verzeichnen, und der 10%ige Ansatz zeigte auch Ergebnisse, die doppelt so hoch sind als rechnerisch zu erwarten wäre.

3.1.1.5 ADAMTS13 Antikörper

Bei der Untersuchung auf ADAMTS13 Antikörper wurde die unverdünnte Haemate[®]P Probe wie unter 2.2.5 beschrieben vorbehandelt und dann wie eine normale Plasmaprobe mittels der BCS-Methode nach Böhm auf die ADAMTS13 Aktivität hin untersucht. Es kam zu keinem Aktivitätsabfall und bei der Umrechnung in BE konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

3.1.2 Wilate[®]

Wilate[®] enthält nach der Auflösung in 10 ml herstellereigenem Lösungsmittel 80 U/ml VWF und 90 U/ml FVIII. Ausgehend von den 80 U/ml VWF wurde eine Verdünnungsreihe von 50 %, 25 %, 20 % und 2,5 % erstellt. Diese fünf Ansätze entsprechen einer VWF-Konzentration von 80 U/ml, 40 U/ml, 20 U/ml, 16 U/ml und 2 U/ml. Der Ansatz mit 20 U/ml wurde nur selten und dann zur Überprüfung der Verdünnungsreihe mit den jeweiligen Methoden gemessen, da der Unterschied zu dem nächst niedrigeren Ansatz sehr gering ist. Die Ansätze mit 16 U/ml und 2 U/ml wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit der Konzentrate gewählt. Der unverdünnte Ansatz mit 80 U/ml entspricht zusätzlich dem 50%igen Ansatz von Haemate[®]P und ist damit direkt mit diesem vergleichbar.

Für Wilate[®] standen zwei Chargen A822A181A (*1a) und A929A181 (*81) zur Verfügung, die getrennt voneinander bei jeder Messmethode untersucht wurden. Zur Gesamtaussage über das Konzentrat wurden die einzelnen Messergebnisse jedoch zusammengefasst.

3.1.2.1 Gelelektrophorese

Für die Herstellung der Agarosegele wurde Wilate[®]*1a und Wilate[®]*81 in den Konzentrationen von 5 U/ml und 2 U/ml verwendet.

Im 1,8 % Agarosegel zeigen sich die Multimerbanden (Abb. 30) mit den für den VWF typischen Satellitenbanden. Wilate[®]*1a ist von der Intensität der Banden schwächer als Wilate[®]*81 gefärbt.

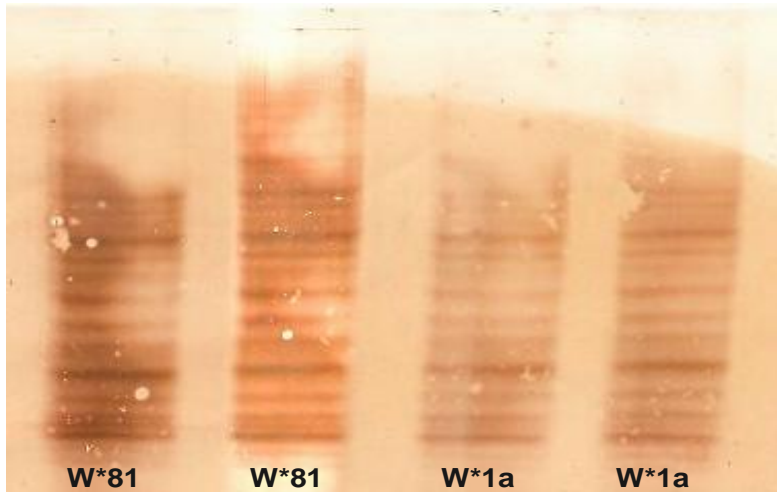


Abb. 30: Wilate[®]*81a und Wilate[®]*1a mit einer VWF Konzentration von 5 U/ml im 1,8 % Agarosegel.

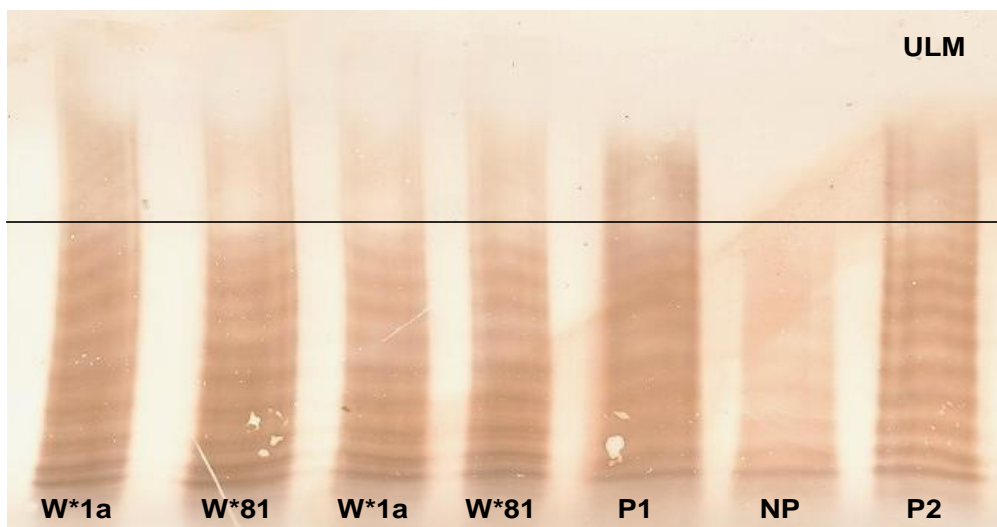


Abb. 31: 1%iges Agarosegel mit (von links nach rechts) Wilate[®]*1a 5 U/ml, Wilate[®]*81 5 U/ml, Wilate[®]*1a 2 U/ml, Wilate[®]*81 2 U/ml, Probe eines TTP Patienten mit Antikörpern (P1), Normalpool (NP) und Probe eines TTP Patienten ohne nachweisbare Antikörper (P2). ULM: ultralange VWF Multimere.

Im 1% Agarosegel ist für beide Chargen sowohl bei 5 U/ml als auch bei 2 U/ml deutlich die Anwesenheit von größeren Mengen UL VWF Multimeren zu sehen (Abb. 31). Erkennbar ist dies durch die Banden oberhalb der letzten Bande des Normalpools und an der Intensität dieser Banden. Als Positivprobe wurden das Plasma von einem TTP Patienten mit Antikörpern und einem ohne nachweisbare Antikörper mit aufgetragen.

3.1.2.2 ADAMTS13 Aktivität

Modifizierte BCS-Methode nach Böhm

Bei der Messung der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität ist eine Abnahme vom Ansatz mit TTP mit Antikörpern (17,9 %) zu TTP ohne nachweisbare Antikörper (13,9 %) zu Normalpool (12,1 %) zu verzeichnen (Abb. 32). Der VWF wurde folglich durch ADAMTS13 gespalten und inaktiviert. Das Enzym wurde durch das Wilate[®] Konzentrat zugeführt. Demzufolge ist indirekt eine ADAMTS13 Aktivität nachweisbar, die durch das moderate Absinken der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität nicht sehr hoch sein kann.

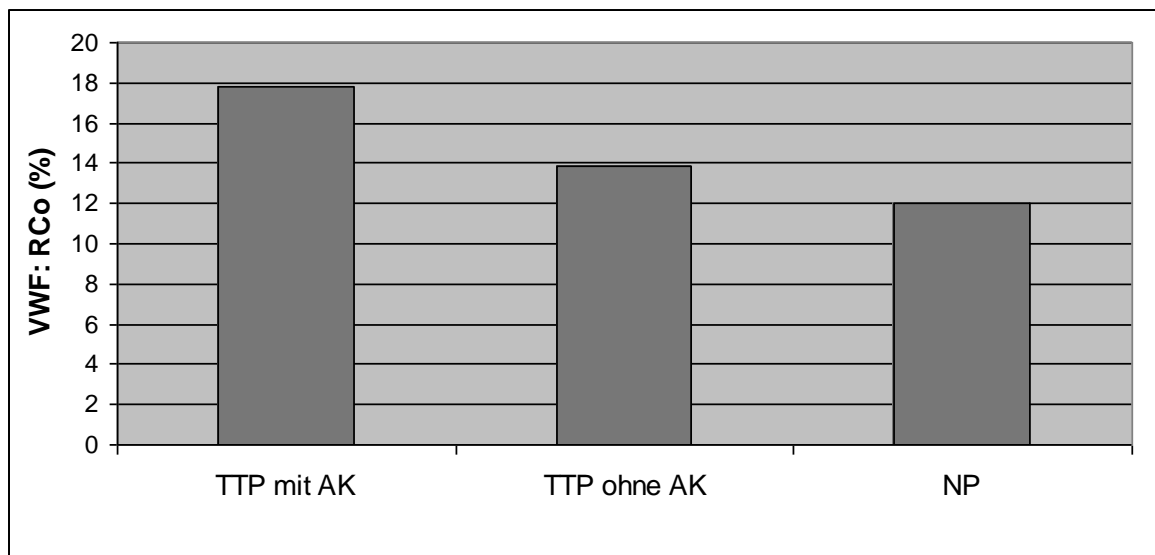


Abb. 32: Durchschnittliche, chargenunabhängige Ristocetin-Cofaktor-Aktivität von Wilate[®] gemessen in einem Ansatz von TTP mit Antikörpern (AK), einem Ansatz von TTP ohne nachweisbaren Antikörper und einem Ansatz mit Normalpool (NP).

Technozym[®] ADAMTS13

Mittels dem Technozym[®] ADAMTS13 Kit erfolgten zehn bzw. sechs Messungen der ADAMTS13 Aktivität von unverdünntem Wilate[®]*1a bzw. Wilate[®]*81 (Tab. 16).

Konzentrationen	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse für Wilate®*1a in %				
1	09,67	09,24		2,00	3,77
2	05,16	09,91		2,00	2,00
3	10,49	06,31		3,62	2,00
4	14,32	10,29		8,92	5,23
5	02,00	02,00	02,00		
6	03,98	03,59	9,53		
7	02,00				
8				2,74	
9	04,24	02,00		2,00	2,00
10	02,00	02,00	3,1	2,00	
MW	6,5	6,2	5,8	3,6	3
s	± 4,5	± 3,7		± 2,5	
Messungen	Ergebnisse für Wilate®*81 in %				
1	5,73	2,00			
2	5,81	2,00		2,93	2,00
3	2,00				
4	3,79				
5				2,00	
6	3,92	9,05		2,56	2,00
MW	4,3	4,4		2,5	2,00
s	± 1,6				
MW beider Chargen	5,6	5,6		3,2	2,7
s beider Chargen	± 3,7	± 3,7		± 2,1	± 1,3

Tab. 16: ADAMTS13 Aktivitäten von Wilate® der Chargen *1a und *81 in den unterschiedlichen Konzentrationen untersucht mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Von den jeweiligen Verdünnungen wurden zwar weniger Messdaten erhoben, aber es ist deutlich erkennbar gewesen, dass die Aktivität in der überwiegenden Anzahl der Fälle abnimmt, aber nicht dem Verhältnis der Verdünnung folgt. Teilweise ist bei den Ansätzen

mit 40 U/ml sogar eine höhere Enzymaktivität messbar als bei unverdünnter Probe (Tab. 16: Wilate®*1a Messung 6 und Wilate®*81 Messung 2).

Die ADAMTS13 Aktivität für Wilate®*1a liegt mit durchschnittlich 6,5 % im sehr niedrigen Aktivitätsbereich und reicht von Werten an der Nachweisgrenze (2 %) bis zu 14,32 %. Daraus ergibt sich eine Streuung von $\pm 4,5$.

Wilate®*81 wurde fünf Mal unverdünnt gemessen und weist hierbei (MW 4,3 %) durchgehend (Streuung von $\pm 1,6$) niedrigere Werte als die Charge *1a auf.

Fasst man beide Chargen zusammen, ergibt sich für die unverdünnte Probe ein Mittelwert von 5,6 % und mit einer Standardabweichung von $\pm 3,7$ eine gute Präzision. Mit zunehmender Verdünnung nimmt die Aktivität sehr langsam ab, die Standardabweichung hingegen zu. Die Standardabweichung wurde beim Vorliegen von sechs oder mehr Werten berechnet, ist aber nur ein Anhaltspunkt und keineswegs statistisch aussagekräftig, da zu wenige Werte und nicht gleich viele Daten von jeder Charge einbezogen wurden.

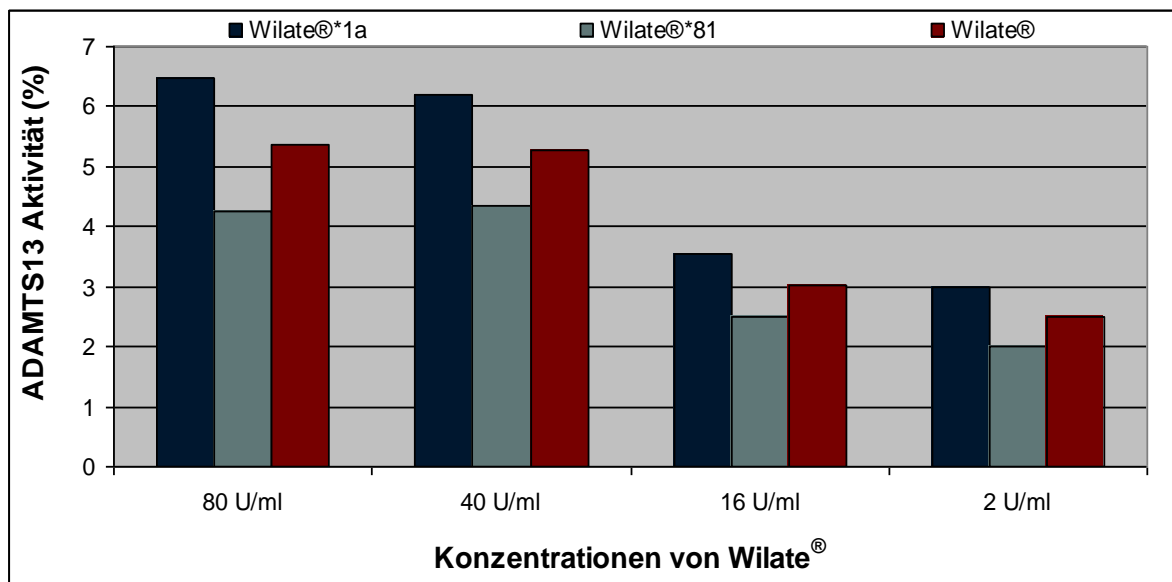


Abb. 33: Mit Technozym®ADAMTS13 Kit ermittelte ADAMTS13 Aktivität der Chargen *1a (dunkelblau) und *81 (hellblau) von Wilate® und dem Mittelwert aus beiden Chargen (rot) zusammen in Abhängigkeit von der Konzentration.

In Abbildung 33 sind die Mittelwerte der Charge *1a und der Charge *81, sowie der Gesamtmittelwert sind in Abhängigkeit von den Konzentrationen graphisch dargestellt. Dabei ist nochmals der Unterschied zwischen den Chargen deutlich zu erkennen. Wilate®*1a beginnt mit einer höheren Aktivität als Wilate® der Charge *81. Mit

zunehmender Verdünnung gleichen sich beide einander und gleichzeitig der unteren Nachweisgrenze an.

Wegen der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des Actifluor™ADAMTS13 Kits wurden die Mittelwerte der jeweiligen Verdünnungen sowohl der einzelnen Chargen als auch des Gesamtmittelwerts von Wilate® in Standardeinheiten (ng/ml) umgerechnet und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Konzentrationen	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
MW (ng/ml) Wilate®*1a	46,7	44,67	41,5	25,5	21,6
MW (ng/ml) Wilate®*81	30,6	31,3	0	18,0	14,4
MW (ng/ml) Wilate®	40,5	40,6	41,5	23,0	19,5

Actifluor™ADAMTS13

Die Chargen *1a und *81 wurden mittels Actifluor™ADAMTS13 Kit acht Mal an fünf verschiedenen Tagen auf ihre ADAMTS13 Aktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 aufgeführt und in Abbildung 34 graphisch dargestellt:

Im Mittel weisen die Chargen *1a und *81 mit 130,7 ng/ml bzw. 142,6 ng/ml ADAMTS13 Aktivitäten im moderaten Bereich auf. Mit einer durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität von 130,7 ng/ml ergibt sich für die Charge Wilate®*1a tendenziell niedrigere Messwerte. Der niedrigste gemessene Aktivitätswert lag bei 65,74 ng/ml der höchste bei 289,16 ng/ml. Dies sind zugleich die niedrigsten und höchsten Werte beider Chargen zusammen. Charge *81 hat eine Spanne der Aktivitätswerte von 84,63 ng/ml bis 269,82 ng/ml. Die Standardabweichung von Wilate®*1a von $\pm 78,6$ gegenüber der Standardabweichung von $\pm 64,9$ der Charge *81 spiegelt diese höhere Streuung der Werte innerhalb der Charge *1a wieder. Bei beiden Chargen wurde je ein Mal die Verdünnungen durch gemessen. Die Abnahme der ADAMTS13 Aktivität verlief bei Wilate®*1a proportional zur Verdünnung (Abb. 34) bei Wilate®*81 nahm die ADAMTS13 Aktivität zur ersten Verdünnung hin kaum ab und von der dritten zur vierten Verdünnung ebenfalls nur sehr wenig (Abb. 34)

Konzentrationen	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse für Wilate®*1a in ng/ml				
1	080,29	43,71		11,31	0
2	101,99				
3	123,65				
4	065,74				
5	067,19				
6	208,05				
7	289,16				
8	109,14				
MW	130,7	(43,71)		(11,31)	(0)
s	± 78,6				
Messungen	Ergebnisse für Wilate®*81 in ng/ml				
1	121,81				
2	143,42				
3	084,63				
4	085,41				
5	209,50				
6	269,82				
7	111,79	104,56	56,74	47,61	
8	114,26				
MW	142,6	104,56	56,74	47,61	
s	± 64,9				
MW beider Chargen	136,6	74,1	56,4	29,5	0
s beider Chargen	± 69,9				

Tab. 17: ADAMTS13 Aktivitäten von Wilate® der Chargen *1a und *81 in den unterschiedlichen Konzentrationen untersucht mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

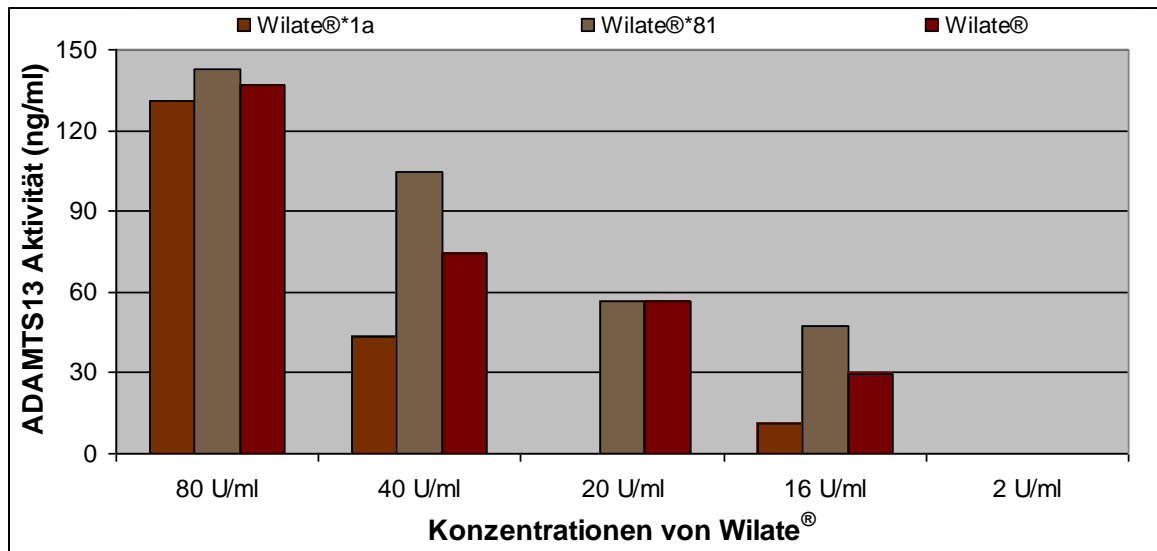


Abb. 34: Mit Actifluor™ ADAMTS13 Kit ermittelte ADAMTS13 Aktivität von Wilate®*1a (orange), Wilate®*81 (beige) und dem Mittelwert aus beiden Chargen (rot) in Abhängigkeit von der Konzentration.

3.1.2.3 ADAMTS13 Antigen

Technozym® ADAMTS13

Nach der Aktivitätsmessung erfolgte im Technozym® ADAMTS13 Kit direkt die ADAMTS13 Antigenbestimmung derselben Probe. Folglich wurden, identisch zur ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung, an zehn Messtagen für Wilate®*1a und fünf für Wilate®*81 das ADAMTS13 Antigen der unterschiedlich konzentrierten Proben ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgelistet.

Korrelierend mit den Aktivitätswerten wird für Wilate®*1a ein durchschnittlich höherer ADAMTS13 Antigen Wert (0,28 µg/ml) angegeben als für Wilate®*81 (0,13 µg/ml). Wilate®*1a hatte bei Messung 10 einen sehr hohen Wert – ansonsten lagen sämtliche Werte im Bereich um die 0,2 µg/ml. Bis auf die Daten aus Messung 10 zeigt sich eine geringe Streuung in den Werten, die alle unter dem physiologischen Normbereich liegen. Wie bei der Untersuchung der ADAMTS13 Aktivität nimmt das ADAMTS13 Antigen zwar mit zunehmender Verdünnungsreihe ab, aber nicht proportional (Abb. 35).

Konzentrationen	80 U/ml	40 U/ml	20 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilate[®]*1a in µg/ml				
1	0,19	0,12		0,08	0,05
2	0,18	0,13		0,11	0,04
3	0,17	0,12		0,05	0,02
4	0,22	0,12		0,07	0,02
5	0,17	0,10	0,08		
6	0,22	0,15	0,11		
7	0,17				
8				0,05	
9	0,25	0,21		0,07	0,05
10	0,93	0,78	0,87	0,91	
MW	0,28	0,22	0,35	0,19	0,04
s	0,25	0,23		0,32	0,01
Messungen	Ergebnisse von Wilate[®]*81 µg/ml				
1	0,18	0,12			
2	0,13	0,10		0,06	0,02
3	0,13				
4	0,10				
5				0,05	
6	0,13	0,10		0,07	0,02
MW	0,13	0,11		0,06	0,02
s	0,03				
MW beider Chargen	0,23	0,19		0,15	0,03
s beider Chargen	0,21	0,20		0,27	0,02

Tab. 18: ADAMTS13 Antigen von Wilate[®] der Chargen *1a und *81 in den unterschiedlichen Konzentrationen untersucht mit dem Technozym[®]ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

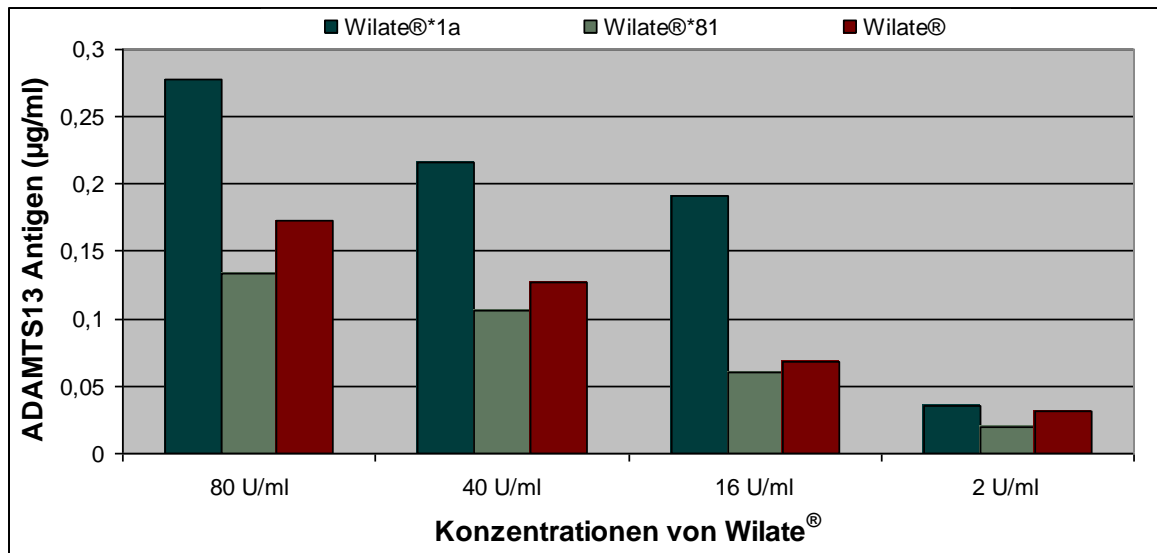


Abb. 35: Gegenüberstellung des mittleren ADAMTS13 Antigens von Wilate® *1a, Wilate® *81 und als Gesamtes in Abhängigkeit von der Konzentration, gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

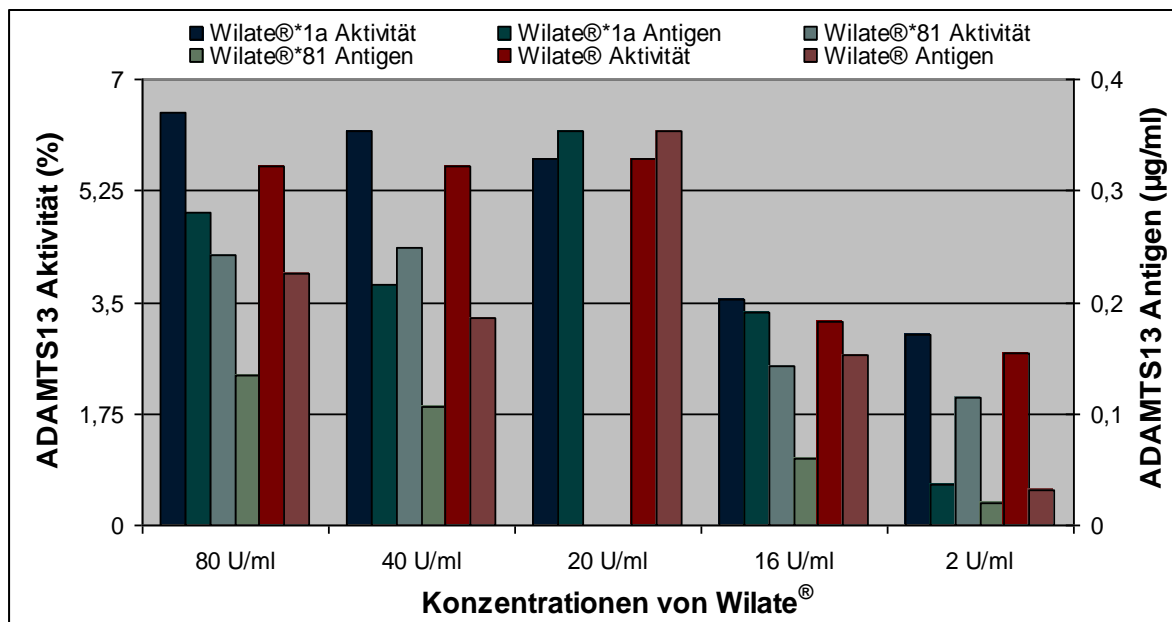


Abb. 36: Gegenüberstellung der mittleren ADAMTS13 Aktivität und des mittleren ADAMTS13 Antigens für Wilate® - chargenspezifisch und zusammengefasst - in Abhängigkeit von der Konzentration. Beide Parameter gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

Die Abnahme der ADAMTS13 Aktivität und des ADAMTS13 Antigenlevels verhalten sich bei allen Verdünnungsstufen proportional zueinander. Passend zur höheren ADAMTS13 Aktivität von Wilate®*1a wurde auch ein höherer ADAMTS13 Antigen Spiegel für diese

Charge bei der Messung mit dem Technozym[®]ADAMTS13 Kit ermittelt. Wilate[®]*81 hat sowohl niedrigere Aktivitäts- als auch Antigenwerte (Abb. 36).

Imubind[®]ADAMTS13 ELISA

Mit dem Imubind[®]ADAMTS13 ELISA wurden Wilate[®]*1a und Wilate[®]*81 je zwei Mal untersucht. Die dabei erhaltenen Messergebnisse sind in Tabelle 19 aufgelistet und in Abbildung 37 graphisch dargestellt.

Konzentrationen	80U/ml	40U/ml	16U/ml	2U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilate[®]*1a in µg/ml			
1	0,114	0,084	0,038	0,016
2	0,048	0,019		
MW	0,08	0,05		
Messungen	Ergebnisse von Wilate[®]*81 in µg/ml			
1	0,073	0,104		
2	0,020	0,015		
MW	0,05	0,13		
MW beider Chargen	0,06	0,06	0,04	0,02

Tab. 19: Messergebnisse für ADAMTS13 Antigen der Chargen Wilate[®]*1a / Wilate[®]*81 und der daraus resultierende Mittelwert für die jeweiligen Verdünnungsstufen gemessen mittels Imubind[®]ADAMTS13 ELISA.

Die Ergebnisse der Antigenmessung bestätigen die des Technozym[®]ADAMTS13 Kits in der Hinsicht, als dass unverdünntes Wilate[®]*1a höhere Antigenwerte (0,08 µg/ml) aufweist als Wilate[®]*81 (0,05 µg/ml). Die Werte sind, wie bei den anderen Konzentrationen, durchgehend niedriger als bei der Messung mit Technozym[®]ADAMTS13. Doch um statistische Aussagen machen zu können, liegen zu wenige Daten vor. Der Test wurde ausschließlich deshalb durchgeführt, um den geringen ADAMTS13 Antigen Spiegel des Technozym[®]ADAMTS13 Kits nochmals mit einem zweiten Test abzusichern.

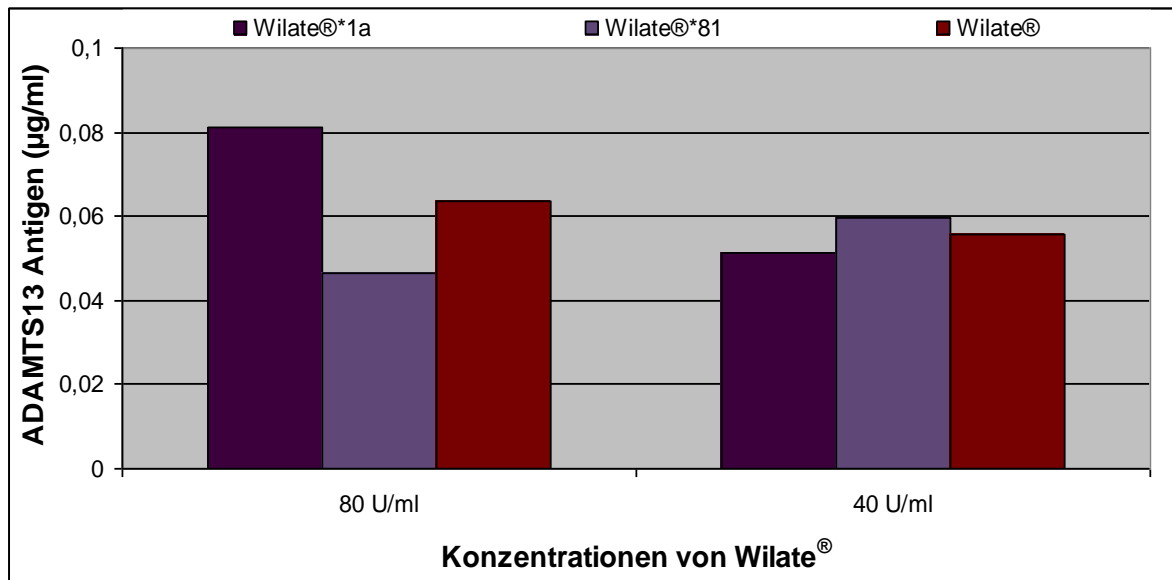


Abb. 37: Mittlere ADAMTS13 Antigenwerte für die verschiedenen Konzentrationen von Wilate®*1a, Wilate®*81 und dem Mittelwert aus beiden Chargen, ermittelt mit dem Imubind® ADAMTS13 ELISA.

3.1.2.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13

Um die beiden FRET Assays zu vergleichen, wurde die Standardeinheit (ng/ml) gewählt und die Messergebnisse von Technozym® ADAMTS13 umgerechnet (2.3.2.3). Die Gegenüberstellung der Ergebnisse von Actifluor™ ADAMTS13 und Technozym® ADAMTS13 für die verschiedenen Chargen ist in Abbildung 38 dargestellt:

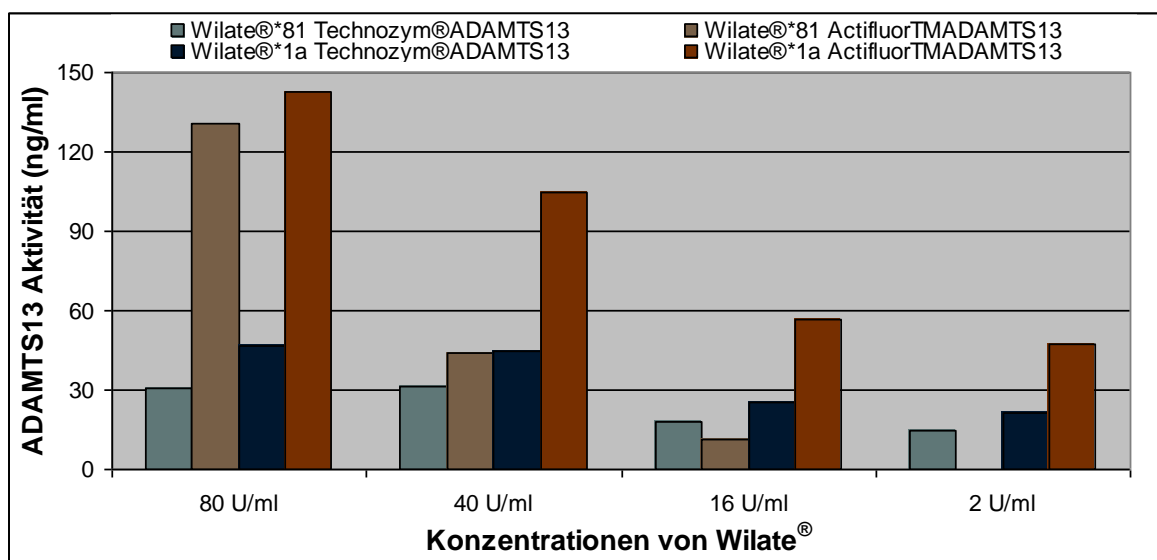


Abb. 38: Vergleich der ADAMTS13 Aktivität von Wilate®*1a und Wilate®*81 ermittelt durch Actifluor™ ADAMTS13 Kit und Technozym® ADAMTS13 Kit.

Bei dem Vergleich der Mittelwerte der beiden Chargen von Wilate® in den jeweiligen Verdünnungsstufen, ist die leicht höhere ADAMTS13 Aktivität der Wilate® Charge *1a gegenüber der Charge *81 bei beiden Messmethoden ersichtlich. Zudem misst die Actifluor™ADAMTS13 Methode deutlich höhere ADAMTS13 Aktivitäten für dieselbe Probe wie Technozym®ADAMTS13. Eine Abnahme der Aktivität mit fortschreitender Verdünnung ist bei beiden Methoden erkennbar. Bei der Actifluor™ADAMTS13 Messung fällt die Abnahme ADAMTS13 Aktivität zur nächsten Verdünnungsstufe jedoch stärker aus als bei Technozym®ADAMTS13. Hier ist kaum eine Änderung zwischen den Ansätzen mit 80 U/ml und 40 U/ml zu sehen.

Verdeutlicht wird das ganze in Abbildung 39, in der chargenunabhängig die untersuchte ADAMTS13 Aktivität bei den zwei Messmethoden verglichen wird.

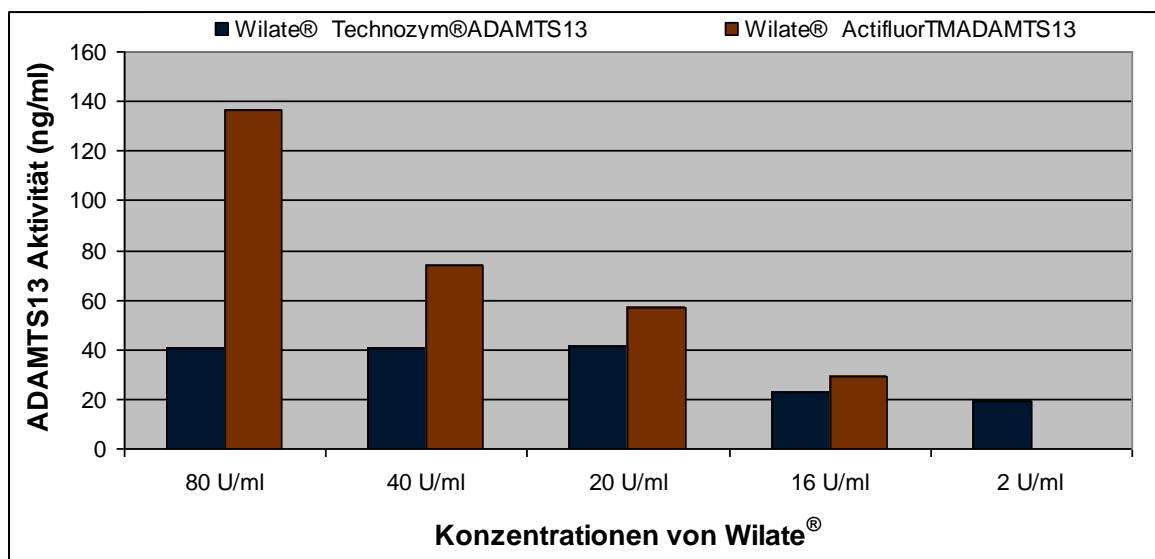


Abb. 39: Mittelwerte von der Messung mit Technozym®ADAMTS13 Kit (blau) und der mit Actifluor™ADAMTS13 Kit (orange) der Verdünnungsreihe von Wilate®.

Bei der Antigenbestimmung ist ebenfalls ein höherer ADAMTS13 Antigenwert bei Wilate®*1a mit beiden Messmethoden gegenüber der Charge Wilate®*81 nachweisbar. Der Technozym®ADAMTS13 Kit misst deutlich höhere Antigenwerte als der von American Diagnostica angebotene Imubind®ADAMTS13 ELISA. Die Unterschiede gleichen sich mit abnehmender Konzentration an (Abb. 40).

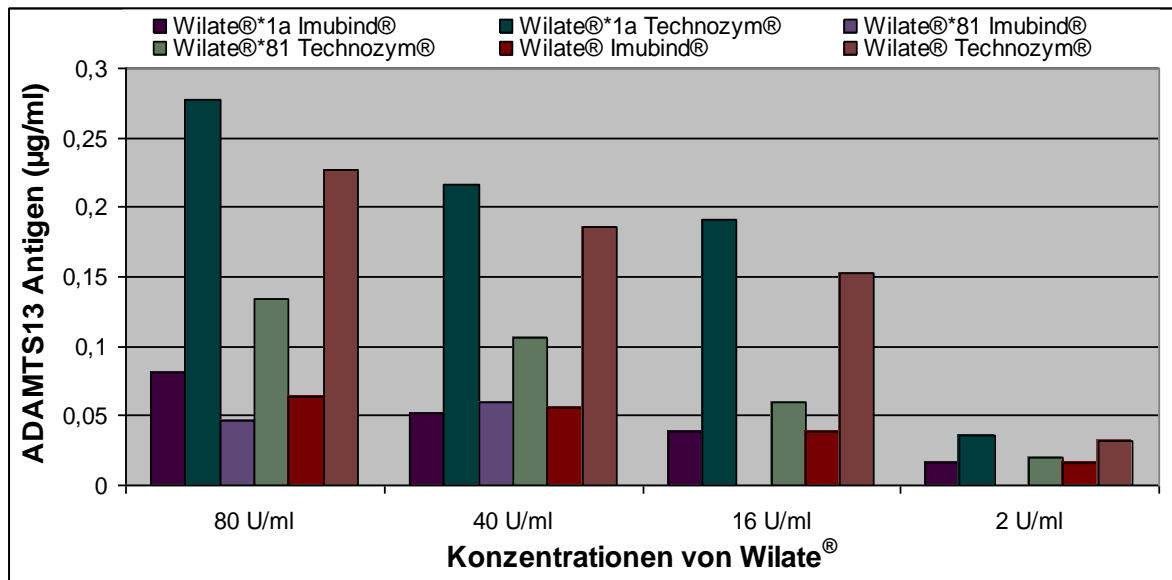
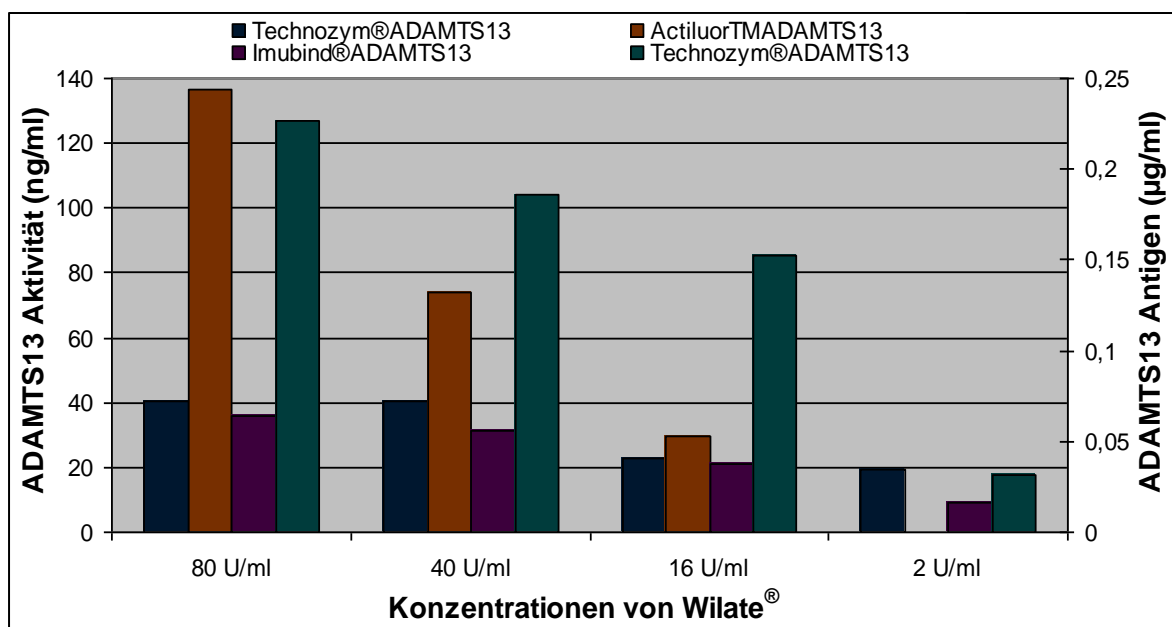


Abb. 40: Mittelwerte der ADAMTS13 Antigenbestimmung mit dem Imubind® ADAMTS13 ELISA (lila), dem Technozym® ADAMTS13 Kit (grün) für Wilate®. Bei verschiedenen Verdünnungsstufen sowohl chargenspezifisch als auch als Wilate® Gesamt angegeben.

Um allgemein die ADAMTS13 Aktivität mit dem ADAMTS13 Antigen zu vergleichen wurden alle Mittelwerte der ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung von dem Technozym® ADAMTS13 Kit und dem Actifluor™ ADAMTS13 Kit sowie die Ergebnisse für das ADAMTS13 Antigen aus dem Technozym® ADAMTS13 Kit und dem Imubind® ADAMTS13 ELISA in einem Diagramm mit dazugehöriger Tabelle (Abb. 41) zusammengefasst.



Konzentrationen	80 U/ml	40 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messmethoden				
Technozym® ADAMTS13	40,5 ng/ml	40,6 ng/ml	23,0 ng/ml	19,5 ng/ml
Actifluor™ ADAMTS13	136,6 ng/ml	74,1 ng/ml	29,5 ng/ml	0 ng/ml
Imubind® ADAMTS13 ELISA	0,06 µg/ml	0,06 µg/ml	0,04 µg/ml	0,02 µg/ml
Technozym® ADAMTS13	0,23 µg/ml	0,19 µg/ml	0,15 µg/ml	0,03 µg/ml

Abb. 41: Graphischer und tabellarischer Vergleich der durchschnittlich gemessenen ADAMTS13 Aktivitäten (Technozym® ADAMTS13 Kit (blau) und Actifluor™ ADAMTS13 Kit (orange)) gegenüber dem durchschnittlichen ADAMTS13 Antigen-Werten (Imubind® ADAMTS13 ELISA (lila), Technozym® ADAMTS13 Kit (grün)) von Wilate® bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen.

Der Vergleich (Abb. 41) zeigt die Unterschiede zwischen den verschiedenen Messmethoden von American Diagnostica und Technoclone für die Antigen- und die Aktivitätsbestimmung.

