

Aus der Transfusionszentrale  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Untersuchungen zur Plasmapheresetherapie bei Patienten  
mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin

der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
vorgelegt von

Sarah Steinemann  
aus Trostberg

Mainz, 2012

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 12.03.2013

# Inhalt

Inhalt.....	iii
Abkürzungsverzeichnis .....	vi
1 Einleitung .....	1
1.1 Zielsetzung der Dissertation.....	3
2 Literaturdiskussion .....	4
2.1 Der Von Willebrand Faktor und seine Rolle in der Hämostase .....	4
2.1.1 Biosynthese und Struktur des VWF.....	4
2.1.2 Funktion des Von Willebrand Faktors.....	5
2.2 Die VWF-spaltende Protease (ADAMTS13).....	6
2.2.1 Synthese und Struktur von ADAMTS13 .....	6
2.2.2 Funktion von ADAMTS13.....	7
2.3 Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP).....	8
2.3.1 Pathophysiologie der TTP .....	9
2.3.2 Diagnosestellung .....	10
2.3.3 Therapieansätze .....	11
2.4 Plasmapräparate.....	13
2.4.1 Herstellung der Plasmapräparate.....	13
2.4.2 Gewinnung des Einzelspenderplasmas .....	14
2.4.2.1 Herstellung von FFP.....	15
2.4.3 Herstellung von solvent/detergent treated Plasma (Octaplas®) .....	16
2.5 Nebenwirkungen der Therapie .....	17
2.6 TTP-like-Syndrom und andere verwandte Mikroangiopathien .....	20
3 Material und Methoden .....	22
3.1 Patientenkollektiv für die Befragung.....	22
3.1.1 Patientenbefragung.....	22
3.2 Untersuchungssubstanzen.....	22
3.2.1 Normalkollektiv.....	22
3.2.2 Patientenkollektiv .....	23
3.2.3 Plasmapräparate.....	23
3.3 Methoden.....	24
3.3.1 BCS-Methode nach Böhm .....	24
3.3.1.1 Materialien.....	25

---

3.3.1.2	Methode .....	27
3.3.2	Bestimmung des ADAMTS13-Antikörpers.....	28
3.3.3	SDS-Gelelektrophorese .....	29
3.3.3.1	Materialien.....	29
3.3.3.2	Methode .....	32
3.3.4	FRET-Assays zur ADAMTS13-Aktivitätsbestimmung.....	34
3.3.4.1	Technozym®ADAMTS13 (Technoclon).....	34
3.3.4.1.1	Materialien .....	36
3.3.4.1.2	Methode.....	37
3.3.4.2	Actifluor™ADAMTS13 Activity Assay (American Diagnostica).....	39
3.3.4.2.1	Materialien .....	41
3.3.4.2.2	Methode.....	41
3.3.5	Imubind®ADAMTS13 ELISA (American Diagnostica) .....	42
3.3.5.1	Material .....	43
3.3.5.2	Methode .....	43
3.4	Umrechnung der ADAMTS13-Aktivitätswerte.....	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Auswertung des Fragebogens .....	46
4.1.1	Allgemeine Patientendaten .....	46
4.1.2	Vorerkrankungen der Patienten .....	46
4.1.3	Datenerhebung zum TTP-Erkrankungsverlauf .....	48
4.1.4	Therapiemöglichkeiten der TTP .....	50
4.1.5	Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie.....	54
4.1.6	Allergien bei Patienten mit TTP.....	62
4.2	Untersuchung der verschiedenen Plasmapräparate.....	67
4.2.1	ADAMTS13-Aktivität in Fresh Frozen Plasma.....	67
4.2.1.1	BCS-Methode nach Böhm.....	67
4.2.1.2	Technozym®ADAMTS13 .....	74
4.2.1.3	Actifluor™ADAMTS13 .....	76
4.2.2	ADAMTS13-Aktivität in solvent/detergent Plasma Octaplas® .....	78
4.2.2.1	BCS Methode nach Böhm .....	78
4.2.2.2	Technozym®ADAMTS13 .....	83
4.2.2.3	Actifluor™ADAMTS13 .....	85
4.2.3	ADAMTS13-Antigen Bestimmung .....	86
4.2.3.1	Technozym®ADAMTS13 .....	86
4.2.3.2	Imubind®ADAMTS13 ELISA .....	89

---

4.2.4	Gelelektrophorese der Plasmakonzentrate FFP und Octaplas® .....	91
4.2.5	Autoantikörper .....	92
4.3	Zusammenfassung der ADAMTS13-Ergebnisse bei FFP und Octaplas® .....	93
4.4	Zusammenfassung der ADAMTS13-Antigenmessung bei FFP und Octaplas® .....	94
5	Diskussion .....	96
5.1	Diskussion über die Ergebnisse der Patientenbefragung .....	96
5.1.1	Epidemiologie und Risikofaktoren der TTP .....	96
5.1.2	Symptome.....	105
5.1.3	Therapiemöglichkeiten der TTP .....	106
5.1.4	Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie.....	112
5.2	Diskussion über die Ergebnisse der Plasmapräparate .....	121
5.2.1	ADAMTS13-Konzentration in FFP.....	122
5.2.2	ADAMTS13-Konzentration in Octaplas® .....	125
5.2.3	Vergleich FFP und Octaplas® .....	126
6	Zusammenfassung.....	134
7	Literaturverzeichnis .....	136
8	Anhang .....	153
8.1	Anhang I: Auswertung des Fragebogens .....	153
8.2	Anhang II: ADAMTS13-Aktivität mittels BCS Methode nach Böhm .....	165
8.3	Patientenfragebögen.....	166
8.3.1	Fragebogen 1 .....	166
8.3.2	Fragebogen 2 .....	169
8.4	Anhang III: SPSS Datensatz .....	174
8.5	Anhang IV: Vorzeitige Veröffentlichungen (Poster und Vorträge).....	191
9	Danksagung.....	194
10	Lebenslauf.....	196

# ***Abkürzungsverzeichnis***

Abb.	Abbildung
ADAMTS13	<u>A</u> <u>d</u> isintegrin-like <u>a</u> nd <u>m</u> etalloprotease with <u>t</u> hrombos <u>p</u> ondin type 1 motif <u>13</u>
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AITP	autoimmun thrombozytopenische Purpura
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
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asp	Asparagin
BaCl <sub>2</sub>	Bariumchlorid
BC	Behring Coagulation
BCS	Behring-Coagulation System (Gerinnungsautomat)
BE	Bethesda Einheiten
BMI	Body Mass Index
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ch.-B.	Chargen-Bezeichnung
C1/C2	Cystin knot
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMV	Cytomegalie-Virus
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CSP	Cryosupernatant Plasma
CUB	Urinary epidermal growth factor and bone morphogenic protein
CV	Variationskoeffizient
Cys	Cysteinreiche-Domäne
d-	Deaktiviert
Da	Dalton
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
dest.	destillata
d-NP	deaktivierter Normalpool
DIC	Disseminierte intravasale Coagulopathie

---

Dis	Disintegrine-Domäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
d-Pool	denaturiertes Poolplasma
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
ELISA	Enzym linked immuno sorbent assay
Em	Emission
Ex	Extinktion
F	(Gerinnungs-)Faktor
FFP	Fresh Frozen Plasma
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FVIII	Blutgerinnungsfaktor VIII
g/l	Gramm pro Liter
Glu	Glutamin
Gly	Glycin
GP	Glykoprotein
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Meerrettichperoxidase
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
IgA	Immunglobulin vom Typ A
IgG	Immunglobulin vom Typ G
IgM	Immunglobulin vom Typ M
IL-6	Interleukin 6

---

IL-8	Interleukin 8
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
l	Liter
LDH	Laktat Dehydrogenase
M	Molar
mA	Milliampere
MBP	Methylenblau Plasma
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mio	Million
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilber
mmol	Millimol
mol	Mol
MP	Metalloprotease-Domäne
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nma	2-(N-methylamino)benzoyl
NP	Normalpool
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PEX	Plasma-Exchange Therapie (= Plasmapheresetherapie)
pH	Hydrogen potential
PP	Propeptid
PPSB	Prothrombinkomplex-Konzentrat (Prothrombin, Proconvertin, Stuart-Prower-Faktor, Antihämophiler Faktor B)
r	rekombinant
RA	rheumatoide Arthritis

---

RFU	relative Fluoreszenz Einheit
RGD	Bindungsstelle für Thrombozyten-Glykoprotein IIb / IIIa
RNA	Ribonucleid acid
rpm	Rotationen pro Minute
s/d Plasma	solvent/detergent Plasma
spa	Spacer-Domäne
s	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SI	Standard Einheiten
SLE	systemischer Lupus Erythematodes
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TMA	thrombotische Mikroangiopathien
TMB	3,3',5,5`Tetramethylbenzidin Perbromat
TNBT	Tri(n-butyl)phosphate
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRALI	Transfusion related acute lung injury
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSR	Thrombospondin typ (1 bis 8) repeat-Domäne
TTP	thrombotisch thrombozytopenische Purpura
U	Units (Einheiten)
UAW	unerwünschte Arzneimittelwechselwirkungen
UL VWF M	Ultralange von Willebrand-Faktor Multimere
ULM	Ultralange von Willebrand-Faktor Multimere
VOD	Veno-occlusive Disease
VWF	Von Willebrand-Faktor
VWF:Ag	Von Willebrand-Faktor Antigen
VWF:RCo	Von Willebrand-Faktor Ristocetin-Cofaktor-Aktivität
VWS	Von Willebrand Syndrom
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

# 1 Einleitung

1924 beschrieb Eli Moschcowitz den Fall eines jungen Mädchens, das sich ein Jahr zuvor mit abrupt aufgetretenen petechialen Hauteinblutungen, Anämie und Lähmungen vorstellte. Innerhalb kurzer Zeit verfiel sie in einen komatösen Bewusstseinszustand und starb. E. Moschcowitz veranlasste eine Autopsie der 16-jährigen, um die bis dahin völlig unbekanntete Erkrankung zu erforschen. In den histologischen Schnitten zahlreicher Organe zeigte sich eine Vielzahl mikrovaskulärer thrombozytenreicher Thromben, ohne dass die Arteriolen und Kapillaren der betroffenen Organe eine Entzündung oder einen Schaden an den Endothelzellen aufwiesen (1). Moschcowitz vermutete, dass ein „powerful poison with both agglutinative and hemolytic properties“ (2) ursächlich für diese Erkrankung sei, die nach ihm benannt wurde und später die deskriptive Bezeichnung thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP) erhielt. Seine Veröffentlichung der Krankheitsgeschichte gilt als die erste schriftliche Darstellung eines TTP-Falls. Erst mit der Entdeckung des Von Willebrand Faktors (VWF) 1971 durch Zimmerman et al. (3) und der Von Willebrand Faktor spaltenden Protease ADAMTS13 (A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin type 1 motif 13) durch Tsai (4) und Furlan et al. 1996 (5) konnten die grundlegenden Mechanismen, die zu dieser schwerwiegenden Mikroangiopathie führen, entschlüsselt werden. So ist mittlerweile erforscht, dass durch einen ADAMTS13-Autoantikörper oder aber eine Mutation im ADAMTS13-Gen die Spaltung des VWF ausbleibt. Die Folge davon ist die Agglutination von Thrombozyten mit den hoch aktiven, hochmolekularen VWF Multimeren. Es kommt zur Ausbildung von Mikrothromben, die sich in den Arteriolen und Kapillaren der verschiedensten Organe ablagern und zu lebensbedrohlichen Zuständen führen, welche unbehandelt in bis zu 90 % der Fälle letal enden (6, 7).

Neben der Ursachenforschung dieser tödlich verlaufenden Erkrankung wird seit Jahren nach passenden Therapieansätzen gesucht. Max Lederer, ein Kollege von Moschcowitz, berichtete über Patienten mit TTP-ähnlichem Erscheinungsbild, deren Symptomatik sich nach einer Bluttransfusion besserte (8). In den darauffolgenden Jahrzehnten galt die Bluttransfusion als Therapie der Wahl bis Bukowski et al. 1977 (9) über zwei Patienten berichteten, die auf eine Plasmapheresetherapie ansprachen. Zu diesem Zeitpunkt wurde vermutet, dass durch die Plasmapheresetherapie das ursächliche Toxin entfernt wird. 1982 entdeckte Moake die ultralangen VWF-Multimere und postulierte, dass diese hyperadhäsiven Multimere das Auftreten der TTP triggern könnten (10). Der Durchbruch für den weitverbreiteten Einsatz der Plasmapherese zur Therapie der TTP gelang nach einer Studie von Rock et al. 1991 (11), die zeigte, dass die Plasmapherese der Plasmainfusionstherapie überlegen ist. Das Puzzle der TTP vervollständigte sich in den letzten 20 Jahren rasant, trotzdem blieb das Kernstück der Therapie die Plasmapherese. Die Plasmapheresetherapie führt in einer großen Anzahl der

---

Fälle zu einer Besserung des Krankheitsschubes, dennoch ist sie mit vielen Risiken und Nebenwirkungen verbunden (7).

## ***1.1 Zielsetzung der Dissertation***

Das Ziel der vorliegenden Dissertation ist die Untersuchung von möglichen Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie (PEX). Die Effizienz der Therapie bei der TTP konnte in den letzten Jahrzehnten im klinischen Alltag belegt werden. Dennoch geht die intensive und invasive Therapie mit vielen Risiken und Nebenwirkungen für die Patienten einher, die in dieser Arbeit herausgearbeitet werden sollen.

Anhand eines Patientenfragebogens sollte retrospektiv das Nebenwirkungsprofil für die Plasmapheresetherapie erstellt werden. So stellt sich beispielsweise die Frage, ob Patienten mit Allergien auch zu einer erhöhten Reaktion auf das substituierte Fremdplasma neigen oder ob Patienten, die viele Plasmapheresen bis zum Remissionseintritt erhielten, mehr oder schwerere Nebenwirkungen erlitten als andere. Die Untersuchung der Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie soll eine Einschätzung über die körperliche und psychische Belastung der Therapie für die Patienten liefern, um den chronisch oder akut kranken Patienten eine Verbesserung der Lebensqualität zu ermöglichen.

Anhand des Patientenfragebogens ist zusätzlich ein Risikoprofil für eine mögliche Prädisposition für die TTP erstellt worden. Anfänglich wurden nur Patienten der Mainzer Universitätsmedizin in die Studie eingeschlossen. Aufgrund des großen Interesses wurde die Patientenbefragung über das TTP-Forum im Internet deutschlandweit ausgeweitet und somit die Patientenkohorte erweitert. Ein wichtiger Punkt der Dissertation sollte die Untersuchung des Nebenwirkungsspektrums von FFP und dem solvent/detergent (s/d) Plasma Octaplas<sup>®</sup> darstellen. Hierzu wurden die Patienten nach dem für die Therapie verwendeten Plasmaprodukt befragt. Als weiterer Beurteilungspunkt war die Verträglichkeit von den verschiedenen Plasmaaustauschverfahren, Plasmapherese und Plasmaseparation, angedacht.

In einem experimentellen Teil der Studie werden die Plasmapräparate FFP und Octaplas<sup>®</sup> blutgruppenspezifisch auf Menge und Aktivität der Protease ADAMTS13, sowie auf das VWF-Multimer-Muster untersucht. Damit sollte ermittelt werden, ob und inwiefern die Präparate Unterschiede in der ADAMTS13-Aktivität und im Von Willebrand Faktor-Gehalt aufweisen, um Rückschlüsse auf ihren Nutzen in der Therapie der TTP ziehen zu können. Die Konzentration des ADAMTS13-Antigens wurde ermittelt, um eine mögliche Inaktivierung der Protease, zum Beispiel durch die Verarbeitungsprozesse bei der Plasmaherstellung, aufzudecken. Es ist bekannt, dass es blutgruppenspezifische Unterschiede im Gehalt an spezifischen Gerinnungsfaktoren in den verschiedenen Plasmapräparaten gibt. Dieser Effekt soll in der vorliegenden Arbeit auch hinsichtlich ADAMTS13 untersucht werden.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Der Von Willebrand Faktor und seine Rolle in der Hämostase**

1926 wurde eine neue Form der hämorrhagischen Diathese von Erich A. von Willebrand beschrieben. Seine Patienten litten unter einer erhöhten Blutungsneigung trotz normaler Blutplättchenzahl. Im Gegensatz zu Hämophilie-Patienten, bei denen Gelenkeblutungen im Vordergrund standen, traten bei seinen Patienten vermehrt Schleimhautblutungen auf.

Mitte der 1970er Jahre wurde das dafür verantwortliche Molekül von Zimmerman et al. identifiziert (12): Der Von Willebrand Faktor (VWF), dessen Hauptaufgabe im Gerinnungssystem die Vernetzung der Thrombozyten und deren Verankerung mit dem Subendothel ist. Somit fördert er die Plättchenadhäsion und -aggregation bei Endothelschäden.

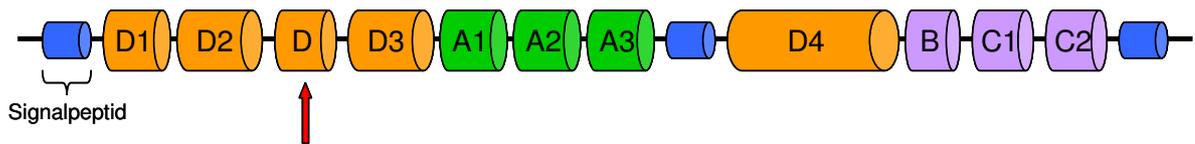
Als eine weitere Funktion des VWF wird die Bindung zu Faktor VIII (FVIII) beschrieben. Der sensible Faktor VIII wird durch die Bindung an die D3-Domäne des VWF vor dem proteolytischen Abbau geschützt, wodurch die Halbwertszeit des FVIII verlängert wird. Im Plasma liegt der VWF in einer kompakten Konformation vor, sodass es nicht zur proteolytischen Spaltung oder festen Verbindung zum Glykoproteinrezeptor (GP) Iba der Thrombozyten kommen kann.

Durch quantitative oder qualitative Defekte in der Synthese des VWF entstehen die verschiedenen Formen des Von Willebrand Syndroms (VWS). Ebenso kann es durch einen Mangel an VWF-spaltender Protease zu einer Überfunktion des VWF kommen, wodurch eine überschießende Plättchenadhäsion und -aggregation hervorgerufen werden kann. Die bei diesem Prozess gebildeten Mikrothromben können bei Patienten mit thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura (TTP) beobachtet werden (13, 14).

Die Zellbiologie und die physiologische Rolle des Von Willebrand Faktors wurden von Peyvandi (15) und Franchini (16) diskutiert.

#### **2.1.1 Biosynthese und Struktur des VWF**

Das Gen des VWF, der ausschließlich in Endothelzellen und Megakaryozyten gebildet wird, ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Das VWF Monomer wird aus 2813 Aminosäuren (AS) synthetisiert. Nach Abspaltung des Signalpeptids entsteht das Pro-VWF-Monomer. Die Pro-VWF-Monomere werden durch Disulfidbrücken am C-terminalen Ende dimerisiert. Ein Dimer hat eine Molekülgröße von ca. 440 kDa.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des VWF Monomers. Die D3-Domäne bindet an FVIII, A1 und A2 an Glykoprotein Ib und Heparin und die A3-Domäne an Kollagen. Die Domänen C1 und C2 sind die Bindungsstellen für GPIIb/IIIa und RGDS (Aminosäuresequenz in z.B. Fibrinogen, Fibronectin und Thrombospondin). Der rote Pfeil markiert die Schnittstelle des Propeptids. Der reife VWF besteht somit aus den Domänen D bis C2 und besitzt 2050 AS.

Im Plasma liegt der VWF in sogenannter Multimerstruktur mit einer Größe von bis zu 20 Millionen Dalton vor. Um Multimere zu bilden, wird das Propeptid mit einer Länge von 741 AS abgespalten (siehe roter Pfeil in Abb. 1) und die Dimere am Amino-terminalen Ende durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft (17).

Der VWF wird in Endothelzellen in den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen in Form von langen Multimerketten gespeichert, aber auch die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten enthalten VWF-Multimere. Im Plasma wird VWF durch das VWF spaltende ADAMTS13 abgebaut, so dass hier nur kurze VWF-Multimerketten vorkommen (18, 19).

### 2.1.2 Funktion des Von Willebrand Faktors

Wie bereits erwähnt, besteht die Hauptaufgabe des VWF in der Thrombozytenadhäsion und –aggregation sowie im Transport von FVIII.

Über die A1-Domäne des VWF wird die Plättchenagglutination hervorgerufen, da in dieser Region die GPIb Bindungsstelle lokalisiert ist. Nach Thrombozytenaktivierung durch ADP oder Thrombin kann der VWF auch an GPIIb/IIIa Rezeptoren binden. Die C1 und C2 Domänen können aber auch an RGDS (siehe oben) binden. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Aminosäuresequenz (Arg-Gly-Asp-Ser), die auch andere adhäsive Proteine aufweisen können. Die Bindung zwischen A1 und GPIb ist relativ instabil, da sie schnell gebildet und gelöst werden kann. Die Bindung zwischen C1 und C2 und GPIIb/IIIa bzw. RGDS bildet sich hingegen langsam aus und stellt eine sehr stabile Bindung dar. Des Weiteren besitzt der VWF die Möglichkeit, direkt an die subendotheliale Matrix zu binden, was auf die unmittelbare Bindung an Kollagen zurückzuführen ist (20).

Um eine möglichst effektive Thrombozytenagglutination zu gewährleisten, ist eine große Molekülgröße von entscheidendem Vorteil, da dadurch viele Bindungsstellen bereitstehen und es so zu einer optimalen Plättchenvernetzung kommen kann.

Eine weitere wichtige Aufgabe des VWF ist der Schutz des FVIII vor Proteolyse bzw. Elimination. Hierfür wird FVIII durch nicht kovalente Bindungen an das N-terminale Ende des VWF gebunden. Neben der Schutzfunktion für FVIII konnten in Zellkulturmodellen gezeigt werden, dass VWF die Sezernierung des FVIII fördern kann (19, 21, 22).

## **2.2 Die VWF-spaltende Protease (ADAMTS13)**

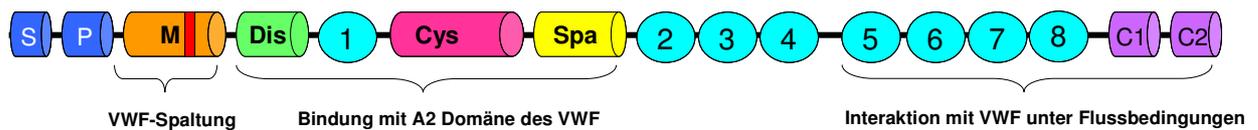
Schon früh waren Forscher der ADAMTS13-Protease auf der Spur, da durch Gelelektrophorese der Abbau der VWF Moleküle durch Plasmaenzyme nachgewiesen werden konnte. Doch erst Jahre später gelang die Isolation des bis dahin allgemein als „VWF-spaltende Protease“ bekannten Enzyms. Bereits 1986 beschrieb Moake (23) einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ultralangen VWF-Multimeren und dem Mangel einer, bis dato unbekannt, VWF Depolymerase. Plasmauntersuchungen von TTP-Patienten und Gesunden brachten Hinweise auf das Vorliegen einer Plasmaprotease, die eine intravaskuläre Plättchenaggregation und Thrombenbildung verhindern kann. 1996 berichteten Tsai (4) und Furlan et al. (5) über eine Metalloprotease, die spezifisch den VWF spaltet. 2001 wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Aminosäuresequenz der VWF spaltende-Protease entdeckt. Die Protease wurde als 13tes Mitglied der ADAMTS-Gruppe identifiziert und trägt den Namen ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin typ 1 motif 13) (13, 14).

Die folgenden Kapitel liefern einen Überblick über die Biosynthese und Funktion des ADAMTS13 und seine Rolle in der Pathophysiologie der TTP.

### **2.2.1 Synthese und Struktur von ADAMTS13**

Das ADAMTS13-Gen liegt auf dem Chromosom 9q34. ADAMTS13 wird hauptsächlich in den Sternzellen der Leber gebildet. Zusätzlich bilden auch Endothelzellen, Megakaryozyten und Thrombozyten die VWF-spaltende Protease. Im Golgi-Apparat wird das Enzym N- und O-glykolysiert, um eine korrekte Faltung und Sekretion zu gewährleisten. Die komplexe N-Glykolisierung, besonders im Bereich der Metalloprotease-Domäne, in und um die Spacer- und in den CUB-Domänen, verdoppelt die Enzymaktivität. Das Fehlen der N-glykolysierten Stellen vermindert die ADAMTS13-Aktivität aber im Gegenzug nicht (24, 25).

ADAMTS13 besteht aus 1427 Aminosäuren mit einer Masse von 190 kDa. Eine Vielzahl an ADAMTS13-Subklassen konnten nachgewiesen werden, die entweder durch alternatives Splicen oder durch den Abbau durch Serinproteasen entstehen (26, 27).



**Abb. 2:** Molekularstruktur von ADAMTS13. Signalpeptid (S), Propeptid (P), Metalloprotease (M), Disintegrin-Domäne (Dis), erste Thrombospondin Typ 1 Wiederholungssequenz (1), Cystein-reiche Region (Cys-R), Spacer-Domäne (Spa), zwei CUB-Domänen (C1, C2). Die Metalloprotease bildet das katalytische Zentrum (rot) des Enzyms. An dieser Stelle wird der VWF gespalten. Die Regionen Dis bis Spa binden an die A2 Domäne des VWF-Moleküls. Die distalen Thrombospondin 1-Regionen (2-8) interagieren mit VWF in Anwesenheit von Scherstress (s.u.).

In Abbildung 2 ist der molekulare Aufbau von ADAMTS13 dargestellt. Die Region zwischen der Disintegrin-Domäne und der Spacer-Region bindet an Stellen der A2-Domäne des VWF. Insbesondere sind die Disintegrin-, Thrombospondin 1 (TSR)- und Cystein-reichen-Domänen an der Erkennung und korrekten Spaltung des Substrates beteiligt (28). Die Sequenz zwischen TSR6 bis C2 bindet mit der D4- bis CK-Domäne des VWF. Diese Bindung findet besonders unter Einfluss von hohen Scherkräften statt.

Die Syntheserate wird durch inflammatorische Zytokine beeinflusst. In Humanplasmaproben finden sich ADAMTS13-Konzentrationen von ungefähr 1 µg/ml. Seine Halbwertszeit beträgt schätzungsweise ein bis zwei Tage unter physiologischen Blutflussbedingungen. Die sehr stabile Protease wird durch Plasmin, Thrombin und Faktor Xa abgebaut. Aber auch der Leukozytenelastase wird eine Rolle im Abbau von ADAMTS13 zugeschrieben, besonders in der Pathogenese der DIC bei Sepsispatienten (24).

### 2.2.2 Funktion von ADAMTS13

Die Metalloprotease ADAMTS13 spaltet den VWF zwischen Y1605 und M1606 in der A2-Domäne zu einem 140 kDa und einem 176 kDa Homodimer. Diese Spaltung kann jedoch nur in Anwesenheit von hohen Scherkräften stattfinden. 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 (5, 14, 29). VWF Multimere werden aus den Endothelzellen sezerniert und binden nach ihrer Aktivierung Thrombozyten. Aufgrund erniedrigter ADAMTS13-Werte bilden sich Mikrothromben und eine Thrombozytopenie aus, da die Gegenregulation gestört ist. Dieser Mechanismus beschreibt den ursächlichen Pathomechanismus in der Entstehung der TTP.

Untersuchungen haben gezeigt, dass die verschiedenen Domänen des ADAMTS13 die Interaktion der Tyrosin-Methionin-Schnittstelle des VWF mit dem katalytischen Zentrum der

ADAMTS13 fördern. So wurde durch Abspaltung verschiedener ADAMTS13-Domänen nachgewiesen, dass die TSR Regionen 5 bis CUB die Affinität zur D4- bis CK-Domäne des VWF erhöhen. Fehlen Teile der TSR oder CUB Domänen wird die Enzymaktivität verringert. Die Metalloprotease allein hat keine proteolytische Aktivität (27).

IgG-Antikörper gegen ADAMTS13 können sich primär gegen alle Domänen des Enzyms richten und so einen Funktionsverlust des Enzyms verursachen. Besonders häufig finden sich bei TTP-Patienten Autoantikörper gegen die CUB-Domäne und die TSR 1-Region. Auch gegen größere Fragmente, die zum Beispiel auch die Metalloprotease mit umfassen, sowie die TSR 2 bis 8-Region und gegen das Propeptid wurden Antikörper gefunden (30).

### ***2.3 Die thrombotisch thrombozytopenische Purpura (TTP)***

Definitionsgemäß ist die TTP den thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) zuzuordnen. Charakteristisch für die TTP ist eine Trias von hämolytischer Anämie mit Fragmentozyten im Blutausschlag, Thrombozytopenie und neurologischen Ausfallserscheinungen (31, 32). Durch die Durchblutungsstörung können, ischämisch bedingt, neurologische Defizite, Kopfschmerzen oder Organausfälle auftreten. Als typisch klinische Symptome werden sensomotorische Ausfälle, Desorientiertheit, Halluzinationen und kardiale Beschwerden beschrieben, da das Gehirn und das Herz besonders häufig von den Folgen der Mikrothromben betroffen sind. Die Hämolyseparameter Haptoglobin, Laktatdehydrogenase (LDH) und indirektes Bilirubin liegen im pathologischen Bereich (vgl. hierzu auch Tabelle 2).

Obwohl die TTP bereits 1924 von Eli Moschowitz beschrieben wurde (2), endete die Erkrankung noch bis in die 1970er Jahre in bis zu 90 % der Fälle tödlich. Erst mit der Anwendung der Plasmapherese konnte die Mortalität auf bis zu 20 % gesenkt werden. Die TTP ist trotz einer Inzidenz von 3 bis 10 pro 1 Million Einwohnern keine seltene Erkrankung, sondern nur zu selten diagnostiziert und tritt mit einem Verhältnis von 3:2 häufiger bei weiblichen als bei männlichen Patienten auf (25).

Man unterscheidet zwischen primärer und sekundärer TTP. Die primäre Form kann hereditären oder idiopathischen Ursprungs sein.

Bei der hereditären Form, dem Upshaw-Schulman-Syndrom, liegt ein angeborener ADAMTS13-Mangel bedingt durch Genmutation vor. Patienten, die an einem Upshaw-Schulman-Syndrom leiden, erfahren oft schon sehr früh schwere TTP-Schübe. Meist wird hier der erste Krankheitsschub durch Infektionen, chirurgische Eingriffe oder Schwangerschaft getriggert (33). Patienten mit hereditärer TTP weisen keine oder nur sehr geringe ADAMTS13-Aktivitäten im Plasma auf. Der Nachweis eines inhibitorischen Antikörpers gegen ADAMTS13 ist negativ. Bei diesen Patienten können schon niedrige

Plasmaproteasespiegel von 5 bis 10 % das Auftreten einer klinisch manifesten Form verhindern.

Weitaus häufiger findet sich unter den primären TTP-Formen die idiopathische TTP. Sie wird durch IgG Antikörper gegen ADAMTS13 ausgelöst. Die inhibitorischen Antikörper richten sich gegen die cysteinreiche Region von ADAMTS13, wodurch eine Spaltung des VWF verhindert wird (6).

Patienten mit sekundären TTP Formen haben im Gegensatz zu den primären TTP Formen nur eine leicht erniedrigte oder normale ADAMTS13-Aktivität. Die sekundäre TTP kann durch eine Vielzahl anderer Grunderkrankungen oder durch Medikamente ausgelöst werden (7). Bekannte Triggerfaktoren für diese Form der TTP sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Erkrankungen, die eine sekundäre TTP induzieren können	Medikamente, die eine sekundäre TTP induzieren können
Immunologische Erkrankungen (Kollagenosen, Vaskulitiden)	Thienopyridine (Clopidogrel, Chinin)
Schwangerschaft, Wochenbett	Mytomycin C, Pentostatin, Gemcitabin
HIV	Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus)
Maligne Tumorerkrankungen	
Hämatopoetische Stammzelltransplantation	

**Tabelle 1:** Übersicht über Erkrankungen und Medikamente die eine sekundäre TTP induzieren können (7).

### 2.3.1 Pathophysiologie der TTP

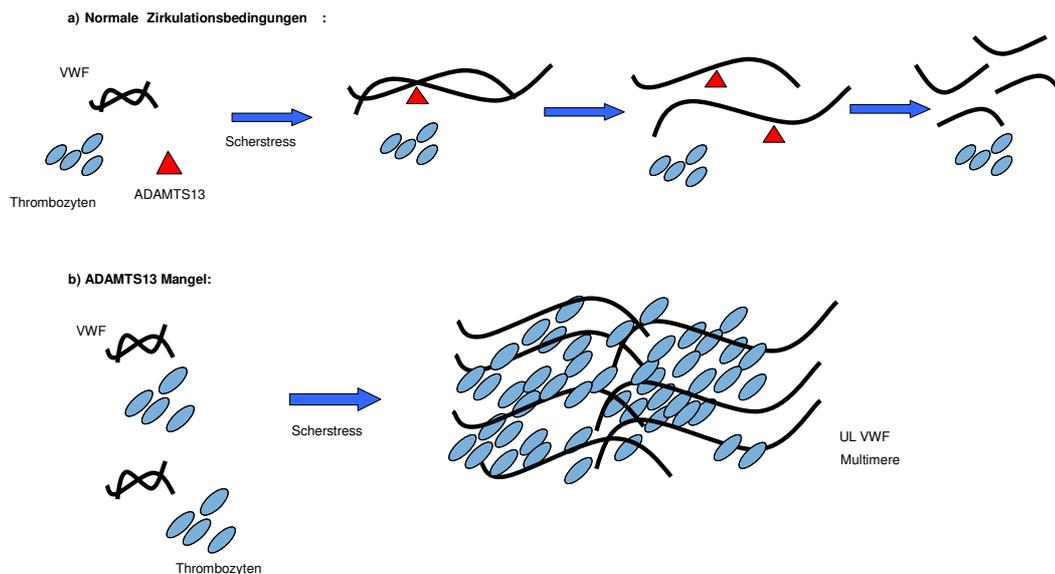
Wie bereits oben beschrieben, entsteht die TTP aufgrund eines ADAMTS13-Mangels. Hierdurch kann der ins Blut sezernierte VWF Faktor nicht gespalten werden. Es kommt zur Dimerisierung des VWF und somit zur Ausbildung von ultralangen Multimeren (UL VWF). Dadurch kommt es zur netzartigen Verlegung der kleinen Arteriolen durch Thrombozyten. Durch die intravasale Thrombusbildung verstärken sich die Scherkräfte weiter, wodurch mehr VWF Multimere aktiviert werden und weitere Plättchen aggregieren (24).

Dieser Teufelskreis verschlimmert die Lage des Patienten oft schlagartig, wenn nicht umgehend eine Plasmapheresetherapie (PEX) eingeleitet wird (siehe Kapitel 2.3.3). Die Thrombozytopenie, die als Folge der Thrombenbildung in der Mikrozirkulation auftritt, induziert petechiale Blutungen und Hämatombildung. Durch Endothelverletzungen und Mikrothrombenbildung in den kleinen Gefäßen werden Erythrozyten beschädigt und es kön-

nen Fragmentozyten im peripheren Blutausstrich nachgewiesen werden. Die Endothelschädigung hat eine Produktion von Zytokinen zur Folge, die Fieberschübe bei den Patienten auslösen können (7).

Die Thromben befinden sich hauptsächlich in Herz, Gehirn, Niere, Nebenniere, Pankreas, Milz und Mesenterium.

Die Abbildung 3 zeigt die physiologische Spaltung von VWF-Multimeren durch ADAMTS13 und die Entstehung der Mikrothromben durch einen ADAMTS13-Mangel.



**Abb. 3:** **a)** Unter physiologischen Zirkulationsbedingungen wird VWF durch ADAMTS13 gespalten. Durch den Einfluss von Scherkräften wird die Spaltungsstelle des VWF für ADAMTS13 zugänglich. **b)** Bei ADAMTS13-Mangel kann der VWF nicht gespalten werden und es kommt zur Bildung von UL VWF Multimeren. Durch Scherstress wird der VWF entfaltet und erreicht seine aktive Form, wodurch es zu einer Anlagerung von Thrombozyten kommt (14).

### 2.3.2 Diagnosestellung

Die Diagnose einer primären oder sekundären TTP wird heute hauptsächlich klinisch gestellt. Eine primäre, idiopathische TTP wird diagnostiziert, wenn die Leitsymptome hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und neurologische Störungen vorliegen. Des Weiteren sollten andere Ursachen, die für eine sekundäre TTP sprechen würden, ausgeschlossen werden. Als Folge der Organschädigung und des Voranschreitens des Krankheitsverlaufs müssen die renalen Ausfälle und das Auftreten von Fieber als unspezifische Symptome bewertet werden.

Eine stark verminderte oder fehlende ADAMTS13-Aktivität gilt als Beweis der primären TTP. Die Diagnose der idiopathischen Form wird zusätzlich durch den Nachweis von Autoantikörpern gegen ADAMTS13 gesichert. Eine verminderte ADAMTS13-Aktivität kann bei Patienten

mit sekundärer TTP fehlen. In diesen Fällen wird oft von einem TTP-like Syndrom gesprochen.

Bei der idiopathischen TTP sollte eine sofortige Therapie aufgrund der klinischen Diagnose erfolgen, um keine Zeit zu verlieren, da die ADAMTS13-Aktivitäts- und –Antikörperbestimmung nicht als Routinelaborparameter verfügbar sind. Die Diagnose wird dann meist retrospektiv nach Eintreffen der ADAMTS13-Laborwerte gestellt und gesichert. Während die klinischen Symptome Hinweise auf die Diagnose geben, beweisen die verminderte oder fehlende ADAMTS13-Aktivität, der Nachweis von inhibitorischen Antikörpern mittels eines ELISAs und der Nachweis von UL VWF Multimeren mittels einer SDS-Gelelektrophorese das Vorliegen einer primären TTP (7, 34).

In Tabelle 2 sind die zu erwartenden Laborparameter einer akuten TTP zusammengestellt, sowie die klinischen Symptome, die sich aus den entsprechenden Laborparametern ergeben können.

Laborparameter	Symptome
Haptoglobin ↓	Kopfschmerz
LDH ↑	Vigilanzstörung
Indirektes Bilirubin ↑	Fokale neurologische Defizite
Freies Hämoglobin ↑	Petechiale Blutungen
Fragmentozyten >15 % im Blutausstrich	Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö
Kreatinin ↑	Abdominelle Schmerzen
Thrombozytopenie	Fieber
Anämie	
Proteinurie/ Hämaturie	

**Tabelle 2:** Klinische Konstellation bei thrombotisch thrombozytopenischer Purpura (nach (7)).

### 2.3.3 Therapieansätze

Aufgrund der dramatischen Verschlechterung des Patientenzustandes gilt besonders der akute Schub der primären TTP als hämatologischer Notfall (7). Da die Mortalität der Erkrankung unbehandelt bei 90 % liegt, ist schnellstmöglich ein Plasmaaustausch mittels Plasmapherese einzuleiten.

Die Plasmapherese stellt derzeit den Therapiestandard dar, obwohl es bisher nur wenige prospektive, kontrollierte Studien zum Therapieerfolg gibt. Dennoch wurde sie in die Leitli-

nien aufgenommen, da ein positives Outcome beobachtet werden konnte und die Mortalität durch Einsatz der Plasmapherese auf 10-20% gesenkt werden konnte (6).

Während die primäre TTP besonders gut auf die Plasmaaustauschtherapie (PEX) anspricht, ist bei den sekundären Formen der Therapieerfolg geringer, da hier häufig normale ADAMTS13-Aktivitäten vorliegen. Somit schwanken die Evidenzgrade für die Therapie in Abhängigkeit von der auslösenden Grunderkrankung (7).

Durch die Zufuhr von Plasmapräparaten verfolgt man das Ziel, ADAMTS13 im Patientenplasma wieder aufzusättigen und inhibitorische Antikörper sowie UL VWF Multimere durch den Plasmaaustausch zu entfernen.

Steht eine Plasmapheresetherapie nicht unmittelbar zur Verfügung, sollte mit einer Plasmainfusion begonnen werden, obwohl diese Therapiemaßnahme in Studien der Plasmapherese unterlag (11, 34, 35). Der Plasmaaustausch sollte mit täglich mit mindestens 1 bis 1,5 Litern durchgeführt werden. Gleichzeitig sollte ein Monitoring von LDH und Thrombozyten erfolgen, um Therapieerfolg oder -versagen beobachten zu können. Werden an zwei bis drei aufeinanderfolgenden Tagen normalisierte Thrombozytenzahlen ( $>150 \times 10^9/l$ ) und LDH-Werte gemessen, kann ein Auslassversuch der Therapie erfolgen. Die LDH spiegelt zum einen die ischämische Gewebeschädigung wieder, zum anderen ist sie ein Parameter, der die Aktivität der Hämolyse widerspiegelt. Spricht ein Patient nur sehr schlecht auf die Plasmapherese an, sollte eine Intensivierung der Therapie erwogen werden. Hierzu wird die Plasmapherese zweimal am Tag durchgeführt und zusätzlich eine immunsuppressive oder immunmodulierende Therapie angesetzt (34). Zum Einsatz kommen hierbei Kortikosteroide, Vincristin, Cyclophosphamid und Cyclosporin A. Die Wirkung der immunsuppressiven Therapie konnte bislang ebenfalls nicht in klinischen Studien bewiesen werden. Fallberichte deuten auf ihre Wirksamkeit hin, jedoch sollte der Einsatz der Immunsuppressiva aufgrund ihrer oft schweren Nebenwirkungen sorgfältig abgewogen werden.

Seit einiger Zeit konnte die Wirksamkeit von Rituximab, einem monoklonalen CD20 Antikörper, bei der Therapie von autoimmunbedingten Erkrankungen gezeigt werden. Auch bei einigen therapierefraktären TTP-Fällen unter Plasmapherese und immunsuppressiver Therapie konnte durch den Einsatz von Rituximab eine Remission erzielt werden. Es wurde sogar über Fälle berichtet, in denen ein TTP-Rezidiv durch den Einsatz von Rituximab verhindert werden konnte, ohne dass eine Plasmapherese durchgeführt werden musste. Jedoch gilt der Einsatz von Rituximab bei der TTP heute noch als „Off label use“. Momentan werden deshalb kontrollierte, randomisierte Studien durchgeführt, um den Stellenwert von Rituximab bei der Therapie der primären TTP zu überprüfen (36, 37) (siehe hierzu auch Kapitel 5.1.3).

Der Einsatz von Erythrozytenkonzentraten allein spielt in der TTP-Therapie keine Rolle, jedoch können schwer anämische Patienten von der Gabe profitieren, da so eine weitere ischämische Organschädigung eventuell begrenzt werden kann (7).

Die Splenektomie wurde früher vor allem bei Patienten eingesetzt, die unter häufigen Rezidiven, aufgrund einer Autoantikörper induzierter TTP, litten. Jedoch hat man heute diese Therapie weitgehend verlassen, da das Risiko eines chirurgischen Eingriffs unter einem akuten TTP-Schub sehr hoch ist. Somit wird die Splenektomie heute nur noch als Reservetherapie bei therapierefraktärer TTP oder bei Patienten mit häufigen Rezidiven angesehen (35, 38, 39).

## **2.4 Plasmapräparate**

Die Plasmapherese spielt die wichtigste Rolle in der Therapie der TTP, wobei die Patienten von einem schnellen Einleiten der Therapie profitieren. Im Folgenden wird der Herstellungsprozess der Plasmapräparate beschrieben.

### **2.4.1 Herstellung der Plasmapräparate**

Trotz der in den letzten Jahren entwickelten alternativen Proteinquellen, sei es durch rekombinante Herstellung bzw. transgene Tiere und Pflanzen, ist der Bedarf an Plasmaprodukten weiterhin hoch (40). Problematisch bleiben jedoch die Übertragung von Infektionen und transfusionsbedingte Zwischenfälle. Zur Risikominimierung wurden verschiedenen Gesetze erlassen, sowie Richtlinien und zwingende Prüfverfahren entwickelt (41):

- 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.

Mithilfe der unter den Punkten eins bis vier aufgeführten Maßnahmen soll die Infektionsübertragung bei der Transfusion verhindert werden. Dabei spielt vor allem die Auswahl und Kontrolle des Spenders eine entscheidende Rolle, da sie den eigentlich entscheidendsten Schutz vor Infektionen, insbesondere schwerwiegenden Virusinfektionen, bietet. Nur Spender, die den Bedingungen der Monographie „Plasma vom Menschen“ zur Fraktionierung des Europäischen Arzneibuches entsprechen, kommen in Frage.

Hierfür unterläuft der Spender verschiedene Prüfverfahren, beginnend mit einer umfangreichen Anamnese, körperlichen Untersuchung und einer labor diagnostischer Untersuchung des Blutes.

Für die Anamnese wird ein Fragebogen herangezogen, der die Kriterien:

- Transfusionsmedizinisch relevante Infektionskrankheiten
- Infektionskrankheiten in der näheren Umgebung bzw. erhöhtes Ansteckungsrisiko
- Umstände, welche zu einer erhöhten Infektionsgefahr führen
- Zuverlässigkeit des Spenders

beurteilt (42). Bei der körperlichen Untersuchung werden die Angaben, insbesondere die Zugehörigkeit auf drogengefährdete/-abhängige Risikogruppen, überprüft. Zudem soll eine Blutuntersuchung auf zahlreiche transfusionsrelevante Virusinfektionen (new variant Creutzfeld-Jakob disease, HIV, Hepatitis- B- und C- Virus, Parvovirus B19, West Nile Virus, Severe acute respiratory syndrom virus, bakterielle Erkrankungen, Syphilis, Malaria und andere Parasitosen) zur Sicherheit der Plasmaprodukte beitragen. Auf jeden Fall müssen jedoch Syphilis, HCV und HIV ausgeschlossen werden (43). Zudem besteht die Chargen-Dokumentationspflicht bezogen auf Produkt und Patienten (§14 Transfusionsgesetz).

Gesunde Probanden im Alter zwischen 18 und 68 Jahren (Erstspende bis 60 Jahre) können bei einem Hämoglobinwert  $\geq 12,5$  g/l (Frauen) bzw.  $\geq 13,5$  g/l (Männer) 450-500 ml Vollblut spenden oder sich einer apparativen Plasmapherese unterziehen.

Zugelassen sind vier verschiedene Präparate: Fresh Frozen Plasma, lyophilisiertes Humanplasma, solvent/detergent-behandeltes Plasma und Methylenblau-Licht-behandeltes Plasma. Des Weiteren gibt es Plasma zur Fraktionierung. Therapeutisch angewendet werden die Präparate bei der Behandlung der TTP, komplexen Gerinnungsstörungen, bei Verlustkoagulopathie und diversen Mangeln an Gerinnungsfaktoren, für die noch kein Konzentrat zur Verfügung steht (44).

### **2.4.2 Gewinnung des Einzelspenderplasmas**

Durch eine Fraktionierung von Vollblutspenden oder aber mittels maschineller Plasmapherese wird Einzelspenderplasma gewonnen. Angewendet wird das Einzelspenderplasma sowohl für die Herstellung von transfusionsfähigem Fresh Frozen Plasma (FFP) als auch für die Weiterverarbeitung zu solvent/detergent behandeltem Plasma (Octaplas<sup>®</sup>), sowie für Plasmasubstitutionspräparate.

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

Erythrozytenkonzentrat, Plasma und Buffy Coat mit Thrombozyten wird durch wiederholtes Zentrifugieren abgetrennt, sodass durch die Auftrennung 200-300 ml Plasma gewonnen werden können (41). Die Pharmacopoeia Europaea schreibt für das „Plasma humanum ad seperationem“ nach der Blutentnahme bzw. Trennung von den zellulären Bestandteilen eine schnellstmögliche Einfrieren innerhalb von 24 Stunden vor. Eine Kerntemperatur von -25 °C oder weniger, muss dabei innerhalb von 12 Stunden erreicht werden. Üblicherweise werden die Proben bereits nach 2 Stunden tiefgefroren, um eine gute Qualität für „labile“ Proteine, wie beispielsweise Gerinnungsfaktoren, sicherzustellen (45).

Eine andere Möglichkeit ist die extrakorporale Plasmagewinnung. In Falle dieser apparativen Plasmapherese wird bis zu 850 ml Plasma durch Separation oder Filtration von Citrat-behandeltem Vollblut gewonnen. Die Blutzellen werden in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert und dem Spender zurückgegeben, das Plasma wird in einem Plastikbehältnis gesammelt (41).

#### **2.4.2.1 Herstellung von FFP**

Fresh Frozen Plasma wird entweder direkt über ein Aphereseverfahren oder aus einer Multi-komponentenspende via Zentrifugation gewonnen. Das Plasma wird innerhalb von 24 Stunden eingefroren und entspricht im Wesentlichen dem Einzelspenderplasma. Sofern der Spender nach Ablauf einer vier-monatigen Quarantäne weiterhin seronegativ für anti-HIV1+2, HBsAg, anti-HCV und PCR negativ für HIV-RNA und HCV-RNA ist, wird das aus Einzelspenderplasma gewonnene transfusionsfähige Fresh Frozen Plasma (FFP) freigegeben.<sup>1</sup> Trotz Quarantänelagerung und mehrfacher Überprüfung der Spender bleibt ein Restrisiko vorhanden, sich mit HIV und insbesondere mit HCV sowie HBV zu infizieren, insbesondere dann, wenn die Viruskonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Testverfahrens liegen. Die ca. 250 ml umfassenden FFP-Beutel können auch HAV und Parvovirus B19 enthalten, da keine Pflicht zur Testung auf diese Viren besteht (46).

---

<sup>1</sup> Zusammenstellung der Plasmagewinnung für FFP und Octaplas<sup>®</sup> nach Korrespondenz mit Dr. T. Franken, Produktmanager Intensivmedizin, Octapharma GmbH, Langenfeld Deutschland, und Dr. R. Conradi, Transfusionszentrale Mainz, Universitätsmedizin Mainz, Deutschland.

### **2.4.3 Herstellung von solvent/detergent treated Plasma (Octaplas®)**

Ein besonders sicheres Präparat stellt das solvent/detergent Plasma oder Octaplas® dar. Durch das Poolen von 500 bis 1600 Einzelspenderplasmen wird eine Nivellierung der interindividuellen Unterschiede der Plasmaproteine der Spender bewirkt und Inhibitoren und seltene Antikörper, wie zum Beispiel Transfusion related acute lung injury (TRALI) auslösende Antikörper, werden unter die Nachweisgrenze verdünnt (47). Um eine Kryopräzipitation zu vermeiden wird das Einzelspenderplasma rasch aufgetaut und anschließend mit weiteren Einzelspenderplasmen vereinigt bis ein Plasmapool von 380 kg entsteht. Ausgehend von diesem Plasmapool erfolgt nun die Aufarbeitung beginnend mit einer Filtration (1 µm-Filter), um Zellen und Zellrückstände vollständig zu entfernen. Dem schließen sich mit der solvent/detergent Behandlung die weiteren entscheidenden Schritte in der Viruseliminierung an. Als Lösungsmittel wird 1% Tri(n-butyl)phosphat (TNBT) eingesetzt. Zur Beseitigung von lipidumhüllten Viren, insbesondere HIV, HBV und HVC, wird das Detergent Triton-X 100, ebenfalls in einer 1%igen Lösung, verwendet. Dieser Vorgang wird bei  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durchgeführt und ist nach ungefähr einer bis eineinhalb Stunden beendet.

Das Infektionsrisiko für nicht lipidumhüllte Viren wird gesenkt, indem das Plasma mittels Nukleinsäureamplifikationstechnik und Immunneutralisation behandelt wird, wodurch im Pool befindliche Antikörper (z.B. Anti-Parvovirus-B19-Antikörper oder Anti-HAV-Antikörper) sowie andere potentiell im Poolplasma enthaltene Viren gebunden und neutralisiert werden können (Einzelspenderplasmen mit hohen Parvovirus B-19 Konzentrationen werden vorher aussortiert).

Das TNBT und Triton-X 100 werden durch eine Kastorölextraktion und eine Festphasenchromatographie aus dem Plasmapool entfernt.

Der Herstellungsprozess wird mit einer Sterilfiltration (0,45 µm und 0,2 µm) abgeschlossen und anschließend in 200 ml Beutel (41, 48) verpackt und bei -60 °C schockgefroren.

Abschließend werden interne Chargen- und Qualitätskontrollen sowie eine externe Chargenfreigabe durch das Paul-Ehrlich-Institut durchgeführt.<sup>1</sup>



**Abb. 4:** Herstellung von solvent/detergent behandeltem Plasma. Aus (49).

## 2.5 Nebenwirkungen der Therapie

Da bei der Therapie der TTP hauptsächlich humane Plasmaproducte zum Einsatz kommen, die unter 2.4 beschrieben wurden, kann es unter der Therapie zu zahlreichen und schwerwiegenden Nebenwirkungen (UAW) kommen. Um den Eintritt in eine Remission zu erreichen, sind bis zu 40 Liter Plasmaaustausch nötig, was für die Patienten ein nicht unerhebliches Risiko an Infektionen und unerwünschter Nebenreaktionen birgt (50).

Um das Infektionsrisiko zu minimieren, unterliegen die Plasmaproducte speziellen Qualitätsanforderungen, die bereits erläutert wurden. Trotzdem bleibt ein geringes Restinfektionsrisiko für Hepatitis C (1:2 Mio.) und HIV (1:4 Mio) beim Einsatz von FFP. Das Infektionsrisiko für andere Viruserkrankungen liegt dagegen deutlich höher (41). Im Vergleich birgt das solvent/detergent behandelte Plasma ein geringeres Risiko, an einer transfusionsvermittelten Infektion zu erkranken (siehe Kapitel 2.4.3).

---

Auch allergische Reaktionen auf die Plasmapräparate selbst sind keine Seltenheit. Shemin et al. führten 2007 in einer Studie mit 1727 Plasmapheresen die häufigsten Nebenwirkungen auf (51). Dabei untersuchten sie die allgemeinen Nebenwirkungen, die bei der PEX auftraten sowie die Häufigkeit der Nebenwirkungen im Bezug auf die verabreichte Substitutionslösung (FFP vs. Albumin/NaCl) und das Auftreten der Unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen (UAW) bezugnehmend auf die Grunderkrankung der Patienten.

Die in Tabelle 3 aufgeführten Nebenwirkungen lassen sich zum Teil auf das infundierte Plasma zurückführen, zum Teil gehen sie aber auch mit der Plasmapherese einher. Daher muss hier zwischen Plasma-assoziierten und Plasmapherese-assoziierten Komplikationen unterschieden werden.

<b>Alle Komplikationen</b>	<b>873</b>
<b>Anzahl der TPE Bandlungen mit Komplikationen</b>	<b>614</b>
Fieber	133 (7,7 %)
Urtikaria	128 (7,4 %)
Symptome der Hypokalzämie	126 (5,8 %)
Pruritus	101 (5,8 %)
Tachykardie	96 (5,6 %)
Hypotension (<95 mmHg)	96 (5,6 %)
Nausea	56 (3,2 %)
Emesis	47 (2,7 %)
Schwindel	23 (1,3 %)
Schwere Hypotension (<85 mmHg)	22 (1,3 %)
Blutungen des Zugangs	21 (1,2 %)
Infektion des Zugangs	9 (0,5 %)
Kopfschmerz	6 (0,3 %)
Brustschmerzen	6 (0,3 %)
Atemnot	4 (0,2 %)
Rückenschmerz	2 (0,1 %)
Abdominal Schmerzen	2 (0,1 %)
Angstzustände	2 (0,1 %)
Arrhythmien	2 (0,1 %)
Krämpfe in den Beinen	2 (0,1 %)

**Tabelle 3:** Die Tabelle spiegelt alle aufgetretenen Komplikationen (UAW) der Plasmapheresetherapie im Rhode Island Krankenhaus wieder. Insgesamt wurden 1727 TPE durchgeführt, davon 734 Behandlungen bei 36 TTP Patienten. 190 Behandlungen hatten mehr als eine Komplikation (42).

Eine genauere Auflistung und Auswertung der Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie erfolgt unter Punkt 5.1.4 im Ergebnisteil.

## ***2.6 TTP-like-Syndrom und andere verwandte Mikroangiopathien***

Bei der TTP-Diagnostik nimmt das TTP-like-Syndrom eine spezielle Rolle ein. Es wird häufig mit der sekundären TTP gleichgesetzt, obwohl eine Differenzierung sinnvoll wäre. Das TTP-like-Syndrom äußert sich mit einer kaum oder nicht verringerten ADAMTS13-Aktivität. Ebenso fehlen inhibitorische Antikörper gegen ADAMTS13. Es gleicht im klinischen Bild der TTP, Auslöser für den Krankheitsschub sind jedoch nicht bekannt. Therapiemaßnahme der Wahl ist somit ebenfalls die Plasmapherese (7). Pathophysiologisch wird ein anderer Enzymdefekt vermutet, da ADAMTS13 nicht betroffen ist. Da sich aber trotzdem die Merkmale einer thrombotischen Mikroangiopathie (TMA) präsentieren, wird ein Defekt in der VWF-Thrombozyten Interaktion vermutet.

Die thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) sind eine pathophysiologisch heterogene Gruppe von Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit in einem Verschluss der kleinsten Gefäße liegt. Es finden sich in den meisten Fällen eine Thrombozytopenie infolge der Thrombozytenaggregation in der Mikrozirkulation sowie eine mikroangiopathische hämolytische Anämie. Als Zeichen der mechanischen Schädigung der Erythrozyten treten Fragmentozyten im Blutausstrich auf. LDH steigt als hinweisgebender Marker auf eine Gewebes-Ischämie, Hämolysen, sowie Nekrosen (52, 53).

Durch die Ähnlichkeit der Symptome ist eine Unterscheidung der einzelnen TMAs oft schwierig. Während bei der TTP die neurologischen Symptome imponieren, stehen bei der HUS neben den Symptomen der TMA vor allem die renale Symptomatik im Vordergrund. Generell haben die TMAs aber eine sehr unterschiedliche Genese.

Die Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verschiedenen Formen der TMA, wobei die Unterteilung nach der ADAMTS13-Aktivität im Plasma gewählt wurde.

<b>Schwerer ADAMTS13-Mangel (TTP)</b>
<b>1. primäre TTP</b>
Hereditär
Idiopathisch
<b>2. sekundäre TTP</b>
HIV assoziiert
Medikamenteninduziert
Malignom assoziiert
Schwangerschaft assoziiert
<b>Nachweisbare ADAMTS13-Aktivität</b>
<b>1. HUS</b>
durch enteropathogene Bakterien
atypische HUS mit Komplement Dysfunktion
atypische HUS mit Streptococcus pneumoniae
atypische HUS mit Cobalamin Metabolismusstörungen
<b>2. TTP-like Syndrom</b>
<b>3. andere TMAs</b>
HIV assoziiert
Malignom assoziiert
Bindegewebserkrankungen
Medikamenteninduziert
Idiopathisch
<b>4. HELLP Syndrom</b>
maligne arterielle Hypertonie, Antiphospholipid Syndrom, Typ II HIT, VOD, DIC

**Tabelle 4:** In Anlehnung an die molekularbiologisch basierte Unterteilung der TMAs. Nach (54).

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Patientenkollektiv für die Befragung**

#### **3.1.1 Patientenbefragung**

Für die Patientenbefragung wurden Patienten mit wenigstens einer TTP-Manifestation aus der hämatologischen Ambulanz der III. medizinischen Klinik der Universitätsmedizin ausgewählt. Mithilfe eines Fragebogens wurde zu zwei Zeitpunkten (Sommer 2009 und Sommer 2010) die Anamnese der Patienten erfragt. Um eine möglichst breite Patientengruppe erreichen zu können, wurde der Fragebogen in schriftlicher Form an die Patienten verschickt und als Onlinefragebogen über [www.onlinefragebogen.de](http://www.onlinefragebogen.de) für die Patienten zugänglich gemacht. Der Zugang zum Onlinefragebogen ([www.onlinefragebogen.de](http://www.onlinefragebogen.de)) wurde den Patienten deutschlandweit über das TTP-Forum der Selbsthilfegruppe ([www.ttp-forum.de](http://www.ttp-forum.de)) ermöglicht. Die Patientenbefragung wurde im Sommer 2010 endgültig abgeschlossen. Den Patienten wurde ermöglicht, die Angaben zu ihrer Krankheitsgeschichte anonymisiert abzugeben. Alle Angaben konnten freiwillig und unabhängig voneinander getätigt werden. Insgesamt beantworteten 87 TTP-Patienten den Fragebogen.

Die statistische Auswertung der Patientendaten wurde mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS® Statistics 19v der Firma IBM® durchgeführt. Die statistische Betreuung erfolgte durch Professor Dr. M. B. vom Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik in Mainz. Für die Auswertung der Fragebögen wurden deskriptive Statistiken und Korrelationen nach Spearman-Rho verwendet.

### **3.2 Untersuchungssubstanzen**

#### **3.2.1 Normalkollektiv**

Zur Erstellung des Normalkollektivs erfolgt eine venöse Blutabnahme bei je 15 männlichen und 15 weiblichen gesunden Probanden im Alter von 20 bis 60 Jahren. Die durch Venenpunktion mit Hilfe von Nadeln des Butterfly-Typs (Größe 0,8 mm) entnommenen 10 ml Citratblut werden für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird das Plasma im Überstand abpipettiert, gepoolt und in 500 µl Portionen bei -20 °C eingefroren.

Dieses Normalkollektiv (Normalpoolplasma, NP) dient als Positivkontrolle und interner Standard. Zusätzlich wird zur Erstellung einer Kalibrationsreihe sowohl unbehandeltes als auch deaktiviertes Poolplasma (d-Pool) benötigt. Die Deaktivierung des Poolplasmas erfolgt durch eine 30-minütige Hitzeinaktivierung im Wasserbad bei 60 °C. Anschließend wird das hitze-

inaktivierte Plasma für 10 Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Das dadurch entstandene deaktivierte Plasma wird als d-Pool markiert.

Alle gesammelten Plasmaproben wurden nach der vorbereitenden Verarbeitung in 500µl-Portionen aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

### **3.2.2 Patientenkollektiv**

Das Citratplasma wurde auf gleich Weise wie beim Normalkollektiv von Patienten der hämatologischen Ambulanz der III. medizinischen Klinik der Universitätsmedizin in Mainz mit TTP, TTP-Like Syndrom, HUS und VWS zu Untersuchungszwecken entnommen und bei -20 °C eingefroren.

### **3.2.3 Plasmapräparate**

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

Blutgruppe A: A9271952/D

Blutgruppe B: A9272952/D

Blutgruppe AB: A9275952/D

Blutgruppe 0: A4502452/0

FFP wurde von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz durch Prof. W. Hitzler und den leitenden Oberarzt Dr. R. Conradi zur Verfügung gestellt. Dazu wurden von den gebrauchsfertigen Transfusionsbeuteln die Verbindungsschläuche, die ca. 10 ml Plasma enthalten, abgeschnitten, eingeschweißt, und für den Versuch verwendet. Die FFP-Proben wurden von folgenden Chargen entnommen:

Blutgruppe A: 0965977, 1018505, 1018509, 1018517, 1018545

Blutgruppe B: 0932185, 1018511, 1018518, 1018519, 1018548

Blutgruppe AB: 0960994, 1018639, 1087532, 1087544, 1087570

Blutgruppe 0: 0956523, 1018501, 1018515, 1018526, 1018541

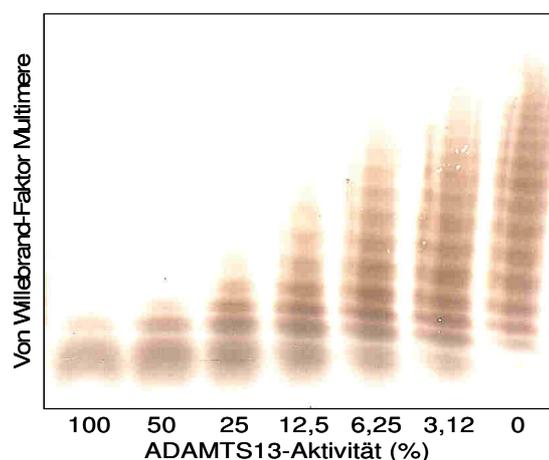
## 3.3 Methoden

### 3.3.1 BCS-Methode nach Böhm

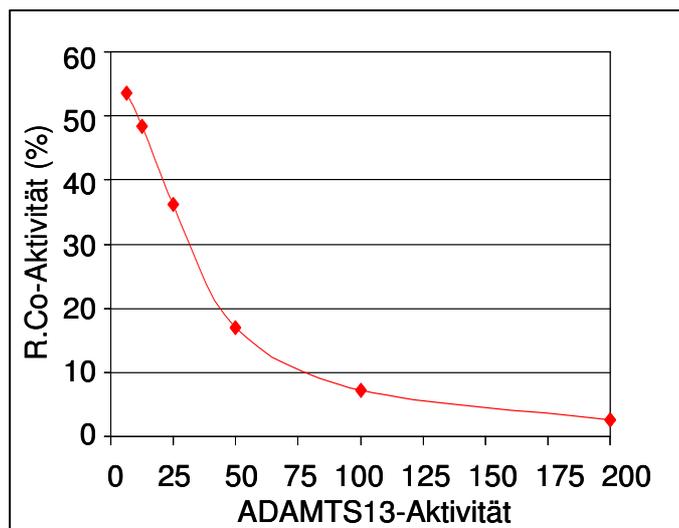
Mit Hilfe der BCS-Methode nach Böhm (55) kann die ADAMTS13-Aktivität indirekt bestimmt werden. Gleichzeitig kann diese Methode auch zur ADAMTS13-Antikörpermessung herangezogen werden.

Im Laufe einer zweitägigen Messung reagiert das sich in der Probe befindliche ADAMTS13 mit dem künstlich zugesetzten VWF. Abhängig von Menge und Aktivität der Protease ADAMTS13 wird der VWF dabei unterschiedlich stark proteolytisch abgebaut und verliert dadurch die Fähigkeit mit Thrombozyten zu agglutinieren. Der Grad seiner „Klebrigkeit“ gegenüber Thrombozyten kann daher für die Messung der ADAMTS13-Aktivität genutzt werden. Hierfür werden dem Probenansatz hochgereinigte Thrombozyten und das Antibiotikum Ristocetin zugesetzt, welches durch eine Veränderung des Bindungsepitops des Glykoprotein-Rezeptors Iba die Bindungsfähigkeit von Thrombozyten gegenüber dem VWF verbessert. In Anwesenheit von Ristocetin lagern sich somit hochmolekulare VWF-Multimere und Thrombozyten zusammen. Diese Agglutinate fallen aus und der Probenansatz klart auf. Liegt hingegen überwiegend niedermolekularer, funktionsloser VWF vor, bleibt die Flüssigkeit trüb.

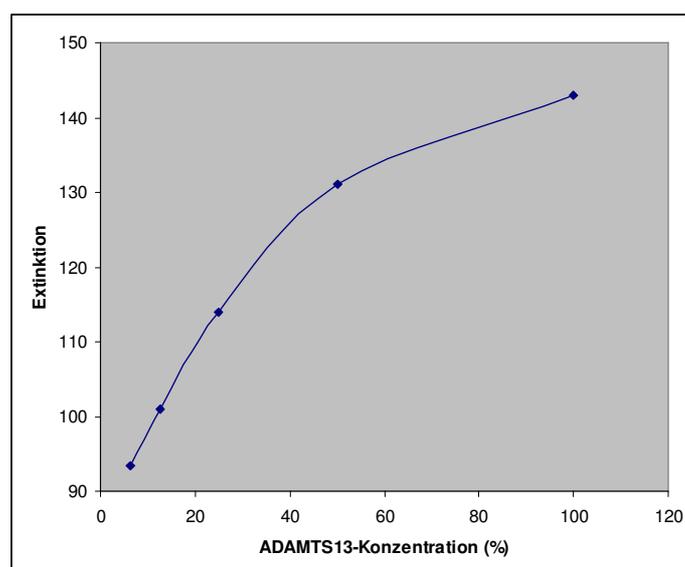
Um aus dem Probenansatz die ADAMTS13-Aktivität zu errechnen, welche sich umgekehrt proportional zur „Klebrigkeit“ des VWF verhält (Abb. 5, 6), wird die optische Dichte (Extinktion) des Probenansatzes photometrisch erfasst und mit der der Kalibrationskurve verglichen (Abb. 7).



**Abb. 5:** Verschieden lange VWF-Multimere bei unterschiedlicher ADAMTS13-Aktivität aufgetrennt in der SDS-Agarose-Gelelektrophorese. Aus (55).



**Abb. 6:** ADAMTS13-Aktivität in Abhängigkeit von der Ristocetin-Cofaktor-Aktivität. Aus (55).



**Abb. 7:** Kalibrationskurve des Probenansatzes mit Extinktionswerten für die Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität mittels der BCS-Methode nach Böhm. Aus (55).

### 3.3.1.1 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 <sup>®</sup> System:	BCS Service Line Hämostase, Siemens HealthCare Diagnostics
Macintosh Computer:	BCS-Software

#### Hilfsmittel

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

#### Chemikalien

Aqua destillata, Delta Select

Aqua ad iniectabilia, Delta Select

Tris- Hydroxymethylaminomethan (TRIS), Carl Roth GmbH & CoKG

Pefabloc<sup>®</sup> SC (4-(2-Aminoethylbenzolsulfonylfluorid-hydrochloride), Merck KGaA

BaCl<sub>2</sub>, p.A. MERCK

Urea, SIGMA<sup>®</sup>

Wilfactin 100 UI/ml, LFB Biomédicamentes, France

BC von Willebrand-Reagenz, Siemens HealthCare Diagnostics

#### Medien

Reaktionspuffer: 12,5 ml 5 mmol/l TRIS-Puffer pH 8  
3 mg Pefabloc<sup>®</sup>  
156 µg 1 mol/l BaCl<sub>2</sub>

TRIS-Urea Puffer: 15 g 5 mol/l Urea  
ad 50 ml 5 mol/l TRIS-Puffer pH 8

Substratpuffer: 0,1 % Wilfactin<sup>®</sup>  
in TRIS-Urea Puffer

### **3.3.1.2 Methode**

Vor Beginn des Versuchs werden die Plasmaproben, das Poolplasma und das d-Pool im Wärmeschrank bei 37 °C aufgetaut und die benötigten Medien hergestellt.

Zu Beginn der Versuchsreihe wird mit Hilfe des Poolplasmas und d-Pools (Herstellung siehe Kapitel 3.2.1) eine serielle Verdünnung der Proben durchgeführt (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 %), welche zur Erstellung der Kalibrationsgerade dient (siehe Abb. 7). Gleichzeitig läuft eine weitere 50 %ige Verdünnung von Poolplasma mit d-Pool als interner Standard mit.

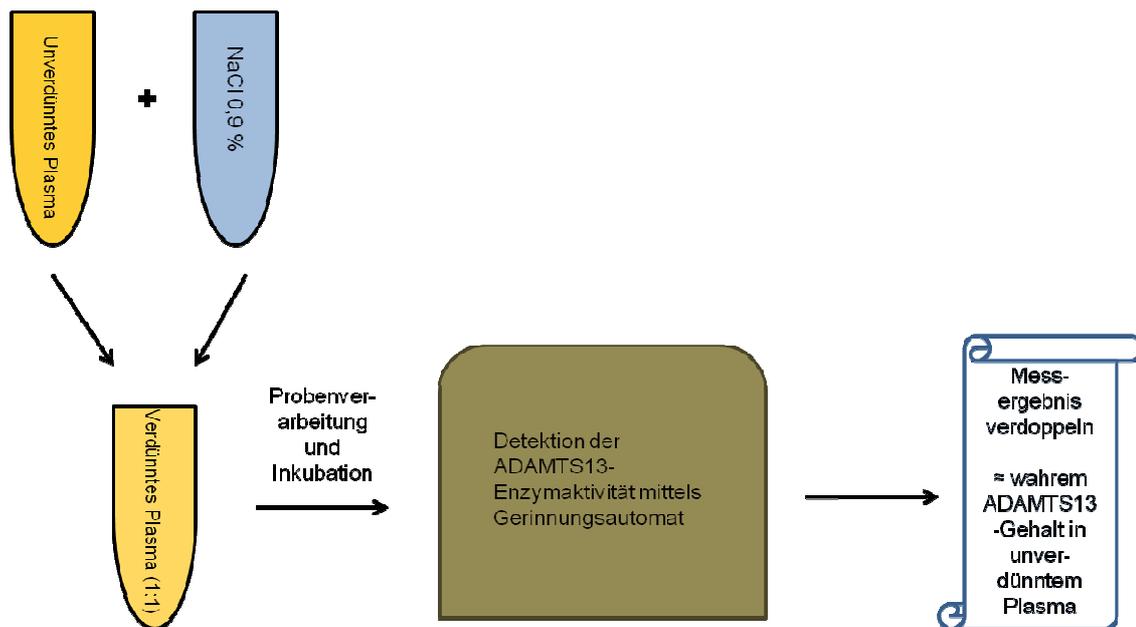
Jede Probe wird doppelt angesetzt und jeweils 15 µl jeder Probe werden mit 300 µl Reaktionspuffer und 150 µl Substratpuffer versetzt. Diese Ansätze werden kurz auf der Rüttelplatte gemischt und im Anschluss im Wärmeschrank 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Vor der Messung der Ansätze wird das lyophilisierte BC-Reagenz, welches vor allem Ristocetin und hochgereinigte Thrombozyten enthält, mit 4 ml Aqua ad iniectabilia aufgelöst. Zur Durchführung der Messung werden das gelöste BC-Reagenz sowie die Ansätze anschließend in Racks überführt und in das BCS-Gerät geschoben.

Zunächst erstellt das Gerät eine Kalibrationsgerade. Hierzu wird den speziell dafür verdünnten Ansätzen das BC-Reagenz zugeführt, wobei das Pipettieren und Auswerten der Messergebnisse automatisch durch das Gerät erfolgt. Sobald die Ergebnisse der Kalibrationsmessung vorliegen, werden die Probenansätze analysiert. Abhängig vom Grad der ADAMTS13-Aktivität liegen unterschiedlich lange VWF-Multimere vor, welche dementsprechend unterschiedlich stark mit Thrombozyten agglutinieren. Anschließend werden die daraus entstandenen Trübungsunterschiede zwischen den Proben photometrisch erfasst und zuletzt errechnet die Computersoftware über die Ristocetin-Cofaktor-Aktivität und unter Einbeziehung der Kalibrationskurve die ADAMTS13-Aktivität in Prozent.

Da die BCS-Methode nach Böhm ein Detektionslimit von 100 % ADAMTS13-Aktivität hat wurden die Plasmaproben für diesen Versuch auch in einer 50 %igen Verdünnung gemessen, da gehäuft Werte > 100 % von dem Gerinnungsautomaten detektiert wurden.

Abb. 8 stellt den Versuchsaufbau für die verdünnten Proben graphisch dar. Nach der Aktivitätsbestimmung wurden die Werte verdoppelt, um den wahren Aktivitätsgehalt der Probe zu eruieren.



**Abb. 8:** Aufbau der Verdünnungsreihe. Die detektierte ADAMTS13-Aktivität soll durch Verdopplung des Messergebnisses den wahren Enzymgehalt der unverdünnten Probe widerspiegeln.

### 3.3.2 Bestimmung des ADAMTS13-Antikörpers

Durch den ADAMTS13-Antikörpertest können Autoantikörper gegen ADAMTS13 im Patientenplasma nachgewiesen werden, welche durch die verschiedenen Pathomechanismen im Patienten entstehen. Ziel der Methode ist der Nachweis einer verringerten ADAMTS13-Aktivität in einer Plasmaprobe, die sich aus Patientenplasma und inaktiviertem Patientenplasma zusammensetzt. Gemessen wird die Probe mit Hilfe der BCS Methode nach Böhm.

Zur Antikörperbestimmung muss zunächst ein Teil des Patientenplasmas und des Normalpoolplasmas (NP) deaktiviert werden (siehe Herstellung des d-Pool in Kapitel 3.2.1). Für den Versuch in Doppelbestimmung werden 60 µl deaktiviertes Patienten- und ca. 300 µl deaktiviertes Poolplasma (d-Pool) benötigt (55).

Als nächstes werden 35 µl des d-Patientenplasmas mit 35 µl Poolplasma gemischt, für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und abschließend wieder bei 12000 rpm zentrifugiert. Aus diesem Überstand bedarf es je zweimal 15 µl für die Bestimmung der ADAMTS13-Aktivität. Zur Kontrolle mit 50 %iger Aktivität dient eine Probe aus 35 µl d-NP und 35 µl NP.

Zur Bestimmung der Restaktivität wird nun zunächst mit Hilfe von Poolplasma und d-Pool eine serielle Verdünnung durchgeführt (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % und 6,25 %), welche als Kalibrationsgerade dient. Die obengenannte 50 %ige Verdünnung von NP mit d-Pool läuft gleichzeitig als interner Standard mit.

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

Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die Restaktivität der Proben, wie zuvor beschrieben, mit Hilfe des BCS-Gerätes gemessen.

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

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

Der Antikörpertiter wird in Prozentwerte umgerechnet, anhand welcher der Bethesda-Wert (BE) aus der Antikörpertiter-Tabelle entnommen werden kann. So entspricht die Hemmung der ADAMTS13-Aktivität um 50 % z.B. der Bethesda Einheit 1. Klinische Relevanz erreichen Antikörpertiter mit > 0,2 BE.

### **3.3.3 SDS-Gelelektrophorese**

Um qualitative und quantitative Informationen über das VWF-Molekül zu erhalten und um den strukturellen Aufbau des Moleküls darzustellen, wird die SDS-Gelelektrophorese angewendet. Dabei kann die die Selektivität des Gels durch unterschiedliche Agarosekonzentrationen den Anforderungen entsprechend reguliert werden. Da in der TTP-Diagnostik vor allem die Differenzierung zwischen ultralangen VWF-Multimeren gegenüber kleineren VWF-Multimeren von Bedeutung ist, werden niedrig konzentrierte Agarosegele bevorzugt, welche ultralange Multimere detektieren können. Agarosegele in höherer Konzentration hingegen spielen bei der Diagnostik des VWS eine bedeutende Rolle, da ihr erhöhter Siebeffekt deutlich feinere Auftrennungen zwischen den einzelnen Molekülgrößen ermöglicht. Für die Moleküle einer Größenordnung zeigt sich nach dem Anfärben daher eine Tripletstruktur in Form von einer Hauptbande und zwei Satellitenbanden. Die Anzahl der Banden und ihre Intensität, im Vergleich zum Internen Standard, ermöglicht deshalb sowohl eine Aussage über das Vorliegen eines VWS, als auch dessen genaue Typisierung.

#### **3.3.3.1 Materialien**

##### Geräte

Feinwaage:	Sartorius
Rührplatte:	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:	1,5 ml Tubes, Eppendorf CELLSTAR® Tubes 50ml
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
Klammern:	Bulldog

### Chemikalien

Agarose, Typ VII, Sigma-ALDERICH®  
Seakem® HGT (P) agarose, bma products  
Aqua ad iniectabilia, Delta Select  
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS), Carl Roth GmbH & CoKG  
Natrium- Dodecyl- Sulfat (SDS), Carl Roth GmbH & CoKG  
Salzsäure (HCl) 2 mol/l, Merck KGaA  
Natriumchlorid (NaCl), Carl Roth GmbH & CoKG  
Bromphenolblau  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Sigma-ALDERICH®Glycin, Carl Roth GmbH & CoKG  
Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Carl Roth GmbH & CoKG  
Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Carl Roth GmbH & CoKG  
Nitrocellulosemembran 200 \* 100 mm, Schleier & Schueller  
Propan-2-ol (F), Fischer Scientific  
Essigsäure, ROTIPURAN® 100% Carl Roth GmbH & CoKG



---

Elutionspuffer:	3l Aqua ad iniectabilia 21,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,75 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,05 % SDS mit NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 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 % NaCl 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

### **3.3.3.2 Methode**

Grundlage der SDS-Gelelektrophorese sind die Untersuchungen und Methoden nach Bukh et al. (56) von 1986 und Furlan et al. (5) von 1996. Nach dem raschen Auftauen der Proben und des Poolplasmas im Wasserbad werden je 20 µl jeder Probe mit 50 µl Probenpuffer versetzt und 30 Minuten im 60 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dies führt zum einen zur Denaturierung der Proteine, während zum anderen das SDS des Probenpuffers die Absättigung der Ladung herbeiführt.

Zur Herstellung des Trenngels werden Agarose, Typ VII, und der Trenngelpuffer zusammen erhitzt und zwischen zwei drei Millimeter dicke Glasplatten gegossen, die zuvor mit Alkohol gereinigt wurden. Eine U-förmigen Gummilippe, die das Auslaufen des Gels verhindert, und Bulldog-Klammern an den Seiten halten die Gussform zusammen. Der untere Teil der Gummilippe wird nach dem Erstarren des Trenngels entfernt und mit einem Sammelgel der Agarosekonzentration 0,75 % (SeaKem<sup>®</sup> HGT (P)) aufgefüllt. Anschließend kann eine der Glasplatten abgehoben werden, um Taschen in das Sammelgel zu stanzen, in welche jeweils 25 µl der Probe gefüllt wurden.

Um mit der Gelelektrophorese zu beginnen, wird die Glasplatte nun horizontal in die Elektrophoreseapparatur gelegt und mit Hilfe von Filterpapier mit dem Elektrophoresepuffer verbunden, welcher zum einen das Austrocknen des Gels verhindert und zum anderen den Stromkreis schließt. Sobald Strom (20 mA) angelegt wird, erfolgt die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, wobei das dem Probenpuffer zugemischte Bromphenolblau die Lauf-front anzeigt. Nach Ablauf von 30 Minuten werden dann die Taschen im Trenngel mit Sammelgel geschlossen, um den Stromkreis zu schließen und somit gerade Banden zu erhalten. Für eine ausreichende Auftrennung bedarf es einer Laufzeit von mindestens 22 Stunden.

Nach erfolgreicher Trennung der Multimere im Agarosegel wird das Multimermuster auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und für die anschließende Behandlung mit der Antiserumlösung vorbereitet: dazu wird das Gel zunächst für 15 Minuten im Elutionspuffer inkubiert, bevor man es vorsichtig von der Glasplatte löst und auf einen Filter schiebt. Auf das Gel selber werden nun blasenfrei die Nitrocellulosemembran und ein weiterer Filter, der das System nach außen abschließt, aufgelegt. Danach wird dieses Schichtsystem vertikal in die mit Elutionspuffer gefüllte Elutionskammer gespannt, in welcher sich das Multimermuster durch eine von außen an die Kammer angelegte Spannung von 1200 mA innerhalb von zwei Stunden von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran überträgt.

Anschließend müssen die Proteinbanden für die restliche Versuchsdurchführung auf der Membran fixiert werden: zu diesen Zweck wird die Nitrocellulosemembran nach zweistündiger Elution in eine Schale auf der Rüttelplatte gelegt und 20 Minuten mit Fixierlösung behandelt. Der in der Fixierlösung enthaltene Alkohol führt dabei zur vollständigen Denaturierung der Proteinbanden, wodurch diese wasserunlöslich und die Multimere fest an die Membran gebunden werden. Zuletzt wird die Nitrocellulosemembran noch dreimal gründlich mit Aqua dest. gewaschen, um die Reste der Fixierlösung abzuwaschen, und dann für 30 Minuten mit Milchlösung behandelt. Dieser Vorgang dient dazu, sämtliche „freie“ Stellen auf der Membran zu „blockieren“, sodass das anschließend zugegebene Antiserum nicht an der Membran adsorbiert.

Im nächsten Schritt wird die präparierte Nitrocellulosemembran mit einer Antiserumlösung behandelt, um ein Anfärben der Proteinbanden zu ermöglichen: das in diesem Versuch verwendete Antiserum ist ein peroxidase-markierter Kaninchenantikörper (P-266), der spezifisch an den VWF bindet und dadurch sämtliche VWF-Multimere aller Größen auf der gesamten Folie markiert. Vor Beginn der Behandlung mit der Antiserumlösung wird die Nitrocellulosemembran noch einmal mit Aqua dest. gewaschen, um Reste der Milchlösung zu entfernen. Anschließend lässt man die Antiserumlösung über 4 Stunden einwirken, wobei darauf zu achten ist, dass die Folie stets komplett mit Lösung bedeckt ist. Vor dem abschließenden Anfärben der Membran wird das Antiserum abgeschüttet und die Folie gründlich einmal mit Waschlösung 1 und zweimal mit Waschlösung 2 gespült, um sie von jeglichen Antiserum-Rückständen zu befreien, da diese die Färbung verfälschen könnten.

Die im letzten Schritt verwendete Färbelösung 1 enthält Wasserstoffperoxid, welches die Peroxidase des Antikörpers reduziert. Der dabei freigesetzte Sauerstoff reagiert nun mit dem DAB und bewirkt eine Braunfärbung. Der anschließende Zusatz von Färbelösung 2 intensiviert die Färbung der Proteinbanden. Nach dem Abschütten der Färbelösung kann die Nitrocellulosemembran schließlich getrocknet und ausgewertet werden.

### **3.3.4 FRET-Assays zur ADAMTS13-Aktivitätsbestimmung**

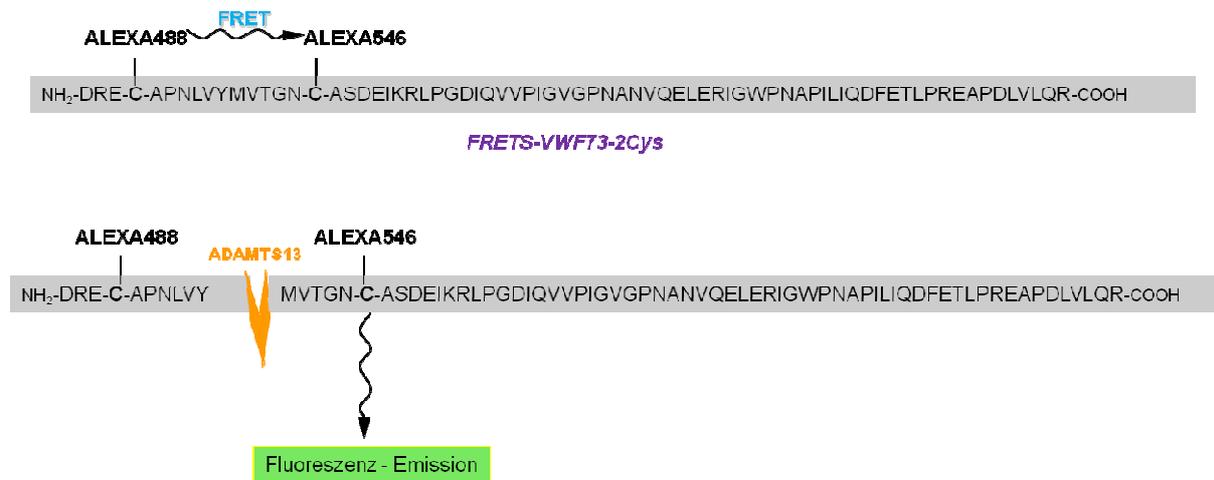
#### **3.3.4.1 Technozym®ADAMTS13 (Technoclon)**

Technozym®ADAMTS13 ist ein ELISA-Kit und kann sowohl zur Messung der ADAMTS13-Aktivität sowie des -Antigens genutzt werden.

Der Versuch basiert auf der fluorescence resonance energy transfer (FRET) Methode, einem physikalischen Prozess, in welchem es durch Dipolwechselwirkungen zu einem Energietransfer zwischen Fluoreszenzmolekülen kommt. Bei Anregung des Donor-Fluorophors verringert sich dessen Fluoreszenz, während gleichzeitig die Fluoreszenz des Akzeptor-Fluorophors zunimmt (= Energietransfer).

Die ADAMTS13-Aktivität wird mit Hilfe einer mit monoklonalen ADAMTS13-Antikörpern beschichteten Platte, die ADAMTS13 bindet, kinetisch gemessen. Als Substrat für die enzymatische Reaktion dient dabei FRET-VWF73, welches 73 Aminosäuren aus der VWF-Aminosäuresequenz enthält und von ADMATS13 zwischen den Peptiden Y1605 und M1606 gespalten wird (Abb. 9). Als Donor-Fluorophor und Akzeptor-Fluorophor werden zwei modifizierte Aminosäuren verwendet, die mit 2-(N-methylamino)benzoyl (Nma) und 2,4-dinitrophenyl (Dnp) substituiert wurden. Verbleibt das Substrat ungespalten, findet bei Anregung mit einer Wellenlänge von 340 nm ein Energietransfer vom Donor (Nma) zum Akzeptor (Dnp) statt. Erfolgt jedoch eine Spaltung des Substrats durch ADAMTS13 kommt dieser

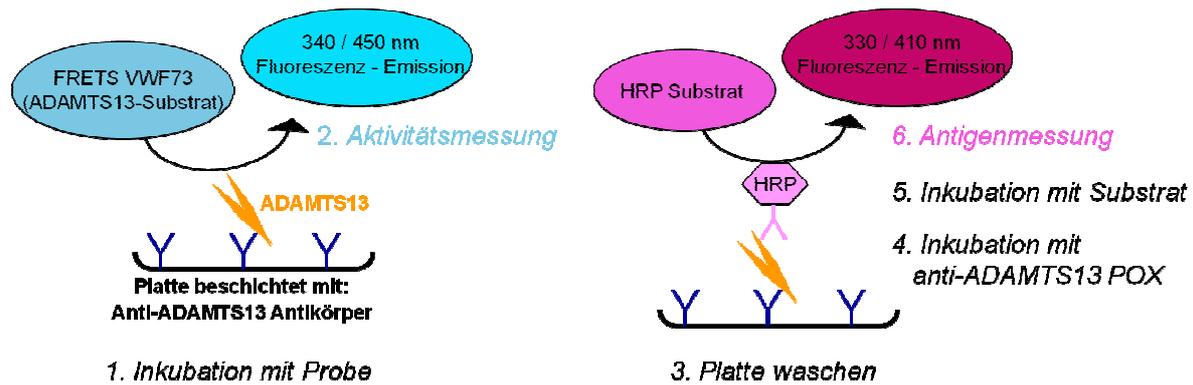
Energietransfer nicht zustande und das Donor-Fluorophor emittiert bei einer Wellenlänge von 450 nm (57).



**Abb. 9:** Struktur von FRETs-VWF73: 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 (57).

Für die Feststellung der Fluoreszenz ist auch die Gaineinstellung des Filters von Bedeutung, welche durch die Verstärkerspannung des Detektors reguliert wird und dessen „Empfindlichkeit“ anzeigt. Ist die Gaineinstellung entweder zu hoch oder zu niedrig, ist eine Unterscheidung der einzelnen Emissionen nicht möglich (58).

Der Nachweis des Antigens erfolgt anschließend durch eine Endpunktmessung, für deren Durchführung der zweite Antikörper anti-ADAMTS13 POX zunächst an ADAMTS13 binden muss. Da HRP (Meerrettichperoxidase) als konjugierte Peroxidase am Antikörper vorliegt, kommt es bei Zugabe des HRP-Substrats und gleichzeitiger Anregung bei einer Wellenlänge von 330 nm bei der Spaltung des Substrats zu einer Energieemission bei 410 nm (Abb. 10).



**Abb. 10:** Schaubild zum Testprinzip (Aktivität und Antigenmessung) von TECHNOZYM® ADAMTS13 ELISA (aus(59)).

### 3.3.4.1.1 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
Stoppuhr:	Abbott Diagnostics

### Chemikalien

Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13, Technoclon, Österreich:

12 ELISA-Teststreifen mit jeweils 8 Testvertiefungen

Waschpufferkonzentrat

Kalibratoren (Standards 1-5)

Kontrollplasmen (hoch und niedrig)

Aktivitätssubstrat

Konjugat

Inkubationspuffer

Antigensubstrat

Stabile Peroxidlösung

Stopplösung für Antigensubstrat

Abklebefolien

Aqua destillata, Delta Select

### Medien

Waschpuffer:                      Waschpufferkonzentrat 1 Volumenteil

    Aqua destillata 9 Volumenteile

#### **3.3.4.1.2 Methode**

Zur Vorbereitung des Versuchs werden alle Proben und die benötigten Testkomponenten zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Während die Plasmaproben für die Versuchsdurchführung im unbehandelten, unverdünnten Zustand verwendet werden, erfolgt die Rekonstitution der Kalibratoren und Kontrollplasmen mit 500 ml Aqua dest. innerhalb von 15 Minuten. Anschließend werden die Reagenzien für 10 Sekunden vorgetextet; sie sind nun gebrauchsfertig.

Im nächsten Schritt pipettiert man die Kalibratoren, Kontrollplasmen und Plasmaproben (jeweils 50 µl im Doppelansatz) zügig in die Testvertiefungen der ELISA-Teststreifen, wobei sowohl das exakte, blasenfreie Pipettieren als auch die genaue Dokumentation der Reihenfolge der aufgetragenen Proben wichtig sind. Da pro Versuchsdurchlauf maximal sechs Teststreifen mit jeweils acht Testvertiefungen verwendet werden können, können insgesamt 48 Proben gemessen werden. Mit Folie abgedeckt wird die ELISA-Platte im Anschluss auf der Rüttelplatte bei Raumtemperatur 120 Minuten inkubiert.

Mit Hilfe der Mehrkanal-Pipette wird die ELISA-Platte nach der Inkubation dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend gut ausgeklopft. Gleichzeitig kann die Rekonstitution des Aktivitätssubstrats (FRETS-VWF73) mit 3 ml Aqua dest. stattfinden und nach 15 Minuten gemischt werden. Mit der Multipette werden dazu jeweils 50 µl Aktivitätssubstrat pro Testvertiefung auf die gewaschene Platte pipettiert, wobei zu beachten ist, dass das Ak-

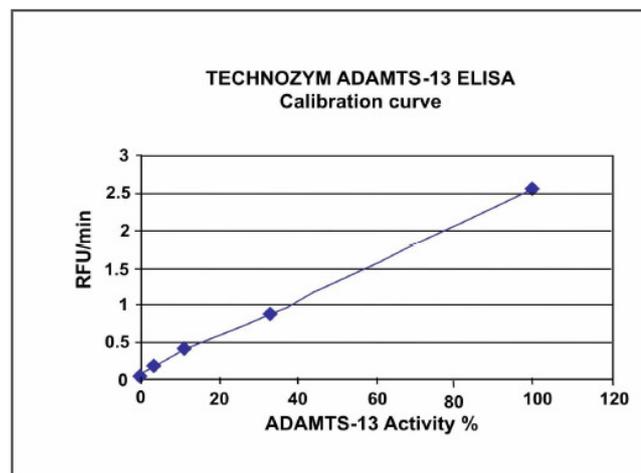
tivitätssubstrat unmittelbar nach der Rekonstitutionszeit zügig aufgetragen wird: laut Angaben des Herstellers darf eine Pipettierzeit von zehn Sekunden pro Teststreifen nicht überschritten werden.

Die kinetische Messung im Fluoreszenz Reader, die bei 30 °C und mit einer Filtereinstellung von 340/450 nm 15 Minuten dauert, muss sofort nach dem Pipettieren des Aktivitätssubstrats begonnen werden. Während der Messung werden jede Minute die „relative fluorescence units“ (RFU) gemessen, welche bei korrekter Einhaltung des Plattenlayouts hinsichtlich der Kalibratoren, Kontrollplasmen und Doppelbestimmungen, als Rohdaten aus dem MARS Data Analysis Programm entnommen und in die TECHNOZYM®ADAMTS13-Auswertesoftware übertragen werden können.

Zunächst wird eine lineare Standardkurve aus den Messergebnissen der Kalibrationen erstellt (Abb. 11):

x-Achse: ADAMTS-13 Aktivität (%)

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



**Abb. 11:** ADAMTS13-Aktivität in Abhängigkeit von der Fluoreszenz (aus (60)).

Die ADAMTS13-Aktivität der Proben wird dann an der Standardkurve abgelesen. Die Auswertbarkeit des Versuchsdurchlaufs wird durch die Kontrollwerte und den Variationskoeffizient (CV) der Doppelbestimmungen, welcher nicht über 15 % liegen sollte, angezeigt. Die untere Nachweisgrenze der ADAMTS13-Aktivität liegt bei diesen Messungen bei 2 %, die obere bei 102,4 %.

Nach erneutem Waschen der Platte erfolgt im Anschluss die Antigenmessung. Hierzu wird zunächst die Konjugatgebrauchslösung (anti ADAMTS13 POX) vorbereitet, indem ein Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnt wird. Jeweils 50 µl dieser Lösung werden dann mit der Multipette in die Testvertiefungen der Platte pipettiert, bevor die Platte für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf der Rüttelplatte inkubiert. Nach einer weiteren

Waschung der Platte wird dann die Antigensubstrat-Arbeitslösung (HRP-Substrat) im Verhältnis von einem Volumenteil stabiler Peroxidlösung und neun Volumenteilen Antigensubstrats hergestellt. Von dieser Lösung werden erneut je 50 µl in die Testvertiefungen pipettiert und anschließend wird die Platte nach Abdecken mit frischer Folie bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Zuletzt pipettiert man je 50 µl der fertigen Stopplösung in die Testvertiefungen und schüttelt die Platte für zehn Sekunden. Im Anschluss kann nun die Endpunktmessung bei 330/410 nm erfolgen. Wie bei der ADAMTS13-Aktivitätsbestimmung kann die endgültige Auswertung der dabei gewonnenen Daten mit Hilfe der TECHNOZYM® ADAMTS-13 Auswertesoftware durchgeführt werden.

Die lineare Standardkurve zeigt an (Abb. 12):

x-Achse: ADAMTS-13 Antigenkonzentration (µg/ml)

y-Achse: relative fluorescence units (RFU)

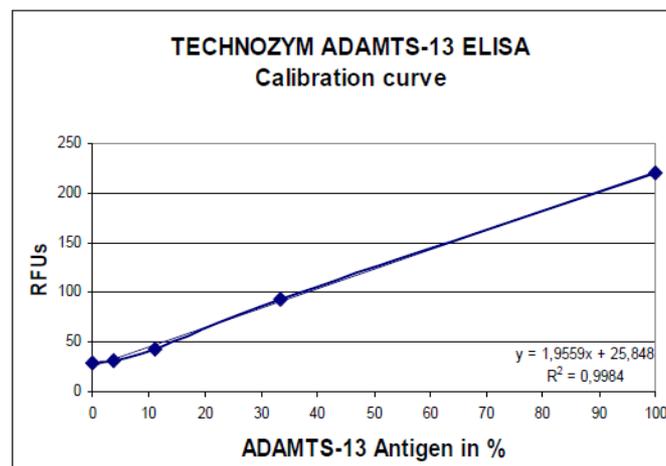
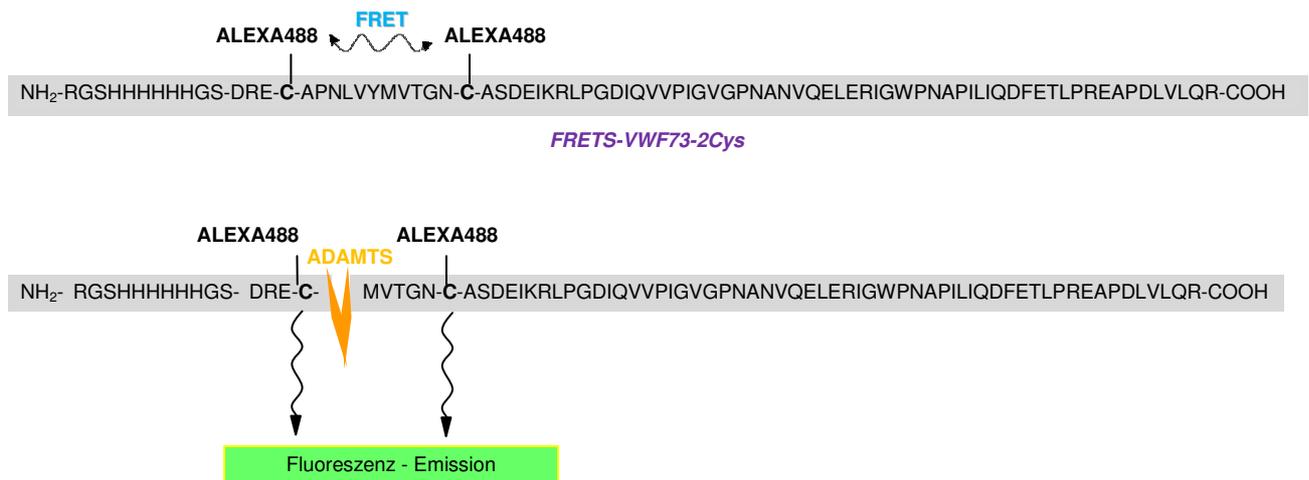


Abb. 12: ADAMTS13-Antigen in Abhängigkeit von der Fluoreszenz (aus (59, 60)).

### 3.3.4.2 Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay (American Diagnostica)

Das Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay bestimmt mit Hilfe von FRET in vitro den Grad der ADAMTS13-Aktivität.

Obwohl das Testprinzip des Assays auf denselben Prinzipien beruht, die im Kapitel 3.3.4 beschrieben wurden, wird im Gegensatz dazu jedoch ALEXA488-VWF86, ein rekombinantes FRET-Substrat, das auf dem Autoquenching von Fluorescien beruht, für die ADAMTS13-Aktivitätsmessung verwendet (61). Das ALEXA488-VWF86 Substrat wird hergestellt, indem die A2 Domäne des VWF-Proteins, D1596-R1668 (VWF73), gentechnisch verändert wird, sodass die Tyrosin-Methionin Schnittstelle von ADAMTS13 von zwei Cysteinen eingerahmt wird (Abb. 13). An diesen können die Fluor-Moleküle ALEXA488 andocken (Donor und Akzeptor).



**Abb. 13:** Struktur von FRET-VWF84aa von D1596 bis R1668. Zwei neuartige Cystein-Bindungsstellen für Fluoreszenzmoleküle wurden in das native VWF-Molekül (Beginn bei DRE) eingefügt: erstes Fluorophor: P28C(ALEXA488), zweites Fluorophor: Q1599(ALEXA488). Die sechs Histamine und zusätzlichen Aminosäuren vor der DER-Region sind aufgrund der Vektoreinfügung in das Molekül eingefügt worden. Untere Bildhälfte zeigt die Fluoreszenz-Emission der Fluorophore nach Spaltung durch ADAMTS13.

Die Fluore der ALEXA-Gruppe weisen eine große Leuchtstärke und Stabilität in einem breiten pH-Bereich (pH 4 - pH 10) vor und sind mit vielen gängigen Fluorimetern kompatibel. Zudem benötigt man zu ihrer Auswertung lediglich eine geeignete Software und entsprechende Detektionsfilter (z.B Extinktion  $\geq 485$  nm, Emission  $\geq 535$  nm).

Das ALEXA488-VWF86-Substrat zeichnet sich durch seine Eigenschaft zum Self-Quenching aus: da die Extinktions- und Emisstionsspektren des ALEXA488 überlappen ist eine Anregung des ALEXA488 gewährleistet. Zudem ermöglicht dieser Test sowohl eine kinetische Messung des ADAMTS13-Gehalts der Probe, als auch eine Messung mit Hilfe der Endpunkt-Methode. Die Wahl der Methode basiert dabei auf der Leistung des zur Verfügung stehenden Fluorimeters. Da in diesem Fall das Fluoroskan Ascent FL Fluorimeter zur Messung genutzt wurde, existiert kein vorgegebener Messbereich, da alle Werte aus der errechneten Standardkurve interpoliert werden können und generell gültige Werte anhand der Kalibrationsgeraden definiert werden. Die Testergebnisse werden in SI Einheiten (ng/ml) angegeben.

### 3.3.4.2.1 *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 Multipipette® 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 10ml
Tube Rack:	1,7 ml 80 Well Tube Rack, LIGHTLABS®
Bechergläser:	Schott AG
Stoppuhr:	Abbott Diagnostics

#### Chemikalien

Actifluor™ ADAMTS13 Activity Assay, American Diagnostica:

Fluoreszenz Mikrotiter Streifen (48 Testvertiefungen)

ADAMTS13 Standard

ADAMTS13 Positivkontrolle

DMSO

ALEXA488-VWF86 FRET Substrat

Assaypuffer

ADAMTS13 inaktiviertes Plasma

Aqua ad iniectabilia, Delta Select

### 3.3.4.2.2 *Methode*

Die Messung in diesem Versuchsaufbau wird mit der Endpunkt-Methode durchgeführt. Vor Beginn des Tests werden alle mitgelieferten Reagenzien nach Herstellerangaben rekonstituiert und alle Plasmaproben zügig auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend verdünnt man sieben ADAMTS13-Standards (120 µl) seriell in 1,5 ml Tubes (100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 0 %). Zudem werden die Plasmaproben (30 µl) und die Po-

sitivkontrollen (30  $\mu$ l) im Verhältnis 1:2 mit ADAMTS13 inaktiviertem Plasma (30  $\mu$ l) verdünnt und vorsichtig gemischt.

Im ersten Schritt pipettiert man 80  $\mu$ l Assaypuffer in jede Testvertiefung und erwärmt den restlichen Puffer im Wärmeschrank auf 37 °C. Dann werden je 20  $\mu$ l ADAMTS13-Standard in die Vertiefungen A1/A2 bis G1/G2 und je 20  $\mu$ l der verdünnten Positivkontrolle in die Vertiefungen H1/H2 pipettiert. Da eine Doppelbestimmung durchgeführt wird, werden im Anschluss noch je 20  $\mu$ l der verdünnten Plasmaproben in jeweils zwei Testvertiefungen (A3/A4 bis H5/H6) pipettiert.

Als nächstes setzt man die Mikrotiterplatte in einen Fluoreszenzreader ein (Ex= 485nm; Em= 535nm; Cut-Off bei 530nm; Temperatur 37 °C) und inkubiert diese bei 3 Minuten im Fluoroskan. Währenddessen wird das ALEXA488-VWF86-Substrat mit dem vorgewärmten Assaypuffer im Verhältnis 1:25 verdünnt, sodass nach Ende der Inkubationszeit je 100  $\mu$ l des verdünnten Substrats in jede Testvertiefung pipettiert werden können. Danach wird die Platte kurz geschüttelt.

Die anschließende Fluoreszenzmessung erfolgt zunächst direkt nach Start der Reaktion (T=0) und erneut nach 20-minütiger Inkubation im Fluoreszenzreader bei 37 °C (T=20). Da das ALEXA488-VWF86-FRET-Substrat von ADAMTS13 an seinen Tyr/Met-Resten proteolytisch gespalten wird, steigt die Fluoreszenz, welche in RFU als Messeinheit angegeben wird, aufgrund der entkoppelten ALEXA-Fluorochrome mit der Zeit an. Anhand der unterschiedlichen Fluoreszenz zwischen der ersten und der zweiten Messung ( $\Delta$ RFU) kann dadurch die ADAMTS13-Aktivität berechnet werden. Hierzu erstellt man zunächst eine Kalibrationsgerade, indem man die Konzentration der Standards in ng/ml gegen  $\Delta$ RFU aufträgt. Mit Hilfe dieser Geraden können dann die ADAMTS13-Konzentrationen der Plasmaproben in ng/ml bestimmt werden. Dabei ist zu beachten, dass die ermittelten Konzentrationen mit dem Faktor zwei multipliziert werden müssen, um die Konzentrationen der unverdünnten Positiv- und Plasmaproben zu erhalten.

### **3.3.5 Imubind<sup>®</sup> ADAMTS13 ELISA (American Diagnostica)**

Das Imubind<sup>®</sup> ADAMTS13 ELISA Kit dient zur Bestimmung der ADAMTS13-Antigen-Menge und basiert auf dem Mechanismus eines Doppel-Sandwich-ELISA. Bei dieser Methode wird das sich in der Probe befindliche ADAMTS13 an einen monoklonalen Fängerantikörper auf der Titerplatte gebunden. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex kann dann durch einen biotinylierten polyklonalen Detektionsantikörper markiert werden, an welchen sich wiederum ein biotinylierter Zweitantikörper binden kann. Zwischen dem Biotin der Antikörper und Streptavidin aus dem Konjugat findet eine Farbreaktion statt, welche durch eine Reaktion zwischen TMB und Meerrettichperoxidase verstärkt wird.

### **3.3.5.1 Material**

#### Geräte

Spektralphotometer	MRX <sup>TC</sup> Revelation, DYNEX Technologies
Wärmeschrank:	Thermo ELECTRON CORPORATION, Heraeus Medical GmbH
Rüttelplatte:	Heidolph Instruments TITRAMAX 100

#### Hilfsmittel

Pipetten:	Eppendorf Reference 100 µl Multipette <sup>®</sup> plus, Eppendorf Digitale Multichannel Pipette 50 – 300 µl, Flow Titerlek <sup>®</sup> 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 <sup>®</sup>

#### Chemikalien

Imubind<sup>®</sup> ADAMTS13 ELISA, American Diagnostica

Antikörperbeschichtete Microtiterstreifen, 96 Testvertiefungen

Acetatabdeckfolie

Testpuffer

ADAMTS13 Standard

Positivkontrolle

Biotinylierter Detektionsantikörper (Anti-Human ADAMTS13 IgG)

Enzymkonjugat (Streptavidin und Meerrettichperoxidase)

Substrat (3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin Perborat (TMB))

Waschpuffer

Aqua ad iniectabilia, Delta Select

### **3.3.5.2 Methode**

Zu Beginn des Versuchs werden sämtliche mitgelieferten Reagenzien laut Herstellerangaben rekonstituiert und 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 durchgeführt. Zu diesem Zweck pipettiert man 200 µl des Standards in die Vertiefungen A1/A2 und je 100 µl des Testpuffers in die Vertiefungen B1/B2 bis F1/F2. Anschließend werden 100 µl des Standards aus Testvertiefung A1/A2 in Testvertiefung B1/B2 gegeben und kurz gerüttelt. Dieser Vorgang wird bis einschließlich F1/F2 wiederholt. Zuletzt pipettiert man 100 µl der Probe aus

F1/F2 heraus und verwirft diesen Rest. Zur Festsetzung des Nullwertes werden 100 µl Testpuffer in Testvertiefung G1/G2 pipettiert.

Im nächsten Arbeitsschritt verdünnt man die Plasmaproben im Verhältnis 1:20 mit Testpuffer und pipettiert je 100 µl Positivkontrolle bzw. verdünnte Plasmaprobe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Danach werden die Vertiefungen mit Folie abgedeckt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

Nach Ende dieser Inkubationszeit werden die Probeninhalte aus den Testvertiefungen entfernt und die Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl Waschpuffer viermal für je drei Minuten gewaschen. Nach jedem Waschvorgang wird die Platte dabei auf einem Papiertuch kräftig ausgeklopft.

Im Anschluss pipettiert man je 100 µl Detektions-Antikörper in jede Vertiefung, deckt die Platte mit Azetatfolie ab und inkubiert diese erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf der Rüttelplatte bei 250 rpm. Es folgt ein weiterer Waschvorgang wie oben beschrieben.

Als nächstes werden 100 µl Enzym-Konjugat in jede Vertiefung pipettiert, für 30 Minuten auf der Rüttelplatte bei Raumtemperatur inkubiert und die Platte wiederholt viermal für je drei Minuten ausgewaschen.

Unmittelbar nach dem letzten Waschvorgang pipettiert man 100 µl Substrat in die Testvertiefungen und lässt den Reaktionsansatz nach Abdecken mit Azetat-Folie für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, wodurch sich eine blaue Farbreaktion entwickelt. Um diese Reaktion zu stoppen, werden 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in die Vertiefungen pipettiert und durch Schwenken gleichmäßig in der Vertiefung verteilt. Nun kann die Extinktion mit einem Spektralphotometer bei 450 nm Wellenlänge innerhalb von zehn Minuten gemessen werden.