Der Actifluor™ ADAMTS13 Kit von American Diagnostica misst mit 136,6 ng/ml im unverdünnten Ansatz Aktivitätswerte im niedrigen Bereich, das Technozym® ADAMTS13 Kit hingegen verzeichnet mit 40,4 ng/ml nur eine sehr geringe ADAMTS13 Aktivität. Die Aktivität bei dem Messkit von American Diagnostica nimmt mit der Verdünnung merklich ab. Die Antigenbestimmung mit dem Imubind® ADAMTS13 ELISA Kit derselben Firma misst sehr niedrige Antigenwerte, die im Gegensatz zu den deutlich höheren Werten des Technozym® ADAMTS13 Kit von Technoclone stehen. Der Technozym® ADAMTS13 Kit weist allerdings von Anfang an eine sehr niedrige ADAMTS13 Aktivität auf, die mit zunehmender Verdünnung deutlich langsamer absinkt als bei dem Actifluor™ ADAMTS13 Kit. Abschließend lässt sich feststellen, dass zwar Schwankungen zwischen den verschiedenen Chargen bestehen, diese aber keine relevanten Unterschiede aufweisen. Insgesamt ist die ADAMTS13 Aktivität von Wilate® im unteren Aktivitätsbereich korrelierend mit einem niedrigen ADAMTS13 Antigenlevel.

3.1.2.5 ADAMTS13 Antikörper

Bei der Untersuchung von Wilate®*1a und Wilate®*81 auf ADAMTS13 Antikörper waren keine Antikörper nachweisbar.

3.1.3 Immunate STIM plus

Immunate STIM plus wurde mit 5 ml Aqua ad iniectabilia rekonstituiert, so dass eine Lösung mit einer Konzentration von 25 U/ml VWF und 50 U/ml FVIII entsteht. Damit enthält dieses Konzentrat die geringsten Konzentrationen an VWF und FVIII. Davon ausgehend wurden nur zwei Verdünnungen, eine von 64 % und eine von 8 %, erstellt, um eine Konzentration von 16 U/ml bzw. 2 U/ml zu erhalten.

3.1.3.1 Gelelektrophorese

Im 1,8%igen Gel ist das VWF Multimermuster mit Haupt- und Nebenbanden zu erkennen (Abb. 42 links).

Im 1%igen Agarosegel lassen sich bei Immunate STIM plus in einer Konzentration von 5 U/ml UL VWF Multimere nachweisen (Abb. 42 rechts), wenn auch in sehr geringen Mengen.

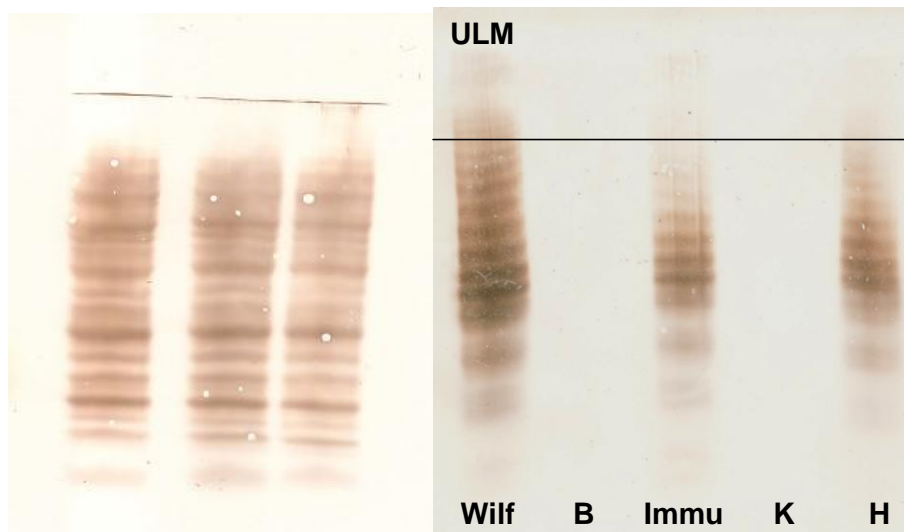


Abb. 42: Links: Immunate STIM plus drei Mal in der Konzentration von 5 U/ml nach der Trennung im 1,8%igen Agarosegel. **Rechts:** 1%iges Agarosegel mit UL VWF Multimeren (ULM) (Wilf: Wilfatin[®], B: Beriate[®]P, Immu: Immunate STIM plus, K: Kogenate[®], H: Haemate[®]P).

3.1.3.2 ADAMTS13 Aktivität

Modifizierte BCS-Methode nach Böhm

Mit der modifizierten BCS-Methode nach Böhm wurden drei Ansätze, einer mit Plasma eines TTP Patienten mit Antikörpern, einer mit Plasma eines TTP Patienten ohne

nachweisbare Antikörper und einer mit Normalpool, mit einer definierte Menge an unverdünntem Immunate STIM plus versetzt. Die durchschnittliche Ristocetin-Cofaktor-Aktivität ergab für den Ansatz TTP mit Antikörper von 13,1 %, für den mit TTP ohne nachweisbare Antikörper von 11,4 % und für den mit Normalpool von 10 % (Abb. 42). Die kaum merklichen Unterschiede zwischen den Ansätzen weisen auf eine sehr geringe ADAMTS13 Aktivität von Immunate STIM plus hin.

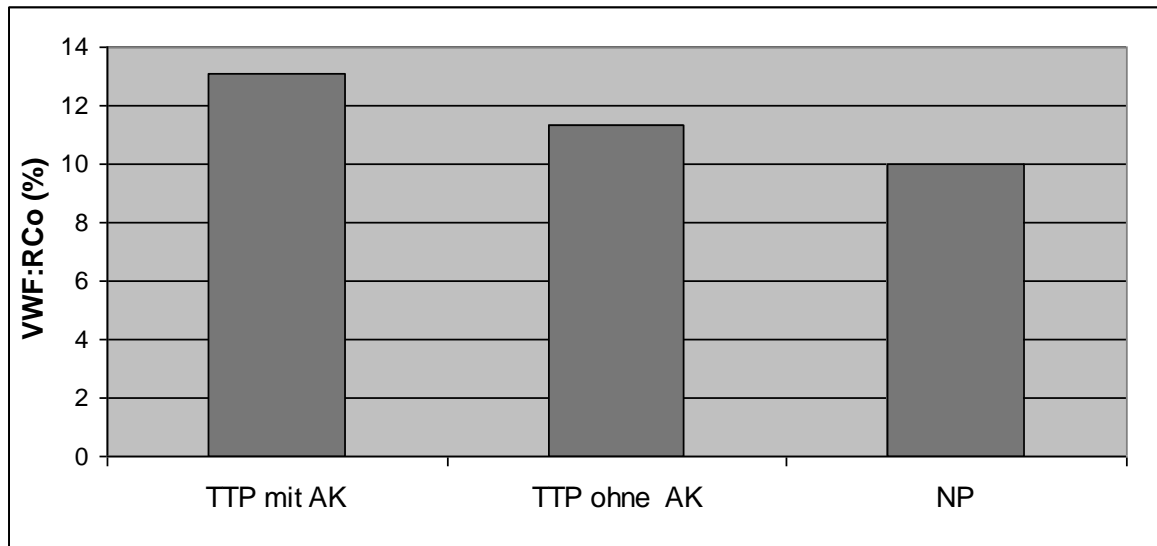


Abb. 42: Durchschnittliche Ristocetin-Cofaktor-Aktivität von unverdünntem Immunate STIM plus gemessen in einem Ansatz mit TTP mit Antikörpern (AK), einem Ansatz mit TTP ohne Antikörpern und einem Ansatz mit Normalpool.

Technozym® ADAMTS13

Bei der Messung mit dem Technozym® ADAMTS13 Kit wurden der unverdünnte und der Ansatz mit 16 U/ml viermal gemessen. Nachdem bereits bei 16 U/ml nur Werte von 2 % an der unteren Nachweisgrenze gemessen wurden, erfolgte für den Ansatz mit 2 U/ml nur eine Messung, um zu bestätigen, dass hier keine ADAMTS13 Aktivität vorhanden ist. Für 25 U/ml ergab sich mit 3,3 % eine sehr niedrige Aktivität (Abb. 43).

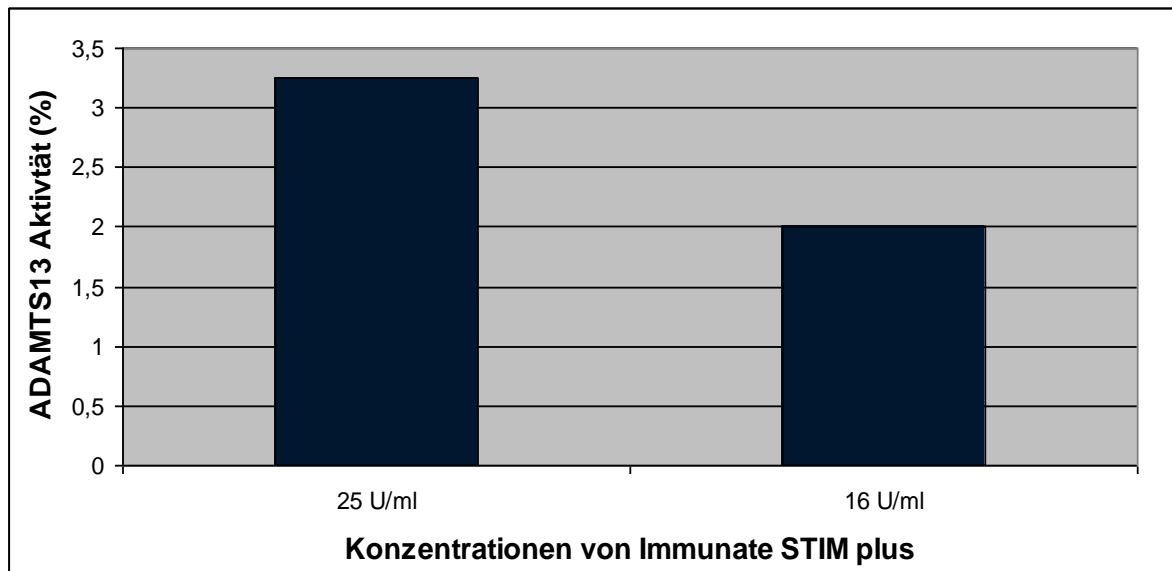


Abb. 43: Durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität von Immunate STIM plus in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

Actifluor™ADAMTS13

Mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit wurden der unverdünnte Ansatz neun Mal und der Ansatz mit 16 U/ml zwei Mal untersucht. Im Schnitt ergibt sich eine ADAMTS13 Aktivität von 95,8 ng/ml \pm 39,8 ng/ml. Der höchste Wert liegt bei 149,39 ng/ml und der niedrigste bei 41,47 ng/ml. Durchschnittlich entspricht dies einer prozentualen Aktivität von 13,3 %. Insgesamt ist die ADAMTS13 Aktivität damit sehr gering. Bei der Messung des Ansatzes mit 16 U/ml sind niedrige, zur Verdünnung proportionale ADAMTS13 Aktivitätswerte zu erkennen (Tab. 20).

Die Mittelwerte sind in Diagramm (Abb. 44) nochmals bildlich dargestellt.

Konzentrationen	25 U/ml	16 U/ml
Messungen	Ergebnisse in ng/ml	
1	104,64	57,40
2	071,15	
3	097,36	
4	049,41	
5	041,47	
6	074,40	
7	149,39	
8	143,44	
9	131,17	60,80
MW	95,8	59,1
s	± 39,8	

Tab. 20: Messergebnisse des Actifluor™ADAMTS13 Kits für die ADAMTS13 Aktivität von Immunate STIM plus in zwei unterschiedlichen Konzentrationen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

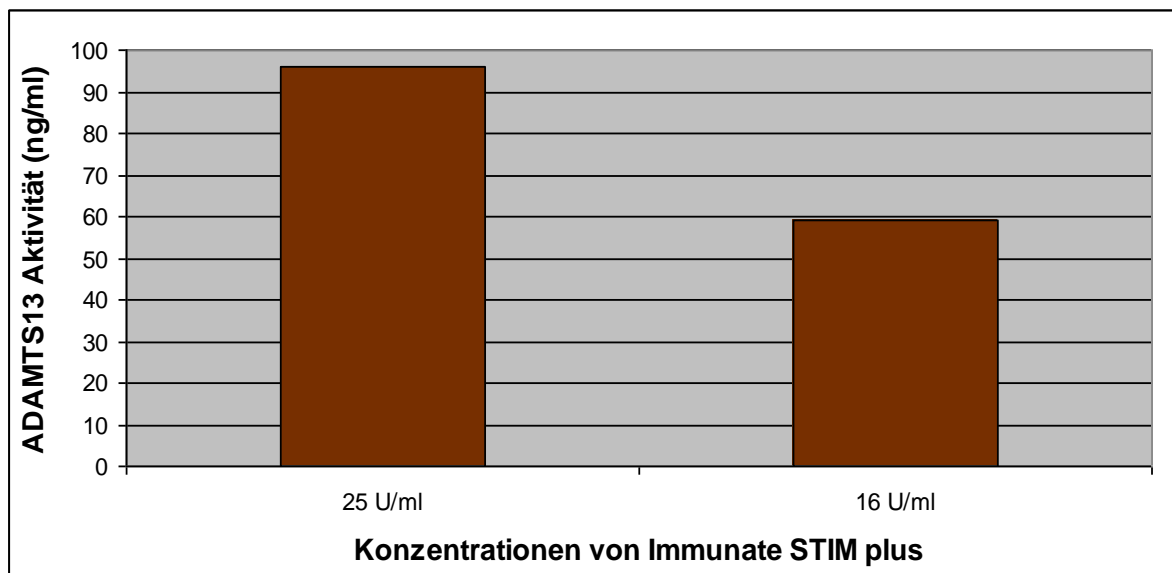


Abb. 44: Durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität von Immunate STIM plus in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen mittels Actifluor™ADAMTS13 Kit.

3.1.3.3 ADAMTS13 Antigen

Technozym[®]ADAMTS13 und Imubind[®]ADAMTS13 ELISA

Beide Antigenmethoden zeigten eine sehr geringe Menge an ADAMTS13 Antigen. Für den unverdünnten Ansatz ergibt sich bei der Technozym[®]ADAMTS13 Methode ein Antigenwert von 0,17 µg/ml und bei der Imubind[®]ADAMTS13 Methode von 0,01 µg/ml. Im Gegensatz zur ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung mit Technozym[®]ADAMTS13 ist bei der Untersuchung auf ADAMTS13 Antigen ein Unterschied zwischen dem Ansatz mit 16 U/ml (0,05 µg/ml) und 2 U/ml (< 0,02 µg/ml) zu verzeichnen (Abb.45).

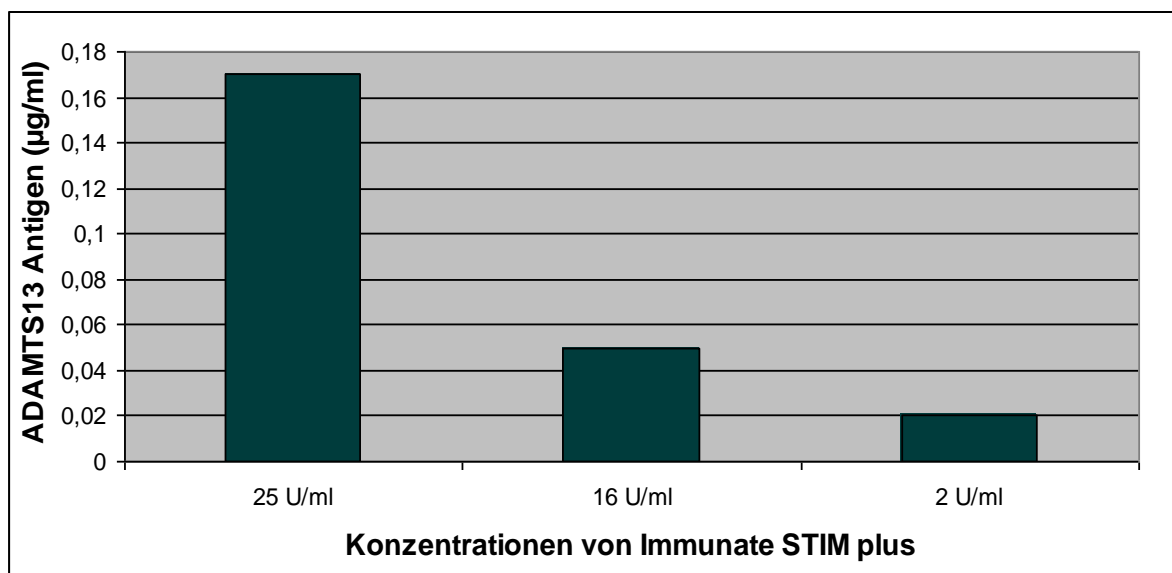


Abb. 45: ADAMTS13 Antigen von Immunate STIM plus in Abhängigkeit von der Konzentration gemessen mittels Technozym[®]ADAMTS13 Kit.

3.1.3.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13

Bei der Gegenüberstellung der zur Aktivitätsbestimmung angewandten FRET-Assays ist ein großer Unterschied zwischen den Aktivitäten zu erkennen (Abb. 46). Der Actifluor[™]ADAMTS13 Kit liegt bei einer durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität von 95,8 ng/ml, während die des Technozym[®]ADAMTS13 Kits nur 23,4 ng/ml zeigt.

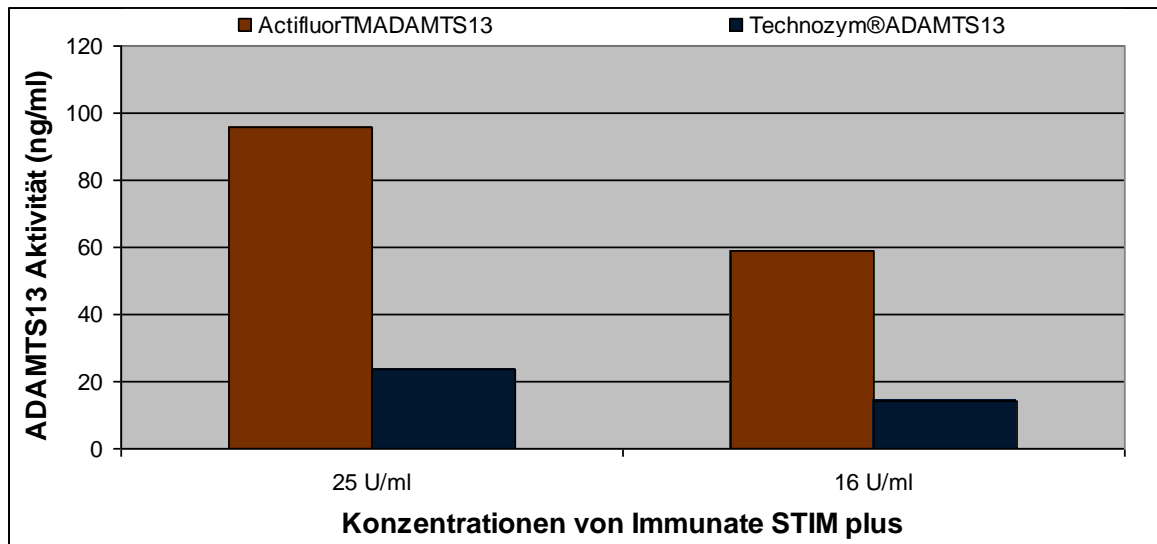


Abb. 46: Mittelwerte der Messung mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit (orange) und mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit (blau) in unverdünntem Immunate STIM plus und in der Konzentration von 16 U/ml.

Bei der Gegenüberstellung der beiden Antigenbestimmungsmethoden weist der Technozym®ADAMTS13 Kit im Gegensatz zur Aktivitätsbestimmung die höhere Konzentration auf. Der Antigenwerte des Imubind®ADAMTS13 ELISAs sind kaum nachweisbar (Abb. 47).

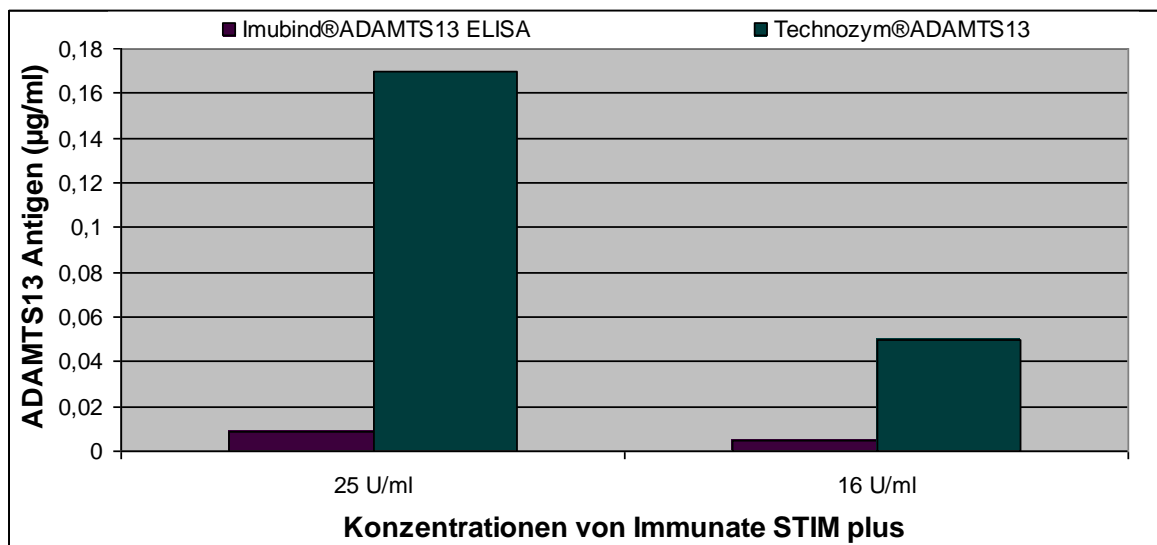
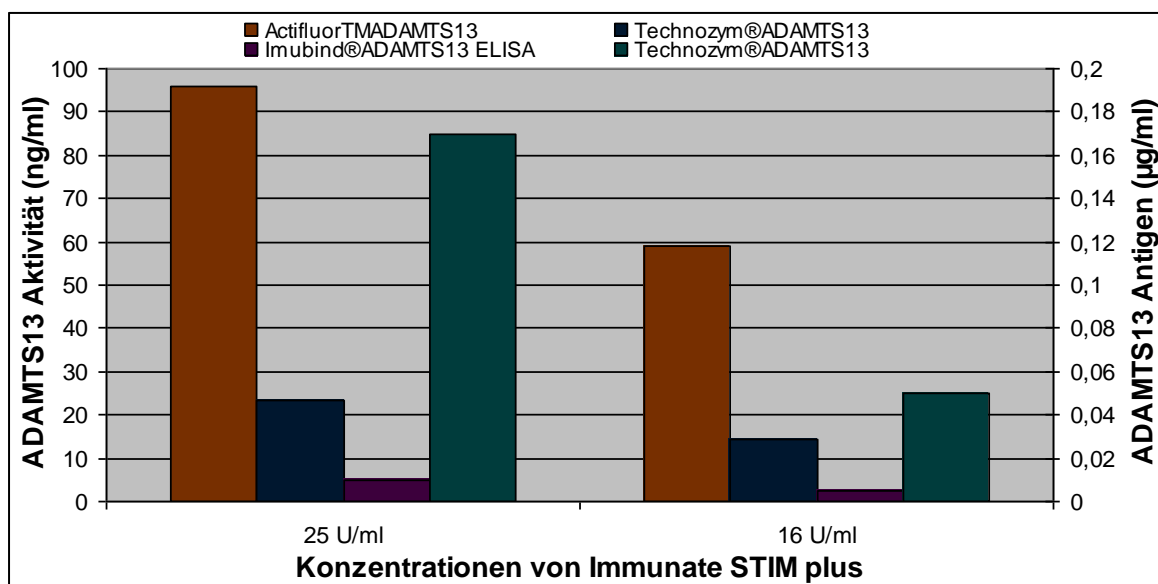


Abb. 47: Werte der ADAMTS13 Antigenbestimmung mit dem Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila) und Mittelwert von dem Technozym®ADAMTS13 Kit (grün) in unverdünntem Immunate STIM plus und in der Konzentration von 16 U/ml.

Abschließend lässt sich für Immunate STIM plus zusammenfassen, dass eine sehr geringe Menge des Enzyms ADAMTS13 vorhanden ist, die eine noch geringere Aktivität aufweist. Fasst man ADAMTS13 Antigen und ADAMTS13 Aktivität in einem Diagramm bzw. einer Tabelle zusammen (Abb. 48), werden dieselben Unterschiede bezüglich der Messmethoden deutlich, wie bereits bei den Untersuchung der vorherigen Konzentrate.



Konzentrationen	25 U/ml	16 U/ml
Messmethoden		
Imubind®ADAMTS13 ELISA	0,009 µg/ml	0,005 µg/ml
Technozym®ADAMTS13	0,17 µg/ml	0,05 µg/ml
Actifluor™ADAMTS13	95,8 ng/ml	59,1 ng/ml
Technozym®ADAMTS13	23,4 ng/ml	14,4 ng/ml

Abb. 48: Graphischer und tabellarischer Vergleich der durchschnittlich gemessenen ADAMTS13 Aktivitäten (Technozym®ADAMTS13 Kit (blau) und Actifluor™ADAMTS13 Kit (orange)) gegenüber dem ADAMTS13 Antigen (Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila), Technozym®ADAMTS13 Kit (grün)) von Immunate STIM plus in unverdünntem und in 16 U/ml Ansatz.

3.1.3.5 ADAMTS13 Antikörper

Es waren keinerlei Antikörper gegen ADAMTS13 nachweisbar.

Bei der Untersuchung auf ADAMTS13 Antikörper wurde unverdünntes Immunate STIM plus wie unter 2.2.5 beschrieben vorbehandelt und anschließend mittels der BCS-

Methode nach Böhm auf die ADAMTS13 Aktivität hin untersucht. Bei der Umrechnung in BE konnten keine Antikörper nachgewiesen werden.

3.1.4 Wilfactin®

Mit 1000 I.E. VWF im Lyophilisat und 100 U/ml nach der Rekonstitution enthält Wilfactin® den zweit höchsten VWF Anteil der untersuchten Präparate. Zudem ist es das einzig untersuchte reine VWF Konzentrat. Von den drei vorliegenden Chargen 08L08117 (*17), 08L04234 (*34) und 08L05852 (*52) wurde wie bei den vorherigen Konzentraten je eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodass Ansätze der Konzentrationen 100 U/ml, 50 U/ml, 25 U/ml, 16 U/ml und 2 U/ml entstanden.

3.1.4.1 Gelelektrophorese

Für die Herstellung der Agarosegele wurde Wilfactin®*17, Wilfactin®*34 und Wilfactin®*52 in den Konzentrationen von 5 U/ml verwendet.

Im 1,8 % Agarosegel werden die VWF Multimere aufgetrennt und nach Anfärbung zeigt sich für jede Wilfactin® Charge das für den VWF typische Multimermuster von einer Hauptbande mit zwei Satellitenbanden (Abb. 49).

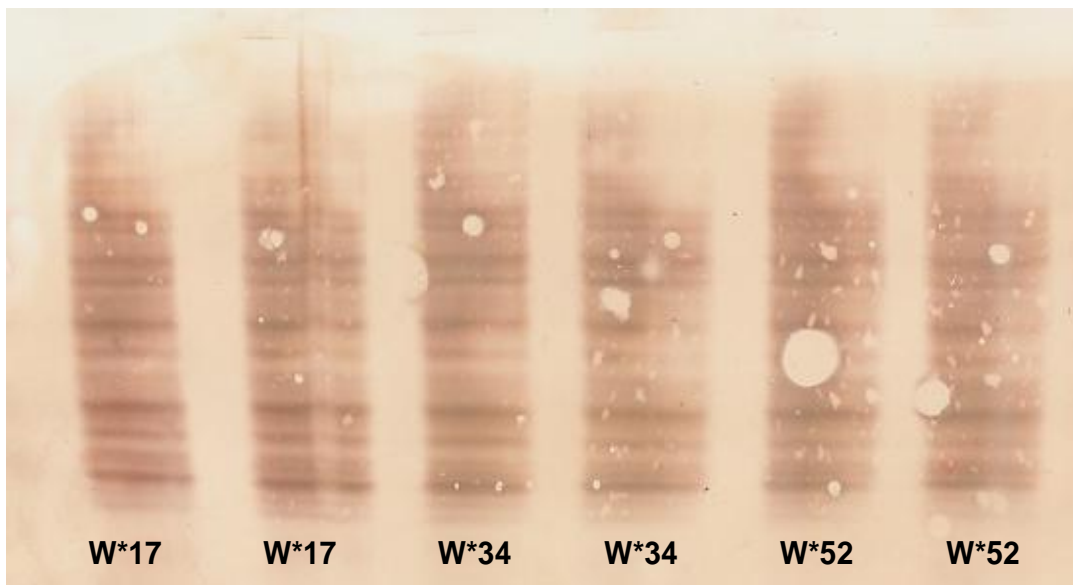


Abb. 49: 1,8%iges Agarosegel mit (von links nach rechts) je doppelt aufgetragen Wilfactin®*17, Wilfactin®*34 und Wilfactin®*52 jeweils in der Konzentration von 5 U/ml.

Im 1% Agarosegel sind für die drei Chargen, aufgetragen gegen Normalpool, UL VWF Multimere zu identifizieren (Abb. 50). Erkennbar sind die UL VWF Multimere durch die Banden oberhalb der letzten sichtbaren Bande des Normalpools.

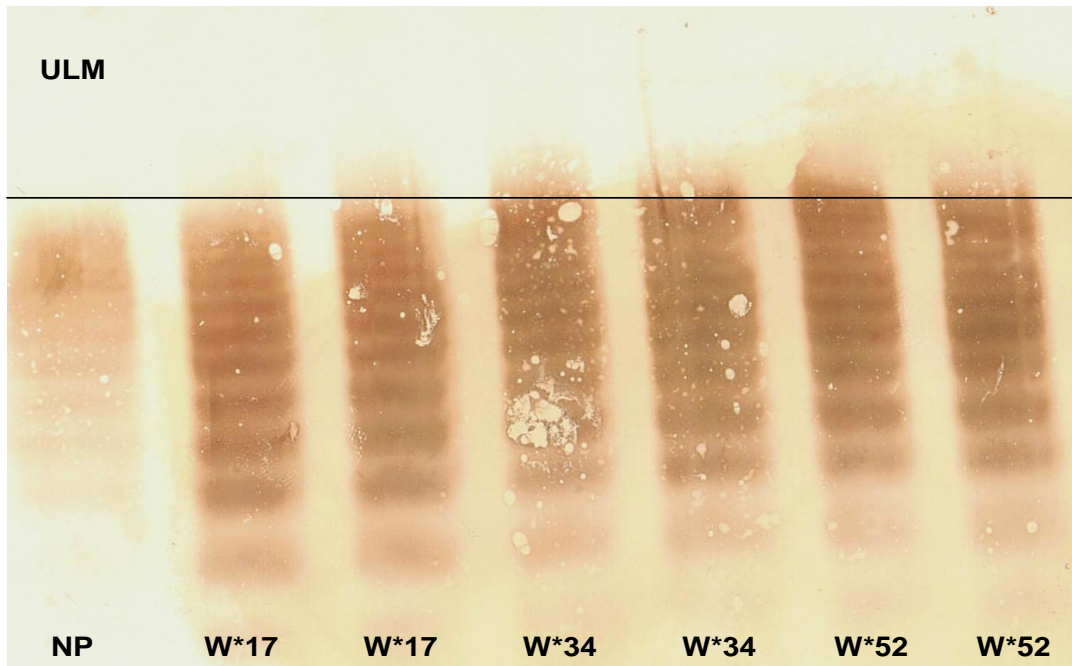


Abb. 50: 1%iges Agarosegel mit (von links nach rechts) Normalpool (NP) und je doppelt aufgetragen Wilfactin[®]*17 Wilfactin[®]*34 und Wilfactin[®]*52 jeweils in der Konzentration von 5 U/ml. ULM: ultralange VWF Multimere.

3.1.4.2 ADAMTS13 Aktivität

Modifizierte BCS-Methode nach Böhm

Eine Zunahme der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität konnte in allen drei Ansätzen (TTP mit Antikörpern / TTP ohne nachweisbare Antikörper / Normalpool) von Wilfactin[®]*17 über Wilfactin[®]*34 bis zu Wilfactin[®]*52 analysiert werden (Tab. 21 und Abb. 51). Innerhalb der Ansätze war eine Abnahme der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (sowohl chargenspezifisch als auch bei Wilfactin[®] allgemein) von TTP mit Antikörpern (28,7 %) zu TTP ohne nachweisbare Antikörper (22,1 %) zu Normalpool (11,8 %) zu verzeichnen (Tab. 21 und Abb. 51). Es muss also eine Spaltung des VWF durch ADAMTS13 erfolgt sein bzw. das Konzentrat muss eine gewisse ADAMTS13 Aktivität besitzen.

Konzentrate	TTP mit Antikörpern	TTP ohne Antikörper	Normalpool
Wilfactin®*17	26,3	19,9	11,2
Wilfactin®*34	26,7	21,3	12,0
Wilfactin®*52	33,0	25,1	12,2
Wilfactin®	28,7	22,1	11,8

Tab. 21: Aus fünf Einzelmessungen ermittelter Durchschnitt der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität der einzelnen Chargen und der aus allen Messungen ermittelte Mittelwert für Wilfactin®.

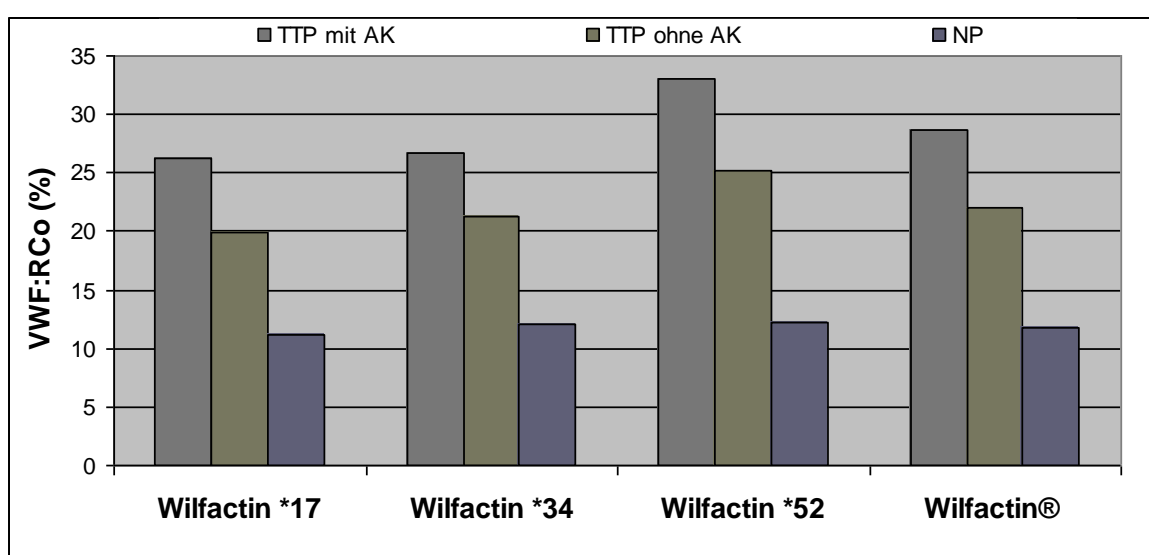


Abb. 51: Ristocetin-Cofaktor-Aktivität der Chargen Wilfactin®*17, Wilfactin®*34, Wilfactin®*52 und Wilfactin® jeweils in einem Ansatz von TTP mit Antikörpern (AK), einem Ansatz von TTP ohne nachweisbaren Antikörper und einem Ansatz mit Normalpool (NP).

Technozym® ADAMTS13

Mittels Technozym®ADAMTS13 Kit wurde für Wilfactin® die ADAMTS13 Aktivität analysiert. Dabei wurden je fünf Messungen mit Wilfactin®*17 und Wilfactin®*34 sowie sieben Messungen mit Wilfactin®*52 durchgeführt. Auch die jeweiligen Verdünnungen wurden mehrere Male gemessen. Die erhobenen Messdaten sind in Abbildung 52 graphisch dargestellt und in der darauf folgenden Tabelle 22 aufgelistet.

Alle Wilfactin® Chargen zeigten bei den Verdünnungen gleich bleibende oder sogar höhere ADAMTS13 Aktivitäten. Bei Wilfactin®*17 stieg die ADAMTS13 Aktivität von 2,4 % der unverdünnten Probe auf 4,17 % des Ansatzes mit 25 U/ml. Wilfactin®*34 wies mit 2,0

% die geringste mögliche Aktivität in der unverdünnten Probe auf und erreichte mit 6,7 % im 16%igen Ansatz den Höchstwert. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die ermittelte ADAMTS13 Aktivität von 19,76 % eine Ausnahme und damit ein möglicher Ausreißer bzw. Messfehler sein kann. Durchschnittlich die höchsten Aktivitätswerte bei allen Verdünnungsstufen zeigte Wilfactin®*52. Bei Betrachtung des Mittelwertes aus allen Chargen fällt auf, dass die ADAMTS13 Aktivität von 3,8 % der unverdünnten Probe auf 5,1 % im 50 U/ml Ansatz und auf 6,0 % im 25 U/ml ansteigt und danach nur leicht abfällt (2,9 % bzw. 3,9 %).

Die Standardabweichung ist innerhalb der unverdünnten Proben ($\pm 1,7$) und in der höchsten Verdünnung ($\pm 1,5$) am geringsten, demzufolge sind diese Werte am präzisesten zu ermitteln gewesen. Das ist aufgrund des Erreichens der unteren Nachweisgrenze jedoch relativ zu betrachten. Insgesamt bewegte sich die ADAMTS13 Aktivität immer in einem sehr niedrigen Aktivitätsbereich und die Standardabweichung zeigt bei allen Konzentrationsstufen eine gute Präzision an.

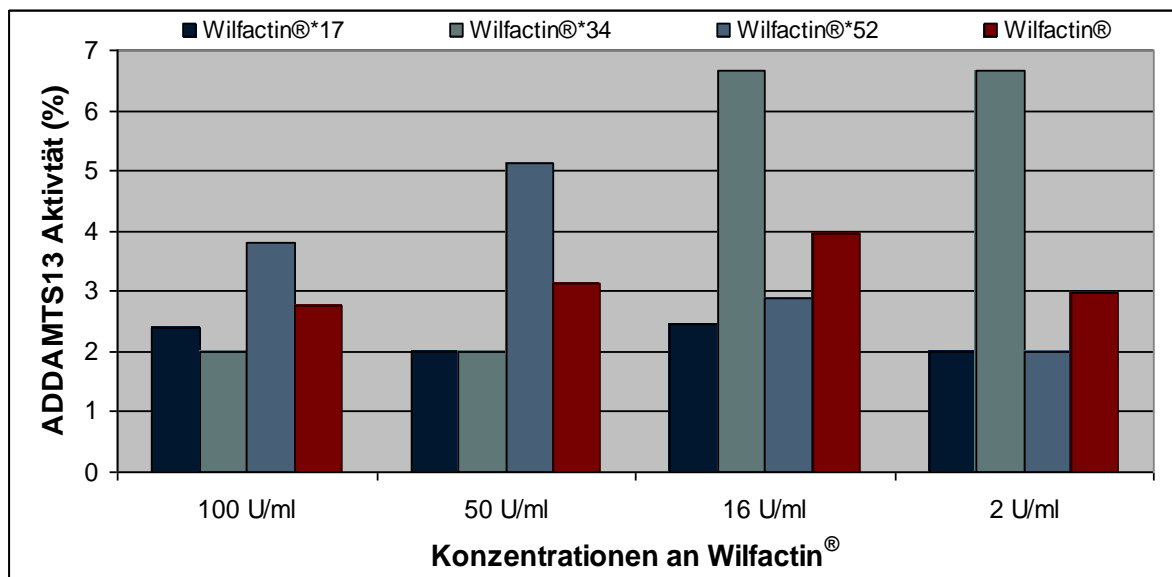


Abb. 52: Mit Technozym® ADAMTS13 Kit ermittelte ADAMTS13 Aktivität der Chargen Wilfactin®*17 (dunkelblau), Wilfactin®*34 (hellblau), Wilfactin®*52 (mittelblau) und dem Mittelwert der drei Chargen als Wilfactin® (rot) in Abhängigkeit von der Konzentration.

Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*17 in %				
1	2,00	2,00		3,40	2,00
2	2,00	2,00	4,17		
3	3,52				
4				2,00	
5	2,00	2,00		2,00	2,00
MW	2,4	2,0	4,17	2,5	2,0
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*34 in %				
1	2,00	2,00		19,76	2,00
2	2,00	2,00		2,00	4,18
3	2,00				
4				2,87	
5	2,00	2,00		2,00	2,00
MW	2,0	2,0		6,7	2,7
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*52 in %				
1	6,06	6,98		2,00	3,80
2	6,95	9,51		4,97	5,77
3	2,00	2,00	5,95		
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*52 in %				
4	2,00				
5				2,00	
6	2,00	2,00		2,55	2,00
7	2,00	2,00	2,00		
MW	3,8	5,1	6,0	2,9	3,9
MW aller Chargen	2,8	3,1	4,0	4,0	3,0
s aller Chargen	1,7	2,6		5,1	1,5

Tab. 22: ADAMTS13 Aktivitäten von Wilfactin® der Chargen *17, *34 und *52 in den unterschiedlichen Konzentrationen untersucht mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Zur Vergleichbarkeit mit den Daten aus dem Actifluor™ADAMTS13 Kit wurden die innerhalb des Technozym®ADAMTS13 Kits erhaltenen Aktivitäten in die Standardeinheiten (ng/ml) umgerechnet. Die Werte sind der Tabelle 23 zu entnehmen.

Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
MW in ng/ml Wilfactin®*17	17,3	14,4	30,0	18	14,4
MW in ng/ml Wilfactin®*34	14,4	14,4		48,2	19,4
MW in ng/ml Wilfactin®*52	27,4	36,7	43,2	20,9	28,1
MW aller Chargen	19,8	22,6	29,1	28,5	21,4

Tab. 23: Durchschnittliche ADAMTS13 Aktivitäten aus dem Technozym®ADAMTS13 Kit umgerechnet in Standardeinheiten in ng/ml.

Actifluor™ADAMTS13

Die verschiedenen konzentrierten Ansätze der drei Wilfactin® Chargen wurden mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit auf die ADAMTS13 Aktivität untersucht. Dabei ist jede Charge acht Mal und die Verdünnungen bei jeder Charge jeweils ein Mal gemessen worden. In Tabelle 24 sind die entsprechenden Messergebnisse, Mittelwert und Standardabweichung der Chargen aufgeführt. Bei der Messung der Verdünnungen von Wilfactin®*17 trat ein Fehler auf. Daher mussten die Ergebnisse verworfen werden und sind nicht in der Tabelle 24 aufgeführt.

Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*17 in ng/ml				
1	178,10				
2	082,61				
3	088,87				
4	044,58				
5	043,52				
Fortsetzung folgende Seite					

Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
6	124,69				
7	195,42				
8	087,54				
MW	105,7				
s	56,6				
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*34 in ng/ml				
1	050,10	26,31		32,1	21,9
2	035,85				
3	062,95				
4	010,70				
5	026,72				
6	090,44				
7	167,61				
8	070,45				
MW	64,4	26,31		32,1	21,9
s	48,8				
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*52 in ng/ml				
1	026,87				
2	066,14				
3	024,52				
4	020,49				
5	085,15				
6	173,09				
7	056,96				
8	065,56	52,28	30,57	51,08	
MW	65,0	52,28	30,57	51,08	
s	49,6				
MW aller Chargen	78,3	39,3		41,6	
s aller Chargen	53,3				

Tab. 24: ADAMTS13 Aktivitäten von Wilfactin® der Chargen *17, *34 und *52 in den unterschiedlichen Konzentrationen untersucht mit dem Actifluor™ ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung,

Die Mittelwerte der jeweiligen Wilfactin® Chargen *17, *34 und *52 als auch die Gesamtaktivität von Wilfactin® sind in der nachfolgenden Abbildung 53 nochmals graphisch dargestellt.

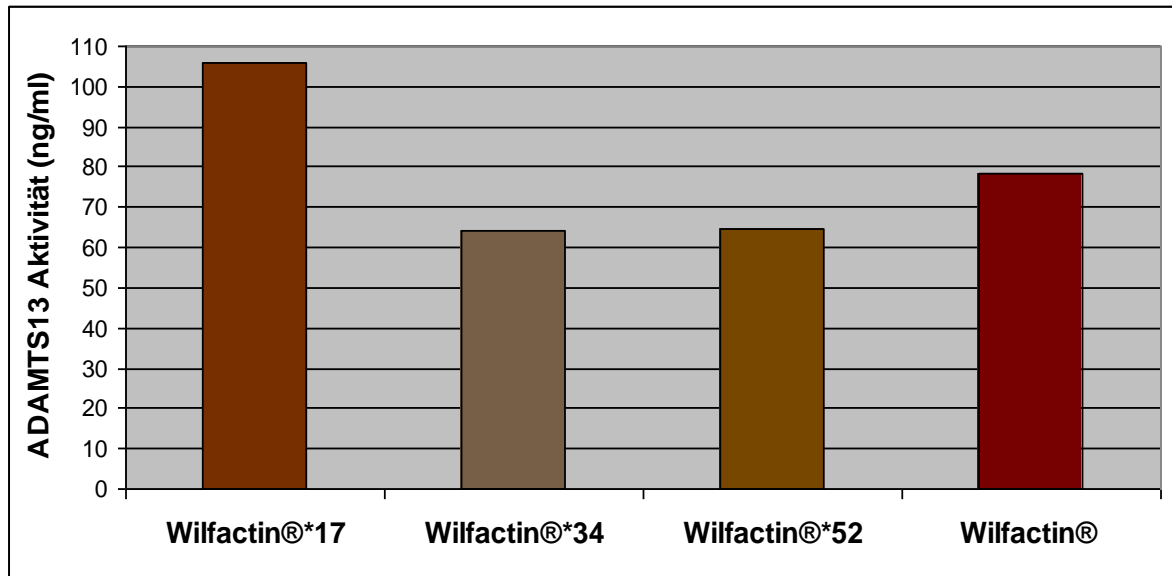


Abb. 53: Mittlere ADAMTS13 Aktivität der Wilfactin® Chargen *17, *34 und *52 und zusammengefasst als Wilfactin® in der Konzentration von 100 U/m gemessen mittels Actifluor™ ADAMTS13 Kit.