Mit Hilfe der Standardkurve, die durch das Auftragen der Mittelwerte der gemessenen Extinktionswerte der einzelnen ADAMTS13-Standards gegen die entsprechenden ADAMTS13-Konzentration erstellt wird, kann die ADAMTS13-Konzentration der verdünnten Plasmaproben interpoliert werden. Um die entsprechende ADAMTS13-Konzentration der ursprünglichen Probe zu erhalten, gilt es dabei zu beachten, dass die Messergebnisse mit dem Faktor 20 multipliziert werden müssen, da die Proben im Verhältnis 1:20 verdünnt worden waren:

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

Da die Testergebnisse verfälscht werden können, wenn das Plasma durch Thrombozyten oder Erythrozyten kontaminiert ist, ist auf die genaue Verarbeitung des Plasmas zu achten. Ebenso können ikterische und lipämische Proben die Testergebnisse verfälschen.

---

### ***3.4 Umrechnung der ADAMTS13-Aktivitätswerte***

Die BCS-Methode nach Böhm und Technozym®ADAMTS13 berechnen die ADAMTS13-Aktivität in Prozent. Um die Einheiten in Internationale Standardeinheiten (SI) umzuwandeln, müssen die Prozentergebnisse mit dem Faktor 7,2 multipliziert werden.

Bei dem Actifluor™ADAMTS13 Activity Assay, das die ADAMTS13-Aktivität in SI-Einheiten angibt, müssen die Messergebnisse durch den Faktor 7,2 dividiert werden um ein vergleichbares Ergebnis in Prozent zu erhalten (Informationen interner Laboruntersuchungen).

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Auswertung des Fragebogens**

Der Patientenfragebogen wurde von insgesamt 87 Patienten beantwortet.

Unter den 87 Patienten waren 80 weibliche und fünf männliche Patienten, zwei Patienten machten keine Aussage zu ihrem Geschlecht. 75 Patienten machten Altersangaben, aus denen sich ein durchschnittliches Patientenalter von 43,5 Jahren (18 bis 81 Jahre) ergab. Die häufigste Blutgruppe der Patienten war die Blutgruppe A (28,7 %), Blutgruppe 0 (25,3 %), Blutgruppe B (13,6 %), die seltenste Blutgruppe AB (6,9 %) (siehe Häufigkeitstabelle 45 im Anhang).

#### **4.1.1 Allgemeine Patientendaten**

65 Patienten litten unter einer erworbenen TTP und vier Patienten unter einer angeborenen Form der TTP. 18 Patienten konnten keine Aussage über die Ätiologie der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura, unter der sie leiden, machen.

Das mittlere Gewicht der Patienten lag vor Therapiebeginn bei 74,5 kg (52-145 kg), 48 Patienten (55,2 %) beschrieben eine Gewichtsveränderung, die sich bei 21 Patienten als eine Gewichtszunahme nach der Therapie beschreiben lässt. 2,3 % der Patienten hatten einen Gewichtsverlust in Folge der Therapie. Insgesamt lag das Körpergewicht der Patienten nach der Therapie im Mittel bei 79,8 kg. 64 Patienten machten keine Angaben zu ihrem Körpergewicht nach der Therapie.

Von 87 nehmen 43 Patienten regelmäßig Medikamente ein, 34 Patienten sind nicht auf Medikamente angewiesen und zehn Patienten machten keine Aussage über ihre Medikamenteneinnahme. Aus Tabelle 46 im Anhang lassen sich die verschiedenen Medikamente, die von den Patienten eingenommen werden, ablesen. 17 Patienten berichten, dass die regelmäßig L-Thyroxin einnehmen. Diese Aussage muss in Zusammenhang mit der folgenden Auswertung der Vorerkrankungen der Patienten betrachtet werden.

#### **4.1.2 Vorerkrankungen der Patienten**

57,2 % der Patienten gaben mindestens eine weitere Vorerkrankung neben der TTP an (vgl. Tabelle 47 im Anhang). 20,8 % der 44 Patienten mit Vorerkrankungen gaben an, dass sie an einer Vorerkrankung leiden, die in Zusammenhang mit Autoimmunreaktionen gebracht werden kann. Erkrankungen, die in Zusammenhang mit Autoimmunreaktionen stehen sind z. B. Evans-Syndrom, Asthma Bronchiale, Hashimoto-Thyreoiditis, Neurodermitis und andere.

Zwei Patienten litten unter mehr als einer autoimmunassoziierten Vorerkrankung. Tabelle 5 gibt eine genaue Übersicht darüber, welche Vorerkrankungen sich bei dem Patienten anamnestisch erheben ließen. Bei gelb unterlegten Erkrankungen werden in der Pathophysiologie der jeweiligen Erkrankung Zusammenhänge mit autoimmunassoziierten Prozessen gesehen oder vermutet. 24 Patienten machten keine Angabe über ihre Vorerkrankungen.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Keine	29	28,7	37,7	37,7
	Asthma bronchiale	3	3,0	3,9	41,6
	COPD	1	1,0	1,3	42,9
	Herzinsuffizienz	1	1,0	1,3	44,2
	Lungenemphysem	1	1,0	1,3	45,5
	Hypertonie	4	4,0	5,2	50,6
	Hashimoto-Thyreoiditis	3	3,0	3,9	54,5
	Meningitis	1	1,0	1,3	55,8
	Hypothyreose	5	5,0	6,5	62,3
	Karzinom	4	4,0	5,2	67,5
	Tuberkulose	2	2,0	2,6	70,1
	Neurodermitis	1	1,0	1,3	71,4
	Restless-Leg-Syndrom	1	1,0	1,3	72,7
	Sharp-Syndrom	1	1,0	1,3	74,0
	M. Crohn	1	1,0	1,3	75,3
	KHK	1	1,0	1,3	76,6
	Schlafapnoe	1	1,0	1,3	77,9
	HWS-Syndrom	1	1,0	1,3	79,2
	VWS	1	1,0	1,3	80,5
	Keratokonius	1	1,0	1,3	81,8
	rheumatoide Arthritis	1	1,0	1,3	83,1
	Depression	1	1,0	1,3	84,4
	Diabetes mellitus	1	1,0	1,3	85,7
	Epilepsie	1	1,0	1,3	87,0
	Kinderkrankheiten	1	1,0	1,3	88,3
	Tonsillektomie	2	2,0	2,6	90,9
	Appendektomie	1	1,0	1,3	92,2
	Rachitis	1	1,0	1,3	93,5
	Ulcus ventriculi	1	1,0	1,3	94,8
	Apoplex	1	1,0	1,3	96,1

	Evans-Syndrom	1	1,0	1,3	97,4
	Thrombose	1	1,0	1,3	98,7
	Hyperthyreose	1	1,0	1,3	100,0
	Gesamt	77	76,2	100,0	
Fehlend	System	24	23,8		
Gesamt		101	100,0		

**Tabelle 5:** Auflistung der Vor- und Begleiterkrankungen der TTP Patienten. Gelb unterlegte Erkrankungen: möglicher Zusammenhang zu autoimmunassoziierten Prozessen. COPD: chronisch obstruktive Lungenerkrankung; M.: Morbus; KHK: koronare Herzkrankheit, HWS: Halswirbelsäule.

### 4.1.3 Datenerhebung zum TTP-Erkrankungsverlauf

Um sich dem Krankheitsbild der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura anzunähern, mögliche Ursachen für die Erkrankung zu finden und ihren Verlauf zu beurteilen, wurden die Patienten zu Beginn der Befragung gebeten anzugeben, unter wie vielen Krankheitsschüben sie bereits litten. 51,2 % der 87 Befragten erlitten zum Zeitpunkt der Befragung erst einen manifesten Schub. 47,2 % der Patienten erkrankten jedoch schon rezidivierend. Drei Patienten machten keine Angaben. Die genaue Anzahl an TTP-Erkrankungen können der Tabelle 48 im Anhang entnommen werden.

Die Patienten wurden danach gefragt, ob sie Angaben zu den vermuteten Auslösern ihrer TTP-Schübe machen können. Dabei wurden die häufigsten Faktoren abgefragt, die einen Ausbruch der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura hervorrufen können. Unter den 87 Patienten litten 48,8 % Patienten bereits unter rezidivierenden TTP-Schüben, weshalb alle genannten Triggerfaktoren zusammen beurteilt wurden. 18 % der Befragten konnten keine möglichen Trigger für den Ausbruch der Krankheit bei sich nennen oder beantworteten die Frage nicht. Bei 38,7 % der aufgetretenen TTP-Schübe wurde ein Zusammenhang mit einer begleitenden oder vorangegangenen Infektion vermutet. In 24,3 % der Fälle wurden Medikamente als Triggerfaktoren für das Auftreten der TTP verantwortlich gemacht. Bei 5,4 % der TTP Patientinnen trat eine schwangerschaftsassozierte TTP auf und bei 13,5 % der untersuchten TTP-Schübe wurden andere Ursachen für das Auftreten der Erkrankung vermutet. Keiner der Patienten aus der der Kohorte erkrankte an der TTP nach einer Knochenmarkstransplantation. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die vermeintlichen Auslöser der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura bei den befragten Patienten.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Keine Angaben	20	18,0	18,0	18,0
	Infektion	43	38,7	38,7	56,8
	Medikamente	27	24,3	24,3	81,1
	Schwangerschaft	6	5,4	5,4	86,5
	sonstige	15	13,5	13,5	100,0
	Gesamt	111	100,0	100,0	

**Tabelle 6:** Die häufigsten Auslöser und Trigger einer TTP.

Einige Patienten konnten spezifische Angaben zur Art der Trigger-Infektion oder der ursächlichen Medikamente machen. Sofern möglich wurden in Tabelle 49 im Anhang die oben genannten Ursachen weiter aufgeschlüsselt. So ergab sich, dass besonders Kontrazeptiva (6,3 % der Auslöser) eine Triggerfunktion zugeordnet werden konnte. Bei 3,6 % der TTP-Episoden konnten vorausgegangene Antibiotikatherapien, wie zum Beispiel mit einem Chinolon oder Clarithromycin, als Trigger ausgemacht werden. Auch wurden Infekte der oberen Atemwege (1,8 %) oder des Gastrointestinaltrakts (3,6 %) häufiger mit dem Auftreten der TTP in Verbindung gebracht. Neben den bereits Genannten konnte unter dem Punkt „sonstige“ Triggerfaktoren eine längere Periode von körperlichem und psychischem Stress (3,6 %) bei den Patienten als Ursache gesehen werden.

Durch die Pathophysiologie der Erkrankung ergeben sich eindrucksvolle Leitsymptome, die auf das Vorliegen einer thrombotisch thrombozytopenischen Purpura hinweisen können. Um zu erfahren, wie typisch die unter 2.3.2 beschriebenen Symptome, die zur Diagnosestellung herangezogen werden, sind, wurden die Patienten darum gebeten, die Symptome zu Beginn einer TTP-Manifestation retrospektiv zu schildern. Tabelle 7 zeigt eine Übersicht über die häufigsten Leitsymptome der TTP (siehe auch Kapitel 2.3.2), Tabelle 50 (im Anhang) zeigt eine detaillierte Auflistung der Symptome.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	starke Kopfschmerzen	32	14,3	15,4	15,4
	Kribbeln, Taubheitsgefühl	15	6,7	7,2	22,6
	Sehstörung	18	8,1	8,7	31,3
	Somnolenz	27	12,1	13,0	44,2
	sonstige, siehe Tab. 50	116	52,0	55,8	100,0
	Gesamt	208	93,3	100,0	
Fehlend	System	15	6,7		
Gesamt		223	100,0		

**Tabelle 7:** Durch das Auftreten von Thromben in der Mikrozirkulation werden bestimmte Leitsymptome der TTP hervorgerufen, die in dieser Tabelle dargestellt wurden.

Da fast 50 % der Patienten rezidivierende Krankheitsepisoden erlitten, wurden die Leitsymptome zusammengefasst. Somit ergab sich, dass 87 Patienten insgesamt 208 Symptome beschrieben. Am häufigsten wurden starke Kopfschmerzen (15,4 %) und Somnolenz (13,0 %) als Erstsymptome bei einem neuauftretendem TTP-Schub genannt. Neben den in Tabelle 7 beschriebenen Symptomen fanden sich unter dem Punkt „sonstige“ vermehrt Sprachstörungen (8,2 %), Hämatome (7,7 %) und Petechien (6,3 %). Weitere seltenere Erstsymptome sind der Tabelle 50 im Anhang zu entnehmen. 15 Patienten machten keine Angaben zu dieser Frage.

#### **4.1.4 Therapiemöglichkeiten der TTP**

In der Fachliteratur wird regelmäßig über die sinnvollsten und erfolgversprechendsten Therapiemöglichkeiten der TTP diskutiert. Um Auskunft darüber zu erhalten, wie die Therapiemöglichkeiten bei den befragten Patienten aussahen, wurden Fragen zur Therapie in den Fragebogen integriert. Den Goldstandard der Therapie stellt die Plasmapherese (Plasma-Exchange Therapie, PEX) dar.

Im Mittel erhielten die befragten TTP-Patienten 26,5 Plasmapheresen (Tabelle 8) und erlitten bis zum Befragungsende (Januar 2011) im Durchschnitt 2,4 Schübe einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (Tabelle 48 im Anhang). Da 41 Patienten rezidivierend an TTP erkrankten, wurde die Häufigkeit der Plasmapheresetherapie für alle Krankheitsepisoden zusammengefasst. Zusätzlich wurden die durchgeführten Plasmapheresetherapien in Zehner-Gruppen zusammengefügt, um eine vereinfachte Darstellung zu ermöglichen. Bei 23 % der Patienten mussten 21-30 PEX vorgenommen werden, um den Ausbruch der TTP zu heilen. In 17,2 % der Krankheitsfälle reichte eine kurze Therapie mit nur 1-10 PEX aus, um die Betroffenen in eine Remission zu führen. Von einigen Patienten wurde berichtet, dass bis zu 50 PEX nötig waren, um in ihrem Falle eine Remission zu erreichen. 12,6 % der Be-

fragten machten keine Angaben zu dieser Frage. Bei der Befragung wurde speziell darauf geachtet, dass die Anzahl der Plasmapherese-Sitzungen gezählt wurden, nicht die Anzahl der transfundierten Plasma-Konserven.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Fehlend	11	12,6	12,6	12,6
	1 - 10 PEX	15	17,2	17,2	29,9
	11-20 PEX	18	20,7	20,7	50,6
	21-30 PEX	20	23,0	23,0	73,6
	31-40 PEX	11	12,6	12,6	86,2
	41-50 PEX	3	3,4	3,4	89,7
	51-60 PEX	7	8,0	8,0	97,7
	61-70 PEX	1	1,1	1,1	98,9
	71 und mehr PEX	1	1,1	1,1	100,0
	Gesamt	87	100,0	100,0	

**Tabelle 8:** Anzahl der durchgeführten Plasmapheresen bei den TTP-Schüben. Für eine bessere Übersicht wurde die Anzahl der erhaltenen Plasmapheresen in Gruppen zusammengefasst. (PEX: Plasma-Exchange-Therapie).

Im zweiten Folgefragebogen wurde zusätzlich erfragt, ob eine zusätzliche „Off-label“ Therapie mit Rituximab, MapThera<sup>®</sup>, neben der Plasmapherese erfolgte. Dazu musste die Patientengruppe selektiert werden, wobei nur Patienten gewertet werden konnten, die den zweiten Fragebogen beantwortet hatten (76 Patienten). 27 Patienten erhielten zusätzlich zur Plasmapheresetherapie eine Behandlung mit Rituximab, um eine schnellere Remission zu erreichen. 40 der 76 Patienten erhielten keine zusätzliche immunmodulierende Therapie, neun Patienten konnten keine Aussage zu dieser Frage machen. (vgl. Tabelle 9).

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Fehlend	9	11,8	11,8	11,8
	ja	27	35,5	35,5	47,4
	nein	40	52,6	52,6	100,0
	Gesamt	76	100,0	100,0	

**Tabelle 9:** Anzahl der Patienten die zusätzlich zur Plasmapherese-Therapie noch Rituximab erhielten.

Die Kreuztabelle 10 zeigt, wie sich der Einsatz von Rituximab zur Anzahl der Plasmapheresen verhält. Insgesamt konnten Antworten von 72 Patienten für diese spezielle Auswertung herangezogen werden. Eine Therapie mit Rituximab wurde am häufigsten bei einem Krankheitsverlauf, der 21-30 Plasmaaustausch-Therapien erforderte, eingesetzt (in 10 von 17 Fällen). Bei Erkrankungen, die gut auf die Plasmapherese ansprachen (Revision nach 1-20

PEX) wurde in 20 von 28 Fällen auf eine Therapie mit Rituximab verzichtet. Bei schweren Krankheitsverläufen mit 51 bis 60 PEX zeigte sich, dass dort eine zusätzliche Therapieoption in Erwägung gezogen wurde. Bei einem schweren Therapieverlauf mit mehr als 71 Plasma-pheresen wurde jedoch keine zusätzlich Rituximab-Therapie durchgeführt.

Gleichzeitige Therapie mit Rituximab \* mittlere PEX-Anzahl – Kreuztabelle

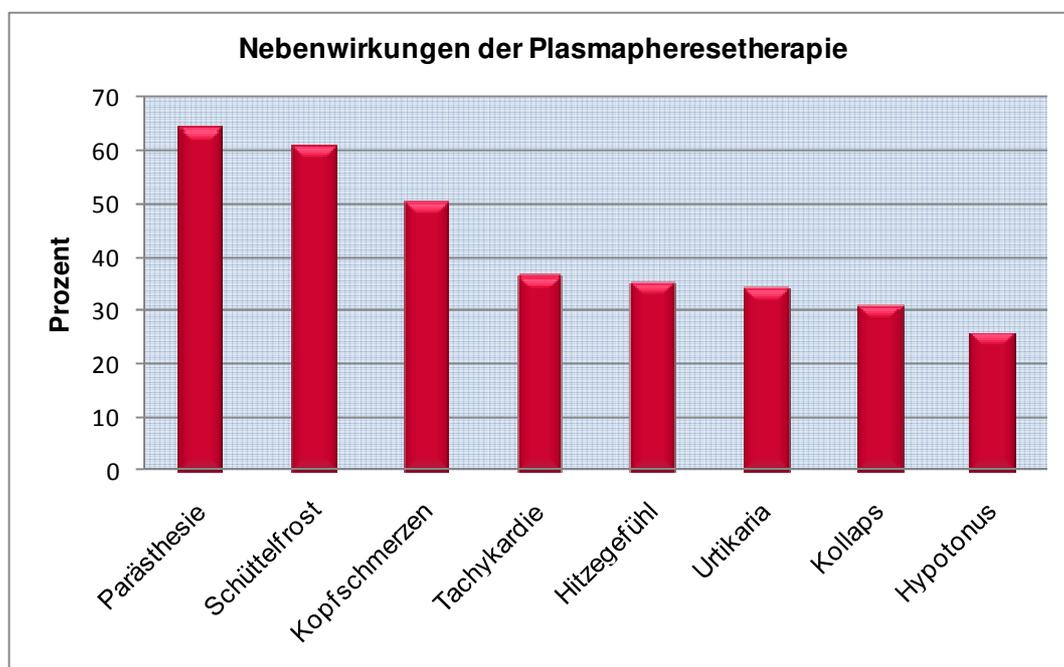
	missing	Mittlere PEX-Anzahl							Gesamt
		1 - 10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	>71	
Gleichzeitige Therapie mit Rituximab	2 28,6%	1 14,3%	0 0,0%	1 14,3%	0 0,0%	0 0,0%	3 42,9%	0 0,0%	7 100,0%
% innerhalb von Gleichzeitige Therapie mit Rituximab									
ja	2 7,4%	3 11,1%	4 14,8%	10 37,0%	5 18,5%	1 3,7%	2 7,4%	0 0,0%	27 100,0%
% innerhalb von Gleichzeitige Therapie mit Rituximab									
nein	3 7,9%	10 26,3%	6 15,8%	6 15,8%	6 15,8%	1 2,6%	1 2,6%	1 2,6%	38 100,0%
% innerhalb von Gleichzeitige Therapie mit Rituximab									
Gesamt	7 9,7%	14 19,4%	14 19,4%	17 23,6%	11 15,3%	2 2,8%	6 8,3%	1 1,4%	72 100,0%
Anzahl									
% innerhalb von Gleichzeitige Therapie mit Rituximab									

**Tabelle 10:** Kreuztabelle: Gleichzeitige Therapie mit Rituximab \* mittlere PEX-Anzahl. „Missing“ Variablen entsprechen den Antworten, die die Frage nicht beantwortet haben.

### 4.1.5 Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie

Es folgt eine Untersuchung der Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie bei Patienten mit thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura. Bekannt ist, dass durch die Gabe von Fresh Frozen Plasma eine Reihe von Nebenwirkungen hervorgerufen werden können. Im Fragebogen wurden die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen der Plasmapherese erfragt.

Zu diesen zählen Schüttelfrost, Hautausschläge (Urtikaria), Kopfschmerzen, Hitzegefühl, Parästhesien, Tachykardie, Hypotonus und Kollaps. Bei der Befragung ergab sich, dass von 87 Patienten nur vier Patienten unter keinen Nebenwirkungen während der Therapie litten. 66 Patienten litten wenigsten unter einer Nebenwirkung, die sowohl durch die PEX an sich, als auch durch das verabreichte Plasma hervorgerufen werden können (Tabelle 51 im Anhang). Abbildung 14 gibt eine Übersicht darüber, wie häufig die Nebenwirkungen bei den Patienten aufgetreten sind. Kribbelparästhesien sind bei 64,4 % der Patienten während der PEX aufgetreten. Als zweithäufigste Nebenwirkung trat Schüttelfrost (61,2 %) auf. Kopfschmerzen (50,6 %), Tachykardie (36,8 %), Hitzegefühl (35,6 %), Urtikaria (34,4 %), Kollaps (31 %) und Hypotonus (26,4 %) waren weitere häufige Nebenwirkungen der Patienten.



**Abb. 14:** Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie (PEX) Weiter Nebenwirkungen, die während der PEX auftraten lassen sich aus Tabelle 52 im Anhang entnehmen. Aus (62).

Zusätzlich wurde erfragt, wie intensiv die Patienten die jeweilige Nebenwirkung der Therapie empfanden. Besonders der aufgetretene Schüttelfrost wurde von den Patienten häufig (21,6 % der Fälle) als sehr schwere Nebenwirkung empfunden. Auch aufgetretene Kollapszustände wurden von 9 % der Patienten als sehr schwer empfunden.

Kribbelparästhesien waren die von den Patienten am häufigsten genannte Nebenwirkung, das Kribbelgefühl empfanden die meisten Patienten jedoch eher als leicht bis stark. Schwere Kribbelparästhesien empfanden 12,6 % der Patienten (siehe Tabelle 11).

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig nicht aufgetreten	23	26,4	31,1	31,1
sehr leicht	8	9,2	10,8	41,9
leicht	11	12,6	14,9	56,8
mäßig	6	6,9	8,1	64,9
stark	15	17,2	20,3	85,1
sehr stark	11	12,6	14,9	100,0
Gesamt	74	85,1	100,0	
Fehlend aufgetreten ohne Stärkenangabe	5	5,7		
System	8	9,2		
Gesamt	13	14,9		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 11:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Kribbelparästhesie.

Die Nebenwirkung, die am zweithäufigsten von den Patienten beschrieben wurde, war Schüttelfrost. Insgesamt litten rund 60 % der Befragten unter Schüttelfrost während der Plasmapheresetherapie. Dabei empfanden 23 % der Patienten nur sehr leichten oder leichten Schüttelfrost, wohingegen bei 21,6 % der Plasmapheresepatienten sehr schwere Schüttelfrostattacken während der Therapie auftraten (Tabelle 12).

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig nicht aufgetreten	26	29,9	35,1	35,1
sehr leicht	6	6,9	8,1	43,2
leicht	11	12,6	14,9	58,1
mäßig	9	10,3	12,2	70,3
stark	6	6,9	8,1	78,4
sehr stark	16	18,4	21,6	100,0
Gesamt	74	85,1	100,0	
Fehlend aufgetreten	5	5,7		
ohne Stärkenangabe				
System	8	9,2		
Gesamt	13	14,9		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 12:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Schüttelfrost.

53,3 % der Patienten beschrieben Kopfschmerz als eine aufgetretene Nebenwirkung während der Therapie mit einem Plasmaaustausch. Hierbei wird von 28 % Patienten jedoch angegeben, dass diese Nebenwirkung nur sehr leicht oder leicht aufgetreten war. Nur 6,7 % der befragten Patienten litten unter stärksten Kopfschmerzen während der Plasmapheresetherapie (Tabelle 13).

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht aufgetreten	35	40,2	46,7	46,7
	sehr leicht	14	16,1	18,7	65,3
	leicht	7	8,0	9,3	74,7
	mäßig	10	11,5	13,3	88,0
	stark	4	4,6	5,3	93,3
	sehr stark	5	5,7	6,7	100,0
	Gesamt	75	86,2	100,0	
Fehlend	aufgetreten	4	4,6		
	ohne Stärkenangabe				
	System	8	9,2		
	Gesamt	12	13,8		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 13:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Kopfschmerz.

Eine weitaus seltenere Nebenwirkung, die von den Patienten beschrieben wurde, stellt die Tachykardie dar (Tabelle 14). Ihr muss jedoch, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Nebenwirkungen, durchaus mehr klinische Relevanz zugeschrieben werden. Von den behandelten Patienten gaben rund 36,8 % an, dass sie während der Therapie unter Herzrasen litten. Die Angaben zu den Schweregrad dieser Nebenwirkung schwankten bei der Befragung sehr. Jedoch zeichnete sich ab, dass Patienten, die während der Therapie unter tachykarden Zuständen litten, diese eher als schwere bis sehr schwere Nebenwirkung einstuften (17,1 % der Patienten).

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht aufgetreten	47	54,0	62,7	62,7
	sehr leicht	8	9,2	10,7	73,3
	leicht	2	2,3	2,7	76,0
	mäßig	5	5,7	6,7	82,7
	stark	8	9,2	10,7	93,3
	sehr stark	5	5,7	6,7	100,0
	Gesamt	75	86,2	100,0	
Fehlend	aufgetreten	4	4,6		
	ohne Stärkenangabe				
	System	8	9,2		
	Gesamt	12	13,8		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 14:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Tachykardie.

Fast genauso häufig wie Tachykardien ist bei den befragten TTP-Patienten während der Plasmaaustauschtherapie Hitzegefühl aufgetreten (35,6 %). Verglichen mit den anderen beschriebenen Nebenwirkungen empfanden die Patienten das Hitzegefühl jedoch als weniger unangenehm. 11,8 % der Befragten beschrieben nur ein sehr leichtes Hitzegefühl, je 10,5 % beschrieben ein leichtes bis mäßiges Hitzegefühl während der Therapie (Tabelle 15).

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht aufgetreten	48	55,2	63,2	63,2
	sehr leicht	9	10,3	11,8	75,0
	leicht	8	9,2	10,5	85,5
	mäßig	8	9,2	10,5	96,1
	sehr stark	3	3,4	3,9	100,0
	Gesamt	76	87,4	100,0	
Fehlend	aufgetreten	3	3,4		
	ohne Stärkenangabe				
	System	8	9,2		
	Gesamt	11	12,6		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 15:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Hitzegefühl.

Eine Nebenwirkung der Plasmapherese, die oft in der Literatur beschrieben wird, stellt Urtikaria dar. Ein urtikarieller Hautausschlag wurde von 34,5 % der Patienten beschrieben. Die Mehrheit der Patienten litt unter sehr leichten (9,1 %) bis mäßigen (10,4 %) urtikariellen Beschwerden. Um einem Hautausschlag vorzubeugen wurden neun der 30 Patienten mit

Hautausschlag mit Antihistaminika oder Cortison vor oder während der PEX behandelt. Eine Patientin erlitt einen allergischen Schock während der Therapie (vgl. Tabelle 16 und 19).

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht aufgetreten	50	57,5	64,9	64,9
	sehr leicht	7	8,0	9,1	74,0
	leicht	3	3,4	3,9	77,9
	mäßig	8	9,2	10,4	88,3
	stark	4	4,6	5,2	93,5
	sehr stark	5	5,7	6,5	100,0
	Gesamt	77	88,5	100,0	
Fehlend	aufgetreten	3	3,4		
	ohne Stärkenangabe				
	System	7	8,0		
	Gesamt	10	11,5		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 16:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Urtikaria.

Am seltensten wurden die ebenfalls schwerwiegenden Nebenwirkungen Hypotonus und kollapsartige Zustände von den Patienten beschrieben.

Während kollapsartige Zustände in verschiedenen Schweregraden bei 31 % der Patienten auftraten, beschrieben 9 % der Patienten ihren Kollaps als besonders schwer, drei Patientinnen berichteten, dass sie während der Behandlung in Koma fielen, eine andere Patientin wurde für mehrere Wochen intensivstationspflichtig. Die Mehrzahl der Patienten, 16,7 %, berichteten jedoch nur über leichte Kollapse, die ohne schwerwiegende Folgen für sie blieben (vgl. Tabelle 17).

Als eine Vorstufe zum Kollaps könnte die Nebenwirkung Hypotonus gesehen werden. Über einen niedrigen Blutdruck klagten 26,4 % der Behandelten. 9,2 % der Patienten beschrieben ihren Blutdruck als nur leicht erniedrigt während der Therapie, während ein starker bis sehr starker Blutdruckabfall von 6,5 % der Patienten verzeichnet wurde (vgl. Tabelle 18).

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht aufgetreten	52	59,8	66,7	66,7
	sehr leicht	13	14,9	16,7	83,3
	leicht	1	1,1	1,3	84,6
	mäßig	2	2,3	2,6	87,2
	stark	3	3,4	3,8	91,0
	sehr stark	7	8,0	9,0	100,0
	Gesamt	78	89,7	100,0	
Fehlend	aufgetreten	1	1,1		
	ohne Stärkenangabe				
	System	8	9,2		
	Gesamt	9	10,3		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 17:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Kollaps.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	nicht aufgetreten	56	64,4	73,7	73,7
	sehr leicht	7	8,0	9,2	82,9
	leicht	5	5,7	6,6	89,5
	mäßig	3	3,4	3,9	93,4
	stark	3	3,4	3,9	97,4
	sehr stark	2	2,3	2,6	100,0
	Gesamt	76	87,4	100,0	
Fehlend	aufgetreten ohne Stärkenangabe	3	3,4		
	System	8	9,2		
	Gesamt	11	12,6		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 18:** Häufigkeitstabelle der Nebenwirkung Hyoptonus.

In Tabelle 61 im Anhang sind weitere Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie, die von den Patienten beschrieben wurden, aufgelistet. Insgesamt wurden noch 35 weitere Nebenwirkungen beschrieben. Häufig wurde über Kribbelparästhesien in den Beinen oder im Gesicht berichtet, sowie über Müdigkeit, Koma, Dyspnoe und Übelkeit.

In der Konzeption des Fragebogens wurde berücksichtigt, dass die Patienten unter mehreren verschiedenen Nebenwirkungen während der Therapie leiden konnten. Somit lässt sich statuieren, dass nur 4,6 % der Befragten unter keinen Nebenwirkungen während des therapeutischen Plasmaaustausches litten.

---

Die Korrelationstabelle (Tabelle 19) beschreibt die Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Nebenwirkungen. Blau markierte Felder symbolisieren Nebenwirkungen, die zum 5 %-Level signifikant oft zusammen auftraten. Rote Felder stehen für Nebenwirkungen die zum 1 %-Level signifikant häufig zusammen auftraten. Aus der Korrelationstabelle lässt sich somit schlussfolgern, dass besonders kreislaurelevante Nebenwirkungen wie Tachykardie, Hypotonus und Kollaps zusammen auftraten. Kopfschmerz und Urtikaria gingen signifikant häufig mit anderen Nebenwirkungen einher, wie zum Beispiel mit Hitzegefühl, oder den oben erwähnten kreislaurelevanten Nebenwirkungen Tachykardie, Hypotension und Kollaps.

Spearman-Rho	Schüttelfr.	Urtikaria	Kopfschm.	Hitzegefühl	Tachycardie	Kribbelp.	Hypotonus	Kollaps
Korrelation Koeffizient	1,000	,022	,302	,011	,384	,298	,012	,159
Sig. (2-seitig)	.	,853	0	,928	,001	,011	,918	,177
N	74	73	73	73	74	72	72	74
Korrelation Koeffizient	,022	1,000	,213	,480	,374	,201	,418	,379
Sig. (2-seitig)	,853	.	,071	,000	,001	,086	,000	,001
N	73	77	73	75	74	74	74	75
Korrelation Koeffizient	,302	,213	1,000	,415	,255	,299	,274	,422
Sig. (2-seitig)	,009	,071	.	,000	,030	,011	,019	,000
N	73	73	75	74	73	72	73	75
Korrelation Koeffizient	,011	,480	,415	1,000	,292	,072	,291	,323
Sig. (2-seitig)	,928	,000	,000	.	,012	,543	,012	,005
N	73	75	74	76	74	73	73	75
Korrelation Koeffizient	,384	,374	,255	,292	1,000	,369	,252	,344
Sig. (2-seitig)	,001	,001	,030	,012	.	,001	,032	,003
N	74	74	73	74	75	73	72	74
Korrelation Koeffizient	,298	,201	,299	,072	,369	1,000	,007	,169
Sig. (2-seitig)	,011	,086	,011	,543	,001	.	,953	,152
N	72	74	72	73	73	74	73	73
Korrelation Koeffizient	,012	,418	,274	,291	,252	,007	1,000	,342
Sig. (2-seitig)	,918	,000	,019	,012	,032	,953	.	,002
N	72	74	73	73	72	73	76	76
Korrelation Koeffizient	,159	,379	,422	,323	,344	,169	,342	1,000
Sig. (2-seitig)	,177	,001	,000	,005	,003	,152	,002	.
N	74	75	75	75	74	73	76	78

\*\* Korrelation ist signifikant zum 0,01 Level.

\* Korrelation ist signifikant zum 0,05 Level.

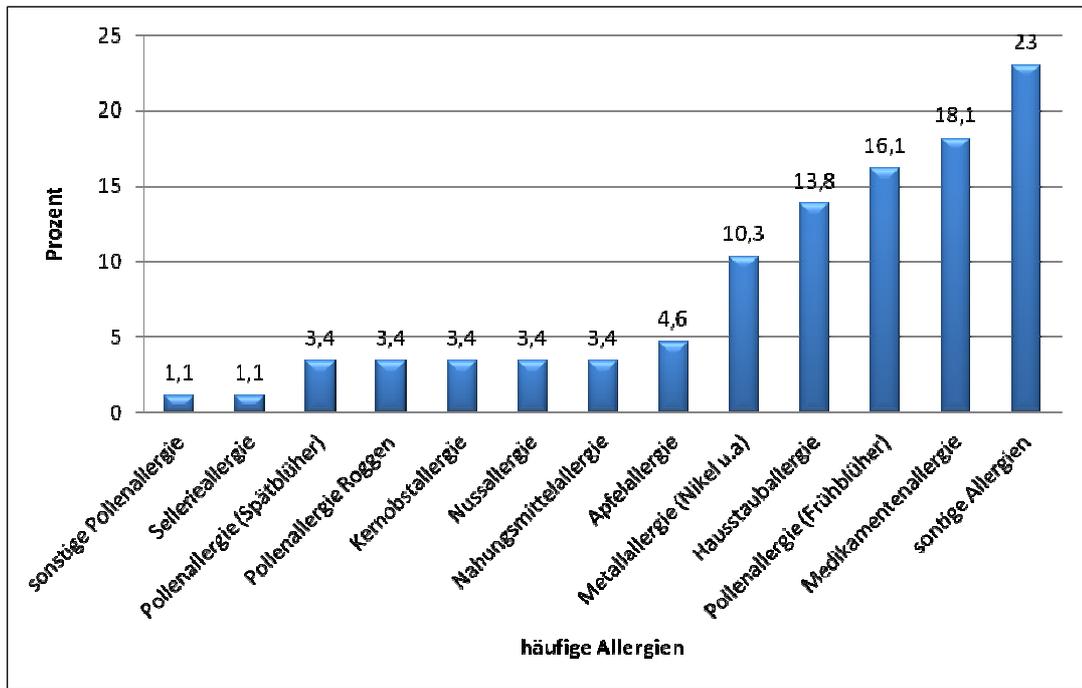
**Tabelle 19:** Korrelation der verschiedenen Nebenwirkungen untereinander. Rot markierte Nebenwirkungen treten signifikant ( $p < 0,01$ ) häufig zusammen auf. Blau markierte Felder sind signifikant zum 0,05 Level. Aus (62).

Zudem wurden die Patienten befragt, mit welchem Plasmaprodukt sie behandelt wurden, entweder dem Fresh-Frozen-Plasma aus Einzelblutspenden oder mit dem pharmazeutisch hergestellten Poolplasma Octaplas®. Bei 70,1 % der Patienten wurden FFP für den Plasmaaustausch verwendet. Nur drei Patienten wurden mit Octaplas® behandelt. 18,4 % der Patienten konnten sich nicht erinnern, mit welchem Plasma sie behandelt wurden und 8 % machten keine Angabe zu dieser Frage (siehe Tabelle 53 im Anhang).

#### **4.1.6 Allergien bei Patienten mit TTP**

Ein weiterer Aspekt des Fragebogens war die Evaluierung von Allergien bei Patienten mit thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura. Hierzu wurde eine allgemeine Allergianamnese bei den Patienten durchgeführt. Mittels des Fragebogens wurden die häufigsten Unverträglichkeiten gegen Nahrungsmittel und Medikamente sowie Hyperreagibilität auf verschiedene Pollenarten, Lebensmittel, Hausstaubmilbe und sonstige Stoffe erfragt.

Bei der Befragung stellte sich heraus, dass 49,5 % der Patienten unter wenigstens einer Hypersensibilität auf einen der oben genannten Stoffe leiden. 29,8 % der befragten TTP-Patienten gaben an, dass sie hyperreagibel auf mehr als einen Stoff seien. 3,4 % der Teilnehmer machten keine Angaben zu dieser Frage (vgl. Tabelle 54 im Anhang). Insgesamt litten 10,3 % der TTP-Patienten unter einer Nahrungsmittelallergie, 18,4 % der Patienten gaben an, unter einer Pollenallergie zu leiden, und ebenso viele haben eine Medikamentenunverträglichkeit. Auf Hausstaubmilben reagierten 13,8 % der Befragten sensibel und auf Metalle reagierten 10,3 % der Patienten (vgl. Häufigkeitstabellen im Anhang, Tabellen 55 - 59). Abbildung 15 zeigt eine genaue Auflistung der Allergietypen unter denen die befragten Patienten litten. Eine Korrelation zwischen der Allergieanzahl und der aufgetretenen TTP-Manifestationen (siehe Tabelle 60 im Anhang) war ohne Signifikanz.



**Abb. 15:** Die häufigsten Allergien der TTP-Patienten.

Durch die Gabe von Plasmapräparaten können allergische Reaktionen auf das substituierte Fremdplasma oder auf das zur Antikoagulation verwendete Citrat bei den Patienten hervorgerufen werden. Tabelle 20 zeigt, bei welchen Plasmapräparaten sich Reaktionen auf das Fremdplasma ereigneten. Bei 34,5 % der Patienten traten allergische Reaktionen auf das verabreichte FFP auf. Auf Octaplas® reagierten 2,4 % der Patienten allergisch. Die allergischen Reaktionen können sich in unterschiedlichen Formen manifestieren (siehe Tabelle 21). Häufig, bei 11,1 % der Fälle, traten Urtikaria auf, Pruritus trat bei 3,9 % der Patienten auf. Als besonders schwere allergische Zwischenfälle ist der anaphylaktische Schock zu nennen, der bei zwei Patienten auftrat. Drei Patienten fielen aufgrund von Überempfindlichkeit gegen das Plasma ins Koma und mussten auf der Intensivstation versorgt werden.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine AR	53	60,9	63,1	63,1
	AR auf FFP	29	33,3	34,5	97,6
	AR auf s/d-Plasma	2	2,3	2,4	100,0
	Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend	System	3	3,4		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 20:** Anzahl der allergischen Reaktionen auf das substituierte Fremdplasma bei der PEX. AR: allergische Reaktion, PEX: Plasmaexchange Therapie.

In Tabelle 21 sind die verschiedenen allergischen Reaktionen auf das substituierte Plasma zusammengefasst. Es konnten bei dieser Frage mehrere Reaktionen gleichzeitig angegeben werden, wodurch bei dieser Frage 46 Antworten erhoben werden konnten. Tabelle 21 schildert die genauen Ereignisse, die die Patienten als allergische Reaktionen auf das Fremdplasma angaben.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine AR	53	51,5	53,5	53,5
	anaphylaktischer Schock	2	1,9	2,0	55,6
	Nausea	2	1,9	2,0	57,6
	Angioödem	3	2,9	3,0	60,6
	Hypotonie	4	3,9	4,0	64,6
	Kribbelparästhesie	4	3,9	4,0	68,7
	Pruritus	4	3,9	4,0	72,7
	Schüttelfrost	7	6,8	7,1	79,8
	Urtikaria	11	10,7	11,1	90,9
	andere	9	8,7	9,1	100,0
	Gesamt	99	96,1	100,0	
Fehlend	System	4	3,9		
Gesamt		103	100,0		

**Tabelle 21:** Allergische Reaktionen, die sich bei den Patienten auf die Verabreichung von Fremdplasma während der PEX entwickelten. AR: allergische Reaktion.

In den meisten Fällen wurden die allergischen Reaktionen, die durch die Gabe von Plasmapräparaten aufgetreten sind, mit einem Antihistaminikum (12,4 %) oder Kortikosteroiden (5,6 %) behandelt (vgl. Tabelle 61 im Anhang). Um citratassoziierte Nebenwirkungen zu behandeln, wurde den Patienten Calcium verordnet (6,7 %). Bei einem Patient, der während der Plasmapheresetherapie mit FFP einen anaphylaktischen Schock erlitt, wurde die Therapie von FFP auf Octoplas<sup>®</sup> umgestellt. Bei 17,2 % der behandelten Patienten traten die Reaktionen auf das verabreichte Plasma wiederholt auf. Bei 8 dieser Patienten kam es zu einer bis vier Wiederholungsepisoden der allergischen Reaktionen während der PEX. Bei vier Patienten traten die allergischen Reaktionen wenigsten mit fünf bis neun Wiederholungen auf. Bei zwei Patienten traten die allergischen Reaktionen bei jedem Plasmaaustausch auf (Ergebnisse nicht dargestellt).

Unter den Patienten, die wiederholt unter allergischen Reaktionen auf das Plasmapräparat reagierten, gab es solche, bei denen eine antiallergische Therapie prophylaktisch vor Beginn der Plasmapherese verordnet wurde. Eine zweite Gruppe von Patienten bekamen Antihistaminika verordnet, wenn allergische Reaktionen während der Plasmapherese aufgetreten waren und eine dritte Gruppe litt, teilweise wiederholt, unter allergischen

Reaktionen, ohne dass eine therapeutische Konsequenz gezogen wurde (14,6 %) (siehe Tabelle 61 im Anhang).

Um eine Plasmapherese durchführen zu können, sind großvolumige Zugänge notwendig. Diese können peripher in der Vena brachialis oder in der Vena femoralis (als Shaldon-Katheter) gelegt werden. Auch ein zentraler Dauerkatheter, der bevorzugt in der Vena jugularis interna oder der Vena subclavia platziert wird, kann als zentrale Zugangsmöglichkeit gewählt werden. Ein peripherer Zugang in der Ellenbeuge unterliegt jedoch den zentralen Zugangswegen. Da die Therapie oft mehrere Tage andauert und große Flüssigkeitsvolumina ausgetauscht werden müssen, bieten die zentralen Zugänge mehr Patientenkomfort und größere Sicherheit für den Patienten während der Therapie. Zentrale Zugänge müssen jedoch operativ eingelegt werden, was unangenehm für den Patienten sein kann.

Tabelle 22 zeigt, wie bei 108 therapeutischen Plasmapheresen die venösen Zugänge gewählt wurden. Bei vier Eingriffen wurde ein peripherer Zugang in der Ellenbeuge gewählt. Der Zentrale Venenkatheter stellt den effizientesten Zugang mit 72,9 % der gelegten Katheter da. Als zweite Wahl wurden periphere Venenverweilkatheter in der Leiste gelegt (23,4 %).

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig Zugang Ellenbeuge	4	3,7	3,7	3,7
Zugang Leiste	25	23,1	23,4	27,1
ZVK	78	72,2	72,9	100,0
Gesamt	107	99,1	100,0	
Fehlend System	1	,9		
Gesamt	108	100,0		

**Tabelle 22:** Punktionsorte für Venenverweilkatheter für die Durchführung der PEX. ZVK: Zentraler Venenkatheter.

Bei 4,5 % der insgesamt 29 peripher gelegten Zugänge (Ellenbeuge und Leiste) gab es Komplikationen, wie zum Beispiel Infektionen der Einstichstelle oder Blutungen. Im Gegensatz dazu traten bei 35,6 % der 78 Zentralvenenkatheter (ZVKs) Komplikationen auf (siehe Tabelle 62 im Anhang). Unter diesen Komplikationsfällen traten bei 14,2 % der Fälle Komplikationen wiederholt auf. Tabelle 63 im Anhang gibt einen Überblick über die Wiederholungstendenz der Komplikationen bei den Venenverweilkathetern.

Die Anlage des ZVKs ist ein risikobehaftetes, invasives Verfahren, das lebensbedrohliche Komplikationen mit sich führen kann. Die Patienten wurden danach gefragt, ob sie Angst

---

vor der Anlage eines ZVKs hätten. 65,5 % der befragten Patienten bejahten dies (Tabelle 64 im Anhang).

## **4.2 Untersuchung der verschiedenen Plasmapräparate**

Vor mehr als 20 Jahren entwickelte die New Yorker Blutbank das sogenannte solvent/detergent Verfahren. Eine Methode mit der sicher behüllte Viren abgetötet werden können. Es stehen verschiedene chemische Kombinationen zur Auswahl um eine Virusfreiheit der Plasmapräparate zu gewährleisten. Damit ein einheitlicher Qualitätsstandard gewährleistet werden kann, müssen die Hersteller regelmäßig ihre Produkte nach internationalen Richtlinien testen und sogenannte *virus validation studies* nach internationalen Vorgaben erfüllen. Zudem muss regelmäßig die Robustheit des pharmazeutisch hergestellten Plasmas überprüft werden, damit der Verlust von Inhaltsstoffen auszuschließen ist (63). In dieser Arbeit wurden das Fresh Frozen Plasma und das pharmazeutisch gewonnene Octaplas® auf ihre ADAMTS13-Aktivität untersucht, um herauszufinden, ob das chemische solvent/detergent Verfahren Auswirkungen auf den ADAMTS13-Gehalt im Plasma hat. Weiterführend soll aus den Ergebnissen ein Schluss über den Einsatz von verschiedenen Plasmapräparaten zur Behandlung der TTP gezogen werden. Wie FFP und Octaplas® gewonnen werden, wurde bereits ausführlich unter 2.4 erläutert. Die untersuchten Plasmapräparate wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz (FFP) durch Herrn Prof. Dr. W. Hitzler und Herrn Dr. R. Conradi, sowie von der Firma Octaplas GmbH Deutschland (Octaplas®) durch Herrn Dr. T. Franken für die Untersuchung dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

### **4.2.1 ADAMTS13-Aktivität in Fresh Frozen Plasma**

Zur Durchführung der ADAMTS13-Aktivitätsbestimmung wurden je fünf Chargen des FFP verwendet. Die ADAMTS13-Enzymaktivität wurde mit verschiedenen etablierten Methoden getestet (siehe Methodenteil 3.2). Die folgende Aufstellung gibt die Ergebnisse der Einzelmessungen wieder und stellt sie anschließend in einem Gesamtzusammenhang dar. Zudem wird ein Vergleich zwischen dem als „Referenzplasma“ verwendeten FFP und dem pharmazeutisch produzierten Plasma, Octaplas®, erstellt.

#### **4.2.1.1 BCS-Methode nach Böhm**

Die BCS-Methode nach Böhm unterliegt einem Detektionslimit von 100 % ADAMTS13-Aktivität. Bei der Versuchsdurchführung mit den Chargen 0965977, 0932185, 0960994 und 0956523 konnten oft ADAMTS13-Aktivitätswerte von > 100 % detektiert werden. Um genauer beurteilen zu können, in welchem Aktivitätsrahmen das gemessene Ergebnis tatsächlich liegt, wurden einige Proben in einer 50 %igen Verdünnung gemessen und anschließend die vermuteten Werte für eine unverdünnte Probe aus der Verdünnungsreihe errechnet (siehe hierzu Kapitel 3.3.1.2)

Die Chargen 0965977, 0932185, 0960994 und 0956523 wurden sowohl unverdünnt wie verdünnt gemessen. Bei der ersten Messung der Chargen mit den Anfangsziffern 108- und 101- wurde in der ersten Messung festgestellt, dass fast ausschließlich Aktivitäten von 100 % ADAMTS13-Aktivität gemessen wurde. Um die Ergebnisse genauer interpretieren zu können, wurden die entsprechenden Chargen in einer 1:1 Verdünnung (50 % Verdünnung) gemessen.

Somit ergaben sich bei den Messungen des FFP der Blutgruppe A die höchsten ADAMTS13-Aktivitätswerte in der Charge 1018509 mit einem Durchschnitt von 127,68 %. Die niedrigste Aktivität ließ sich in der Charge 1018545 mit nur 84,38 % detektieren. Im Durchschnitt enthalten die FFP-Proben der Blutgruppe A eine ADAMTS13-Aktivität von 103,42 % (siehe Tabelle 24).

Die Messergebnisse der Versuchsreihen sind unter M 1- M 5 dargestellt. Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse der verdünnten Plasmaproben an, Tabelle 24 enthält dann die interpolierten Messwerte für unverdünnte FFP-Proben der Blutgruppe A.

Blutgruppe A Charge #	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	MW	s
0965977 (unverdünnt)	90,5 %	90 %	78,5 %	100 %	98,8 %	<b>91,56 %</b>	8,63
0965977 (1:1)					26,89 %		
1018505 (1:1)	65,3 %	48 %	27,75 %	96,05 %		<b>59,27 %</b>	28,92
1018509 (1:1)	64,25 %	53,4 %	67,7 %	70 %		<b>63,84 %</b>	7,35
1018517 (1:1)	56,35 %	35,3 %	30,15 %	68,1 %		<b>47,48 %</b>	17,82
1018545 (1:1)	54,35 %	25,85 %	44,8 %	43,75 %		<b>42,19 %</b>	11,89

**Tabelle 23:** Gemessene Werte (M 1- M 5) für FFP der Blutgruppe A. Die Chargen 1018505, 1018509, 1018517, 1018545 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Die Ergebnisse der Verdünnungsreihe zeigen, dass die Enzymaktivität durch die Verdünnung abnimmt. Jedoch schwanken die Ergebnisse zwischen den einzelnen Messungen teils stark, was an der hohen Standardabweichung abgelesen werden kann.

Errechnet man aus den obigen verdünnten Plasmaproben die ADAMTS13-Aktivität für unverdünnte Proben erhält man folgendes Ergebnis:

Blutgruppe A Charge #	M1	M2	M3	M4	M5	MW	s
0965977 (unverdünnt)	90,5 %	90 %	78,5 %	100%	98,8%	<b>91,56 %</b>	8,63
0965977					53,78%		
1018505	130,6 %	96 %	55,5 %	192,1 %		<b>118,55 %</b>	57,85
1018509	128,5 %	106,8 %	135,4 %	140 %		<b>127,68 %</b>	14,7
1018517	112,7 %	70,6 %	60,3 %	136,2 %		<b>94,95 %</b>	35,64
1018545	108,7 %	51,7 %	89,6 %	87,5 %		<b>84,38 %</b>	23,78
MW aller Chargen der Blutgruppe A						<b>103,42 %</b>	$s_{MW} =$ 18,66

**Tabelle 24:** Errechnete Werte (M 1- M 5) für FFP der Blutgruppe A. Die Chargen 1018505, 1018509, 1018517, 1018545 wurden in dieser Tabelle aus der Verdünnungsreihe der FFP-Proben der Tabelle 23 errechnet. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Fresh Frozen Plasma der Blutgruppe A kann, abhängig von der Charge, ADAMTS13-Konzentrationen mit einer Aktivität von über 100 % enthalten (siehe Mittelwerte Tabelle 24). Die Standardabweichung (s) macht hierbei eine Aussage über die Schwankungen bei den gemessenen Ergebnissen. Das Ergebnis zeigt, dass sich, je nach Charge, physiologische Aktivitätsschwankungen von  $\pm 43,3 \%$  ergeben können. Der Mittelwert aller gemessenen Ergebnisse in Tabelle 24 liegt für die Blutgruppe A bei 103,42 % (s:  $\pm 18,66 \%$ ).

Die Blutgruppen B, AB und 0 des FFP wurden wie die Blutgruppe A ebenfalls verdünnt und unverdünnt gemessen. Aus den 50 %igen Verdünnungen wurde dann, entsprechend der Blutgruppe A, ein Aktivitätswert für die unverdünnte Probe errechnet. Die Wertetabellen für die Messung der verdünnten Proben finden sich im Anhang (Tabellen 74 - 76). Im Folgenden findet sich ein Überblick über die ADAMTS13-Aktivität von unverdünnten Plasmaproben verschiedener Blutgruppen.

Wie bei der Blutgruppe A wurden auch bei der Blutgruppe AB die unverdünnten ADAMTS13-Aktivitätswerte der Charge 0932185 als Referenz gemessen. Die Chargen 1018511, 1018518, 1018519 und 1018548 wurden 50 %ig verdünnt und anschließend aus dem gemessenen Aktivitätswert (siehe Tabelle 65 im Anhang) der Wert für eine unverdünnte Probe ermittelt, um auch Aktivitätswerte von >100 % nachweisen zu können. (Tabelle 25).

Aus den für die Blutgruppe B gemessenen Verdünnungen ergaben sich folgende ADAMTS13-Aktivitätswerte:

Blutgruppe B Charge #	M1	M2	M3	M4	M5	MW	s
0932185	77,7 %	100 %	45,7 %	91,6 %	100 %	<b>95,80 %</b>	22,76
1018511	160,3 %	84,7 %	89,8 %	113,9 %		<b>112,18 %</b>	34,52
1018518	56,4 %	109,3 %	61,9 %	97,6 %		<b>81,30 %</b>	26,12
1018519	62,6 %	116,3 %	143,2 %	78,5 %		<b>100,15 %</b>	36,48
1018548	30,8 %	100,6 %	139,3 %	176,5 %		<b>111,80 %</b>	62,26
MW aller Chargen der Blut- gruppe B						<b>80,22 %</b>	$s_{MW} =$ 12,79

**Tabelle 25:** Gemessene Werte (M1- M5) für FFP der Blutgruppe B. Die Chargen 1018511, 1018518, 1018519, 1018548 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt (vgl. Verdünnungsreihe der Tabelle 65). Anschließend wurde der Wert für eine unverdünnte Probe errechnet. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Die höchsten ADAMTS13-Aktivitätswerte, mit im Schnitt 112,18 %, konnten in der Charge 1018511 nachgewiesen werden. Die niedrigste Enzymaktivität (81,3 %) wurde in der Probe 1018518 gemessen. Insgesamt liegt die mittlere ADAMTS13-Aktivität der gemessenen Chargen der Blutgruppe B bei 80,22 %, und ist somit niedriger als die der Blutgruppe A (103,42 %). Die Schwankungen (s) zwischen den einzelnen Messreihen (M) sind bei der Blutgruppe B ausgeprägter als bei den Ergebnissen der Blutgruppe A. Jedoch liegt die Standardabweichung aller Mittelwerte für die Ergebnisse des FFP der Blutgruppe B mit  $\pm 12,79$  % niedriger als die des FFP der Blutgruppe A ( $\pm 18,66$  %).

Den obigen Darstellungen schließen sich die Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsuntersuchung für FFP der Blutgruppe AB an. Die unverdünnten ADAMTS13-Aktivitätswerte der Charge 0960994 gelten hierbei wiederum als Referenz. Die Chargen 1087532, 1018639, 1087544 und 1087570 wurden 50 %ig verdünnt und anschließend aus dem gemessenen Aktivitätswert (siehe Tabelle 66 im Anhang) der Wert für eine unverdünnte Probe ermittelt, um auch Aktivitätswerte von >100 % nachweisen zu können.

Aus den für die Blutgruppe AB gemessenen Verdünnungen ergaben sich folgende ADAMTS13-Aktivitätswerte:

Blutgruppe AB Charge #	M1	M2	M3	M4	M5	MW	s
0960994	100 %	100 %	87,2 %	100 %	100 %	<b>97,44 %</b>	5,72
1087532	70,6 %	82,3 %	200 %	95,9 %		<b>112,20 %</b>	59,44
1018639	33,4 %	90,6 %	200 %	171 %		<b>123,75 %</b>	75,96
1087544	140,9 %	55,3 %	132,4 %	157,1 %		<b>121,43 %</b>	45,26
1087570	89,1 %	102 %	26,4 %	125,1 %		<b>85,65 %</b>	42,21
MW aller Chargen der Blut- gruppe AB						<b>108,09 %</b>	$s_{MW} =$ 16,26

**Tabelle 26:** Gemessene Werte (M1- M5) für FFP der Blutgruppe AB. Die Chargen 1087544, 1087570, 1087532, 1018639 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt (vgl. Ergebnisse der Verdünnungsreihe der Tabelle 66). Anschließend wurde der Wert für eine unverdünnte Probe errechnet. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

In der Charge 1018639 konnte die größte ADAMTS13-Enzymaktivität gemessen werden (123,75 %), die Charge 1087570 zeigte die niedrigsten Messergebnisse mit 85,65 %. Im Mittel liegen bei den Proben der Blutgruppe AB somit eine Enzymaktivität von 108,09 % vor. Die Schwankungen der Messergebnisse (vgl. s) sind bei dieser Blutgruppe höher als bei den zuvor untersuchten Blutgruppen. Die Standardabweichung für die Mittelwerte der Blutgruppe AB liegt mit  $\pm 16,26$  % zwischen denen für FFP der Blutgruppe A ( $\pm 18,66$  %) und B ( $\pm 12,79$  %).

Die Blutgruppe 0 wurde wie die Proben der anderen Blutgruppen behandelt. Bei den Ergebnissen der Charge 0956523 handelt es sich um die Messergebnisse einer unverdünnten Plasmaprobe, die Chargen 1018501, 1018515, 1018526 und 1018541 wurden in entsprechender 50 %igen Verdünnungen gemessenen (Ergebnisse siehe Tabelle 67 im Anhang). Die Tabelle 27 gibt eine Übersicht über die ADAMTS13-Aktivitätswerte in FFP der Blutgruppe 0, die aus der Verdünnungsreihe errechnet wurden:

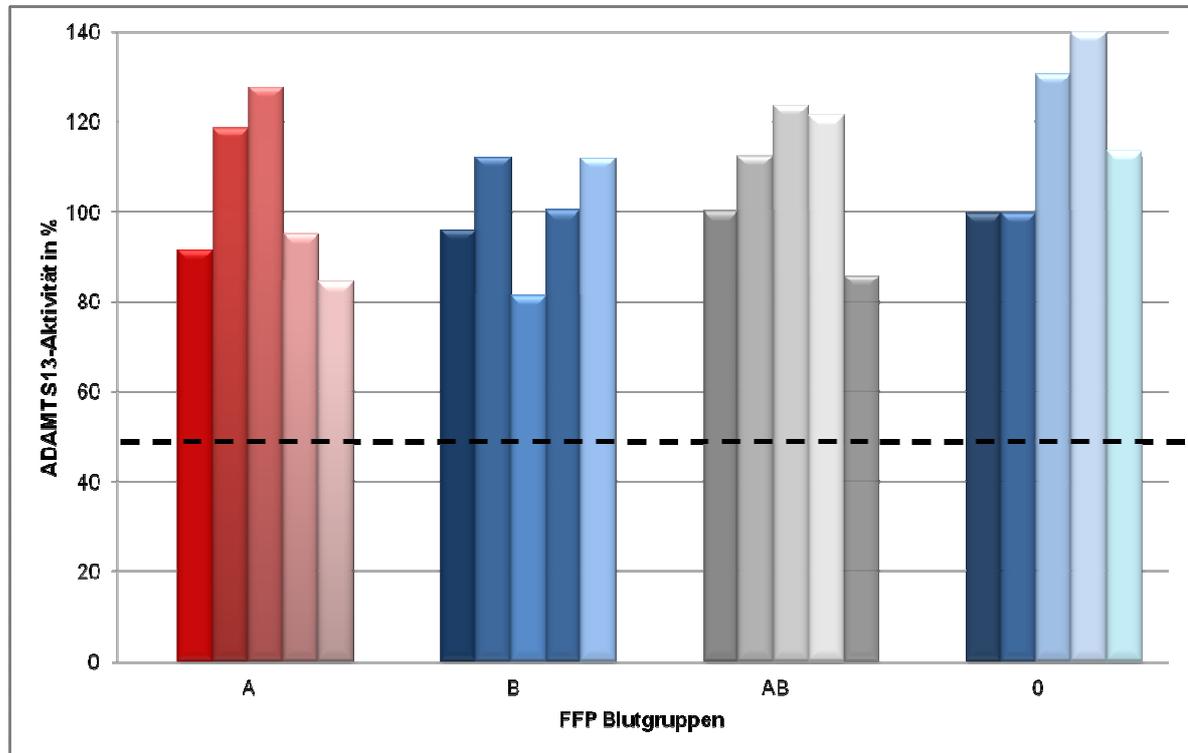
Blutgruppe 0 Charge #	M1	M2	M3	M4	M5	MW	s
0956523	75,2 %	100 %	70,9 %	98,9 %	100 %	<b>99,45 %</b>	14,65
1018501	115,9 %	76,9 %	87,2 %	118,1 %		<b>99,53 %</b>	20,63
1018515	127,9 %	63,4 %	175,9 %	154,9 %		<b>130,53 %</b>	48,87
1018526	65,7 %	155,9 %	165,3 %	172,1 %		<b>139,75 %</b>	49,81
1018541	135,4 %	44,9 %	176 %	97,9 %		<b>113,55 %</b>	55,78
MW aller Chargen der Blutgruppe 0						<b>116,56 %</b>	$s_{MW} = 18,19$

**Tabelle 27:** Gemessene Werte (M1- M5) für FFP der Blutgruppe 0. Die Chargen 1018501, 1018515, 1018526 und 1018541 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt (vgl. Ergebnisse der Verdünnungsreihe der Tabelle 67). Anschließend wurde der Wert für eine unverdünnte Probe errechnet. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

In der Charge 1018526 konnte der bislang höchste ADAMTS13-Gehalt von 139,75 % gemessen werden. Der niedrigste Aktivitätsgrad der Blutgruppe 0 wurde in der Charge 0956523 gemessen (99,53 %). Insgesamt zeigt die Blutgruppe 0 in Mittelwert aller Messungen die höchste ADAMTS13-Aktivität (116,56 %) im Vergleich zu den anderen FFP-Blutgruppen. Die Schwankungen zwischen den Messungen (M) werden durch die Standardabweichung (s) beschrieben. Die Standardabweichung für alle Mittelwerte des FFP der Blutgruppe 0 liegt mit  $\pm 18,19$  % etwas unter dem des FFP der Blutgruppe A.

Als abschließende Zusammenfassung der ADAMTS13-Aktivitätsmessung von FFP mit Hilfe der BCS-Methode nach Böhm, zeigt die Abbildung 16 einen Überblick. Die gestri-

chelte Linie zeigt den Beginn der physiologischen ADAMTS13-Konzentration in Normalplasma.



**Abb. 16:** FFP Blutgruppe A, Chargen von links nach rechts: 0965977 (unverdünnt), 1018505, 1018509, 1018517, 1018545 (errechnete Werte); Blutgruppe B von links nach rechts: 0932185 (unverdünnt), 1018511, 1018518, 1018519, 1018548 (errechnete Werte); Blutgruppe AB von links nach rechts: 0960994 (unverdünnt), 1087532, 1018639, 1087544, 1087570 (errechnete Werte); Blutgruppe 0 von links nach rechts: 0965977 (unverdünnt), 1018501, 1018515, 1018526, 1018541 (errechnete Werte).

Aus Abbildung 16 lassen sich deutlich die ADAMTS13-Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen FFP-Proben erkennen. Je nach Spender schwankt die ADAMTS13-Aktivität im FFP (hier zwischen 81,3 % und 139,75 %), auch zwischen den einzelnen Blutgruppen schwanken die Messwerte. So ließen sich in den Plasmaproben der Blutgruppe 0 die größten ADAMTS13-Aktivitätswerte detektieren, wohingegen Blutgruppe B die niedrigsten ADAMTS13-Werte zeigte.

Um später einen Gesamtvergleich ziehen zu können, wurden die Mittelwerte der Proben 0965977 (A), 0932185 (B), 0960994 (AB) und 0956523 (0) von der Angabe in Prozent in die Standardeinheit ng/ml umgerechnet (siehe Kapitel 3.4). Das Ergebnis ist der Tabelle 28 zu entnehmen.

---

Probe	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
MW in ng/ml	744,62	577,58	778,25	839,23

**Tabelle 28:** umgerechnete Mittelwerte in die Standardeinheit ng/ml. Ergebnisse für Blutgruppe A, B, AB, 0 gemessen mit der BCS-Methode nach Böhm.

#### **4.2.1.2 Technozym® ADAMTS13**

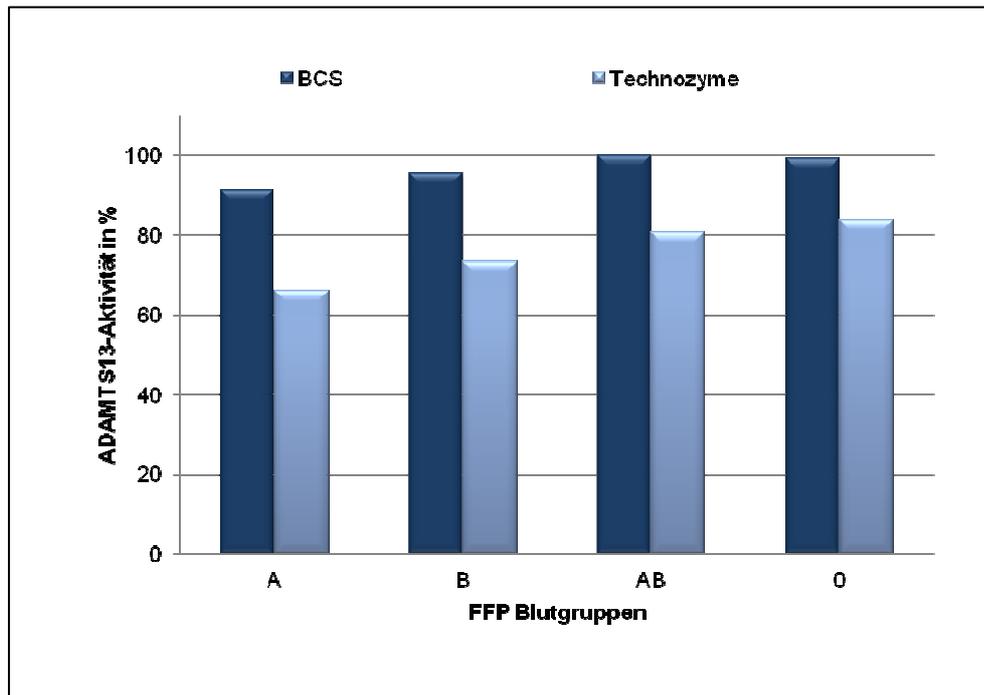
Eine weitere ADAMTS13-Aktivitätsmessmethode wird von der Firma Technoclone unter dem Namen Technozym®ADAMTS13 vertrieben. Der Technozym®ADAMTS13 Assay beruht auf einem grundlegend anderen Detektionsprinzip als die oben vorgestellte BCS-Methode nach Böhm (siehe hierzu Kapitel 3.3.4.1). Die detektierte ADAMTS13-Aktivität wird bei Technozym®ADAMTS13 ebenfalls in Prozent angegeben. Das Detektionslimit liegt bei dieser Methode bei 104,6 %. Der Normalbereich für die ADAMTS13-Aktivität liegt laut Herstellerangaben zwischen 50 – 150 %.

Um einen Überblick über die Messwerte der verschiedenen Methoden zu erhalten wurden nur die FFP-Proben der Chargen 0965977, 0932185, 0960994 und 0956523 unverdünnt gemessen (Tabelle 29).

Messung	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 5
<b>Mittelwert</b>	<b>66,19 %</b>	<b>73,27 %</b>	<b>80,73 %</b>	<b>83,82 %</b>
s	19,05	27,87	33,8	20,01
MW aller	76,00 % ( $s_{MW} = 7,09$ )			

**Tabelle 29:** Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsmessungen mit Technozym®ADAMTS-13 der FFP-Chargen 0965977 (A), 0932185 (B), 0960994 (AB) und 0956523 (0). Alle Angaben in Prozent. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Die Proben der Blutgruppe 0 zeigen bei dieser Methode wiederum, wie auch bei den Ergebnissen mittels BCS-Methode nach Böhm, die höchsten ADAMTS13-Aktivitätswerte mit 83,82 %. Die niedrigsten Aktivitätswerte ließen sich in der Blutgruppe A nachweisen. Wie schon bei der BCS Methode nach Böhm zeigen sich auch hier Schwankungen zwischen den einzelnen Blutgruppen, die durch die Standardabweichung definiert wurden. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die mittels der BCS-Methode nach Böhm ermittelt wurden, fallen die Enzymaktivitäten, die mit Technozym®ADAMTS13 detektiert wurden, jedoch niedriger aus (siehe Abb. 17).



**Abb. 17:** Im Vergleich zwischen den beiden Methoden Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13 und BCS-Methode nach Böhm zeigt die Abbildung, dass die Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13 deutlich niedrigere Aktivitätswerte in der gleichen Probe detektiert.

Wie bei der BCS Methode nach Böhm müssen die Ergebnisse der Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13-Messung für einen allgemeinen Vergleich von Prozent in Standardeinheiten in ng/ml umgerechnet werden (Tabelle 30).

Probe	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
MW in ng/ml	476,57	527,54	581,26	603,50

**Tabelle 30:** Umgerechnete Mittelwerte in die Standardeinheit ng/ml. Ergebnisse für die Blutgruppen A, B, AB, 0 gemessen mit Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13 Assay.

#### 4.2.1.3 Actifluor<sup>™</sup>ADAMTS13

Actifluor<sup>™</sup>ADAMTS13 Activity Assay unterscheidet sich, wie im Methodenteil unter 3.3.4 beschrieben, in mehreren Punkten von den anderen Methoden zur ADAMTS13-Aktivitätsmessung. Hier sind die Messwerte der Aktivitätsuntersuchung nicht in Prozent angegeben sondern in SI-Einheiten (ng/ml). Durch einen Umrechnungsfaktor, der unter 3.4 beschrieben wurde, kann man das Ergebnis in Prozent umrechnen und somit die Ergebnisse untereinander vergleichen. Als Normalbereich gibt American Diagnostica einen ADAMTS13-Aktivitätsgehalt zwischen 360 ng/ml – 720 ng/ml für das Actifluor<sup>™</sup>-ADAMTS13-Assay an.

Es wurden sieben Messreihen mit den unverdünnten FFP-Proben der Chargen 0965977 (A), 0932185 (B), 0960994 (AB) und 0956523 (0) durchgeführt.

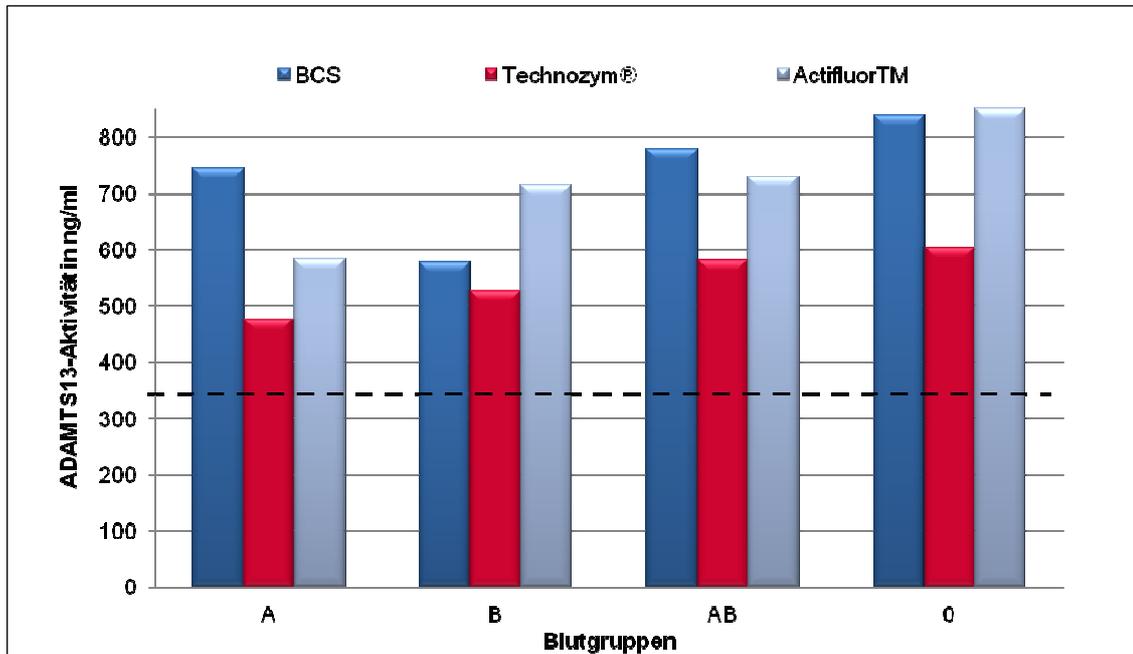
Blutgruppe 0 zeigt wiederum die höchsten ADAMTS13-Aktivitätswerte und wie auch bei der Messung mit Technozym®ADAMTS13 enthält die Plasmaprobe der Blutgruppe A den niedrigsten ADAMTS13-Wert. Die Schwankungen der Messungen entsprechen mit einer mittleren Standardabweichung von  $s = \pm 109,42$  ng/ml (entspricht  $s = 15,2$  %) in etwa der Standardabweichungsrate der anderen Methoden.

Tabelle 31 stellt die ADAMTS13-Aktivitätswerte der gemessenen FFP-Proben der vier Chargen dar:

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	517,37	672,37	804,25	798,85
2	666,15	643,653	756,25	756,79
3	554,88	659,09	819,05	714,96
4	277,19	505,45	195,88	707,09
5	680,95	1002,45	934,12	949,60
6	752,94	908,56	799,53	1133,66
7	632,69	613,99	807,40	893,21
<b>MW</b>	<b>583,17</b>	<b>715,08</b>	<b>730,92</b>	<b>850,59</b>
S	156,25	175,23	242,18	153,95
MW aller	719,94 ( $s_{MW} = \pm 109,42$ )			

**Tabelle 31:** Übersicht der ADAMTS13-Aktivität in den Proben der Chargen 0965977, 0932185, 0960994 und 0956523. Angaben in ng/ml. Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (s) wurden ebenfalls mit angegeben.

Abbildung 18 zeigt einen Vergleich der drei vorgestellten Methoden und der Messergebnisse, die diese Methoden im Mittel für die einzelnen FFP-Blutgruppen lieferten. Der Actifluor™ADAMTS13 Activity Assay misst jeweils die höchste Aktivität in der gleichen Probe, die Technozym®ADAMTS13-Methode dagegen die niedrigsten Enzymaktivitäten. Die in der Abbildung gestrichelte Linie definiert den minimalen physiologischen ADAMTS13-Aktivitätswert (360 ng/ml), der einer Aktivität von 50 % entspricht.



**Abb. 18:** Die Mittelwerte der FFP Proben 0965977, 0932185, 0960994 und 0956523 aller drei Methoden im Vergleich. Technozym® ADAMTS13 misst im Vergleich die niedrigsten ADAMTS13-Aktivitäten, wohingegen die Enzymaktivität gemessen mit Actifluor™ ADAMTS13 vergleichsweise am höchsten ausfällt. Die schwarz-gestichelte Linie markiert die physiologische ADAMTS13-Konzentration.

## 4.2.2 ADAMTS13-Aktivität in solvent/detergent Plasma Octaplas®

### 4.2.2.1 BCS Methode nach Böhm

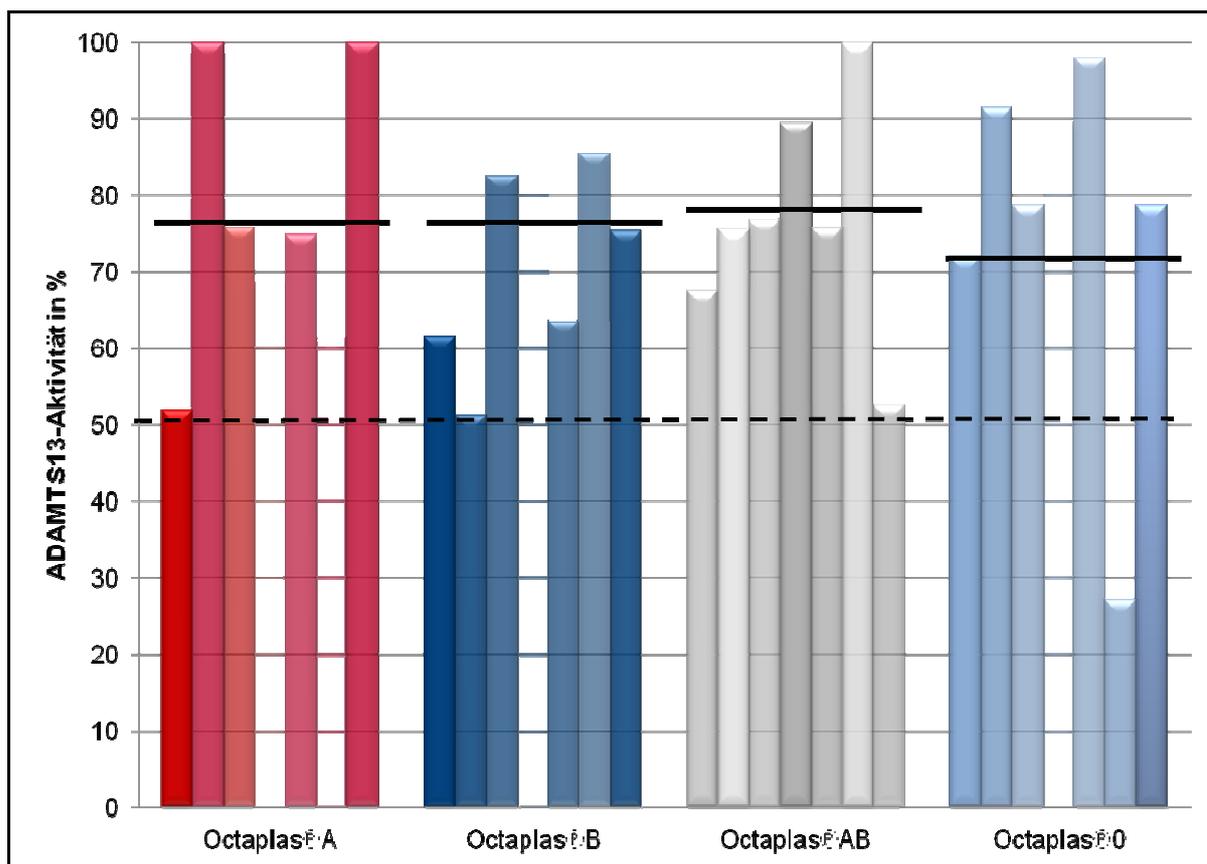
Die Messung des pharmazeutisch hergestellten solvent/detergent-behandelten Plasmas (Octaplas®) mittels der BCS Methode nach Böhm wurde entsprechend den Messungen von FFP durchgeführt. Zur Verfügung standen je eine Plasmaprobe aus den Chargen A9271952/D (Blutgruppe A), A9272952/D (Blutgruppe B), A9275952/D (Blutgruppe AB) und A4502452/0 (Blutgruppe 0). Das Octaplas® Plasma wurde in sieben Messreihen verdünnt (siehe Anhang Tabelle 68) und unverdünnt gemessen, wobei sich folgende Ergebnisse ermitteln ließen:

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 %
<b>MW</b>	<b>76,21 %</b>	<b>76,84 %</b>	<b>79,4 %</b>	<b>73,28 %</b>
s	18,27	13,11	15,17	23,52

**Tabelle 32:** ADAMTS13-Aktivität für das pharmazeutisch hergestellte Octaplas®-Plasma. Gemessen wurden die vier verschiedenen Octaplas®-Blutgruppen mit der BCS Methode nach Böhm. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Octaplas® der Blutgruppe AB zeigte im Test mit der BCS-Methode nach Böhm die höchste ADAMTS13-Aktivität, wohingegen Octaplas® der Blutgruppe 0 die niedrigsten ADAMTS13-Aktivitätswerte verzeichnete. Die Messergebnisse schwanken zwischen  $\pm 13,11$  % für Proben der Blutgruppe B und  $\pm 23,52$  % bei Messungen des Octaplas® 0.

Abbildung 19 zeigt die verschiedenen Chargen des Octaplas® im graphischen Zusammenhang, wobei die teils deutlichen Schwankungen (vgl. Standardabweichung s) zwischen den einzelnen Messungen sichtbar werden. Die schwarzen Balken markieren die jeweiligen Mittelwert-Ergebnisse der Blutgruppe. Die untere gestrichelte Linie markiert die minimale physiologische ADAMTS13-Konzentration von 50 %.



**Abb. 19:** Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsmessung des Octaplas®-Plasmas. Die Ergebnisse der sieben Messungen (M1 – M7 von links nach rechts) sind in entsprechender Reihenfolge aufgeführt. Die schwarzen Balken markieren die jeweiligen Gesamtmittelwerte der Proben.

Tabelle 33 zeigt die ADAMTS13-Aktivitäten der FFP Chargen 0965977, 0932185, 0960994 und 0956523 und der vier Chargen Octaplas® im Vergleich:

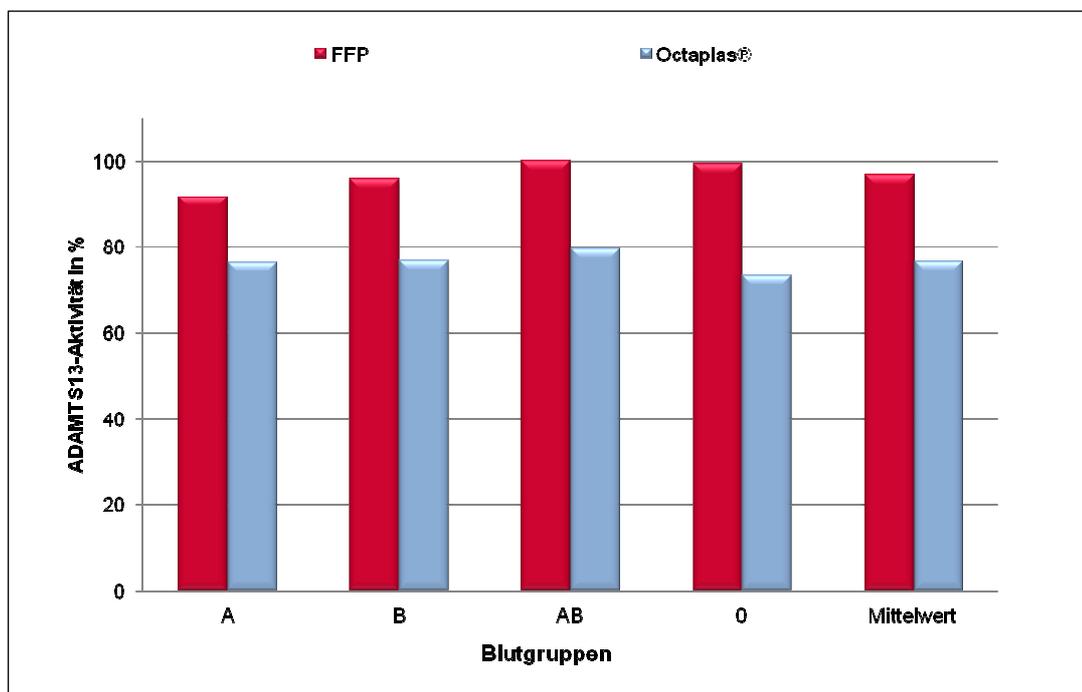
Messung	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	90,5 %	77,7 %	100,0 %	75,2 %
2	90 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
3	78,5 %	45,7 %	87,2 %	70,9 %
4	100,0 %	91,6 %	100,0 %	98,9 %
5	98,8 %	100 %	100,0 %	100,0 %
<b>Mittelwert</b>	<b>91,56 %</b>	<b>95,8 %</b>	<b>97,44 %</b>	<b>99,5 %</b>
s	8,63	22,76	5,72	14,65
<b>MW aller FFP</b>	<b>96,06 % (s<sub>MW</sub> = 3,35)</b>			
	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
1	51,9 %	61,7 %	67,4 %	71,9 %
2	100 %	51,2 %	75,5 %	91,5 %
3	75,9 %	82,5 %	76,9 %	78,6 %
4	68,5 %	82,9 %	89,5 %	89,4 %
5	74,9 %	63,6 %	75,6 %	97,9 %
6	61,5 %	85,5 %	100,0 %	27,1 %
7	100 %	75,35 %	52,5 %	78,7 %
<b>MW</b>	<b>76,21 %</b>	<b>76,84 %</b>	<b>79,4 %</b>	<b>73,28 %</b>
s	18,27	13,11	15,17	23,52
<b>Mittelwert aller Octaplas®</b>	<b>76,43 % (s<sub>MW</sub> = 2,51)</b>			

**Tabelle 33:** ADAMTS13-Aktivität im Vergleich zwischen FFP und Octaplas®. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

Insgesamt wurde in den Octaplas® Proben mit 73,28 % - 79,4 % ADAMTS13-Aktivität eine geringere Enzymaktivität nachgewiesen als in den Vergleichsproben des FFP (91,5 % - 97,44 %). Jedoch liegen die Schwankungen zwischen den einzelnen Blutgruppen beim

Octaplas® in einem wesentlich kleineren Spektrum. Während einige Plasmaproben sehr stabile Messergebnisse lieferten (kleine Standardabweichung), gab es andere Proben, deren Ergebnisspektrum weiter auseinanderlag (größere Standardabweichung), wodurch ungenauere Ergebnisse berechnet wurden.

Die ADAMTS13-Aktivitätsmittelwerte von FFP schwanken zwischen den einzelnen Blutgruppen um  $\pm 8,4\%$ , beim solvent/detergent Plasma liegen die Aktivitätsschwankungen zwischen den einzelnen Blutgruppen bei nur  $\pm 6,1\%$ . Die Standardabweichungen sind jedoch bei beiden Plasmaarten im mittleren Vergleich nur sehr gering ausgeprägt. Abbildung 20 zeigt die Unterschiede der Enzymaktivität zwischen den beiden Plasmapräparaten graphisch und gibt einen Überblick über die Ergebnisse aus Tabelle 33.



**Abb. 20:** Graphische Darstellung der Tabelle 33. FFP (rot) zeigt im Durchschnitt höhere ADAMTS13-Aktivitäten als Octaplas® (blau). Der Mittelwert stellt die gemeinsame Schnittmenge aller vier Blutgruppen dar.

Um die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden miteinander vergleichen zu können, müssen die Ergebnisse in SI-Einheiten in ng/ml umgerechnet werden.

Probe	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® O
MW in ng/ml	547,71	553,25	571,68	527,62

**Tabelle 34:** Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsmessung in Octaplas®. Umrechnung der Ergebnisse von Prozent in SI-Einheiten in ng/ml, gemessen mittels BCS-Methode nach Böhm.

#### 4.2.2.2 Technozym® ADAMTS13

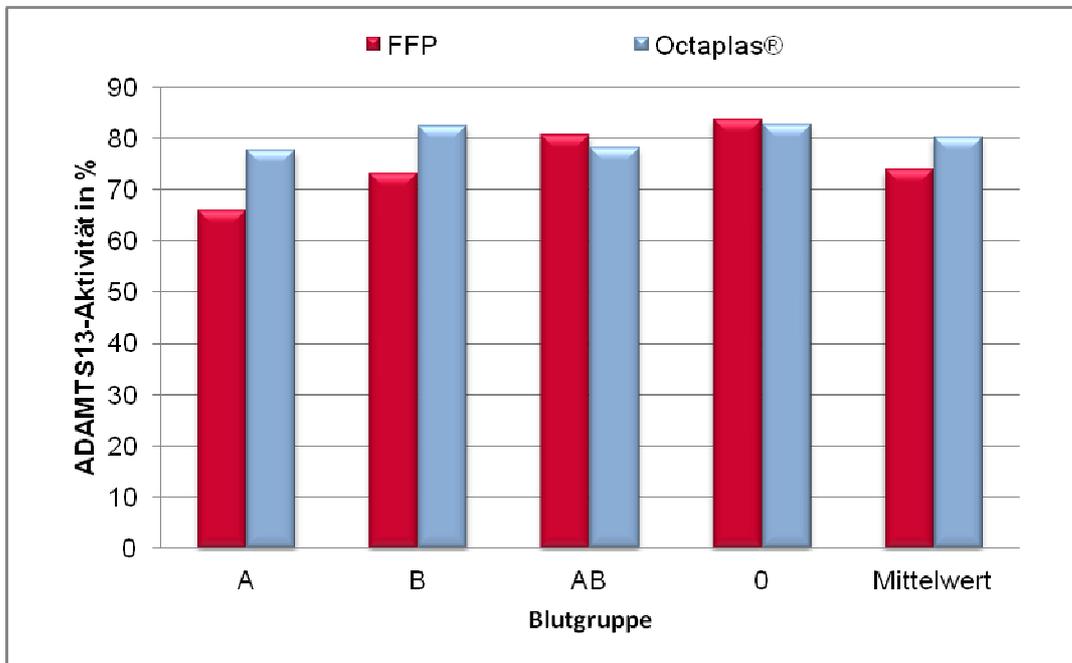
Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen des solvent/detergent Plasmas wurden unter gleichen Bedingungen wie für das Frischplasma, FFP, mittels der Technozym-ADAMTS13 Methode ermittelt. Tabelle 35 fasst die gemessene ADAMTS13-Aktivität in den verschiedenen Plasmaproben des Octaplas® zusammen.

Es ergab sich für das s/d Plasma der Blutgruppe B und 0 die höchsten Enzymaktivitäten, die niedrigste Aktivität ließ sich im Plasma der Blutgruppe A nachweisen. Die Mittelwerte dieser Versuchsreihe liegen für alle untersuchten Blutgruppen eng beieinander (77,7 % - 82,8 %). Wie schon in Tabelle 33 bezieht sich auch in dieser Messreihe die Standardabweichung s auf die Schwankungen zwischen den einzelnen Messdurchläufen. Die Standardabweichung der Ergebnisse liegt im Durchschnitt bei  $\pm 22,4$  %.

Messung	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
1	89,4 %	92,8 %	96,1 %	88,2 %
2	66,6 %	100,0 %	59,5 %	79,9 %
3	60,2 %	59,7 %	57,8 %	65,5 %
4	80,8 %	65,5 %	54,6 %	71,9 %
5	77,8 %	89,1 %	100,0 %	96,8 %
6	104,6 %	104,6 %	104,6 %	104,6 %
7	104,6 %	104,6 %	104,6 %	104,6 %
8	37,92	44,6 %	49,8 %	51,5 %
Mittelwert	<b>77,7 %</b>	<b>82,6 %</b>	<b>78,4 %</b>	<b>82,9 %</b>
s	22,7	22,9	24,8	19,2
MW aller	80,4 ( $s_{MW} = 2,70$ )			

**Tabelle 35:** ADAMTS13-Aktivität in Octaplas®-Plasma der Chargen A9271952/D (Blutgruppe A), A9272952/D (Blutgruppe B), A9275952/D (Blutgruppe AB) und A4502452/0 (Blutgruppe 0). Mittelwert (MW), Standardabweichung (s).

Abbildung 21 zeigt graphisch den Vergleich der ADAMTS13-Aktivität zwischen den FFP Chargen 0965977, 0932185, 0960994, 0956523 und den Ergebnissen des s/d-Plasmas Octaplas® aus Tabelle 35. Gemessen wurden die in dieser Grafik dargestellten Ergebnisse mittels der FRET-Methode Technozym®ADAMTS13.



**Abb. 21:** Graphische Darstellung der Tabelle 35. FFP (rot) zeigt im Durchschnitt niedrigere ADAMTS13-Aktivitäten als Octaplas® (blau). Der Mittelwert stellt die gemeinsame Schnittmenge aller vier Blutgruppen dar.

Bei der Messung der beiden Plasmapräparate FFP und Octaplas® mittels Technozym®ADAMTS13 wurden im Frischplasma FFP höhere Enzymaktivitäten bei den Blutgruppen AB und 0 detektiert als für das s/d-behandelte Plasma Octaplas®. Für die Blutgruppen A und B wurde im FFP weniger Enzymaktivität gemessen, als im Octaplas®. Die Mittelwerte der einzelnen Blutgruppen liegen hier ähnlich nah zusammen (77,7 % – 82,9 %,  $s = 2,51$ ) wie bei den Messungen mittels der BCS-Methode nach Böhm (73,28 % – 79,4 %,  $s = 2,7$ ) (vgl. auch Tabelle 33 und Abb. 20).

Da auch die Ergebnisse der Technozym®ADAMTS13 Messung in Prozent angegeben werden, müssen sie zum Vergleich in SI-Einheiten in ng/ml umgerechnet werden.

Probe	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
MW in ng/ml	559,44	594,72	564,48	596,88

**Tabelle 36:** Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsmessung in Octaplas®. Umrechnung der Ergebnisse von Prozent in SI-Einheiten in ng/ml, gemessen mittels Technozym®ADAMTS13-Aktivityassay.

### 4.2.2.3 Actifluor™ ADAMTS13

Wie die Fresh-Frozen Plasma Proben wurden auch die vier verschiedenen Chargen Octaplas® mit dem FRET-Assay Actifluor™ADAMTS13 gemessen. Die hier dargestellten Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsmessung in Tabelle 37 sind in SI-Einheiten (ng/ml) angegeben.

Die höchsten ADAMTS13-Enzymwerte konnten in der Octaplas® Probe der Blutgruppe 0 detektiert werden (808,18 ng/ml). Die niedrigsten Werte (694,71 ng/ml) wurden für die Plasmaprobe der Blutgruppe A gemessen.

Messungen	Octaplas® A	Octaplas® B	Octaplas® AB	Octaplas® 0
1	635,3	607,8	647,6	662,9
2	661,5	713,6	648,5	648,9
3	682,3	620,9	583,6	613,3
4	656,6	769,6	762,0	791,5
5	721,7	901,6	1197,2	1107,5
6	726,1	925,8	873,4	1052,7
7	779,6	898,6	781,2	780,6
<b>MW</b>	<b>694,7</b>	<b>776,8</b>	<b>784,7</b>	<b>808,2</b>
s	50,25	135,11	206,70	197,87
MW Octaplas®	<b>766,1 (s<sub>MW</sub> = 49,43)</b>			

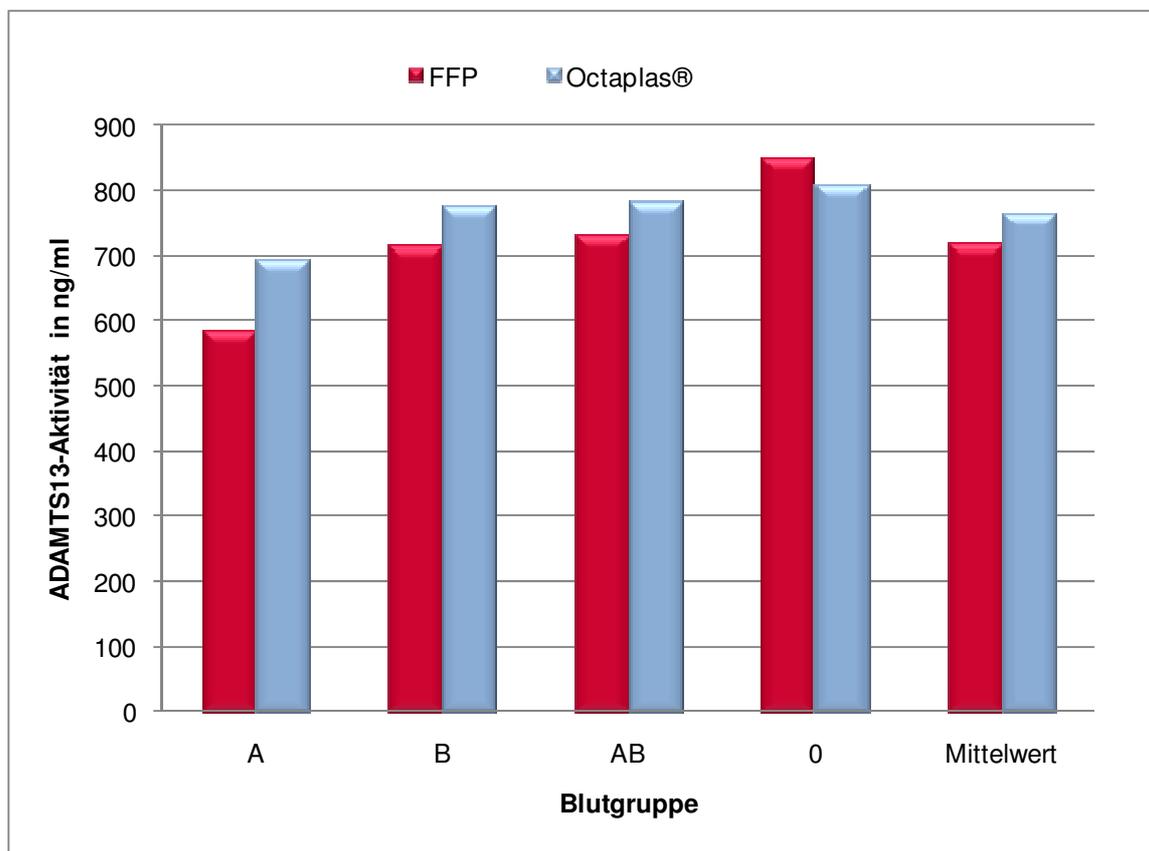
**Tabelle 37:** Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsmessung in Octaplas® mittels Actifluor™ADAMTS13 Elisa. Angaben in ng/ml. Mittelwert (MW), Standardabweichung (s).

Die Standardabweichung s beschreibt in dieser Tabelle, wie auch bei den Obigen, die Aktivitätsabweichungen der Messungen untereinander. Somit zeigt sich, dass die Ergebnisse der Blutgruppe A am wenigsten schwanken und dass sie sich mit diesem Messverfahren am genauesten darstellen lassen.

Abbildung 22 zeigt einen Vergleich der ADAMTS13-Aktivität in FFP und Octaplas®, gemessen mittels Actifluor™ADAMTS13. Die Blutgruppen A, B und AB des Octaplas® haben eine höhere Enzymaktivität als die Proben der entsprechenden Blutgruppen des FFPs.

Für die Blutgruppe 0 konnten höhere Aktivitätswerte in FFP detektiert werden als im Octaplas®. Im Mittel, vergleicht man alle Durchschnittsergebnisse der Plasmaproben, zeigt das s/d-Plasma ebenfalls höhere ADAMTS13-Enzymaktivitäten als sie das Vergleichs-plasma FFP aufweist.

Normwerte, die einer ADAMTS13-Aktivität von 100 % entsprechen, liegen bei 720 ng/ml ADAMTS13-Aktivität.



**Abb. 22:** Ergebnisse der Actiflour™ ADAMTS13 Untersuchung. FFP und Octaplas® im Vergleich. In Octaplas® (blau) ließen sich in den Blutgruppen A, B und AB höhere ADAMTS13-Werte detektieren als in FFP (rot). Der Mittelwert stellt die gemeinsame Schnittmenge aller vier Blutgruppen dar.

## 4.2.3 ADAMTS13-Antigen Bestimmung

### 4.2.3.1 Technozym® ADAMTS13

In einem weiteren Arbeitsschritt kann nach der ADAMTS13-Aktivitätsmessung eine ADAMTS13-Antigenbestimmung der Probe mittels des Technozym® ADAMTS13-Kits erfolgen (siehe auch Kapitel 3.3.4). Im Folgenden sind in Tabelle 38 die Messergebnisse des ADAMTS13-Antigen in den FFP Proben 0965977, 0932185, 0960994, 0956523 und den Octaplas® Proben A9271952/D, A9272952/D, A9275952/D und A4502452/0 aufgelistet.

---

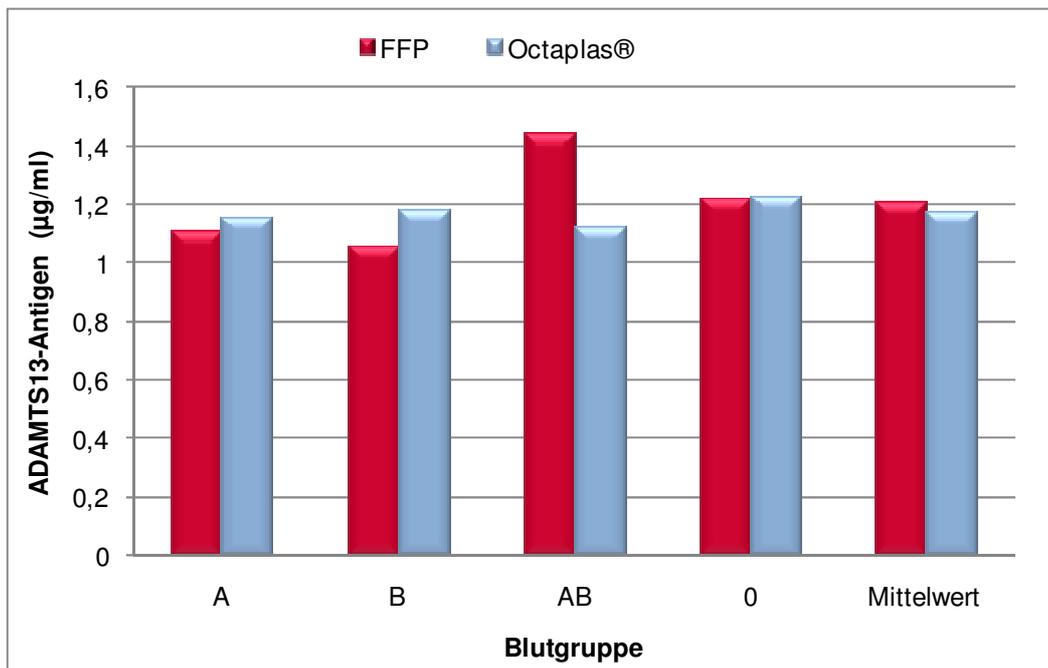
Bei FFP zeigt die Blutgruppe AB (1,44 µg/ml) den höchsten Enzymgehalt im Plasma, bei Octaplas® war der höchste ADAMTS13-Wert in der Blutgruppe 0 messbar (1,23 µg/ml).

Den niedrigsten Enzymgehalt enthielten die Proben FFP Blutgruppe B (1,06 µg/ml) und Octaplas® AB (1,12 µg/ml). Die Schwankungen der Ergebnisse liegen im Mittel bei den FFP Proben zwischen 0,19 µg/ml – 0,48 µg/ml. Für die Plasmaproben des s/d Plasmas liegen die Schwankungen etwas niedriger zwischen 0,18 µg/ml – 0,30 µg/ml. Betrachtet man den durchschnittlichen ADAMTS13-Enzymgehalt zwischen FFP und Octaplas®, so besitzen die FFP Plasmaproben insgesamt mehr ADAMTS13 (1,21 µg/ml) als die Octaplas® Proben (1,18 µg/ml).

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	0,56	0,83	1,18	0,87
2	0,76	1,15	1,48	1,15
3	0,99	0,24	1,5	1,17
4	0,8	0,79	1,17	1
5	1,59	1,59	1,59	1,59
6	1,59	1,59	1,59	1,59
7	1,48	1,21	1,59	1,19
<b>MW</b>	<b>1,11</b>	<b>1,06</b>	<b>1,44</b>	<b>1,22</b>
s	0,43	0,48	0,19	0,27
MW FFP	1,21 ( $s_{MW} = 0,17$ )			
Messungen	Octaplas A	Octaplas B	Octaplas AB	Octaplas 0
1	1,17	1,43	1,43	1,16
2	0,98	1,08	0,7	1,07
3	1,11	1,16	1	1,15
4	1,12	0,99	0,84	1,19
5	1,07	1,09	1,3	1,35
6	1,52	1,59	1,54	1,35
7	1,51	1,26	1,27	1,59
8	0,79	0,87	0,92	1
<b>MW</b>	<b>1,16</b>	<b>1,18</b>	<b>1,13</b>	<b>1,23</b>
s	0,25	0,24	0,30	0,19
MW Octaplas®	1,18 ( $s_{MW} = 0,05$ )			

**Tabelle 38:** ADAMTS13-Antigenwerte in den Plasmaproben FFP und Octaplas®. Angaben in µg/ml. MW: Mittelwert,  $s_{MW}$ : Standardabweichung der Mittelwerte.

Abbildung 23 stellt die Ergebnisse der Tabelle 38 graphisch dar. Die Grafik verdeutlicht, dass die Ergebnisse zwischen den einzelnen FFP-Proben stärkeren Schwankungen unterliegen als die Octaplas® Proben. Im Vergleich der Mittelwerte ergeben sich allerdings nur sehr geringe Unterschiede (FFP: 1,21 µg/ml; Octaplas®: 1,18 µg/ml). Die Schwankungen der Standardabweichungen verdeutlicht jedoch, dass die Ergebnisse für Octaplas® sehr genau und konstant gemessen wurden. Für die Antigenmessung gibt Technoclone einen Normalbereich von 0,6 µg/ml – 1,6 µg/ml an. Alle gemessenen Proben liegen innerhalb der physiologischen Norm.



**Abb. 23:** Ergebnisse der Technozym®ADAMTS13-Antigenmessung. Dargestellt sind die Mittelwerte der ADAMTS13-Antigenkonzentration in den verschiedenen Plasmaproben von FFP und Octaplas® aus Tabelle 38. Der Mittelwert stellt die gemeinsame Schnittmenge aller vier Blutgruppen dar.

#### 4.2.3.2 Imubind®ADAMTS13 ELISA

Mittels des Imubind®ADAMTS13-Kits kann ebenfalls die ADAMTS13-Antigenkonzentration im Plasma ermittelt werden. Die Messungen wurden für diese Messreihe mit den FFP Chargen 0965977, 0932185, 0960994, 0956523 und den Octaplas®-Proben A9271952/D, A9272952/D, A9275952/D und A4502452/0 durchgeführt. Die Ergebnisse der drei Messungen sind in Tabelle 39 dargestellt.

Auffallend ist, dass die ermittelten Werte teils stark von den Messungen mit Technozym®ADAMTS13 abweichen. Imubind®ADAMTS13 ELISA detektiert in den FFP-Proben ein durchschnittliches ADAMTS13-Antigen von 0,57 µg/ml. Für die Octaplas®-Proben wurde ein Durchschnittswert von 0,75 µg/ml detektiert. Insgesamt schwanken die

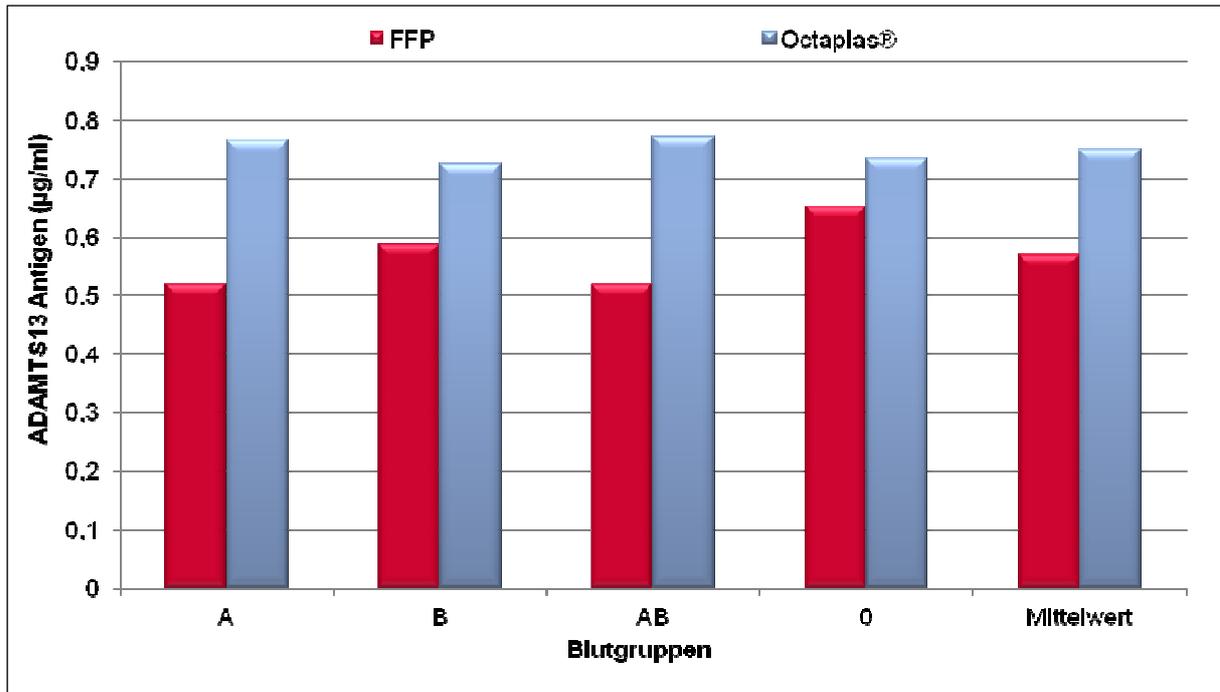
ADAMTS13-Antigenwerte für FFP nur sehr gering. Der höchste Antigengehalt wurde in der Probe FFP 0 mit 0,65 µg/ml gemessen, die niedrigsten Werte wiesen FFP A und FFP AB auf. Die Messergebnisse schwankten in einem Bereich von 0,13 µg/ml.

Für die Octaplas<sup>®</sup> Proben ergab sich der höchste Antigenhalt in den Proben der Blutgruppe A und AB (MW 0,77 µg/ml), der niedrigste Wert wurde in der Plasmaprobe der Blutgruppe 0 detektiert (0,73 µg/ml). Somit liegt selbst der höchste Antigenwert des Fresh Frozen Plasmas unterhalb von dem des s/d Plasmas. Die Ergebnisse für Octaplas<sup>®</sup> sind zudem sehr konstant und schwanken nur in einem minimalen Bereich von 0,05 µg/ml.

Messungen	FFP A	FFP B	FFP AB	FFP 0
1	0,427	0,483	0,331	0,774
2	0,537	0,689	0,814	0,381
3	0,593	0,588	0,409	0,800
<b>MW</b>	<b>0,52</b>	<b>0,59</b>	<b>0,52</b>	<b>0,65</b>
MW FFP	0,57 ( $s_{MW} = 0,06$ )			
Messungen	Octaplas <sup>®</sup> A	Octaplas <sup>®</sup> B	Octaplas <sup>®</sup> AB	Octaplas <sup>®</sup> 0
1	1,170	0,770	1,010	0,980
2	0,350	0,528	0,518	0,425
3	0,775	0,874	0,786	0,796
<b>MW</b>	<b>0,77</b>	<b>0,72</b>	<b>0,77</b>	<b>0,73</b>
MW Octaplas <sup>®</sup>	0,75 ( $s_{MW} = 0,02$ )			

**Tabelle 39:** ADAMTS13-Antigenkonzentration in FFP und Octaplas<sup>®</sup>. Messergebnisse der Imubind<sup>®</sup>-Untersuchung. Angaben in µg/ml. MW: Mittelwert,  $s_{MW}$ : Standardabweichung der Mittelwerte.