Wilfactin®*17 wies mit dem höchsten Wert von 195,42 ng/ml und dem niedrigsten Wert von 43,52 ng/ml die größten Schwankungen auf. Bei Wilfactin®*34 reichten die ADAMTS13 Aktivitäten von 167,61 ng/ml bis 10,70 ng/ml und bei Wilfactin®*52 von 173,09 ng/ml bis 20,49 ng/ml. Bei den Standardabweichungen bestätigten sich die höheren Schwankungen der Werte bei Wilfactin®*17 mit $s \pm 56,6$ gegenüber Wilfactin®*34 mit $s \pm 48,8$ und Wilfactin®*52 mit $s \pm 49,6$. Die Mittelwerte von Wilfactin®*34 und Wilfactin®*52 liegen mit 64,4 ng/ml bzw. 65,0 ng/m sehr eng zusammen, während Wilfactin®*17 mit 105,7 ng/ml eine deutlich höhere ADAMTS13 Aktivität aufweist. Werden die 24 Werte der drei Chargen zu einer ADAMTS13 Aktivität für Wilfactin® zusammengefasst, ergibt sich eine mittlere Aktivität von 78,3 ng/ml und eine Standardabweichung von $\pm 53,3$.

Bei den Chargen *34 und *52 wurden je ein Mal die Verdünnungen untersucht. Die Abnahme der ADAMTS13 Aktivität verlief bei beiden Chargen nicht proportional zur Verdünnung. Die ADAMTS13 Aktivität der ersten Verdünnung nahm bei Wilfactin®*34 passend zur Konzentrationsabnahme ab, blieb jedoch auf dieser Aktivitätsstufe bzw. stieg bei der 16 U/ml Probe leicht an. Dieses Bild war auch bei Wilfactin®*52 zu erkennen. Auch

bei dieser Probe sank die ADAMTS13 Aktivität nur in sehr geringem Maße und stieg ebenfalls zur Probe mit 16 U/ml wieder an.

3.1.4.3 ADAMTS13 Antigen

Technozym[®]ADAMTS13

Im Anschluss an die Aktivitätsmessung mit Technozym[®]ADAMTS13 wurde direkt das ADAMTS13 Antigen derselben Probe bestimmt. Für die fünf Aktivitätsmessungen von Wilfactin[®]*17 bzw. Wilfactin[®]*34 und die sieben Aktivitätsmessungen von Wilfactin[®]*52 wurde nun das jeweilige ADAMTS13 Antigen ermittelt. In Tabelle 25 aufgelistet sind die erhobenen Daten:

Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin[®]*17 in µg/ml				
1	0,13	0,09		0,06	0,05
2	0,14	0,09	0,07		
3	0,06				
4				0,03	
5	0,08	0,08		0,04	0,02
MW	0,10	0,09	0,07	0,04	0,04
Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin[®]*34 in µg/ml				
1	0,18	0,09		0,09	0,05
2	0,02	0,02		0,02	0,02
3	0,02				
4				0,02	
5	0,08	0,25		0,22	0,39
MW	0,08	0,12		0,09	0,15
Fortsetzung folgende Seite					

Konzentrationen	100 U/ml	50 U/ml	25 U/ml	16 U/ml	2 U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin®*52 in µg/ml				
1	0,09	0,06		0,03	0,02
2	0,04	0,03		0,02	0,02
3	0,04	0,03	0,03		
4	0,02				
5				0,02	
6	0,04	0,2		0,12	0,09
7	0,28	0,19	1,14		
MW	0,05	0,08	0,60	0,05	0,04
MW aller Chargen	0,09	0,10	0,41	0,06	0,08
s aller Chargen	0,07	0,08	0,63	0,06	0,13

Tab. 25: ADAMTS13 Antigen von Wilfactin® der Chargen *17, *34 und *52 in Abhängigkeit von der Konzentration untersucht mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Wilfactin®*17 weist mit 0,10 µg/ml den höchsten Wert für ADAMTS13 Antigen der unverdünnten Probe auf. Die Antigenwerte sinken mit zunehmender Verdünnung, aber nicht proportional. Wilfactin®*34 besitzt, unter Einbeziehung aller Verdünnungen, das höchste Antigen. Das ADAMTS13 Antigen nahm mit den Verdünnungsstufen nicht ab, sondern zu. Wilfactin®*52 besitzt den niedrigsten Antigenspiegel trotz der höchsten ADAMTS13 Aktivitätswerte. Der bei der Aktivitätsmessung aufgefallene Wert von 19,76 % korrelierte mit einem Antigenwert von 0,09 µg/ml und der sehr hohe Antigenwert von 1,14 µg/ml mit einer Aktivität von 2 %. Da der jeweilige Gegenwert im Rahmen der Messdaten lag, konnte er nicht als eindeutiger Messfehler ausgeschlossen werden und wurde somit in der Datenerhebung mit berücksichtigt.

Bei der chargenunabhängigen Betrachtung von Wilfactin® konnte insgesamt ein sehr niedriges ADAMTS13 Antigen gezeigt werden, welches mit den sehr niedrigen Aktivitätswerten übereinstimmt. Die Antigenwerte verhielten sich wie die Aktivität nicht proportional zur Verdünnungsreihe und wiesen zum Teil höhere Werte bei den niedrigeren Konzentrationen auf (Abb. 54).

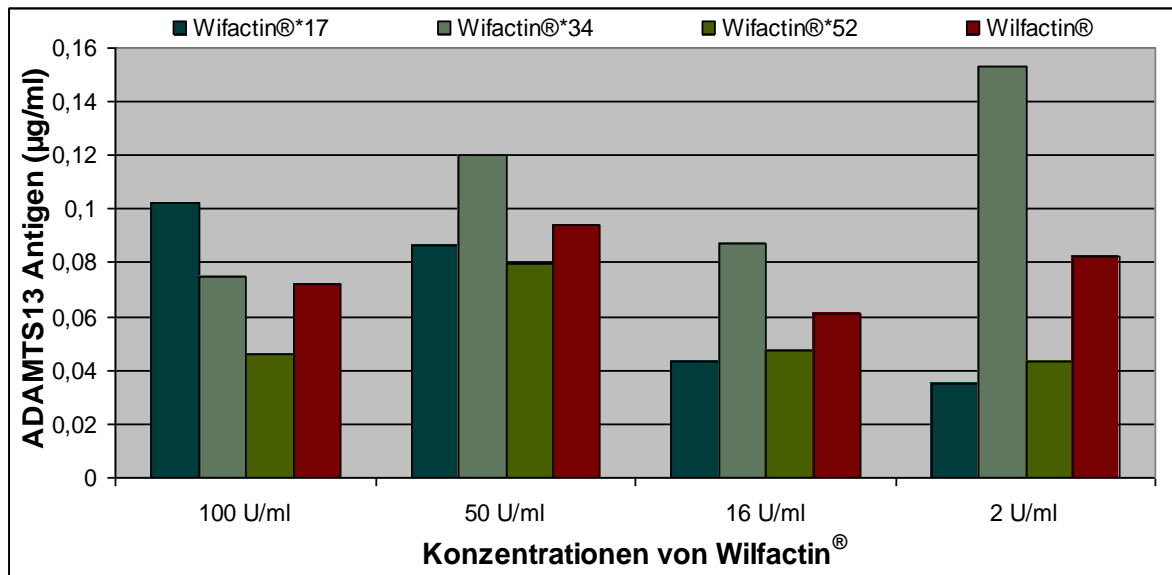


Abb. 54: Gegenüberstellung des mittleren ADAMTS13 Antigens der Chargen *17, *34 und *52 und von Wilfactin® als Gesamtes in Abhängigkeit von der Konzentration, gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

Imubind®ADAMTS13

Mit dem Imubind®ADAMTS13 ELISA wurden der unverdünnte und der 50%ige Ansatz der drei Wilfactin® Chargen drei bzw. zwei Mal untersucht. Zusätzlich erfolgte eine einmalige Messung der Ansätze mit 16 U/ml und 2 U/ml. Die Messdaten sind der Tabelle 26 zu entnehmen und graphisch in Abbildung 55 aufgezeigt.

Konzentrationen	100U/ml	50U/ml	16U/ml	2U/ml
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin[®]*17 in µg/ml			
1	0,020	0,030	0,010	0
2	0,025	0,010		
3	0,023	0,015		
MW	0,02	0,02	0,01	0
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin[®]*34 in µg/ml			
1	0,027	0,008		
2	0,048	0,026		
MW	0,04	0,02		
Messungen	Ergebnisse von Wilfactin[®]*52 in µg/ml			
1	0,031	0,028		
2	0,051	0,053		
MW	0,04	0,04		
MW aller Chargen	0,03	0,03	0,01	0

Tab. 26: Messergebnisse für ADAMTS13 Antigen der Chargen Wilfactin[®]*17, *34 und *52 und der daraus resultierende Mittelwert für Wilfactin[®] bei den jeweiligen Verdünnungsstufen untersucht mit Imubind[®]ADAMTS13 ELISA.

Die Ergebnisse der Antigenmessung bestätigten die sehr niedrigen ADAMTS13 Antigenwerte des Technozym[®]ADAMTS13 Kits, wobei sie nochmals um annähernd die Hälfte geringere Werte aufweisen. Wilfactin[®]*17 besitzt den geringsten und Wilfactin[®]*52 den höchsten Antigenwert. Da zu wenige Daten und die vorhandenen in so geringer Anzahl vorliegen, ist eine statistische Differenzierung schwierig.

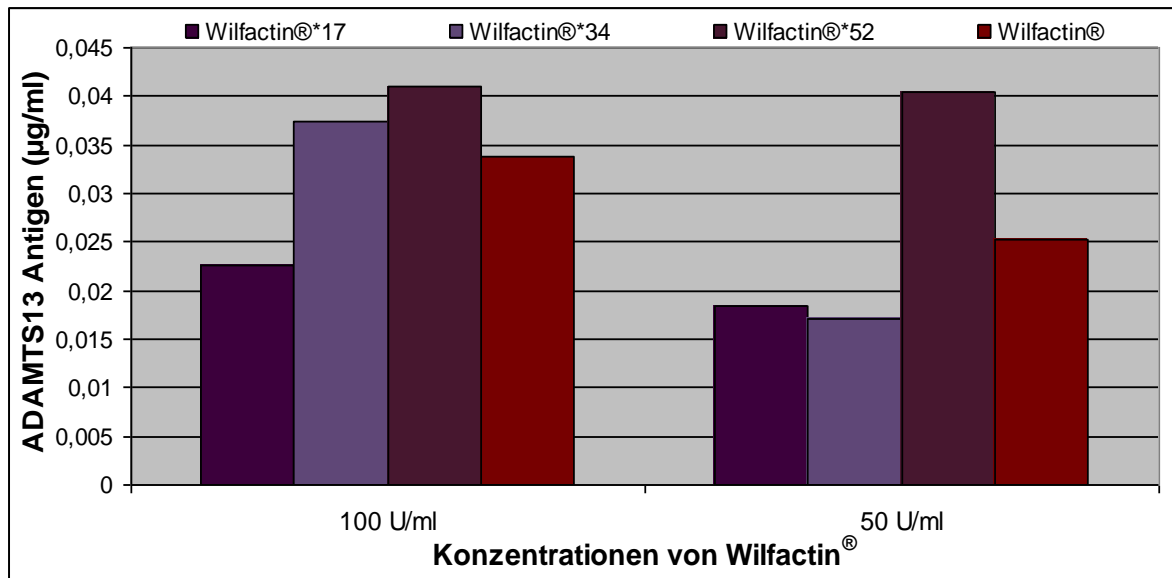


Abb. 55: Mittlere ADAMTS13 Antigenwerte für die verschiedenen Konzentrationen von Wilfactin®*17, *34 und *52 sowie dem Mittelwert aus den Chargen als Wilfactin®, ermittelt mit dem Imubind®ADAMTS13 ELISA.

3.1.4.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13

In der Gegenüberstellung (Abb. 56) der Ergebnisse der beiden FRET Assays Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13 für die verschiedenen Chargen sind die konstant höheren Messergebnisse mit der Actifluor™ADAMTS13 Methode gegenüber der Technozym®ADAMTS13 Methode ersichtlich. Um die beiden FRET Assays zu vergleichen, wurde die Standardeinheiten (ng/ml) gewählt. Dadurch mussten die in % gemessenen Angaben von Technozym®ADAMTS13 umgerechnet (2.3.2.3) werden.

Bei der Actifluor™ADAMTS13 Methode liegen die ADAMTS13 Aktivitäten für Wilfactin®*17 deutlich höher als für die anderen beiden Chargen, die sich kaum in ihrer Aktivität unterscheiden. Bei der Technozym®ADAMTS13 Methode hingegen ergibt sich für Wilfactin®*52 die höchste Aktivität. Insgesamt waren aber die Aktivitätswerte bei dieser Methode viel näher beieinander als bei dem FRET Assay von American Diagnostica.

Beide Testmethoden belegen jedoch eine ADAMTS13 Aktivität in sehr niedrigen Bereichen.

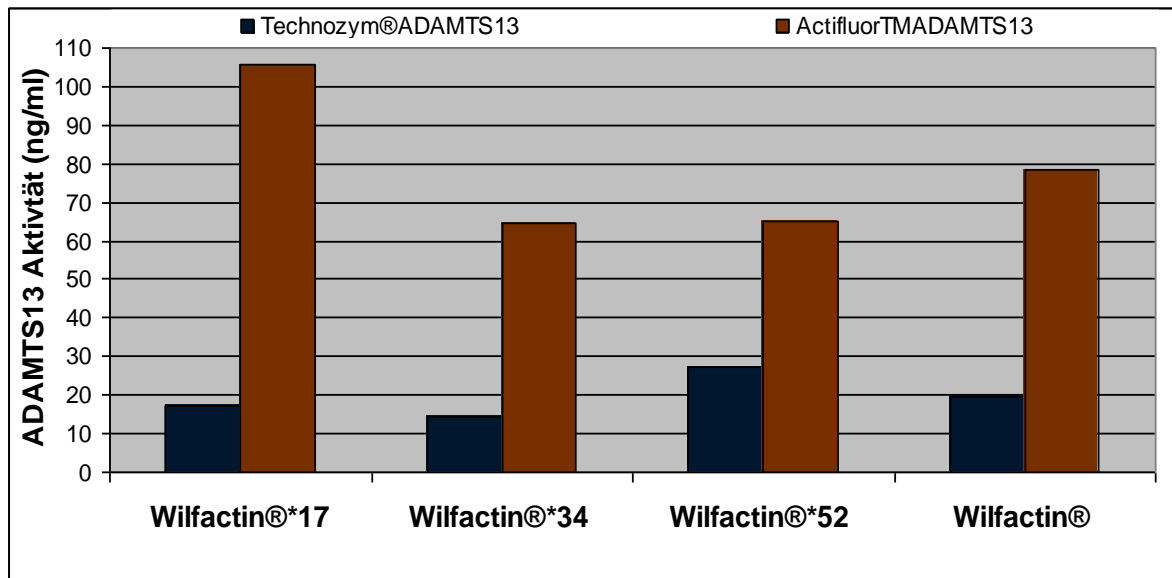


Abb. 56: Vergleich der ADAMTS13 Aktivität von Wilfactin® zusammengefasst aus allen drei Chargen ermittelt durch Technozym®ADAMTS13 (blau) und Actifluor™ADAMTS13 (orange).

Bei der Antigenbestimmung wird ebenfalls bei beiden angewandten Methoden ein ADAMTS13 Antigenlevel von Wilfactin® in sehr niedrigen Bereichen analysiert. Der Technozym®ADAMTS13 Kit beschreibt höhere und zwischen den einzelnen Chargen stärker schwankende Werte als der Imubind®ADAMTS13 ELISA. Des Weiteren werden, entgegen den Aktivitätswerten, die höchsten Antigenwerte für Wilfactin®*17 gemessen und die niedrigsten für Wilfactin®*52. Der Imubind®ADAMTS13 ELISA zeigt für Wilfactin®*17 die niedrigsten Antigenwerte an und machte zwischen den beiden anderen Chargen kaum einen Unterschied aus (Abb. 57).

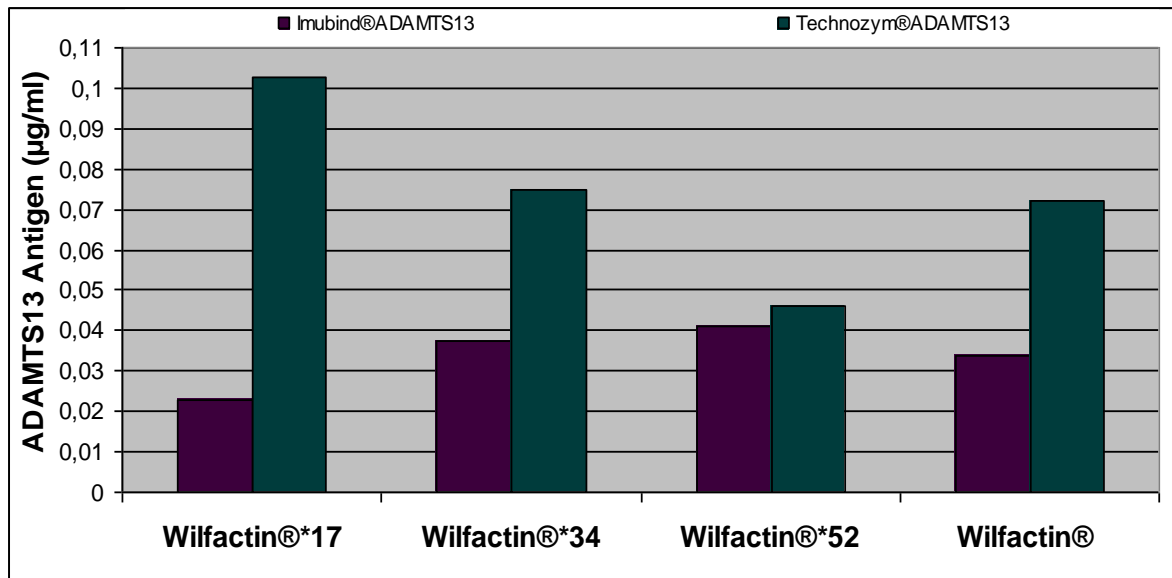
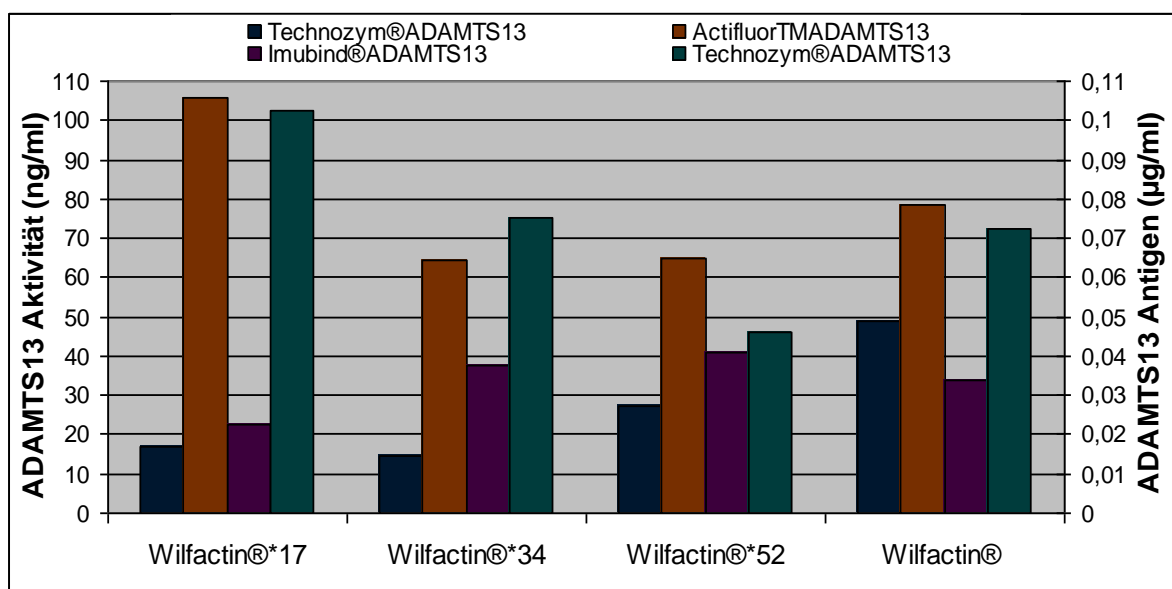


Abb. 57: Werte der ADAMTS13 Antigenbestimmung mit dem Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila) und dem Technozym®ADAMTS13 Kit (grün) für Wilfactin®. Chargenspezifisch aufgetrennt und als Wilfactin® Gesamt angegeben in der Konzentration 100 U/ml.

Die ADAMTS13 Aktivität und das ADAMTS13 Antigen werden in Abbildung 58 graphisch als auch tabellarisch nochmals zusammengestellt. Durch die so unterschiedlichen Ergebnisse ist nur die sehr geringe ADAMTS13 Aktivität als auch das sehr geringe ADAMTS13 Antigen als eindeutiges Fazit zu ziehen. Grund für die Schwankungen sind wahrscheinlich die tiefen Werte, die sich nahe der Nachweisgrenze bewegen und daher größeren Fehlern unterliegen.



Fortsetzung folgend Seite

Konzentrate	Wilfactin®*17	Wilfactin®*34	Wilfactin®*52	Wilfactin®
Messmethoden				
Technozym® ADAMTS13	17,1 ng/ml	14,4 ng/ml	27,4 ng/ml	49,0 ng/ml
Actifluor™ ADAMTS13	105,7 ng/ml	64,4 ng/ml	64,9 ng/ml	78,3 ng/ml
Imubind® ADAMTS13	22,7 µg/ml	37,5 µg/ml	41,0 µg/ml	33,7 µg/ml
Technozym® ADAMTS13	102,5 µg/ml	75,0 µg/ml	46,0 µg/ml	72,3 µg/ml

Abb. 58: Graphischer und tabellarischer Vergleich der durchschnittlich gemessenen ADAMTS13 Aktivitäten (Technozym® ADAMTS13 Kit (blau) und Actifluor™ ADAMTS13 Kit (orange)) gegenüber dem durchschnittlichen ADAMTS13 Antigen (Imubind® ADAMTS13 ELISA (lila), Technozym® ADAMTS13 Kit (grün)) von Wilfactin® in der Konzentration von 100 U/ml.

3.1.4.5 ADAMTS13 Antikörper

Bei der Untersuchung von Wilfactin®*17 und Wilfactin®*34 und Wilfactin®*52 auf ADAMTS13 Antikörper waren keine Antikörper nachweisbar.

3.1.5 Beriate® P

Von den aus Humanplasma hergestellten Faktorkonzentraten, die innerhalb der Arbeit untersucht wurden, beinhaltet Beriate® P nach der Rekonstitution mit 100 U/ml die höchste FVIII Konzentration. Beriate® P stellte aber auch das einzige in dieser Arbeit untersuchte rein plasmatische Faktor VIII Konzentrat dar. Für die Verdünnungsreihe konnte folglich nicht der VWF Anteil heran gezogen werden, sondern der FVIII stellte die entsprechende Bezugsgröße dar. Es wurde eine Verdünnung von 16 U/ml hergestellt und diese sowie der unverdünnte Ansatz gemessen.

3.1.5.1 Gelelektrophorese

Beriate® P ist ein Faktor VIII Konzentrat, daher sollten keine VWF Multimere bzw. nur Spuren vorhanden sein. Im 1,8%igen Agarosegel sind ganz schwache VWF Banden mit spezifischem Kaninchen-Antikörper anfärbbar. Die Anwesenheit des VWF in Beriate® P, wenn auch in sehr geringer Menge, ist damit nachweisbar (Abb. 59 rechts).

In einem 1%igen Agarosegel wurde Beriate[®]P neben den anderen Konzentraten mitlaufen gelassen. Nach der Auswertung sind bei Beriate[®]P im Gegensatz zu den anderen Konzentraten keinerlei Banden zu erkennen (Abb. 60 links).

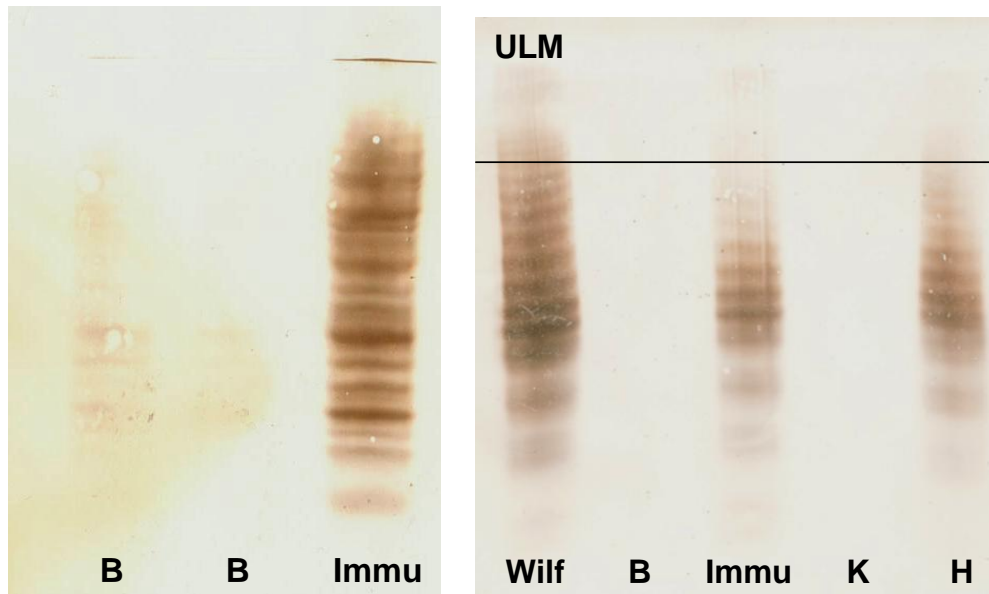


Abb. 60: Rechts: 1,8%iges Agarosegel mit Spuren von VWF in Beriate[®]P neben dem VWF Multimermuster von Immunate STIM plus. Links: 1%iges Agarosegel zur Untersuchung auf UL VWF Multimere (ULM) (Wilf: Wilfatin[®], B: Beriate[®]P, Immu: Immunate STIM plus, K: Kogenate[®], H: Haemate[®]P).

3.1.5.2 ADAMTS13 Aktivität

Modifizierte Böhm-Methode

Aufgrund dessen, dass Beriate[®]P keinen VWF in größeren Mengen beinhaltet, ist hier die modifizierte Böhm-Methode nicht anwendbar, da sie auf der indirekten Messung der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität beruht.

Technozym[®] ADAMTS13

Mit dem zweiten FRETs Test wurde Beriate[®]P fünf Mal unverdünnt und vier Mal in der Konzentration von 16 U/ml untersucht. Es ergab sich für alle Messungen eine ADAMTS13 Aktivität an der Nachweisgrenze von 2 %.

Actifluor™ ADAMTS13

Beriate®P wurde neun Mal mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit auf seine ADAMTS13 Aktivität untersucht und die Verdünnung von 16 U/ml zwei Mal (Tab. 27). Es zeigt sich eine sehr niedrige Aktivität von durchschnittlich 92,2 ng/ml im unverdünnten und 53,4 ng/ml im 16 U/ml Ansatz. Die Werte schwanken von 21,10 ng/ml bis hin zu 228,84 ng/ml. Die Standardabweichung von 74,4 ng/ml stellt für diese niedrigen Aktivitätswerte eine hohe Streuung und damit schlechte Präzision dar. Außer den zwei Werten (192,51 ng/ml und 228,84 ng/ml), die über 100 ng/ml liegen, ergaben sich jedoch nur Werte im sehr niedrigen Aktivitätsbereich zwischen 21,10 ng/ml und 92,46 ng/ml.

Die Verdünnungen wiesen nochmals niedrigere Werte auf, wobei sie jedoch höher waren als aufgrund ihrer Verdünnung angenommen wurde.

Konzentrationen	100U/ml	16U/ml
Messungen	Beriate® P in ng/ml	
1	092,46	45,79
2	042,98	
3	066,33	
4	021,10	
5	035,30	
6	192,51	
7	228,84	
8	068,32	
9	082,34	61,02
MW	92,2	53,4
s	± 74,4	

Tab. 27: ADAMTS13 Aktivitäten von Beriate®P in dem unverdünnten Ansatz und in der Konzentration von 16 U/ml. Untersucht mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

3.1.5.3 ADAMTS13 Antigen

Technozym® ADAMTS13 Kit und Imubind® ADAMTS13 ELISA

Mittels Technozym® ADAMTS13 wurde das ADAMTS13 Antigen fünf Mal unverdünnt und vier Mal in dem Ansatz von 16 U/ml untersucht. Mit der Imubind® ADAMTS13 Methode erfolgte eine zweimalige Bestimmung beider Ansätze (Tab. 28). Die Antigenwerte fielen bei beiden Methoden sehr niedrig aus. Das Technozym® ADAMTS13 weist einen Antigenwert im Schnitt von 0,13 µg/ml auf und liegt damit um eine Zehnerpotenz höher als der Imubind® ADAMTS13 Kit mit 0,01 µg/ml.

Konzentrationen	100 U/ml	16 U/ml
Messungen mit Imubind® ADAMTS13	Beriate® P in µg/ml	
1	0,01	0,009
2	0,01	0,011
Mittelwert	0,01	0,01
Konzentrationen	100 U/ml	16 U/ml
Messungen mit Technozym® ADAMTS13	Beriate® P in µg/ml	
1	0,02	0,02
2	0,02	0,02
3	0,21	0,06
4	0,04	
5	1,11	0,57
Mittelwert	0,13	0,17

Tab. 28: ADAMTS13 Antigen von Beriate® P in Abhängigkeit von der Konzentration, gemessen mittels Technozym® ADAMTS13 Kit und Imubind® ADAMTS13 ELISA.

3.1.5.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13

Eine ADAMTS13 Aktivität konnte mit dem Technozym® ADAMTS13 Kit nicht ermittelt werden, da alle Messwerte an der Nachweisgrenze lagen.

Selbst der Actifluor™ ADAMTS13 Kit, der immer höhere ADAMTS13 Aktivitäten ermittelt, analysiert nur eine durchschnittliche Aktivität für ADAMTS13 von 92,2 ng/ml. Die beiden

Werte über 100 ng/ml sind kritisch zu betrachten. Würden sie aus der Auswertung herausgenommen werden, ergäbe sich für die ADAMTS13 Aktivität nur noch ein Wert von 58,4 ng/ml. Die beiden hohen Aktivitätswerte korrelieren auch mit den beiden hohen Antigenwerten desselben Kits. Auch die Antigenmessungen ermittelte Werte an der Nachweisgrenze (Technozym[®]ADAMTS13 Kit: 0,02 µg/ml), bis auf die beiden erwähnten Ausnahmen. Die Werte waren ansonsten so gering, dass zwischen Messungenauigkeiten und einer tatsächlichen Anwesenheit von ADAMTS13 nicht unterschieden werden kann (Imubind[®]ADAMTS13 ELISA: 0,01 µg/ml). Das Vorliegen von ADAMTS13 Antigen bzw. seine Aktivität kann nahezu ausgeschlossen werden.

3.1.6 Kogenate[®]

Das rekombinant hergestellte Faktor VIII Konzentrat Kogenate[®] beinhaltet nach der Auflösung in 2,5 ml Aqua ad iniectabilia 400 U/ml Gerinnungsfaktor VIII. In diesem Präparat dürften aufgrund seiner Herstellung keinerlei Spuren von ADAMTS13 beziehungsweise des VWF nachweisbar sein. In der SDS-Gelelektrophorese bestätigt sich dies (Abb. 42 rechts)

Das Konzentrat wurde als Negativstandard bei sämtlichen Methoden mit untersucht.

Kogenate[®] zeigte bei allen ADAMTS13 Aktivitäts- und Antigenbestimmungen sowie bei den Methoden zur Untersuchung des VWF und auf ADAMTS13-Antikörper negative Ergebnisse.

3.2 Fresh Frozen Plasma und solvent / detergent behandeltes Plasma (Octaplas[®])

Die Plasmapherese stellt den momentanen Goldstandard zur Behandlung der thrombotischen Mikroangiopathien, insbesondere der TTP, dar. Dabei stehen verschiedene Plasmapräparate zur Verfügung, die unterschiedlich gewonnen und verarbeitet werden (1.2.6.2). Ob durch die verschiedenen Gewinnungen und Weiterbehandlung Unterschiede hinsichtlich ihrer ADAMTS13 Aktivität zustande kommen, galt es zu untersuchen. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel beschreiben.

Die innerhalb der Arbeit verwendeten Plasmen waren Fresh Frozen Plasma (FFP) und das solvent / detergent behandelte Plasma Octaplas[®], die freundlicher Weise von der Transfusionszentrale durch Herrn Dr. Conradi bzw. von der Firma Octapharma GmbH zur Verfügung gestellt wurden.

3.2.1 Gelelektrophorese

Um auf UL VWF Multimere zu testen, wurde FFP und Octaplas[®] jeder Blutgruppe unverdünnt auf das 1%ige Agarosegel aufgetragen und mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt. Als Standard galt der ebenfalls aufgetragene Normalpool aus 15 männlichen und 15 weiblichen, gesunden Probanden. Nach der Anfärbung sind für beide Präparate bei jeder Blutgruppe UL VWF Multimere zu identifizieren (Abb. 61). Erkennbar sind die UL VWF Multimere durch die Banden oberhalb der letzten, sichtbaren Bande des Normalpools.

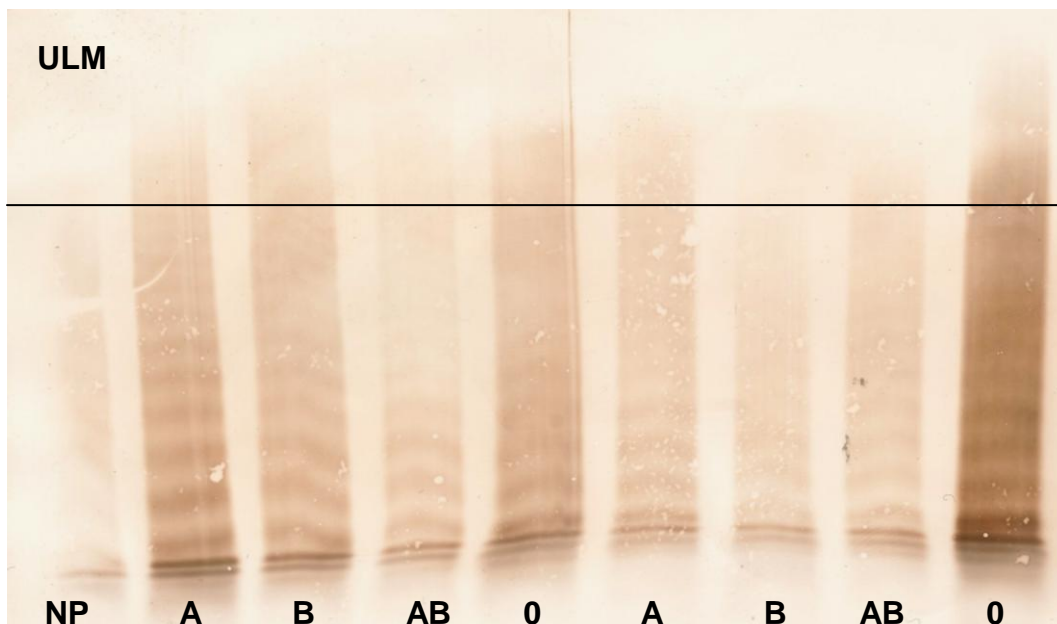


Abb. 61: 1%iges Agarosegel mit unverdünntem (von links nach rechts) Normalpool (NP), Octaplas[®] der Blutgruppen A, B, AB und 0 und FFP der Blutgruppen A, B, AB und 0. ULM: ultralange VWF Multimere.

3.2.2 ADAMTS13 Aktivität

BCS-Methode nach Böhm

Mit der hausinternen BCS-Methode nach Böhm wurden die einzelnen Blutgruppen von FFP je fünf Mal untersucht, die von Octaplas[®] sieben Mal. Wie aus den Messdaten in Tabelle 29 ersichtlich, wurden für Octaplas[®] mit 75,3 % eine niedrigere ADAMTS13 Aktivität als für FFP mit 90,3 % analysiert.

Die Einzelwerte und folglich auch die Mittelwerte der Messungen jeder Blutgruppe zeigen bei FFP höhere Aktivitäten als bei Octaplas®. Während bei FFP die Werte an der oberen Nachweisgrenze der Methode vorzufinden sind, sind die Einzeldaten von Octaplas® über einen größeren Messbereich verteilt. Dies ist auch an den tendenziell höheren Standardabweichungen für Octaplas® ersichtlich (Tab. 29). Die niedrigste ADAMTS13 Aktivität wurde bei FFP wiederum für die Blutgruppe A gemessen. Die höchste Aktivität wies jedoch die Blutgruppe AB (100,0 %) auf, wobei mit 99,5 % die Blutgruppe 0 davon kaum zu unterscheiden war.

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	90,50 %	77,70 %	100,00 %	75,20 %
2	90,00 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %
3	78,50 %	45,70 %	87,20 %	70,90 %
4	100,00 %	91,60 %	100,00 %	98,90 %
5	98,80 %	100,00 %	100,00 %	100,00 %
MW	91,6 %	95,8 %	100,0 %	99,5 %
s	± 8,6	± 22,8	± 5,7	± 14,6
MW FFP	90,3 %			
Messungen	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
1	51,90 %	61,70 %	67,40 %	71,90 %
2	100,00 %	51,20 %	75,50 %	91,50 %
3	75,90 %	82,50 %	76,90 %	78,60 %
4	68,50 %	82,90 %	89,50 %	89,40 %
5	74,90 %	63,60 %	75,60 %	97,90 %
6	61,45 %	85,50 %	100,00 %	27,10 %
7	100,00 %	75,35 %	52,50 %	78,70 %
MW	76,2 %	76,8 %	79,4 %	73,3 %
s	± 18,3	± 13,1	± 15,2	± 23,5
MW Octaplas®	75,3 %			

Tab. 29: Messergebnisse der BCS-Methode nach Böhm bei der ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung von FFP und Octaplas®, aufgeteilt nach Blutgruppen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

Die Aktivitätsunterschiede zwischen den Blutgruppen betragen 8,4 %, die von Octaplas® 6,1 %, und sind damit geringfügig niedriger. Bei Octaplas® zeigt sich die niedrigste

Aktivität für die Blutgruppe 0 und die höchste wie beim FFP für Blutgruppe AB. Blutgruppe A und B sind in der Mitte zwischen höchster und niedrigster ADAMTS13 Aktivität anzutreffen und mit 76,2 % bzw. 76,8 % wiederum sehr dicht beieinander.

Die ausgewerteten Daten wurden in der Abbildung 62 graphisch zusammengefasst.

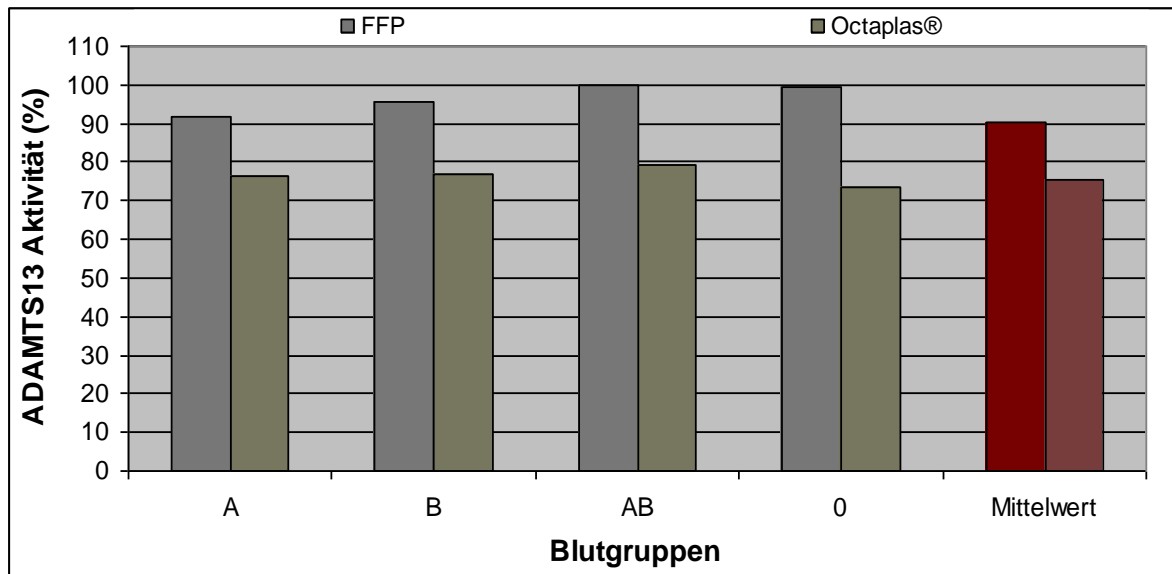


Abb.62: ADAMTS13 Aktivität der verschiedenen Blutgruppen und als Gesamtheit (Mittelwert) von FFP und Octaplas®, gemessen mittels BCS-Methode nach Böhm.

Wie die Technozym®ADAMTS13 Methode misst die BCS-Methode nach Böhm die Aktivität in %. Um später die Messdaten mit denen der Actifluor™ADAMTS13 Methode vergleichen zu können, werden die Aktivitätswerte von % in Standardeinheiten (ng/ml) umgerechnet (2.3.2.3) und sind der Tabelle 30 zu entnehmen.

Proben	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0	FFP
MW in ng/ml	548,7	553,2	571,7	527,6	122,8
Proben	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0	Octaplas®
MW in ng/ml	659,2	689,8	720,0	716,0	649,8

Tab. 30: Mittelwerte der BCS-Methode nach Böhm umgerechnet in Standardeinheiten in ng/ml.

Technozym[®]ADAMTS13

Mit dem FRET Assay Technozym[®]ADAMTS13 wurden blutgruppenspezifisch FFP sieben Mal (Tab. 31) und Octaplas[®] acht Mal untersucht (Tab. 32).

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	55,42 %	72,00 %	92,52 %	72,04 %
2	57,55 %	72,90 %	100,00 %	73,60 %
3	85,51 %	31,35 %	100,00 %	91,84 %
4	79,04 %	83,16 %	100,00 %	90,68 %
5	73,29 %	104,60 %	61,39 %	104,60 %
6	80,76 %	104,60 %	30,44 %	104,60 %
7	31,74 %	44,26 %	24,63 %	49,40 %
MW	66,2 %	73,3 %	80,7 %	83,8 %
s	± 19,1	± 27,9	± 33,8	± 20,0
MW FFP	74,0 %			

Tab. 31: Messergebnisse des Technozym[®]ADAMTS13 Kits für die ADAMTS13 Aktivität bei der Bestimmung von FFP, aufgeteilt nach Blutgruppen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

Messungen	Octaplas [®] A	Octaplas [®] B	Octaplas [®] AB	Octaplas [®] 0
1	89,40 %	92,77 %	96,08 %	88,27 %
2	66,56 %	100,00 %	59,51 %	79,92 %
3	60,21 %	59,68 %	57,79 %	65,50 %
4	80,82 %	65,48 %	54,59 %	71,92 %
5	77,83 %	89,08 %	100,00 %	96,83 %
6	104,60 %	104,60 %	104,60 %	104,60 %
7	104,60 %	104,60 %	104,60 %	104,60 %
8	37,92 %	44,56 %	49,80 %	51,48 %
MW	77,7 %	82,6 %	78,4 %	82,9 %
s	± 22,7	± 22,9	± 24,8	± 19,2
MW Octaplas[®]	80,4 %			

Tab. 32: Messergebnisse des Technozym[®]ADAMTS13 Kits für die ADAMTS13 Aktivität bei der Bestimmung von Octaplas[®], aufgeteilt nach Blutgruppen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

Die durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität von Octaplas® (80,4 %) ist höher als die des FFPs (74,0 %). Beim Vergleich der einzelnen Blutgruppen von FFP und Octaplas®, sind die Unterschiede jedoch sehr gering. Blutgruppe A hat mit 66,2 % bei FFP und 77,7 % bei Octaplas® beide Male die geringste und Blutgruppe 0 mit 83,8 % bei FFP und 82,9 % bei Octaplas® knapp die höchste ADAMTS13 Aktivität. Die Blutgruppen B und AB zeigten kaum Unterschiede in ihren Aktivitätswerten, wobei Blutgruppe B bei FFP im Gegensatz zu Blutgruppe AB bei Octaplas® geringfügig höhere Werte aufweist. Insgesamt sind die Aktivitätswerte aller Blutgruppen bei Octaplas® innerhalb von 5,2 %, von FFP hingegen innerhalb von 17,6 %, vorzufinden. Die ADAMTS13 Aktivität bei FFP variiert demzufolge stärker als die bei Octaplas® (Abb. 63). Die Standardabweichungen der blutgruppeninternen Messungen ergeben Werte zwischen $\pm 19,1$ und $\pm 33,8$ und sind bei Octaplas® im Schnitt ein wenig geringer als bei FFP.

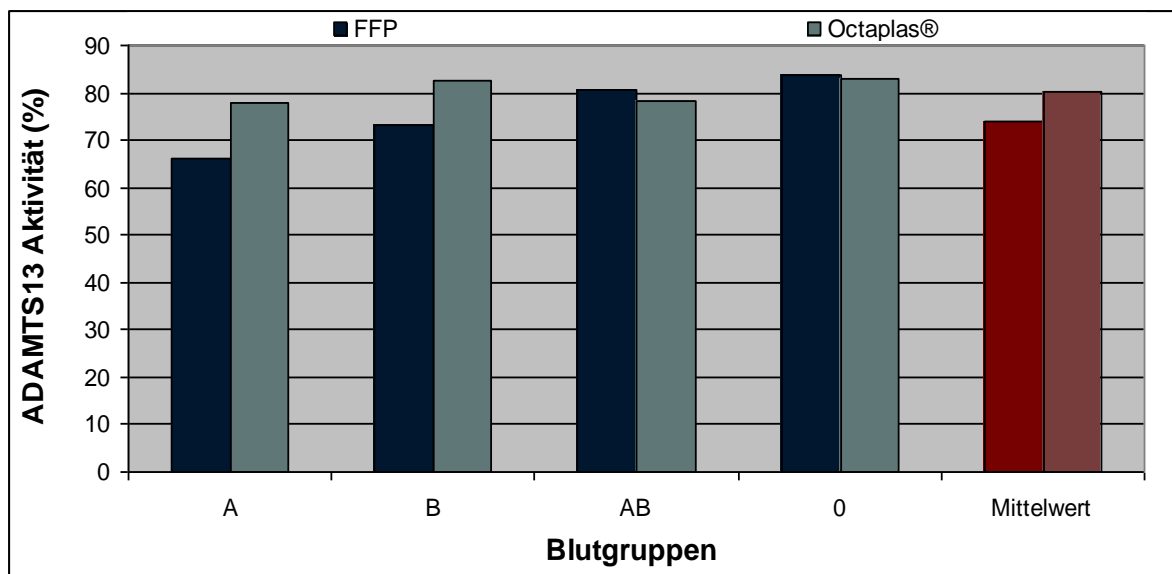


Abb. 63: ADAMTS13 Aktivität der verschiedene Blutgruppen und als Gesamtheit (Mittelwert) von FFP und Octaplas® gemessen mittels Technozym® ADAMTS13 Kit.

Um später die einzelnen Messdaten vergleichen zu können, wurden die Aktivitätswerte von % in die Standardeinheit ng/ml umgerechnet (2.3.2.3).

Proben	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0	FFP
MW in ng/ml	476,6	527,5	581,2	603,5	532,8
Proben	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0	Octaplas®
MW in ng/ml	559,8	594,7	564,3	596,8	578,9

Actifluor™ADAMTS13

An 7 Messtagen wurden von jeder Blutgruppe von FFP und Octaplas® mittels Actifluor™ADAMTS13 Methode die ADAMTS13 Aktivitäten erhoben, die in den Tabellen 33 und 34 aufgelistet erscheinen. Die Ergebnisse entsprechen weitestgehend denen von Technozym®ADAMTS13

Aus den Messergebnissen ist eine durchschnittlich höhere ADAMTS13 Aktivität für Octaplas® (766,1 ng/ml) gegenüber FFP (719,9 ng/ml) abzulesen. Bei der Betrachtung der Blutgruppen ist die niedrigste Aktivität bei FFP als auch bei Octaplas® für Blutgruppe A zu verzeichnen und die höchste für Blutgruppe 0. Für Blutgruppe B und AB lassen sich kaum Unterschiede hinsichtlich ihrer Aktivität ausmachen, wobei bei Blutgruppe B bei beiden Plasmaderivaten die Aktivität geringfügig niedriger ist als bei Blutgruppe AB.

Die Aktivitätsdifferenzen zwischen den einzelnen Blutgruppen von FFP (583,2 ng/ml zu 850,6 ng/ml) sind höher als bei Octaplas® (694,7 ng/ml zu 808,2 ng/ml). Auch innerhalb der Blutgruppen war die Präzision bei Octaplas® höher als bei FFP (Tab. 35). Die Ergebnisse sind in Abbildung 64 graphisch wiedergegeben.

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	517,37 ng/ml	672,37 ng/ml	804,25 ng/ml	798,85 ng/ml
2	666,15 ng/ml	643,65 ng/ml	756,25 ng/ml	756,79 ng/ml
3	554,88 ng/ml	659,09 ng/ml	819,05 ng/ml	714,96 ng/ml
4	277,19 ng/ml	505,45 ng/ml	195,88 ng/ml	707,09 ng/ml
5	680,95 ng/ml	1002,45 ng/ml	934,12 ng/ml	949,60 ng/ml
6	752,94 ng/ml	908,56 ng/ml	799,53 ng/ml	1133,66 ng/ml
7	632,69 ng/ml	613,99 ng/ml	807,40 ng/ml	893,21 ng/ml
MW	583,2 ng/ml	715,1 ng/ml	730,9 ng/ml	850,6 ng/ml
s	± 156,3	± 175,2	± 242,2	± 154,0
MW FFP	719,9 ng/ml			

Tab. 33: ADAMTS13 Aktivitätsergebnisse bei der Bestimmung von FFP mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit aufgeteilt nach Blutgruppen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

Messungen	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
1	635,25 ng/ml	607,79 ng/ml	647,57 ng/ml	662,87 ng/ml
2	661,51 ng/ml	713,64 ng/ml	648,50 ng/ml	648,92 ng/ml
3	682,29 ng/ml	620,87 ng/ml	583,55 ng/ml	613,26 ng/ml
4	656,64 ng/ml	769,60 ng/ml	761,95 ng/ml	791,45 ng/ml
5	721,68 ng/ml	901,55 ng/ml	1197,16 ng/ml	1107,50 ng/ml
6	726,06 ng/ml	925,80 ng/ml	873,40 ng/ml	1052,73 ng/ml
7	779,55 ng/ml	898,62 ng/ml	781,23 ng/ml	780,55 ng/ml
MW	694,7 ng/ml	776,8 ng/ml	784,8 ng/ml	808,2 ng/ml
s	± 50,3	± 135,1	± 206,7	± 197,9
MW Octaplas®	766,1 ng/ml			

Tab. 34: ADAMTS13 Aktivitätsergebnisse bei der Bestimmung von Octaplas® mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit aufgeteilt nach Blutgruppen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

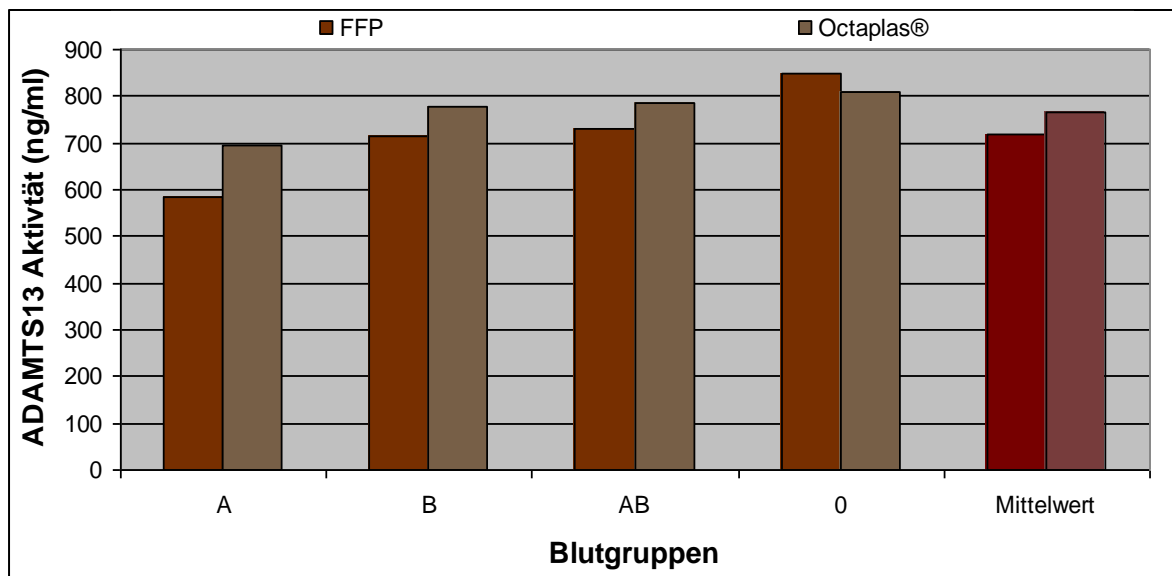


Abb. 64: ADAMTS13 Aktivität der verschiedene Blutgruppen und als Gesamtheit (Mittelwert) von FFP und Octaplas® gemessen mittels Actifluor™ADAMTS13 Kit.

3.2.3 ADAMTS13 Antigen

Technozym® ADAMTS13

Die im selben Messverfahren wie die ADAMTS13 Aktivität ermittelten ADAMTS13 Antigenwerte des Technozym® ADAMTS13 Kits sind in Tabelle 35 aufgeführt. Für jede Blutgruppe von FFP sind sieben Messreihen durchgeführt worden und für Octaplas® acht Messreihen.

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	0,56 µg/ml	0,83 µg/ml	1,18 µg/ml	0,87 µg/ml
2	0,76 µg/ml	1,15 µg/ml	1,48 µg/ml	1,15 µg/ml
3	0,99 µg/ml	0,24 µg/ml	1,50 µg/ml	1,17 µg/ml
4	0,80 µg/ml	0,79 µg/ml	1,17 µg/ml	1,00 µg/ml
5	1,59 µg/ml	1,59 µg/ml	1,59 µg/ml	1,59 µg/ml
6	1,59 µg/ml	1,59 µg/ml	1,59 µg/ml	1,59 µg/ml
7	1,48 µg/ml	1,21 µg/ml	1,59 µg/ml	1,19 µg/ml
MW	1,1 µg/ml	1,1 µg/ml	1,5 µg/ml	1,2 µg/ml
s	± 0,5	± 0,5	± 0,2	± 0,3
MW FFP	1,2 µg/ml			
Messungen	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
1	1,17 µg/ml	1,43 µg/ml	1,43 µg/ml	1,16 µg/ml
2	0,98 µg/ml	1,08 µg/ml	0,70 µg/ml	1,07 µg/ml
3	1,11 µg/ml	1,16 µg/ml	1,00 µg/ml	1,15 µg/ml
4	1,12 µg/ml	0,99 µg/ml	0,84 µg/ml	1,19 µg/ml
5	1,07 µg/ml	1,09 µg/ml	1,30 µg/ml	1,35 µg/ml
6	1,52 µg/ml	1,59 µg/ml	1,54 µg/ml	1,35 µg/ml
7	1,51 µg/ml	1,26 µg/ml	1,27 µg/ml	1,59 µg/ml
8	0,79 µg/ml	0,87 µg/ml	0,92 µg/ml	1,00 µg/ml
MW	1,2 µg/ml	1,2 µg/ml	1,1 µg/ml	1,2 µg/ml
s	± 0,5	± 0,2	± 0,3	± 0,2
MW Octaplas®	1,2 µg/ml			

Tab. 35: Messergebnisse des Technozym® ADAMTS13 Kits für ADAMTS13 Antigen nach Blutgruppen von FFP und Octaplas®. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

Die Ergebnisse aus der Tabelle 35 sind in der Abbildung 65 nochmals graphisch verdeutlicht.

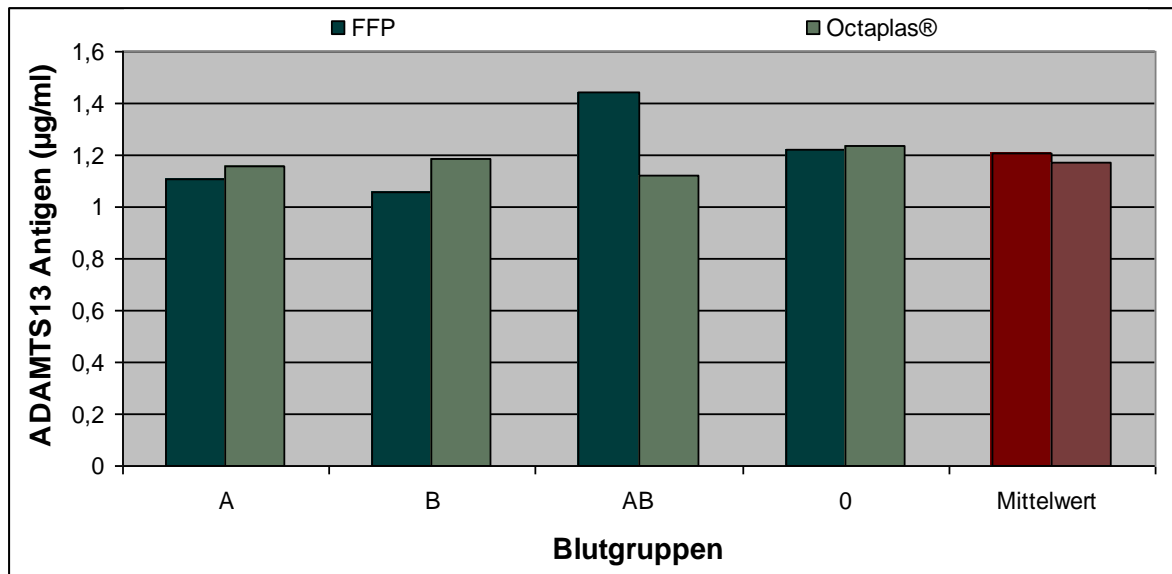


Abb. 65: ADAMTS13 Antigen der verschiedene Blutgruppen und als Gesamtheit (Mittelwert) von FFP und Octaplas® gemessen mittels Technozym®ADAMTS13 Kit.

Im Durchschnitt ist der ADAMTS13 Antigenspiegel mit gerundet 1,2 µg/ml bei beiden Plasmaderivaten nahezu identisch. Wie bereits bei den Untersuchungen der ADAMTS13 Aktivität sind für FFP größere Schwankungen (um 0,4 µg/ml) zwischen den Blutgruppen als für Octaplas® (um 0,1 ng/ml) zu beobachten. Auch die Präzision innerhalb der Blutgruppen ist bei Octaplas® erneut höher als bei FFP. Bei Octaplas® lassen sich mit 1,2 µg/ml Antigen für die Blutgruppen A, B sowie 0 und mit 1,1 µg/ml Antigen für Blutgruppe AB kaum Unterschiede nachweisen. Bei FFP werden mit 1,5 µg/ml Antigen für Blutgruppe AB die höchste und mit 1,1 µg/ml für Blutgruppe A und B die niedrigste Antigenkonzentration messen.

Imubind®ADAMTS13

Mit dem Imubind®ADAMTS13 Kit wurde die Antigenkonzentration für FFP und Octaplas® nochmals bestimmt. Wobei durch eine dreimalige Messung jeder Blutgruppe für FFP und für Octaplas® vor allem die erzielten Werte des Technozym®ADAMTS13 Kit erhärtet werden sollen.

Die erzielten Ergebnisse (Tab. 36) weichen von denen des Technozym[®]ADAMTS13 Kits stark ab. Octaplas[®] wird mit einem durchschnittlichen ADAMTS13 Antigen von 0,75 µg/ml und FFP von 0,57 µg/ml gemessen. Die Antigenwerte von FFP reichen von 0,52 µg/ml für Blutgruppe A und AB bis hin zu 0,65 µg/ml für Blutgruppe 0. Damit liegt aber der höchste Antigenwert immer noch unter dem niedrigsten Wert von Octaplas[®], der mit 0,72 µg/ml für Blutgruppe B bestimmt wird. Die übrigen Antigenwerte von Octaplas[®] befinden sich alle innerhalb von 0,05 µg/ml. Der höchste Antigenwert wird für Blutgruppe A und AB mit 0,77 µg/ml ermittelt.

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	0,427 µg/ml	0,483 µg/ml	0,331 µg/ml	0,774 µg/ml
2	0,537 µg/ml	0,689 µg/ml	0,814 µg/ml	0,381 µg/ml
3	0,593 µg/ml	0,588 µg/ml	0,409 µg/ml	0,800 µg/ml
MW	0,52 µg/ml	0,59 µg/ml	0,52 µg/ml	0,65 µg/ml
MW FFP	0,57 µg/ml			
Messungen	Octaplas [®] A	Octaplas [®] B	Octaplas [®] AB	Octaplas [®] 0
1	1,170 µg/ml	0,770 µg/ml	1,010 µg/ml	0,980 µg/ml
2	0,350 µg/ml	0,528 µg/ml	0,518 µg/ml	0,425 µg/ml
3	0,775 µg/ml	0,874 µg/ml	0,786 µg/ml	0,796 µg/ml
MW	0,77 µg/ml	0,72 µg/ml	0,77 µg/ml	0,73 µg/ml
MW Octaplas[®]	0,75 µg/ml			

Tab. 36: Messergebnisse des Imubind[®]ADAMTS13 ELISAs für ADAMTS13 Antigen bei der Bestimmung von FFP und Octaplas[®], aufgeteilt nach Blutgruppen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung

In Abbildung 66 wird nochmals bildlich der Unterschied zwischen Octaplas[®] und FFP verdeutlicht. Die Balken von Octaplas[®] (lila) liegen alle konstant über 0,7 µg/ml, die von FFP variieren zwischen 0,52 µg/ml bis hin zu 0,65 µg/ml.

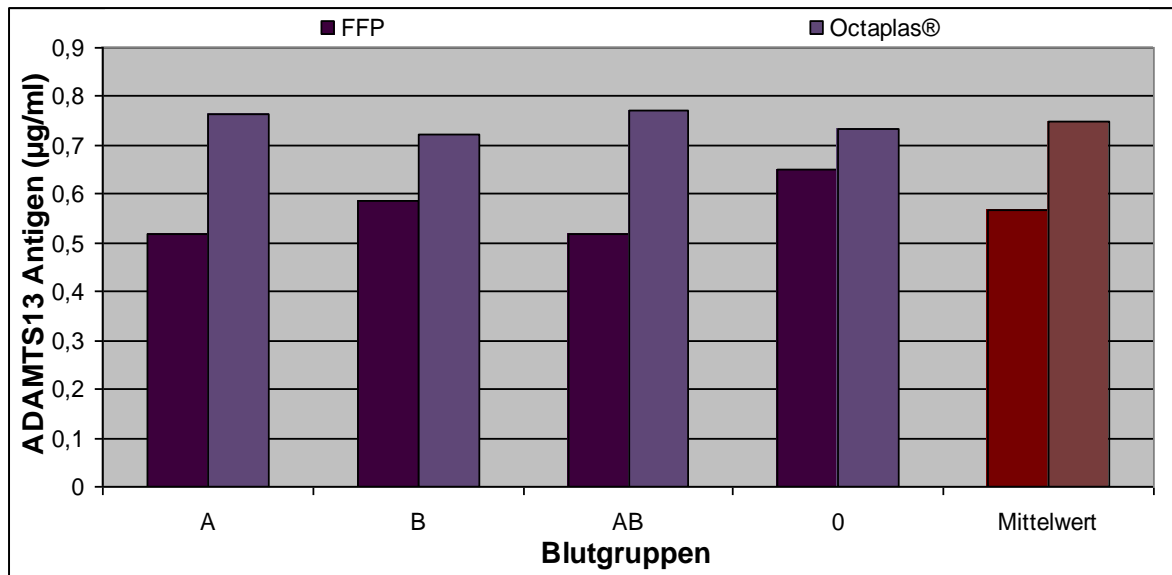


Abb. 66: ADAMTS13 Antigen der verschiedene Blutgruppen und als Gesamtheit (Mittelwert) von FFP und Octaplas® gemessen mittels Imubind® ADAMTS13 ELISA.

3.2.4 Zusammenfassung bezüglich ADAMTS13

Trägt man die Mittelwerte für die vier Blutgruppen, ermittelt durch die drei Aktivitätsbestimmungsmethoden, zusammen, zeigt sich das nachfolgende Diagramm (Abb. 67).

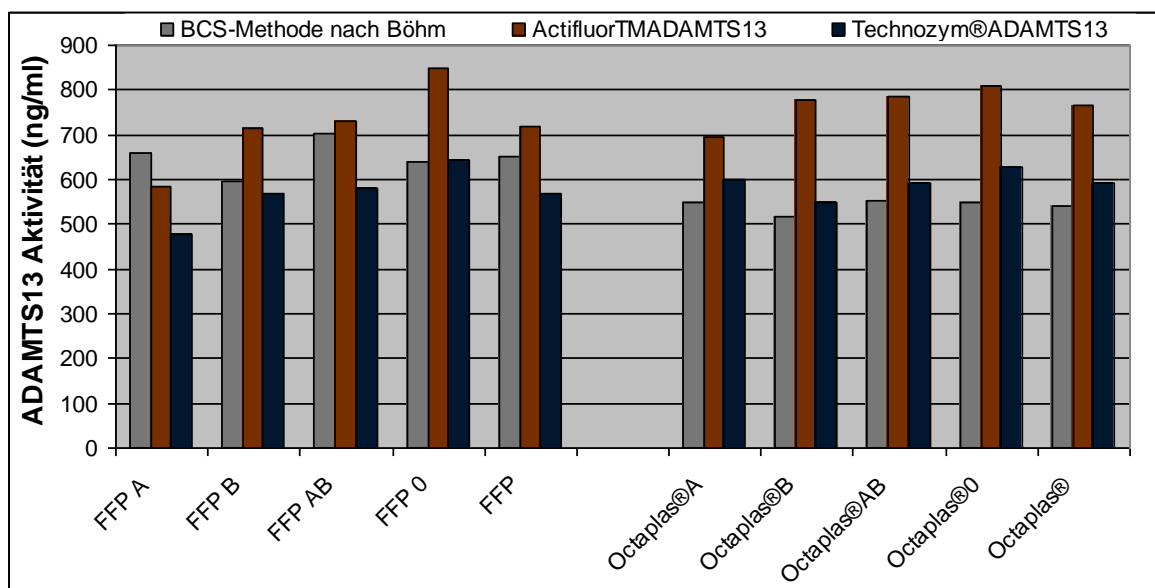


Abb. 67: Vergleich der ADAMTS13 Aktivitätswerte aus den Messungen mit Technozym®ADAMTS13 Kit (blau), BCS-Methode nach Böhm (weiß) und Actifluor™ADAMTS13 (orange) Kit von FFP und Octaplas® sowohl aufgeteilt nach Blutgruppen als auch als Gesamtwert.

Bei der Betrachtung der Daten für FFP ist die große Varianz der ADAMTS13 Aktivitäten zu erkennen. Die Spanne erstreckt sich von 476,5 ng/ml für Blutgruppe A mittels Technozym®ADAMTS13 Kit bis hin zu 850,6 ng/ml für Blutgruppe 0 mittels Actifluor™ADAMTS13 Kit gemessen. Tendenziell weist Blutgruppe A die geringsten und Blutgruppe 0 die höchsten Aktivitäten auf. Fasst man die einzelnen Blutgruppen (FFP Gesamt) für die jeweilige Methode zusammen, ergibt sich für die Actifluor™ADAMTS13 Methode die höchste und für Technozym®ADAMTS13 die niedrigste Aktivität. Die BCS-Methode nach Böhm liegt mit ihren 649,7 ng/ml ziemlich genau am theoretischen Mittelwert (646 ng/ml) der ADAMTS13 Aktivität aus allen drei Methoden.

Octaplas® hat eine geringere Spanne zwischen höchstem (808,2 ng/ml) und niedrigstem (517,1 ng/ml) Wert. Den niedrigsten Wert erhebt die BCS-Methode nach Böhm. Der höchste Wert wird, wie auch schon beim FFP, mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit gemessen. Insgesamt ergeben sich mit der Actifluor™ADAMTS13 Methode bei jeder Blutgruppe mit Abstand die höchsten Werte, während die BCS-Methode nach Böhm und die Technozym®ADAMTS13 Methode sehr ähnliche, jedoch deutlich niedrigere Aktivitäten aufweisen. Hierauf ist auch die große Varianz zwischen den Gesamtmittelwerten der einzelnen Methoden von 542,0 ng/ml BCS-Methode nach Böhm zu 766,1 ng/ml Actifluor™ADAMTS13 Methode begründet.

FFP beschreibt deutlich größere Differenzen zwischen den einzelnen Blutgruppen. Die Unterschiede zwischen den ADAMTS13 Aktivitätswerten fallen dafür aber für die drei Methoden geringer aus. Im Gegensatz dazu herrschen bei Octaplas® sehr ausgeglichene Aktivitäten zwischen den Blutgruppen, jedoch sind die mit Actifluor™ADAMTS13 untersuchten Werte deutlich höher als die der beiden anderen Methoden. Würde man einen Mittelwert für die ADAMTS13 Aktivität aus den drei Methoden errechnen, liegt dieser für FFP um 646 ng/ml und für Octaplas® um 634 ng/ml.

Für beide Präparate ist bei jeder angewandten Aktivitätsbestimmungsmethode und innerhalb jeder Blutgruppe eine hohe physiologische ADAMTS13 Aktivität nachzuweisen. Hinsichtlich Aktivität und Antigen ist kein signifikanter Unterschied auszumachen.

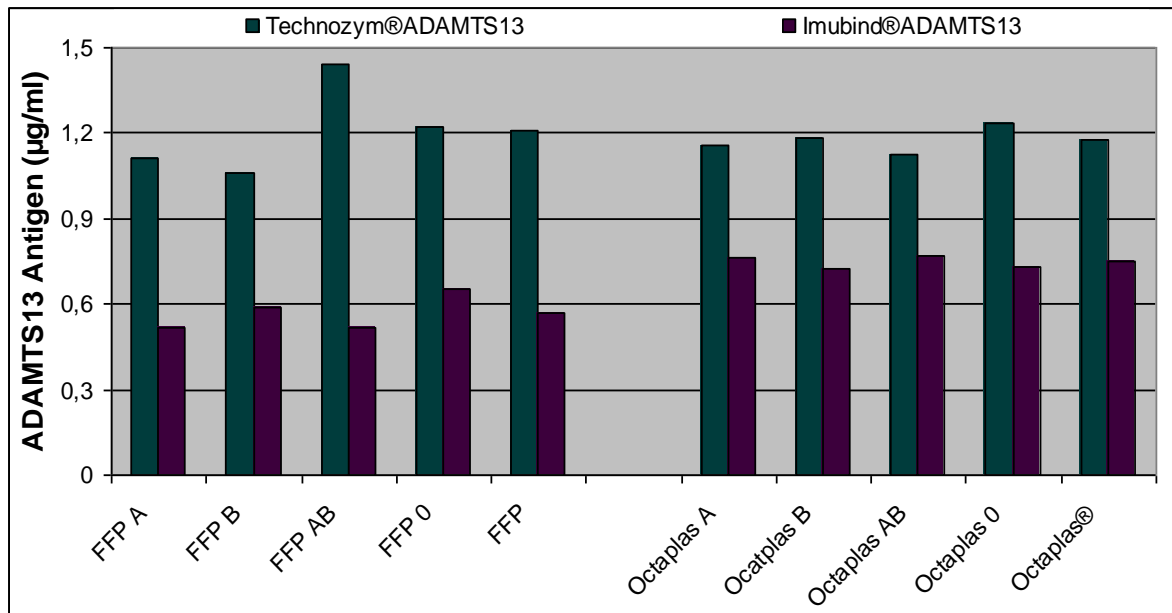


Abb. 68: Vergleich der ADAMTS13 Antigenwerte aus den Messungen mit Technozym®ADAMTS13 Kit (grün) und Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila) von FFP und Octaplas® sowohl aufgeteilt nach Blutgruppen als auch als Gesamtwert.

Beim Vergleich der Antigenwerte (Abb. 68 und Tab. 37) fällt auch die größere Varianz der Antigenwerte bei beiden Messmethoden innerhalb der unterschiedlichen Blutgruppen von FFP auf. Der niedrigste Wert wird vom Imubind®ADAMTS13 ELISA bei 0,52 µg/ml gemessen, der höchste bei 0,65 µg/ml. Damit liegen bei dieser Methode die Blutgruppen A, B und AB unter dem physiologischen Antigenbereich. Der insgesamt höchste ermittelte Wert lag bei 1,4 µg/ml für Blutgruppe AB bestimmt mit Technozym®ADAMTS13. Fasst man die Mittelwerte der Blutgruppen für jede Methode zu einem Gesamtwert FFP zusammen wird ein enormer Unterschied zwischen den beiden Methoden ersichtlich.

Das Antigenlevel für FFP, durch Imubind®ADAMTS13 ELISA ermittelt, liegt bei 0,57 µg/ml am untersten physiologischen Normwert. Der Technozym®ADAMTS13 Kit ermittelt mit 1,2 µg/ml eine gut doppelt so hohen Wert, der sich im mittleren bzw. höheren physiologischen Bereich für das ADAMTS13 Antigen bewegt. Die tendenziell höheren Antigenwerte sind auch bei der Bestimmung des Antigens von Octaplas® zu erkennen. Durch die ebenfalls höheren Antigenwerte vom Imubind®ADAMTS13 ELISA ist der Unterschiede nicht so ausgeprägt (0,75 µg/ml zu 1,2 µg/ml). Keine untersuchte Blutgruppe fällt unter den physiologischen Normbereich und insgesamt sind die Ergebnisse für die Blutgruppen zwischen den beiden Methoden sehr ausgeglichen.

Messmethoden	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0	FFP
BCS–Methode nach Böhm	659,2 ng/ml	597,3 ng/ml	701,6 ng/ml	640,8 ng/ml	649,7 ng/ml
Technozym[®] ADAMTS13	476,5 ng/ml	567,3 ng/ml	581,2 ng/ml	644,8 ng/ml	567,5 ng/ml
Actifluor[™] ADAMTS13	583,2 ng/ml	715,1 ng/ml	730,9 ng/ml	850,6 ng/ml	719,9 ng/ml
Technozym[®] ADAMTS13	1,1 µg/ml	1,1 µg/ml	1,5 µg/ml	1,2 µg/ml	1,2 µg/ml
Imubind[®] ADAMTS13	0,52 µg/ml	0,59 µg/ml	0,52 µg/ml	0,65 µg/ml	0,57 µg/ml
Messmethoden	Octaplas [®] A	Octaplas [®] B	Octaplas [®] A B	Octaplas [®] 0	Octaplas [®]
BCS-Methode nach Böhm	547,9 ng/ml	517,1 ng/ml	552,8 ng/ml	550,4 ng/ml	542,0 ng/ml
Technozym[®] ADAMTS13	600,7 ng/ml	550,5 ng/ml	593,7 ng/ml	629,1 ng/ml	593,5 ng/ml
Actifluor[™] ADAMTS13	694,7 ng/ml	776,8 ng/ml	784,8 ng/ml	808,2 ng/ml	766,1 ng/ml
Technozym[®] ADAMTS13	1,2 µg/ml	1,2 µg/ml	1,1 µg/ml	1,2 µg/ml	1,2 µg/ml
Imubind[®] ADAMTS13	0,77 µg/ml	0,72 µg/ml	0,77 µg/ml	0,73 µg/ml	0,75 µg/ml

Tab. 37: Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung mit Technozym[®]ADAMTS13 Kit, BCS-Methode nach Böhm und Actifluor[™]ADAMTS13 Kit sowie der Antigenbestimmung durch den Technozym[®]ADAMTS13 Kit und Imubind[®]ADAMTS13 ELISA von FFP und Octaplas[®] nach Blutgruppen und mit Gesamtwert.

Die niedrigeren Aktivitätswerte der Blutgruppen A und B korrelieren mit den niedrigeren Antigenwerten, während für die Blutgruppe AB und 0, passend zu der höheren Aktivität, auch höhere Antigenwerte gemessen werden. Die Antigenwerte weisen deutliche Unterschiede auf, die Aktivitätswerte der verschiedenen Methoden korrelieren hingegen gut (Abb. 69).

Es zeigen sich für die ADAMTS13 Aktivität wie für ADAMTS13 Antigen ausschließlich Werte im physiologisch normalen bis hohen Bereich. Zwischen Aktivität und Antigen ist eine gute Korrelation zu erkennen.

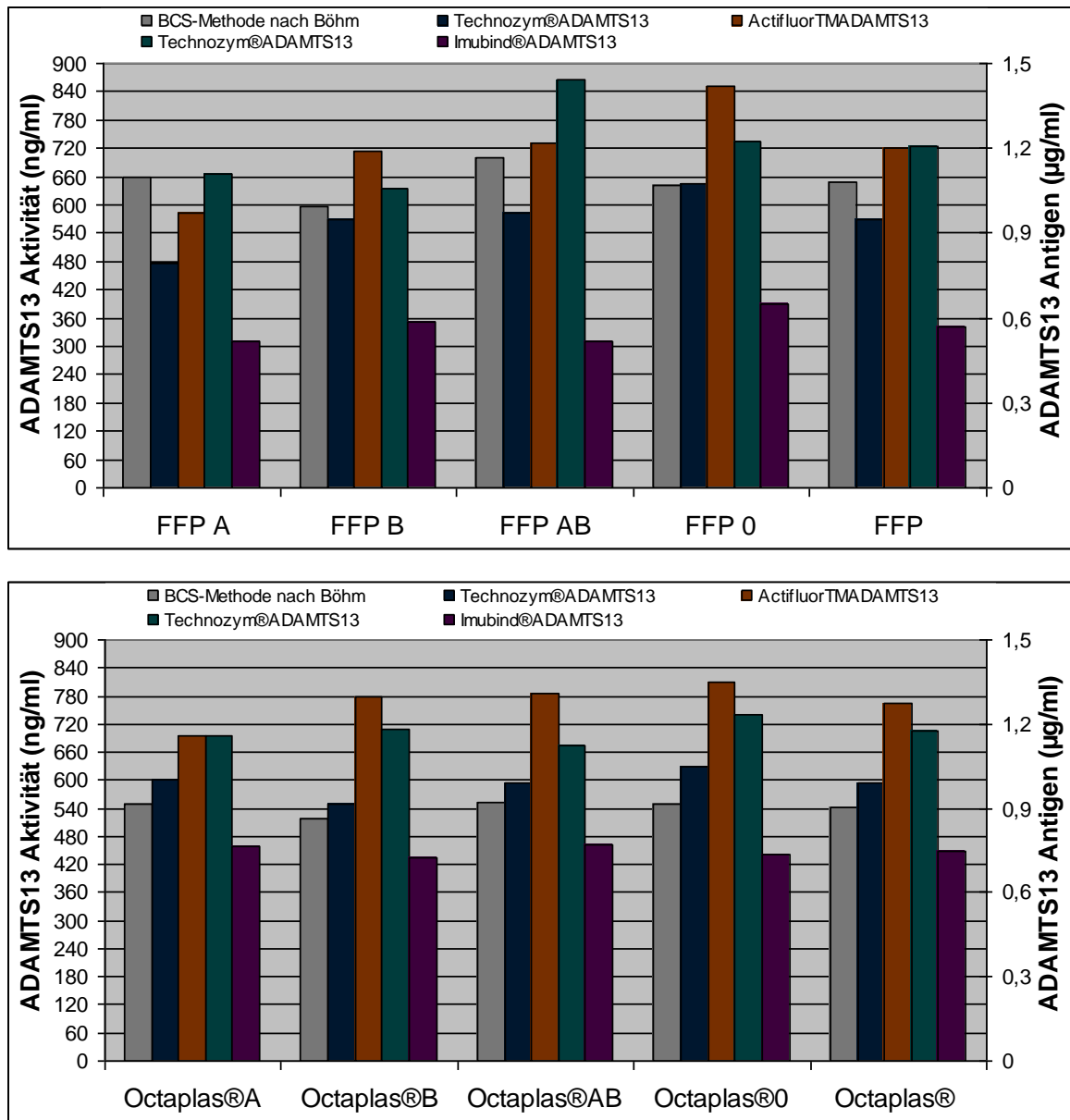


Abb. 69: Graphische Gegenüberstellung der Ergebnisse der ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung (Technozym®ADAMTS13 Kit (blau), BCS-Methode nach Böhm (weiß), Actifluor™ADAMTS13 Kit (orange)) und der Antigenbestimmung (Technozym®ADAMTS13 Kit (grün) und Imubind®ADAMTS13 ELISA (lila)) von FFP und Octaplas®, aufgeteilt nach Blutgruppen und mit Gesamtwert FFP bzw. Octaplas®.

3.2.5 ADAMTS13 Antikörper

Jede Blutgruppe von beiden Plasmaderivaten wurde nach vorheriger Behandlung (2.2.5) mittels BCS-Methode nach Böhm auf ADAMTS13 Antikörper untersucht. Es waren dabei keine Antikörper nachweisbar.

3.3 Vergleich Konzentrate und Plasmapräparate

3.3.1 ADAMTS13 Aktivität

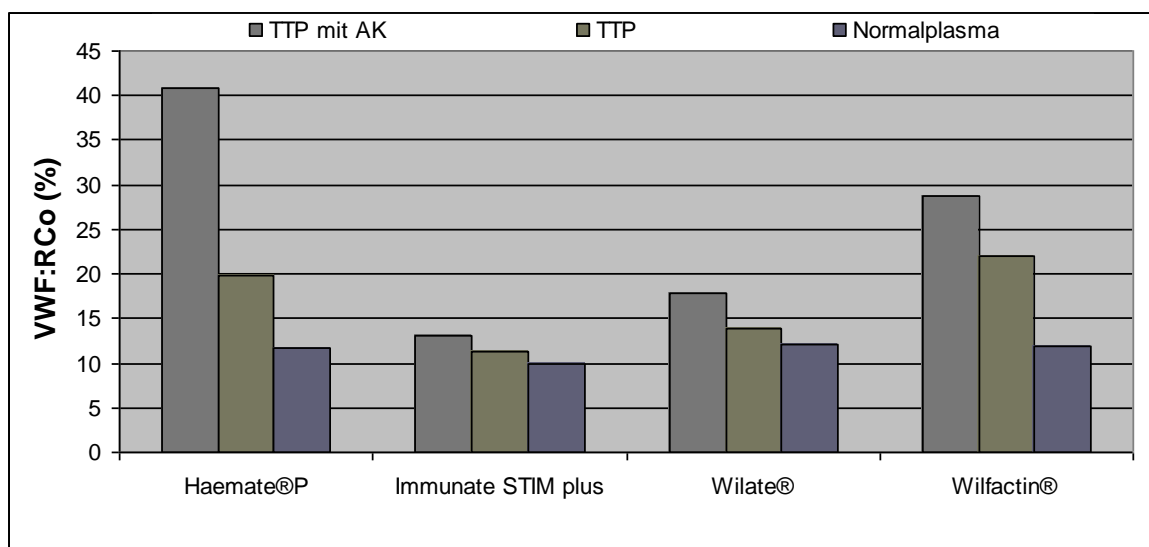
Modifizierte BCS-Methode nach Böhm

Nachdem die BCS-Methode nach Böhm Gerinnungsfaktorkonzentrate als Reagenz einsetzt, war sie in unveränderter Form nicht zur Messung der ADAMTS13 Aktivität für die Gerinnungsfaktorkonzentrate geeignet. Durch die veränderte Methode wird die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität gemessen und zwischen den einzelnen Ansätzen verglichen.

Angenommen wird, dass bei der Probe TTP mit Antikörpern das ADAMTS13 durch den Antikörper abgefangen und somit inaktiviert wird. Die Restaktivität des VWFs ist hoch, da er nicht durch ADAMTS13 geschnitten wird. Die TTP Probe ohne Antikörper würde bei Anwesenheit von ADAMTS13 im Konzentrat geringere Restaktivität aufweisen, da der VWF als Substrat umgesetzt wird. Bei der Normalpool Probe ist sowohl ein physiologischer Anteil bereits vorhanden und folglich auch eine von Anfang an geringere Menge an UL VWF Multimeren. Durch die Zugabe des Konzentrates kann bei vorhandenem ADAMTS13 die Ristocetin Restaktivität noch weiter sinken. Je nach ADAMTS13 Konzentration müsste sich also eine unterschiedlich steile Abstufung ergeben. Eine Interpretation der Ergebnisse ist nur innerhalb der drei Versuchsansätze möglich, jedoch nicht zwischen den verschiedenen Konzentraten.

Das Ergebnis der untersuchten VWF-haltigen Konzentrate zeigt bei Haemate[®]P eine Abnahme der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität von der TTP Probe mit Antikörpern zu der ohne Antikörper von 21,1 %. Die Abnahme hin zur Probe mit Normalpool war mit 8,2 % dazu hingegen verhältnismäßig gering. Die Probe des TTP Patienten ohne Antikörper hat nur eine sehr geringe ADAMTS13 Aktivität. Es muss also davon ausgegangen werden, dass die starke Absenkung der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität durch eine recht hohe ADAMTS13 Konzentration in Haemate[®]P verursacht wurde. Dies bestätigte auch die geringe Verminderung der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität im Bezug auf den Normalpool. An dem hohen Anfangswert der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität ist der hohe VWF Gehalt des Konzentrates abzulesen. Dem VWF Gehalt der Konzentrate folgend ließ sich für Wilfactin[®] die zweithöchste, für Wilate[®] die dritthöchste und für Immunate STIM plus die geringste Ristocetin-Cofaktor-Aktivität im ersten Probenansatz messen (Abb. 74).

Die Abnahme von der Probe mit Antikörpern zu der ohne war jedoch bei allen drei untersuchten Proben nur minimal, genauso wie die Verringerung der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität zur Normalprobe. Es kann also eine ADAMTS13 Aktivität angenommen werden, die muss sich jedoch in einem sehr geringen Maße bewegen.



	Haemate®P	Wilate®	Wilfactin®	Immunate STIM plus
TTP mit Antikörpern	40,9 %	17,9 %	28,7 %	13,1 %
TTP	19,8 %	13,9 %	22,1 %	11,4 %
Normalplasma	11,6 %	12,1 %	11,8 %	10,0 %

Abb. 74: Graphische Darstellung der VWF Ristocetin-Cofaktor-Aktivität der VWF-haltigen Faktorkonzentrate in einem Ansatz mit Plasma von TTP mit Antikörpern, TTP ohne nachweisbaren Antikörper und in Normalplasma, untersucht mit der abgewandelten BCS-Methode nach Böhm.

Technozym® ADAMTS13

Die ADAMTS13 Aktivitäten bei der Messung mittels des Technozym® ADAMTS13 Kits bewegen sich im niedrigen bis sehr niedrigen Aktivitätsbereich.

Für Haemate®P wurde mit einer ADAMTS13 Aktivität von 12,3 % der höchste Wert gemessen. Wilate® folgt mit einer Aktivität von 5,4 %, während für die anderen Konzentrate eine Aktivität an der Nachweisgrenze angezeigt wird (Tab. 39). Bei zunehmender Verdünnung nahm die Aktivität bei Haemate®P ab, bei Wilate® und Wilfactin® hingegen zu. Immunate STIM plus und Beriate®P zeigten auch in der Verdünnung keine Aktivität über der Nachweisgrenze mehr auf (Abb. 72).

Faktorkonzentrate	Haemate®P	Immunate STIM plus	Wilate®	Wilfactin®	Beriate®P
Konzentrationen	ADAMTS13 Aktivität in ng/ml				
160 U/ml	12,3				
100 U/ml				2,8	2,0
80 U/ml	6,7		5,4		
50 U/ml				3,4	
40 U/ml	3,9		5,3		
25 U/ml	3,7	2,0		4,0	
20 U/ml			4,9		
16 U/ml	4,0	2,0	3,1	4,4	2,0
2 U/ml	2,6		2,7	3,1	

Tab. 39: Gegenüberstellung der durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität in % der Faktorkonzentrate in Abhängigkeit von ihrer Verdünnung (**unverdünnten Ansätze**), untersucht mit Technozym®ADAMTS13.