Die Abbildung 24 stellt die Ergebnisse der Tabelle 39 graphisch dar. Dabei zeigt sich wie auch schon bei Abbildung 23 der Technozym<sup>®</sup> ADAMTS13-Antigendaten ein konstanterer Wert für alle Octaplas<sup>®</sup> Proben ( $\geq 0,72 \mu\text{g/ml}$ ). American Diagnostica gibt die physiologische ADAMTS13-Antigenkonzentration für den Imubind<sup>®</sup>-Elisa mit  $0,63 \mu\text{g/ml} - 0,83 \mu\text{g/ml}$  an. Somit liegen die Antigenkonzentrationen in allen FFP, bis auf in den Proben der der Blutgruppe 0, unterhalb der physiologischen Grenze.

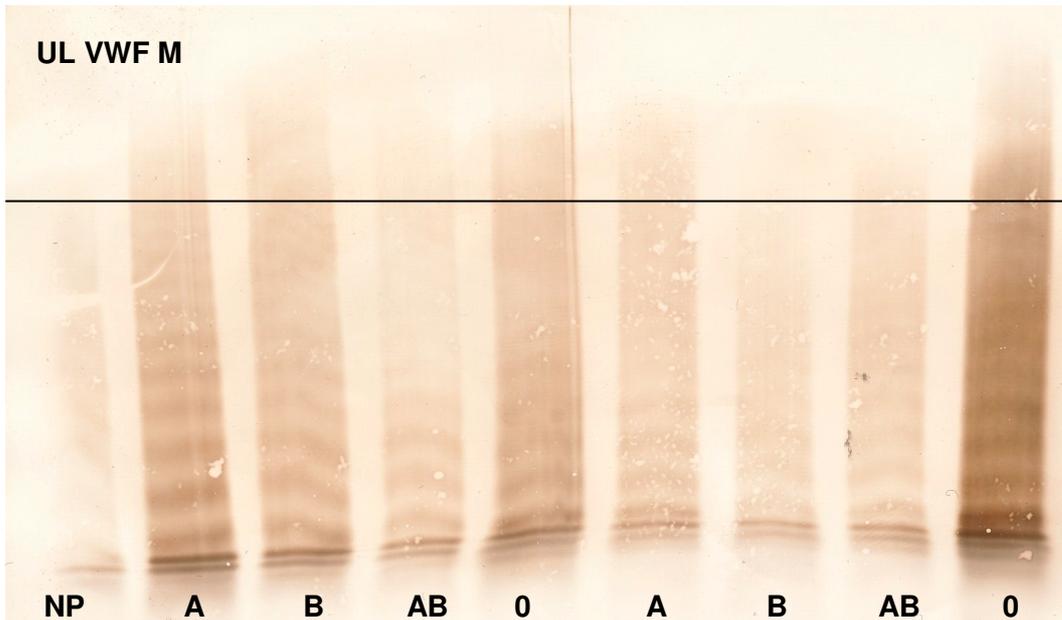


**Abb. 24:** Ergebnisse der Imubind<sup>®</sup>ADAMTS13-Antigenmessung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Antigenmessungen aus Tabelle 39. In FFP (rot) wurde im Vergleich zu Octaplas<sup>®</sup> (blau) weniger ADAMTS13-Antigen nachgewiesen, zudem schwanken die gemessenen Werte in FFP deutlicher, als bei den Octaplas<sup>®</sup>-Proben. Der Mittelwert stellt die gemeinsame Schnittmenge aller vier Blutgruppen dar.

#### 4.2.4 Gelelektrophorese der Plasmakonzentrate FFP und Octaplas<sup>®</sup>

Ein weiteres Medium, mit dessen Hilfe eine Aussage über die Beschaffenheit der Plasmaproben gemacht werden kann, ist die 1 %-ige Agarose-Gelelektrophorese. Durch ihren Einsatz können in verschiedenen Plasmaproben ultralange Von-Willebrand-Multimere (UL VWF M) nachgewiesen werden. Dabei werden die zu untersuchenden Plasmaproben mit einer Poolplasmaprobe aus 15 weiblichen und 15 männlichen, gesunden Probanden (Normalpool) verglichen. Je eine Probe jeder Blutgruppe FFP und Octaplas<sup>®</sup> wurde repräsentativ untersucht. Abbildung 25 zeigt das Ergebnis einer solchen Gelelektrophorese. Banden oberhalb der letzten sichtbaren Bande des Normalpool (schwarze Line in Abbil-

ung 25) werden als UL VWF M bezeichnet. In allen untersuchten Plasmaproben konnten UL VWF M nachgewiesen werden.



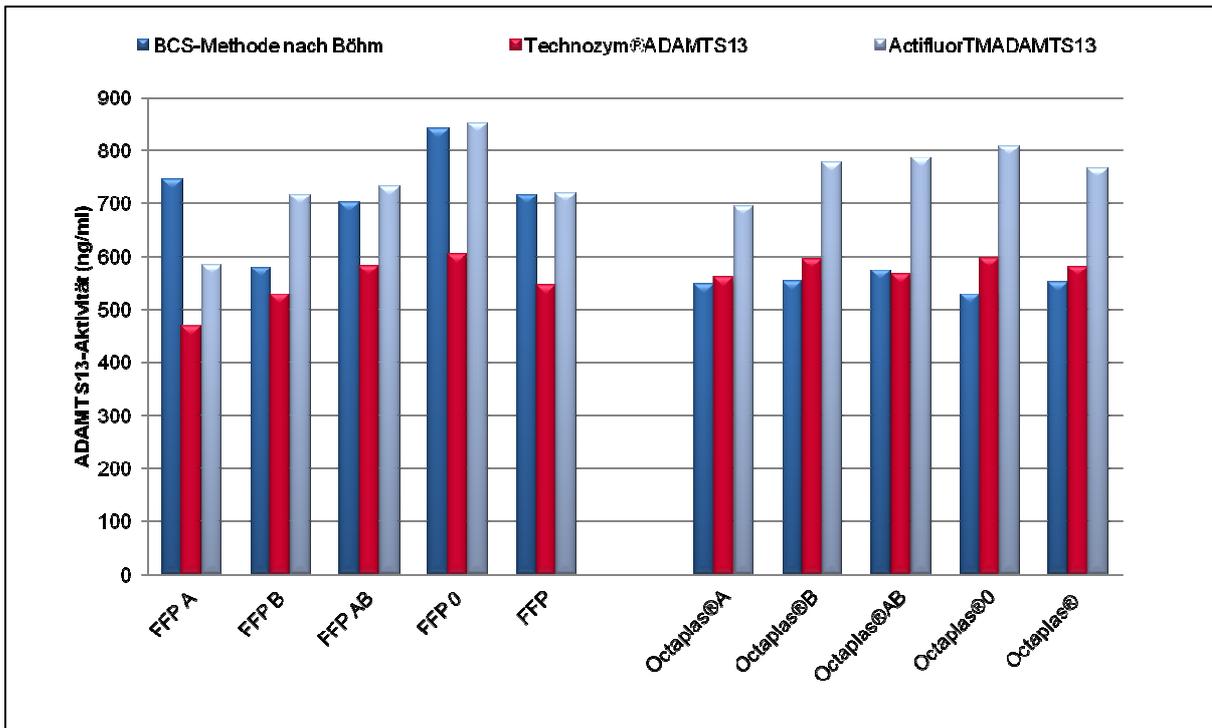
**Abb. 25:** 1 %-ige Agarose-Gelelektrophorese der unverdünnten Plasmaproben Normalpool (NP) und von links nach rechts Octaplas<sup>®</sup> der Blutgruppen A, B, AB, 0 und FFP der Blutgruppen A, B, AB, 0. Banden oberhalb der Line zeigen ultralange VW-Multimere (UL VWF M).

### **4.2.5 Autoantikörper**

Zur Vervollständigung der Untersuchungstechniken wurde auch eine ADAMTS13-Autoantikörpertestung durchgeführt. Hierbei werden die Plasmaproben auf etwaige Autoantikörper getestet, die die Enzymaktivität in der Probe herabsetzen könnten. Die in den Versuchen getesteten Plasmaproben enthielten keine Autoantikörper.

### 4.3 Zusammenfassung der ADAMTS13-Ergebnisse bei FFP und Octaplas®

Trägt man alle Ergebnisse der ADAMTS13-Aktivitätsuntersuchungen mit den drei verschiedenen Methoden BCS-Methode nach Böhm, Actifluor™ADAMTS13 und Technozym®ADAMTS13 in einer Tabelle auf, erhält man folgende Übersicht:



**Abb. 26:** Vergleich der Messergebnisse der verschiedenen Plasmaproben FFP (0965977, 0932185, 0960994, 0956523) und Octaplas® aus den drei verschiedenen ADAMTS13-Aktivitätsassays. Die Ergebnisse sind sowohl nach Blutgruppe und Gesamtmittelwert aufgelistet (63).

Bei der abschließenden Gesamtbetrachtung der Aktivitätsergebnisse ist auffallend, dass die Schwankungen zwischen den einzelnen Blutgruppen und Methoden für FFP deutlich mehr variieren, als für das s/d Plasma Octaplas®. Die niedrigsten Werte wurden tendenziell für das Fresh Frozen Plasma der Blutgruppe A gemessen. Dabei detektierte der Technozym™ADAMTS13 Assay die niedrigsten Enzymaktivitäten für FFP A (467,57 ng/ml). Die höchsten Enzymaktivitäten ließen sich im Schnitt für das Fresh Frozen Plasma in der Blutgruppe 0 nachweisen. Nimmt man alle Ergebnisse der verschiedenen Blutgruppen für FFP zusammen, so zeigt sich, dass die Technozym®ADAMTS13-Methode die niedrigsten ADAMTS13-Aktivitätswerte lieferte, wohingegen sich mit der Actifluor™ADAMTS13-Methode die höchsten Werte detektieren ließen.

Vergleicht man die Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden für das pharmazeutische Octaplas<sup>®</sup>, so schwanken die Enzymaktivitäten der einzelnen Blutgruppen für die jeweilige Methode nur geringgradig. Die niedrigsten Werte wurden mit der BCS-Methode nach Böhm in der Blutgruppe A gemessen (547,71 ng/ml). Der höchste ADAMTS13-Aktivitätswert ließ sich mittels des Actifluor<sup>™</sup>ADAMTS13 Assay für die Blutgruppe 0 detektieren. Insgesamt lieferte die BCS-Methode nach Böhm für das Octaplas<sup>®</sup> die niedrigsten Messergebnisse, die jedoch sehr dicht an den Werten des Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13-Kits liegen. Actifluor<sup>™</sup>ADAMTS13 Assay detektierte für alle Octaplas<sup>®</sup>-Proben die höchsten Aktivitätswerte im Vergleich zu den anderen beiden Methoden.

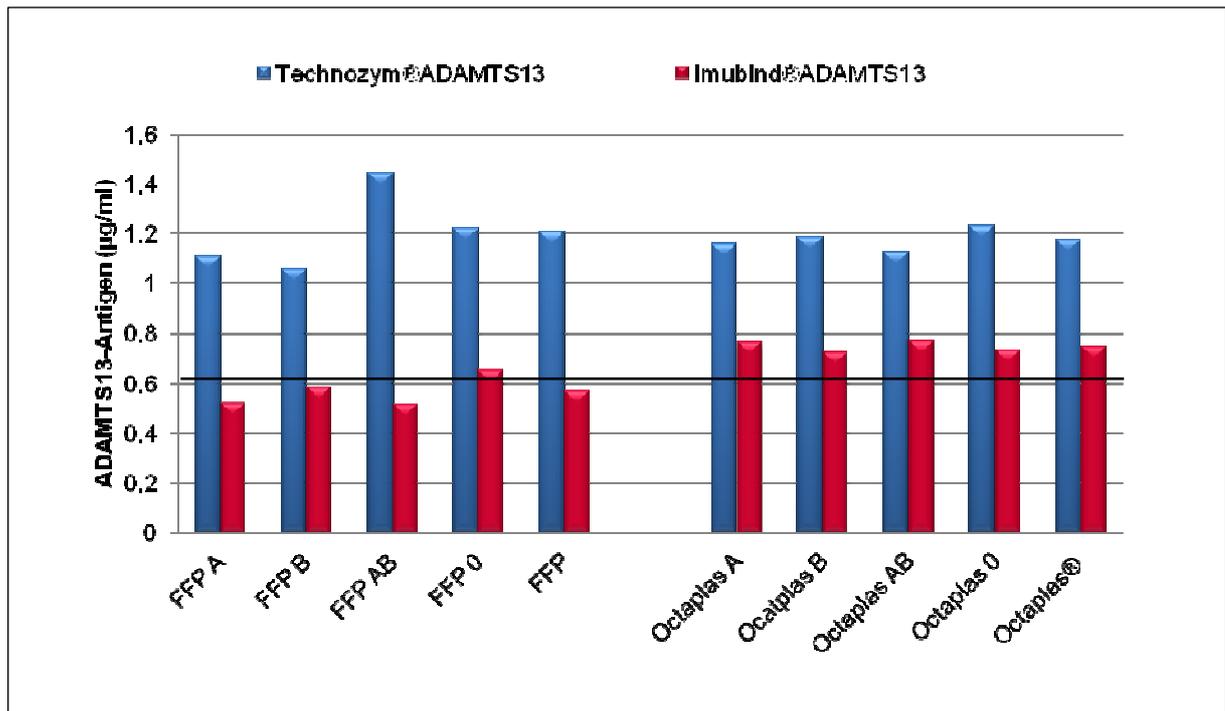
In der Gesamtbeurteilung lässt sich eine wesentlich größere Differenz zwischen den einzelnen FFP-Blutgruppen beschreiben als für Octaplas<sup>®</sup>. Vergleicht man jedoch die verschiedenen Methoden, so fallen die Schwankungen für das FFP hier geringer aus (544,97 ng/ml - 719,94 ng/ml) als für Octaplas<sup>®</sup> (547,71 ng/ml - 766,12 ng/ml). Das solvent/detergent Plasma steht für eine stetige ADAMTS13-Aktivität in allen vier verschiedenen Blutgruppen, jedoch reißen besonders die Werte, die mittels des Actifluor<sup>™</sup>ADAMTS13 Assays bestimmt wurden, nach oben hin aus.

Ein potentieller Mittelwert für die Ergebnisse aller drei Methoden würde für FFP einen ADAMTS13-Aktivität von 660,19 ng/ml ergeben und für Octaplas<sup>®</sup> eine Enzymaktivität von 631,64 ng/ml. Somit zeigen die beiden Plasmatypen ein sehr ähnliches Aktivitätsspektrum.

Die Messungen zeigen, dass beide Plasmapräparate eine physiologische ADAMTS13-Aktivität aufweisen. Die Schwankungen in ADAMTS13-Enzymaktivität und -Antigengehalt unterliegen somit keiner statistischen Relevanz.

#### ***4.4 Zusammenfassung der ADAMTS13-Antigenmessung bei FFP und Octaplas<sup>®</sup>***

Beim Vergleich der Antigenwerte (Abb. 27) fällt eine größere Varianz der Antigenwerte bei beiden Messmethoden innerhalb der einzelnen FFP-Blutgruppen auf. Der höchste Wert für FFP mittels des Imubind<sup>®</sup>ADAMTS13 ELISA wurde bei 0,65 µg/ml gemessen, der niedrigste bei 0,52 µg/ml. Damit liegen bei dieser Methode die FFP-Blutgruppen A, B und AB unter dem physiologischen Antigenbereich ( $\geq 0,6$  µg/ml). Der insgesamt höchste ermittelte Wert für FFP lag bei 1,44 µg/ml für Blutgruppe AB, bestimmt durch Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13. Fasst man die Mittelwerte der Blutgruppen für jede Methode zu einem Gesamtwert für die beiden Plasmasorten zusammen, wird der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Methoden ersichtlich.



**Abb. 27:** Vergleich der ADAMTS13-Antigenlevel der FFP und Octaplas, gemessen mit Technozym®ADAMTS13 (blau) und Imubind®ADAMTS13 (rot). Der letzte Spalte stellt dabei den Mittelwert der gemessenen Ergebnisse der FFP- und Octaplas®-Gruppe dar. Die schwarze Linie markiert die minimale physiologische Antigenkonzentration (vgl. Tabelle 39).

Das mittlere Antigenlevel in FFP, durch Imubind®ADAMTS13 ELISA ermittelt, liegt bei 0,57 µg/ml am unteren physiologischen Normwert. Das Technozym®ADAMTS13-Kit ermittelt mit 1,2 µg/ml einen fast doppelt so hohen Mittelwert, 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 des Octaplas® sind die Unterschiede zwischen Imubind®ADAMTS13 ELISA und Technozym®ADAMTS13 nicht so ausgeprägt (1,2 µg/ml zu 0,75µg/ml). Keine untersuchte Blutgruppe des s/d-Plasmas fällt unter den physiologischen Normbereich und insgesamt sind die Ergebnisse für die Blutgruppen zwischen den beiden Methoden sehr ausgeglichen. Die niedrigeren ADAMTS13-Aktivitätswerte der Octaplas®-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. Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Antigenwerte deutliche Unterschiede aufweisen, die Aktivitätswerte der verschiedenen Methoden hingegen gut korrelieren.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion über die Ergebnisse der Patientenbefragung**

#### **5.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der TTP**

Um verschiedene Krankheitsbilder zu verstehen, wird in der Wissenschaft nicht nur Wert auf klinische und experimentelle Forschungsergebnisse gelegt, sondern auch auf epidemiologische Erkenntnisse. Bei vielen Krankheiten werden mittlerweile Zusammenhänge zwischen der Ätiologie, der Prävalenz, der Pathogenese, der Ausprägung, dem klinischen Outcome und dem Geschlecht oder der Rasse der Patienten gesehen (64). Auch bei der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) wird kontinuierlich versucht, die Erkrankung und ihre Vielseitigkeit besser zu verstehen, indem neben molekulargenetischen Forschungsreihen auch epidemiologische Daten ausgewertet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten, die in der hämatologischen Sprechstunde von Frau Prof. Dr. Inge Scharrer angebunden sind, sowie freiwillige Patienten aus der TTP-Selbsthilfegruppe über das TTP-Forum ([www.ttp-forum.de](http://www.ttp-forum.de)) befragt. Die TTP ist eine seltene Erkrankung mit nur etwa vier Erkrankungen/10<sup>6</sup> Einwohner im Jahr (65), weshalb die Anzahl der erkrankten Personen in Deutschland nur auf wenige Hundert geschätzt wird. Für die Befragung ergab sich ein Geschlechter- und Altersverhältnis, das auch von anderen Gruppen belegt werden konnte. Unter den 87 befragten Patienten befanden sich 80 Patientinnen mit einem mittleren Alter von 43,5 Jahren. Ähnliche Daten fanden sich auch in der Auswertung des *Oklahoma TTP-HUS registry* von 2011 (66) und des *WAA-apheresis registry* von 2011 (67). Die Auswertung des *Oklahoma TTP-HUS registry* zeigte, dass weibliche Patienten bis zu 2,7-mal häufiger erkrankten als Männer (34, 68, 69) und dass das Alter zwischen 16 und 65 Jahren einen Risikofaktor für eine TTP mit schwerem ADAMTS13-Mangel darstellt (68). Zudem scheinen Frauen häufiger auch an anderen Autoimmunkrankheiten zu erkranken (70). Neben dem Alter stellt auch das Gewicht einen Risikofaktor für eine TTP-Erkrankung dar. In der hier vorliegenden Patientengruppe lag das mittlere Körpergewicht vor der Therapie bei 74,5 kg (52 kg - 145 kg) und nach der Therapie bei 79,8 kg. Dies zeigt, dass bei der untersuchten Patientengruppe ein Trend zum Übergewicht besteht. Der BMI der Patienten wurde nicht errechnet. Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Daten von 2009) gibt die mittlere Körpergröße für Frauen im Alter von 40 bis 45 Jahre mit 167 cm, bei einem mittleren Körpergewicht von 67,7 kg an. Daraus ergibt sich ein mittlerer BMI von 25,5 kg/m<sup>2</sup> (71). Für die Datenauswahl wurde das mittlere Patientenalter (43,5 Jahre) gewählt, und der Datensatz für

Frauen herangezogen, da 95 % der befragten Patienten Frauen waren. Diese Angaben verdeutlichen die Neigung zu Übergewicht bei TTP-Patientinnen.

Nicol et al. und Lombardi et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass adipöse Patienten häufiger an TTP erkrankten als Patienten der Kontrollgruppe (72, 73). Gleichzeitig scheint sich Adipositas jedoch positiv auf das Outcome der Erkrankung auszuwirken: Nicol et al. berichten über eine niedrigere Mortalität bei adipösen TTP-Patienten, wobei die Mortalitätsdaten jedoch keine statistische Relevanz erreichen (72).

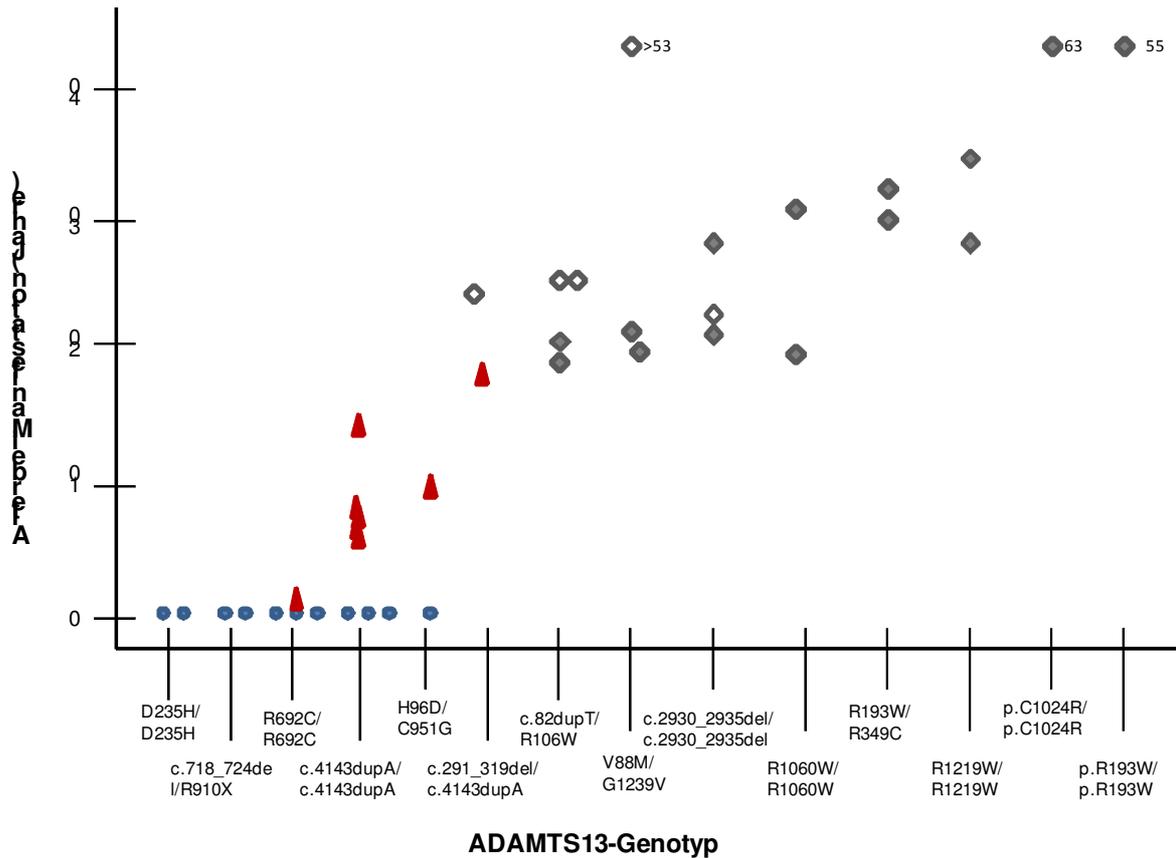
Desweiteren wurde postuliert, dass die ethnische Herkunft der Patienten einen weiteren Risikofaktor darstellt. Aus der Auswertung des *Oklahoma TTP-HUS registry* ging hervor, dass afroamerikanische Frauen häufiger an idiopathischer TTP erkrankten als die Patienten der Kontrollgruppe (68). Demnach erkrankten Afrikaner und Afro-Amerikaner bis zu 9,3-mal häufiger als Kaukasier (68, 69, 74). Eine Rassenunterscheidung wurde in der durchgeführten Mainz-Studie nicht erhoben. Jedoch handelt es sich hierbei größtenteils um Patienten des deutschsprachigen Raumes und somit aus Mitteleuropa.

Ein weiteres Merkmal, nachdem die Patienten befragt wurden, war ihre Blutgruppe. Bei den in der Mainzer Studie befragten Patienten gaben 25,3 % der Patienten an, die Blutgruppe 0 zu haben. Die meisten Patienten (28,7 %) besaßen Blutgruppe A. Ebenfalls 25,3 % der Befragten konnten ihre Blutgruppe nicht angeben, weshalb die Ergebnisse sehr differenziert betrachtet werden müssen. Forschungsergebnisse zeigten, dass eine Unterscheidung von Blutgruppe 0 und Nicht-Null eine Auswirkung auf das Erkrankungsrisiko haben könnten. Es gibt jedoch verschiedene Ergebnisse bezüglich beider Hypothesen: Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Blutgruppe 0 einen protektiven Einfluss auf das Auftreten einer TTP besitzt (75, 76). Es konnte gezeigt werden, dass die Blutgruppe 0 einen genetischen Schutz vor Thrombosen aufweist und dass sich Thrombosen hauptsächlich in Patienten mit Nicht-0-Blutgruppen entwickeln (77). Neuere Auswertungen des *Oklahoma TTP-HUS Registry* zeigten eine höhere Inzidenz der TTP bei Patienten mit Blutgruppe 0 (78). Aus den sich gegenseitig widerlegenden Hypothesen lässt sich schließen, dass eine endgültige Aussage über den Schutz vor thrombotischen Ereignissen durch die Blutgruppe 0, und insbesondere ihre Rolle bei TTP-Patienten noch nicht getroffen werden kann. Nicol et al. errechneten, dass Patienten, die mehr als zwei Standardabweichungen von den mittleren Einflussgrößen Alter, Rasse und Geschlecht abweichen, ein 7,6-fach erhöhtes Risiko (OR) entwickeln, an TTP zu erkranken (72).

Als weitere Prädisposition für eine thrombotisch thrombozytopenische Purpura sind genetische Faktoren bewiesen. Dementsprechend wird die primäre TTP in eine hereditäre und eine idiopathische Form unterteilt. Die hereditären TTP Formen sind die seltenere Form

---

der TTP. Bis Juni 2009 wurde über 76 Mutationen im ADAMTS13-Gen berichtet, die für eine angeborene Form der Erkrankung ursächlich sein können (79). Seitdem wurden jedoch weitere Genmutationen von den verschiedenen Forschungsgruppen entdeckt (80, 81). Die meisten Veränderungen werden durch Missense-Mutationen (insgesamt 60 %) am 5'-Ende des Gens hervorgerufen, das dem N-terminalen Ende des Enzyms entspricht. In dieser Region befinden sich die Domänen, die für die katalytische Funktion von ADAMTS13 verantwortlich sind (siehe Kapitel 2.2). Daneben wurden 2010 von Lotta et al. zahlreiche Splice-Stellen, Deletions-, Inversions-, Frameshift- und Nonsense-Mutationen identifiziert (79, 82). Die vielen verschiedenen Mutationen des ADAMTS13-Gens sind jedoch nicht alle für eine gleiche Manifestationsrate der TTP verantwortlich. So scheint es ADAMTS13-Genotypen zu geben, die einen frühen Ausbruch der Krankheit im Neugeborenen- und Jugendalter zur Folge haben. Andere Mutationen machen sich dagegen erst im höheren Alter bei den Patienten bemerkbar (65, 79-81). Abbildung 28 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen den verschiedenen ADAMTS13-Genotypen und dem Patientenalter bei Erstmanifestation der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura. Durch die Rarität der angeborenen TTP stellten die adäquate Therapie und Prophylaxe eine besondere Herausforderung dar. Bei der Auswertung der Patientendaten aus Mainz gaben vier der 87 Patienten an, dass sie an einer hereditären Form der TTP leiden. Überprüft werden konnten diese Angaben jedoch nicht, weshalb die Aussagen der Patienten diesbezüglich nicht relativiert werden konnten.



**Abb. 28:** Zusammenhang zwischen des ADAMTS13-Genotyp und Patientenalter bei Erstmanifestation der TTP. Blaue Kreise: Patienten mit neonatalen TTP-Episoden; rote Dreiecke: Patienten mit Erstmanifestation im Kinder- und Jugendalter (zwei Monate bis 18 Jahre); graue Rechtecke: Patienten mit Erstmanifestation im Erwachsenenalter (>18 Jahre); weiße Rechtecke: keine Manifestation bei Abschluss des Follow-ups (modifizierte Grafik nach (79) und (81)).

De Groot et al. beschrieben 2010, dass die Sequenzen D187-R198 und D252-P256 innerhalb der Metalloprotease-Domäne eine wichtige Rolle für die proteolytische Funktion von ADAMTS13 spielen (83). Zudem erkannten sie, dass diese Region wichtig für die spezifische Erkennung für das VW-Molekül ist. So können auch Mutationen innerhalb des VWF zu einem ADAMTS13-Aktivitätsverlust führen.

Nachdem die thrombotisch thrombozytopenische Purpura 1925 erstmals von E. Moschowitz beschrieben und ein Patientenfall von ihm veröffentlicht wurde, folgten viele weitere Fallbeschreibungen von ähnlichen Krankheitsbildern und -verläufen. Neben den oben genannten Triggerfaktoren wurden zunehmend Case Reports veröffentlicht, bei denen die Vorerkrankungen der TTP-Patienten als Trigger für das Auftreten der TTP gesehen wurden. Schon früh wurden Verbindungen zwischen dem Ausbruch einer TTP und dem Systemischen Lupus Erythematosus (SLE) gesehen (84, 85). Die Beschreibung von möglichen pathophysiologischen Verbindungen und andern immunologisch getriggerten Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Polyarthrit oder Sjögren Syn-

drom, folgten (86). Die Schwierigkeit der genaueren Beurteilung der Entstehung von Autoimmunerkrankungen liegt in deren multifaktoriellen Pathogenese. Der Zusammenhang zwischen den *human leukocyte antigen* (HLA) Typen und Autoimmunerkrankungen lässt schlussfolgern, dass die Reaktion von regulatorischen T-Zellen mit HLA Klasse II-markierten Autoantigenen für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ausschlaggebend ist (87). Schon bevor man der ADAMTS13-Aktivitätsmessung bei der TTP-Diagnostik eine Rolle zuteilte, wurde von Joseph et al. ein Zusammenhang zwischen der HLA Klasse II und der TTP/HUS bei erkrankten Patienten gesehen (vermindertes HLA-DR 53 in der Patientengruppe) (88). Neben diesen genetischen Prädispositionsfaktoren scheinen aber auch Immunglobuline vor allen bei der idiopathischen TTP eine Rolle zu spielen. Im Verlauf der Jahre nahm die Vermutung zu, dass es immunologische Auslöser geben müsste, durch die die TTP hervorgerufen werden kann.

Weitere Forschung deckte verschiedene Autoantikörper gegen ADAMTS13 auf. Bei der idiopathischen TTP kommen hauptsächlich Autoantikörper der Gruppe IgG gegen die VWF-spaltende Protease vor (89). Neben IgG wurde auch über IgA und IgM ADAMTS13-Autoantikörper berichtet (90, 91). Bei den verschiedenen Autoantikörpern gegen ADAMTS13 kann weiterhin zwischen den inhibitorischen und nicht-inhibitorischen Autoantikörpern unterschieden werden. Durch inhibitorischen Autoantikörper wird die ADAMTS13-gesteuerte Proteolyse des VWF gestört, wohingegen nicht-inhibitorische Autoantikörper den Abbau von ADAMTS13 beschleunigen (92). Zheng et al. zeigten 2010, dass fast alle Patienten der von ihnen untersuchten Kohorte IgG-Autoantikörper gegen das N-terminale Ende des ADAMTS13-Moleküls besaßen, insbesondere gegen die cysteinreiche Region und die Spacerdomäne (siehe Kapitel 2.2.1, Abb. 2) (89). Durch die Manipulation an dieser Stelle wird die katalytische Funktion des Enzyms gestört. Des Weiteren wurde in dieser Untersuchung gezeigt, dass bei etwa der Hälfte der Patienten mit Antikörpern gegen das N-terminale Ende ebenfalls Autoantikörper gegen die C-terminale Region (TSP 1-5 und CUB) vorlagen. Bei zwei Patienten der TTP-Gruppe wurden nur IgG-Autoantikörper gegen die C-terminale Region von ADAMTS13 gefunden, was den Schluss für Zheng et al. nahelegte, dass diese Region eine funktionale Rolle in vivo spielt. Außerdem ist bekannt, dass die C-terminale Region eine Funktion bei ADAMTS13-VWF Interaktion unter Scherstress innehat (93). Die IgG-ADAMTS13-Autoantikörper können in vier Subklassen unterteilt werden (IgG1-IgG4). Bei der von Ferrari et al. durchgeführten Studie fanden sich alle Subklassen bei der untersuchten Patientengruppe (94). Ferrari et al. konnten 2009 zeigen, dass Patienten mit einem hohen Level an IgG4 und nicht nachweisbarem IgG1-Level häufiger an TTP-Rückfällen litten als die Patienten mit niedrigem IgG4 und nachweisbarem IgG1 (94). Somit wurde von ihnen postuliert, dass der IgG4-

Autoantikörper-Titer bei der Identifikation von rückfallgefährdeten Patienten hilfreich sein könnte.

Auch in der hier vorliegenden Studie wurde versucht, die Patienten, basierend auf dem Vorliegen einer Grunderkrankung mit autoimmunologischem Charakter, zu selektieren. Dazu wurden die Patienten gebeten, möglichst genau ihre Vorerkrankungen im Fragebogen zu benennen. Dabei gaben 18,4% der Patienten an, dass sie an einer Erkrankung leiden, die in Zusammenhang mit Autoimmunreaktionen stehen. Wie schon oben angesprochen, konnte auch in unserer Fallbeschreibung gesehen werden, dass Sharp-Syndrom, rheumatoide Arthritis, Neurodermitis und vor allem Schilddrüsenerkrankungen wie Hashimoto-Thyreoiditis im TTP-Patientenpool vermehrt vorkommen. Das gemeinsame Auftreten von SLE und TTP ist zwar selten, dennoch finden sich zahlreiche Fallbeispiele in der Literatur. Perez et al. beschreiben 2011 die Inzidenz von TTP bei SLE-Patienten mit ca. 2 % der Fälle (95). John et al. diskutieren, dass TTP bei Lupuspatienten sechsmal häufiger auftreten als in der Normalbevölkerung. Hashimoto-Thyreoiditis tritt bei TTP-Patienten nach den Beobachtungen von John et al. in 2012 rund dreimal häufiger auf als in der Allgemeinbevölkerung (96). Jedoch ist nicht näher belegt, dass Schilddrüsendysfunktionen einen eindeutigen prothrombotischen Effekt mit sich ziehen. Sowohl Hyper- wie Hypothyreose können sowohl ein Blutungs-, als auch Thrombosenerisiko darstellen (97). Das Thema um die Schilddrüsenfunktion und ihre Rolle in der Hämostase wird noch konträr diskutiert. Das klinische Spektrum der Schilddrüsendysfunktion reicht von subklinischen Erscheinungen, bei denen nur laborchemische Abweichungen auftreten über schwerste Beeinträchtigungen für den betroffenen Patient mit stärksten Blutungs- oder Thromboseneigungen (98). So wird von Ford und Carter postuliert, dass es durchaus einen Zusammenhang sowohl zwischen Hashimoto-Thyreoiditis, wie auch Morbus Basedow und anderen Autoimmunkrankheiten geben könnte (99). Ein Zusammenhang zwischen Blutungsereignissen bei autoimmun thrombozytopenischer Purpura (AITP) und Morbus Basedow (97, 98) wird eindeutig bekräftigt. Die Schilddrüse spielt eine komplexe Rolle in der Regulation der Hämostase, aufgrund dessen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen ihrer Dysfunktion und einer daraus resultierenden TTP nur schwer voraussagen ist.

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) wurde ebenfalls über das vermehrte Auftreten einer TTP berichtet (97, 100). Grund hierfür dürften ebenfalls immunologische Triggerfaktoren sein. Bei der Manifestation einer TTP auf dem Boden einer rheumatoiden Arthritis, muss jedoch in der Ätiologie unterschieden werden, ob die RA an sich für das Auftreten verantwortlich ist, oder ob die TTP aufgrund der immunsuppressiven Therapie und somit medikamentös-getriggert, entstanden ist. (101).

Für die adäquate Behandlung der Patienten steht jedoch nicht alleinig die korrekte Therapie des ersten Ausbruchs einer TTP im Vordergrund. Nach dem erstmaligen Auftreten und der Diagnose einer TTP steht für den Patienten und das behandelnde Ärzteteam auch die Prävention vor weiteren Rezidiven im Mittelpunkt. Die Auswertung des *Oklahoma TTP-HUS registry* von 1989 bis 2008 zeigte, dass vor allem eine ADAMTS13-Aktivität unter 10 % als Risikofaktor für eine weitere Krankheitsperiode in der Zukunft zu werten ist (102). Bei der Auswertung der Daten ergab sich, dass von insgesamt 261 Patienten, deren ADAMTS13-Aktivität bei der Erstdiagnose bestimmt wurde, 60 Patienten eine Aktivität von unter 10 % hatten. Davon überlebten 47 Patienten die Follow-Up-Periode (bis Oktober 2009), wobei 16 Überlebende (34 %) ein Rezidiv erlitten. In der Kontrollgruppe mit 201 Patienten, deren ADAMTS13-Aktivität größer 10 % war, erlitten fünf Patienten (4 %) wenigstens eine weitere Krankheitsepisode (103).

Ähnliche Daten können auch aus der hier durchgeführten Studie abgeleitet werden. Von den 87 Befragten erlitten 47,2 % wenigstens ein weiteres Rezidiv der TTP. Der Fragebogen wurde anonym von den Patienten beantwortet, weswegen ein Vergleich mit den ADAMTS13-Aktivitäten der Plasmaproben der Patienten nicht durchgeführt werden konnte. Die etwas höheren Prozentzahlen der Rezidive bei den Mainzer Patienten verglichen mit den amerikanischen Ergebnissen lassen sich am ehesten durch das befragte Patientengut in Mainz erklären. Die hämatologische Ambulanz in Mainz stellt ein Kompetenzzentrum für die thrombotisch thrombozytopenische Purpura dar. Hier werden auch besonders schwere Fälle behandelt, die oft zu Rezidiven neigen. Zudem sind in der Selbsthilfegruppe des TTP-Forums vor allem Patienten vertreten, die einen starken Leidensdruck durch die Schwere der Erkrankung haben. Inwiefern eine hohe Rezidivneigung Auswirkungen auf die Therapie der TTP hat, wird zu einem späteren Zeitpunkt noch diskutiert werden (siehe Kapitel 5.1.3).

Die oben diskutierten prädispositionierenden Faktoren für eine TTP sind meist nicht alleinige Ursache für das Eintreten eines akuten Krankheitsschubes. Im folgenden Abschnitt soll deshalb auf mögliche Auslöser, die, bei gegebener Prädisposition, zu einer TTP führen können, eingegangen werden.

Die häufigsten Ursachen für das Auftreten einer thrombotischen Mikroangiopathie (TMA) stellen, bei gegebenen Prädispositionen, bakterielle Infektionen dar. In der Mainzer Patientenkohorte fanden sich insgesamt 43 Patienten, bei denen eine bakterielle oder virale Infektion eine TTP-Episode auslöste. Dabei waren bei zwei dieser Patienten ein Infekt der oberen Atemwege, bei zwei Patienten ein grippaler Infekt oder Influenza-Impfung, bei drei Patienten ein Gastrointestinaler Infekt, bei zwei Patienten eine Zystitis und bei einem Herpes Zoster möglicherweise für die Erkrankung ursächlich.

Eine der bekanntesten Risikofaktoren des hämolytisch urämisches Syndroms (HUS), als ein weiterer Vertreter der TMA neben der TTP, ist beispielsweise eine Infektion mit *E. coli* O157 (104). Die Brandbreite der Erreger, die eine Exazerbation der TTP oder ein Rezidiv hervorrufen können, ist breit (105). So werden in der Literatur Staphylokokken und Streptokokken (106-108) als Auslöser für eine TTP beschrieben, ebenso finden sich Borrelieninfektionen (109), Brucellose (110-112), Tuberkulose (113), Mycoplasmen-Infektionen (104, 114) und viele weitere als mögliche Triggerinfektion bei gegebenen Risikofaktoren. Vor allem Erreger gastrointestinaler und urogenitaler Infektionen finden sich gehäuft bei Patienten mit akuten TTP-Erkrankungen oder Rezidiven ((115-118). Park et al. (115) dokumentierten 2011, dass 23 % der untersuchten TTP-Patienten an einen Urogenitalinfekt vor oder während einer TTP-Exazerbation erkrankt waren. Neben bakteriell verursachten Gastroenteritiden stellt auch die Pankreatitis, die mit einer gravierenden abdominalen Entzündungsreaktion einhergehen kann, eine weitere mögliche Ursache für eine TTP-Episoden dar (69, 70, 101). Als mögliche Ursachen für eine Infekt-getriggerte TTP können Verbindungen zwischen der Hämostase und den verschiedenen Zytokinen, die durch die Entzündungsreaktion hervorgerufen werden, gesehen werden. TNF- $\alpha$  und IL-8 stimulieren eine vermehrte Sekretion von UL VWF-Multimeren, zudem aktivieren sie mikrovaskuläre Endothelzellen, sodass es zu einer Aggregation von Leukozyten und Thrombozyten kommen kann (119). IL-6 ist bekannt für seine koagulationsfördernden Effekte auf Thrombozyten (120). Zudem stimuliert IL-6 die Thrombozytenproduktion (121). Im Zellversuch von Bernardo et al. hinderte an löslichen IL-6-Rezeptor gebundenes IL-6 ADAMTS13 daran, die UL VWF-Multimere unter Flussbedingungen zu spalten (119). Diese Ansätze könnten den prothrombotischen Effekt von systemischen Entzündungen im Ansatz erklären. Als Konsequenz für eine erfolgreiche Therapie der TTP lässt sich daraus schließen, dass bakterielle Infektionen bei Risikopatienten frühzeitig therapiert werden sollten, vor allem auch um Rezidive zu vermeiden (104).

Bei 5,4 % der Patienten wurde die TTP durch eine Schwangerschaft ausgelöst. Dieser Zusammenhang wurde 1955 erstmals von Miner et al. (122) beschrieben. George fasst zusammen, dass in der Literatur zwischen 1964 bis 2002 insgesamt über 1476 TTP-Patientinnen (in 52 Case Reports, die mehr als 10 Patienten umfassten) berichtet wurde. Unter diesen waren 13 % schwanger und erlitten eine TTP-Episode. Am häufigsten erkrankten die Patientinnen im dritten Trimenon (30 %) oder um den Zeitraum der Niederkunft oder kurz nach der Geburt (43 %) (70). Das Risiko für die Patientinnen, in den ersten beiden Trimenen zu erkranken, war gering (70). Im Verlauf der Schwangerschaft nimmt die ADAMTS13-Aktivität kontinuierlich ab, bis sie ihren Tiefpunkt im zweiten und dritten Trimenon erreicht (64 % Restaktivität, Ausgangswerte 94 % im ersten Trimenon) (123). Zusammen mit anderen gegebenen Risikofaktoren, wie Adipositas oder

Heterozygotie für ADAMTS13-Mangel, kann die reduzierte ADAMTS13-Aktivität in der Schwangerschaft ausgeprägter sein und das Erkrankungsrisiko steigern (70). Vesely et al. (124) zeigten in ihrer Fallstudie, dass schwangere TTP-Patientinnen ein erhöhtes Rezidivrisiko haben. 11 % der Patientinnen erlitten ein Rezidiv, nur Patientinnen mit idiopathischer TTP zeigten ein höheres Wiedererkrankungsrisiko (21 %). Besonders die angeborene TTP kann bei den Patientinnen erstmals in der Schwangerschaft zu einer Krankheitsmanifestation führen, wobei eine hereditäre TTP mit einem großen Komplikationsrisiko für Mutter und Kind einhergeht (24). Sánchez-Luceros et al. zeigten, dass in ihrer Patientengruppe ebenfalls die niedrigsten Proteasewerte am Schwangerschaftsende und im frühen Puerperium detektiert wurden. Zudem zeigten sie, dass die ADAMTS13-Aktivität in den ersten sechs bis 11 Wochen und im späten Puerperium über der der nicht-schwangeren Vergleichsgruppe lagen (125). Mannucci et al. vermuteten bereits einen Zusammenhang zwischen dem Östrogenspiegel der Schwangeren und der ADAMTS13-Aktivität (123). Diese These wird von Sánchez-Luceros et al. bekräftigt, wenn auch unter einem anderem Aspekt (125). Sie zeigten beispielsweise, dass Erstgebärende niedrigere ADAMTS13-Spiegel besitzen als Mehrgebärende. Die Studienergebnisse lassen darauf schließen, dass ein komplexer Zusammenhang zwischen dem Hormonstatus der Schwangeren und der ADAMTS13-Aktivität besteht, der noch nicht endgültig erforscht worden ist (125). Erklären ließe sich ein erhöhtes Risiko in der Schwangerschaft an TTP zu erkranken durch eine vermehrte VWF-Synthese in dieser Zeit (70).

Ein weiterer Aspekt, der zu diesem Diskussionspunkt beiträgt, ist die Entstehung von TTP unter oraler Kontrazeption (126). Ein Zusammenhang zwischen der Ätiologie der TTP und Östrogenen (natürlicher oder synthetischer Form), wie zum Beispiel oralen Kontrazeptiva, Hormonersatzbehandlungen, Tamoxifen und die vermehrte Östrogenproduktion in und nach der Schwangerschaft, ist bekannt (127). Aufgrund der Seltenheit von östrogeninduzierter TTP muss jedoch davon ausgegangen werden, dass mehrere Faktoren zusammenspielen müssen, damit eine Östrogenexposition als Auslöser für eine TTP-Episode oder –rezidiv verantwortlich gemacht werden kann.

Weitere bekannte und ebenfalls multifaktoriell bedingte Auslöser für eine TTP stellen verschiedene Medikamente dar. Insgesamt sind über 50 verschiedene Medikamente bekannt, die eine thrombotisch thrombozytopenische Purpura hervorrufen können. Die Rolle der Ovulationshemmer und Hormontherapie wurde bereits diskutiert. Eine weitere Gruppe, bei denen der Zusammenhang zwischen der Therapie und dem Auftreten von TMA belegt ist, stellen die Chemotherapeutika Mitomycin C (128) und Interferon- $\alpha$  dar (129). Klinisch stellt sich eine durch Chemotherapeutika induzierte TMA eher als akute Niereninsuffizienz dar. Neurologische Symptome treten nur selten auf (130). Auch immunmodulierende Medikamente wie Cyclosporine und Tacrolimus wurden mit dem

Auftreten von TTP/HUS in Verbindung gebracht, wobei der Pathomechanismus, der eine TMA in diesem Rahmen auslöst, noch unverstanden bleibt. Es wird vermutet, dass Tacrolimus einen Endothelschaden triggert, wodurch der Scherstress erhöht wird (131). Auch eine Chinin-assoziierte Thrombozytopenie ist seit mehreren Jahrzehnten bekannt (132), wobei oft IgG oder IgM Antikörper bei den Patienten gemessen werden können (130). Medikamentös findet Chinin Einsatz in der Malariaphylaxe, zur Therapie bei Restless-Leg-Syndrom, sowie als Therapieoption bei Muskelkrämpfen (Limptar<sup>®</sup>N). Eine wichtige Gruppe von Medikamenten, die eine Rolle in der Entstehung der TMA spielen, sind die ADP-Rezeptorantagonisten der Thienopyridine. Der frühe Vertreter Ticlopidin wurde aufgrund eines erhöhten Risikos für TTP bereits aus dem Handel genommen worden. Zahlreiche Fallstudien über Ticlopidin wurden veröffentlicht (132, 133, 134). Jedoch traten auch unter dem anfangs als sicher erscheinenden Clopidogrel Thrombozytopenie und TTP auf. Diese Fälle sind jedoch bei weitem seltener als unter Ticlopidin-Therapie (130). Zudem sind zahlreiche Antibiotika bekannt, die das Auftreten einer TTP begünstigen (Rifampicin (135), Cotrimoxazol und der darin enthaltene Stoff Trimethoprim (136), Doxycyclin (137) und weitere).

Neben Medikamenten können auch psychische Belastung ein Trigger für die TTP darstellen (110) Episoden von andauerndem körperlichem und psychischem Stress begünstigen das Auftreten einer TTP, so wie es bei 3,7 % der in Mainz befragten Patienten geschehen ist.

Die Komplexität der Zusammenhänge zwischen den einzelnen prädisponierenden Faktoren für eine TTP und der multifaktoriellen Genese, die bei gegebener Prädisposition eine TTP hervorrufen kann, zeigt, wie sensibel auf mögliche Symptome und Risikofaktoren reagiert werden muss, um eine optimale Therapie der Patienten nicht zu verpassen. Mögliche Differenzialdiagnosen der TTP können zu einer initial falschen Therapie führen oder eine korrekte Diagnose verschleiern. Zudem sind viele Sachverhalte nicht abschließend geklärt oder erforscht worden, sodass sich hier wiederum Schwierigkeiten ergeben, da die pathophysiologischen Zusammenhänge noch nicht eindeutig verstanden werden. Da auch das klinische Erscheinungsbild der TTP von dem oben diskutierten individuellen Risiko der Patienten abhängt, kann die korrekte Diagnosefindung erschwert werden. Eine Diagnostik mittels ADAMTS13-Aktivitätsmessung kann hier für viele Patienten einen Vorteil bringen, da ein ADAMTS13-Mangel eindeutig und schnell diagnostiziert werden kann, woraufhin eine angemessene Therapie für den Patienten eingeleitet werden kann.

### **5.1.2 Symptome**

Für die Patienten spielt neben der korrekt durchgeführten und optimalen Therapie auch eine schnelle Diagnosefindung eine wichtige Rolle. Die Kenntnis über mögliche Auslöser

und prädisponierende Faktoren der TTP sind oft nicht fundiert genug, um eine TTP sicher und schnell zu erkennen, weshalb auch das Wissen über die möglichen Erstsymptome einer beginnenden TTP an Bedeutung gewonnen hat.

Schon seit vielen Jahren ist die Symptom-Pentade (Thrombozytopenie, hämolytische Anämie, Fieber, renale und zentralnervöse Dysfunktion) bekannt, nach deren klinischen und laborchemischen Eigenschaften die thrombotisch thrombozytopenische Purpura von anderen thrombotischen Mikroangiopathien (TMA) unterschieden werden kann (31). Da jedoch selten alle fünf Symptome gemeinsam auftreten, ist man in den letzten Jahren vermehrt dazu übergegangen, vor allem die ADAMTS13-Aktivität in die Diagnosestellung mit einzubeziehen (34). Durch intensive Forschung, Beobachtungen und Auswertungen der Melderegister für TTP konnten verschiedene Triggerfaktoren isoliert werden, die den Ausbruch eines Krankheitsschubs begünstigen (vgl. Kapitel 5.1.1). Die Melderegister geben jedoch zusätzlich Auskunft über die Symptome, die bei den Patienten unter einer Exazerbation zu finden waren. Nur selten wird das Auftreten von alle fünf Leitsymptome gleichzeitig bei den Patienten beschrieben, wohingegen neurologische Symptome wie Verhaltensauffälligkeiten, Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma, Sensibilitätsstörungen, Aphasien, starke Kopfschmerzen oder Paresen oft auftreten (60 % der Fälle). Weiterhin finden sich Niereninsuffizienz (40 %), Fieber (33 %), Thrombozytopenie ( $< 30.000/\mu\text{l}$ ), Petechien und Fragmentozyten im peripheren Blutausschlag als Zeichen der Mikroangiopathie (138). Weitere Diagnosekriterien stellen eine hämolytische Anämie ( $\text{Hb} \leq 12 \text{ g/l}$ ), negativer Coombs-Test, ein LDH-Anstieg sowie nicht nachweisbares Serum-Haptoglobin ( $\leq 10 \text{ mg/dl}$ ) dar (126, 139).

Bei der in Mainz durchgeführten Befragung wurde hauptsächlich auf die subjektiven Symptome eingegangen, die die Patienten bei einer beginnenden Krankheitsepisode verspürten. Neurologische Symptome wurden bei 55 % der TTP-Schübe von den Patienten als klinisches Symptom genannt. Darunter fielen insbesondere starke Kopfschmerzen, Somnolenz, Seh-, Sprach- und Gedächtnisstörungen, sowie Parästhesien und Schwindel. Weitere Erstsymptome waren Zeichen der hämolytischen Anämie (15,4 % der genannten Symptome), wie Hämatome, Petechien und Blässe. Zudem wurden abdominelle Beschwerden (10,1 %) von den Patienten als häufiges Erstsymptom beschrieben (vgl. Tabelle 50 im Anhang).

### **5.1.3 Therapiemöglichkeiten der TTP**

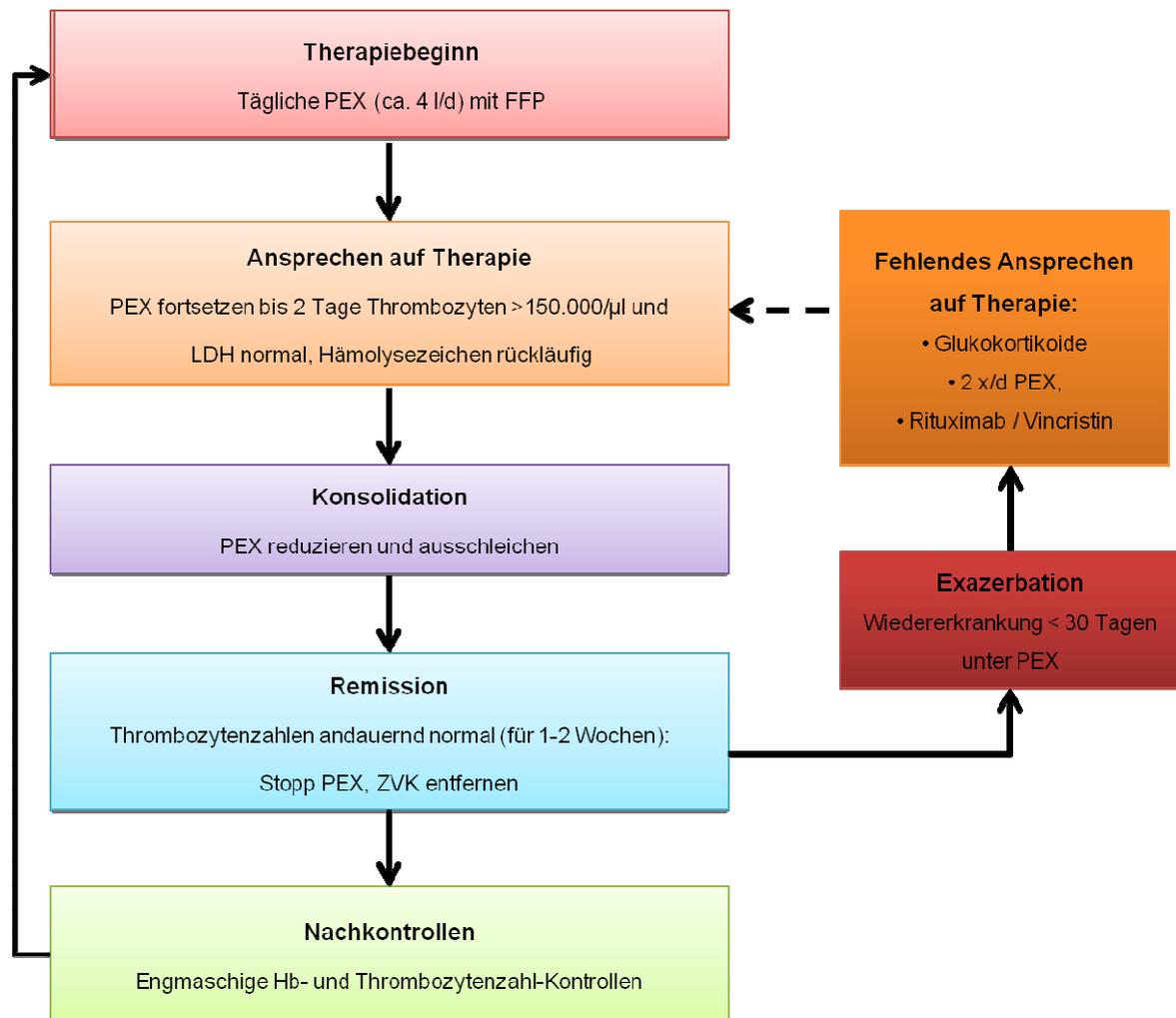
Vor der Einführung der Plasmapheresetherapie lag die Mortalitätsrate der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura bei  $\geq 90 \%$ . Nach der Einführung der Plasmapheresetherapie stieg das Überleben der Patienten auf rund 80 % an. Eine Plasmainfusionstherapie ohne Plasmaaustausch garantiert ein etwa 50 %iges Überleben der Patienten (103, 140).