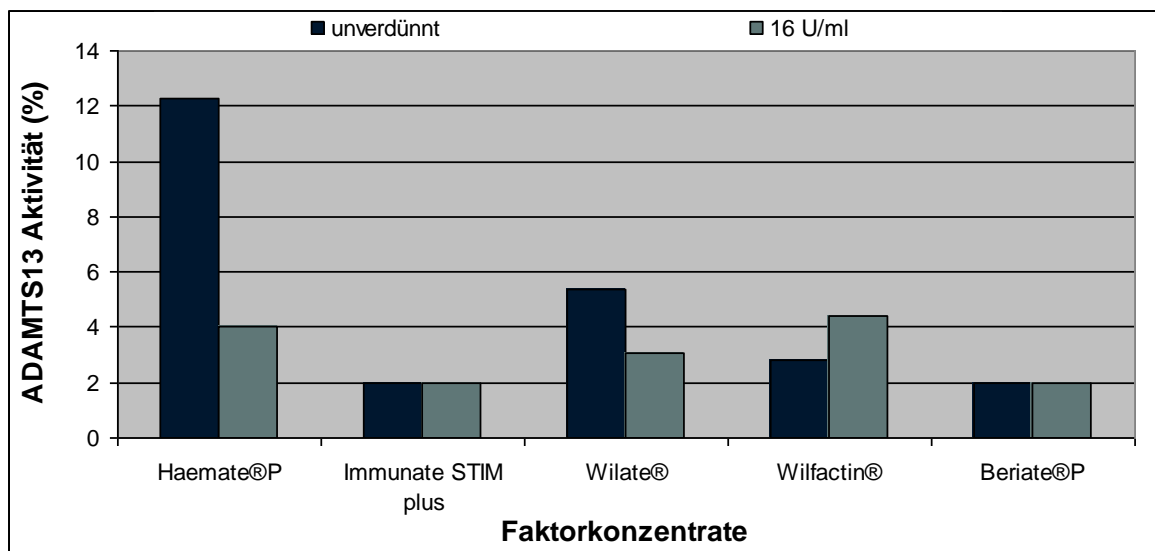


Abb. 72: Graphische Darstellung der durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität der einzelnen Faktorkonzentrate im unverdünnten und 16 U/ml konzentrierten Ansatz, untersucht mit Technozym®ADAMTS13.

Der Normalbereich für den Technozym®ADAMTS13 Kit wird zwischen 50 % und 150 % angegeben, errechnet aus 142 gesunden Probanden.

Die Plasmapräparate fallen mit einer ADAMTS13 Aktivität von 74,0 % für FFP und 80,4 % für Octaplas® Werte in den Normbereich. Die Konzentrate hingegen besitzen alle ADAMTS13 Aktivitäten unterhalb des Normbereichs (Abb. 73).

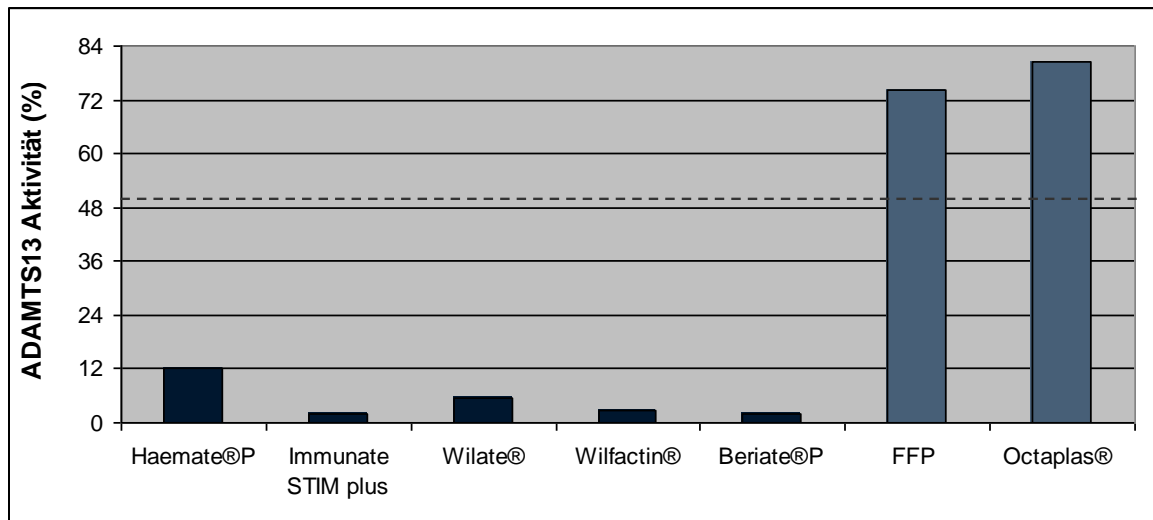


Abb. 73: Gegenüberstellung der durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität der Faktorkonzentrate und der Plasmapräparate, untersucht mit Technozym®ADAMTS13.

Actifluor™ADAMTS13

In der Tabelle 38 sind alle durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivitäten der fünf Konzentrate, ermittelt mit dem Actifluor™ADAMTS13 Kit, aufgelistet.

Im Vergleich zur ADAMTS13 Aktivität der fünf verschiedenen Faktorkonzentrate wird ersichtlich, dass Haemate®P mit 469,9 ng/ml eine deutlich höhere Aktivität aufweist als sämtliche andere Faktorkonzentrate. Nach dem ersten Verdünnungsschritt von 50 % als auch bei dem auf 25 % liegen die ADAMTS13 Aktivitäten mit 293,5 ng/ml und 171,8 ng/ml von Haemate®P immer noch höher als in den unverdünnten Ansätzen der anderen vier Konzentrate. Eine ebenfalls höhere Konzentration als die anderen Gerinnungsfaktorpräparate weist mit 136,6 ng/ml Wilate® auf. Immunate STIM plus und Beriate®P sind hinsichtlich ihrer ADAMTS13 Aktivität von 95,8 ng/ml bzw. 92,2 ng/ml fast identisch. Nur bei Wilfactin® fällt die Aktivität mit 78,3 ng/ml noch geringer aus. Bei zunehmender Verdünnung sinken die ADAMTS13 Aktivitäten, mit Ausnahme von Wilfactin®. Hier nimmt Aktivität von 30,6 ng/ml bei 25%iger Verdünnung auf 40 ng/ml bei 16%iger Verdünnung zu (Abb. 70).

Das die Aktivitäten nicht proportional zur Verdünnung des Konzentrates abnehmen, kann zum einen durch die hohen Verdünnungen zustande kommen und zum anderen durch die von Anfang an geringe ADAMTS13 Konzentration.

Faktorkonzentrate	Haemate®P	Immunate STIM plus	Wilate®	Wilfactin®	Beriate®P
Konzentrationen	ADAMTS13 Aktivität in ng/ml				
160 U/ml	469,9				
100 U/ml				78,3	92,2
80 U/ml	293,5		136,6		
50 U/ml				39,3	
40 U/ml	171,8		074,1		
25 U/ml		95,8		30,6	
20 U/ml			056,7		
16 U/ml	28,7	59,1	029,5	41,6	53,4
2 U/ml	0,0		0,0	21,9	

Tab. 38: Gegenüberstellung der durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität in ng/ml der Faktorkonzentrate in Abhängigkeit von ihrer Verdünnung (**unverdünnten Ansätze**), untersucht mit Actifluor™ADAMTS13.

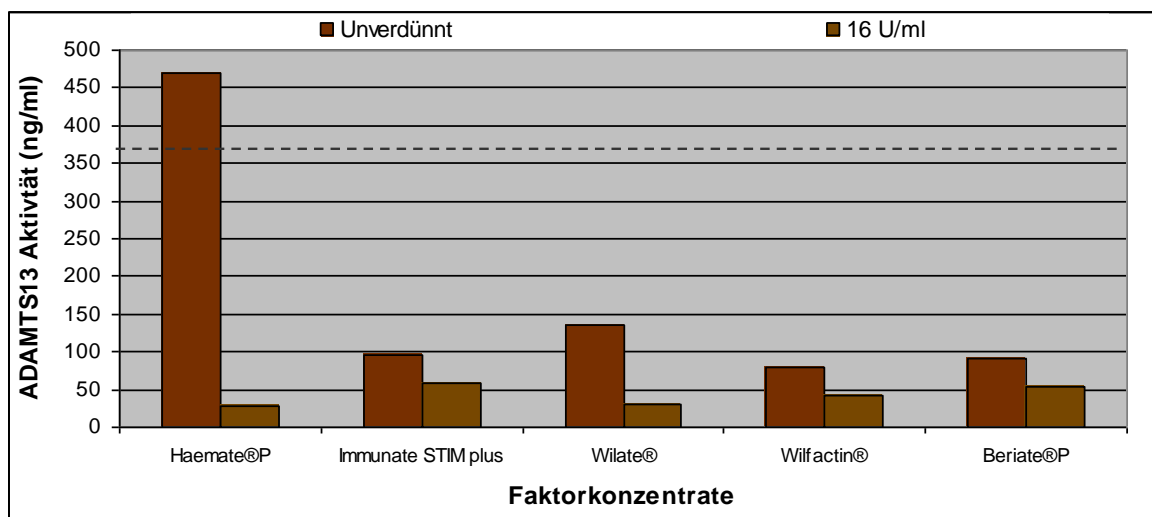


Abb. 70: Graphische Darstellung der durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität der einzelnen Faktorkonzentrate im unverdünnten und 16 U/ml konzentrierten Ansatz, untersucht mit Actifluor™ADAMTS13.

Die Konzentrate weisen gegenüber den beiden Plasmapräparaten deutlich niedrigere Aktivitäten auf. Die von Haemate®P ist jedoch, wenn auch niedriger als FFP und Octaplas® deutlich im physiologischen Aktivitätsbereich. Die anderen Konzentrate bewegen sich mit 78,3 ng/ml bis 136,6 ng/ml weit unterhalb der physiologischen Norm.

Der physiologische Bereich wird, wie in der Abbildung 71 durch den gestrichelten Rahmen eingegrenzt, mit 360 ng/ml bis 720 ng/ml angegeben. Für den Actifluor™ADAMTS13 Kit selbst ist eine mittlere ADAMTS13 Aktivität von 666 ng/ml \pm 135 ng/ml angezeigt, die aus einer Studie von 234 Normalpatienten stammt.

FFP und Octaplas® untermauern mit 719,9 ng/ml bzw. 766,1 ng/ml deutlich diesen Normalwert. Mit einem durchschnittlichen Aktivitätswert von 469,9 ng/ml liegt Haemate®P zwar gut im physiologischen Bereich, aber ca. 61 ng/ml unter dem von der Firma ausgewiesenen Normalwert. Die weiteren Gerinnungsfaktorpräparate befinden sich weit aus niedriger als die mit 360 ng/ml angegebene physiologische Norm.

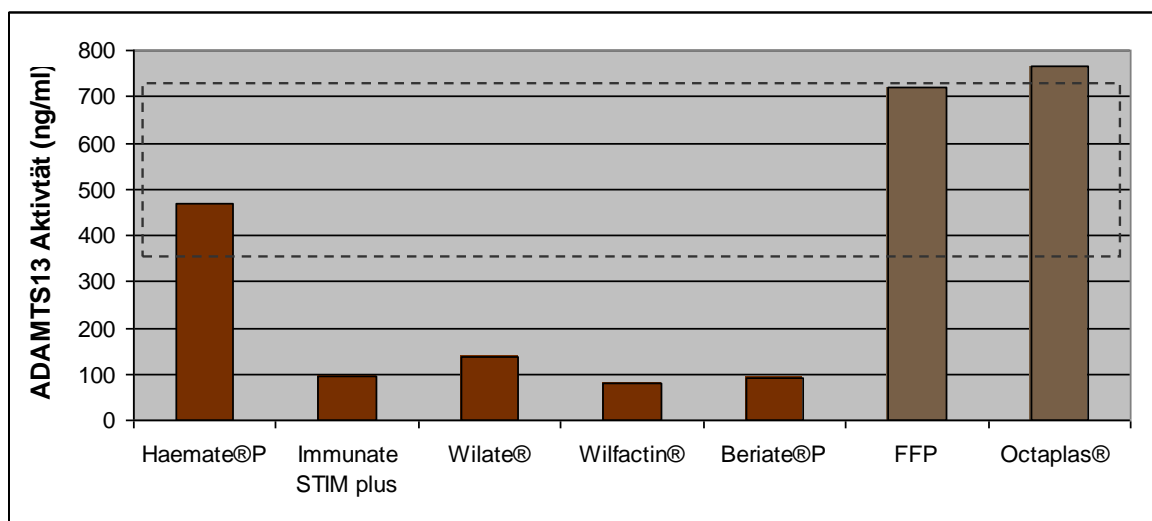


Abb. 71: Gegenüberstellung der durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität der Faktorkonzentrate und der Plasmapräparaten, untersucht mit Actifluor™ADAMTS13.

3.3.2 ADAMTS13 Antigen

Technozym® ADAMTS13

Im Gegensatz zur ADAMTS13 Aktivität misst der sich anschließende ELISA im Verhältnis zur Aktivität hohe Antigenwerte für alle Konzentrate (Tab. 40). Der Normbereich, aus 159 Normalpatienten ermittelt, schließt Werte zwischen 0,60 μ g/ml bis 1,60 μ g/ml ein.

Mit 1,41 µg/ml kann für Haemate[®]P eine Antigen Konzentration im oberen Drittel des Normbereichs nachgewiesen werden. Selbst die Verdünnungen von 50 % und 25 % ergeben noch physiologische Werte. Wie bereits bei der Aktivitätsbestimmung lässt sich für Wilate[®] mit 0,23 µg/ml die zweithöchste Antigen Konzentration belegen. Synchron zur Aktivitätsbestimmung nimmt die Antigen Konzentration nicht proportional zur Verdünnungsreihe ab, sondern weist bei 20 U/ml mit 0,35 µg/ml den höchsten Wert auf. Ein ähnliches Bild ergeben die Antigen Werte für Wilfactin[®]. Mit 0,09 µg/ml im unverdünnten Zustand übertrifft die Antigen Konzentration des 50%igen Ansatzes mit 0,1 µg/ml knapp und des 25%igen Ansatzes mit 0,41 µg/ml deutlich diesen Wert. Während sich bei Immunate STIM plus und Beriate[®]P die Aktivitäten an der Nachweisgrenze befanden, ergab sich für das Antigen eine Konzentration von 0,17 µg/ml bzw. von 0,13 µg/ml und deutlich über der Nachweisgrenze von 0,02 µg/ml. Sogar die Verdünnungen demonstrieren noch eine nachweisbare Antigen Konzentration. Die bei Immunate STIM plus lag mit 0,10 µg/ml proportional zur Verdünnung, die von Beriate[®]P ergab mit 0,17 µg/ml sogar einen höheren Wert als für den unverdünnten Ansatz.

Faktorkonzentrate	Haemate [®] P	Immunate STIM plus	Wilate [®]	Wilfactin [®]	Beriate [®] P
Konzentrationen	ADAMTS13 Aktivität in µg/ml				
160 U/ml	1,41				
100 U/ml				0,09	0,13
80 U/ml	1,24		0,23		
50 U/ml				0,10	
40 U/ml	1,07		0,19		
25 U/ml		0,17		0,41	
20 U/ml			0,35		
16 U/ml	0,33	0,10	0,15	0,06	0,17
2 U/ml	0,02		0,03	0,08	

Tab. 40: Gegenüberstellung des durchschnittlichen ADAMTS13 Antigen in µg/ml der Faktorkonzentrate in Abhängigkeit von ihrer Verdünnung (**unverdünnten Ansätze**), untersucht mit Technozym[®]ADAMTS13.

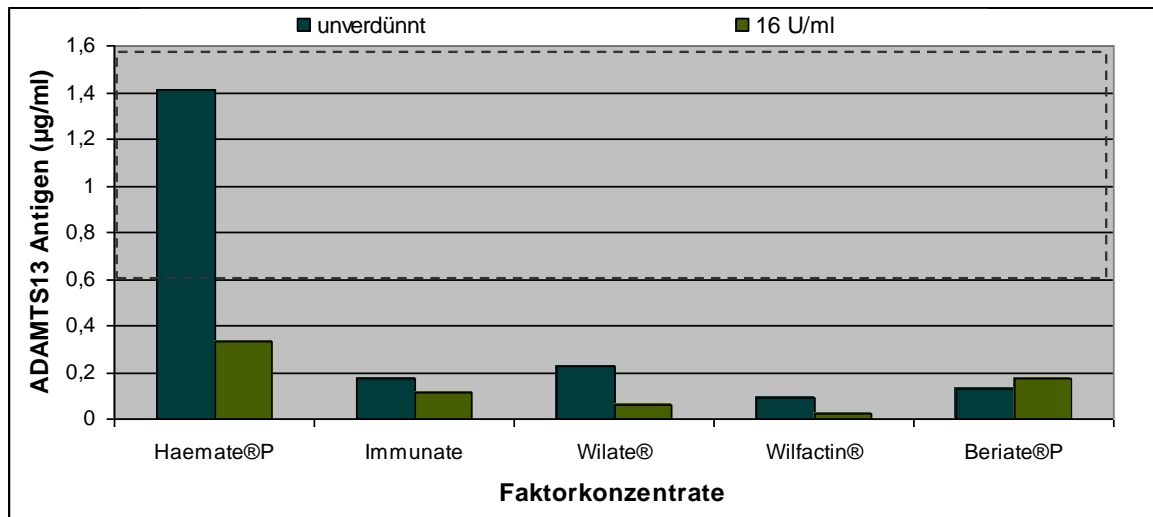


Abb. 75: Graphische Darstellung des durchschnittlichen ADAMTS13 Antigen der einzelnen Faktorkonzentrate im unverdünnten und 16 U/ml konzentrierten Ansatz, untersucht mit Technozym®ADAMTS13.

Die Antigenwerte der Konzentrate waren zwar vergleichsweise höher als die Werte für die Aktivität, trotzdem befand sich kein Ergebnis im physiologischen Bereich (Abb.75). Dieser Wert befand sich dafür im sehr hohen physiologischen Bereich, mit Ausnahme von Haemate®P. Bei der Gegenüberstellung mit den Plasmakonzentraten demonstrierte Haemate®P auch höhere Antigen Werte (Abb. 76). Während sich für FFP eine Antigen von 1,21 µg/ml nachweisen ließ, war es für Octaplas® ein Antigen von 1,18 µg/ml. Damit führen beide Plasmapräparate Antigen Konzentrationen deutlich im physiologischen Bereich an, aber auch deutlich unter dem Wert für Haemate®P.

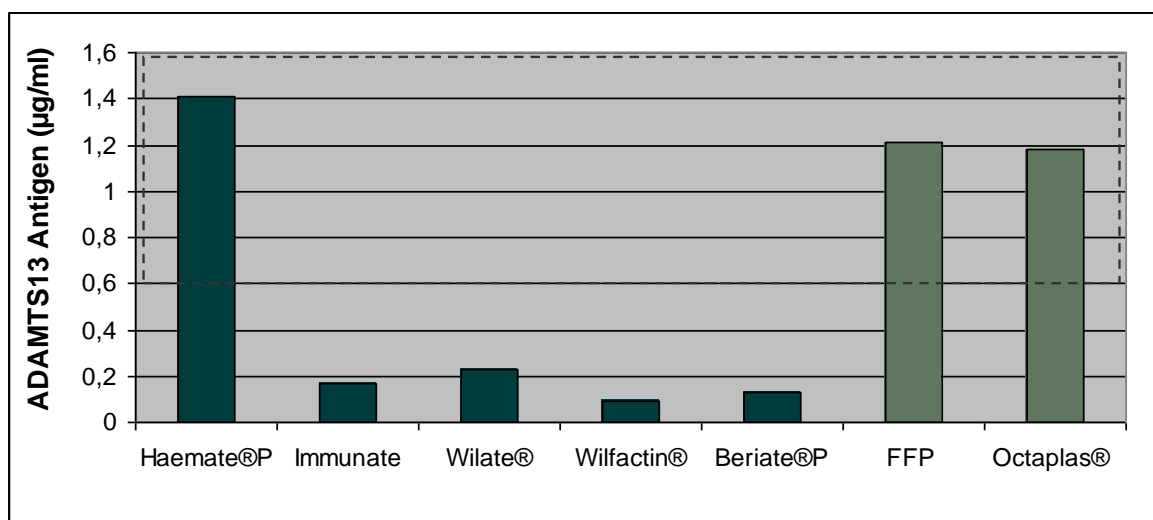


Abb. 76: Gegenüberstellung des durchschnittlichen ADAMTS13 Antigens der Faktorkonzentrate und der Plasmapräparate, untersucht mit Technozym®ADAMTS13.

Imubind® ADAMTS13 ELISA

Die Untersuchungsergebnisse der Antigenmessung mit Technozym® ADAMTS13 wurden mittels des Imubind® ADAMTS13 ELISA überprüft (Abb. 77). Der Normbereich dieser Messmethode wurde nach der Untersuchung von 49 Normal Spendern bei $740 \text{ ng/ml} \pm 110 \text{ ng/ml}$ angegeben. Dadurch dass Technozym® ADAMTS13 in $\mu\text{g/ml}$ misst, wurden sämtliche Einzelmessungen bereits in diese Einheit umgerechnet. Grund ist die bessere Vergleichbarkeit zwischen den beiden Methoden. Daher kommt aber auch die Angabe der $\mu\text{g/ml}$ Einheiten auf drei Nachkommastellen.

Demzufolge ist der umgerechnete Normbereich zwischen $0,630 \mu\text{g/ml}$ und $0,850 \mu\text{g/ml}$ anzusiedeln. Bei der Auswertung der Ergebnisse stellte sich ein anderes Bild als bei Technozym® ADAMTS13 dar. Den höchsten Antigen Wert stellt mit $0,749 \mu\text{g/ml}$ Octaplas®, gefolgt von FFP mit $0,569 \mu\text{g/ml}$ und Haemate®P mit $0,500 \mu\text{g/ml}$. Damit liegen aber weder die Werte von FFP noch von Haemate®P im physiologischen Bereich. Im Gegensatz zu der Auswertung mit Technozym® ADAMTS13, bei dem das für Octaplas® nachweisbare Antigenlevel nur geringfügig unter dem von FFP lag, stellt Octaplas® bei dieser Nachweismethode das mit Abstand höchste Antigenlevel.

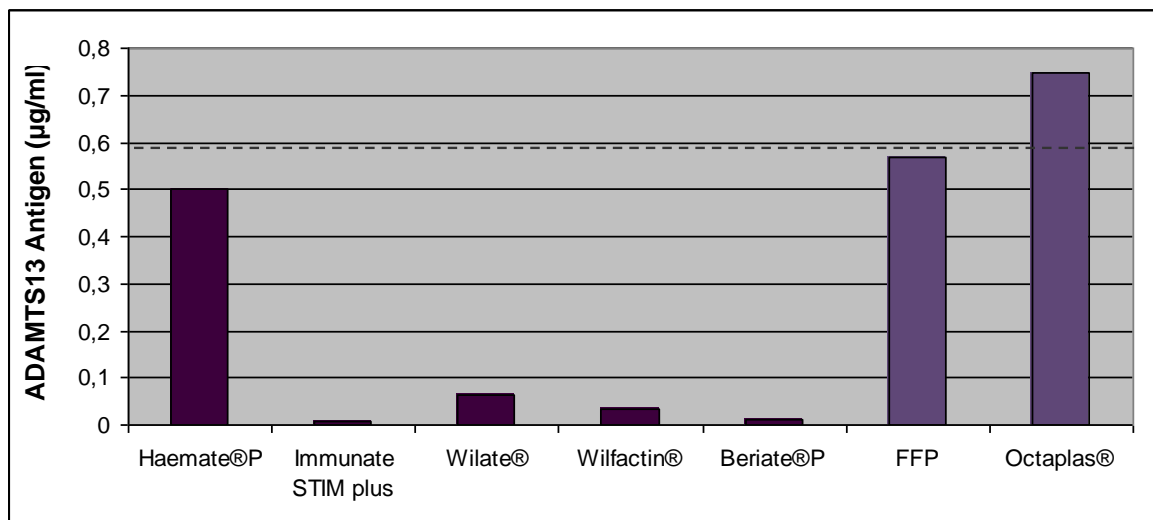


Abb. 77: Gegenüberstellung des durchschnittlichen ADAMTS13 Antigen der Faktorkonzentrate und der Plasmapräparate, untersucht mit Imubind® ADAMTS13 ELISA.

Für die weiteren Konzentrate wurden Antigen Werte unter $0,070 \mu\text{g/ml}$ analysiert. Wilate® wies mit $0,064 \mu\text{g/ml}$ den zweithöchsten Wert der Plasmakonzentrate auf, gefolgt von Wilfactin® mit $0,034 \mu\text{g/ml}$, Beriate®P mit $0,010 \mu\text{g/ml}$ und zuletzt Immunate STIM plus mit $0,009 \mu\text{g/ml}$.

3.4 Differentialdiagnose

der thrombotischen Mikroangiopathien

Zu den bereits in der Einleitung erwähnten Mikroangiopathien zählen unter anderem die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) in hereditärer wie erworbener Form, das TTP-Like Syndrom und das hämolytisch urämische Syndrom (HUS). Im klinischen Bild weisen alle in der akuten Phase, die für die Mikroangiopathien typischen Symptome, hämolytische Anämie und Thrombozytopenie auf. Zusätzliche Symptome können sowohl in ihrem Auftreten so wie ihrer Intensität stark variieren und lassen daher keine genaue Zuordnung zu einer Erkrankung zu. Zur Abgrenzung von anderen Erkrankungen und vor allem zur Differenzierung dieser verschiedenen Mikroangiopathien werden daher folgende Laborparameter ermittelt: Thrombozytenzahl, Hämoglobin, LDH, Kreatinin und ADAMTS13-Aktivität und -Antigen. Außerdem kann mittels eines Blutausstrichs auf Fragmentozyten und durch die SDS-Gelelektrophorese auf UL VWF Multimere getestet werden.

Diese Parameter werden einander gegenübergestellt und verglichen. Besonderer Wert wird dabei auf die ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung gelegt, da sie vor allem der Diagnosestellung einer TTP dient.

Durchführung

Untersucht wurde Patientenplasma mit TTP, mit und ohne nachweisbare Antikörper, TTP-Like Syndrom und HUS sowohl im akuten Schubs als auch während der Remission. Das Blut der Patienten wurde auf die ADAMTS13 Aktivität, Antigen und Antikörper sowie ultralange VWF Multimere, Thrombozytenzahl, Hämoglobinwert, LDH und Fragmentozyten hin überprüft.

Die ADAMTS13 Aktivität wurde mittels drei verschiedener Methoden gemessen. Fluorimetrisch mit Technozym[®]ADAMTS13 und Actifluor[™]ADAMTS13 (FRET) und indirekt über die BCS Methode nach Böhm. Durch Deaktivierung der Probe, werden mit denselben Versuchsdurchführungen ADAMTS13 Antikörper nachgewiesen. Dafür wird die ADAMTS13 Aktivität der deaktivierten Proben nach Zusatz von Poolplasma bestimmt und mittels einer Umrechnungstabelle in Bethesda Einheiten (1 BE = Hemmung der ADAMTS13 Aktivität um 50 %) umgerechnet. Das Antigen wurde mittels Imubind[®]ADAMTS13 ELISA und Technozym[®]ADAMTS13 Kit gemessen. Die SDS-Gelelektrophorese wird durchgeführt, um die Anwesenheit von ultralangen VWF Multimeren nachzuweisen. Mittels der Betrachtung eines Blutausstrichs unter dem

Mikroskop wird auf Fragmentozyten getestet. Thrombozytenzahl, Hämoglobinwert und LDH-Spiegel werden den Krankenakten der jeweiligen Patienten entnommen.

Ergebnisse

Im akuten Schub befinden sich LDH-Spiegel, Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl bei allen Mikroangiopathien im pathologischen Bereich. Aufgrund der Pathogenese des hämolytisch urämischen Syndroms zeigen die Parameter LDH und Hämoglobin eine deutlich höhere Zellnekrose an als bei den anderen TMA. Die genannten Parameter sind jedoch in Phasen der Remission wieder in den physiologischen Bereichen zu finden (Abb. 78 und Tab. 41).

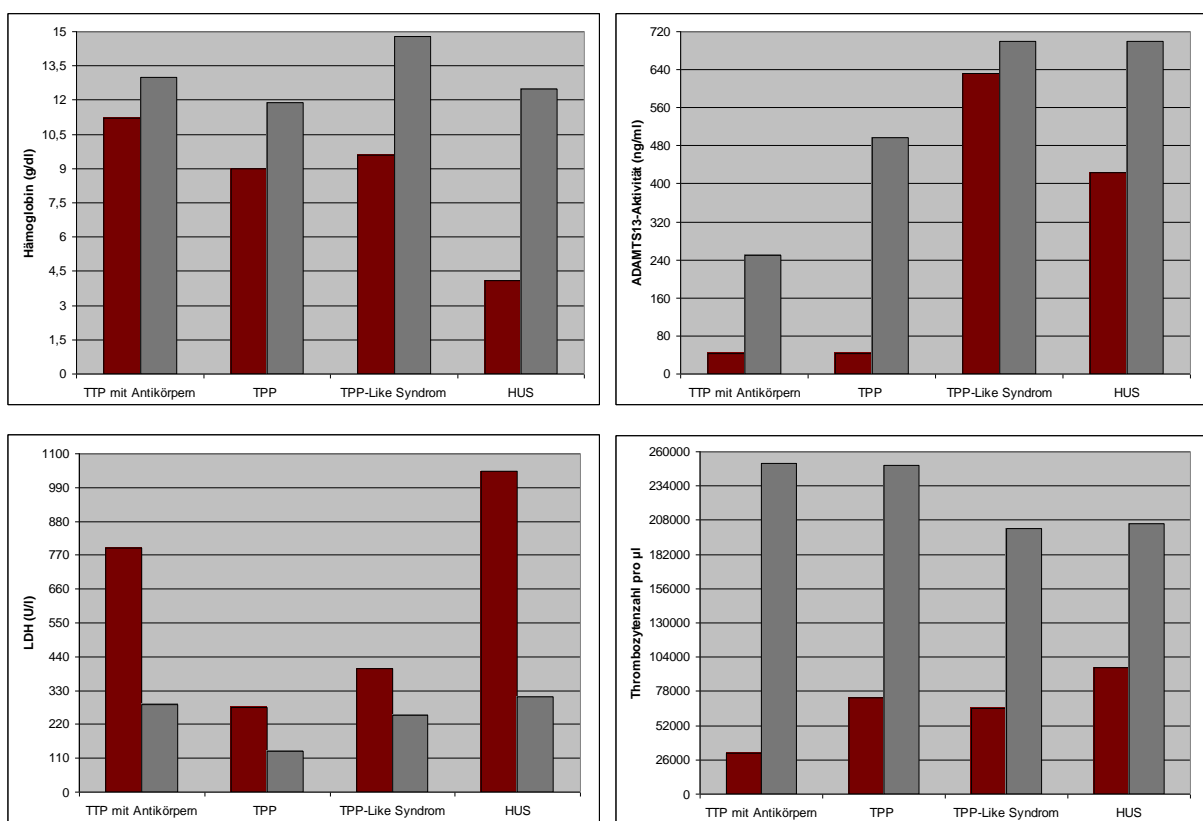


Abb. 78: ADAMTS13 Aktivität, Thrombozytenzahl, LDH-Spiegel und Hämoglobinwert von TTP mit Antikörpern, TPP, TPP-Like Syndrom und HUS im akuten Schub (rot) und während der Remission (weiß).

Mit der ADAMTS13 Aktivität verhält es sich anders. Die ADAMTS13 Werte befinden sich ausschließlich bei den beiden TTP-Formen in sehr niedrigen Aktivitätsbereichen. Während der Remissionsphase steigen zwar beide ADAMTS13 Aktivitäten deutlich an, liegen aber trotzdem noch unter dem Normalbereich. Vor allem bei den TTP Patienten mit

Antikörpern können die Werte auch in der Remission noch weit im pathologischen Bereich liegen. Die ADAMTS13 Aktivität bei der TTP ohne nachweisbare Antikörper kann an der Grenze zum Normalbereich nachweisbar sein. Bei fallenden ADAMTS13 Aktivitäten ist es daher möglich, eine rechtzeitige Behandlung einzuleiten, um einen völligen Schub zu vermeiden. Die ADAMTS13 Aktivität beim TTP-Like Syndrom und dem HUS sind während des Schubs und in der Remission in der Regel nahezu im Normalbereich und sind daher gut von der TTP abzugrenzen.

Laborparameter	TTP mit Antikörpern		TTP		TTP-Like Syndrom		HUS	
ADAMTS13 Aktivität	043,2	250,0	043,2	496,8	633,0	700,0	423,0	700,0
Thrombozyten (10 ³ /nl)	31	251	73	250	65	202	96	205
Hämoglobin (g/dl)	11,2	13,0	09,0	11,9	09,6	14,8	04,1	12,5
LDH (U/l)	793	283	274	133	402	250	1042	309
Fragmentozyten	positiv	negativ	negativ	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Antikörper (BE)	2,4	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
UL VWF M	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein

Tab. 41: Laborergebnisse innerhalb eines Schubs (rot) und während der Remission (schwarz) für ADAMTS13 Aktivität, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Lactatdehydrogenase (LDH), Fragmentozyten, Antikörper und ultralange VWF Mutlimere (UL VWF M) der Patienten mit TTP mit Antikörpern, TTP, TTP-Like Syndrom und HUS.

Im akuten Schub zeigt sich in den Blutausstrichen aller Patienten, sowohl von denen mit TTP, TTP-Like Syndrom als auch von den Patienten mit HUS Fragmentozyten. Diese sind jedoch während der Remission nicht mehr nachweisbar (Abb. 79).

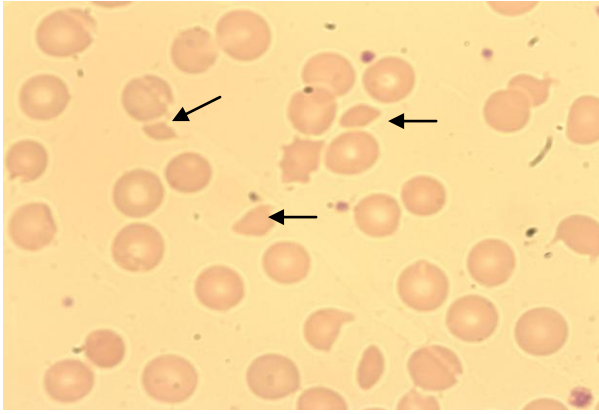


Abb. 79: Beispielhafter Blutausstrich eines TTP Patienten unter dem Mikroskop. Deutlich erkennbare Fragmentozyten (←).

Ultralange VWF Multimere sind bei allen vier Mikroangiopathien im akuten Schub nachzuweisen (Abb. 80). Während sie bei HUS und TTP-Like Syndrom in der Remission nicht mehr nachweisbar sind, können SDS-Gele von TTP Patienten auch dann noch UL VWF Multimere darstellen. Dies lässt sich damit erklären, dass durch Endothelverletzungen und Entzündungsprozesse in der Akutphase bei allen TMA UL VWF Multimere ausgeschüttet werden.

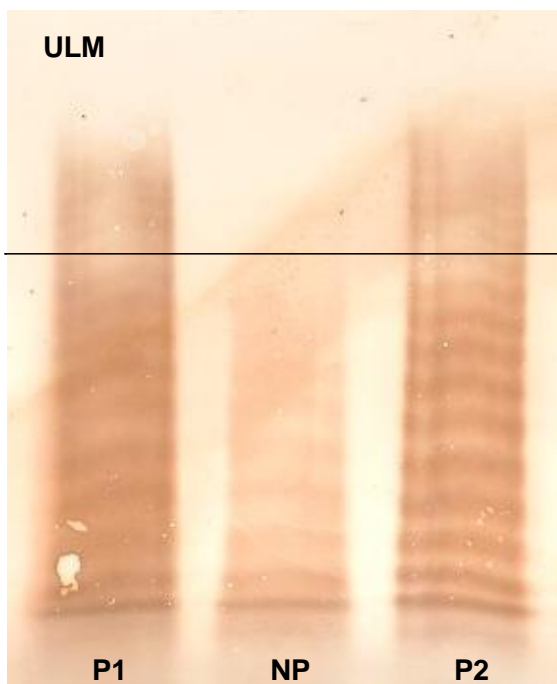


Abb. 80: 1%iges Agarosegel mit (von links nach rechts) TTP Patienten mit ADAMTS13 Antikörpern (P1), Normalpool (NP) als Standard und TTP Patienten ohne nachweisbare Antikörper (P2).

In der Regenerationsphase normalisieren sich die UL VWF M-Werte dann wieder. Bei der TTP hingegen werden, aufgrund des nachgewiesenen ADAMTS13 Mangels, auch in der Remission weiterhin die UL VWF Multimere nicht abgebaut und sind daher dauerhaft detektierbar.

Bei den anderen Mikroangiopathien ist funktionsfähiges ADAMTS13 in ausreichender Menge vorhanden, bzw. keine Antikörper gegen ADAMTS13 nachweisbar. Daher erfolgt die Spaltung der UL VWF Multimere in der Remissionsphase.

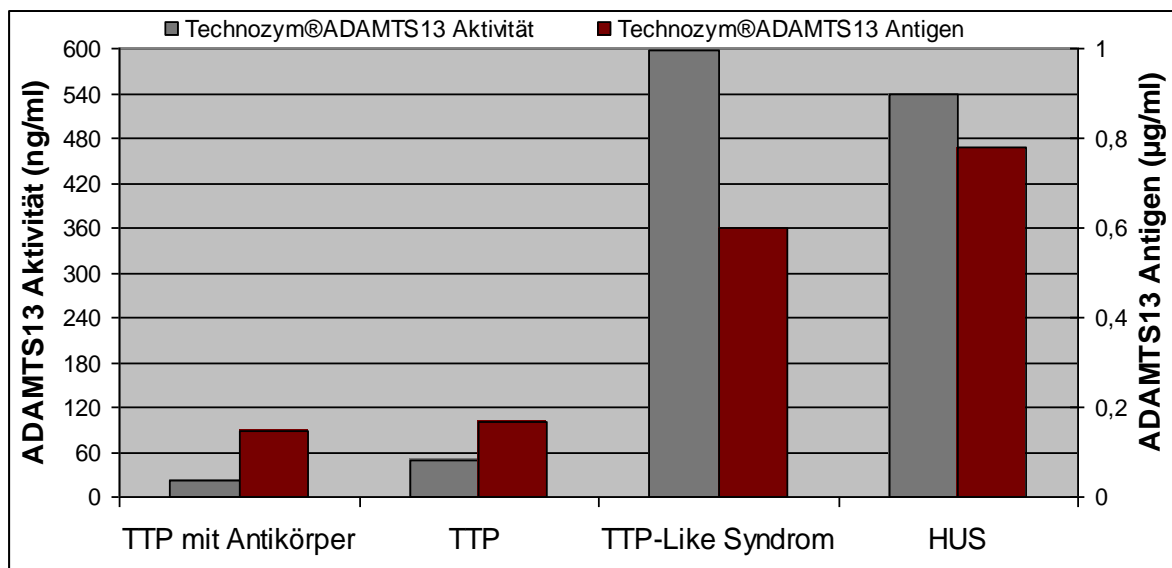


Abb. 81: Gegenüberstellung von ADAMTS13 Aktivität gegen ADAMTS13 Antigen ermittelt mit Technozym®ADAMTS13 Kit von Patienten mit TTP mit Antikörpern, TTP, TTP-Like Syndrom und HUS.

Bei beiden TTP Formen wurden sowohl niedrige ADAMTS13 Aktivitäten als auch niedrige Antigenkonzentration gemessen, wobei bei der TTP mit Antikörpern davon ausgegangen werden muss, dass nicht detektierbare Antigen-Antikörperkomplexe die Antigenwerte verfälschen (Abb. 81). Die beiden TTP Formen können nur durch die Antikörperbestimmung und die genetische Analyse voneinander abgegrenzt werden. Die ADAMTS13 Antigenwerte bei TTP-Like Syndrom und HUS sind leicht erniedrigt bzw. normal und daher gut von den Patienten mit TTP zu differenzieren.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Methoden zur Bestimmung der ADAMTS13 Aktivität

Seit der Entdeckung der Metalloprotease ADAMTS13 1996 durch Furlan [21] und Tsai [59] wurden verschiedene Messverfahren akquiriert. Dabei beinhaltet die ADAMTS13 Untersuchung sowohl die Messung der Aktivität, des Antigens als auch die Bestimmung der ADAMTS13 Antikörper. Mittlerweile ist es auch möglich genetische Mutationen im ADAMTS13 Gen zu charakterisieren. Trotz der vielfältigen Messmethoden verfügen nur wenige spezialisierte Laboratorien über hinreichend Erfahrung bei der Untersuchung von ADAMTS13 [104].

Zur Messung der ADAMTS13 Aktivität stehen mittlerweile eine Vielzahl verschiedener Messmethoden zur Verfügung. Die Grundlage aller Messmethoden ist die Spaltung von rekombinant hergestellten oder aus Humanplasma gereinigten VWF Multimeren bzw. synthetischen VWF Peptiden. Als Messtechniken dienen dabei die Elektrophorese, die Plättchenaggregation, der FRET oder der Immunoassay. In der folgenden Tabelle 42 sind alle momentan verfügbaren, in der Literatur beschriebenen ADAMTS13 Untersuchungsmethoden aufgelistet.

Im Laufe der letzten 15 Jahre entstand eine Fülle an Messmethoden, die es ermöglichten, immer sensitivere ADAMTS13 Werte zu messen. Insbesondere im unteren Messbereich sind genaue ADAMTS13 Aktivitäten zur Differenzierung der TMA erforderlich. Die Verifizierung von ADAMTS13 Aktivitäten unter 5 % [49] gegenüber den über 5 % ist für die Unterteilung der verschiedenen TTP-Formen entscheidend. Laut Studt et al. [105] sollten die ADAMTS13 Messmethoden diesen Anforderungen bezüglich der Nachweisgrenze entsprechen. Bereits geringe Aktivitätsunterschiede haben einen großen Einfluss hinsichtlich der Prognose.

Eine ADAMTS13 Aktivität unter 5 % ist mit einer niedrigeren Mortalität verbunden, tendiert jedoch zu höheren Rückfallraten. Bei gleichzeitigem Auftreten von ADAMTS13 Aktivitätswerten unter 5 % und einem gleichzeitig hohen Antikörpertiter ist die Überlebenszeit verkürzt. Patienten mit niedrigen Aktivitätswerten sprechen dafür jedoch deutlich besser auf eine Plasmapherese an [47, 73, 74].

Prinzip	VWF Substrat	Denat. Reagenz	Aktivator	DL	Zeit	Einordnung der verwendeten Assay
Fragment von VWF Dimeren mit 176 KDa	VWF Komplette	Guanidin CL ⁻		1 %	24 h	
VWF Multimergröße mit Gelelektrophorese	VWF Komplette	1,5 mol/l Harnstoff	10 mmol/l BaCl ₂	5 %	24 h	SDS-Gelelektrophorese
CBA von gespaltenem VWF	VWF Komplette	1,5 mol/l Harnstoff	3 mmol/l BaCl ₂	6 %	6 h bis 24 h	
Risto.-Cofakt.-Akt. von gespaltenem VWF	VWF Komplette	1,6 mol/l Harnstoff	6,25 mmol/l BaCl ₂	6 %	6 h bis 24 h	BCS-Methode nach Böhm
Ungespaltenes VWF Antigen mit IRMA	VWF Komplette	1,5 mol/l Harnstoff	3 mmol/l BaCl ₂	5 %	18 h	
VWF Multimergröße mit WB	VWF Komplette	1,5 mol/l Harnstoff	4,5 mmol/l BaCl ₂	5 %	14 h	
Ungespaltene, markierte VWF A2-Domäne mit ELISA	VWF A2-Domäne			5 %	2 h	
Gespaltene VWF A2-Domäne mit WB	VWF A2-Domäne				1 h	
Gespaltener VWF78 mit HRP Assay	VWF78			3 %	½ h	
Ungespaltener, markierter VWF73 mit ELISA	VWF73			2 %	3 h	
Gespaltener VWF73 mit FRET Assay	VWF73		25 mmol/l CaCl ₂	3 %	1 h bis 3 h	Actifluor™ ADAMTS13 Technozym® ADAMTS13
Gespaltener VWF73 mit WB	VWF73		10 mmol/l BaCl ₂	3 %	1 h	
Gespaltener VWF73 mit ELISA	VWF73		5 mmol/l MgCl ₂	0,5 %	1 h	
Gespaltener VWF73 mit SELDI-TOF	VWF73		1 mmol/l BaCl ₂	0,5 %	16 h	

Tab. 42: Verschiedene Messprinzipien zur Bestimmung der ADAMTS13 Aktivität mit den wichtigsten Charakteristika und der Zuordnung der verwendeten Assays zum jeweiligen Messprinzip. DL: Detektionslimit, CBA: Collagen-Binding-Activity, Risto.-Cofak.-Akt.: Ristocetin-Cofaktor-Aktivität, WB: Western Blot.

Patienten mit ADAMTS13 Aktivitätswerten unter 5 % werden fast ausschließlich der idiopathischen TTP zugeschrieben. Werte über 10 % können hingegen bei sekundären TTP Formen (beispielsweise schwangerschafts- oder knochenmarkstransplantation assoziierte TTP) als auch bei anderen Erkrankungen nachgewiesen werden [47, 106, 107]. Letztendlich hat die exakte ADAMTS13 Aktivität keinen entscheidenden Einfluss auf die Therapiemaßnahmen, sondern ist ein wichtiger prognostischer und diagnostischer Marker.

Die von uns angewandten Methoden beinhalten sowohl zwei Assays, die nach dem FRET Prinzip aufgebaut sind und die ADAMTS13 Aktivität direkt messen, als auch zwei indirekte Methoden. Die BCS-Methode nach Böhm beruht auf der Bestimmung der Residualen Ristocetin-Cofaktor Aktivität. Die SDS-Gelelektrophorese stellt eine qualitative und semiquantitative Methode zum Nachweis der UL VWF Multimere dar. Bei der Auswahl der Methoden wurde darauf geachtet, ein möglichst breites Spektrum an Nachweisverfahren abzudecken. Mögliche methodenspezifische Fehlerquellen konnten durch die Messungen derselben Probe mit den jeweiligen Methoden identifiziert werden. Somit konnten diese Fehler bei der Analyse der Gerinnungspräparate berücksichtigt werden und gewährleisteten eine objektivere Auswertung der Messergebnisse.

Problematisch bei der Bewertung der Messergebnisse ist die unterschiedliche Definierung des Normbereichs je nach Messmethode [108]. Diese Variabilität wird darüber hinaus zusätzlich durch die ethnischen Unterschiede hinsichtlich des ADAMTS13 Enzyms verstärkt [109, 110].

So definiert American Diagnostica für den Actifluor™ ADAMTS13 Kit den Normwert von 666 ng/ml \pm 135 ng/ml, während Technoclone für sein Kit einen Normbereich von 50 % bis 150 % angibt [93, 97]. Bei der BCS-Methode nach Böhm werden ebenfalls alle ADAMTS13 Aktivitäten über 50 % als normal eingeordnet [91].

Bei den verwendeten Methoden kann noch eine Vielzahl von weiteren möglichen Variabilitäten zu Interferenzen der Testergebnisse führen. Da keiner der verwendeten Aktivitätsassays die physiologischen Bedingungen des Blutflusses in vivo nachahmen kann, ergeben sich aus dem Versuchsaufbau Probleme, die die ADAMTS13 Aktivität verfälschen können. Zur Denaturierung sowie zur Enzymaktivierung werden unterschiedliche Reagenzien je nach Messmethode verwendet, die nicht den physiologischen Bedingungen entsprechen. Entscheidenden Einfluss auf die Aktivitätsbestimmung haben auch die verwendeten Detektionsmethoden sowie das jeweilige VWF Substrat [104].

Alle innerhalb der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden unterscheiden zwar pathologisch-niedrige von physiologischen ADAMTS13 Aktivitäten, dennoch gab es

zwischen den einzelnen Methoden Messschwankungen für dieselbe Probe. Wie aus der folgenden Abbildung 82 ersichtlich wird, ergibt sich jedoch, unter Einbeziehung der Standardabweichung, für alle Bestimmungsmethoden eine gemeinsame Schnittmenge. Der wahre Wert ist wohl im Bereich der sich überlappenden Standardabweichungen aller drei Methoden anzusiedeln.

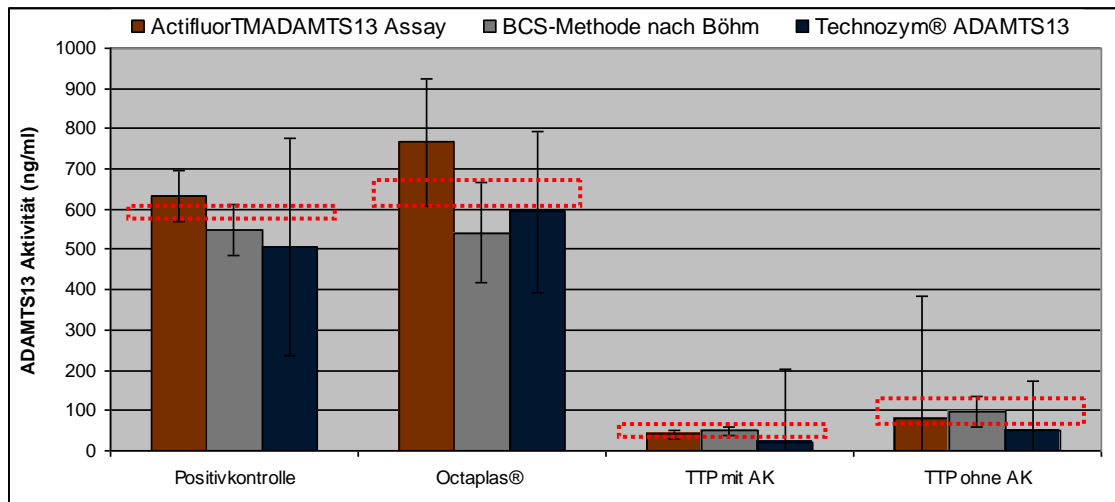


Abb. 82: ADAMTS13 Aktivität der Positivkontrolle, Octaplas®, TTP mit Antikörper und TTP ohne Antikörper, gemessen mit Actifluor™ADAMTS13, BCS-Methode nach Böhm und Technozym®ADAMTS13. Roter Rahmen: Schnittmenge der ADAMTS13 Aktivität für alle drei Bestimmungsmethoden.

Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der FRET Assays, zeigen sich für Actifluor™ADAMTS13 deutlich höhere Aktivitäten als bei Technozym®ADAMTS13 für dieselbe Probe. Diese Diskrepanz wurde in allen Aktivitätsbereichen nachgewiesen, ist aber vor allem in höheren Aktivitätsbereichen deutlich erkennbar.

Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Verwendung unterschiedlicher VWF Substrate sein. Während Technozym®ADAMTS13 das ursprünglich von Kokame et al. [92, 111] entwickelte VWF73 Substrat einsetzt, wird bei Actifluor™ADAMTS13 ein von Zhang et al. [94] entwickeltes VWF86 Substrat verwendet. Die molekulare Struktur des VWF dient als Grundlage für beide verwendeten Substrate der Assays, diese sind jedoch im Aufbau stark verkürzt.

Mahdian et al. [112] beweist bei dem Vergleich zwischen einem Immunradiometrischen Assay und dem VWF73 Assay, dass die Länge des VWF Substrats bei der Spaltung durch ADAMTS13 keine Änderung der Aktivitätsmessung bewirkt.

Andererseits sind Unterschiede bei der enzymatischen Reaktion je nach Substratlänge denkbar. Bei der Umsetzung des physiologischen VWFs kommt es zur Bindung der D4- bis CK-Domäne des VWFs mit der TSR5- bis CUB-Domäne des ADAMTS13. Hingegen haben diese ADAMTS13 Domänen für die Umsetzung des VWF73 bzw. VWF86 Substrats keinen Einfluss, da diese selbst keine D4- / CK-Domänen enthalten (siehe 1.2.2.3 und 1.2.4.2). Die volle Funktionsfähigkeit von ADAMTS13 kann somit bei den FRET Assays nicht überprüft werden.

Des Weiteren ist die Funktionsfähigkeit von ADAMTS13 für die Bindung an den Fängerantikörper der beschichteten ELISA-Platte von besonderer Relevanz. Bei Technozym[®]ADAMTS13 bindet ADAMTS13 mit der CUB-Domäne am Fängerantikörper. Mutationen in diesem Bereich von ADAMTS13 werden durch diese Messmethode nicht erfasst und ergeben falsch negative Werte [113]. Bei näherer Betrachtung der Mutationen ergibt sich eine gewisse Diskrepanz zwischen gemessenen ADAMTS13 Werten und der in vivo Funktionsfähigkeit des Enzyms, da eine Inaktivierung der CUB-Domänen nicht zu einem 100%igem Aktivitätsverlust führen [25].

Das Technozym[®]ADAMTS13 VWF73 Substrat ist an der Position 1599 mit dem Donor-Fluorophor Nma und an 1610 mit dem Akzeptor-Fluorophor Dnp substituiert [92, 111]. Das VWF86 Substrat von Actifluor[™]ADAMTS13 nutzt zwei ALEXA Fluorophore. Die grundlegenden Unterschiede der zwei angewendeten Methoden beruhen auf der Verwendung von unterschiedlichen Fluorophoren. Der Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer bei Actifluor[™]ADAMTS13 nutzt das Prinzip des Autoquenching. Als Donor und Akzeptor wird das gleiche Fluorophor verwendet. Bei Spaltung des VWF86 Substrats wird der Abstand zwischen den Fluorophoren vergrößert und die reziproke intermolekulare Interaktion verringert. Folglich verstärkt sich die Emission der einzelnen Fluorophore bei Spaltung [94, 114]. Zudem ist die Fluoreszenzintensität der ALEXA Fluorophore gegenüber den meisten vergleichbaren Konjugaten größer. Außerdem wurde für das ALEXA Fluorophor eine geringere Empfindlichkeit gegenüber pH-Veränderungen sowie höhere Photostabilität nachgewiesen [95].

Das ALEXA Fluorophor vor der ADAMTS13 Schnittstelle befindet sich an derselben Position wie das Fluorophor bei Technozym[®]ADAMTS13. Jedoch ist das ALEXA Fluorophor nach der Enzymschnittstelle um eine Aminosäure nach hinten verschoben [94]. Die Positionsverschiebung des Akzeptorfluorophors um eine Aminosäure zum C-terminalen Ende vergrößert die Försterdistanz. Dies kann zu einer Veränderung des Fluoreszenzspektrums führen, und damit zu einem möglichen Unterschied bei der Aktivitätsmessung.

ADAMTS13 erscheint im Plasma als äußerst stabile Protease. So konnten Rock et al. [115] nachweisen, dass der ADAMTS13 Gehalt über 72 Stunden im Plasma konstant

bleibt, auch bei vorheriger chemischer und physikalischer Behandlung des Plasmas. Auch mehrmaliges Einfrieren und wieder Auftauen ist ohne ADAMTS13 Aktivitätsverlust beschrieben [4]. Trotz allem sind auch ADAMTS13 spaltende Prozesse entdeckt worden. Crawley et al. [50] und Lam et al. [116] konnten eine Inaktivierung von ADAMTS13 durch Thrombin und Plasmin aufzeigen. Erklärbar sind diese proteolytischen Prozesse durch die Möglichkeit ADAMTS13 bei Gefäßverletzungen lokal zu regulieren. Dieser proteolytische Abbau von ADAMTS13 birgt auch bei der Messung ein Interaktionspotential.

Die Probe kann zusätzlich zu den ADAMTS13 spaltenden Proteasen noch weitere Bestandteile enthalten, die zu Interaktionen führen können. Für die FRET Methoden sind vor allem der Hämoglobin- und Bilirubingehalt der Probe von Bedeutung [117-120].

So kann ein erhöhter Hämoglobingehalt der Probe als Inhibitor von ADAMTS13 fungieren. Der erhöhte Hämoglobingehalt kann in vivo beispielsweise durch hämolytische Anämien oder inkompatible Erythrozytentransfusion zustande kommen. Daher ist es wichtig bei hämolytischen TTP-Patientenplasma darauf zu achten. In vitro kann die falsche Behandlung der Probe, wie die zu starke Zentrifugation bzw. eine Aufbewahrung als Vollblutprobe, ursächlich für hämolytische Plasmaproben sein [118].

Ein hoher Bilirubingehalt im Patientenplasma beeinflusst die Fluoreszenzmessung. Meyer et al. [120] als auch Eckmann et al. [119] beschreiben die Interferenz von Bilirubin bei der FRET-VWF73 Methode. Dabei fungiert Bilirubin selbst als Quencher bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Eckmann et al. [119] entwickelten eine Methode zur Minimierung der Interferenz durch erhöhte Bilirubinwerte. Dabei kann, durch Inkubation der Plasmaprobe mit Bilirubinoxidase, Bilirubin zu Biliverdin oxidiert werden. Die Interferenz wird damit aufgehoben und es kommt nicht mehr zur Messung falsch niedriger ADAMTS13 Werte.

Des Weiteren kann ein hoher VWF Gehalt die ADAMTS13 Aktivitätsmessung beeinflussen.

Sowohl der VWF der Probe als auch das zugeführte VWF Substrat stehen als mögliches Substrat der ADAMTS13 Protease zur Verfügung. Bei Spaltung des nativen VWFs kommt es zur kompetitiven Hemmung des VWF Substrates. Die Fluoreszenzintensität nimmt damit ab. Von besonderer Relevanz ist dieser Umstand bei der Messung VWF reicher Proben, wie zum Beispiel VWF / FVIII Konzentrate.

Als weitere Interaktionspotentiale sind die technischen Unterschiede bei der Durchführung der beiden Assays zu nennen. Bei ActifluorTMADAMTS13 erfolgt vor der Zugabe des Aktivitätssubstrats keine Auswaschung der Probe, wodurch möglicherweise nicht gebundenes ADAMTS13 zusätzlich zu einer Umsetzung des Substrates führt. Dadurch kann eine erhöhte Fluoreszenz zustande kommen. Demgegenüber steht die Tatsache,

dass bei erhöhtem VWF Gehalt der Probe, die Umsetzung des Aktivitätssubstrates ohne den Waschvorgang vermindert wird.

Die verwendete Probe wird vor dem Auftragen auf die Platte im Verhältnis 1:2 mit inaktiviertem Plasma verdünnt. Außerdem wird bei dem Assay mit Inkubationspuffer gearbeitet, der einen weiteren Verdünnungsfaktor von 1:4 bewirkt.

Bei Technozym®ADAMTS13 wird vor der Zugabe des Aktivitätssubstrates die unverdünnte Probe ausgewaschen. Damit wird zwar eine Interaktion von VWF der Probe und dem VWF des Aktivitätssubstrates verhindert, aber auch die Auswaschung von nicht gebundenem ADAMTS13 erhöht.

Ein weiterer Unterschied bei der Testdurchführung ist die Verwendung der Endpunktmethode bei Actifluor™ADAMTS13 gegenüber der kinetischen Messung bei Technozym®ADAMTS13. Bei dieser kinetischen Messung wird über einen Zeitraum von 15 Minuten die Fluoreszenz pro Minute detektiert und die Steigung der Fluoreszenz errechnet (RFU). Die Aussagekraft der kinetischen Messung ist gegenüber der Momentaufnahme einer Endpunktmessung höher. Die kinetische Messung unterliegt jedoch einer deutlich höheren Störanfälligkeit.

Bei Actifluor™ADAMTS13 kann bei der Auswertung auf eine lineare oder quadratische Kalibration zurückgegriffen werden. Innerhalb der Universitätsklinik ist die lineare Kalibration etabliert. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Verwendung der quadratischen Gleichung sich insbesondere für die Auswertung von Plasmaproben mit niedrigen ADAMTS13 Werten besser eignet, da die lineare Kalibrationskurve die niedrigen Werte falsch hoch erscheinen lässt [121].

Neben den verwendeten FRET Assays ist die Messung der ADAMTS13 Aktivität noch mit einer Vielzahl weiterer Messmethoden möglich (Tab. 42), die auf unterschiedliche Messprinzipien zurückgreifen.

Allein Technoclone betreibt zwei Assays zur ADAMTS13 Aktivitätsmessung, basierend auf unterschiedlichen Testprinzipien. Beim Methodenvergleich von Geiter et al. [122] korrelieren die Testergebnisse des fluorogenen Technozym®ADAMTS13 sehr gut mit dem chromogenen Technozym®ADAMTS13 Activity ELISA. Nachteilig bei der ursprünglichen chromogenen Methode ist dabei die indirekte und zugleich zeitaufwendige Messung der Aktivität. Hingegen ist durch die direkte Bindung von ADAMTS13 an die beschichtete ELISA-Platte beim fluorogenen Kit die nachfolgende Antigenmessung möglich.

BCS-Methode nach Böhm

Mit der von Böhm entwickelten abgeänderten Methode zur Ristocetin-Cofaktor Aktivitätsbestimmung kann die ADAMTS13 Aktivität zuverlässig bestimmt werden. Da die Methode jedoch sehr zeitaufwendig ist, birgt sie einige Fehlerquellen, die die Aktivitätsmessung beeinflussen können.

Im Gegensatz zu den Aktivitätsassays von American Diagnostica und Technoclone müssen für die BCS-Methode nach Böhm alle benötigten Reagenzien vor der Versuchsdurchführung zubereitet werden. Die Methode ist daher vor allem bei einer großen Anzahl an Messungen kostengünstiger als die erwerblichen Assays. Durch die eigene Herstellung der Reagenzien, ist die Zahl der möglichen Fehlerquellen beispielsweise bei der Verdünnung, beim Abwiegen und bei der pH-Werte Einstellung jedoch deutlich höher. Während also für die klinische Testung der ADAMTS13 Aktivitäten geringe Mengen von Test- und Substratpuffern frisch angesetzt werden, kann bei den kommerziellen Aktivitätsassays auf industriell hergestellte und bereits gebrauchsfertige Testpuffer zurückgegriffen werden und damit potentielle Verdünnungsfehler minimiert werden. Doch auch innerhalb der Probenverdünnungen können sich, sowohl mit zunehmender Verdünnungsstufe, als auch bei der Anfertigung der Kalibrationsreihe durch Verdünnung der Positivprobe mit deaktiviertem Plasma Fehler potenzieren.

Die kommerziellen Testkits haben den Vorteil, dass sie geringere Schwankungen innerhalb der Testergebnisse aufweisen, da weniger manuelle Verarbeitungsschritte nötig sind. Somit werden auch Fehlerquellen durch den Versuchsdurchführer, wie zum Beispiel Pipettierfehler bei der Durchführung des Versuchs vermieden [123, 124]. Die Ungenauigkeit durch Pipettierfehler wirkt sich besonders auf die Kalibrationsgerade der BCS-Methode nach Böhm aus, die für jede Testreihe erstellt werden muss. In den unteren Messbereichen liefert die Kalibrationsgerade durch ihre Linearität sehr genaue Werte, jedoch verliert sich die Linearität in den höheren Messbereichen, wodurch es zu größeren Schwankungen der Ergebnisse und Ungenauigkeiten kommen kann.

Bei den Versuchsergebnissen kann festgestellt werden, dass die gemessene ADAMTS13 Aktivität der Probe stark vom verwendeten VWF Konzentrat abhängt. Der zugeführte VWF soll durch das ADAMTS13 der Plasmaprobe proteolytisch gespalten werden. Durch einen Eigengehalt von ADAMTS13 im VWF Konzentrat wird das Ergebnis zur ADAMTS13 Aktivität der Plasmaprobe verfälscht. Allford et al. [125] beschrieb das VWF Konzentrat Wilfactin[®] als geeignetes Substrat für den Aktivitätsnachweis mittels Immunoblottingmethode nach Furlan [21], da es keine ADAMTS13 Aktivität aufweise.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte jedoch für Wilfactin[®] eine ADAMTS13 Aktivität nachgewiesen werden. Diese Aktivität ist zwar sehr gering, aber trotzdem in einem

Bereich, der ausschlaggebend für die Messung sein kann. Zudem schwankt die ADAMTS13 Aktivität zwischen den einzelnen Chargen, was dazu führt, dass das Verdünnungsverhältnis des Substratpuffers angepasst werden muss [126]. Von diesem Standpunkt aus wäre es besser, ein rekombinantes VWF Konzentrat als Substrat für die ADAMTS13 Aktivitätsmessung zu verwenden. Andererseits kann wegen der niedrigen Aktivitätswerte des Wilfactin® der Fehler durch die Anpassung des Substratpuffers und durch die Neuerstellung der Kalibrationsgeraden vor jeder Probenmessung ausgeglichen werden [127]. Ein ähnliches Problem stellt der Einsatz des humanen Thrombozyten enthaltenden BC-VWF-Reagenz dar, da auch dieses Produkt natürlichen Schwankungen unterliegt. Demnach können hier ebenfalls chargenabhängige Variabilitäten auftreten, die aber durch die Neuerstellung der Kalibrationsgeraden ausgeglichen werden.

Bei der BCS-Methode nach Böhm spielt auch die Plasmaqualität der Probe eine wichtige Rolle. Insbesondere lipämische Proben verfälschen die Messung, da sie den Trübungsprozess des Agglutinators beeinflussen. Im Gegensatz zu den FRET Assays beeinflussen hämolytische Plasmaproben bzw. ein hoher Bilirubinanteil die Messergebnisse dagegen weniger [118-120, 128]

Die Inkubationszeit stellt einen weiteren Einflussfaktor bezüglich der Testergebnisse dar. Die Zeitspanne von 16 bis 20 Stunden bei der BCS-Methode nach Böhm sind Erfahrungswerte aus der Routinediagnostik. Kürzere Inkubationszeiten bewirken eine verringerte Präzision. Neben der Metalloprotease ADAMTS13 wird der VWF auch durch weitere Proteasen gespalten. Elastase, Proteinase 3, Cathepsin G, Matrixmetalloprotease 9 sowie isolierte Neutrophile sind bisher als weitere VWF spaltende Proteasen identifiziert. Zwar spielt diese Regulation des VWF eine untergeordnete Rolle, kann aber bei einer schweren ADAMTS13 Defizienz an Bedeutung gewinnen. Dadurch ist erklärbar, warum sich bei angeborenem ADAMTS13 Mangel bzw. bei Patienten mit hohem Antikörpertiter und schwerer ADAMTS13 Defizienz nicht zwingend eine klinische TTP entwickelt. Bei Bestimmungsmethoden mit langer Inkubationszeit können diese Proteasen die Messergebnisse möglicherweise beeinflussen und höhere ADAMTS13 Aktivitäten suggerieren [129].

Insgesamt muss bei der BCS-Methode nach Böhm äußerst sorgfältig gearbeitet werden und es bedarf Erfahrung, um präzise Aktivitätswerte zu erlangen.

Ein weiteres Problem bei der Aktivitätsmessung ist die Nachahmung der Scherkräfte innerhalb der Methode. Diesem Problem unterliegen alle Bestimmungsmethoden, da es bisher keine Möglichkeit gibt, die physiologischen Scherkräfte bei der ADAMTS13 Messung nachzustellen. Bei dem Versuchsaufbau in vitro werden daher die komplexen physiologischen Gegebenheiten der Scherkraftentwicklung durch einen Puffer nachgeahmt. Der Reaktionspuffer enthält TRIS-Urea und wird mittels HCl auf den pH-

Wert von 8 eingestellt, da die Reaktion bei großer Ionenstärke (Natrium) gehemmt wird [98]. Die physiologische Aktivierung des VWFs wird somit durch denaturierenden Stress mittels Harnstoff oder anderer denaturierender Reagenzien hervorgerufen. Tsai [59] konnte zeigen, dass sich in Anwesenheit von Guanidin HCl die UL VWF Multimere gut durch ADAMTS13 spalten lassen. Die pH-Abhängigkeit des Tests beruht auf dem enzymatischen Verdau des VWFs durch ADAMTS13. Die Protease wird im Versuchsansatz am besten durch Bariumionen bei einem pH-Optimum von 8,0 bis 9,0 aktiviert [21]. Die lange Inkubationszeit der Untersuchungsmethode muss eingehalten werden, da die Enzymreaktionen *in vitro* nur stark verlangsamt ablaufen. Baldauf, Schneppenheim et al. [130] belegten, dass besonders große und nur teilweise entfaltete VWF Multimere unter physiologischen Gegebenheiten besonders gut von ADAMTS13 gespalten werden können.

Die lange enzymatische Spaltung bei der BCS Methode nach Böhm kann unter anderem auch durch eine von Dong et al. [131] postulierte Hypothese erklärt werden. Bei Betrachtung der physiologischen Abläufe wird nämlich ersichtlich, dass ADAMTS13 die von den Endothelzellen sezernierten VWF Multimere innerhalb von Sekunden spaltet. Die Reaktion wird durch das Anheften des VWFs an die Endothelzelle beschleunigt, da der VWF hierdurch enormen Scherkräften ausgesetzt wird und in gestreckter Form vorliegt. Zum anderen bildet die Protease, bei der Spaltung von endothelzell-gebundenem VWF, Anker- und Kofaktoren aus [131]. Das Fehlen dieses zum Teil noch wenig verstandenen physiologischen Prozesses, könnte als mögliche Ursache der langsamen proteolytischen Spaltung des VWF *in vitro* gelten.

Ein Problem, welchem vor allem die älteren Methoden unterliegen, ist die untere Nachweisgrenze. Mittlerweile ist bekannt, dass eine ADAMTS13 Aktivität kleiner 5 % sehr spezifisch für die TTP ist. Die Verallgemeinerung, dass erniedrigte ADAMTS13 Aktivitäten mit der TTP verbunden werden können, gilt nicht mehr. Zu viele Erkrankungen sind mittlerweile nachgewiesen, die eine erniedrigte ADAMTS13 Aktivität aufweisen. Aus diesem Grund wird auch momentan die ADAMTS13 Aktivitätsgrenze von kleiner 5 % in der Literatur stark diskutiert.

Vom heutigen Standpunkt aus ist der Einsatz der BCS-Methode nach Böhm zu überdenken, da diese Methode nur ADAMTS13 Aktivitäten bis 6,2 % detektiert. Entscheidende Aktivitätsunterschiede im Bereich zwischen 0 % bis 5 % bzw. die einfache Differenzierung zwischen Werten über und unter 5 % ist nicht gegeben. Demgegenüber stehen die einfacher durchführbaren FRET und ELISA Assays, die in der Lage sind, Werte bis mindestens 3 % (Technozym®ADAMTS13 bis 2 % und Actifluor™ADAMTS13 bis 22 ng/ml / 3 %) präzise zu ermitteln. Mittlerweile gibt es zudem auch Testmethoden, die Werte von 0,5 % messen können [132].

Überdies beschreibt Böhm [98] die Intra- und Inter-Assay Variationskoeffizienten, der von ihr etablierten Methode mit 2,8 % und 7,5 % für normale Proben und mit 8,7 % und 12,9 % für Proben mit sehr niedrigen ADAMTS13 Aktivitätswerten. Diese Ergebnisse zeigen, dass es für Proben mit geringerer Aktivität größere Schwankungspotentiale gibt. Zudem liegen die Intra- und Inter Assay Variationskoeffizienten damit durchschnittlich höher, als bei den meisten anderen verwendeten Assays [104]. So werden bei Actifluor™ADAMTS13 der Intra-Assay Variationskoeffizient mit 4,1 % und der Inter-Assay Variationskoeffizient mit 4,4 % angegeben [97].

SDS-Gelelektrophorese

Im Vergleich zur BCS-Methode nach Böhm zeigt die Immunoblotting Methode nach Furlan [21] und Tsai [59] einen niedrigeren „cut-off“ Punkt. Hier können Plasmaproben mit bis zu kleiner 3 % oder auch kleiner 1 % unterschieden werden [49]. Da die Immunoblottingmethode jedoch bei weitem am zeitaufwendigsten und am empfindlichsten auf Störungen reagiert, wird sie heute nicht mehr als konkurrierende Methode zu den Aktivitätsassays angesehen. Jedoch ist sie unverzichtbar bei der Darstellung von UL VWF Multimeren und zur Typisierung des VWS. Durch Nachweis der UL VWF Multimere kann sie ein wichtiges Indiz für eine TTP sein, bei der die UL VWF Multimere die Pathologie der Krankheit widerspiegeln. Durch den Mangel an ADAMTS13 können sich extrem große VWF Multimere bilden, die sukzessive zur Bildung von Mikrothromben führen. Auch bei anderen Mikroangiopathien wie dem HUS können vermehrt VWF Multimere nachgewiesen werden. Bei diesem Krankheitsbild sind die VWF Moleküle jedoch nicht an der Pathophysiologie beteiligt. Tsai [133] rät zu einem Nachweis der UL VWF Multimere bei abnormen Aktivitätsnachweisen, um einer Fehldiagnose vorzubeugen.

Die heute von uns verwendete Detektion der VWF Banden auf Nitrocellulose erleichtert die Interpretation der Gele. War früher die Detektion mit autoradioaktiven Antikörper oder Silberfärbung im Gel gängig, ist es heute die Blottingtechnik mit der Markierung durch peroxidasegekoppelter Antikörper. Mit Hilfe des Radioimmunoassays kann die VWF Diagnostik zwar sehr genau durchgeführt werden, aber die Einführung der Antikörperdetektionstechnik auf Nitrocellulose erleichtert die allgemeine Handhabung der Methode [30, 90]. Die Silberfärbung im Gel besitzt zwar eine hohe Sensibilität, ist aber nur eingeschränkt zur Quantifizierung der Proteine anwendbar. Jedoch können auch bei der Detektion der VWF Moleküle mittels Peroxidase-markiertem Kaninchen Antikörper falsche Ergebnisse geliefert werden. Durch die geringe Empfindlichkeit der Antikörper markierten Enzyme, müssen die Plasmaproben vor Verarbeitung verdünnt werden, um abnormen Verteilungsmustern vorzubeugen [30].

4.1.2 Methoden zur Bestimmung des ADAMTS13 Antigen

Imubind®ELISA und Technozym®ADAMTS13

Neben der ADAMT13 Aktivität wurde das ADAMTS13 Antigen ebenfalls mit zwei unterschiedlichen Assays untersucht. Der Technozym®ADAMTS13 Kit beinhaltet dabei sowohl Aktivitäts- als auch Antigenmessung, während der zweite Assay von American Diagnostica (Imubind®ELISA) ausschließlich ADAMTS13 Antigen misst. Bei beiden Kits handelt es sich um einen Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay.

Der Technozym®ADAMTS13 Kit verwendet jedoch im Gegensatz zum Imubind®ELISA einen bereits enzymkonjugierten Detektionsantikörper. Bei dem Imubind®ELISA wird innerhalb der Versuchsdurchführung der Detektionsantikörper durch Zuführung eines Enzymkonjugats markiert. Daraus ergibt sich eine höhere Empfindlichkeit bei der Testdurchführung. Zudem wird bei Technozym®ADAMTS13 die unverdünnte Probe doppelt so lang inkubiert, während bei Imubind®ELISA eine 1:20 verdünnte Probe eingesetzt wird. Dieser Unterschied innerhalb der Messung könnte die niedrigeren Antigenwerte bei Imubind®ELISA erklären.

Prinzipiell ist die Messung des ADAMTS13 Antigens der Aktivitätsmessung nachgestellt [134]. Um die Bedeutung von ADAMTS13 in den untersuchten Proben zu verstehen, wurde die Messung der Aktivität mit der Messung des Antigens gekoppelt. Mit der Kenntnis beider Parameter können Aussagen über den Anteil des aktiven Enzyms (Aktivitäts-Antigen Ratio) getroffen werden und eventuelle Inaktivierungsprozesse bzw. aktivitätsbeeinflussende Mutationen aufgedeckt werden [135, 136]. Beispielsweise konnten Untersuchungen von Kokame et al. [137] beweisen, dass bereits die Mutation von einem Nukleotid zu einer geringeren Aktivität führt, bei jedoch gleich bleibendem Antigenlevel. Kokame et al. [137] vermutet bei 10% der japanische Population eine heterozygoten Polymorphismus an P475S, der zu einer geringeren ADAMTS13 Aktivität führt, aber mit einem normalen Antigenlevel.

Die Messung des ADAMTS13 Antigens ist neben der Autoantikörperbestimmung insbesondere zur Differenzierung der hereditären von der erworbenen TTP möglich [134]. Neben der TTP besitzt der Antigen Spiegel auch einen prognostischen Wert bei coronary artery disease. Ein verringerter ADAMTS13 Antigenwert ist assoziiert mit erhöhtem Risiko eines Myokardinfarktes, Schlaganfalls und kardiovaskulären Erkrankungen [138].

Im Rahmen der Untersuchungen der thrombotischen Mikroangiopathien zeigte sich bei der hereditären als auch bei der erworbenen TTP eine positive Korrelation zwischen ADAMTS13 Aktivität und Antigen. Bei der erworbenen TTP mit hohem Antikörpertiter von 2,4 BE würde man einen hohen Antigengehalt bei niedriger Aktivität erwarten, da eine

Inaktivierung des Enzyms als Autoimmunreaktion erfolgt. Die Untersuchungen von Liu et al. [139] und Rieger et al. [140] bestätigen, dass Patienten mit hereditärer TTP mit hohem Antikörpertiter sowohl niedrige als auch hohe Antigenspiegel aufweisen [141].

Die These konnte jedoch innerhalb der Untersuchungen nicht bestätigt werden. Bezüglich des Antigengehalts ist kein Unterschied zwischen den beiden TTP Formen erkennbar. Möglicherweise interferieren die zirkulierenden Autoantikörper im TTP Plasma mit dem Fängerantikörper des ELISAs. Durch die Ausbildung von Autoantikörper-Antigen-Komplexen könnte daher die Detektion des ADAMTS13 Antigens behindert werden [140]. Die falsch negativen Werte wären somit erklärbar. Feys et al. [109] konnten mit ihrem ADAMTS13 Antigen Assay hingegen zeigen, dass keine Interferenz zwischen dem Autoantikörper und dem monoklonalen Fängerantikörper besteht. Für diesen Nachweis wurde rekombinantes ADAMTS13 mit Autoantikörper-beihaltendem TTP Plasma inkubiert. Es konnte keine Immobilisierung des rekombinanten ADAMTS13 durch die Autoantikörper dargestellt werden [109, 142].

Die niedrigen ADAMTS13 Antigenwerte bei der erworbenen TTP können möglicherweise auch durch die Clearance von Antikörper-Antigen-Komplexen im Organismus begründet sein [109, 143].

Die Untersuchungsergebnisse von Shelat et al. [144] zeigten, dass der ADAMTS13 Antigenspiegel zwischen angeborener und erworbener TTP mit inhibitorischen IgG Antikörpern keinen signifikanten Unterschied aufweist. Folglich verringern die ADAMTS13 Autoantikörper nicht nur die Aktivität von ADAMTS13, sondern reduzieren auch den Antigenspiegel durch die Beschleunigung der in vivo Clearance [145]. Interessanterweise verursachen nicht-inhibitorische IgG-Antikörper keine erhöhte in vivo Clearance und damit keinen abfallenden Antigenspiegel [144, 145].

Damit kommt den Autoantikörpern eine zentrale Bedeutung innerhalb der Pathophysiologie zu. Zudem sind hohe Antikörpertiter mit einem erhöhten Rückfallrisiko verbunden und sind somit ein prognostisch wichtiger Faktor. Darüber hinaus ist der Nachweis über die An- bzw. Abwesenheit von Autoantikörpern ein bedeutendes diagnostisches Merkmal. Insbesondere in der Behandlung spielt dies eine entscheidende Rolle, da bei der Anwesenheit von Antikörpern zusätzlich zur Plasmapherese eine immunmodulatorische Medikation erfolgt. Bei fehlenden Antikörpern ist hingegen die Anwendung von rekombinantem ADAMTS13 eine mögliche Therapieperspektive für die Zukunft.

Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen Gerinnungsfaktorkonzentrate konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Proben tendenziell niedrige Aktivitätswerte bei gleichzeitig hohen Antigenwerten aufweisen. Insbesondere Haemate[®]P weist bei einer

durchschnittlichen ADAMTS13 Aktivität von 12,3 % mit 1,14 ng/ml einen sehr hohen Antigengehalt auf.

Insgesamt wurde für die Gerinnungsfaktorkonzentration eine positive Korrelation zwischen der Aktivität und dem Antigen für dieselbe Probe evaluiert. Der Korrelationskoeffizient aller untersuchten Gerinnungsfaktorkonzentration bei der Messung beider Parameter mit Technozym®ADAMTS13 betrug 0,75. Die niedrige ADAMTS13 Aktivität ist hier jedoch nicht durch Autoantikörper erklärbar, sondern beruht höchstwahrscheinlich auf der Inaktivierung des Enzyms beim Herstellungsprozess.

Durch diese komplexen Sachverhalte und mögliche Interaktionen ist die ausschließliche Messung des ADAMTS13 Antigens ungeeignet. Somit ist zur weiteren Analyse von ADAMTS13 in den verschiedenen Proben die Untersuchung von Aktivität und Antigen sinnvoll.

4.2 Thrombotische Mikroangiopathien

Die thrombotischen Mikroangiopathien sind charakterisiert durch eine mikrovaskuläre Okklusion und zeigen im klinischen Bild eine Thrombozytopenie, eine mikroangiopathische hämolytische Anämie und variierende Symptome einer Organischämie. Primäre sind die thrombotisch thrombozytopenische Purpura und das hämolytisch urämisches Syndrom, die Haupterkrankungen der thrombotischen Mikroangiopathien. Neben diesen Erkrankungen werden jedoch noch andere Erkrankungen und Medikamente mit der TMA assoziiert und auch das Auftreten von einer thrombotischen Mikroangiopathien nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation ist beschrieben [26]. Hinsichtlich des klinischen Erscheinungsbildes ist kaum eine eindeutige Differenzierung der thrombotischen Mikroangiopathien vorzunehmen [61, 146, 147].

Zur Erstellung eines diagnostischen Algorithmus für die sehr heterogene Gruppe der thrombotischen Mikroangiopathien wurde daher Plasma von Patienten mit TTP, TTP-Like Syndrom und HUS in Schub und Remission untersucht. Insbesondere die Aktivität von ADAMTS13 bei den verschiedenen Erkrankungen sollte untersucht und als mögliches diagnostisches Merkmal bewertet werden.

Wie dem Diagrammen 83 zu entnehmen ist, war die ADAMTS13 Aktivität für beide TTP Formen deutlich erniedrigt und stellt das einzige eindeutige Unterscheidungsmerkmal zwischen dem verschiedenen TMA im akuten Schub dar. Die Thrombozytenwerte ebenso wie die Hämoglobinwerte sind bei allen Erkrankungen erniedrigt, und der LDH Wert erhöht und sind nicht als spezifisches labordiagnostisches Unterscheidungskriterium

festzulegen. Die zum Teil deutlichen Unterschiede innerhalb der LDH Werte sind nicht aufgrund der Erkrankung sondern hinsichtlich des Ausmaßes der Zellnekrose erklärbar und daher von dem Patienten und der Schwere des Schubs abhängig.

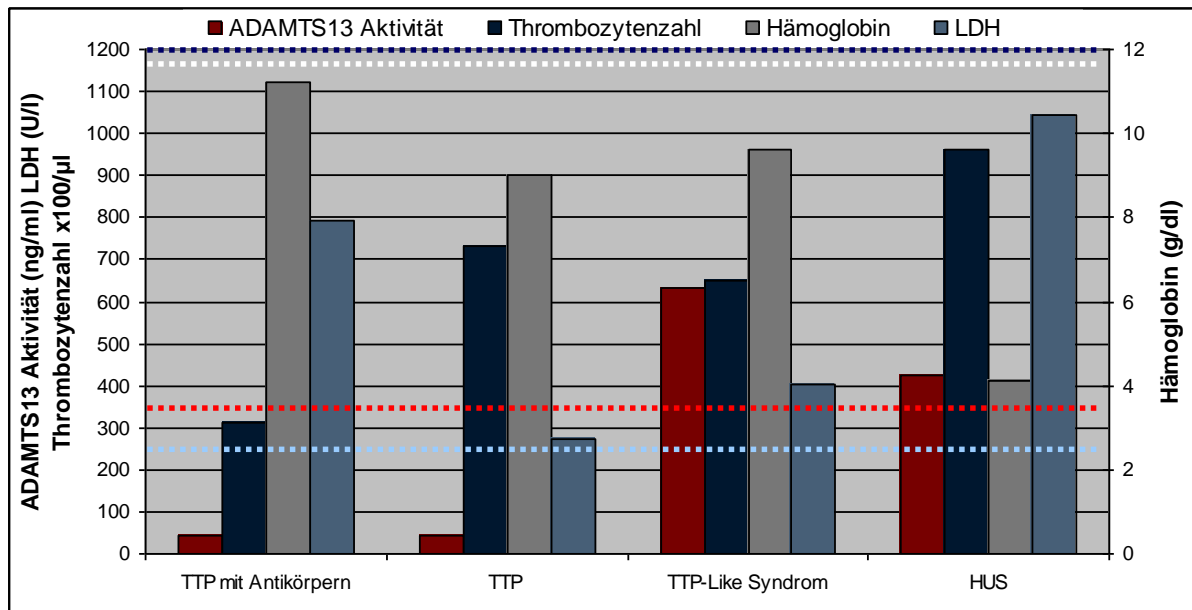


Abb. 83: ADAMTS13 Aktivität, Thrombozytenzahl, LDH-Spiegel und Hämoglobinwert von TTP mit Antikörpern, TTP, TTP-Like Syndrom und HUS im akuten Schub. Die Normwerte werden durch die gestrichelten gleichfarbigen Linien angegeben.

Das Ergebnis wird auch anhand vorliegender Literatur bestätigt, die eine ADAMTS13 Aktivität im akuten Schub bei HUS und TTP-Like Syndrom im Normbereich und bei TTP hingegen im sehr niedrigen Aktivitätsbereich angibt [61]. Doch inwieweit eine (stark) verminderte ADAMTS13 Aktivität spezifisch für die TTP ist, muss diskutiert werden. Mit der Entdeckung von ADAMTS13 und seiner wichtigen Funktion innerhalb der Ätiologie und Pathogenese der TTP begann eine intensive Erforschung der bis dahin selten diagnostizierten Erkrankung. Doch bis heute gibt es keine Einigung hinsichtlich der Definition von TTP bzw. über die ADAMTS13 Defizienz. Ohne eine standardisierte Definition ist es jedoch nicht möglich, einheitliche Kohorten zu untersuchen bzw. Ergebnisse verschiedener Autoren miteinander zu vergleichen. Das gilt auch für die Unterscheidung zwischen TTP, HUS und TTP-Like Syndrom [129] als auch für die Festlegung des schweren ADAMTS13 Mangels als Merkmal und Definition der TTP [148, 149]. Tsai [149] definiert die TTP als prothrombotisches Stadium, begründet in einem schweren ADAMTS13 Mangel. Das HUS grenzt Tsai [149] durch die sich von der TTP differenzierende Pathogenese ab. Demgegenüber steht Remuzzi [147], dem zur klaren

Trennung der Syndrome die bisherigen Differenzierungsmerkmale nicht ausreichen. Seine These, dass ein ADAMTS13 Mangel nicht zur Unterscheidung zwischen HUS und TTP ausreicht, unterstreicht er mit Studienergebnissen. So beschreiben Veyradier et al. [150, 151] und Raife et al. (2002) bei erwachsenen TTP Patienten ein ADAMTS13 Level von 30 % bzw. 38 %, während andere Studien sogar normale ADAMTS13 Werte angeben. Des Weiteren widerlegen eine Vielzahl an Fallbeispielen von HUS Patienten mit niedrigen ADAMTS13 die ausschließliche Relevanz von ADAMTS13 bei der TTP [147, 150-154]. Auch im Rahmen andere thrombozytopenischen oder entzündlichen Erkrankungen und sogar bei Gesunden sind reduzierte ADAMTS13 Aktivitäten nachweisbar [105, 155-157]. Mittlerweile werden auch erniedrigte ADAMTS13 Aktivitäten bei kardiovaskulären Erkrankungen und Schlaganfall diskutiert [106, 107, 158, 159]. Auch der Nachweis von Shigatoxin produzierenden Mikroorganismen, dem HUS auslösenden Erregern, ist ein wichtiges Indiz für das Vorliegen eines HUS. Aber auch, wenn die meisten positiven Fälle dem HUS zugeordnet werden, gibt es hier Ausnahmen. Gerth et al. [160] beschreibt einen TTP Patienten mit positivem Befund für Verotoxin produzierenden E. coli. Dies reflektiert wie schwierig eine genaue Einordnung und Diagnose ist. Jedoch hat sich trotz der genannten Schwierigkeiten die Messung der ADAMTS13 Aktivität als diagnostisches Merkmal der TTP etabliert, da in den meisten Fällen eines schweren ADAMTS13 Mangel ein TTP diagnostiziert wurde [61, 66, 105, 143, 161-164].

Neben der ADAMTS13 Aktivität stellt sein Substrat, der von Willebrand-Faktor, ebenfalls ein diagnostisches Merkmal dar. Im akuten Schub waren in der vorliegenden Arbeit bei allen vier Erkrankungen der Nachweis von UL VWF Multimere im Gel positiv.

Die Gründe für das Auftreten bei allen Erkrankungen in der Schubphase sind unterschiedlich. Während bei der TTP, unabhängig vom Auslöser, der Mangel an ADAMTS13 ausschlaggebend ist, ist bei dem HUS eine vermehrte Bildung und Freisetzung des VWF ursächlich. Immunhistochemisch zeigen die renalen Thromben bei dem HUS eine überwiegende Präsenz an Fibrin und nicht an VWF [165]. Bei dem HUS spielt also der VWF nur eine unterordnete Rolle und ist nicht der aktive Auslöser im thrombotischen Prozess. Bei der TTP sind die UL VWF Multimere hingegen ein wichtiger pathologischer Faktor. Im Tierversuch wurde an ADAMTS13 und VWF knock out Mäusen dargestellt, dass nicht die alleinige Abwesenheit von ADAMTS13 zur klinisch-manifesten TTP führt, sondern auch vermehrt VWF Multimere vorliegen müssen [166]. Die histologische Untersuchung der Thromben beim Menschen mit einem hohen Anteil an VWF unterstreichen diese Forschungsergebnisse [167]. Die Pathomechanismen beim TTP-Like Syndrom sind bis dato noch weitgehend unerforscht, sodass die Ursache für das Auftreten von UL VWF Multimere nicht zweifelsfrei geklärt ist.

In der Remission zeigten nur die beiden TTP Formen UL VWF Multimere. Jedoch ist auch das kein zweifelsfreier Beleg für das Vorliegen einer TTP. So sind Fälle beschrieben, bei denen trotz eines kompletten ADAMTS13 Mangels keine UL VWF Multimere nachweisbar waren und zwar weder im akuten Schub noch in der Remission [147].

Unabhängig von den Gründen, aus denen die Thromben auftreten, sind sie verantwortlich für das Vorliegen von Fragmentozyten. Aufgrund des pathologisch hohen Scherstresses um den Thrombus kommt es zur Fragmentation der Erythrozyten. Nach der Beseitigung der Thromben sinkt auch die Anzahl der Fragmentozyten im Blutausstrich.