Heutiger Goldstandard der Therapie stellt die Plasmapherese dar (141). Dabei sollen der Austausch von Patientenplasma gegen Spenderplasma zum einen UL VWF-Multimere und ADAMTS13-Antikörper aus dem Patientenblut entfernen und zum anderem dem Patienten wieder funktionsfähiges ADAMTS13 zuführen (142). Dieser Sachverhalt ist jedoch nicht endgültig belegt, da die PEX auch bei Patienten anspricht, die nicht unter schwerem ADAMTS13-Mangel leiden (143).

Die ursprünglichen Therapieoptionen der TTP, Plasmainfusion und Plasmapherese wurden 1991 durch die von G. Rock et al. durchgeführte Studie relativiert (11). In einer siebenjährigen Studie wurden die Effektivität von Plasmainfusion und Plasmapherese sowie die Mortalität unter den beiden Therapien untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass TTP-Patienten im Plasmapherese-Arm der Studie eine schnellere Remission erreichten, als Patienten, bei denen eine Plasmainfusion durchgeführt wurde. Jedoch wurde für die Durchführung von Plasmapheresen deutlich mehr Plasma substituiert als im Kontrollarm. Als entscheidender Faktor konnte gezeigt werden, dass die Mortalität bei der PEX deutlich unter der der Plasmainfusionstherapie lag ( $p_{9 \text{ Tage}} = 0,035$ ,  $p_{6 \text{ Monate}} = 0,036$ ) (11).

Laut Kaplan und Scully ist ein schneller Behandlungsbeginn für das Überleben der Patienten ausschlaggebend, daher sollte eine Plasmapheresetherapie schon bei Verdacht auf das Vorliegen einer TTP begonnen werden, auch wenn die Diagnose noch nicht endgültig festgelegt ist (39, 141). Andere Vorerkrankungen des Patienten können die facettenreichen Symptome der TTP oft verschleiern und eine korrekte Diagnosefindung hinauszögern (144). Da die Plasmainfusion der Plasmapheresetherapie in ihrer Effektivität unterlag (11), stellt sie nur noch eine Therapieindikation dar, falls eine Plasmaaustauschtherapie nicht schnell genug durchzuführen ist. Jedoch sollte eine adäquate Therapie in diesem Fall schnellstmöglich bereitgestellt werden. Bei der Plasmainfusion werden Plasamengen von 25 – 30 ml/kg KG/d infundiert. Diese Therapie kann auch als Second-Line Therapie bei Patienten zum Einsatz kommen, die nicht adäquat auf die Plasmapherese ansprechen (141).

Grundsätzlich sollte eine Plasmapherese mit ca. vier Litern pro Tag begonnen werden, und nach Normalisierung der Laborwerte langsam ausgeschlichen werden (siehe Therapie-Algorithmus Abb. 29).



**Abb. 29:** Therapiealgorithmus der primären idiopathischen TTP. Die unterbrochene Linie stellt eine Therapieindikation dar, die nur für die Minderheit der Patienten zutrifft. FFP: Fresh Frozen Plasma, PEX: Plasma-Exchange Therapie, ZVK: zentraler Venenkatheter, Hb: Hämoglobin (modifiziert nach (7, 34))

Wichtig für die adäquate Durchführung des Algorithmus ist, dass auch nach dem Start der Plasmapheresetherapie nach weiteren Ätiologien gesucht wird, die die klinischen Symptome des Patienten erklären können. Oftmals versteckt sich hinter einer vermeintlichen TTP auch eine Exazerbation eines SLE, deren Differenzierung von einer TTP oftmals aufgrund der ähnlichen Symptomatik kaum möglich erscheint (95). Zudem können systemische Infektionen und Tumorerkrankungen das Erscheinungsbild einer TTP annehmen. Sollte eine andere Identität für die klinischen Symptome des Patienten gefunden werden als die TTP, so sollte die Plasmapherese gestoppt werden (34).

Bei schlechtem Ansprechen auf alleinige Plasmaaustauschtherapie kann zusätzlich versucht werden, die Remission mittels Gaben von Glukokortikoiden zu erreichen. Balduini et al. konnten ein verbessertes Outcome unter PEX und Steroidtherapie zeigen (145), jedoch ist die Wirksamkeit einer Kortikosteroidtherapie bislang nicht in kontrollierten,

randomisierten klinischen Studien nachgewiesen worden (7, 33). Vinkaalkaloide (1 mg Vincristin /d für drei Tage) sollten aufgrund ihrer schweren Nebenwirkungen ebenfalls nur unter sorgsamem Abwägen von Nutzen und Risiko zum Einsatz kommen. Gleiches gilt für andere immunmodulierende Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, und Cyclosporin A. Für diese Substanzen konnte ebenfalls noch keine effektive Wirksamkeit belegt werden, auch wenn sie in einzelnen Fällen zur Remission führten (7).

Der Einsatz von Rituximab während schweren TTP-Exazerbationen und zum Erhalt der Remission bei rückfallgefährdeten Patienten unterliegt derzeit in Deutschland noch dem Off-label Einsatz. Scully et al. untersuchten 2011 die Rituximabwirkung bei der TTP in einer klinischen Studie (37). In der *STAR-Study of TTP and rituximab, A randomized clinical Trail* (U.S. National Institutes of Health, 2010) wurde der Effekt der Rituximabgaben zusätzlich zur Plasmapheresetherapie gegen den alleinigen Einsatz von PEX zusammen mit Glukokortikoiden getestet. Schon frühere Studien konnten belegen, dass durch den Einsatz von Rituximab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20, eine längere Remission ohne erneute Rückfälle erzielt werden konnte als bei einer konventionellen Therapie nur mittels PEX in Kombination mit Steroiden (1 mg/kg KG Predisolonäquivalent oral) (146, 147). Die 2011 veröffentlichten Ergebnisse von Scully et al. über den Einsatz von Rituximab zur Initialtherapie der TTP und als Prävention vor Rückfällen ist vielversprechend. Die Gruppe konnte in der Studie nachweisen, dass durch Rituximabgaben initial zur PEX der Klinikaufenthalt der Patienten, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, verkürzt werden konnte. Ein weiteres vielversprechendes Ergebnis der Studie war, dass die Patienten unter Rituximab signifikant weniger Rückfällen erlitten, als die Kontrollgruppe unter konventioneller Steroid- und immunsuppressiver Therapie (37). Eine engmaschige Überwachung bei betroffenen Patienten wäre vorstellbar, um im Falle einer Blutbildveränderung, die auf den Ausbruch eines erneuten Schubes hinweist, rechtzeitig mit Rituximabgaben zu intervenieren. Hierfür ist eine schnelle und zuverlässige ADAMTS13-Bestimmung notwendig, um eine Routine ADAMTS13-Aktivitätsbestimmung durchführen zu können. Die FRET-Assays stellen eine Möglichkeit für ein routinemäßiges ADAMTS13-Monitoring dar (133).

Derzeit liegt die Therapieempfehlung für den Einsatz von Rituximab bei 375 mg/m<sup>2</sup> pro Woche für vier aufeinanderfolgende Wochen (142). Da die Halbwertszeit von Rituximab durch die Plasmapherese beeinflusst wird, sollte nach der Rituximabgabe die Plasmapheresetherapie für wenigstens vier bis 24 Stunden unterbrochen werden (148). Ein weiteres Hinauszögern der PEX würde sich jedoch nachteilig auf den Krankheitsverlauf des Patienten auswirken. Durch die Plasmapherese kann es zu Schwankungen im Rituximabspiegel um bis zu 65 % kommen, weshalb mehrmalige Gaben von Rituximab nötig werden (149). Die Untersuchung über die Pharmakokinetik von Rituximab während der PEX zeigte, dass

innerhalb von 3 Tagen eine Depletion der B-Zellen einsetzte, wobei die Anzahl der durchgeführten Plasmapheresen nach Rituximabgabe keine Rolle spielten. Diese Tatsache lässt den Rückschluss zu, dass eine initiale Gabe von 375 mg/m<sup>2</sup> Rituximab eher überdosiert erscheint. Jedoch ist die minimal wirksame Dosis noch unbekannt (149). Im Schnitt lässt sich die Wirksamkeit von Rituximab für etwa 10 bis 12 Monate verfolgen. In dieser Zeit blieben die untersuchten Patienten rückfallfrei (33, 37). Das Nebenwirkungsspektrum der Rituximabtherapie ist breit gefächert. Oft treten nur leichte Nebenwirkungen wie Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerz, Übelkeit und Blutdruckabfall auf. Gravierende Nebenwirkungen wie kardiogene Schocks und schwere Infektionen sind selten, müssen jedoch umso kritischer (150) bei der Therapieabwägung mit beurteilt werden (33). Derzeit können die Langzeiteffekte von Rituximab noch nicht beurteilt werden. Gefürchtete Infektionen und andere schwerwiegende Nebenwirkungen blieben in der von Scully et al. durchgeführten Studie bei der Patientenkohorte unter Rituximab jedoch aus (37).

Die Mainzer Studie zeigte, dass im Schnitt 26,5 Plasmapheresen nötig waren, um die Patienten in die Remission zu führen, was bei einer durchschnittlichen Plasmapherese-therapie mit vier Liter Plasmaaustausch pro Sitzung einem Gesamtvolumen von 106 Litern FFP entspricht. Diese Menge verdeutlicht die Dringlichkeit, mit der nach supportiven Therapien gesucht wird, um die Therapiedauer für die Patienten zu verkürzen. Nur 35,5 % der befragten Patienten erhielten eine zusätzliche Rituximabtherapie neben der Plasmapherese. Die Auswertung lässt aber auch vermuten, dass oft der Einsatz der Rituximabtherapie entweder zu lange hinausgezögert wurde oder der behandelnde Arzt zu zögernd mit dem Einsatz von Rituximab umging. In den schweren Fällen wurde jedoch eher die Entscheidung für eine zusätzliche Gabe von Rituximab getroffen. Inwiefern sich die Gaben von Rituximab auf die Rückfallrate der Patienten auswirkte, konnte anhand des durchgeführten Fragebogens nicht evaluiert werden.

Neue Therapieansätze stellen die Aptamer- und die rekombinante ADAMTS13-Therapie dar. Mayr et al. entdeckten 2010 ein Aptamer, ARC1779, das spezifisch an die A1-Domäne des VWF bindet und so die VWF-gesteuerte Thrombozytenaggregation über den GPIIb-Rezeptor verhindert (151). Durch den Einsatz von ARC1779 wird die Neuausbildung von Thromben in einem Akut-Stadium der TTP unterbunden, wodurch schwerwiegendere Schäden in der Endstrombahn der Organe vermindert werden können. In dem 2011 veröffentlichten Bericht von Caterland et al. konnte gezeigt werden, dass die Patienten des Aptamer-Armes schneller die Remissionen erreichten als die Placebogruppe. Die Gabe von ARC1779 konnte jedoch nicht alle Laborparameter der TTP-Patienten korrigieren (152). Die Aptamer-Therapie kann, wie auch die immunsupprimierende Therapie, zusätzlich zur PEX angewendet werden. Da sie jedoch nicht in die Pathophysiologie der Krankheitsentstehung eingreift, bleibt sie als supportive Maßnahme anzusehen (150). Die

Aptamer-Forschung stellt ein vielversprechendes Therapiekonzept für die TTP dar, muss aber über die nächsten Jahre noch verbessert und erprobt werden. Das Medikament wurde von den Patienten gut vertragen, schwere Blutungskomplikationen blieben aus (150). Zudem konnte im Maus-Modell der Einsatz von rekombinanten ADAMTS13 (153) und N-acetylcystein (154) erprobt werden. In welchen Dosen rekombinantes ADAMTS13 bei einer akuten erworbenen TTP eingesetzt werden muss ist von Patient zu Patient unterschiedlich. Je nach Ausgangstitel der inhibitorischen Anti-ADAMTS13-Antikörper sind unterschiedliche Mengen an rekombinanten ADAMTS13 nötig, um die vorhandenen Antikörper abzusättigen und rekombinantes ADAMTS13 zu substituieren. Derzeit ist noch nicht sichergestellt, dass rekombinantes ADAMTS13 allein, ohne PEX, akute Episoden einer erworbenen TTP überwinden kann (155).

Die Therapie der TTP ist vielseitig und oft abhängig von der ursächlichen Ätiologie der Erkrankung. Somit gelten für Schwangerschafts-assoziierte Fälle andere Therapierichtlinien als beispielsweise für HIV-assoziierte, für Knochenmarktransplantation-assoziierte und Malignom-assoziierte TTP-Fälle. 2012 veröffentlichten Scully et al. die neuesten *Guidelines on diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies* (39). Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten Therapiegrundsätze nochmals kurz mit jeweiligem Evidenzgrad zusammengefasst (aus (39)):

1. TTP muss als hämatologischer Notfall behandelt werden (1A).
2. Die initiale Diagnose muss anhand der Anamnese, Klinik, Routinelabor und Blutausstrich gestellt werden (1A).
3. Um die Mortalität der TTP zu senken, muss eine unverzügliche PEX innerhalb der ersten vier bis acht Stunden nach Vorstellung eingeleitet werden, wenn der Patient Zeichen einer hämolytischen Anämie und Thrombozytopenie aufweist (1B).
4. HIV-, Hepatitis B-, Hepatitis C-, Autoantikörper- und ggf. Schwangerschaftstests sollten bei Aufnahme erfolgen (1A).
5. Plasmaproben vor Therapiebeginn abnehmen, um ADAMTS13-Aktivität, -Antigen und -Antikörper testen zu lassen (1B).
  - ADAMTS13-Aktivität < 5 %, das Fehlen von Autoantikörpern und der homozygote oder heterozygote Defekt des ADAMTS13-Gens sprechen für eine kongenitale TTP (1 A).
6. Um Rückfälle und Wiedererkrankungen zu vermeiden, sollten Medikamente, die eine TTP triggern können (z.B. Chinin, östrogenhaltige Medikamente) vermieden werden (2 C).
7. An TTP erkrankte Frauen sollten Östrogen-freie Kontrazeptiva erhalten (1 C).

Wichtige Therapierichtlinien der akuten TTP (siehe hierzu auch Abb. 29):

1. PEX mit 1,5-fachem Plasmavolumenaustausch beginnen und täglich wiederholen (1 B).
2. Austauschvolumen kann reduziert werden, wenn sich die Laborwerte und Klinik des Patienten stabilisiert haben (2 B).
3. Bei lebensgefährlichen Erkrankungen sollte eine Therapieintensivierung durchgeführt werden (2 B).
4. Nach Normalisierung der Laborwerte (Thrombozyten  $> 150.000/\mu\text{l}$ ) sollte die PEX noch für mindestens zwei Tage weiter durchgeführt werden (2 B).
5. Schwangere mit kongenitaler TTP sollten während der Schwangerschaft und postpartum in spezialisierten Kliniken betreut werden und ADAMTS13-Substitutionen erhalten (1 A).
6. Bei Schwangeren mit erworbener TTP sollten während und nach der Schwangerschaft regelmäßige ADAMTS13-Aktivitätskontrollen durchgeführt werden (1B).
7. Bei Malignom- oder Knochenmarktransplantation-assoziiertes TTP ist eine PEX nicht indiziert (1 A).

Zusätzliche Therapieoptionen:

1. Intravenöse oder orale Steroidtherapie kann durchgeführt werden (1 B).
2. Bei schweren Verläufen einer akuten idiopathischen TTP (neurologische oder kardiologische Symptome) sollte zusätzlich zur PEX und Steroiden eine Rituximabtherapie erwogen werden (1 B).
3. Bei (chronischen) Rückfällen oder therapierefraktärer TTP sollte den Patienten Rituximab verabreicht werden (1 B).
4. Bluttransfusionen (1B), Folsäuresubstitution (1 A), Thromboseprophylaxe mit niedermolekularem Heparin ab Thrombozytenzahlen  $> 50.000/\mu\text{l}$  (1B) sollten individuell bei Bedarf verabreicht werden.

#### **5.1.4 Nebenwirkungen der Plasmapheresetherapie**

Die Plasmapheresetherapie wurde mit größer werdendem Erfolg in der Therapie der TTP etabliert. Heutzutage ist die Plasmapherese in vielen Kliniken durchführbar und ihr Einsatzspektrum vielfältig. Bei der Beurteilung von Nebenwirkungen, die bei einer PEX auftreten können, erscheint es sinnvoll, zwischen zwei verschiedenen Gruppen der Nebenwirkungen zu unterscheiden:

Nebenwirkungen,

- 1) die mit dem Plasmaphereseverfahren assoziiert sein können (siehe 5.1.4) und
- 2) die durch die Substitution von Fremdplasma hervorgerufen werden können.

Unerwünschte Reaktionen, die durch die extrakorporale Zirkulation oder durch den Einsatz von Substitutionspräparaten hervorgerufen werden können, reichen von leichter Übelkeit bis hin zu lebensgefährlichen Situationen für den Patienten (156). Ishihara et al. teilen die Reaktionen auf die Plasmapheresetherapie nach der Zeit ihres Auftretens in frühe Reaktionen (von Beginn bis 30 min nach Start der PEX auftretend), mittlere (nach 30 Minuten nach Therapiestart bis 30 min vor Therapieende auftretend) und späte Reaktionen auf die Therapie ein (157). Frühe Reaktionen auf die Therapie traten in der angegebenen Patientengruppe nur selten auf (2,9 %) und umfassten vor allem vasovagale Reaktionen, Urtikaria, Erbrechen und ein einmaliges Todesereignis bei einem Patient. Am häufigsten wurden Reaktionen in der mittleren Zeitspanne bei der Therapie beobachtet (8,6 %), worunter hauptsächlich Hautausschläge, Übelkeit, Blutdruckabfall, Hämolyse und Angst zu nennen waren. Spätkomplikationen wurden nur sehr selten in Form von Urtikaria beobachtet (157).

Unerwünschte Reaktionen, die direkt mit der Plasmasubstitution in Verbindung gebracht werden können, sind in Tabelle 40 aufgelistet.

Unerwünschte Nebenwirkungen bei FFP-PEX	Unerwünschte Nebenwirkungen bei s/d Plasma PEX
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Risiko für allergische Reaktionen 0,053 % / Beutel (47)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Risiko für allergische Reaktionen 0,003%/Beutel (47)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Allergische Reaktionen auf Citrat 18 % für CSP (50)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Allergische Reaktionen auf Citrat 6,9 % (50)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 1 TRALI Fall pro ca. 3500 transfundierte Plasma Units (36)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ &gt; 150000 PEX in Jena ohne TRALI (158)</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Potentiell höheres Risiko für venöse Thrombus aufgrund von ↓Protein S (51)</li> </ul>

**Tabelle 40:** Zwischenfälle der Plasmapherese: Gegenüberstellung von FFP und s/d Plasma. CSP: Cryosupernatantplasma. Aus (159).

Das Risiko einer allergischen Reaktion auf das solvent/detergent Plasma wird wesentlich niedriger beschrieben als Reaktionen auf Einzelspenderplasma. Im aktuellen Hämovigilanzbericht des PEI von 2010 (160) werden die schweren allergischen Zwischenfälle auf Gefrierplasma mit 17,36 % pro  $10^6$  transfundierte Einheiten beschrieben. Insgesamt, auf die Daten der Vorjahre bezogen, stiegen die schweren allergischen Reaktionen auf das Plasmaprodukt an. Eine Differenzierung der Daten zwischen Zwischenfällen bei FFP-Transfusionen und s/d Plasma-Transfusionen ergibt sich aus dem Hämovigilanzbericht jedoch nicht. Edel et al. berichten aber über den österreichischen Hämovigilanzbericht, der die allergischen Reaktionen auf FFP mit 0,053 % pro Unit angibt (47). Für s/d Plasma liegt das Risiko für allergische Reaktionen laut Edel et al. bei 0,003 % pro Unit.

Eine Gruppe der häufigsten Nebenwirkungen, die durch die Plasmapherese hervorgerufen werden, sind Reaktionen auf das zur Antikoagulation verwendete Citrat. Citrat ruft eine Hypokalziämie hervor, durch die es zu Muskelkrämpfen, Parästhesien, EKG-Veränderungen und in schweren Fällen zur Tetanie kommen kann. Eine sinnvolle Standardprophylaxe gegen die Citrat-assoziierte Hypokalziämie ist die Infusion von Kalzium-Gluconat (2 cm<sup>2</sup> einer 10 %igen Kalium-Gluconat-Lösung pro 250 ml ersetztes Plasma) während der Therapiesitzung (161). Sollte diese Menge bei einem Patienten nicht ausreichen, um einer Citratintoxikation vorzubeugen, wird eine zusätzliche orale Substitution von Kalziumkarbonat empfohlen (51).

Ein entscheidender Faktor, bei dem das FFP weit hinter den Werten des Octaplas® zurückbleibt, sind unerwünschte Wirkungen aufgrund der Citratbelastung durch die Plasma-substitution. Die in der Tabelle 40 angegebenen Werte beziehen sich auf Cryosuper-natant-Plasma. Die Werte können aber in ähnlicher Weise auch auf das FFP übertragen werden, da beide Plasmen aus Einzelblutspenden hergestellt werden (19). Symptome auf das im Plasma vorhandene Citrat werden meist von Patienten in Form von Muskelzittern oder Parästhesien im Oropharynx und an den distalen Extremitäten erlebt, die mit Kalzi-um ausgeglichen werden können (51). Durch die Verwendung von Octaplas® kann die Citratreaktion jedoch um 50 % reduziert werden.

Shemin et al. beschreiben eine Komplikationsrate bei der PEX von insgesamt 36% (51). Bei 11 % der PEX traten bei der untersuchten Patientengruppe mehrere Komplikationen auf. 80 % der untersuchten Patienten erlitten wenigstens eine Komplikation. In der Kohor-te traten Fieber, Urtikaria, Hypokalziämie-Symptome sowie Pruritus am häufigsten auf. Zudem können eine Citrat-assoziierte metabolische Alkalose auftreten oder hämorrhagi-sche Diathesen entstehen (51, 159) (siehe auch Kapitel 2.5).

In Tabelle 41 sind die verschiedenen Nebenwirkungen der PEX, die bei den Mainzer Pati-enten aufgetreten sind dokumentiert. Verglichen wurden die Häufigkeiten mit Daten des Rhode Island Hospitals.

Art der Nebenwirkung	Mainzer Patienten	Rhode Island Hospital
Parästhesie	64,4 %	7,3 %
Schüttelfrost	61,2 %	n. u.
Kopfschmerzen	50,6 %	0,3 %
Tachykardie	36,8 %	5,6 %
Hitzegefühl	35,6 %	7,7 %
Urtikaria	34,7 %	7,3 %
Kollaps	31 %	n. u.
Hypotonus	26,4 %	6,9 %

**Tabelle 41:** Häufige Nebenwirkungen der Plasmapherese bei der Mainzer Patientenkohorte und der Untersuchung von Shemin et al. (2007) aus dem Rhode Island Hospital mit (51, 159). N. u.: nicht untersucht.

Auffallend an den oben dargestellten Daten ist, dass die Zahlen in Mainz wesentlich höher liegen als die Zahlen aus Amerika. Dies mag in mehreren Gründen seine Ursache finden: die Patienten aus Rhode Island bekamen eine individuelle prophylaktische Therapie, um möglichen Nebenwirkungen vorzubeugen. So wurden alle Patienten prophylaktisch mit der von Weinstein empfohlenen Kalziumdosis von Beginn der PEX an behandelt. Zudem bekamen Patienten, bei denen nach der ersten PEX eine allergische Reaktion in Form

von Urtikaria auftrat, eine Prophylaxe mit Diphenhydramin vor der Behandlung, um allergische Reaktionen in Zukunft zu vermeiden. Bei einem Blutdruckabfall unter 100 mmHg systolisch wurde den Patienten Volumen (NaCl 0,9%-Lösung) verabreicht. Zudem wurden die Vitalparameter der Patienten strikt kontrolliert und von speziell geschultem Personal dokumentiert (51). Jedoch ist zu beachten, dass im Rhode Island Hospital 1727 Fälle untersucht wurden und in der Mainzer Studie nur die Daten von 87 Patienten evaluiert werden konnten. Anhand der gegebenen Daten kann kein direkter Vergleich aufgestellt werden, doch lassen sich Trends ablesen. Parästhesien, Hitzegefühl und Urtikaria kamen waren die häufigsten Nebenwirkungen in beiden Patientengruppen. In Mainz traten Kopfschmerzen bei etwa 50 % der Patienten auf, wohingegen diese Nebenwirkung der PEX in Rhode Island nur bei 0,3 % der Patienten vorkam.

Die akkurate Dokumentation der Nebenwirkungen und Vitalparameter konnte bei der Auswertung der Mainzer Patientendaten nicht stattfinden, da es sich um eine retrospektive Patientenbefragung handelt. Die Patienten wurden teilweise in verschiedenen Kliniken behandelt und die Symptome konnten nur subjektiv vom Patienten wiedergegeben werden. Eine Rückfrage bei behandelten Ärzten oder ein Aktenstudium war nur möglich, sofern die Patienten den Fragebogen nicht anonymisiert beantwortet hatten. Besonders für klinische Messpunkte wie Hypotension und Tachykardie konnten somit nur ungenaue Daten gesammelt werden. Somit wurde eine Tachykardie bei Patienten angenommen, die während des Therapieprozederes starkes Herzrasen verspürten. Mit dem Symptom des Blutdruckabfalles taten sich viele Patienten sehr schwer, da sie oft nicht eindeutig wiedergeben konnten, ob sie unter Hypotension litten. Somit fehlt es den hier angegebenen Daten möglicherweise an Spezifität.

Um die Patientenangaben genauer zu differenzieren, wurde darum gebeten, dass die Patienten den durchlebten Nebenwirkungen einen Schweregrad zuteilten. Somit konnte jeder Patient eine Aussage darüber machen bei welchem Schub welche Reaktionen verspürt wurden, und wie intensiv diese waren. Hierzu wurde den Patienten angeboten die Intensität der Nebenwirkung auf einer Skala von null (nicht aufgetreten) bis fünf (sehr stark) zu quantifizieren.

Bei der Auswertung der Nebenwirkungsqualitäten ergibt sich, dass besonders Kribbelparästhesien als stark (17,2 %) bis sehr stark (12,6 %) beschrieben wurden. Auch Schüttelfrost war eine Reaktion auf die durchgeführte Therapie, die in 18,4 % der Fälle als sehr stark wahrgenommen wurde. Kopfschmerzen traten etwa der Hälfte der Therapien auf, wobei diese als sehr leicht (16,1 %) bis mäßig (11,5 %) beschrieben wurden. Hitzegefühl war ebenfalls eine Reaktion, die meist nur in leichter auftrat. Urtikaria und Hypotonus wurden bei den durchgeführten Therapien sehr unterschiedlich stark erlebt. Die Korrelations-tabelle (Tabelle 19, Kapitel 4.1.5) zeigt, dass die verschiedenen Nebenwirkungen auf

die Therapie auch nebeneinander aufgetreten sind. Signifikant häufig traten Schüttelfrost zusammen mit Kopfschmerzen oder Tachykardie auf. Bei dem gemeinsamen Auftreten von Urtikaria und Hitzegefühl konnte ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang gesehen werden. Von klinischer Bedeutung sind jedoch das gemeinsame Auftreten von Kollaps und Hypotonus. Aus der Kreuztabelle lässt sich zudem entnehmen, dass Kollaps signifikant häufig mit anderen Nebenwirkungen wie Urtikaria, Kopfschmerz, Hitzegefühl und Tachykardie gemeinsam auftrat.

Kribbelparästhesien war die einzige Nebenwirkung, die nur wenig Signifikanz im gemeinsamen Auftreten mit anderen Reaktionen zeigte.

Ein interessanter Aspekt für weitere klinische Untersuchungen wäre die Untersuchung von Plasmapherese und Plasmaseparation bezüglich ihres Nebenwirkungsspektrums. Während bei der Plasmapherese eine Separation der Blutbestandteile durch Zentrifugation herbeigeführt wird, wird bei der Plasmaseparation das Plasma durch Filtration von den Blutkomponenten getrennt.<sup>2</sup> Derzeit findet sich noch keine vergleichende Studie in Bezug auf Effektivität, Verträglichkeit und Nebenwirkungen der beiden Verfahren bei der TTP.

Bei der Untersuchung von verschiedenen Apherese-Systemen wurden jedoch bereits unterschiedliche Nebenwirkungen und Komplikations-Spektren erkannt (157).

Ein Vergleich erscheint schwierig, da die Durchführung der Therapiemaßnahmen sehr individuell bei den Patienten gehandhabt werden muss. Oft ist während des Verfahrens eine Veränderung der Einstellungen notwendig und das Verfahren muss an die Patientensituation angepasst werden, wodurch eine objektive Beurteilung erschwert wird. Dennoch wäre die Untersuchung dieses Teilaspektes der Therapie zur Vervollständigung der Therapiebeurteilung wichtig. Das transfundierte Plasmaprodukt stellt nur eine Hälfte der Therapieform der PEX dar, die andere, durchaus genauso wichtig erscheinende Hälfte, wird durch die verwendete Apparatur gestellt. Dementsprechend sinnvoll erscheint eine ganzheitliche Beurteilung des Therapiekonzeptes.

Ein weiterer Gesichtspunkt, unter dem die Patientendaten betrachtet werden können, ist, neben den Vorerkrankungen die Allergieneigung der Patienten. So kann ein Zusammenhang zwischen einer vorbestehenden Allergie und einer Hyperreagibilität auf das verabreichte Plasmaprodukt vermutet werden. Die Befragung ergab, dass 49,5 % der Patienten unter einer Allergie leiden (vgl. 4.1.6. Abb. 15).

---

<sup>2</sup> Korrespondenz mit Dr. R. Conradi, Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz und Dr. B. J. Thanka Nadar, I. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz.

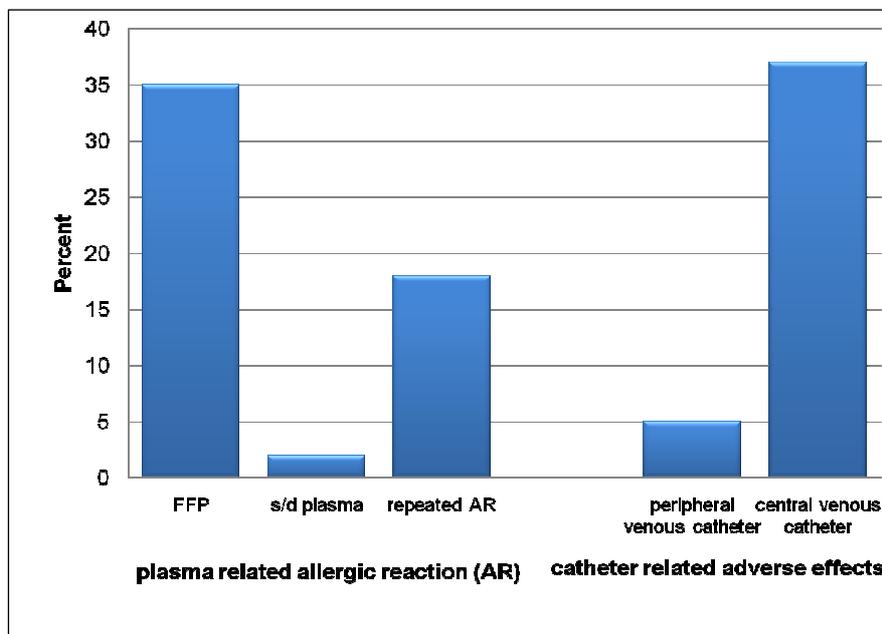
Bei der Plasmapherese erlitten 35,6 % der Patienten eine allergische Reaktion auf das Plasmapräparat. Diese Beobachtungen konnten auch bei ähnlichen Untersuchungen anderer Gruppen festgestellt werden (162). In der Untersuchung von Reutter et al. zeigten bis zu 71 % der Patienten, die FFP erhielten, eine allergische Reaktion auf das Plasma. Von Baeyer beschrieben die allergischen Reaktionen auf FFP mit 40- 45 % (163). Wenn die Patienten der Mainzer Kohorte eine allergische Reaktion auf das Substitutionsplasma zeigten, wurden sie ab der folgenden Behandlung prophylaktisch mit einem Antihistaminikum (bei 12,4 % der Betroffenen) oder Glukokortikoiden (5,6 % der Betroffenen) behandelt. Trotz einer antiallergischen Präexpositionsprophylaxe können allergische Reaktionen auftreten. Bei einer Immunreaktion unter antiallergischer Therapie sind die Patienten auf intensive ärztliche Überwachung angewiesen, um sicherzustellen, dass mögliche Symptome nicht eskalieren (162). Bei 14 von insgesamt 29 Mainzer Patienten, die allergisch auf das Plasmaprodukt reagierten, traten die Allergiesymptome auch in anschließenden Behandlungen, trotz therapeutischer Maßnahmen, wiederholt auf. Zwei Patienten erlitten einen anaphylaktischen Schock unter der Plasmatherapie. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der Studie von Reutter et al. wieder, wo sogenannte "break-through"-Reaktionen bei etwa der Hälfte der Patienten unter Antihistaminikaschutz auftraten (162).

Mögliche Ursache für das häufige Auftreten von allergischen Reaktionen auf das Substitutionspräparat bei den TTP-Patienten könnte die große Menge an Plasma und die Therapielänge sein, mit denen sie während der Therapie in Kontakt kommen. In der Literatur wird die Inzidenz für das Auftreten von allergischen Nebeneffekten mit 1-3 % pro Plasmaunit angegeben (164).

Eine Korrelation zwischen der Anzahl der verschiedenen Allergien der Patienten und der Anzahl der individuellen Nebenwirkungen ergab keine Signifikanz (vgl. Tabelle 60 im Anhang), was bedeutet, dass TTP-Patienten mit vielen Überempfindlichkeiten oder Allergien nicht häufiger unter Nebenwirkungen litten als Patienten mit wenigen Allergien.

Eine endgültige Aussage über die bessere Verträglichkeit von Octaplas® im Vergleich zu FFP konnte nicht gezogen werden. Die Befragten wurden fast ausschließlich mit herkömmlichem FFP behandelt. Nur bei einzelnen Patienten wurde eine Plasmapherese mit Octaplas® durchgeführt (siehe Abb. 30). Bei einer Patientin wurde nach anfänglicher FFP Therapie auf Octaplas® umgestellt, da diese Patientin schwerste Reaktionen auf das verabreichte Fremdplasma zeigte, die sich unter der Therapie mit s/d Plasma besserten (vgl. Tabelle 61 im Anhang). Pandey et al. beschreiben in ihrem aktuellen Review von 2012, dass allergische Reaktionen auf s/d Plasma wesentlich seltener sind, als auf herkömmliches FFP, bei dem es neben leichten Überempfindlichkeitsreaktionen auch zum anaphylaktischen Schock kommen kann (164).

Neben den schwerwiegenden unerwünschten Reaktionen auf das Fremdplasma und die verabreichten Substanzen, die durch eine Plasmapherese hervorgerufen werden können, führt auch der für die PEX nötige venöse Zugang oft zu erheblichen Komplikationen (51). Abb. 30 stellt die Häufigkeiten von Katheter-assoziierten Reaktionen den allergischen Reaktionen auf die Plasmaprodukte gegenüber.



**Abb. 30:** Gegenüberstellung der Häufigkeiten von allergischen Reaktionen auf das verabreichte Plasmapräparat und unerwünschten Reaktionen auf den Venenverweilkatheter. AR: allergische Reaktionen. Aus (159).

Für einen adäquaten Plasmaaustausch sind großvolumige Venenkatheter nötig, die oft aufgrund einer intensiven Therapie lang verweilen müssen. Aufgrund dessen sind Katheterinfektionen nicht selten (51, 165). Für die PEX wurde in 72,2 % der Fälle ein zentraler Katheter gelegt. Bei diesem Zugang kam es bei 35,6 % dieser Fälle zu Katheter-assoziierten Zwischenfällen, wie zum Beispiel Blutungen oder Infektionen. Je länger der gewählte Katheter bei den Patienten für die Therapie verweilen muss, umso größer wird das Risiko für eine Infektion im Bereich der Einstichstelle. Bei den befragten Patienten war das Komplikationsrisiko verhältnismäßig hoch. In anderen Untersuchungen von großen Patientengruppen lag die Komplikationsrate durch Blutungen und Infektionen bei 2,3 % (51). Bei der Auswertung des Oklahoma TTP Registry lag die Komplikationsrate der zentralen Venenkatheter bei einer ähnlich starken Kohorte bei 13 % (165). Bei der Auswertung des *Oklahoma TTP Registry* wurden nur die schweren Katheter-assoziierten Komplikationen ausgewertet. In der hier durchgeführten Studie wurde jedoch nicht zwischen der Schwere der Komplikation differenziert, sondern nur eine quantitative Auswertung durchgeführt.

Die lange und intensive Therapie der TTP stellt für viele Patienten eine enorme psychische Belastung dar, weshalb bei der Entwicklung neuer Therapiekonzepte mehr denn je die Lebensqualität der zu therapierenden Patienten im Fokus der Forschung steht. Für die Durchführung einer Plasmapherese ist das invasive Legen eines Venenverweilkatheters fast unumgänglich. 65,5 % der Mainzer Patienten hatten Angst vor der Katheteranlage, was die Belastungssituation für die Patienten noch vergrößert. Dies beobachteten auch Rios et al. in ihrer Studie 2012 (166).

Die gefährlichste Reaktion auf das verabreichte Fremdplasma kann die Entwicklung eines TRALI darstellen. Seit 2009 sind aufgrund des Risikoprofils nur noch Plasmaspenden von Spenderinnen mit negativer Schwangerschaftsanamnese zugelassen (167). Der Hämovigilanzbericht 2010 berichtet über keine TRALI in Zusammenhang mit der Transfusion von Gefrierplasma (168). Hellstern berichtete noch 2004 über eine weit höhere Inzidenz von TRALI, die jedoch aufgrund des neuen Transfusionsgesetzes relativiert werden muss (48). 2009 lag die Inzidenz von TRALI laut Angaben des Paul-Ehrlich-Institutes noch bei 4,56 % pro 10<sup>6</sup> transfundierte Plasmaunits und konnte 2010 auf null Zwischenfälle gesenkt werden.

Tabelle 42 stellt die oben diskutierten Punkte noch einmal zusammenfassend gegenüber:

FFP	Octaplas <sup>®</sup>
• Allergische Reaktionen auf Plasma ↑	• Allergische Reaktionen auf Plasma ↓
• Citratreaktionen ↑	• Citratreaktionen ↓
• TRALI (seit 2010) ↔	• TRALI ↔
• Infektionsrisiko (HCV, HBV, HIV 2010) ↔	• Infektionsrisiko ↔
• Gerinnungsfaktoren ↑	• Gerinnungsfaktoren ↓
• ADAMTS13 Aktivität ↔	• ADAMTS13 Aktivität ↔

**Tabelle 42:** Vergleich der Vor- und Nachteile von FFP und Octaplas<sup>®</sup>. ↓ = Vermindert im Vergleich zum Konkurrenz Plasma, ↑ = erhöht im Vergleich zum Konkurrenzplasma, ↔ = Gleiche Voraussetzungen in beiden Plasmen. Infektionsrisiko: Vgl. Daten Hämovigilanzbericht 2010 (160).

Aufgrund dessen, dass in den letzten Jahren die Übertragung von Krankheiten und TRALI durch FFP fast auf den Nullpunkt gesunken sind (160), unterliegt das FFP dem s/d Plasma nur noch bei der Triggerung von allergischen Reaktionen. Der Schwachpunkt des Octaplas<sup>®</sup> liegt darin, dass es eine verminderte Konzentration an Gerinnungsfaktoren aufweist, wodurch das Risiko für ein thrombembolisches Ereignis bei den Patienten steigt. Letztlich bleibt es dem behandelten Arzt überlassen, für welches Plasmaprodukt er sich

entscheidet, solange die Therapie schnellstmöglich bereitgestellt wird. Die durchgeführte Untersuchung konnte keine eindeutige Überlegenheit von einem speziellen Plasmaprodukt belegen. Für TTP-Patienten, die nicht oder nur schlecht auf die Plasmapherese mit FFP ansprechen, bietet Octaplas® eine adäquate Therapiealternative.

## ***5.2 Diskussion über die Ergebnisse der Plasmapräparate***

Bei der Therapie der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura spielt die Plasmapherese bei den Patienten seit 1991 eine entscheidende Rolle. Supportive Therapiemaßnahmen werden zwar neben der Goldstandardtherapie herangezogen, können jedoch allein keine Heilung herbeiführen, teilweise fallen sie auch noch unter den off-label-Einsatz, da ihre Wirkung auf das Krankheitsbild noch nicht sicher in klinischen Studien bewiesen werden konnte (141) (siehe auch Kapitel 5.1.3).

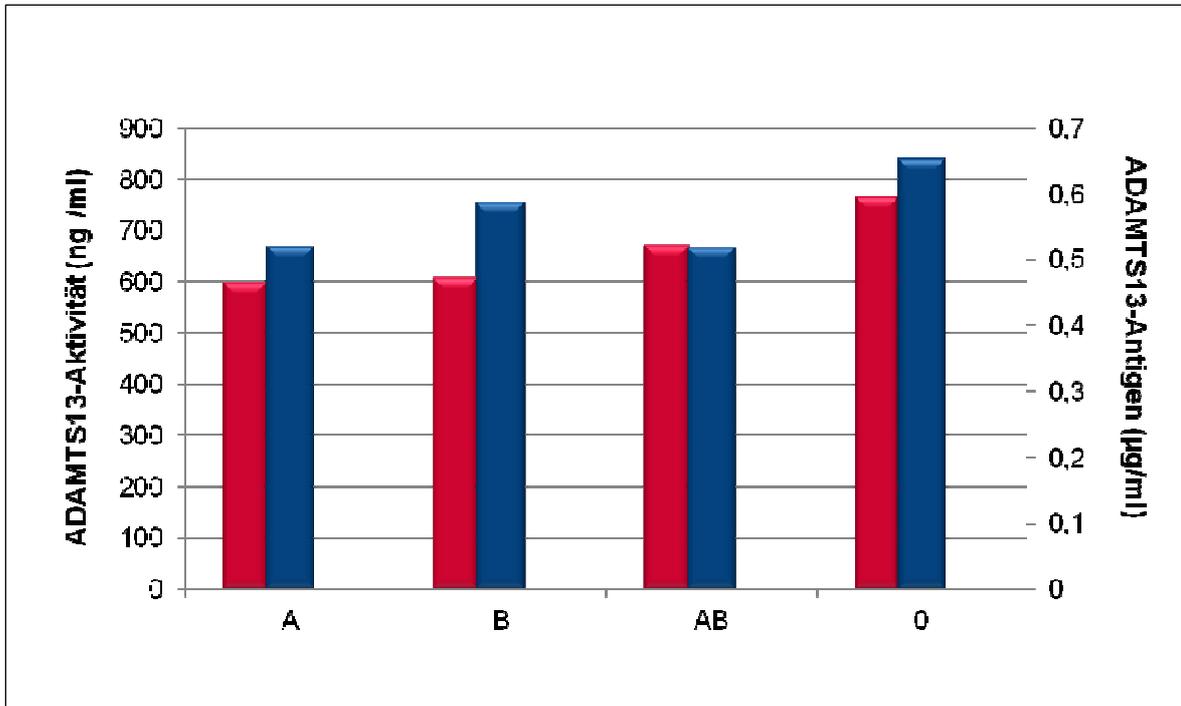
Die Therapie der TTP stützt sich vor allem auf den Plasmaaustausch, um eine schnelle Remission bei den betroffenen Patienten zu erzielen. In schweren Fällen werden zusätzlich Kortison und Rituximab empfohlen (7).

Für die Durchführung einer Plasmaaustauschtherapie stehen heutzutage verschiedene Plasmaprodukte zur Verfügung, die je nach Verarbeitungsschritten unterschiedlich sicher in Bezug auf das Übertragungsrisiko von Krankheiten sind (19). Pharmazeutische Plasmaprodukte dürfen durch ihre Verarbeitung keinen Enzymverlust erleiden, dennoch sind die Folgen durch die verschiedenen Arbeitsschritte im Plasma messbar (22, 169).

Im Folgenden sollen die Frischplasmaprodukte Fresh Frozen Plasma und Octaplas® noch einmal genauer gegenübergestellt werden.

### 5.2.1 ADAMTS13-Konzentration in FFP

Unter 4.2.1 wurden bereits ausführlich die Messergebnisse der einzelnen FFP-Chargen dargestellt. Der ADAMTS13-Enzymgehalt schwankt dabei jedoch deutlich zwischen den verschiedenen Chargen, wie die Abbildung 31 noch einmal veranschaulicht:



**Abb. 31:** ADAMTS13-Aktivitätswerte und -Antigen verschiedener Chargen FFP. Dargestellt ist der MW der Enzymaktivität aller Methoden, die dargestellten ADAMTS13-Antigenwerte wurden mittels Imubind<sup>®</sup>ELISA detektiert. Rot: ADAMTS13-Aktivität (ng/ml), blau: ADAMTS13-Antigen (µg/ml).

Da es sich bei den Fresh-Frozen Plasmapräparaten um Einzelspender handelt, sind Schwankungen im Bereich der physiologischen Norm durchaus zu erwarten. Bei den untersuchten Plasmen fand sich keine Charge mit kritisch erniedrigtem ADAMTS13-Aktivitätswert, woraus zu schließen ist, dass durch eine Substitution von FFP den Patienten Plasma mit potentem Enzym zugeführt wird. Die Auswertung der ADAMTS13-Aktivitätswerte zeigte, dass sich im Plasma der Blutgruppe 0 im Mittel die höchste Enzymaktivität detektiert werden konnte (764,44 ng/ml). Der höchste ADAMTS13-Antigengehalt wurde ebenfalls in den Proben der Blutgruppe 0 detektiert (0,65 µg/ml mittels Imubind<sup>®</sup>ELISA) Dieser Sachverhalt korreliert mit den Studienergebnissen von O'Donnell et al. (170) und Gallinaro et al. (171), die in ihren Arbeiten einen um etwa 25 % verringerten VWF-Gehalt in Plasmaproben der Blutgruppe 0 nachweisen konnten. Der erhöhte ADAMTS13-Gehalt in der Probe könnte ursächlich für einen verringerten Gehalt an VWF im Plasma sein. Auch Terrell et al. konnten einen erniedrigten VWF-Gehalt im Plasma von Patienten mit Blutgruppe 0 nachweisen. Dieser Nachweis ist jedoch gegen-

sätzlich zu dem erhöhten Erkrankungsrisiko, unter dem TTP-Patienten mit Blutgruppe 0 laut ihrer Studie leiden (78) (siehe Kapitel 5.1.1).

Die ADAMTS13-Aktivitätsmessung wurde mit drei verschiedenen Methoden bestimmt, die auf unterschiedlichen Detektionsmechanismen für das gesuchte Enzym basierten.

Dementsprechend variieren auch die Messergebnisse für die gleiche Probe, je nachdem welche Methode für die Bestimmung der Aktivität herangezogen wurde. Im Vergleich wurden die niedrigsten ADAMTS13-Aktivitätswerte mittels des Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13-FRET Assays bestimmt. Im Gegensatz dazu lieferte der Actifluor<sup>™</sup>ADAMTS13-Assay, der ebenfalls auf der FRET-Methode basiert, konsequent die höchsten Aktivitätswerte (vgl. Abb. 26, Kapitel 4.2.5). Die Ursachen für die verschiedenen Aktivitätswerte können vielfältig sein, so wird beispielsweise bei der Durchführung der beiden FRET-Assays ein unterschiedliches VWF-Substrat verwendet (27, 57). Dies könnte zur Folge haben, dass es zu unterschiedlichen Enzymreaktionen bei der Spaltung des Substrates kommt. Ein weiterer Erklärungsansatz liegt in den unterschiedlichen Primärantikörpern, mit denen die Assay-Platten beschichtet sind. Es werden je nach Kit unterschiedliche Teile des ADAMTS13 gebunden, wodurch es durch patientenspezifische Mutationen zu Aktivitätsverlust kommen kann (172). Beide FRET-Assays erzeugen eine Lichtreaktion durch verschiedene Fluoreszenzmechanismen (57, 61, 173-175) (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.4), wodurch es zu unterschiedlich starken Lichtemissionen kommen kann und dadurch wiederum zu sekundär leicht verfälschbaren Messergebnissen. Bei den photometrischen und FRET-Methoden spielt die Qualität der Plasmapräparate eine große Rolle, Verunreinigungen durch Kryopräzipitate, erhöhter Bilirubin- oder VWF-Gehalt der Probe können zu Messungenauigkeiten führen (176-179). Eine genaue Zusammenfassung von möglichen Störgrößen und Einflussfaktoren sind in den weiteren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe (52, 58) zusammengestellt.

Um den ADAMTS13-Enzymgehalt im Plasma zu untersuchen, wurde ein Antigen-Test durchgeführt. Die Messung des ADAMTS13 Antigens ist der Aktivitätsmessung nachgestellt und dient als diagnostische Zusatzuntersuchung (180). Die verwendeten Assays, die hierfür herangezogen wurden, waren der Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13-Antigenassay und der Imubind<sup>®</sup>ELISA von American Diagnostica. Die höchsten ADAMTS13 Antigenkonzentrationen wurden mittels Imubind<sup>®</sup>ELISA im FFP der Blutgruppe 0 detektiert (0,65 µg/ml). Der Technozym<sup>®</sup>ADAMTS13-Antigenassay lieferte jedoch für die Blutgruppe AB den höchsten Antigentiter (1,44 µg/ml). Die hier vorliegenden Werte stellen sich gegensätzlich zu den Antigenwerten von Heger et al. dar (181). Von Heger et al. wird beschrieben, dass es bei der Antigenmessung von FFP zu sehr starken Schwankungen zwischen den Messergebnissen gekommen ist (0,74 µg/ml - 1,67 µg/ml) (182). Große Ausreißer der Messergebnisse sind in der hier vorliegenden Arbeit weder bei der Antigen-

bestimmung mittels Technozym®ADAMTS13 noch mit Imubind®ELISA aufgetreten. Schwankungen zwischen den einzelnen Chargen waren jedoch bei FFP ausgeprägter als bei Octaplas®.

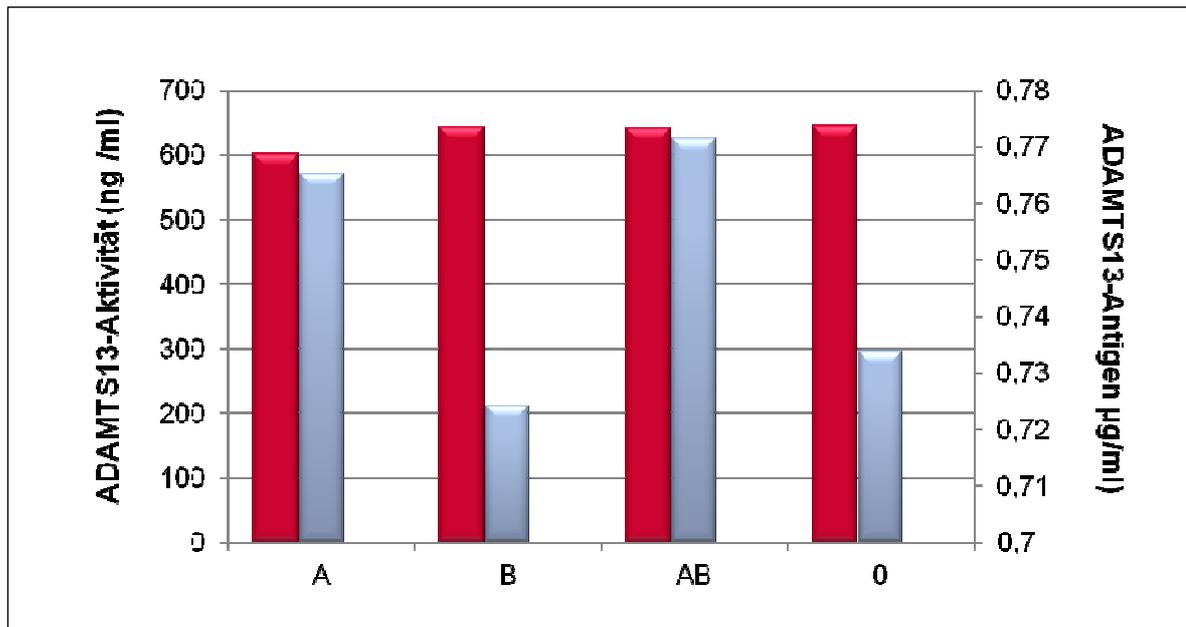
Gill et al. beschreiben, dass in Proben der Blutgruppe 0 bis zu 25 % weniger ADAMTS13-Antigen nachzuweisen wäre, ähnliches berichtet auch Heger et al. 2006 (182, 183). Diese Aussagen konnten die Daten der hier durchgeführten Versuche ebenfalls nicht belegen.

Der ADAMTS13-Antigengehalt einer Plasmaprobe kann herangezogen werden, um die gemessene ADAMTS13-Aktivität besser beurteilen zu können. Die Detektion beider Parameter ermöglicht eine Aussage über den aktiven Enzymgehalt der Plasmaprobe (Aktivitäts-Antigen-Ratio). So können aktivitätsbeeinflussende Mutationen und Inaktivierungsprozesse aufgedeckt werden. Kokame konnte belegen, dass bereits eine Punktmutation zu einem Aktivitätsverlust führt, wobei der Antigenlevel jedoch unverändert bleibt (184-186). Bei etwa 10 % der japanischen Bevölkerung wird ein heterozygoter Polymorphismus an P475S, der zu einer geringeren ADAMTS13 Aktivität führt, aber mit einem normalen Antigenlevel einhergeht, vermutet (186).

Das ADAMTS13-Antigen kann neben der Beurteilung von Autoantikörper zur Differenzierung der hereditären von der erworbenen TTP herangezogen werden (180). Neben dem Einsatz in der TTP-Diagnostik besitzt der ADAMTS13-Antigenspiegel auch einen prognostischen Wert bei der koronaren Herzkrankheit. Ein erniedrigter ADAMTS13-Antigenwert geht mit erhöhtem Risiko eines Myokardinfarktes, Schlaganfalls und kardiovaskulären Erkrankungen einher (187). Durch die Komplexität möglicher Interaktionen (52, 58) ist die alleinige Messung des ADAMTS13-Antigens ungeeignet für die TTP Diagnostik. Zur weiteren Analyse von ADAMTS13 in den verschiedenen Proben ist allein die gemeinsame Untersuchung von Aktivität und Antigen sinnvoll.