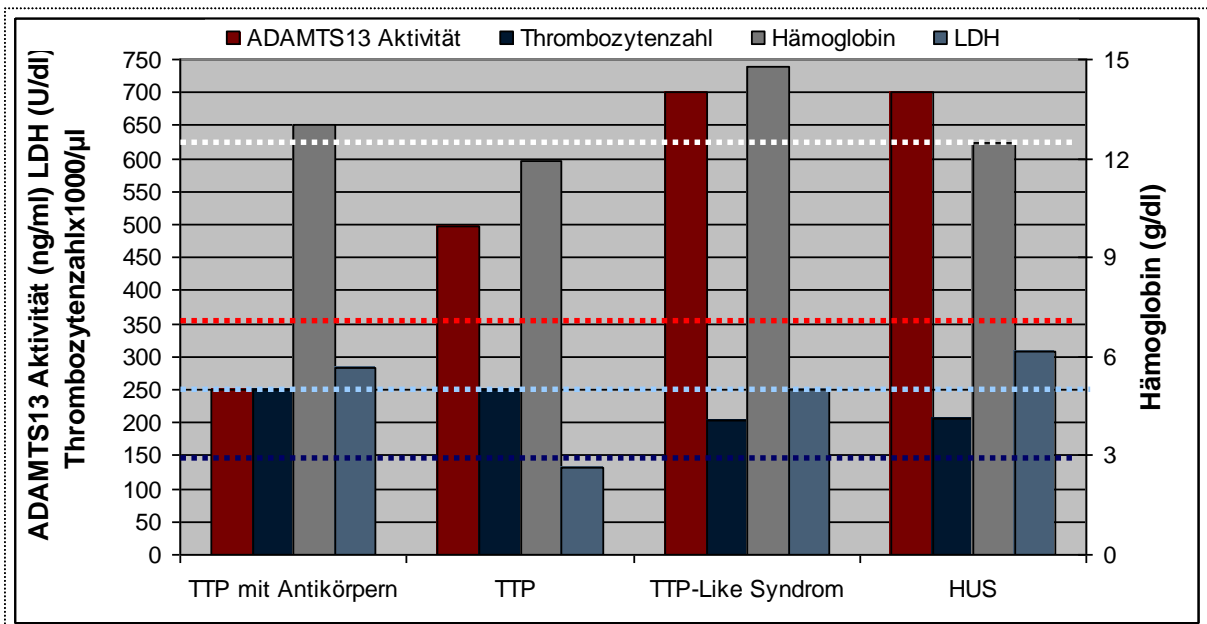


Abb. 84: ADAMTS13 Aktivität, Thrombozytenzahl, LDH-Spiegel und Hämoglobinwert von TTP mit Antikörpern, TTP, TTP-Like Syndrom und HUS während der Remission. Die Normwerte werden durch die gestrichelten gleichfarbigen Linien angegeben.

Auch die Thrombozytenzahl, der Hämoglobin und LDH Wert normalisieren sich bei allen TMA in der Phase der Remission wieder, mit Ausnahme der ADAMTS13 Aktivität, die zwar für die TTP ohne nachweisbare Antikörper auf Normwerte steigt, für die TTP mit Antikörpern jedoch im pathologischen Bereich bleibt (Abb. 84). Damit ist auch mit einem normalen ADAMTS13 Wert in den Phasen der Remission eine TTP nicht auszuschließen. Umgekehrt ist jedoch ein ADAMTS13 Mangel bei einem sonst klinisch Gesunden eine ziemlich eindeutige Diagnose, wobei eine Einteilung innerhalb der TTP Formen damit noch nicht gegeben ist. Der Anstieg der Aktivität ohne vorherige Gabe von FFP lässt für die TTP Form ohne nachweisbare Antikörper schließen, dass es sich nicht um eine angeborene TTP handelt. Patienten mit angeborener TTP weisen eine ADAMTS13 Aktivität, bedingt durch eine Genmutation, von unter 5 % sowohl im Schub als auch in

der Remission auf [144]. Durch eine genetische Analyse ist sie im Gegensatz zu allen anderen Varianten zweifelsfrei feststellbar. Je nach Mutationslage kann es bei diesen Patienten zu einer frühen [168] oder späten Manifestation [169] der TTP kommen.

Bei nicht nachweisbaren Antikörpern gestaltet sich die Einordnung schwieriger. Statistischen Vorlagen zufolge liegen bei der primären idiopathischen TTP in 81 % der Fälle Autoantikörper vor, wobei davon 28,6 % nicht inhibierend und 52,4 % inhibitorisch für ADAMTS13 sind. Die primäre idiopathische TTP stellt somit eine Autoimmunerkrankung dar. Bei der sekundären TTP liegt der Anteil der Patienten mit Antikörpern gegenüber denen ohne Antikörper bei 50:50 [144]. Demzufolge ist zwar der Beleg von ADAMTS13 Antikörpern ein Unterscheidungskriterium, ob eine TTP oder ein HUS vorliegt, gegeben, aber nicht automatisch eine Differenzierung hinsichtlich der TTP Form. Der sekundären TTP kann ein Auslöser zugeordnet werden, sodass dies zur Differenzierung helfen kann. Die meisten der in der Literatur beschriebenen Fälle an sekundärer TTP weisen eine niedrig normale bis erniedrigte ADAMTS13 Aktivität auf [47, 66]. Zusätzlich zu den labor diagnostischen Ergebnissen werden eine renale Beteiligung überwiegend bei HUS und neurologische Dysfunktionen der TTP zugeschrieben [170-172].

Die Diagnose der TTP und damit verbunden die Abgrenzung gegenüber anderen TMA gestaltet sich also sehr schwierig. Bei den TMA handelt es sich jedoch um hämatologische Notfälle, wodurch im klinischen Alltag eine schnelle Entscheidung durch den behandelnden Arzt getroffen werden muss. Außerdem wird je nach dem welche Erkrankung vorliegt, eine andere Behandlung gewählt. Daher kann, wenn auch mit gewissen Einschränkungen, ein diagnostischer Algorithmus erstellt werden (Abb. 85). Meist basiert die Diagnose auf der Grundlage der klinischen Merkmale [73, 171]. Zur Sicherung der Diagnose ist es angebracht die ADAMTS13 Aktivität bzw. die Serumfaktoren H und I zu bestimmen oder ein Nachweis auf EHEC / VHEC durchzuführen [163], [171]. Vor allem die ADAMTS13 Aktivität in Kombination mit dem Antikörpertiter haben prognostische Relevanz [66, 73, 74].

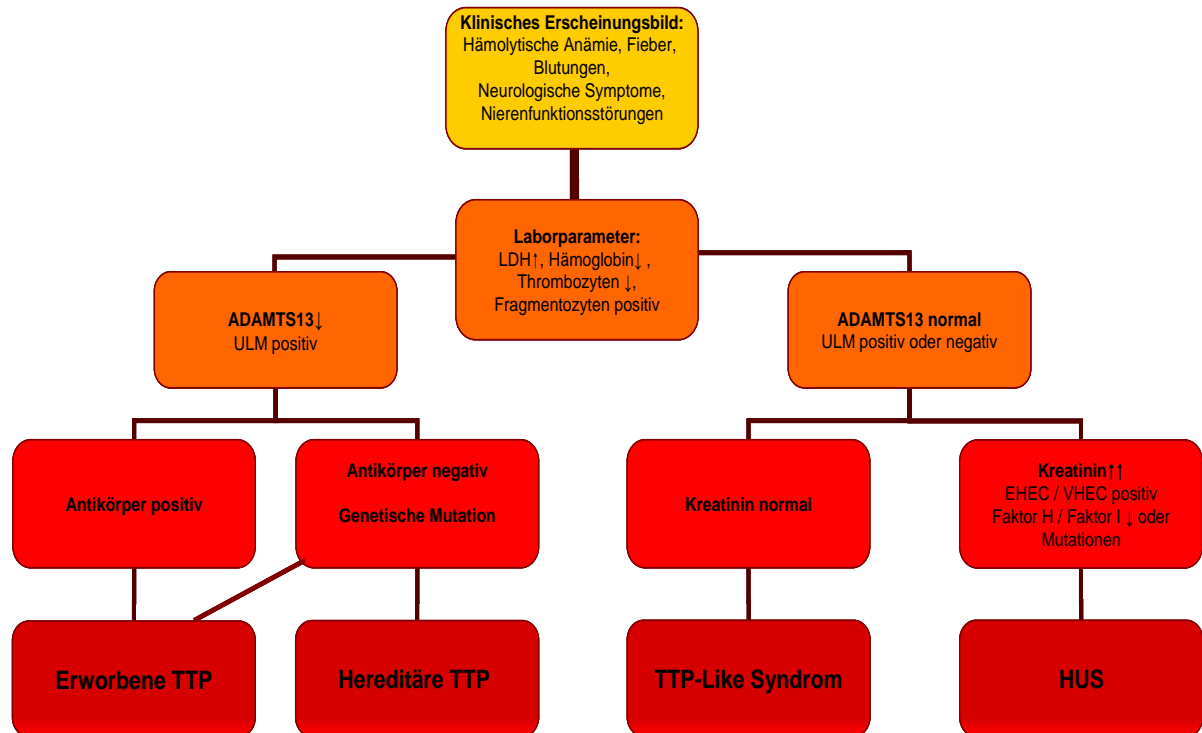


Abb. 85: Diagnostischer Algorithmus für die TMA.

4.3 Plasmapräparate

Die Plasmapherese ist momentan der Therapiestandard bei der TTP Behandlung und wird täglich bis zum Erreichen normaler Thrombozytenzahlen und LDH Werten durchgeführt [65]. Zwar wurde insbesondere in den Anfängen der TTP Behandlung auch Plasmainfusionen durchgeführt, jedoch wurde bereits 1991 die Überlegenheit der Plasmapherese gegenüber der Plasmainfusion sowie ihr Wert bei der Behandlung der TTP demonstriert [6, 70]. Heute wird eine Plasmainfusion nur durchgeführt, wenn eine Plasmapherese nicht schnell genug bereit steht oder wenn eine angeborener TTP vorliegt [65, 66]. Mit der Plasmapherese wird eine Zufuhr von ADAMTS13, eine Beseitigung der Autoantikörper sowie der UL VWF Multimere angestrebt [66, 173, 174]. Insbesondere idiopathische TTP Patienten mit einer sehr geringen ADAMTS13 Aktivität und hohen Antikörpertitern sprechen gut auf die Therapie an [65].

Der Einsatz der Plasmapherese ist jedoch insbesondere bei der sekundären TTP umstritten, die schlecht bis gar nicht auf die Plasmapherese anspricht. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, dass die sekundäre TTP fast nie einen ADAMTS13 Mangel bzw. ADAMTS13 Antikörper aufweist [65, 175]. Inwiefern daher eine Plasmapherese überhaupt

sinnvoll ist, ist schwer zu sagen, da die Effektivität der Plasmapherese überprüft wurde, bevor ADAMTS13 entdeckt worden ist [65]. Bis eine Alternative zur Verfügung steht, wird daher die Plasmapherese auch weiter bei der sekundären Therapie eingesetzt. Jedoch sollte sie als zusätzliche Therapie verwendet werden bis die primäre Erkrankung unter Kontrolle ist [176].

Zur Therapie stehen drei verschiedene Plasmapräparate zur Verfügung: Fresh Frozen Plasma, mittels Chemikalien und Licht pathogenreduziertes Einzelspenderplasma und industriell aus einem Plasmapool erzeugtes durch solvent – detergent Verfahren pathogeninaktiviertes Plasma [177].

Das FFP stellt dabei das einzige „unbehandelte“ Plasma dar, welches keine Verminderung der Gerinnungsfaktoren durch eine Virusinaktivierung erfährt. Die beiden Einzelspenderplasmen unterliegen hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe den interindividuellen Unterschieden der Einzelspender und bergen das Risiko einer Krankheitsübertragung, wobei das Risiko bei FFP nochmals höher ist als das des behandelten Einzelspenderplasmas. Das solvent / detergent behandelte Plasma weist gegenüber den Einzelspenderplasmen ein deutlich geringeres Infektionsrisiko auf [177]. Zudem induziert das s / d Plasma deutlich weniger TRALI und die Zahl der allergischen Reaktionen ist deutlich verringert [7, 8, 88, 178]. Durch die Virusinaktivierung kommt es jedoch auch zu einer Reduktion aller Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren [177, 179].

Für den Einsatz bei der TTP Therapie spielt vor allem die Aktivität von ADAMTS13 eine entscheidende Rolle und inwieweit bei der Plasmabehandlung mittels solvent / detergent Verfahren eine Reduktion von ADAMTS13 erfolgt.

Innerhalb unserer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Fresh Frozen Plasma und das solvent / detergent behandelte Plasma der Firma Octapharma, Octaplas[®], hinsichtlich ihrer ADAMTS13 Aktivität keine deutlichen Unterschiede aufweisen. Die ADAMTS13 Aktivität des Octaplas[®] ist gegenüber der des FFP, je nach Nachweismethode, leicht verringert bzw. sogar leicht erhöht. Die ADAMTS13 Aktivität, ermittelt mit drei unterschiedlichen Bestimmungsmethoden, weist sowohl innerhalb desselben Präparates als auch zwischen den zwei Präparaten eine Schnittmenge auf (Abb. 86: durch den roten Rahmen gekennzeichnet). Insgesamt liegt die ADAMTS13 Aktivität weit über dem physiologischen Mindestwert von 360 ng/ml, entspricht 50 % Aktivität (Abb. 86: rote Linie). Die Normwerte für gesunde Spender schwanken je nach Testmethode und verwendetem Normkollektiv [108]. Für den Actifluor[™]ADAMTS13 Kit gibt American Diagnostica einen mittleren ADAMTS13 Aktivitätswert von 666 ng/ml \pm 135 ng/ml [97]. Mit 766 ng/ml \pm 157 ng/ml für Octaplas[®] und 720 ng/ml \pm 200 ng/ml für FFP liegen beide Plasmapräparate auch deutlich in dem von der Firma vorgegebenen Normalbereich. Für die beiden Aktivitätsbestimmungsmethoden BCS-Methode nach

Böhm und Technozym®ADAMTS13 Kit, die ihre Ergebnisse in Prozent angeben, wird ein Normalkollektiv mit 100 % Aktivität zur Kalibration verwendet, der Normalbereich jedoch von 50 % bis 150 % angegeben [91, 93]. Auch in diesem Fall sind mit 75 % \pm 17 % und 83 % \pm 28 % für Octaplas® und mit 90 % \pm 14 % und 79 % \pm 25 % für FFP die Werte alle im Normalbereich. Studien von Heger et al. [108] und Yarranton et al. [174] bestätigen, dass Octaplas® eine ADAMTS13 Aktivität im Normbereich aufweist. Sie zeigen jedoch auch, dass die Aktivität signifikant erniedrigt ist gegenüber dem FFP, dieser Aktivitätsunterschied jedoch nicht klinisch signifikant ist. Dem gegenüber steht Roush et al. [180], der für s / d Plasma eine höhere ADAMTS13 Aktivität (185 %) gegenüber FFP gefunden hat.

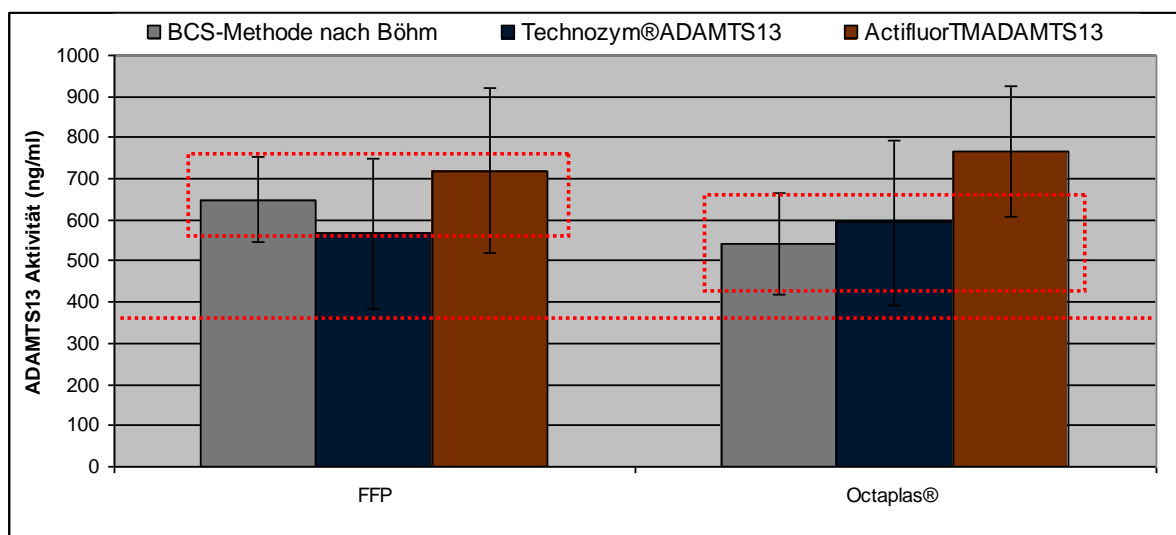


Abb. 86: ADAMTS13 Aktivität unter Angabe der Standardabweichung der Plasmapräparate FFP und Octaplas® ermittelt mit der BCS-Methode nach Böhm, dem Technozym®ADAMTS13 Kit und dem Actifluor™ADAMTS13 Kit. Roter Rahmen. Schnittmenge der Aktivität der drei verwendeten Bestimmungsmethoden. Rote Linie: Untere physiologische Grenze (360 ng/ml) der ADAMTS13 Aktivität.

Die Untersuchung des Gehaltes an ADAMTS13 Antigen ergibt ebenfalls physiologische Werte für die Plasmapräparate. Im Unterschied zu den Aktivitätsmethoden wird hier die untere Normgrenze für das ADAMTS13 Antigen bei beiden Messmethoden mit 0,6 μ g/ml angegeben [93, 97].

Für FFP lassen sich mit Technozym®ADAMTS13 Antigenwerte von 1,21 μ g/ml \pm 0,38 μ g/ml nachweisen. Im Gegensatz dazu sind bei der Messung mit dem Imubind®ELISA für FFP mit 0,57 μ g/ml \pm 0,17 μ g/ml Werte knapp unter dem physiologischen Bereich zu verzeichnen. Auch die Ergebnisse mit derselben Methode bei Octaplas® resultieren in

einem niedrigeren – wenn auch physiologischen - ADAMTS13 Spiegel von $0,75 \mu\text{g/ml} \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ gegenüber der Bestimmung mit Technoclon®ADAMTS13 von $1,18 \mu\text{g/ml} \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$. Der durch das Imubind®ELISA ermittelte Antigenwert, wird durch Untersuchungen von Heger et al. [108] gestützt. Heger et al. [108] gibt den ADAMTS13 Antigen Spiegel für Octaplas® mit $0,89 \mu\text{g/ml} \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$ an, ebenfalls bestimmt mit Imubind®ELISA. Die Werte für FFP sind jedoch bei der Bestimmung mit $0,96 \mu\text{g/ml} \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$ signifikant höher als die von Octaplas® ausgefallen.

Da innerhalb der vorliegenden Arbeit bei allen Proben diese Diskrepanz zwischen den beiden Methoden auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Problem innerhalb der Methodik und nicht um ein rein präparatabhängiges handelt und wird daher in der Methodendiskussion intensiver erläutert (4.1).

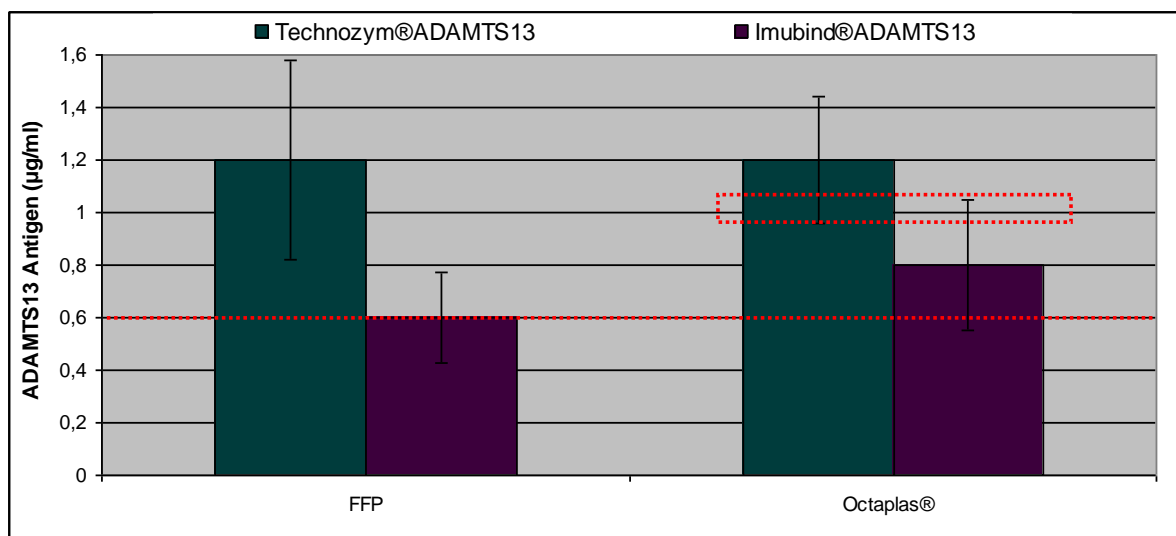


Abb. 87: ADAMTS13 Antigen unter Angabe der Standardabweichung der Plasmapräparate FFP und Octaplas® ermittelt mit dem Technozym®ADAMTS13 Kit und dem Imubind®ELISA. Roter Rahmen. Schnittmenge des Antigens der zwei verwendeten Bestimmungsmethoden. Rote Linie: Untere physiologische Grenze ($0,6 \mu\text{g/ml}$) der ADAMTS13 Aktivität.

Der Technoclon®ADAMTS13 Kit unterscheidet zwischen den beiden Präparaten kaum und ermittelt für beide einen hohen Antigengehalt, der mit den hohen ADAMTS13 Aktivitätswerten korreliert. Die Antigenwerte des Imubind®ELISA ergeben mit denen des Technozym®ADAMTS13 Kit eine Schnittmenge, während es bei FFP zu keiner Übereinstimmung zwischen den beiden Antigenergebnissen kommt (Abb. 87).

Innerhalb der Arbeit konnte keine Verminderung an ADAMTS13 Antigen bzw. an ADAMTS13 Aktivität durch die Virusinaktivierung mittels solvent / detergent Verfahren bei Octaplas® gegenüber FFP nachgewiesen werden. ADAMTS13 erweist sich damit als

ziemlich unempfindlich gegenüber äußeren Einflüssen, was auch von Rock et al. [115] beschrieben wurde. Rock et al. [115] konnte in seinen Untersuchungen aufzeigen, dass die ADAMTS13 Aktivität in verschiedenen Plasmapräparaten, sowohl FFP als auch Octaplas[®], übereinstimmt und dieses hohe Aktivitätslevel über 48 Stunden unverändert bleibt.

Bei der differenzierten Betrachtung der Blutgruppen ist für FFP eine größere Varianz für ADAMTS13 Aktivität sowie Antigen zwischen den einzelnen Blutgruppen auszumachen als bei Octaplas[®].

Bei der BCS-Methode nach Böhm ergibt sich für FFP eine Differenz von 104 ng/ml (597 ng/ml bis 701 ng/ml), für Technozym[®]ADAMTS13 von 168 ng/ml (477 ng/ml bis 645 ng/ml) und für Actifluor[™]ADAMTS13 von 268 ng/ml (583 ng/ml bis 851 ng/ml) zwischen dem höchsten und dem niedrigsten Wert. Octaplas[®] hingegen zeigt Unterschiede von 36 ng/ml (517 ng/ml bis 553 ng/ml) für die BCS-Methode nach Böhm, von 35 ng/ml (594 ng/ml bis 629 ng/ml) für Technozym[®]ADAMTS13 und von 113 ng/ml (695 ng/ml bis 808 ng/ml) für Actifluor[™]ADAMTS13. Auch bei den Messungen für das ADAMTS13 Antigen sind die Schwankungen bei FFP mit 0,4 µg/ml bzw. 0,13 µg/ml gegenüber denen bei Octaplas[®] von 0,1 µg/ml bzw. 0,05 µg/ml größer. Diese Variation wird in der Literatur auch von Heger et al. [108] beschrieben. Ursächlich hierfür ist das Poolen von bis zu 40 Beuteln FFP, die anschließend zu Octaplas[®] weiterverarbeitet werden. Vorhandene spenderbedingte Unterschiede werden damit ausgeglichen. Bei der Betrachtung der einzelnen Blutgruppen fällt zudem auf, dass bei fast allen Messmethoden die Blutgruppe 0, bei FFP wie Octaplas[®], eine höhere ADAMTS13 Aktivität und ein höheres ADAMTS13 Antigen besitzt. Nur die BCS-Methode nach Böhm und die Antigenbestimmung mit Technozym[®]ADAMTS13 bei FFP Blutgruppe AB weicht hiervon ab. Dies steht im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Heger et al. [108], die bei der Blutgruppe 0 niedrigere Werte gemessen hatten.

Die SDS-Gelelektrophorese konnte außer der blutgruppenspezifischen Variabilität keine Unterschiede zwischen FFP und Octaplas[®] nachweisen. Eine geringere Menge an UL VWF Multimeren wie sie durch Yarranton et al. [174] für das Octaplas[®] beschrieben wird, war nicht ersichtlich.

Unsere Untersuchung bezüglich FFP und Octaplas[®] bestätigen die Gleichwertigkeit hinsichtlich der ADAMTS13 Aktivität und des ADAMTS13 Antigens. Im Bezug auf die Nebenwirkungen bei der Therapie und im Hinblick auf das Infektionsrisiko ist Octaplas[®] jedoch dem FFP überlegen [7].

4.4 Gerinnungsfaktorkonzentrate

Neben der Plasmapherese stehen bis heute keine alternativen Behandlungsmöglichkeit der akuten TTP zur Verfügung, sondern ausschließlich zusätzliche Therapiemaßnahmen, deren Nutzen fragwürdig ist. So konnte in unabhängigen Studien die Wirksamkeit der zusätzliche Behandlung der erworbenen TTP mit Kortikosteroiden und anderen Immunsuppressiva wie Vincristin, Cyclosporin A nicht belegt werden [52, 66]. Die in jüngster Zeit häufig als „off-label-use“ verwendete Therapie mit Rituximab, erweist sich als deutlich wirksamer. Der Einsatz von Rituximab konnte bei refraktärer und rezidivierender TTP mit Autoantikörpern gute Erfolge erzielen, sowohl nach der Plasmapherese als auch bei alleiniger Gabe bei frühen Rezidiven [72, 181]. Vorteilhaft sind dabei das gute Sicherheitsprofil und ein geringerer Plasmabedarf sowie die Vermeidung einer starken Immunsuppression [52]. Die Effektivität von Rituximab ist zwar viel beschrieben und es wird auch bereits häufig zur Zusatztherapie verwendet, aber die Ergebnisse der momentan laufenden klinischen Studien stehen noch aus [66, 182]. Bei der erworbenen TTP mit Antikörpern wird auch die Splenektomie verwendet. Crowther et al. [183] bescheinigen, dass bei einer Splenektomie die Rückfallrate gesenkt werden kann. Seine Erfahrungen werden auch durch Kremer Hovinga et al. [71] und durch Mant et al. [184] unterstützt, die ebenfalls nach Splenektomie in der Remission eine Normalisierung der ADAMTS13 Aktivität und einen Rückgang der ADAMTS13 Antikörper beschreiben. Als Grund hierfür nennen sie die Eliminierung der Autoantikörper produzierenden B-Zellen. Jedoch ist aus Erfahrung in der Behandlung von TTP Patienten in Frankfurt und Mainz ersichtlich [185], dass nicht jede Splenektomie erfolgreich ist.

Besonders problematisch wird die Behandlung der TTP vor allem dann, wenn der Patienten nicht auf die Plasmapherese anspricht oder sehr hohen Rückfallraten unterliegt. Auch die Behandlung von Säuglingen bzw. Kleinkinder und Schwangeren stellen den behandelnden Arzt vor eine große Herausforderung.

Ein wichtiger Schritt wäre die Entwicklung eines Präparates, das die aufgrund von Mutationen defekte ADAMTS13 Protease ersetzt bzw. die ADAMTS13 Antikörper blockiert. Mittels der Aufkonzentrierung von Gerinnungsfaktoren aus humanem Plasma ist es bereits gelungen eine Vielzahl von Gerinnungsfaktorpräparaten herzustellen, die erfolgreich bei der Behandlung verschiedenster Bluterkrankungen eingesetzt werden können. Unter anderem das von Willebrand Syndrom und die Hämophilie A werden durch hochkonzentrierte VWF / FVIII Konzentrate behandelt. Die Entwicklung der Faktorkonzentrate brachte eine Reihe von Vorteilen mit sich. Durch die Vermeidung von Blutungen ist für den Patienten ein fast völlig normales Leben bei ungefähr gleicher

Lebenserwartung möglich. Außerdem kann das Gerinnungsfaktorkonzentrats vom Patienten selbstständige sowohl zur Therapie als auch Prophylaxe injiziert werden. Neben der Überlebensrate ist vor allem auch die Lebensqualität des Patienten drastisch gestiegen.

Bei der Aufkonzentrierung von VWF aus Humanplasma ist durchaus denkbar, dass neben dem Substrat auch das Enzym in höheren Konzentrationen vorhanden ist, da Nebenprodukten durchaus vorkommen können [75]. Zudem gibt es Quellen, dass die Qualität im Bezug auf die Behandlung des VWS und der Hämophilie, insbesondere des ersten Gerinnungsfaktorkonzentrates Haemate[®]P, schlechter ist als bei den neueren Konzentraten hinsichtlich seiner VWF Qualität. Grund kann ein Abbau das VWF durch ADAMTS13 in der Probe sein. Andere Untersuchungen konnten jedoch keine verminderte Qualität in den verschiedenen Konzentraten nachweisen.

Eine umfassende Untersuchung von VWF / FVIII Konzentraten auf ihre ADAMTS13 Aktivität, Antigen und UL VWF Multimere ist jedoch nicht durchgeführt worden.

Innerhalb unserer Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass alle aus Humanplasma gewonnenen Konzentrate eine ADAMTS13 Aktivität aufweisen und eine im Vergleich zur Aktivität höhere Konzentration an ADAMTS13 beinhalten (Tab. 43 und Abb. 88).

Aus dem Diagramm 88 und der Tabelle 43 wird ersichtlich, dass außer Haemate[®]P keines der Konzentrate Aktivitäten bzw. Antigenwerte aufweist, die annähernd an die Normwerte heranreichen. Daher können sie bei der Überlegung hinsichtlich eines Einsatzes bei der Therapie der TTP ausgeschlossen werden. Haemate[®]P zeigt jedoch bei der Messung mit Actifluor[™]ADAMTS13 Aktivitätswerte von durchschnittlich $469,9 \text{ ng/ml} \pm 93,5 \text{ ng/ml}$ und liegt damit über der unteren Normgrenze von 360 ng/ml . Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass American Diagnostica für Normalpatienten einen Wert von $666 \text{ ng/ml} \pm 135 \text{ ng/ml}$ angibt. Bei Einbeziehung der Standardabweichungen käme es jedoch auch hierbei zu einer Überschneidung der Aktivitätswerte des Normalpatienten mit denen von Haemate[®]P. Im Gegensatz dazu lässt sich bei Technozym[®]ADAMTS13 eine durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität von $12,3 \%$ ($88,6 \text{ ng/ml}$) ermitteln. Damit liegt der Wert weit unter der 50% Grenze. Bestätigt wird diese Aktivität durch eine Untersuchung von Allford et al. [125], der eine ADAMTS13 Aktivität von $12,5 \%$ für Haemate[®]P, jedoch mit einer anderen Methode, ermitteln konnte. Allford et al. [125] verwendete zur Untersuchung eine modifizierte Methode nach Furlan et al. [21] an. Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die von uns verwendete modifizierte Methode nach Böhm. Bei dieser indirekten Methode war ebenfalls eine ADAMTS13 Aktivität für Haemate[®]P nachweisbar, die auch im Vergleich zu den Ergebnissen der anderen Konzentrate deutlich höher liegt.

Methoden	Actifluor™ ADAMTS13	Technozym® ADAMTS13	Technozym® ADAMTS13	Imubind® ADAMTS13
Präparate	ADAMTS13 Aktivität in ng/ml		ADAMTS13 Antigen in µg/ml	
Haemate® P	469,9	088,6	1,41	0,500
Immunate STIM plus	095,8	014,4	0,17	0,009
Wilate®	136,6	038,9	0,23	0,064
Wilfactin®	078,3	020,2	0,09	0,034
Beriate® P	092,2	014,4	0,13	0,010
FFP	719,9	532,8	1,21	0,569
Octaplas®	766,1	578,9	1,18	0,749

Tab. 43: Auflistung der durchschnittliche ADAMTS13 Aktivität in ng/ml und ADAMTS13 Antigen in µg/ml gemessen mit den verschiedenen Methoden für die Faktorkonzentrate und Plasmapräparate.

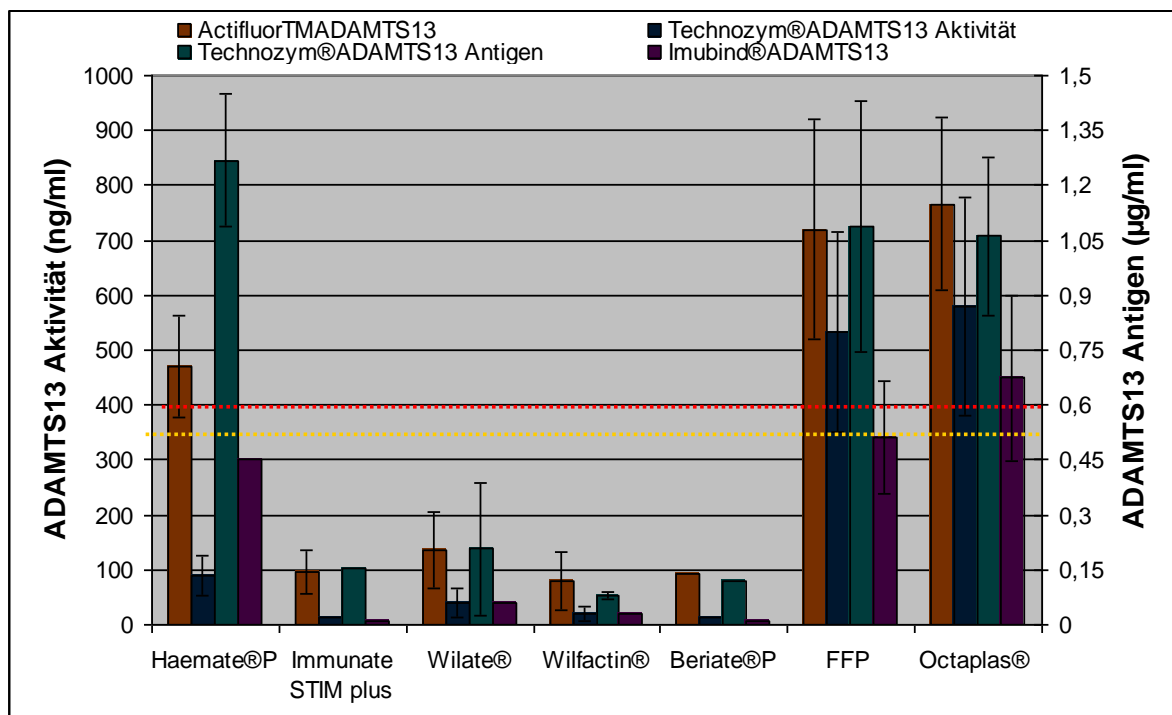


Abb. 88: ADAMTS13 Aktivität und Antigen der VWF / FVIII Konzentrate Haemate®P, Immunate STIM plus, Wilate®, Wilfactin® und Beriate®P sowie der Plasmapräparate FFP und Octaplas®. Untersuchungsmethoden für die ADAMTS13 Aktivität sind Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13 und für das ADAMTS13 Antigen Technozym®ADAMTS13 und Imubind®ELISA. Die untere Normgrenze für die ADAMTS13 Aktivität wird bei 360 ng/ml (50 %) angegeben (gelben Linie) und die vom ADAMTS13 Antigen bei 0,6 µg/ml (rote Linie).

Für die Aktivitäten kann auch unter Einbeziehung der Standardabweichungen keine Überschneidung der Ergebnisse der beiden Messmethoden erreicht werden. Da sich beide Methoden jedoch bereits als zuverlässig erwiesen haben und auch die Werte bei Plasmaproben als auch den anderen Konzentraten weitestgehende Übereinstimmungen zeigen, muss diese Diskrepanz am vorliegenden Konzentrat hängen.

Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede könnte der hohe VWF Anteil der Konzentrate sein, der insbesondere bei Haemate[®]P am höchsten ist. So wird bei Technozym[®]ADAMTS13 vor der Zugabe des Aktivitätssubstrates die Probe ausgewaschen, bei Actifluor[™]ADAMTS13 hingegen verbleibt die Probe im Vial.

Bei der Bestimmung des ADAMTS13 Antigen ist ebenfalls eine Variabilität zu erkennen (Abb. 88). Die Werte liegen bei allen Konzentraten bei beiden Methoden prozentual höher als die ADAMTS13 Aktivitäten. Zumal die höheren Antigenwerte von Technozym[®]ADAMTS13 gemessen werden, derselben Methode, die die niedrigeren Aktivitätswerte anzeigt.

Für Haemate[®]P lassen sich durchschnittliche Antigenwerte von 1,41 µg/ml (Technozym[®]ADAMTS13) und 0,5 µg/ml (Imubind[®]ELISA) angeben. Damit ist das Antigen höher als das der Plasmapräparate. Auch der niedrigere Wert von 0,5 µg/ml ist nur unwesentlich niedriger als der für FFP mit 0,59 µg/ml. Die Antigenwerte der anderen Konzentrate fallen mit einer Bandbreite von 0,09 µg/ml für Wilfactin[®] bis 0,23 µg/ml für Wilate[®] deutlich niedriger aus, bestätigen jedoch die Anwesenheit von ADAMTS13 in allen Konzentraten.

Der Grund für die höheren Aktivitäts- und Antigenwerte von Haemate[®]P kann in der Herstellung begründet sein. Beispielsweise wird Haemate[®]P ausschließlich pasteurisiert und unterliegt somit weniger starker Beanspruchung als die anderen Konzentrate, die alle einem solvent / detergent und chromatographischen Verfahren unterzogen werden. Demgegenüber steht jedoch die Tatsache, dass das solvent / detergent behandelte Plasma keine geringeren Aktivitäten als das unbehandelte Plasma aufweist.

Nachdem die Bindungsregion des Fängerantikörpers eine andere ist als das aktive Zentrum, kann es demzufolge auch ein Unterschied zwischen Aktivität und Menge an Enzym erklärt werden. Zumal bereits kleinste Veränderungen in der Protease zu einer Verminderung der Enzymaktivität führen [137]. Des Weiteren wird darüber spekuliert, ob es nicht einen Aktivierungsmechanismus für ADAMTS13 gibt, der mit dem VWF in Verbindung steht bzw. dieser eine Verbindung mit ADAMTS13 eingeht [49]. Dies könnte die hohe Menge von ADAMTS13 in VWF Konzentraten erklären, zumal andere Plasmabestandteile nicht in dieser Menge vorhanden sind.

Die ursprüngliche Fragestellung, ob VWF / FVIII Konzentrate als Ersatz für die Plasmapherese dienen können, kann für die neueren, hoch virusinaktivierten Präparate

verneint werden. Bei Haemate[®]P ist der Einsatz kritisch zu überlegen. Einerseits zeigt Actifluor[™]ADAMTS13 eine ADAMTS13 Aktivität im physiologischen Bereich, die für einen Einsatz sprechen würde und die annähernd physiologischen bzw. hoch normale Antigenkonzentration bei Imubind[®]ELISA bzw. Technozym[®]ADAMTS13 unterstützt diese These. Andererseits liegt die Aktivität untersucht mit Technozym[®]ADAMTS13 bei nur 12,3 %. Jedoch wird diskutiert, ob nicht bereits geringe ADAMTS13 Konzentrationen ausreichen, um eine klinische TTP bzw. Rückfälle zu verhindern oder sogar zur Therapie ausreichen [125, 186]. Unterstützt wird diese These durch Fälle von TTP Patienten, deren ADAMTS13 Aktivität unter 5 % liegt, die jedoch trotzdem keine klinische TTP entwickeln bzw. eine klinische Remission erreichen können. In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss weiterer VWF spaltender Proteasen diskutiert [129]. Hintergrund wäre der Einsatz von Haemate[®]P durchaus in der Klinik zu überprüfen. Insbesondere bei Säuglingen bzw. Kleinkinder könnte die Gabe von Haemate[®]P eine mögliche Behandlung darstellen.

Im Hinblick auf die momentanen Entwicklungen in der Therapie von TTP spielt die klinische Untersuchung zum Einsatz von Haemate[®]P als Ersatztherapie eine von mehreren Rollen. So befindet sich ein rekombinantes ADAMTS13 Präparat in der Entwicklung von dessen Einsatz vor allem Patienten mit angeborener TTP, also einem mutationsbedingten ADAMTS13 Mangel profitieren würden. Bei der erworbenen TTP könnte dieses Präparat zur Absättigung der Inhibitoren in Kombination mit Immunsuppressiva dienen [187]. Dafür muss jedoch erst ausgeschlossen werden können, dass durch die ADAMTS13 Boosterung nicht ein Schub vermehrter Antikörperbildung ausgelöst wird. Außerdem könnte das Volumen an rekombinantes ADAMTS13 bis zur Absättigung der Antikörper, solche Maße annehmen, dass womöglich eine Plasmapherese bzw. der Einsatz von Konzentraten vorteilhafter ist, sowohl im Hinblick auf den Nutzen für den Patienten als auch aus Kostengründen. Zudem wird rekombinantes ADAMTS13 erst in den nächsten Jahren in die klinische Testung kommen, womit die Zulassung in ferner Zukunft rückt. Bis dahin müssen allerdings andere Alternativen gefunden werden. Neben rekombinantes ADAMTS13 wird auch an der Möglichkeit geforscht, die UL VWF Multimere zu inaktivieren. Dazu ist eine klinische Studie im Universitätsklinikum geplant, die sich in der Phase II befindet [188]. Auch der Einsatz von N-Acetylcystein zur Spaltung von UL VWF Multimere erwies sich im Tierversuch als hoffnungsvoller Therapieansatz [189].

Bis allerdings die Medikamente auf den Markt kommen, kann noch einige Zeit vergehen und bis dahin müssen andere Alternativen gefunden werden.

5 Zusammenfassung

1996 entdeckten Furlan et al. [21] und Tsai [59] gleichzeitig bei der Erforschung der TTP die VWF-spaltende Protease ADAMTS13. Eine stark verringerte Aktivität von ADAMTS13 oder ein völliges Fehlen dieser Protease führen zur Entstehung der TTP. Leicht verringerte ADAMTS13 Aktivitäten werden heutzutage bei juvenilen Schlaganfallpatienten und kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert. Die Erforschung von ADAMTS13 und seiner Bedeutung befindet sich gerade erst in den Anfängen und damit auch die Therapiemöglichkeiten und Medikamente, die bei einer ADAMTS13 Defizienz zum Einsatz kommen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden sechs bisher bei der Behandlung des VWS angewendete VWF / FVIII Gerinnungsfaktorkonzentrate unterschiedlicher Chargen untersucht.

Die Konzentrate, zusammengesetzt aus drei VWF / FVIII Gerinnungsfaktorkonzentraten (Haemate[®]P, Immunate STIM plus und Wilate[®]), einem reinen VWF Konzentrat (Wilfactin[®]), einem reinen Faktor VIII Konzentrat (Beriate[®]P) und einem rekombinanten Faktor VIII Konzentrat (Kogenate[®]) wurden insbesondere auf ihre ADAMTS13 Aktivität, Antigen und VWF Multimere untersucht. Grund dafür ist die Annahme, dass bei der Aufkonzentrierung des VWFs möglicherweise auch erhöhte Mengen seines Enzyms ADAMTS13 vorhanden sind. Wäre dies nachweisbar, könnten die entsprechenden Konzentrate auch Anwendung bei TTP Patienten finden. Neben den Gerinnungsfaktorkonzentraten wurden ebenfalls die bisher als Goldstandard zur Plasmapherese bei der TTP verwendeten Therapeutika FFP und s / d Plasma analysiert. Nur bei genauer Kenntnis der ADAMTS13 Aktivität und des Antigens sowie der VWF Multimerstruktur lässt sich eine alternative Behandlungsmöglichkeit prüfen. Zudem soll mit dieser Untersuchung getestet werden, ob Unterschiede hinsichtlich der Qualität zwischen den Präparaten bestehen und inwiefern die Blutgruppen eine Auswirkung auf die ADAMTS13 Aktivität und das Antigen haben. Überdies wurde die Bedeutung von ADAMTS13 als wichtiges diagnostisches Merkmal im Rahmen der Gegenüberstellung von Patienten mit thrombotischen Mikroangiopathien erörtert. Daraufhin sollte für die Patienten mit HUS, TTP-Like Syndrom sowie TTP mit und ohne nachweisbaren Antikörpern ein diagnostischer Algorithmus erstellt werden. Alle zur Messung angewandten Methoden wurden zudem kritisch miteinander verglichen und auf ihre Eignung für die klinische Diagnostik getestet.

Zur Untersuchung der ADAMTS13 Aktivität kamen drei unterschiedliche Methoden zur Anwendung. Durch ein indirektes, in der Universitätsmedizin Mainz etabliertes Messverfahren, der BCS-Methode nach Böhm, wurde die ADAMTS13 Aktivität über die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität errechnet. Außerdem wurden zwei auf Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer beruhende Kits, das Technozym[®]ADAMTS13 Kit und das Actifluor[™]ADAMTS13 Kit, eingesetzt. Für die Bestimmung des ADAMTS13 Antigen wurde sowohl das schon für die Aktivität verwendete Technozym[®]ADAMTS13 Kit als auch ein reines Antigen Kit, der Imubind[®]ELISA angewendet. Mittels der SDS- Agarosegelelektrophorese konnten die VWF Multimere dargestellt werden.

Die Untersuchungen konnten zeigen, dass in nur einem Faktorkonzentrat, Haemate[®]P, deutlich höhere ADAMTS13 Aktivitäten sowie ein hohes ADAMTS13 Antigen vorlagen. Während das Antigen bei allen Messmethoden im physiologischen Bereich vorzufinden war, gab es bei der Aktivitätsbestimmung deutliche Diskrepanzen. So wurde bei Technozym[®]ADAMTS13 ein durchschnittlicher Wert von 12,3 % und damit im niedrigen Aktivitätsbereich ermittelt, bei Actifluor[™]ADAMTS13 mit 470 ng/ml (entspricht 65 %) hingegen im Normbereich. Die anderen Faktorkonzentrate wiesen entweder nur sehr geringe Aktivitäten auf oder sogar gar keine. Das Antigen lag bei allen Konzentraten im nachweisbaren Bereich und damit sind in allen Faktorkonzentraten Spuren von ADAMTS13 enthalten, wenn sie auch nicht immer eine Aktivität aufweisen. In der SDS- Gelelektrophorese konnten die typischen Tripletstrukturen des VWF aufgezeigt und darüber hinaus auch UL VWF Multimere nachgewiesen werden. Antikörper gegen ADAMTS13 waren nicht nachweisbar. Anhand der Ergebnisse ist ein Einsatz von Haemate[®]P, als einziges der untersuchten Gerinnungsfaktorkonzentrate, bei der Therapie der TTP in Erwägung zu ziehen und innerhalb der Klinik zu testen. Insbesondere bei hereditären TTP Formen sowie bei Kindern, die durch eine Plasmapherese sehr stark belastet werden, und bei Schwangeren, könnten eventuell mit der Gabe von Haemate[®]P gute Ergebnisse erzielt werden.

Die Plasmapräparate FFP und Octaplas[®] wiesen in allen Untersuchungen ADAMTS13 Aktivitäten im mittleren bis hohen physiologischen Bereich auf, wobei Octaplas[®] leicht höhere Werte anzeigte. Das ADAMTS13 Antigen lag bei der Messung mit Technozym[®]ADAMTS13 für beide Präparate im hohen physiologischen Bereich, für Imubind[®]ELISA hingegen konnte nur Octaplas[®] Normwerte aufweisen. FFP maß bei drei von vier Blutgruppen Werte knapp unter der physiologischen Untergrenze. Unterschiede zwischen den Blutgruppen hinsichtlich ihrer ADAMTS13 Aktivität und Antigen waren auszumachen. Insbesondere bei Blutgruppe 0 ließ sich beiden Präparaten eine höhere ADAMTS13 Aktivität und Antigen gegenüber den drei anderen Blutgruppen darstellen.

Insgesamt waren die interindividuellen Schwankungen bei FFP deutlich höher als bei Octaplas[®], was sich in der unterschiedlichen Herstellung der Präparate aus Einzelspenderplasma gegenüber gepooltem Plasma begründen lässt. UL VWF Multimere waren in allen Proben nachweisbar, wenn auch in unterschiedlich starker Konzentration. Antikörper waren wie bei den Konzentraten nicht nachweisbar. Octaplas[®] ist also genauso geeignet zur Plasmapherese bei der TTP wie FFP, kann jedoch aufgrund seiner intensiveren Virusinaktivierung eine größere Sicherheit aufweisen und stellt sich auch in der Klinik als nebenwirkungsärmer dar.

Bei der Gegenüberstellung der thrombotischen Mikroangiopathien konnte gezeigt werden, dass eine verminderte ADAMTS13 Aktivität ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist und, im Gegensatz zu den anderen thrombotischen Mikroangiopathien, auch während der Remission schon diagnostizierbar werden kann. Auf der Grundlage der labordiagnostischen Werte und dem klinischen Erscheinungsbild im akuten Schub und in der Remission konnte ein diagnostischer Algorithmus für den klinischen Alltag erstellt werden, indem die ADAMTS13 Aktivität und die UL VWF Multimere zentrale Punkte sind.

Hinsichtlich der ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung erwies sich in der Methodvalidierung der Actifluor[™]ADAMTS13 Kit als der beste, da er innerhalb kürzester Zeit zuverlässige Werte in Standardeinheiten liefert. Nach neuesten Erkenntnissen, bei der eine Unterscheidung von ADAMTS13 Aktivitäten über und unter 5 % von großer prognostischer Bedeutung sind [49], ist die BCS-Methode nach Böhm mit einer unteren Nachweisgrenze von 6,2 % zu ungenau und auch hinsichtlich ihres Zeitaufwandes eher ungünstig. Bei Laboratorien, die sowohl ADAMTS13 Aktivität als auch das Antigen bestimmen möchten, bietet sich die Technozym[®]ADAMTS13 Methode an.

6 Summary

In 1996 Furlan et al. [21] and Tsai [59] discovered both coincidentally the protease ADAMTS13 during their studies on the disease of TTP. A low activity or the total absence of this protein is the cause of TTP. Whereas slightly low activity of ADAMTS13 is discussed to be the reason of juvenile strokes and cardiovascular incidences. The studies concerning ADAMTS13 are in the very beginning.

In this paper you can read about six different batches of VWF / FVIII blood clotting factors concentrates.

The concentrates containing three VWF / FVIII blood clotting factors (Haemate[®]P, Immunate STIM plus and Wilate[®]), one pure VWF concentrate (Wilfactin[®]), one pure concentrate of factor VIII (Beriate[®]P) and a recombinant concentrate of factor VIII (Kogenate[®]) were especially vetted of their ADAMTS13 activity, antigen and VWF multimer. Reason for that is the hypothesis that during the process for concentrating diluted VWF the amount of the protein ADAMTS13, too, increases. Due to his hypothesis one might use the very same concentrates to treat TTP.

Also a testing of FFP and s/d plasma, which is regarded as a gold standard by treating TTP, took place. Only with the exact knowing of the ADAMTS13 activity including its antigen and the multimer structure of VWF alternative treatment methods can be found. Additionally this testing can show differences in quality of the compounds as well as the impact of different blood types on ADAMTS13 activity and antigen. In to the bargain ADAMTS13 was tested as a diagnostic sign for patients with thrombotic microangiopathies.

Due to this an algorithm should be found for patients who suffer HUS; TTP-like syndromes and TTP with and without antibodies.

All methods for measurements are proved on critically as well as the comparison to each other and the suitability for diagnostics in everyday life.

Three different methods for ADAMTS13 activity were used. Number one is a direct measurement method which is well established in Mainz and called BCS-Method according to Boehm. Here one can calculate the ADAMTS13 activity with the help of the Ristocetin-Cofactor-activity. Test number two and three were both test concerning fluorescence resonance energy transfer. The kits therefore used are called Technozym[®]ADAMTS13 Kit and Actiflour[™]ADAMTS13 Kit. For testing the activity of ADAMTS13 antigen two kits were used: Technozym[®]ADAMT13 and Imubind[®]ELISA. By using SDS-Agaroses gel electrophoresis VWF multimers were detected.

The testing showed that only in Haemate[®]P a higher activity of ADAMST13 and its antigen exist. In all measurements the antigen was found in physiologic quantities, but not so for the activity. Technozyme[®]ADAMTS13 had a mean score of 12.3 %. This means a very low activity. Actiflour[™]ADAMTS13 has an average value of 470 ng/ml which equals 65.0 %. This parameter is normal range. The other factor concentrates show no or only little activity. The antigen could be detected in all samples which mean ADAMST13 can be found as well, though they do not show activity. Using the gel electrophoresis one could find the typical triplet structure of VWF and UL VWF multimeres as well. There was no prove of ADAMTS13 antibodies. To sum up one can say that Haemate[®]P is the only concentrate which can probably be tested in the diagnostics and therapy of TTP. Haemate[®]P could be used by children, who suffer under the procedure of plasmapheresis or during pregnancy.

FFP and Octaplas[®] showed in all examinations ADAMTS13 activity in an average to high amount. Octaplas[®] was slightly higher. Both preparations showed by using Technozyme[®]ADAMTS13 a high physiological range. By using Imubind[®]ELISA only Octaplas[®] could show standard values. FFP was able to be measured three very low mean values out of four blood types. Also a difference within blood types concerning the activity of ADAMTS13 and its antigen could be found. Especially type 0 shows a higher activity and more antigens than the other blood types. The fluctuations between individuals by using FFP were higher than with Octaplas[®]. The reason can be found by the process of making the preparations. One is made out of pooled blood plasma whereas the other products is made out of blood of an individual donor. UL VWF multimers could be found in every sample and in different concentrations. Octaplas[®] is as suitable for the treatment of TTP as FFP. It even is safer as far as its inactivation of viruses is concerned and it shows less side effects.

In the comparison of thrombotic microangiopathies one could prove that the decreased activity of ADAMTS13 is an important distinguishing feature and it can be detected even during the remission. Based on the diagnostic parameters and clinical features an algorithm could be established in which ADAMTS13 activity and UL VWF multimers are the key issue.

Work was best by using Actiflour[®]ADAMTS13 for several reasons. Firstly the validation of ADAMTS13 activity took only little time and secondly the results were presented in standard units. According to recent findings the BCS-Method becomes too imprecise when the ADAMTS13 activity differs more than 5 % [49]. The detection limit is 6.2 %, which is very poor and it takes too much time. Laboratories who want to test on ADAMTS13 activity as well as on its antigen one can recommend Technozym[®]ADAMTS13.

7 Literaturverzeichnis

1. Achner H: Ärzte in der Antike. 1. Auflage. Mainz am Rhein: Philipp von Zabern Verlag; 2009.
2. Moschowitz E: Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. Proc NY Pathol Soc 1924, 24:21-24.
3. Amorosi EL, Ultmann JE: Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of literature. Medicine (Baltimore) 1966, 45:139-159.
4. Kremer Hovinga JA, Mottini M, Lammler B: Measurement of ADAMTS-13 activity in plasma by the FRETs-VWF73 assay: comparison with other assay methods. J Thromb Haemost 2006, 4(5):1146-1148.
5. Byrnes JJ, Khurana M: Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with plasma. N Engl J Med 1977, 297:1386-1389.
6. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, Spasoff RA: Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. N Engl J Med 1991, 325(6):393-397.
7. Steinemann S: Nebenwirkungen der Plasmapherese bei der TTP. [Dissertation]. Mainz: Universitätsklinik, III Medizinische Klinik und Poliklinik; noch unveröffentlicht.
8. Scully M, Longair I, Flynn M, Berryman J, Machin SJ: Cryosupernatant and solvent detergent fresh-frozen plasma (Octaplas) usage at a single centre in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. Vox Sang 2007, 93(2):154-158.
9. Barthels M, von Depka M: Das Gerinnungskompandium. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2003.
10. Brackmann HH, Schwaab R, Oldenburg J, Schramm W: Klinische Anwendung plasmatischer und rekombinanter Gerinnungsfaktoren. 1. Auflage. Bremen London New York: UNI-MED Verlag AG; 2003.
11. Kurnik K, Bidlingmaier C: Gerinnungsstörungen im Kindesalter. Diagnostik und Therapie.: Ligatur; 2008.
12. Lackner KJ, Peetz D: Hämostaseologie. In Integrative Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin: Pathophysiologie, Pathobiochemie, Hämatologie. Edited by Renz H. Berlin, New York: Walter de Gruyter; 2003.
13. Thews G, Mutschler E, Vaupel P: Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen. 5. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH 1999.

14. Clauss W, Clauss C: Humanbiologie kompakt. 1. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
15. Estler CJ, Schmidt HG: Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2007.
16. Ahrens I, Lip GY, Peter K: New oral anticoagulant drugs in cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 2010, 104(1):49-60.
17. Paulinska P, Spiel A, Jilma B: Role of von Willebrand factor in vascular disease. *Hamostaseologie* 2009, 29(1):32-38.
18. Ruggeri ZM: Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001, 14(2):257-279.
19. Ruggeri ZM: Von Willebrand factor. *Curr Opin Hematol* 2003, 10(2):142-149.
20. Sadler JE: Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998, 67:395-424.
21. Furlan M, Robles R, Lammle B: Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996, 87(10):4223-4234.
22. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE: Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996, 88(8):2939-2950.
23. Ginsburg D, Handin RI, Bonthron DT, Donlon TA, Bruns GA, Latt SA, Orkin SH: Human von Willebrand factor (vWF): isolation of complementary DNA (cDNA) clones and chromosomal localization. *Science* 1985, 228(4706):1401-1406.
24. Schneppenheim R, Budde U: Von-Willebrand-Faktor und ADAMTS13. In *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. 2. Auflage. Edited by Pötzsch B, Madlener K. Heidelberg: Springer Verlag; 2009.
25. Tsai HM: Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 2010, 91(1):1-19.
26. Zheng XL, Sadler JE: Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol* 2008, 3:249-277.
27. Wagner DD: Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990, 6:217-246.
28. Schneppenheim R, Budde U: Von-Willebrand-Erkrankung. In *Hämostaseologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*. Edited by Pötzsch B, Madlener K. Heidelberg: Springer Verlag; 2009.
29. Schneppenheim R, Budde U: [Inborn and acquired von Willebrand disease]. *Hamostaseologie* 2008, 28(5):312-319.

30. Budde U, Drewke E, Will K, Schneppenheim R: [Diagnostic standards of von Willebrand disease]. *Hamostaseologie* 2004, 24(1):12-26.
31. Michiels JJ, Berneman Z, Gadisseur A, van der Planken M, Schroyens W, van de Velde A, van Vliet H: Classification and characterization of hereditary types 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2M, 2N, and 2U (unclassifiable) von Willebrand disease. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006, 12(4):397-420.
32. Schneppenheim R, Budde U: [Classification of von Willebrand disease]. *Hamostaseologie* 2004, 24(1):27-36.
33. Sadler JE: A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost* 1994, 71(4):520-525.
34. Wahlberg T, Blombäck M, Hall P, Axelsson G: Application of Indicators, Predictors and Diagnostic Indices in Coagulation Disorders. *Meth Inform Med* 1980, 19(4):194-200.
35. Silwer J: von Willebrand's disease in Sweden. *Acta Paediatr* 1973, 283:1-159.
36. Klatter W: Von-Willebrand-Syndrom. Edited by Hämophilie Portal: www.haemophilieportal.de; 2007.
37. Mazurier C: von Willebrand disease masquerading as haemophilia A. *Thromb Haemost* 1992, 67(4):391-396.
38. Von Depka Prondzinski M: Patienteninformation zu dem von Willebrand Syndrom . Edited by Werlhof-Institute: www.werlhof-institute.de; 2010.
39. Scharrer I: persönliche Mitteilungen. Mainz; 2010 - 2011.
40. Patzke J, Schneppenheim R: Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. *Hamostaseologie* 2010, 30(4):203-206.
41. Gadisseur A, Hermans C, Berneman Z, Schroyens W, Deckmyn H, Michiels JJ: Laboratory diagnosis and molecular classification of von Willebrand disease. *Acta Haematol* 2009, 121(2-3):71-84.
42. Mannucci PM: Desmopressin (DDAVP) for treatment of disorders of hemostasis. *Prog Hemost Thromb* 1986, 8:19-45.
43. Lusher JM: Response to 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in von Willebrand disease. *Haemostasis* 1994, 24(5):276-284.
44. Federici AB, Mazurier C, Berntorp E, Lee CA, Scharrer I, Goudemand J, Lethagen S, Nitu I, Ludwig G, Hilbert L et al: Biologic response to desmopressin in patients with severe type 1 and type 2 von Willebrand disease: results of a multicenter European study. *Blood* 2004, 103(6):2032-2038.

45. Santagostino E, Mannucci PM, Bianchi Bonomi A: Guidelines on replacement therapy for haemophilia and inherited coagulation disorders in Italy. *Haemophilia* 2000, 6(1):1-10.
46. Battle J, Noya MS, Giangrande P, Lopez-Fernandez MF: Advances in the therapy of von Willebrand disease. *Haemophilia* 2002, 8(3):301-307.
47. Zheng XL, Kaufman RM, Goodnough LT, Sadler JE: Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and nonidiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2004, 103(11):4043-4049.
48. Zhou W, Dong L, Ginsburg D, Bouhassira EE, Tsai HM: Enzymatically active ADAMTS13 variants are not inhibited by anti-ADAMTS13 autoantibodies: a novel therapeutic strategy? *J Biol Chem* 2005, 280(48):39934-39941.
49. Kremer-Hovinga JA: persönliche Mitteilung. Bern; 2011.
50. Crawley JT, Lam JK, Rance JB, Mollica LR, O'Donnell JS, Lane DA: Proteolytic inactivation of ADAMTS13 by thrombin and plasmin. *Blood* 2005, 105(3):1085-1093.
51. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K: Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem* 2001, 276(44):41059-41063.
52. Studt JD: [Thrombotic microangiopathies]. *Hamostaseologie* 2008, 28(5):358-364.
53. Manea M, Kristoffersson A, Schneppenheim R, Saleem MA, Mathieson PW, Morgelin M, Bjork P, Holmberg L, Karpman D: Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007, 138(5):651-662.
54. Turner N, Nolasco L, Tao Z, Dong JF, Moake J: Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS-13. *J Thromb Haemost* 2006, 4(6):1396-1404.
55. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Ashida S, Soejima K, Okada Y, Ikeda Y: Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 313(1):212-216.
56. Shelat SG, Ai J, Zheng XL: Molecular biology of ADAMTS13 and diagnostic utility of ADAMTS13 proteolytic activity and inhibitor assays. *Semin Thromb Hemost* 2005, 31(6):659-672.
57. Coppo P, Veyradier A: Thrombotic microangiopathies: towards a pathophysiology-based classification. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2009, 9(1):36-50.

58. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL, Deykin D: Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982, 307(23):1432-1435.
59. Tsai HM: Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood* 1996, 87(10):4235-4244.
60. Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Lammle B: Acquired deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1998, 91(8):2839-2846.
61. Furlan M, Robles R, Galbusera M, Remuzzi G, Kyrle PA, Brenner B, Krause M, Scharrer I, Aumann V, Mittler U et al: von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998, 339(22):1578-1584.
62. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, Yang AY, Siemieniak DR, Stark KR, Gruppo R et al: Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature* 2001, 413(6855):488-494.
63. Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, Antoine G, Kerschbaumer R, Jenab P, Furlan M, Gerritsen H, Lammle B, Schwarz HP et al: Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* 2002, 100(10):3626-3632.
64. Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K: Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res* 1985, 38(5):469-479.
65. Sadler JE: Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2008, 112(1):11-18.
66. Hellmann M, Hallek M, Scharrer I: [Thrombotic-thrombocytopenic purpura]. *Internist (Berl)* 2010, 51(9):1136, 1138-1144.
67. Kiss JE: Thrombotic thrombocytopenic purpura: recognition and management. *Int J Hematol* 2010, 91(1):36-45.
68. Lotta LA, Garagiola I, Palla R, Cairo A, Peyvandi F: ADAMTS13 mutations and polymorphisms in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hum Mutat* 2010, 31(1):11-19.
69. Allford SL, Hunt BJ, Rose P, Machin SJ: Guidelines on the diagnosis and management of the thrombotic microangiopathic haemolytic anaemias. *Br J Haematol* 2003, 120(4):556-573.

70. Henon P: [Treatment of thrombotic thrombopenic purpura. Results of a multicenter randomized clinical study]. *Presse Med* 1991, 20(36):1761-1767.
71. Kremer Hovinga JA, Studt JD, Demarmels Biasiutti F, Solenthaler M, Alberio L, Zwicky C, Fontana S, Taleghani BM, Tobler A, Lammle B: Splenectomy in relapsing and plasma-refractory acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica* 2004, 89(3):320-324.
72. Fakhouri F, Vernant JP, Veyradier A, Wolf M, Kaplanski G, Binaut R, Rieger M, Scheiflinger F, Poullin P, Deroure B et al: Efficiency of curative and prophylactic treatment with rituximab in ADAMTS13-deficient thrombotic thrombocytopenic purpura: a study of 11 cases. *Blood* 2005, 106(6):1932-1937.
73. Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lammle B, George JN: Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2010, 115(8):1500-1511; quiz 1662.
74. Peyvandi F, Lavoretano S, Palla R, Feys HB, Vanhoorelbeke K, Battaglioli T, Valsecchi C, Canciani MT, Fabris F, Zver S et al: ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 antibodies as markers for recurrence of acquired thrombotic thrombocytopenic purpura during remission. *Haematologica* 2008, 93(2):232-239.
75. Hoppe JD, Scriba PC, Klüter H: Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. In 4. Auflage. Edited by Bundesärztekammer. Deutschland; 2008.
76. Schramm W, Royal S, Kroner B, Berntorp E, Giangrande P, Ludlam C, Gringeri A, Berger K, Szucs T: Clinical outcomes and resource utilization associated with haemophilia care in Europe. *Haemophilia* 2002, 8(1):33-43.
77. Royal S, Schramm W, Berntorp E, Giangrande P, Gringeri A, Ludlam C, Kroner B, Szucs T: Quality-of-life differences between prophylactic and on-demand factor replacement therapy in European haemophilia patients. *Haemophilia* 2002, 8(1):44-50.
78. Barthels M, Oldenburg J: [Clotting factor concentrates]. *Hamostaseologie* 2008, 28(5):387-399.
79. Barthels M: Clinical efficacy of prothrombin complex concentrates and recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding episodes in patients with factor VII and IX inhibitors. *Thromb Res* 1999, 95(4 Suppl 1):S31-38.
80. Sanchez JC, Appel RD, Golaz O, Pasquali C, Ravier F, Bairoch A, Hochstrasser DF: Inside SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis* 1995, 16(7):1131-1151.
81. Cohn EJ, Strong LE, et al.: Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946, 68:459-475.

82. Gröner A, Konrad M (Eds.): Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen - Therapie - Methodik. 4. Auflage edition. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag; 2011.
83. Hellstern P, Seyfert UT: Rationelle Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten. 2. Auflage. Bremen, London, New York: UNI-MED Verlag AG; 2005.
84. Solheim BG, Rollag H, Svennevig JL, Arafa O, Fosse E, Bergerud U: Viral safety of solvent/detergent-treated plasma. *Transfusion* 2000, 40(1):84-90.
85. Conradi R (Transfusionsmedizin): persönliche Mitteilung. Mainz; 2010.
86. Hellstern P, Haubelt H: Manufacture and composition of fresh frozen plasma and virus-inactivated therapeutic plasma preparations: correlation between composition and therapeutic efficacy. *Thromb Res* 2002, 107 Suppl 1:S3-8.
87. Hellstern P: Solvent/detergent-treated plasma: composition, efficacy, and safety. *Curr Opin Hematol* 2004, 11(5):346-350.
88. Edel E, Al-Ali HK, Seeger S, Kauschat D, Matthes G: Efficacy and Safety Profile of Solvent/Detergent Plasma in the Treatment of Acute Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Single-Center Experience. *Transfus Med Hemother* 2010, 37(1):13-19.
89. Franken T (Produktmanager Intensivmedizin): persönliche Mitteilung. Langenfeld: Octapharma GmbH; 2010.
90. Bukh A, Ingerslev J, Stenbjerg S, Moller NP: The multimeric structure of plasma F VIII:RAg studied by electroelution and immunoperoxidase detection. *Thromb Res* 1986, 43(5):579-584.
91. Bohm M, Vigh T, Scharrer I: Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13). *Ann Hematol* 2002, 81(8):430-435.
92. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T: FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol* 2005, 129(1):93-100.
93. Technoclone: Technozym ADAMTS13.
94. Zhang L, Lawson HL, Harish VC, Huff JD, Knovich MA, Owen J: Creation of a recombinant peptide substrate for fluorescence resonance energy transfer-based protease assays. *Anal Biochem* 2006, 358(2):298-300.
95. invitrogen. Portal: <http://www.invitrogen.com>. 2010-2011.
96. Guinto E: persönliche Mitteilung. USA: American Diagnostica. 2010.
97. American Diagnostica: Mitteilungen der Firma. 2010-2011.
98. Böhm M: Ein neuartiges Verfahren für den Nachweis der Von Willebrand Faktor-spaltenden Proteaseaktivität von ADAMTS-13 und dessen klinische Anwendung

- bei Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura (TTP) und bei Patienten mit anderen Erkrankungen. [Dissertation]. Johann Wolfgang Goethe-Universität Biologie und Informatik; 2004.
99. Neugebauer M, Rücker G: Bewertung von Analysemethoden. In instrumenteller pharmazeutischer Analytik. Edited by Neugebauer M, Rücker, G, Willems G. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 2001.
 100. Passing H, Bablok W: A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I Clin Chem Clin Biochem 1983, 21:709-720.
 101. Institute CLSI: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. In Second Edition. ISBN: 1-56238-472-4; 2010.
 102. Kny L, Beyrich I, Göber B: Lehrbuch der Arzneimittelkontrolle. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit; 1983.
 103. Portal: www.analytik.de.12/2010.
 104. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA: Pathogenesis and treatment of acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. Haematologica 2010, 95(9):1444-1447.
 105. Studt JD, Bohm M, Budde U, Girma JP, Varadi K, Lammle B: Measurement of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) activity in plasma: a multicenter comparison of different assay methods. J Thromb Haemost 2003, 1(9):1882-1887.
 106. Bongers TN, de Bruijne EL, Dippel DW, de Jong AJ, Deckers JW, Poldermans D, de Maat MP, Leebeek FW: Lower levels of ADAMTS13 are associated with cardiovascular disease in young patients. Atherosclerosis 2009, 207(1):250-254.
 107. Nowak-Gottl U, Lambers M, Thedieck S, Manner D, Mesters RM, Junker R, Stoll M: Impact of Reduced Von Willebrand Factor-Cleaving Protease [ADAMTS13] In Pediatric Stroke: A Nested Case-Control Study. In ASH. Orlando; 2010.
 108. Heger A, Kannicht C, Romisch J, Svae TE: Normal levels of ADAMTS13 and factor H are present in the pharmaceutically licensed plasma for transfusion (Octaplas) and in the universally applicable plasma (Uniplas) in development. Vox Sang 2007, 92(3):206-212.
 109. Feys HB, Liu F, Dong N, Pareyn I, Vauterin S, Vandeputte N, Noppe W, Ruan C, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K: ADAMTS-13 plasma level determination uncovers antigen absence in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura and ethnic differences. J Thromb Haemost 2006, 4:955-962.
 110. Liu F, Feys HB, Dong N, Zhao Y, Ruan C: Alteration of ADAMTS13 antigen levels in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura, idiopathic

- thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. *Thromb Haemost* 2006, 95(4):749-750.
111. Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, Miyata T: VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood* 2004, 103(2):607-612.
 112. Mahdian R, Rayes J, Girma JP, Houllier A, Obert B, Meyer D, Veyradier A: Comparison of FRET-S-VWF73 to full-length VWF as a substrate for ADAMTS13 activity measurement in human plasma samples. *Thromb Haemost* 2006, 95(6):1049-1051.
 113. Crist RA, Rodgers GM: A Comparison of Two Commercial ADAMTS13 Activity Assays With a Reference Laboratory Method. *LABMEDICINE* 2009, 40(4):232-235.
 114. Zhuang X, Ha T, Kim HD, Centner T, Labeit S, Chu S: Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(26):14241-14244.
 115. Rock G, Yousef H, Neurath D, Lu M: ADAMTS-13 levels in fresh, stored, and solvent detergent treated plasma. *Transfus Apher Sci* 2006, 35(3):235-238.
 116. Lam JK, Chion CK, Zanardelli S, Lane DA, Crawley JT: Further characterization of ADAMTS-13 inactivation by thrombin. *J Thromb Haemost* 2007, 5(5):1010-1018.
 117. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ: ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2010, 8(4):631-640.
 118. Studt JD, Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheifflinger F, Lammle B: Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood* 2005, 105(2):542-544.
 119. Eckmann CM, De Laaf RT, Van Keulen JM, Van Mourik JA, De Laat B: Bilirubin oxidase as a solution for the interference of hyperbilirubinemia with ADAMTS-13 activity measurement by FRET-S-VWF73 assay. *J Thromb Haemost* 2007, 5(6):1330-1331.
 120. Meyer SC, Sulzer I, Lammle B, Kremer Hovinga JA: Hyperbilirubinemia interferes with ADAMTS-13 activity measurement by FRET-S-VWF73 assay: diagnostic relevance in patients suffering from acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost* 2007, 5(4):866-867.
 121. Smirnov M: persönliche Mitteilung. Stamford; 2010-2011.

122. Geiter S, Tschokert E, Graf M, Vetr H, Dockal M, Scheiflinger F, Binder BR, Wagner L: Correlation between two ADAMTS-13 activity assays based on different principles. In GTH. Wiesbaden: Technoclone; 2011.
123. Ermens AA, de Wild PJ, Vader HL, van der Graaf F: Four agglutination assays evaluated for measurement of von Willebrand factor (ristocetin cofactor activity). *Clin Chem* 1995, 41(4):510-514.
124. Falter T, Qorraj M, Steinemann S, Vigh T, Dannhardt G, Lackner KJ, Scharrer I: Vergleich von Methoden zur Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität. In 7 Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Edited by Falter T. Mannheim; 2010.
125. Allford SL, Harrison P, Lawrie AS, Liesner R, MacKie IJ, Machin SJ: Von Willebrand factor--cleaving protease activity in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2000, 111(4):1215-1222.
126. Falter T, Qorraj M, Steinemann S, Vigh T, Scharrer I: Evaluation of clotting factor concentrates for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. In American Society of Hematology, Blood. Edited by Falter T. Orlando, USA; 2010.
127. Vigh T: persönliche Mitteilung. Mainz; 2010 - 2011.
128. Spannagl M, Moessmer G: [Global tests of haemostasis]. *Hamostaseologie* 2006, 26(1):27-37.
129. Raife TJ, Cao W, Atkinson BS, Bedell B, Montgomery RR, Lentz SR, Johnson GF, Zheng XL: Leukocyte proteases cleave von Willebrand factor at or near the ADAMTS13 cleavage site. *Blood* 2009, 114(8):1666-1674.
130. Baldauf C, Schneppenheim R, Stacklies W, Obser T, Pieconka A, Schneppenheim S, Budde U, Zhou J, Gräter F: Shear-induced unfolding activates von Willebrand factor A2 domain for proteolysis. *J Thromb Haemost* 2009, 7(12):2096-2105.
131. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA: ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002, 100(12):4033-4039.
132. Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fujimura Y: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion* 2006, 46(8):1444-1452.
133. Tsai HM: Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14(4):1072-1081.
134. Starke R, Machin S, Scully M, Purdy G, Mackie I: The clinical utility of ADAMTS13 activity, antigen and autoantibody assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2007, 136(4):649-655.

135. Feys HB, Canciani MT, Peyvandi F, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K, Mannucci PM: ADAMTS13 activity to antigen ratio in physiological and pathological conditions associated with an increased risk of thrombosis. *Br J Haematol* 2007, 138(4):534-540.
136. Feys HB, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K: ADAMTS13 in health and disease. *Acta Haematol* 2009, 121(2-3):183-185.
137. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, Tamai H, Konno M, Kamide K, Kawano Y et al: Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(18):11902-11907.
138. Miura M, Kaikita K, Matsukawa M, Soejima K, Fuchigami S, Miyazaki Y, Ono T, Uemura T, Tsujita K, Hokimoto S et al: Prognostic value of plasma von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) antigen levels in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2010, 103(3):623-629.
139. Liu F, Feys HB, Dong NZ, Bai X, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Ruan CG: [Determination of the ADAMTS13 antigen and its activity in TTP patients and carriers]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2006, 27(3):154-157.
140. Rieger M, Ferrari S, Kremer Hovinga JA, Konetschny C, Herzog A, Koller L, Weber A, Remuzzi G, Dockal M, Plaimauer B et al: Relation between ADAMTS13 activity and ADAMTS13 antigen levels in healthy donors and patients with thrombotic microangiopathies (TMA). *Thromb Haemost* 2006, 95(2):212-220.
141. Sarig G, Dann EJ, Tennenbaum G, Rowe JM, Brenner B: ADAMTS-13 activity, antigen and inhibitor antibodies in TTP patients - a single center experience. In *ASH*. Edited by Sarig G. Orlando; 2010.
142. Lammler B, Kremer Hovinga JA: A new tool to further explore the role of ADAMTS-13 in health and disease. *J Thromb Haemost* 2006, 4(5):952-954.
143. Kobayashi T, Wada H, Nishioka N, Yamamoto M, Matsumoto T, Tamaru T, Nomura S, Masuya M, Mori Y, Nakatani K et al: ADAMTS13 related markers and von Willebrand factor in plasma from patients with thrombotic microangiopathy (TMA). *Thromb Res* 2008, 121(6):849-854.
144. Shelat SG, Smith P, Ai J, Zheng XL: Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo. *J Thromb Haemost* 2006, 4(8):1707-1717.
145. Scully M: Inhibitory anti-ADAMTS 13 antibodies: measurement and clinical application. *Blood Rev* 2010, 24(1):11-16.

146. Brandis A, Karch H, Zimmerhackl LB, Verweyen H, Gerber A: Das hämolytisch-urämische Syndrom. *Deutsche Ärzteblatt* 2002, 99 (4):196-203.
147. Remuzzi G: Is ADAMTS-13 deficiency specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? No. *J Thromb Haemost* 2003, 1(4):632-634.
148. Bianchi V, Robles R, Alberio L, Furlan M, Lammle B: Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2002, 100(2):710-713.
149. Tsai HM: Is severe deficiency of ADAMTS-13 specific for thrombotic thrombocytopenic purpura? Yes. *J Thromb Haemost* 2003, 1(4):625-631.
150. Veyradier A, Brivet F, Wolf M, Boyer-Neumann C, Obert B, Girma JP, Meyer D: Total deficiency of specific von Willebrand factor-cleaving protease and recovery following plasma therapy in one patient with hemolytic-uremic syndrome. *Hematol J* 2001, 2(5):352-354.
151. Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP: Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 2001, 98(6):1765-1772.
152. Remuzzi G, Galbusera M, Noris M, Canciani MT, Daina E, Bresin E, Contaretti S, Caprioli J, Gamba S, Ruggenenti P et al: von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13) is deficient in recurrent and familial thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Blood* 2002, 100(3):778-785.
153. Veyradier A, Obert B, Haddad E, Cloarec S, Nivet H, Foulard M, Lesure F, Delattre P, Lakhdari M, Meyer D et al: Severe deficiency of the specific von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS 13) activity in a subgroup of children with atypical hemolytic uremic syndrome. *J Pediatr* 2003, 142(3):310-317.
154. Hunt BJ, Lammle B, Nevard CH, Haycock GB, Furlan M: von Willebrand factor-cleaving protease in childhood diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Thromb Haemost* 2001, 85(6):975-978.
155. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, Lussana F, Lattuada A, Rossi E: Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001, 98(9):2730-2735.
156. Moore JC, Hayward CP, Warkentin TE, Kelton JG: Decreased von Willebrand factor protease activity associated with thrombocytopenic disorders. *Blood* 2001, 98(6):1842-1846.
157. Loof AH, van Vliet HH, Kappers-Klunne MC: Low activity of von Willebrand factor-cleaving protease is not restricted to patients suffering from thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2001, 112(4):1087-1088.

158. Hanson E, Jood K, Nilsson S, Blomstrand C, Jern C: Association between genetic variation at the ADAMTS13 locus and ischemic stroke. *J Thromb Haemost* 2009, 7(12):2147-2148.
159. Zhao BQ, Chauhan AK, Canault M, Patten IS, Yang JJ, Dockal M, Scheiflinger F, Wagner DD: von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. *Blood* 2009, 114(15):3329-3334.
160. Gerth J, Busch M, Oyen F, Schneppenheim R, Keller T, Budde U, Groene HJ, Wolf G: Thrombotic microangiopathy in a 17-year-old patient: TTP, HUS or a bit of both? *Clin Nephrol* 2007, 68(6):405-411.
161. Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, Lammle B, Furlan M: Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost* 1999, 82(5):1386-1389.
162. Moake JL: Moschcowitz, multimers, and metalloprotease. *N Engl J Med* 1998, 339(22):1629-1631.
163. Moake JL: Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 2002, 126(11):1430-1433.
164. Furlan M, Lammle B: Assays of von Willebrand factor-cleaving protease: a test for diagnosis of familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Semin Thromb Hemost* 2002, 28(2):167-172.
165. Tsai HM, Chandler WL, Sarode R, Hoffman R, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Wong CS, Williams GD, Tarr PI: von Willebrand factor and von Willebrand factor-cleaving metalloprotease activity in *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 2001, 49(5):653-659.
166. Banno F, Kokame K, Okuda T, Honda S, Miyata S, Kato H, Tomiyama Y, Miyata T: Complete deficiency in ADAMTS13 is prothrombotic, but it alone is not sufficient to cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2006, 107(8):3161-3166.
167. Moschcowitz E: An acute febrile pleiochromic anemia with hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries; an undescribed disease. *Am J Med* 1952, 13(5):567-569.
168. Klukowska A, Niewiadomska E, Budde U, Oyen F, Schneppenheim R: Difficulties in diagnosing congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol* 2010, 32(2):103-107.
169. Camilleri RS, Cohen H, Mackie IJ, Scully M, Starke RD, Crawley JT, Lane DA, Machin SJ: Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 2008, 6(2):331-338.

170. Mori Y, Wada H, Gabazza EC, Minami N, Nobori T, Shiku H, Yagi H, Ishizashi H, Matsumoto M, Fujimura Y: Predicting response to plasma exchange in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura with measurement of vWF-cleaving protease activity. *Transfusion* 2002, 42(5):572-580.
171. George JN: How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood* 2010, 116(20):4060-4069.
172. Kaplan BS, Meyers KE, Schulman SL: The pathogenesis and treatment of hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 1998, 9(6):1126-1133.
173. Fontana S, Kremer Hovinga JA, Lammle B, Mansouri Taleghani B: Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang* 2006, 90(4):245-254.
174. Yarranton H, Lawrie AS, Purdy G, Mackie IJ, Machin SJ: Comparison of von Willebrand factor antigen, von Willebrand factor-cleaving protease and protein S in blood components used for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Med* 2004, 14(1):39-44.
175. McLeod BC: Therapeutic apheresis: history, clinical application, and lingering uncertainties. *Transfusion* 2010, 50(7):1413-1426.
176. Altuntas F, Aydogdu I, Kabukcu S, Kocyigit I, Cikim K, Sari I, Erkut MA, Eser B, Ozturk A, Kaya E et al: Therapeutic plasma exchange for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura: a retrospective multicenter study. *Transfus Apher Sci* 2007, 36(1):57-67.
177. Hellstern P: Fresh-frozen plasma, pathogen-reduced single-donor plasma or biopharmaceutical plasma? *Transfus Apher Sci* 2008, 39(1):69-74.
178. Octapharma® GmbH o: octoplas® LG verträglich und effektiv. GTH, Wiesbaden. 2011.
179. Doyle S, O'Brien P, Murphy K, Fleming C, O'Donnell J: Coagulation factor content of solvent/detergent plasma compared with fresh frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003, 14(3):283-287.
180. Roush KS, Hillyer KL, Barclay S, Kelley VA, Duncan A, Roback JD, Hillyer CD: VWF-Cleaving Metalloprotease (MP) Activity: Comparison Fresh Frozen Plasma (FFP), Cryosupernatant (CSP) and Solvent Detergent Treated Plasma (SDP). *Transfusion* 2001, S132(040J.).
181. Chemnitz JM, Uener J, Hallek M, Scheid C: Long-term follow-up of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura treated with rituximab. *Ann Hematol* 2010, 89(10):1029-1033.
182. Foley SR, Weibert K, Arnold DM, Rock GA, Clark WF, Barth D, Sutton DM: A Canadian phase II study evaluating the efficacy of rituximab in the management of

- patients with relapsed/refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int Suppl* 2009(112):S55-58.
183. Crowther MA, Heddle N, Hayward CP, Warkentin T, Kelton JG: Splenectomy done during hematologic remission to prevent relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med* 1996, 125(4):294-296.
184. Mant MJ, Turner AR, Bruce D, Ritchie C, Larratt LM: Splenectomy during partial remission in thrombotic thrombocytopenic purpura with prolonged plasma exchange dependency. *Am J Hematol* 1999, 62(1):56-57.
185. Scharrer I, Vigh T, Qorraj M, Böhm M: ADAMTS-13 activity and antigen in commercial Von Willebrand-factor (VWF) concentrates.
186. Langer F, Bergmann F, Budde U, Hegewisch-Becker S, Hossfeld DK: Prolonged inhibition of von Willebrand factor-cleaving protease after splenectomy in a 22-year-old patient with acute and plasma refractory thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 2002, 118(1):271-274.
187. Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C, Wolfsegger MJ, Skalicky S, Schmidt M, Grillberger L, Hasslacher M, Knobl P, Ehrlich H et al: Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost* 2011.
188. von Auer C: Klinisches Studienprotokoll. Mainz: Universitätsklinik Mainz; 2010.
189. Chen J, Reheman A, Gushiken FC, Nolasco L, Fu X, Moake JL, Ni H, Lopez JA: N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice. *J Clin Invest* 2011, 121(2):593-603.

8 Veröffentlichungen

Veröffentlichungen im Rahmen der Dissertation

Vorträge

T Falter, M Qorraj, S Steinemann, T Vigh, G Dannhardt, K Lackner, I Scharrer: ADAMTS13-Aktivität im akuten Schub und in der Remission bei verschiedenen Mikroangiopathien. 41. Hämophilie Symposium, Hamburg (2010).

S Steinemann, T Falter, M Qorraj, T Vigh, I Scharrer: Comparison between Fresh Frozen Plasma and solvent/detergent Plasma for therapy of thrombotic thrombocytopenic purpura. 55. Jahrestagung Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wiesbaden. Hämostaseologie (2011) 31:26

Poster

T Falter, M Qorraj, S Steinemann, T Vigh, G Dannhardt, K Lackner, I Scharrer: Vergleich von Methoden zur Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität. 7. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Mannheim (2010).

S Steinemann, T Falter, M Qorraj, T Vigh, G Dannhardt, K Lackner, I Scharrer: Vergleich von Fresh Frozen Plasma und solvent/detergent Plasma in der Therapie der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura. 41. Hämophilie Symposium, Hamburg (2010).

T Falter, M Qorraj, S Steinemann, T Vigh, I Scharrer: Evaluation of clotting factor concentrates for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. 52nd American Society of Hematology (ASH[®]) Annual Meeting, Orlando, Blood (2010) 116 (21): 1509 (3678)

M Qorraj, T Falter, S Steinemann, T Vigh, I Scharrer: ADAMTS13 in 4 different VWF/VIII concentrates and its impact on therapy. 52nd American Society of Hematology (ASH[®]) Annual Meeting, Orlando, Blood (2010) 116 (21): 1509 (3677)

S Steinemann, T Falter, M Qorraj, T Vigh, I Scharrer: Investigation of side effects of plasmaexchange in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. 55. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wiesbaden, Hämostaseologie (2011) 31:67.

M Qorraj, T Falter, S Steinemann, T Vigh, I Scharrer: Comparison of ADAMTS13 Activity Assays for the diagnosis in thrombotic thrombocytopenic purpura. 55. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wiesbaden. Hämostaseologie (2011) 31:66.

M Qorraj, T Falter, S Steinemann, T Vigh, I Scharrer: ADAMTS13 activity in manifestation and remission of different microangiopathic diseases. 55. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, Wiesbaden. Hämostaseologie (2011) 31:66.

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Tanja Falter
Geburtsdatum	29. September 1984
Geburtsort	Stuttgart
Eltern	Dr. Gernot Falter M.A., Rechtsanwalt Dr. Annette Falter, geb. Döring, Dipl. Agraringenieurin

Schulbildung

09/1995 bis 07/2004	Paracelsus – Gymnasium - Hohenheim
06/2004	Abitur

Hochschulbildung

10/2004 bis 10/2008	Studium der Pharmazie, Martin – Luther - Universität, Halle - Wittenberg
10/2008	Zweites Staatsexamen
11/2009	Drittes Staatsexamen
12/2009	Approbation als Apothekerin
04/2010	Diplom Pharmazeutin, Martin – Luther - Universität, Halle - Wittenberg

Praktische Tätigkeiten

07/2004 bis 12/2009	Aushilfskraft im Alters- & Pflegeheim Samariterstift Ruit
08/2007 bis 09/2007	Praktikum bei Boehringer - Ingelheim
11/2008 bis 04/2009	Praktisches Jahr in der Hirsch - Apotheke
05/2009 bis 10/2009	Praktisches Jahr und Diplomarbeit bei Sanofi – Aventis in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Gerd Wolf im Bereich Research & Development Analytical Sciences FFM
Seit 01/2010	Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Inge Scharrer im Bereich der Hämostasiologie der III Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Mainz