### 5.2.2 ADAMTS13-Konzentration in Octaplas®

Der Vergleich der mittleren ADAMTS13-Aktivitäten in den Octaplas®-Proben ergibt einen homogenen Aktivitätsspiegel zwischen den einzelnen Blutgruppen (siehe Abb. 32). Die Blutgruppe 0 zeigt mit 644,12 ng/ml ADAMTS13-Aktivität den höchsten Wert, die niedrigste ADAMTS13-Aktivität wurde in der Blutgruppe A detektiert (600,62 ng/ml). Insgesamt liegt die Enzymaktivität jedoch niedriger als in den FFP Proben.



**Abb. 32:** ADAMTS13-Aktivität und Antigen in den verschiedenen Octaplas®-Chargen. Die hier dargestellten Werte sind die Mittelwerte aller 3 Methoden. Die dargestellten Antigenwerte sind mittels Imubind®ELISA bestimmt. Rot: ADAMTS13-Aktivitätswerte in ng/ml, hellblau: ADAMTS13-Antigen in µg/ml.

Heger et al. beschrieben in ihrer Arbeit ein ähnliches Ergebnis bezüglich der Beobachtungen bei s/d Plasma (182). Die ADAMTS13-Aktivität schwankt nur sehr gering zwischen den einzelnen Chargen, liegt jedoch unter den Aktivitätswerten des single-donor Plasmas.

Bei der Antigenbestimmung mit dem Imubind®ELISA konnten die höchsten Werte in den Blutgruppen A und AB mit je 0,77 µg/ml gemessen werden. Die ADAMTS13-Antigenmessung mit Technozym®ADAMTS13 ergab für das s/d Plasma den höchsten Antigengehalt im Plasma der Blutgruppe 0 (1,23 µg/ml).

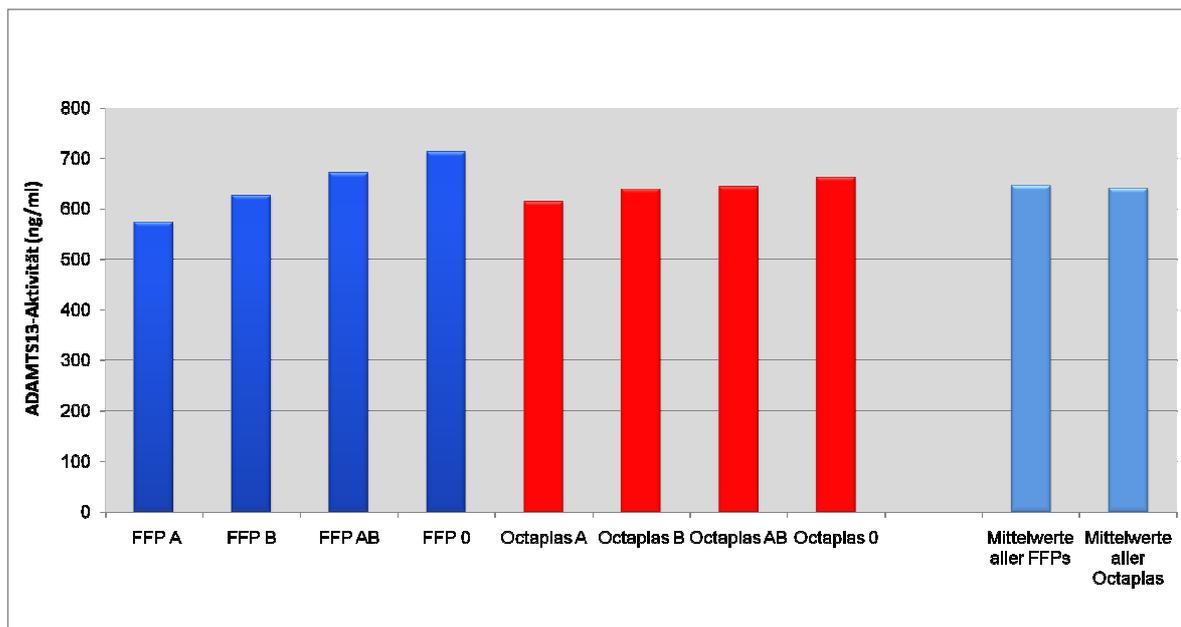
Ursachen für Schwankungen der Messergebnisse zwischen den einzelnen Methoden wurden unter 5.2.2 bereits erläutert.

### 5.2.3 Vergleich FFP und Octaplas®

Vergleicht man die beiden Plasmapräparate FFP und Octaplas® bezüglich ihrer ADAMTS13-Aktivität können folgende Schlüsse gezogen werden:

Während die Unterschiede bei Betrachtung der einzelnen FFP-Chargen noch deutlich erscheinen, schwanken die Werte des Poolplasmas zwischen den einzelnen Blutgruppenchargen kaum.

In der unten dargestellten Grafik (Abb. 33) sind die Ergebnisse aller Messungen (BCS nach Böhm, Technozym®ADAMTS13 und Actifluor™ADAMTS13) in SI-Einheiten umgerechnet worden (Umrechnungsfaktor: %-Aktivität \* 7,2 = SI ng/ml) und zusammengefasst, um einen Überblick gewinnen zu können. Nimmt man alle Messergebnisse zusammen, zeigt die Blutgruppe 0 des FFP und des Octaplas® den höchsten ADAMTS13-Aktivitätswert (FFP: 764,44 ng/ml, Octaplas®: 644,10 ng/ml). Die Blutgruppe A zeigte die niedrigsten Aktivitätswerte für beide Plasmapräparate (FFP: 598,45 ng/ml; Octaplas®: 600,62 ng/ml. Erstellt man einen Mittelwert aus den Ergebnissen der einzelnen Blutgruppen, ergibt sich ein Mittelwert von 660,19 ng/ml für FFP und ein Mittelwert von 631,66 ng/ml für Octaplas®.



**Abb. 33:** Blutgruppenspezifische Schwankungen der ADAMTS13- Aktivität bei FFP, im Gesamtzusammenhang zeigen sich jedoch nur geringe Aktivitätsunterschiede [FFP (660,19 ng/ml) und s/d Plasma (631,66 ng/ml)]. Aus (188).

Auch Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen konnten diese Beobachtung unterstreichen. Theusinger et al. detektierten in ihrer Studie von 2011 ebenfalls ADAMTS13-Aktivitäten von durchschnittlich 100 % (Bereich: 75 % - 125 %) (189). Auch die in der hier vorliegenden Studie gemessenen Werte konnten Aktivitäten von über 100 % nachweisen. Yarranton et al. detektierten in den von ihnen untersuchten FFP-Proben einen

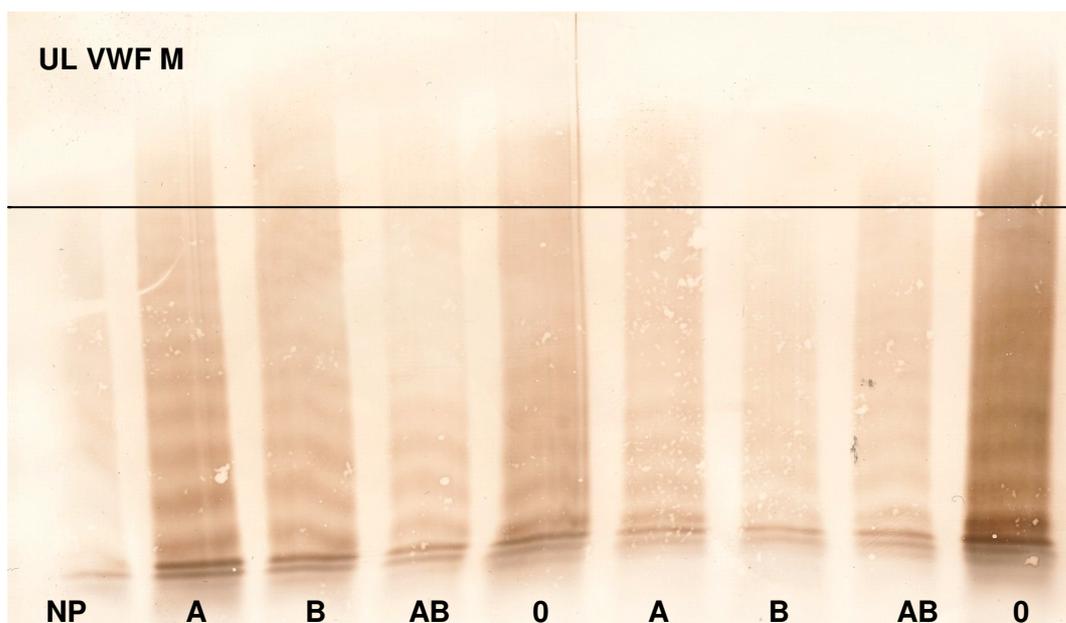
ADAMTS13-Aktivitätswert von 113 %, wobei ihre verwendeten Methoden ungenauere Messergebnisse lieferten. Die Aktivitätsmessungen von Yarranton et al. wurden mittels Gelelektrophorese durchgeführt, die den modernen Methoden in ihrer Genauigkeit nachsteht. Für das s/d Plasma konnte die Arbeitsgruppe eine ADAMTS13-Aktivität von 99 % nachweisen, wodurch sich somit ein signifikanter Aktivitätsverlust bei s/d Plasma errechnen ließ ( $p < 0,05$ ) (190).

Da während der Plasmapheresetherapie eine große Menge an Plasma (bis zu 4 l/d) ausgetauscht wird, kann man auch bei der Substitution von FFP von einem insgesamten Pooling-Effekt für den Patienten ausgehen.

Abschließend lässt sich somit postulieren, dass aufgrund des ähnlichen Gehaltes an ADAMTS13-Aktivitäten FFP dem s/d Plasma in diesem Punkt nicht nachsteht. Rock et al. diskutieren in ihrer Arbeit, dass das ADAMTS13-Enzym in FFP nach dem Auftauen stabiler ist als im solvent/detergent Plasma (191).

Zieht man das ADAMTS13-Antigen in die Beurteilung mit ein, kann daraus der Schluss gezogen werden, dass durch das solvent/detergent Verfahren ADAMTS13-Aktivität im Plasma verloren geht. In der ADAMTS13-Antigentestung zeigt der Imubind<sup>®</sup>ELISA eine höhere Antigenkonzentration für alle Blutgruppen des s/d Plasmas (vgl. Abb. 24, Kapitel 4.2.3.2; MW 0,75 µg/ml) als für das chemisch unbehandelte FFP (MW 0,57 µg/ml). Die höheren Antigenkonzentrationen korrelieren jedoch nicht mit einem gleichzeitigen Aktivitätsanstieg in den Proben. Somit kann in diesem speziellen Fall der Schluss gezogen werden, dass durch das chemische Verfahren der solvent/detergent Behandlung Enzymaktivität eingebüßt wird.

Neben dem ADAMTS13-Gehalt in den Plasmaproben wurden auch UL VWF-Multimere mittels 1%iger Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Abbildung 34 zeigt noch einmal die bei dieser Untersuchung detektierten UL VWF-Multimere:



**Abb. 34:** 1 %ige Agarose-Gelelektrophorese der unverdünnten Plasmaproben Normalpool (NP) und von links nach rechts Octaplas<sup>®</sup> der Blutgruppen A, B, AB, 0 und FFP der Blutgruppen A, B, AB, 0. Banden oberhalb der Line zeigen ultralange VW-Multimere (UL VWF M). Aus (188).

Der Vergleich zwischen den Plasmapräparaten und dem Normalpool (NP) zeigt, dass in allen Octaplas<sup>®</sup> Präparaten UL VWF-Multimere nachweisbar waren. Besonders deutlich konnten diese in den Chargen der Blutgruppe A, B und 0 gezeigt werden (Intensität der Banden). Im FFP konnten ebenfalls in den Blutgruppen A und 0 eindeutig UL VWF-Multimere nachgewiesen werden. Während das Ergebnis für die Blutgruppe AB allenfalls leichtgradig erhöht scheint, wurden im FFP der Blutgruppe B keine ULFWF-Multimere detektiert. Auch in anderen Studien wurden die verschiedensten Plasmapräparate auf ihren Gehalt an UL VWF-Multimeren untersucht. Heger et al. detektierten in den von ihnen untersuchten s/d Proben einen gleich hohen Anteil an Multimeren wie in Normalplasma (182).

Der Anteil an UL VWF-Multimeren kann individuell schwanken und ist bei Patienten mit aktivem ADAMTS13 als nicht pathologisch anzusehen. Jedoch kann man sich bei der Therapie der TTP einen Vorteil von Plasmapräparaten erhoffen, die keine hohen Konzentrationen an UL VWF-Multimeren besitzen. Da die UL Multimere pathognomonisch für die TTP sind, möchte man diese dem Patienten nicht wieder über eine Plasmapherese hinzufügen, sondern durch das Therapieverfahren schnellstmöglich abbauen, beziehungsweise eliminieren (182).

Die Plasmaqualität wird nicht allein aufgrund der Inhaltsstoffe ADAMTS13 und UL VWF M bewertet. Nach Möglichkeit sollen alle humanen Gerinnungsfaktoren in ausreichender physiologischer Konzentration im Substitutionspräparat vorliegen. Als weitere wichtige

Beurteilungsfaktoren sollten das Infektionsrisiko für den Patienten so gering wie möglich sein und schwerwiegende Transfusionszwischenfälle so gut wie ausgeschlossen werden können.

Stellt man die Verarbeitungsprozesse von FFP und solvent/detergent Plasma gegenüber, fallen Verarbeitungsschritte auf, die die Qualität des Plasmaprodukts beeinflussen können. Die Tabelle 43 soll einige Prozesse herausheben, die bei der Plasmaherstellung kritisch beurteilt werden sollten:

Herstellung Fresh Frozen Plasma	Herstellung solvent/detergent Plasma
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schonender Verarbeitungsprozess, mit nur geringer Auswirkung auf die Plasmaqualität</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• s/d Prozess eliminiert alle lipidbehüllten Viren, inklusive aller Subtypen von HIV und Hepatitis C</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Risikolimitierung für Krankheitsübertragung minimiert durch: Leukozytendepletion, Quarantänelagerung, kontinuierliches Spenderscreening</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Absolute Zellfreiheit durch Ultrafiltration</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• keine komplette Risikoelimination der Virus- oder Krankheitsübertragung nach dem Screening und Ablauf der Quarantäne Eine sichere Elimination von allen Subtypen des HI- und Hepatitis C-Virus kann nach Ablauf der Quarantäne nicht sichergestellt werden (192).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pooling fördert Immunneutralisation von Parvovirus B19 und HAV → Geeignet für Einsatz bei Neugeborenen und Kindern</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zeitspanne zwischen Plasma-gewinnung und Schockgefrierung kann einen Einfluss auf empfindlichere Plasmakomponenten haben (192).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verdünnung von TRALI-Antikörpern durch Immunneutralisation</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zerstörung von Leukozyten durch Gefrierlagerung → ↓ Alloimmunisation durch Transfusion (41).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leicht erniedrigter, jedoch sehr stabiler Wert von Gerinnungsfaktoren</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Das Plasmaprodukt enthält annähernd doppelt so viel Citrat wenn es durch konventionelle Blutspende gewonnen wurde, als durch eine Plasmakollektion mittels Apherese (125,(48)</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komplementaktivierung (↑ C3a &amp; ↑ C5a) durch Leukozytendepletion (193).</li> </ul>	

**Tabelle 43:** Gegenüberstellung von Vor- und Nachteilen bei den Herstellungsprozessen von FFP und s/d Plasma. Aus (62), Informationen s/d Plasma: (146).

Bei der Herstellung des s/d Plasmas wird auf höchste Plasmareinheit geachtet. Allergene Zellrückstände werden herausgefiltert und Viren können sicher eliminiert werden (siehe auch Herstellung der Plasmakonzentrate 2.4.3). Transfusionsbezogene Übertragungen von Cytomegalie Virus und Parvovirus B19 werden durch eine Immunneutralisation unschädlich gemacht. Die Immunneutralisation stellt einen Vorteil des Plasmapooling dar. Dabei kommt Plasma von potentiellen Virusträgern mit den Antikörpern von immunen Spendern zusammen und die Viren werden durch die Immunprozesse inaktiviert.

Eine der schwerwiegendsten Transfusionszwischenfälle entsteht durch das Auftreten von sogenannten *transfusion related acute lung injuries* (TRALI), die tödlich verlaufen können (194). Ein TRALI tritt typischerweise ein bis sechs Stunden nach der Transfusion auf und wird durch eine akute Immunreaktion durch Antikörper gegen die Granulozyten des Empfängers hervorgerufen. Die Antikörper werden durch das transfundierte Plasma auf den Empfänger übertragen und aktivieren dessen Granulozyten, wodurch es zu einem Endothel- und Lungenschaden kommen kann. Als Überträger für TRALI-Antikörper gelten Mehrgebärende und Spender mit einer positiven Transfusionsanamnese. In Deutschland gibt es aufgrund dessen seit 2009 ein Transfusionsgesetz, dass die Verarbeitung von Blutprodukten von Multigravida verbietet (160).

Das Plasmapooling bei der Herstellung von s/d Plasma kann TRALI-Antikörper unter die Nachweisgrenze verdünnen, wodurch das Übertragungsrisiko maximal minimiert werden kann (195, 196).

Als sehr sensible Komponenten des Plasmas gelten die Gerinnungsfaktoren. Schon seit 1992 (197) wird in der Literatur über den Einfluss von Plasmaveredelungsverfahren auf die Plasmainshaltsstoffe debattiert, doch auch heute noch sind die Plasmabestandteile Gegenstand der Forschung (22). Durch die Anwendung von neuen und sensibleren Testverfahren wird versucht, die Plasmapräparate genauestens zu analysieren und ihre Inhaltsstoffe zu bewerten. Die Tabelle 44 gibt einen Überblick über die Konzentration von wichtigen Gerinnungsfaktoren in FFP und Octaplas®:

Gerinnungs- faktoren	ABO Blutgruppen	FFP	s/d Plasma
Factor V (IU/dl)	MW	100 ± 16,6	69 ± 6,1**
Factor VIII (IU/dl)	MW	93 ± 21,4	69 ± 13,5**
Protein S (IU/dl)	MW	78 ± 14,8	39 ± 3,3**
ADAMTS13 (ng/ml)	MW	645 ± 96,6	634 ± 101,9*

**Tabelle 44:** Gerinnungsfaktor-Konzentrationen in FFP und s/d Plasma im Vergleich. \*\*signifikant,  $p < 0,05$  (198), \*nicht signifikant,  $p > 0,05$ . MW: Mittelwert. Nach (159).

Die Tabelle 44 stellt die Plasmakonzentration von verschiedenen Faktoren in FFP und Octaplas<sup>®</sup> gegenüber. Die Aktivitätswerte von ADAMTS13 sind in beiden Plasmaprodukten ähnlich und auch die aufgetretenen Schwankungen liegen in einer ähnlichen Messbreite.

Betrachtet man die Werte für Faktor V, Faktor VIII und Protein S so sind diese im s/d Plasma signifikant erniedrigt. Die Messergebnisse für diese Gerinnungsfaktoren erscheinen im Überblick konstanter (siehe geringere Standardabweichung von s/d Plasma zu FFP). Wie auch bei der ADAMTS13-Konzentration waren die Schwankungen der Faktoren zwischen den einzelnen Blutgruppen beim s/d Plasma weitaus geringer ausgeprägt als bei FFP. FVIII war in Plasma der Blutgruppe 0 von FFP und s/d Plasma signifikant verringert (198).

Durch das chemische solvent/detergent Verfahren bei der Herstellung von Octaplas<sup>®</sup> kann es somit zu einer Reduktion verschiedener Gerinnungsfaktoren kommen. Die erniedrigten Plasmakonzentrationen dieser Faktoren können schwere Nebenwirkungen bei den Patienten hervorrufen.

Benjamin et al. diskutieren, dass FVIII aufgrund eines niedrigeren Gehalts an UL VWF-Multimeren im s/d Plasma vermindert ist. Wie unter 2.1. beschrieben schützt der VWF den Faktor VIII vor proteolytischem Abbau (22), wodurch die verminderte Aktivität in Octaplas<sup>®</sup> erklärt werden könnte. Eine erniedrigte FVIII-Konzentration führt zu einer Beeinträchtigung der sekundären Hämostasefähigkeit des Plasmas. Dies ist insbesondere bei Patienten mit einem ausgesprochenen Mangel an FVIII relevant, hier ist die Substitution mit Faktorkonzentraten wegweisend (189).

Auch die Verminderung von Faktor V im Patientenplasma kann zu einer Dysregulation der sekundären Hämostase mit einer erhöhten Blutungsneigung führen. Dabei stellt die Aktivierung von Faktor V einen wichtigen Schritt der Thrombingenerierung dar. Die durch

einen Mangel des Faktors entstehenden Blutungssymptome können in ihrer Intensität stark variieren (199).

Wohingegen eine verminderte Plasmakonzentration an Protein S mit einer erhöhten Thromboseneigung einhergehen kann. Ein signifikanter Verlust von Protein S in s/d Plasma ist bereits in der Literatur bekannt und konnte mehrfach bestätigt werden (22, 190, 192, 197, 198, 200, 201). Da das thrombogene Risiko des Protein S scharf diskutiert wird, ist die Verminderung dieses Faktors ein vulnerabler Punkt bei der Qualitätsbeurteilung des Octaplas®. In Amerika führte der Protein S-Mangel in PLAS+s/d® dazu, dass das Produkt aufgrund von erhöhtem Thromboserisiko vom Markt genommen werden musste.

Einen interessanten Beitrag zum Gerinnungsfaktorverlust bei Octaplas® liefern auch Doyle et al.. Sie argumentierten in ihrer Arbeit, dass die erniedrigten FV und FVIII-Werte klinische Relevanz erreichen können, wenn man berücksichtigt, dass Octaplas® Units immer einheitlich 200 ml umfassen, während FFP meist in Units um die 260 ml verabreicht werden. Wenn nun Octaplas® in "Units" oder "Packungen" verordnet wird, kann dies dazu führen, dass der Patient weniger Plasma zugeführt bekommt. Daraus schließen Doyle et al. dass dann der allgemeine Volumenverlust den Gerinnungsfaktormangel an Protein S, FV und FVIII verstärkt (198).

Zusammenfassend lässt sich aus den oben aufgeführten Ergebnissen schließen, dass sowohl FFP, wie Octaplas® für die Therapie der TTP geeignet sind. Sie unterschieden sich nur gering in ihren ADAMTS13-Aktivitäten und besitzen ein ähnliches Risikoprofil an unerwünschten Nebenwirkungen, die bei der Verabreichung auftreten können. Da beide Plasmapräparate für die Therapie verwendet werden können, sollte je nach individuellem Risikoprofil der betroffenen Patienten das passende Plasma ausgewählt werden.

## 6 Zusammenfassung

Die thrombotische thrombozytopenische Purpura (TTP) ist charakterisiert durch eine Triade aus Thrombozytopenie, hämolytischer Anämie und Mikrothromben. Ursächlich für diese Mikroangiopathie ist ein Mangel der Von Willebrand Faktor (VWF)-spaltenden Protease, ADAMTS13, der durch Autoantikörper oder eine genetische Mutation bedingt sein kann. In der Folge treten hochmolekulare, prothrombotische VWF Multimere im Blut auf, die eine Plättchenadhäsion und -aggregation initiieren, die zu mikrovaskulären Thromben in den Arteriolen und Kapillaren zahlreicher Organe insbesondere im zentralen Nervensystem führt.

Momentan ist der Goldstandard der Therapie dieser ansonsten tödlich verlaufenden Erkrankung, die Plasmapherese (PEX). Hierfür stehen mit Fresh Frozen Plasma (FFP) und solvent/detergent (s/d) Plasma zwei Präparate zur Verfügung. Die Effizienz der Therapie bei der TTP konnte in den letzten Jahrzehnten im klinischen Alltag belegt werden, dennoch geht die intensive und invasive Therapie mit vielen Risiken und Nebenwirkungen für die Patienten einher, die in dieser Arbeit herausgearbeitet werden sollten.

In einer deutschlandweiten Patientenstudie wurde retrospektiv, mittels Fragebögen, ein Nebenwirkungsprofil der Plasmapherese erstellt, sowie mögliche Prädispositionen für die TTP untersucht. Zudem wurden mögliche Auslöser für das Auftreten einer klinisch manifesten TTP analysiert. Die Auswertung zeigte, dass Parästhesien (64,4 %) und Schüttelfrost (61,2 %) als häufigste Nebenwirkungen der PEX bei den Patienten auftraten. Weitere Symptome waren vermehrte Kopfschmerzen (50,6 %) und Tachykardien (36,8 %). Nebenwirkungen wie schwerer Kollaps (9 %) traten selten auf. Patienten mit Allergien in der Anamnese reagierten nicht empfindlicher auf die PEX, als andere. Ein Unterschied in der Häufigkeit der Nebenwirkungen hinsichtlich der verschiedenen Plasmapräparate konnte nicht gezeigt werden, relativiert wird dies durch den sehr geringen Einsatz von Octaplas® bei der untersuchten Patientenkohorte.

Es konnte eine deutliche Verbindung zwischen dem Auftreten der TTP und anderen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden. Von insgesamt 87 Patienten leiden 20,8 % an einer weiteren Autoimmunerkrankung. Insbesondere die Hashimoto Thyreoiditis liegt bei den Befragten als häufige Begleiterkrankung vor. Die genetische Prädisposition hat sich in den vergangenen Jahren als ein primärer Risikofaktor für die TTP herausgestellt.

Als mögliche Trigger eines TTP Schubes konnten Infektionen (38,7 %), Medikamente (u.a. Kontrazeptiva, Chinolone, Clarithromycin) (24,3 %), und Schwangerschaft (5,4 %) ausgemacht werden.

Ein weiterer Untersuchungspunkt der Dissertation war die Beurteilung der ADAMTS13-Aktivität in den Plasmapräparaten. Hierfür wurden drei verschiedenen Methoden, zwei auf Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer beruhende Assays und eine turbidimetrische Messung, verwendet. In allen Methoden konnte eine physiologische ADAMTS13-Aktivität, 646 ng/ml für FFP und 634 ng/ml für Octaplas<sup>®</sup>, gemessen werden, die sich für beide Präparate nicht signifikant unterschied. Auffällig waren jedoch die höheren Schwankungen der Aktivität bei den verschiedenen Chargen bei FFP gegenüber Octaplas<sup>®</sup>.

Aufgrund des Herstellungsverfahrens bietet Octaplas<sup>®</sup> einen sichereren Schutz vor Virusübertragungen und dem Auftreten von TRALI als FFP. Jedoch kann es aufgrund der niedrigen Konzentration an Protein S prothrombotisch wirken. FFP enthält dagegen einen höheren Gehalt an Gerinnungsfaktoren.

Abschließend ist festzuhalten, dass beide Präparate für die Therapie der TTP geeignet sind. Welches Präparat gewählt wird, sollte individuell für den zu behandelnden Patienten entschieden werden. Bei TTP-Patienten, die in der Vergangenheit bereits sensibel auf FFP reagierten, bietet sich eine Therapie mit Octaplas<sup>®</sup> an. Die schnelle Bereitstellung einer adäquaten Therapie spielt bei der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura die entscheidende Rolle.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Moake JL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: survival by "giving a dam". *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2004;115:201-19.
2. Moschcowitz E. Hyaline thrombosis of the terminal arterioles and capillaries: a hitherto undescribed disease. *Proc NY Pathol Soc.* 1924;24:21-4.
3. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Littell AS. Detection of carriers of classic hemophilia using an immunologic assay for antihemophilic factor (factor 8). *J Clin Invest.* 1971 Jan;50(1):255-8.
4. Tsai HM. Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion. *Blood.* 1996 May 15;87(10):4235-44.
5. Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood.* 1996 May 15;87(10):4223-34.
6. Studt JD. [Thrombotic microangiopathies]. *Hamostaseologie.* 2008 Dec;28(5):358-64.
7. Hellmann M, Hallek M, Scharrer I. [Thrombotic-thrombocytopenic purpura]. *Internist (Berl).* 2010 Sep;51(9):1136, 8-44.
8. Clark WF. Thrombotic microangiopathy: current knowledge and outcomes with plasma exchange. *Semin Dial.* 2012 Mar-Apr;25(2):214-9.
9. Bukowski RM, King JW, Hewlett JS. Plasmapheresis in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1977 Sep;50(3):413-7.
10. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, et al. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982 Dec 2;307(23):1432-5.
11. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC, et al. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med.* 1991 Aug 8;325(6):393-7.
12. Zimmerman TS, Ratnoff OD, Powell AE. Immunologic differentiation of classic hemophilia (factor 8 deficiency) and von Willebrand's disease, with observations on combined deficiencies of antihemophilic factor and proaccelerin (factor V) and on an acquired circulating anticoagulant against antihemophilic factor. *J Clin Invest.* 1971 Jan;50(1):244-54.

13. Zheng XL, Sadler JE. Pathogenesis of thrombotic microangiopathies. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:249-77.
14. Chapman K, Seldon M, Richards R. Thrombotic microangiopathies, thrombotic thrombocytopenic purpura, and ADAMTS-13. *Semin Thromb Hemost.* 2012 Feb;38(1):47-54.
15. Peyvandi F, Garagiola I, Baronciani L. Role of von Willebrand factor in the haemostasis. *Blood Transfus.* 2011 May;9 Suppl 2:s3-8.
16. Franchini M, Lippi G. The role of von Willebrand factor in hemorrhagic and thrombotic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2007;44(2):115-49.
17. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:395-424.
18. Weibel ER. Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells. *J Thromb Haemost.* 2012 Jun;10(6):979-84.
19. Barthels M, von Depka M. *Das Gerinnungskompndium.* Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2003.
20. Tsai HM. von Willebrand factor, shear stress, and ADAMTS13 in hemostasis and thrombosis. *ASAIO J.* 2012 Mar-Apr;58(2):163-9.
21. Bond V, Lenahan J, Wagner W. HL7: here and now. Part II. *Healthc Inform.* 1990 Oct;7(10):48-9.
22. Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion.* 2012 May;52 Suppl 1:9S-19S.
23. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD. Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1986 Dec;78(6):1456-61.
24. Tsai HM. Pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol.* 2010 Jan;91(1):1-19.
25. Levy GG, Motto DG, Ginsburg D. ADAMTS13 turns 3. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):11-7.
26. Sadler JE. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2008 Jul 1;112(1):11-8.
27. 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 Nov 2;276(44):41059-63.

28. Ai J, Smith P, Wang S, Zhang P, Zheng XL. The proximal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 determine substrate specificity and are all required for cleavage of von Willebrand factor. *J Biol Chem*. 2005 Aug 19;280(33):29428-34.
29. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, et al. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest*. 1991 Apr;87(4):1234-40.
30. Klaus C, Plaimauer B, Studt JD, Dorner F, Lämmle B, Mannucci PM, et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4514-9.
31. Amorosi EL, Ultmann JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of 16 cases and review of literature. *Medicine (Baltimore)*. 1966;45:139-59.
32. Lämmle B, Kremer Hovinga J, editors. *Thrombotisch thrombozytopenische Purpura, hämolytisch urämisches Syndrom und andere thrombotische Mikroangiopathien*: Springer Verlag; 2008.
33. Kiss JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: recognition and management. *Int J Hematol*. 2010 Jan;91(1):36-45.
34. George JN. How I treat patients with thrombotic thrombocytopenic purpura: 2010. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4060-9.
35. Fontana S, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, Mansouri Taleghani B. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang*. 2006 May;90(4):245-54.
36. Scully M. Rituximab in the treatment of TTP. *Hematology*. 2012 Apr;17 Suppl 1:S22-4.
37. Scully M, McDonald V, Cavenagh J, Hunt BJ, Longair I, Cohen H, et al. A phase 2 study of the safety and efficacy of rituximab with plasma exchange in acute acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1746-53.
38. Outschoorn UM, Ferber A. Outcomes in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura with splenectomy: a retrospective cohort study. *Am J Hematol*. 2006 Dec;81(12):895-900.
39. Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, et al. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. *Br J Haematol*. 2012 Aug;158(3):323-35.
40. Brackmann HH, Schwaab R, Oldenburg J, Schramm W. *Klinische Anwendung plasmatischer und rekombinanter Gerinnungsfaktoren*. Bremen London New York: UNI-MED Verlag AG; 2003.
41. Hellstern P, Seyfert UT, editors. *Rationelle Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten*. Bremen Londond New York: UNI-MED Verlag AG; 2005.

42. Bach J, Endler G, Winkelmann BR, Boehm BO, Maerz W, Mannhalter C, et al. Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of FXII C46T gene polymorphism and coronary risk. *J Thromb Haemost.* 2008 Feb;6(2):291-6.
43. Solheim BG, Rollag H, Svennevig JL, Arafa O, Fosse E, Bergerud U. Viral safety of solvent/detergent-treated plasma. *Transfusion.* 2000 Jan;40(1):84-90.
44. Hellstern P, editor. *Hämostaseologie, Kapitel: Plasma*: Springer Verlag; 2008.
45. Gröner A, Konrad M, editors. *Plasmafraktionierung und therapeutische Plasmaproteine*: Springer Verlag; 2008.
46. Hellstern P, Haubelt H. Indications for plasma in massive transfusion. *Thromb Res.* 2002 Oct 31;107 Suppl 1:S19-22.
47. 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 Feb;37(1):13-9.
48. Hellstern P. Solvent/detergent-treated plasma: composition, efficacy, and safety. *Curr Opin Hematol.* 2004 Sep;11(5):346-50.
49. Steinemann S. Comparison between Fresh Frozen Plasma and solvent/detergent plasma for therapy of Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hämostaseologie.* 2011;31(Issue 1 2011 ):A26.
50. 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 Aug;93(2):154-8.
51. Shemin D, Briggs D, Greenan M. Complications of therapeutic plasma exchange: a prospective study of 1,727 procedures. *J Clin Apher. [Comparative Study].* 2007;22(5):270-6.
52. Falter T. *Untersuchung über ADAMTS13 in Gerinnungsfaktorpräparaten*. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität; 2011.
53. Qorraj M, Falter T, Steinemann S, Vigh T, Scharrer I. ADAMTS13 activity in manifestation and remission of different microangiopathic diseases. *Hämostaseologie.* 2011;31(Issue 1 2011 ):A66.
54. Coppo P, Veyradier A. Thrombotic microangiopathies: towards a pathophysiology-based classification. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2009 Mar;9(1):36-50.
55. Böhm 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 Aug;81(8):430-5.

56. 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 Sep 1;43(5):579-84.
57. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama A, Miyata T. FRET-S-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol.* 2005 Apr;129(1):93-100.
58. Qorraj M. Bedeutung von ADAMTS13 bei der Therapie des Von Willebrand Syndroms mit VWF / FVIII Konzentraten. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität; 2012.
59. Technoclone. Produktbeschreibung: Technozym ADAMTS13. In: technoclone, editor. 2007.
60. Technoclone. Technozym ADAMTS13.
61. 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 Nov 15;358(2):298-300.
62. Steinemann S, Falter T, Qorraj M, Vigh T, Scharrer I. Investigation of side effects of plasmaexchange in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hämostaseologie.* 2011;31(Issue 1 2011 ):A67.
63. Dichtelmüller HO, Biesert L, Fabbrizzi F, Gajardo R, Groner A, von Hoegen I, et al. Robustness of solvent/detergent treatment of plasma derivatives: a data collection from Plasma Protein Therapeutics Association member companies. *Transfusion.* 2009 Sep;49(9):1931-43.
64. Burchard EG, Ziv E, Coyle N, Gomez SL, Tang H, Karter AJ, et al. The importance of race and ethnic background in biomedical research and clinical practice. *N Engl J Med.* 2003 Mar 20;348(12):1170-5.
65. Veyradier A, Coppo P. [ADAMTS13, von Willebrand factor specific cleaving protease]. *Med Sci (Paris).* 2011 Dec;27(12):1097-105.
66. Terrell DR, Vesely SK, Hovinga JA, Lämmle B, George JN. Different disparities of gender and race among the thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic-uremic syndromes. *Am J Hematol.* 2010 Nov;85(11):844-7.
67. Mortzell M, Berlin G, Nilsson T, Axelsson CG, Efvergren M, Audzijoni J, et al. Analyses of data of patients with Thrombotic Microangiopathy in the WAA registry. *Transfus Apher Sci.* 2011 Oct;45(2):125-31.
68. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol.* 2010 Mar;85(3):174-80.
69. Swisher KK, Doan JT, Vesely SK, Kwaan HC, Kim B, Lämmle B, et al. Pancreatitis preceding acute episodes of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic

- uremic syndrome: report of five patients with a systematic review of published reports. *Haematologica*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Jul;92(7):936-43.
70. George JN. The association of pregnancy with thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2003 Sep;10(5):339-44.
  71. Bundesamt, S. Das Informationssystem der Gesundheitsberichterstattung des Bundes Bonn 2009; Available from: <http://www.gbe-bund.de> [updated: 2012.07.21].
  72. Nicol KK, Shelton BJ, Knovich MA, Owen J. Overweight individuals are at increased risk for thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2003 Nov;74(3):170-4.
  73. Lombardi AM, Fabris R, Scarda A, Zanato V, Dal Pra C, Scarparo P, et al. Presence of anti-ADAMTS13 antibodies in obesity. *Eur J Clin Invest*. 2012 Jul 27.
  74. George JN. The thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndromes: evaluation, management, and long-term outcomes experience of the Oklahoma TTP-HUS Registry, 1989-2007. *Kidney Int Suppl*. 2009 Feb(112):S52-4.
  75. Staropoli JF, Stowell CP, Tuncer HH, Marques MB. An inquiry into the relationship between ABO blood group and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Vox Sang*. 2009 May;96(4):344-8.
  76. Zuberi L, Yerasuri D, Kuriakose P. Effect of blood group on idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apher*. 2009;24(4):131-3.
  77. Dentali F, Sironi AP, Ageno W, Turato S, Bonfanti C, Frattini F, et al. Non-O blood type is the commonest genetic risk factor for VTE: results from a meta-analysis of the literature. *Semin Thromb Hemost*. 2012 Jul;38(5):535-48.
  78. Terrell DR, Motto DG, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, George JN, Vesely SK. Blood group O and black race are independent risk factors for thrombotic thrombocytopenic purpura associated with severe ADAMTS13 deficiency. *Transfusion*. 2011 Apr 6.
  79. Lotta LA, Mariani M, Consonni D, Mancini I, Palla R, Maino A, et al. Different clinical severity of first episodes and recurrences of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2010 Dec;151(5):488-94.
  80. Taguchi F, Yagi H, Matsumoto M, Sadamura S, Isonishi A, Soejima K, et al. The homozygous p.C1024R- ADAMTS13 gene mutation links to a late-onset phenotype of Upshaw-Schulman syndrome in Japan. *Thromb Haemost*. 2012 May 2;107(5):1003-5.

81. Fujimura Y, Matsumoto M, Isonishi A, Yagi H, Kokame K, Soejima K, et al. Natural history of Upshaw-Schulman syndrome based on ADAMTS13 gene analysis in Japan. *J Thromb Haemost.* 2011 Jul;9 Suppl 1:283-301.
82. Lämmle B, Kremer Hovinga JA, Alberio L. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1663-75.
83. de Groot R, Lane DA, Crawley JT. The ADAMTS13 metalloprotease domain: roles of subsites in enzyme activity and specificity. *Blood.* 2010 Oct 21;116(16):3064-72.
84. Siegel BM, Friedman IA, Kessler S, Schwartz SO. Thrombohemolytic thrombocytopenic purpura and lupus erythematosus. *Ann Intern Med.* 1957 Nov;47(5):1022-9.
85. Levine S, Shearn MA. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura and Systemic Lupus Erythematosus. *Arch Intern Med.* 1964 Jun;113:826-36.
86. Neame PB. Immunologic and other factors in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Semin Thromb Hemost.* 1980;6(4):416-29.
87. Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ, Machin S. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost.* 2010 Feb;8(2):257-62.
88. Joseph G, Smith KJ, Hadley TJ, Djulbegovic B, Troup GM, Oldfather J, et al. HLA-DR53 protects against thrombotic thrombocytopenic purpura/adult hemolytic uremic syndrome. *Am J Hematol.* 1994 Nov;47(3):189-93.
89. Zheng XL, Wu HM, Shang D, Falls E, Skipwith CG, Cataland SR, et al. Multiple domains of ADAMTS13 are targeted by autoantibodies against ADAMTS13 in patients with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2010 Sep;95(9):1555-62.
90. Mant MJ, Cauchi MN, Medley G. Thrombotic thrombocytopenic purpura: report of a case with possible immune etiology. *Blood.* 1972 Sep;40(3):416-21.
91. Ferrari S, Scheiflinger F, Rieger M, Mudde G, Wolf M, Coppo P, et al. Prognostic value of anti-ADAMTS 13 antibody features (Ig isotype, titer, and inhibitory effect) in a cohort of 35 adult French patients undergoing a first episode of thrombotic microangiopathy with undetectable ADAMTS 13 activity. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):2815-22.
92. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA. Pathogenesis and treatment of acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2010 Sep;95(9):1444-7.
93. Zhang P, Pan W, Rux AH, Sachais BS, Zheng XL. The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow. *Blood.* 2007 Sep 15;110(6):1887-94.

94. Ferrari S, Mudde GC, Rieger M, Veyradier A, Kremer Hovinga JA, Scheifflinger F. IgG subclass distribution of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2009 Oct;7(10):1703-10.
95. Perez CA, Abdo N, Shrestha A, Santos ES. Systemic lupus erythematosus presenting as thrombotic thrombocytopenia purpura: how close is close enough? *Case Report Med.* 2011;2011:267508.
96. John M, Hitzler W, Scharrer I. The role of human leukocyte antigens as predisposing and/or protective factors in patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *Hämostaseologie* 2012;4a(2012).
97. Franchini M, Lippi G, Manzato F, Vescovi PP. Thyroid-associated autoimmune coagulation disorders. *J Thromb Thrombolysis.* 2010 Jan;29(1):87-91.
98. Hofbauer LC, Heufelder AE. Coagulation disorders in thyroid diseases. *Eur J Endocrinol.* 1997 Jan;136(1):1-7.
99. Ford HC, Carter JM. Haemostasis in hypothyroidism. *Postgrad Med J.* 1990 Apr;66(774):280-4.
100. Zhan H, Streiff MB, King KE, Segal JB. Thrombotic thrombocytopenic purpura at the Johns Hopkins Hospital from 1992 to 2008: clinical outcomes and risk factors for relapse. *Transfusion.* 2010 Apr;50(4):868-74.
101. Kfoury Baz EM, Mahfouz RA, Masri AF. Thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with rheumatoid arthritis treated by plasmapheresis. *Ther Apher.* 1999 Nov;3(4):314-6.
102. George JN, Kremer Hovinga JA, Terrell DR, Vesely SK, Lämmle B. The Oklahoma Thrombotic Thrombocytopenic Purpura-Hemolytic Uremic Syndrome Registry: the Swiss connection. *Eur J Haematol.* 2008 Apr;80(4):277-86.
103. Hovinga JA, Vesely SK, Terrell DR, Lämmle B, George JN. Survival and relapse in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2010 Feb 25;115(8):1500-11; quiz 662.
104. Douglas KW, Pollock KG, Young D, Catlow J, Green R. Infection frequently triggers thrombotic microangiopathy in patients with preexisting risk factors: a single-institution experience. *J Clin Apher.* 2010;25(2):47-53.
105. Booth KK, Terrell DR, Vesely SK, George JN. Systemic infections mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 2011 Sep;86(9):743-51.
106. Myers KA, Marrie TJ. Thrombotic microangiopathy associated with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia: case report and review. *Clin Infect Dis.* 1993 Dec;17(6):1037-40.

107. Niv E, Segev A, Ellis MH. Staphylococcus aureus bacteremia as a cause of early relapse of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*. 2000 Sep;40(9):1067-70.
108. Morrin MJ, Jones FG, McConville J, Arnold C, Mullan B, Lavery GG, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura secondary to Streptococcus. *Transfus Apher Sci*. 2006 Apr;34(2):153-5.
109. Schroder S, Spyridopoulos I, Konig J, Jaschonek KG, Luft D, Seif FJ. Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) associated with a Borrelia burgdorferi infection. *Am J Hematol*. 1995 Sep;50(1):72-3.
110. Kiki I, Gundogdu M, Albayrak B, Bilgic Y. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Brucella infection. *Am J Med Sci*. 2008 Mar;335(3):230-2.
111. Kiki I, Gundogdu M, Kaya H. Spuriously high phosphate level which is promptly resolved after plasmapheresis in a patient with multiple myeloma. *Transfus Apher Sci*. 2007 Oct;37(2):157-9.
112. Erdem F, Kiki I, Gundogdu M, Kaya H. Thrombotic thrombocytopenic purpura in a patient with Brucella infection is highly responsive to combined plasma infusion and antimicrobial therapy. *Med Princ Pract*. 2007;16(4):324-6.
113. Toscano V, Bontadini A, Falsone G, Conte R, Fois F, Fabiani A, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with primary tuberculosis. *Infection*. 1995 Jan-Feb;23(1):58-9.
114. Bar Meir E, Amital H, Levy Y, Kneller A, Bar-Dayyan Y, Shoenfeld Y. Mycoplasma pneumoniae-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Acta Haematol*. 2000;103(2):112-5.
115. Park YA, Schultz EF, Hay SN, Brecher ME. Thrombotic thrombocytopenic purpura and urinary tract infections: is there a connection? *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan;135(1):85-8.
116. Hay SN, Scanga L, Brecher ME. Life, death, and the risk of transfusion: a university hospital experience. *Transfusion*. [Comparative Study]. 2006 Sep;46(9):1491-3.
117. Morton AR, Yu R, Waldek S, Holmes AM, Craig A, Mundy K. Campylobacter induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*. [Case Reports Letter]. 1985 Nov 16;2(8464):1133-4.
118. Franchini M. Thrombotic thrombocytopenic purpura: proposal of a new pathogenic mechanism involving Helicobacter pylori infection. *Med Hypotheses*. [Clinical Trial]. 2005;65(6):1128-31.

119. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004 Jul 1;104(1):100-6.
120. Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and haemostasis. *Br J Haematol*. [Review]. 2001 Oct;115(1):3-12.
121. Kaser A, Brandacher G, Steurer W, Kaser S, Offner FA, Zoller H, et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Nov 1;98(9):2720-5.
122. Miner PE, Nutt RL, Thomas ME. Thrombotic thrombocytopenic purpura occurring in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1955 Sep;70(3):611-7.
123. 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 Nov 1;98(9):2730-5.
124. Vesely SK, George JN, Lämmle B, Studt JD, Alberio L, El-Harake MA, et al. ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):60-8.
125. Sanchez-Luceros A, Farias CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta R, Marchese C, et al. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2004 Dec;92(6):1320-6.
126. Scully M, Yarranton H, Liesner R, Cavenagh J, Hunt B, Benjamin S, et al. Regional UK TTP registry: correlation with laboratory ADAMTS 13 analysis and clinical features. *Br J Haematol*. 2008 Sep;142(5):819-26.
127. Stylianou K, Tsirakis G, Mantadakis E, Xylouri I, Foudoulakis A, Vardaki E, et al. Refractory thrombotic thrombocytopenic purpura associated with oral contraceptives and factor V Leiden: a case report. *Cases journal*. 2009;2:6611.
128. Lesesne JB, Rothschild N, Erickson B, Korec S, Sisk R, Keller J, et al. Cancer-associated hemolytic-uremic syndrome: analysis of 85 cases from a national registry. *J Clin Oncol*. 1989 Jun;7(6):781-9.
129. Ravandi-Kashani F, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Thrombotic microangiopathy associated with interferon therapy for patients with chronic myelogenous leukemia: coincidence or true side effect? *Cancer*. [Case Reports]. 1999 Jun 15;85(12):2583-8.
130. Zakarija A, Bennett C. Drug-induced thrombotic microangiopathy. *Semin Thromb Hemost*. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. 2005 Dec;31(6):681-90.

131. Burke GW, Ciancio G, Cirocco R, Markou M, Olson L, Contreras N, et al. Microangiopathy in kidney and simultaneous pancreas/kidney recipients treated with tacrolimus: evidence of endothelin and cytokine involvement. *Transplantation*. 1999 Nov 15;68(9):1336-42.
132. Zakarija A. Thrombotic microangiopathy syndromes. *Cancer Treat Res*. [Review]. 2009;148:115-36.
133. Sadler JE. Thrombotic thrombocytopenic purpura: a moving target. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:415-20.
134. Bennett CL, Weinberg PD, Rozenberg-Ben-Dror K, Yarnold PR, Kwaan HC, Green D. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine. A review of 60 cases. *Annals of internal medicine*. 1998 Apr 1;128(7):541-4.
135. Gupta R, Wargo KA. Rifampin-induced thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ann Pharmacother*. [Case Reports Letter]. 2005 Oct;39(10):1761-2.
136. Martin MG, Whitlatch NL, Shah B, Arepally GM. Thrombotic thrombocytopenic purpura induced by trimethoprim-sulfamethoxazole in a Jehovah's Witness. *Am J Hematol*. [Case Reports Research Support, N.I.H., Extramural]. 2007 Jul;82(7):679-81.
137. Knox-Macaulay HH, Adil SN, Ahmed EM. Acute thrombotic thrombocytopenic purpura following doxycycline treatment of *Chlamydia pneumoniae* infection in a patient with dermatomyositis. *Clin Lab Haematol*. [Case Reports]. 2004 Apr;26(2):147-51.
138. Kiefel V, Greinacher A. [Differential diagnosis and treatment of thrombocytopenia]. *Internist (Berl)*. [Review]. 2010 Nov;51(11):1397-410.
139. Polito MG, Kirsztajn GM. Thrombotic microangiopathies: thrombotic thrombocytopenic purpura / hemolytic uremic syndrome. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Jul-Sep;32(3):303-15.
140. Rock G, Shumak K, Kelton J, Blanchette VS, Buskard N, Nair R, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura: outcome in 24 patients with renal impairment treated with plasma exchange. Canadian Apheresis Study Group. *Transfusion*. [Clinical Trial Multicenter Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1992 Oct;32(8):710-4.
141. Kaplan AE GJ. Treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome in adults. In: *Wolters Kluwer Health - Up to Date*. 2012 [updated 2012 Apr 12]; Available from: <http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-thrombotic-thrombocytopenic-purpura-hemolytic-uremic-syndrome-in-adults#H5>.

142. Chemnitz JM, Uener J, Hallek M, Scheid C. Long-term follow-up of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura treated with rituximab. *Ann Hematol.* 2010 Oct;89(10):1029-33.
143. Moake J. Platelets in bloom. *Blood.* [Comment]. 2010 May 6;115(18):3650-1.
144. Baron JM, Baron BW. Thrombotic thrombocytopenic purpura and its look-alikes. *Clin Adv Hematol Oncol.* [Review]. 2005 Nov;3(11):868-74.
145. Balduini CL, Gugliotta L, Luppi M, Laurenti L, Klersy C, Pieresca C, et al. High versus standard dose methylprednisolone in the acute phase of idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: a randomized study. *Ann Hematol.* 2010 Jun;89(6):591-6.
146. Heidel F, Lipka DB, von Auer C, Huber C, Scharrer I, Hess G. Addition of rituximab to standard therapy improves response rate and progression-free survival in relapsed or refractory thrombotic thrombocytopenic purpura and autoimmune haemolytic anaemia. *Thromb Haemost.* 2007 Feb;97(2):228-33.
147. Scully M, Gattens M, Khair K, Liesner R. The use of intermediate purity factor VIII concentrate BPL 8Y as prophylaxis and treatment in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2006 Oct;135(1):101-4.
148. Scully M, Cohen H, Cavenagh J, Benjamin S, Starke R, Killick S, et al. Remission in acute refractory and relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura following rituximab is associated with a reduction in IgG antibodies to ADAMTS-13. *Br J Haematol.* 2007 Feb;136(3):451-61.
149. McDonald V, Manns K, Mackie IJ, Machin SJ, Scully MA. Rituximab pharmacokinetics during the management of acute idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2010 Jun;8(6):1201-8.
150. Cataland SR, Peyvandi F, Mannucci PM, Lämmle B, Kremer Hovinga JA, Machin SJ, et al. Initial experience from a double-blind, placebo-controlled, clinical outcome study of ARC1779 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 2012 Apr;87(4):430-2.
151. Mayr FB, Knobl P, Jilma B, Siller-Matula JM, Wagner PG, Schaub RG, et al. The aptamer ARC1779 blocks von Willebrand factor-dependent platelet function in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura ex vivo. *Transfusion.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 May;50(5):1079-87.
152. Jilma-Stohlawetz P, Gorczyca ME, Jilma B, Siller-Matula J, Gilbert JC, Knobl P. Inhibition of von Willebrand factor by ARC1779 in patients with acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* [Clinical Trial, Phase II]. 2011 Mar;105(3):545-52.
153. Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegl W, Rottensteiner H, et al. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of

- symptoms by recombinant human ADAMTS13. *Blood*. 2012 Jun 21;119(25):6128-35.
154. Chen J, Reheman A, Gushiken FC, Nolasco L, Fu X, Moake JL, et al. N-acetylcysteine reduces the size and activity of von Willebrand factor in human plasma and mice. *J Clin Invest*. 2011 Feb 1;121(2):593-603.
155. Plaimauer B, Kremer Hovinga JA, Juno C, Wolfsegger MJ, Skalicky S, Schmidt M, et al. Recombinant ADAMTS13 normalizes von Willebrand factor-cleaving activity in plasma of acquired TTP patients by overriding inhibitory antibodies. *J Thromb Haemost*. 2011 May;9(5):936-44.
156. Brunskill SJ, Tusold A, Benjamin S, Stanworth SJ, Murphy MF. A systematic review of randomized controlled trials for plasma exchange in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfus Med*. 2007 Feb;17(1):17-35.
157. Ishihara T, Inoue S, Takagi Y, Shimomura T, Sagami Y, Katayama S, et al. Adverse events in therapeutic apheresis: a single center survey of various therapies. *Ther Apher Dial*. 2010 Dec;14(6):589-95.
158. Barz D, editor. *Klinischer Einsatz von SD-Plasma - Erste Erfahrungen mit Octaplas LG*. Institut für Transfusionsmedizin Universitätsklinikum Jena; 2010 Nürnberg.
159. Steinemann S, Falter T, Qorraj M, Vigh T, Scharrer I, Comparison between Fresh Frozen Plasma and solvent/detergent plasma for therapy of Thrombotic thrombocytopenic purpura: *Hämostaseologie*. 2011;31(Issue 1 2011 ):A27.
160. Funk M, Günay S. *Hämovigilanz-Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts 2010*. Langen: Paul-Ehrlich-Institut; 2011.
161. Weinstein R. Prevention of citrate reactions during therapeutic plasma exchange by constant infusion of calcium gluconate with the return fluid. *J Clin Apher*. 1996;11(4):204-10.
162. Reutter JC, Sanders KF, Brecher ME, Jones HG, Bandarenko N. Incidence of allergic reactions with fresh frozen plasma or cryo-supernatant plasma in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Clin Apher*. 2001;16(3):134-8.
163. von Baeyer H. Plasmapheresis in thrombotic microangiopathy-associated syndromes: review of outcome data derived from clinical trials and open studies. *Ther Apher*. 2002 Aug;6(4):320-8.
164. Pandey S, Vyas GN. Adverse effects of plasma transfusion. *Transfusion*. 2012 May;52 Suppl 1:65S-79S.
165. Som S, Deford CC, Kaiser ML, Terrell DR, Kremer Hovinga JA, Lämmle B, et al. Decreasing frequency of plasma exchange complications in patients treated for thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome, 1996 to 2011. *Transfusion*. 2012 Apr 15.

166. Rios DR, Carvalho MG, Figueiredo RC, Ferreira CN, Rodrigues VL, Souza RA, et al. ADAMTS13 and Von Willebrand factor in patients undergoing hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis*. 2012 Feb 2.
167. Löwer J. Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln - Abwehr von Arzneimittelrisiken -Anordnung von Auflagen zu den Zulassungen von therapeutischem Einzelplasma (in Quarantäne gelagertes oder mit einem Verfahren zur Pathogeninaktivierung behandeltes Plasma). Paul-Ehrlich-Institut; 2009 [updated 23.06.2009]; Available from: [http://www.pei.de/cIn\\_236/nn\\_154580/SharedDocs/bekanntmachungen/2009/banz-84-10-06-2009-s2064.html?\\_\\_nnn=true](http://www.pei.de/cIn_236/nn_154580/SharedDocs/bekanntmachungen/2009/banz-84-10-06-2009-s2064.html?__nnn=true).
168. Funk MB, Gunay S, Lohmann A, Henseler O, Keller-Stanislawski B. [Evaluation of measures aimed to reduce serious adverse transfusion reactions (hemovigilance data from 1997 to 2008)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. [Evaluation Studies]. 2010 Apr;53(4):347-56.
169. Yarranton H, Cohen H, Pavord SR, Benjamin S, Hagger D, Machin SJ. Venous thromboembolism associated with the management of acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Jun;121(5):778-85.
170. O'Donnell J, Boulton FE, Manning RA, Laffan MA. Amount of H antigen expressed on circulating von Willebrand factor is modified by ABO blood group genotype and is a major determinant of plasma von Willebrand factor antigen levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Feb 1;22(2):335-41.
171. Gallinaro L, Cattini MG, Sztukowska M, Padrini R, Sartorello F, Pontara E, et al. A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood*. 2008 Apr 1;111(7):3540-5.
172. Crist RA, Rodgers GM. A Comparison of Two Commercial ADAMTS13 Activity Assays With a Reference Laboratory Method. *LABMEDICINE*. 2009;40(4):232-5.
173. 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 Jan 15;103(2):607-12.
174. 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 Dec 19;97(26):14241-4.
175. Invitrogen. ALEXA Fluorophore2010.
176. Peyvandi F, Palla R, Lotta LA, Mackie I, Scully MA, Machin SJ. ADAMTS-13 assays in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2010 Apr;8(4):631-40.

177. Studt JD, Hovinga JA, Antoine G, Hermann M, Rieger M, Scheifflinger F, et al. Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):542-4.
178. 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 Jun;5(6):1330-1.
179. Meyer SC, Sulzer I, Lämmle 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 Apr;5(4):866-7.
180. 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 Feb;136(4):649-55.
181. 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 Apr;92(3):206-12.
182. Heger A, Romisch J, Svae TE. A biochemical comparison of a pharmaceutically licensed coagulation active plasma (Octaplas) with a universally applicable development product (Uniplas) and single-donor FFPs subjected to methylene-blue dye and white-light treatment. *Transfus Apher Sci*. [Comparative Study]. 2006 Dec;35(3):223-33.
183. Gill JC, Endres-Brooks J, Bauer PJ, Marks WJ, Jr., Montgomery RR. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood*. 1987 Jun;69(6):1691-5.
184. 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 Aug;138(4):534-40.
185. Feys HB, Deckmyn H, Vanhoorelbeke K. ADAMTS13 in health and disease. *Acta Haematol*. 2009;121(2-3):183-5.
186. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, Yagi H, Ishizashi H, Funato M, 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 Sep 3;99(18):11902-7.

187. Miura M, Kaikita K, Matsukawa M, Soejima K, Fuchigami S, Miyazaki Y, et al. Prognostic value of plasma von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) antigen levels in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost.* 2010 Mar;103(3):623-9.
188. Steinemann S, Falter T, Qorraj M, Vigh T, Lackner K. Vergleich von Fresh Frozen Plasma und solvent/detergent Plasma in der Therapie der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura. *Hämostaseologie* 2011;4a(2011):A18.
189. Theusinger OM. The inhibiting effect of factor XIII on hyperfibrinolysis. *Anesth Analg.* 2012 Jun;114(6):1149-50.
190. 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 Feb;14(1):39-44.
191. Rock G, Yousef H, Neurath D, Lu M. ADAMTS-13 levels in fresh, stored, and solvent detergent treated plasma. *Transfus Apher Sci.* 2006 Dec;35(3):235-8.
192. 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 Oct 31;107 Suppl 1:S3-8.
193. Gu YJ, Van Oeveren W. Activation of plasma components by leukocyte removal filters. *ASAIO J.* 1994 Jul-Sep;40(3):M598-601.
194. MacLennan S, Williamson LM. Risks of fresh frozen plasma and platelets. *J Trauma.* 2006 Jun;60(6 Suppl):S46-50.
195. Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, Bohle RM, Weiss T, Sibelius U, et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Feb 1;107(3):1217-9.
196. Sachs UJ, Kauschat D, Bein G. White blood cell-reactive antibodies are undetectable in solvent/detergent plasma. *Transfusion.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Oct;45(10):1628-31.
197. Horowitz B, Bonomo R, Prince AM, Chin SN, Brotman B, Shulman RW. Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood.* 1992 Feb 1;79(3):826-31.
198. 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 Apr;14(3):283-7.
199. Camire RM. A new look at blood coagulation factor V. *Curr Opin Hematol.* 2011 Sep;18(5):338-42.

- 
200. Flamholz R, Jeon HR, Baron JM, Baron BW. Study of three patients with thrombotic thrombocytopenic purpura exchanged with solvent/detergent-treated plasma: is its decreased protein S activity clinically related to their development of deep venous thromboses? *J Clin Apher.* [Case Reports]. 2000;15(3):169-72.
201. Beeck H, Hellstern P. In vitro characterization of solvent/detergent-treated human plasma and of quarantine fresh frozen plasma. *Vox Sang.* 1998;74 Suppl 1:219-23.

## 8 Anhang

### 8.1 Anhang I: Auswertung des Fragebogens

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig BG "0"	22	25,3	25,3	25,3
BG "A"	25	28,7	28,7	54,0
BG"B"	12	13,8	13,8	67,8
BG"AB"	6	6,9	6,9	74,7
unbekannt	22	25,3	25,3	100,0
Gesamt	87	100,0	100,0	

**Tabelle 45:** Häufigkeitstabelle der Blutgruppen der befragten Patienten. BG: Blutgruppe

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig Keine	33	21,7	21,7	21,7
L-Thyroxin	17	11,2	11,2	32,9
Fehlend	12	7,9	7,9	40,8
ACE-Hemmer	12	7,9	7,9	48,7
Beta-Blocker	7	4,6	4,6	53,3
SSRI	7	4,6	4,6	57,9
PPI	6	3,9	3,9	61,8
Steroide	6	3,9	3,9	65,8
ASS	5	3,3	3,3	69,1
Statine	4	2,6	2,6	71,7
OAD	4	2,6	2,6	74,3
Ovulationshemmer	4	2,6	2,6	77,0
Immunsuppressiva	4	2,6	2,6	79,6

HCT	3	2,0	2,0	81,6
Antihistaminika	3	2,0	2,0	83,6
OAK	3	2,0	2,0	85,5
Antikonvulsiva	3	2,0	2,0	87,5
Vitamine/ Homöopathie	3	2,0	2,0	89,5
Kalziumantagonisten	2	1,3	1,3	90,8
AT1-Rezeptorantagonisten	2	1,3	1,3	92,1
TzAD	1	,7	,7	92,8
Antibiotika	1	,7	,7	93,4
Insulin	1	,7	,7	94,1
Zopiclon	1	,7	,7	94,7
Bisphosphonate	1	,7	,7	95,4
Neuroleptika	1	,7	,7	96,1
L-Dopa	1	,7	,7	96,7
Laxantien	1	,7	,7	97,4
Theophillin	1	,7	,7	98,0
Antivertiginosa	1	,7	,7	98,7
Chinin	1	,7	,7	99,3
Clopidogrel	1	,7	,7	100,0
Gesamt	152	100,0	100,0	

**Tabelle 46:** Medikamente, die von den TTP Patienten eingenommen wurden. SSRI: Selektive Serotonin Reuptake-Inhibitoren, PPI: Protonenpumpenblocker, ASS: Aspirinsalicylsäure, OAD: Orale Antidiabetika, HCT: Hydrochlorothiazid, OAK: Orale Antikoagulantien. TzAD: Trizyklische Antidepressiva.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig keine	33	37,9	42,9	42,9
Vorerkrankung (siehe Tab. 5)	28	32,2	36,4	79,2
Vorerkrankung (autoimmunassoziiert)	16	18,4	20,8	100,0
Gesamt	77	88,5	100,0	
Fehlend System	10	11,5		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 47:** Übersicht über die Anzahl der Patienten, die an Vor- und Begleiterkrankungen neben der TTP leiden. 11 der 33 TTP-Patienten mit Vorerkrankungen leiden unter autoimmunassoziierten Erkrankungen.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig 1	43	49,4	51,2	51,2
2	15	17,2	17,9	69,0
3	9	10,3	10,7	79,8
4	10	11,5	11,9	91,7
5	1	1,1	1,2	92,9
6	2	2,3	2,4	95,2
7	2	2,3	2,4	97,6
8	1	1,1	1,2	98,8
21	1	1,1	1,2	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 48:** Anzahl der manifesten TTP Erkrankungen bei den befragten Patienten. Im Mittel erlitten die Patienten 2,4 TTP-Schübe.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig Keine Angaben	20	18,0	18,0	45,0
Infektion	30	27,0	27,0	27,0
Medikamente	11	9,9	9,9	55,0
sonstige	9	8,1	8,1	63,1
Kontrazeptiva	7	6,3	6,3	69,4
Schwangerschaft	6	5,4	5,4	74,8
Stress	4	3,6	3,6	78,4
Antibiotika	4	3,6	3,6	82,0
Magen-Darm-Infektion	4	3,6	3,6	84,7
Zystitis	2	1,8	1,8	86,5
Infekt der oberen Atemwege	2	1,8	1,8	88,3
Grippaler Infekt und Influenza-Impfung	2	1,8	1,8	90,1
Tamoxifen	1	,9	,9	91,9
Chinin	1	,9	,9	92,8
Herpes Zoster	1	,9	,9	93,7
Tamsulosin	1	,9	,9	94,6
Heparin	1	,9	,9	95,5
Bleivergiftung	1	,9	,9	96,4
Hormonersatztherapie	1	,9	,9	97,3
Pankreatitis	1	,9	,9	98,2
Malariaphylaxe	1	,9	,9	99,1
Tonsillitis	1	,9	,9	100,0
Gesamt	111	100,0	100,0	

**Tabelle 49:** Genauere Angaben zu den vermeintlichen Triggerfaktoren der TTP im Bezug auf Infektion, Medikamente und sonstiges (vgl. Tabelle 6).

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig				
Starke Kopfschmerzen	32	14,3	15,4	15,4
Somnolenz	27	12,1	13,0	28,4
Sehstörungen	18	8,1	8,7	37,0
sonstige	17	7,6	8,2	45,2
Sprachstörungen	17	7,6	8,2	53,4
Hämatom	16	7,2	7,7	61,1
Parästhesien	15	6,7	7,2	68,3
Petechien	13	5,8	6,3	74,5
Schwäche	11	4,9	5,3	79,8
Schwindel	9	4,0	4,3	84,1
Übelkeit	7	3,1	3,4	87,5
Oberbauchschmerzen	6	2,7	2,9	90,4
Emesis	5	2,2	2,4	92,8
Blässe	3	1,3	1,4	94,2
Gedächtnisprobleme	3	1,3	1,4	95,7
Ikterus	3	1,3	1,4	97,1
Bewusstlosigkeit	2	,9	1,0	98,1
Tachykardie	2	,9	1,0	99,0
Nierenversagen	2	,9	1,0	100,0
Gesamt	208	93,3	100,0	
Fehlend				
System	15	6,7		
Gesamt	223	100,0		

**Tabelle 50:** Auflistung der Symptome, die die Patienten zu Beginn eines TTP-Ausbruchs verspürten.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Nebenwirkungen bei der Therapie	4	4,6	5,7	5,7
	Nebenwirkungen aufgetreten	66	75,9	94,3	100,0
	Gesamt	70	80,5	100,0	
Fehlend	System	17	19,5		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 51:** Auftreten von Nebenwirkungen bei der PEX. PEX: Plasma-Exchange Therapie.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	Parästhesien in Gesicht/Beinen	5	14,3	14,3	14,3
	Müdigkeit	4	11,4	11,4	25,7
	Kältegefühl	3	8,6	8,6	34,3
	Koma	3	8,6	8,6	42,9
	Dyspnoe	2	5,7	5,7	48,6
	Alopezie	2	5,7	5,7	54,3
	Druck im Oberbauch	2	5,7	5,7	60,0
	Übelkeit	2	5,7	5,7	65,7
	keine Erinnerung	1	2,9	2,9	68,6
	anaphylaktischer Schock	1	2,9	2,9	71,4
	Angst	1	2,9	2,9	74,3
	Hyperventilation	1	2,9	2,9	77,1
	Engegefühl im Hals	1	2,9	2,9	80,0
	pektanginöse Beschwerden	1	2,9	2,9	82,9
	Epileptische Anfälle	1	2,9	2,9	85,7

Fieber unter Rituximab	1	2,9	2,9	88,6
Hyperosmie	1	2,9	2,9	91,4
Inkontinenz bei starkem Schüttelfrost	1	2,9	2,9	94,3
Konzentrationsstörungen	1	2,9	2,9	97,1
Sehstörungen	1	2,9	2,9	100,0
Gesamt	35	100,0	100,0	

**Tabelle 52:** Übersicht über Nebenwirkungen, die zusätzlich zum den oben Genannten aufgetreten sind.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig keine Angabe	7	8,0	8,0	8,0
FFP	61	70,1	70,1	78,2
Octaplas	3	3,4	3,4	81,6
weiß nicht	16	18,4	18,4	100,0
Gesamt	87	100,0	100,0	

**Tabelle 53:** Therapeutische Plasmabehandlung, unter der die oben beschriebenen Nebenwirkungen der PEX auftraten (Tabellen 11-18 und 52).

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig 0	41	47,1	48,8	48,8
1	17	19,5	20,2	69,0
2	9	10,3	10,7	79,8
3	13	14,9	15,5	95,2
4	2	2,3	2,4	97,6
5	2	2,3	2,4	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 54:** Anzahl der Stoffe, auf die die TTP-Patienten allergisch reagieren.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig keine	68	78,2	81,0	81,0
vorhanden	16	18,4	19,0	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 55:** Häufigkeitstabelle Medikamentenallergie; 19,0 % der Patienten leiden unter einer Medikamentenunverträglichkeit.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig keine	72	82,8	85,7	85,7
vorhanden	12	13,8	14,3	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 56:** Häufigkeitstabelle Hausstauballergie; 14,3 % der Patienten leiden unter einer Hypersensibilität gegenüber Hausstaubmilben.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig keine	75	86,2	89,3	89,3
vorhanden	9	10,3	10,7	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 57:** Häufigkeitstabelle Metallallergie; 10,3 % der Patienten leiden unter einer Hypersensibilität gegenüber Metallen.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig Keine	68	78,2	81,0	81,0
vorhanden	16	18,4	19,0	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 58:** Häufigkeitstabelle Pollenallergie; 18,4 % der Patienten leiden unter einer Hypersensibilität gegenüber Blütenpollen.

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig keine	75	86,2	89,3	89,3
vorhanden	9	10,3	10,7	100,0
Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend System	3	3,4		
Gesamt	87	100,0		

**Tabelle 59:** Häufigkeitstabelle Nahrungsmittelallergie; 10,3 % der Patienten leiden unter einer Hypersensibilität gegenüber verschiedenen Nahrungsmitteln.

	Anzahl der Allergien						Gesamt
	0	1	2	2	4	5	
Anzahl TTP- 1 Schübe	21	9	3	6	1	2	42
2	4	5	2	3	1	0	15
3	6	1	1	1	0	0	9
4	5	1	2	1	0	0	9
5	1	0	0	0	0	0	1
6	1	1	0	0	0	0	2
7	1	0	0	1	0	0	2
8	1	0	0	0	0	0	1
21	0	0	0	1	0	0	1
Gesamt	40	17	8	13	2	2	82

**Tabelle 60:** Korrelationstabelle zwischen Allergieanzahl und Anzahl der TTP-Schübe. Die Korrelationstabelle zeigt keinen signifikanten Einfluss dieser beiden Einflussgrößen aufeinander.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine AR aufgetreten	53	57,6	59,6	59,6
	Octaplas	1	1,1	1,1	60,7
	Calcium	6	6,5	6,7	67,4
	Antihistaminika	11	12,0	12,4	79,8
	Kortikosteroide	5	5,4	5,6	85,4
	keine Therapie trotz AR	13	14,1	14,6	100,0
	Gesamt	89	96,7	100,0	
Fehlend	System	3	3,3		
Gesamt		92	100,0		

**Tabelle 61:** Therapie der allergischen Reaktionen auf Fremdplasma bei PEX. AR: allergische Reaktion.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Komplikation	53	58,9	59,6	59,6
	Komplikation peripher (Leiste/ Ellenbeuge)	4	4,4	4,5	64,0
	Komplikation ZVK	32	35,6	36,0	100,0
	Gesamt	89	98,9	100,0	
Fehlend	System	1	1,1		
Gesamt		90	100,0		

**Tabelle 62:** Komplikationsraten bei Venenverweilkathetern während der PEX.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	0	55	63,2	64,7	64,7
	1	18	20,7	21,2	85,9
	2	8	9,2	9,4	95,3
	3	2	2,3	2,4	97,6
	4	2	2,3	2,4	100,0
	Gesamt	85	97,7	100,0	
Fehlend	System	2	2,3		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 63:** Häufigkeit der repetitiven Komplikationen von Venenverweilkathetern bei der PEX.

		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	keine Angst	29	33,3	34,5	34,5
	Angst	55	63,2	65,5	100,0
	Gesamt	84	96,6	100,0	
Fehlend	System	3	3,4		
Gesamt		87	100,0		

**Tabelle 64:** 65,5 % der befragten Patienten gaben an, Angst vor der Einlage eines zentralen Venenkatheters (ZVK) zu haben.

## 8.2 Anhang II: ADAMTS13-Aktivität mittels BCS Methode nach Böhm

<b>B</b>	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	<b>MW</b>	<b>s</b>
0932185					33,85		
1018511	80,15 %	42,35 %	44,9 %	56,95 %		56,09	17,26
1018518	28,2 %	54,65 %	30,95 %	48,8 %		40,65	13,06
1018519	31,3 %	58,15 %	71,6 %	39,25 %		50,08	18,24
1018548	15,4 %	50,3 %	69,65 %	88,25 %		55,9	31,13

**Tabelle 65:** gemessene Werte (M1- M5) für FFP Blutgruppe B. Die Chargen 1018518, 1018519, 1018548, 1018511 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt. Die Plasmaprobe 0932185 wurde ebenfalls verdünnt (1:1) gemessen. MW: Mittelwert, s: Standartabweichung.

<b>AB</b>	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	<b>MW</b>	<b>s</b>
0960994					49,85		
1087532	35,3 %	41,15 %	100 %	47,95 %		56,1 %	29,72
1018639	16,7 %	45,3 %	100 %	85,5 %		61,88 %	37,98
1087544	70,45 %	27,65 %	66,2 %	78,55 %		60,71 %	22,63
1087570	44,55 %	51 %	13,2 %	62,55 %		42,83 %	21,11

**Tabelle 66:** gemessene Werte (M1- M5) für FFP Blutgruppe AB. Die Chargen 1087544, 1087570, 1087532, 108639 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt. Die Plasmaprobe 0932185 wurde ebenfalls verdünnt (1:1) gemessen. MW: Mittelwert, s: Standartabweichung.

<b>O</b>	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	<b>MW</b>	<b>s</b>
0956523					54,05 %		
1018501	57,95 %	38,45 %	43,6 %	59,05 %		49,76 %	10,32
1018515	63,95 %	31,7 %	87,95 %	77,45 %		65,26 %	24,44
1018526	32,85 %	77,95 %	82,65 %	86,05 %		69,88 %	24,90
1018541	67,7 %	22,45 %	88 %	48,95 %		56,77 %	27,89

**Tabelle 67:** gemessene Werte (M1- M5) für FFP Blutgruppe 0. Die Chargen 1018515, 1018541, 1018526, 1018501 wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt. Die Plasmaprobe 0932185 wurde ebenfalls verdünnt (1:1) gemessen. MW: Mittelwert, s: Standardabweichung.

	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	MW
Oc A 0,5	66,65 %	40,1 %	36,55 %	83,85 %	44,95 %	<b>61,68 %</b>
Oc B 0,5	68,1 %	32,5 %	31,85 %	85,25 %	49,3 %	<b>54,88 %</b>
Oc AB 0,5	61,6 %	29,35 %	28 %	100 %	44,45 %	<b>50,14 %</b>
Oc 0 0,5	79 %	32,55 %	57,4 5	82,35 %	69,65 %	<b>68,13 %</b>

**Tabelle 68:** gemessene Werte (M1- M5) für Octaplas® (Oc) mittels MCS-Methode nach Böhm. Die Chargen wurden bei diesen Messungen 50 %ig verdünnt. MW: Mittelwert.

## 8.3 Patientenfragebögen

### 8.3.1 Fragebogen 1

Hat die Plasmapherese akute Nebenwirkungen bei Ihnen hervorgerufen? Wenn ja bitte zutreffendes ankreuzen:

Hatten Sie:	Ja	Nein
Schüttelfrost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hautauschläge	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Kopfschmerzen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Hitzegefühl	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Pulsrasen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Kribbeln in den Händen und Füßen	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Blutdruckabfall	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Kollapsartige Zustände	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Sonstiges (wenn ja, bitte beschrieben)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

---

Ist bei Ihnen eine Allergie bekannt? (Zutreffendes bitte markieren)

Gegen:

**Pollen** Frühblüher

Spätblüher

Roggen

Sonstige Pflanzen

**Nahrungsmittel** Sellerie

Kernobst

Nüsse

Äpfel

Sonstige Nahrungsmittel

**Medikamente** (bitte aufführen): \_\_\_\_\_

**Hausstaub**

**Sonstige Allergien:** \_\_\_\_\_

**Wie viele Plasmapheresen haben Sie nach ihrer Erinnerung erhalten?**

\_\_\_\_\_

Wie oft wurden die Plasmapheresen durchgeführt? (d.h. bei verschiedenen Schüben?) \_\_\_\_\_

mit FFP der Bluttransfusionszentrale? Ja  Nein

Oder mit Octaplas:

Wurde nur mit FFP oder mit Octaplas behandelt? (Ohne Plasmapherese)

\_\_\_\_\_

Hatten Sie allergische Reaktionen auf FFP? \_\_\_\_\_

Auf Octaplas? \_\_\_\_\_

Welche? \_\_\_\_\_

**Wo wurde bei Ihnen ein Zugang gelegt?**Peripher (Ellenbeuge) Peripher (Leiste) Zentral (Hals) **Hatten Sie Komplikationen (Blutungen, Entzündungen) des**Peripheren Zuganges Ja  Nein Zentralen Zuganges  

Wenn ja, wie oft? \_\_\_\_\_

**Haben Sie Angst vor einem zentralen Katheter?**

\_\_\_\_\_

**Wurde bei Ihnen durchgeführt:**eine Plasmaseparation (Filtration) oder eine Plasmapherese 

(Falls nicht bekannt, bitte Angabe des Arztes bzw. Krankenhauses für unsere telefonische Nachfrage.)

\_\_\_\_\_

**Wie wurde eine eventuelle allergische Reaktion behandelt? Wenn ja welche und wie?**\_\_\_\_\_ Ja  Nein  unbekannt **Sind allergische oder sonstige (Blutungen, Entzündungen) Komplikationen wiederholt aufgetreten?**

\_\_\_\_\_

Wenn ja, wie oft? \_\_\_\_\_

### 8.3.2 Fragebogen 2

#### I. Patientendaten:

Name:

Geburtsdatum:

Blutgruppe:

Angeborene oder erworbene TTP?

Hat sich das Gewicht seit/unter der Therapie Verändert?

Ausgangsgewicht vor Therapiebeginn:

Welche Medikamente nehmen sie regelmäßig ein?

Vorerkrankungen:

II. Verlauf Ihrer TTP-Erkrankung:

Mögliche Auslöser des TTP-Schubs (Infektionen, Medikamente, Schwangerschaft, oder andere)

Welche Symptome hatten Sie in dem (bzw. in den verschiedenen) Schub/Schüben?

Wie viele Schübe hatten Sie insgesamt?

Wie viele Plasmapheresen haben Sie nach ihrer Erinnerung erhalten?

Falls Sie sich nicht mehr genau an die Therapie erinnern können, nennen Sie uns bitte den behandelnden Arzt und die Klinik:

Haben Sie zusätzlich eine Therapie mit *Rituximab MabThera*<sup>®</sup> erhalten?

Nebenwirkungen der Therapie

Welche Nebenwirkungen hat die Plasmapherese bei Ihnen hervorgerufen?

Bitte beschreiben Sie wie stark sie die Nebenwirkungen empfunden haben (0 = nicht aufgetreten, 1=sehr leicht, 2= leicht, 3= mäßig, 4= stark, 5= sehr stark) und bei welchem Schub die speziellen Nebenwirkungen aufgetreten sind (z.B Schub 2/2008). Falls die gleichen Nebenwirkungen bei verschiedenen Schüben unterschiedlich stark aufgetreten sind, machen Sie dies bitte kenntlich

Art der Nebenwirkung	Wie stark haben Sie die Nebenwirkung empfunden (0-5)	Bei welchem Schub ist die Nebenwirkung aufgetreten
Schüttelfrost		
Hautausschläge		
Kopfschmerzen		
Hitzegefühl		
Pulsrasen		
Kribbeln in den Händen und Füßen		
Blutdruckabfall		
Kollapsartige Zustände		
Sonstiges (bitte beschreiben)		

Wie wurde Ihr TTP-Schub behandelt und sind unter der Therapie Nebenwirkungen aufgetreten?

Art der Nebenwirkung	Fresh Frozen Plasma (FFP)	Octaplas	Weiß nicht	Bei welchem Schub
Schüttelfrost				
Hautausschläge				
Kopfschmerzen				
Hitzegefühl				
Pulsrasen				
Kribbeln in den Händen und Füßen				
Blutdruckabfall				
Kollapsartige Zustände				
Sonstiges (bitte beschreiben)				

Ist bei Ihnen eine Allergie bekannt? (Zutreffendes bitte markieren)

- *Pollen:* Frühblüher
- Spätblüher
- Roggen
- Sonstige Pflanzen
- *Nahrungsmittel* Sellerie
- Kernobst
- Nüsse
- Äpfel

Sonstige Nahrungsmittel

- *Medikamente* (bitte aufführen): \_\_\_\_\_
- *Hausstaub*
- *Sonstige Allergien*: \_\_\_\_\_

Hatten Sie allergische Reaktionen auf FFP oder Octaplas? (zutreffendes bitte markieren)

Wenn ja, welche?

Wie wurde eine eventuelle allergische Reaktion behandelt?

\_\_\_\_\_

Sind allergische oder sonstige (Blutungen, Entzündungen) Komplikationen wiederholt aufgetreten?

Wenn ja, wie oft? \_\_\_\_\_

Wo wurde bei Ihnen ein Zugang gelegt?

Peripher (Ellenbeuge)

Peripher (Leiste)

Zentral (Hals)

Hatten Sie Komplikationen (Blutungen, Entzündungen) des

Peripheren Zuganges Ja  Nein

Zentralen Zuganges

Wenn ja, wie oft? \_\_\_\_\_

Haben Sie Angst vor einem zentralen Katheter?

### 8.4 Anhang III: SPSS Datensatz

Fallnummer	Fragebogen	Alter	Blutgruppe	Gewicht	Vorgeschichte	Gewicht	RIMed	Einnahme	Medikamente	Vorerkrankungen	Vorekrankungen
n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
166	1	51	1	2	1	108	0	0			0
167	1	57	5	3	1	58	0	1	Cortison, Ramipril, Pantozol, Simvastatin		0
174	1	52	2	2	2	146	0	1	Theophyllin, Cortisonsprays, Enalapril, Diuretika, ASS, Amiodipin	COPD, Asthma bronchiale, Herzinsuffizienz, Lungenernphysem	0
16	1	66	1	2	1	103	0	1		Hypertonus, Hashimoto-Thyreoiditis	2
157	1	37	4	2	1	65	0	0			0
160	1	39	2	2	1	75	0	0			0
151	1	23	3	2	0	53	0	1	Cipramil	Meningitis	1
152	1	47	3	2	1	72	83	1	Atenolol, Jodid	Hypertonus	1
130	1	37	4	2	1	56	62	1	Ovulationshemmer		0
14	1	58	5	2	1	64	73	1	L-Thyroxin	Hypothyreose, Mamma-Ca, Unterleib-TB, Nieren-TB	2
23	1	73	2	2	1	70	65	2	Beta-Blocker, Amlibeta, HCT		1
43	1	46	1	2	1	95	0	1	Citalopram, Remifemin		1
26	1	56	1	2	1	58	78	1		Mamma-Ca	1
29	1	76	2	2	1	75	83	1	Ramipril, Antivertiginosa, HCT, Metoprolol, Limptar	Hypertonie	1
11	1	25	1	2	2	52	0	0			0
28	1	33	2	2	2	66	0	1	L-Thyroxin, ASS 100, Ramipril, Metoprolol, Antiasthmatika	Hashimoto-Thyreoiditis, Asthma Bronchiale	2
16	1	30	2	2	1	103	0	0			0
18	1	49	3	2	1	72	0	1	Azathioprin, L-Thyroxin		1
32	1	72	5	2	2	0	0	1	Statine, Diuretikum, Laxantien, Antiasthmatika	Peritoneal TB, Billroth II, Pankreas-Ca, Morbus Crohn	2
37	1	44	3	2	0	0	0	0		Neurodermitis	2
42	1	27	1	2	1	76	90	1			0
34	1	40	2	2	0	60	0	0			0
8	1	23	3	2	1	103	112	1	Östrogenfreie Ovulationshemmer		0
30	1	81	3	1	0	57	0	1	Restex	Restless leg Syndrom	1
50	1	41	2	2	1	102	89	1			0
152	1	38	1	2	1	72	77	1	Bisoprolol, Ramilich		1
153	1	26	2	2	2	130	0	1	Amilorid, Spironolacton		1
154	1	31	2	2	2	84	0	1	Cellcept		1
155	1	43	1	2	1	67	70	1			0
42	1	27	1	2	1	76	90	1			0
10	1	45	5	2	1	0	0	0			0

Fallnr	Fragebogennummer	Alter	Geschlecht	Blutgruppe	Art der Aufnahme	Gewicht vor	Gewicht nach	Gewichtsunterschied	Medikation	Vorerkrankungen	Vorerkrankungen
n	n	in Jahren	m/f	g/b	Art	kg	kg	kg	Medikamente	Vorerkrankungen	Vorerkrankungen
n56	1	46	f	5	3	86	0	0	0	0	0
n63	n	50	f	4	3	2	0	1	Omeprazol, Ramipril, Amlodipin	0	0
n64	n	39	f	2	3	1	70	0	0	0	0
n68	n	39	f	4	2	1	73	0	Cortison, Ramipril	0	0
n78	n	32	f	2	2	2	0	0	0	0	2
n9	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n15	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n17	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n44	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n45	a	5	f	5	3	0	0	1	Insulin	1	1
n46	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n47	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n4	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n33	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n36	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
n3	n	23	f	1	3	1	83	91	Prednison	1	1
n13	n	36	f	2	2	1	66	0	0	0	1
1	n	29	f	1	1	2	72	0	Cotrim, L-Thyroxin, Pantozol, CellCept	1	1
39	n	41	f	5	2	2	56	0	0	0	0
35	n	67	f	2	2	0	0	1	Ramipril	0	0
3	n	45	f	3	2	1	100	110	L-Thyroxin	1	1
12	n	41	f	1	2	1	85	89	0	0	0
22	n	37	f	1	2	2	68	0	0	0	0
27	n	29	f	1	2	1	52	60	0	0	0
35	n	67	f	2	2	0	0	1	Ramipril	1	1
40	n	60	f	2	2	0	0	1	L-Thyroxin, Metformin, Ramipril, Plavix	2	2
n70	n	42	f	1	2	2	0	1	ASS, Jodid, Calcium, Opipramol	1	1
n72	n	73	f	1	3	2	64	0	Omeprazol, L-Tyroxin, Gabapentin, ASS, Cetirizin	2	2
n76	n	18	f	5	2	1	58	67	L-Thyroxin	2	2
n25	a	5	f	5	3	0	0	0	0	0	0
5	n	5	f	5	2	0	0	0	0	0	0
n38	n	43	f	1	2	2	0	1	Cipramil	1	1
7	n	45	f	3	2	2	84	0	0	0	0

Fallnummer	Fragebogennummer	Geschlecht	Alter	Blutgruppe	Art	Gewicht vor	Gewicht nach	Gewicht	Röntgenaufnahme	Medikamente	Vorerkrankungen	Vorerkrankungen
31	n	1	19	5	2	1	60	74	1	0	0	V.a von Willebrand Syndrom
58	n	1	36	5	2	1	100	0	0	0	0	Keratotonus
62	n	1	35	1	2	1	63	0	0	0	0	0
48	n	1	46	2	2	1	55	0	0	0	0	0
71	n	1	33	2	2	2	0	0	1	L-Thyroxin, Simvastatin, Zopiclon	2	Hypothyreose
77	n	1	79	5	2	0	73	0	1	L-Thyroxin, Votum, Lamictal, Azathioprin, Prednisolon	1	0
73	n	1	53	3	2	1	53	73	1	Prednison, ASS, Diovan, Sertralin	2	Hypertonie, Rheuma, Depression
1	n	1	47	2	2	1	85	0	0	0	1	Diabetes
20	n	1	41	1	2	1	60	70	1	Beta-Blocker, L-Thyroxin, Pantoprazol, Citalopram	1	0
49	n	1	27	2	2	2	0	0	0	0	0	0
41	n	1	45	1	2	1	0	0	1	L-Thyroxin	1	0
21	n	1	43	3	3	1	0	0	1	Marcumar, Raimipril, Gabapentin, Citalopram	1	Epilepsie
2	n	1	60	2	2	2	67	0	1	L-Thyroxin	2	Hypothyreose
59	n	1	32	2	2	1	78	85	1	Ovulationshemmer	0	0
61	n	1	27	4	1	1	54	0	0	0	0	0
69	n	1	26	3	2	2	73	0	0	0	0	0
2	n	2	25	1	2	1	84	74	2	0	0	0
19	n	1	66	4	1	1	72	0	1	L-Thyroxin, Metoprolol, Enalapril, Simvastatin, Diuretikum, Marcumar	1	Kinderkrankheiten, Tonsillektomie, Appendektomie
75	n	1	44	2	2	1	0	0	1	ASS, Paracetamol	1	Rachitis, Tonsillektomie
16	n	1	55	2	2	1	83	0	1	Omeprazol, Cipramil, Vitamin D3, Metoprolol, Pipameron, Marcumar, Alendron	2	Magenulcus, Apoplex, Evanssyndrom, Thrombose
51	n	1	34	3	2	1	56	71	0	0	0	0
24	n	1	47	1	2	1	55	0	0	0	0	0
65	n	1	46	2	2	1	63	0	1	L-Thyroxin	2	Hyperthyreose, Hypothyreose

Fallnummer	vermutet Auslöser	Sym pt	Symptome_Schub	Anzahl_Schübe	PEX_Anz_aef	PEX_H_Rituxi
n66	Medikamente	0				0
n67		1	Sehstörungen, Somnolenz, Hämatoeme, Trübe Augen			2
n74		4	Hämatoeme, Schwäche, Blässe	53	6	0
6		4	Übelkeit, Hämatoeme, Emesis, Epistaxis	6	1	2
n57		1	Parästhesien, Sehstörungen, Emesis, Diarrhoe	1		2
n60	unbekannt	5	Oberbauchschmerzen	5	1	2
51	Medikamente	1	Parästhesien, Sehstörungen	0	0	1
52		1	Sehstörung, Schwindel	0	0	2
n30	Magen-Darminfekt, Cystitis	5	Dyspnoe, Emesis	26	3	1
14	Infektion	1	st. Kopfschmerzen, Sprachstörung	35	4	2
23	0	4	Bewusstlosigkeit, Übelkeit, Emesis	30	2	2
43	Schwangerschaft, Infektion, Stress	1	Schwindel, Kopfschmerzen, Schwäche, Blässe	18	2	2
26	Tamoxifen	1	Kopfschmerzen, Bauchschmerzen, Hämatoeme, Müdigkeit, Gedächtnisprobleme	39	4	2
29	0	3	Sprachstörung	10	1	1
n1	0	1		1	0	1
28	Chinin	5	Hämatoeme	8	1	1
n6	1	4	Hämatoeme	7	1	2
18	0	5	Petechnien, Schwindel, Hämatoeme, Sprachstörung, Delir	23	3	1
32	2	4		29	3	0
37	5	1	Übelkeit, Hämatoeme	23	3	1
42	1	5	Hämatoeme, Petechnien, Schwäche	29	3	1
34	1	1	Müdigkeit, Magenschmerzen	55	6	0
8	2	1		10	1	2
30	5	5	Darmblutung	39	4	1
50	1	1	neurologische Symptome, Schwindel	17	2	2
n52	1	5	Nierenversagen, Fieber	11	2	2
n53	1	4	Tachykardie, Hydrocephalus	22	3	2
			Kopfschmerz, Schwindel, Sprachstörung, Vergesslichkeit, Petechnien,			
n54	1	4	Hämatoeme	8	1	2
n55	5	1	Parästhesien, Sehstörungen, Schwindel	40	4	1
42	1	5	Diarrhoe, Schwäche, Hämatoeme, Petechnien	29	3	1
10	3	5	Petechnien, Haarausfall	29	3	2

Fallnummer	vermutet Auslöser	Sympt	Symptome_Schub	Anzahl_Schübe	PEX_Ah	PEX_Anz	PEX_H	Rituximab
n56	1	4		1	17	2	2	2
n63	5	1	Parästhesien, Müdigkeit, Aphasie	1	6	1	2	2
n64	1	1	Parästhesien, Somnolenz	1	15	2	1	1
n68	1	1	Parästhesien, Sehstörungen	1	6	1	2	2
n78	1	1	Somnolenz, Petechien, neurologische Ausfälle	1	21	3	1	1
a9	0	0		1	16	2	0	0
a15	0	0		1	18	2	0	0
a17	0	0		1	20	3	0	0
a44	0	0		1	21	3	0	0
a45	0	0		1	15	2	0	0
a46	0	0		1	65	7	0	0
a47	0	0		1	6	1	0	0
a4	0	0		1	20	3	0	0
a33	0	0		1	50	6	0	0
a36	0	0		1	19	2	0	0
n3	3	3		2		0	2	2
13	1	1	Parästhesien, Sehstörungen, Somnolenz, Aphasie, Koma	2	12	2	2	2
1	2	5	Hämatome, Icterus, Sprachstörung, Petechien	2	45	5	1	1
39	1	4	Petechien	2	27	3	2	2
35	1	5	Übelkeit	2		0	0	0
3	2	3	Sprachstörung, rechte Seitenlähmung	2	30	3	2	2
12	2	1	Sprachstörung, Schwindel	2	19	2	2	2
22	2	1	Parästhesie	2	25	3	2	2
27	1	1	Parästhesie, Petechien, neurologisch. Symptome, Schwäche	2	31	4	2	2
35	1	5	Übelkeit	2			0	0
40	2	5	Nierenversagen, Sprachstörung, Somnolenz	2	16	2	1	1
n70	2	5	Schwäche	2	10	1	2	2
n72	1	5		2	10	1	2	2
n76	1	4	Schüttelfrost	2	30	3	1	1
a25	0	0		2	47	5	0	0
5	0	0		3		0	2	2

Fallnummer	vermutl. Auslöser	Sympt Symptome_Schub	Anzahl_Schübe	PEX_APEX_HaeufRituz
38	Kontrazeptiva, Antibiotika	Schwäche, Sprachstörung, Ikterus	3	3
7	Bleivergiftung	Magenschmerzen	3	6
31				1
n58		Hämatome, Emesis, Ikterus	3	40
n62		Sehstörung	3	22
48	Grippeimpfung und anschließender Infekt	Parästhesien, Somnolenz	3	35
n71		Petechien, Hämatome, Erschöpfung	3	35
n77		Schwäche, Anämie	3	4
n73		Kopfschmerzen, Sehstörungen, Aphasie, Schwindel	4	48
1	0	starke Kopfschmerzen, Müdigkeit, Unwohlsein	4	20
20	Infekt	Parästhesie linker Arm und Beine, Sprachstörung, Müdigkeit, Schwäche	4	8
49	Infekt d. Oberen Atemwege		4	30
41			4	150
21			4	0
2	Kontrazeptiva, Hormonersatztherapie	Übelkeit, Müdigkeit	4	32
n59	Stress	Parästhesien, Sehstörungen, Urticae im Mund	4	34
n61		Aphasie	4	25
n69		Petechien, Bauchkrämpfe	4	60
n2	Pankreatitis	Bauchschmerz, Makrohämaturie	5	11
19	0	Hämatome, Somnolenz, Parästhesie im Gesicht	6	6
n75	Kontrazeptiva	Somnolenz	6	52
16		Kopfschmerzen, Parästhesie, Somnolenz	7	60
n51		Schwäche, Übelkeit, Tachykardie, Pektanginöse Symptome	7	35
24	Kontrazeptiva, Malaria prophylaxe, Schwangerschaft	Hämatome, Petechien	8	18
n65	Medikamente	Aphasie, Konzentrationsschwäche, Müdigkeit	21	12





Falln	Schüttelfrost	Hautausschlag	Kopfschmerz	Hitze	Puls	Kribbeln	RR_A	Kolla	sonst_N	sonstige_NW	NW_Therap	unter_FB	AL_SB	Po_SB	AI_Ro	AI_Po	AI_NM	AI_NMKO
n58	0	3	0	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n7	4	0	1	0	1	4	3	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n51	4	0	3	0	0	3	0	0	1	Parästhesien im Gesicht	1	0	0	0	0	0	0	0
n58	3	1	1	3	1	1	1	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
n62	1	3	1	1	3	2	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n48	5	1	3	3	4	5	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n71	2	0	0	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n77	5	0	0	0	0	0	0	5	1	epileptische Anfälle	3	0	0	0	0	0	0	0
n73	5	0	0	0	0	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n1	5	0	4	0	4	4	0	4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n20	0	3	0	0	0	4	0	0	1	Kribbeln im Gesicht	1	0	0	0	0	0	0	0
n49	2	3	0	0	4	2	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n41	4	4	4	3	1	2	2	1	1	Dyspnoe	1	0	0	0	0	0	0	0
n21	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
n2	5	3	5	0	5	3	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n59	5	4	1	1	4	4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n61	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
n69	3	1	1	1	4	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n2	5	0	0	0	5	2	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n75	5	0	0	0	0	4	0	0	1	Inkontinenz bei starkem Schüttelfrost	1	0	0	0	0	0	0	0
n16	5	0	2	1	3	0	0	0	0	Starker Druck im Oberbauch	1	0	0	0	0	0	0	0
n51	3	0	3	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
n24	1	3	0	2	0	4	0	0	0	Frieren	1	0	0	0	0	0	0	0
n65	2	3	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0





Fallnummer	AI_NUAI_AAI_so	AI_Medi	AL_HAI_MeAI_so	AI_sonst	AR_PlaRkt_arRkt	Therapie	WDH_Anz_Z_pe									
ss	pfel_NM	edf1	ST	talle	nst1	AI	sonst	asma	FFP	O	art	arRkt	WDH	Anz	Z	pe
40	0	1	0	0	1	0	exogere allergische	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n70	0	0	1	0	0	0	Alveolitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n72	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
n76	0	1	1	0	0	0		1	1	0	0	Schüttelfrost	0	0	0	0
a25	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	Schüttelfrost, Blutdruckabfall	0	1	2	0
5	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	1	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	1	4	0
7	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	Calcium	0	0	0
n58	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
n62	0	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	1	9	0
48	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0
n71	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0
n77	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
n73	0	0	0	1	1	0	Nickel	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	1	0	1	0	Nickel, Sonne	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	1	2	0
21	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	0	1	0	0	1	0	Sonnenallergie	1	1	0	0	0	0	0	0	0
n59	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0
n61	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
n69	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0
n2	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
n75	0	0	0	0	1	0	Nahrungsmittelunverträgl.	1	1	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0		1	1	0	0	0	0	1	5	1
n51	0	0	1	0	1	0	Sonne, Kobaltchlorid.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	Nickel, Jod-Antiseptikum,	0	0	0	0	0	0	0	0	0
n65	0	0	0	0	1	1	Benzalkoniumchlorid,	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	Nickel, Katzen	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1	1	0	Somnolenz, Blutdruckabfall, Zittern	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Fallnummer	Z_perl	LZVK	KO_perl	KO_Zntr	Komplikation	KO_HaeufAngstZVK	Kommentar	filter_\$	Sum_Allergien	NW_Sum2	NW_Sum_bin2
n66	0	1	0	0	0	0		1	0	2	1
n67	0	1	0	0	0	0		1	2	1	1
n74	0	0	0	0	0	0		1	5	3	1
n57	1	0	1	1	2	0		1	3	12	1
n60	1	0	0	0	0	1		1	0	10	1
51	1	0	0	0	0	0	Keine Therapie mit PP auf eigenen Wunsch	1	3		
52	0	0	0	0	0	0	keine PP erhalten	1	4		
n30	1	1	0	0	0	0		1	3	5	1
14	0	1	0	1	2	2		1	0	32	1
23	0	1	0	0	0	0		1	1	1	1
43	0	1	0	1	1	1		1	0	11	1
26	0	1	0	0	0	0		1	0	10	1
29	0	1	0	1	1	1		1	3	3	1
n1	0	1	0	0	0	0		1	2	7	1
28	0	1	0	1	1	1		1	0	15	1
n6	0	1	0	0	0	0		1	1	11	1
18	0	1	0	1	2	2		1	1	11	1
32	0	1	0	0	0	0		1	0	7	1
37	0	1	0	0	0	0		1	0	7	1
42	0	1	0	0	0	0		1	0	11	1
34	0	1	0	1	3	3		1	1	11	1
8	1	1	0	1	2	0		1	1	11	1
30	0	1	0	0	0	0		1	0	12	1
50	0	1	0	0	0	0		1	2	10	1
n52	0	1	0	0	0	0		1	0	10	1
n53	0	1	0	0	0	0		1	3	3	1
n54	0	1	0	0	0	0		1	0	10	1
n55	1	1	1	1	4	4		1	0	15	1
42	0	1	0	0	0	0		1	0	7	1
10	0	1	0	1	1	1		1	0	1	1

Fallnu	mm	Z	per	L	ZVK	KO	per	KO	Zntr	Komplikation	KO	Haeuf	Angst	ZVK	Kommentar	filter	\$	Sum	Allergien	NW	Sum2	NW	Sum	bln2
n56	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	12			1		1	
n63	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	9			1		1	
n64	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	6			1		1	
n68	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	17			1		1	
n78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	7			1		1	
a9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
a15	0	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0							
a17	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	0	2							
a44	1	1	0	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	5	0	5							
a45	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0		0	
a46	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	0	0	1	1	1	1							
a47	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1							
a4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1							
a33	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0	3	0	0		0		0	
a36	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0		0	
n3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	7			1		1	
13	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	15			1		1		
1	0	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	0	0	1	2	2	4			1		1		
39	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	1	13			1		1		
35	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	15			1		1		
3	0	1	0	1	2	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	15			1		1		
12	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	23			1		1		
22	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	8			1		1		
27	0	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	11			1		1		
35	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	13			1		1		
40	1	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	3	13			1		1		
n70	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3			1		1		
n72	0	1	0	1	2	1	1	2	1	1	1	0	0	1	3	3	3			1		1		
n76	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4	4	3			1		1		
a25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							
5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	16			1		1		

Fallnu	mmr	Z	peri	L	ZVK	KO	peri	KO	Zntr	KO	Komplikation	KO	Haeuf	Angst	ZVK	Kommentar	filter	\$	Sum	Allergien	NW	Sum2	NW	Sum	bin2
n56	0	1	0	1	0	1	0	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	3	8	8	1	1	1	1	1
n57	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	13	13	1	1	1	1	1
n58	1	1	1	1	1	1	1	1	2	4	0	1	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1	1	1	1
n59	1	1	0	1	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	11	11	1	1	1	1	1
n60	1	1	0	1	0	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	12	12	1	1	1	1	1
n61	0	1	0	1	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	21	21	1	1	1	1	1
n62	1	1	0	1	0	1	1	1	2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	5	5	1	1	1	1	1
n63	0	1	0	1	0	1	1	2	2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	11	11	1	1	1	1	1
n64	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	9	9	1	1	1	1	1
n65	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	2	17	17	1	1	1	1	1
n66	0	1	0	1	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	8	8	1	1	1	1	1
n67	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	3	1	1	3	14	14	1	1	1	1	1
n68	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	18	18	1	1	1	1	1
n69	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1
n70	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	2	21	21	1	1	1	1	1
n71	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	19	19	1	1	1	1	1
n72	1	1	0	1	0	1	1	2	2	2	1	1	1	1	0	1	1	0	6	6	1	1	1	1	1
n73	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	12	12	1	1	1	1	1
n74	0	1	0	1	0	1	1	2	2	2	1	1	1	1	0	1	1	0	15	15	1	1	1	1	1
n75	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1
n76	0	1	0	1	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	10	1	1	1	1	1
n77	0	1	0	1	0	1	1	2	2	2	1	1	1	1	0	1	1	0	9	9	1	1	1	1	1
n78	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	3	1	1	3	5	5	1	1	1	1	1
n79	0	1	0	1	0	1	1	2	2	1	1	1	1	1	0	1	1	0	10	10	1	1	1	1	1
n80	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	3	1	1	3	10	10	1	1	1	1	1

Variablenansicht der SPSS-Daten:

Name	Typ	Variablenlabel	Fehlende Werte
Fallnummer	String		Keine
Fragebogen	String		Keine
Geschlecht	Numerisch		Keine
Alter	Numerisch		Keine
Blutgruppe	Numerisch		Keine
Art	Numerisch	erworben/angeboren	Keine
Gew_Veränd	Numerisch	Gewichtsveränderung	Keine
Gewicht_vor	Numerisch		Keine
Gewicht_nach	Numerisch		Keine
Gew_Richtung	Numerisch	Gewichtrauf oder. runter	Keine
Med_Einnahme	Numerisch	Medikamenteneinnahme	Keine
Medikamente	String		Keine
Vorerkr	Numerisch	Vorerkrankungen	Keine
Vorerkrankunger	String		Keine
vermutl_Ausl	Numerisch	vermutlicher Auslöser	0
Auslöser	String	sonstige vermutete Auslöser	Keine
Sympt	Numerisch	Symptome zu Beginn einer TTP	Keine
Symptome_Schub	String	Sonstige Symptome zu Beginn einer TTP	Keine
Anzahl_Schübe	Numerisch	Anzahl der TTP-Schübe	Keine
PEX_Anzahl	Numerisch	Anzahl der PEX bis zur Remission	Keine
PEX_Haeuf	Numerisch	Wie viele PEX im Mittel erhalten	Keine
Rituxi	Numerisch	Gleichzeitige Therapie mit Rituximab	Keine
Schüttelfrost	Numerisch		6
Hautausschläge	Numerisch		6
Kopfschmerz	Numerisch		6
Hitzgefühl	Numerisch		6
Pulserasen	Numerisch		6
Kribbeln	Numerisch		6
RR_Abfall	Numerisch	Blutdruckabfall während Therapie	6
Kollaps	Numerisch		6
sonst_NW	Numerisch	Sonstige NW ja/nein, siehe Variable „sonstige“	Keine
sonstige	String		Keine

Name	Typ	Variablenlabel	Fehlende Werte
NW_unter_Therap	Numerisch	Unter welcher Therapie trat NW auf	Keine
AI_Po_FB	Numerisch	Pollenallergie Frühblüher	Keine
AI_Po_SB	Numerisch	Pollenallergie Spätblüher	Keine
AI_Po_Ro	Numerisch	Pollenallergie Roggen	Keine
AI_Po_s	Numerisch	Pollenallergie sonstige	Keine
AI_NM_Se	Numerisch	Allergie Sellerie	Keine
AI_NMKO	Numerisch	Allergie Kernobst	Keine
AI_Nuss	Numerisch	Allergie Nüsse	Keine
AI_Apfel	Numerisch	Allergie Äpfel	Keine
AI_so_NM	Numerisch	Allergie sonstige Nahrungsmittel	Keine
AI_medi1	Numerisch	existiert eine Allergie gegen Medikamente	Keine
AI_Medi	String	Allergie gegen welche Medikamente	Keine
AI_HST	Numerisch	Hausstauballergie	Keine
AI_Metalle	Numerisch	Allergie gegen Metall (z.B. Nickel)	Keine
AI_sonst1	Numerisch	bestehen sonstige Allergien	Keine
AI_sonst	String	welche sonstigen Allergien bestehen	Keine
AR_Plasma	Numerisch	allergische Reaktion auf Plasma	Keine
aRkt_FFP	Numerisch	allergische Reaktion auf FFP	Keine
aRkt_O	Numerisch	allergische Reaktion auf Octaplas	Keine
art_aRkt	String	Welche art von allergischer Reaktion	Keine
Therapie	String	Therapie der allergischen Reaktion	Keine
WDH_aRkt	Numerisch	Sind allerg. Reaktionen/sonst. Kompl. wiederholt aufgetreten?	Keine
Anz_Wdh	Numerisch	wie oft sind Komplikationen aufgetreten	Keine
Z_peri_E	Numerisch	peripherer Zugang Ellenbeuge	Keine
Z_peri_L	Numerisch	peripherer Zugang Leiste	Keine
ZVK	Numerisch	Zugang ZVK	Keine
KO_peri	Numerisch	Komplikationen mit peripherem Zugang	Keine
KO_Zntr	Numerisch	Komplikationen mit zentralem Zugang	Keine
Komplikation	Numerisch		Keine
KO_Haeuf	Numerisch	Häufigkeit der Komplikation	Keine
AngstZVK	Numerisch	Angst vor ZVK-Anlage	Keine
VAR00001	String	Sonstige Anmerkungen	Keine
filter_\$	Numerisch	Fragebogen = "n" (FILTER)	Keine
Sum_Allergien	Numerisch	Summe aller Allergien	Keine
NW_Sum2	Numerisch	Nebenwirkungen auf PEX	Keine
NW_Sum_bin2	Numerisch	Nebenwirkungen_binär	Keine

## **8.5 Anhang IV: Vorzeitige Veröffentlichungen (Poster und Vorträge)**

**55. Jahrestagung Gesellschaft  
für Thrombose und  
Hämostaseforschung**

16.02.2011 bis 19.02.2011,  
Wiesbaden

**Investigation of side effect of plasma exchange in the  
treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura**

(Poster)

S Steinemann<sup>1</sup>, T Falter<sup>1</sup>, M Qorraj<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology, Oncology and Pneumology,  
University Medical Centre of the Johannes Gutenberg

University Mainz

<sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine University  
Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

**Comparison between Fresh Frozen Plasma and sol-  
vent/detergent Plasma for therapy of Thrombotic  
thrombocytopenic purpura (Vortrag)**

S Steinemann<sup>1</sup>, T Falter<sup>1</sup>, M Qorraj<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology, Oncology and Pneumology, Uni-  
versity Medical Centre of the Johannes Gutenberg University  
Mainz

<sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Univer-  
sity Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

**Comparison of ADAMTS13 Activity Assays for the di-  
agnosis in thrombotic thrombocytopenic purpura  
(Poster)**

M Qorraj<sup>1</sup>, T Falter<sup>1</sup>, S Steinemann<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology, Oncology and Pneumology, Uni-  
versity Medical Centre of the Johannes Gutenberg University  
Mainz

<sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Univer-  
sity Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

**52<sup>nd</sup> ASH<sup>®</sup> Annual Meeting  
and Exposition**

03.12.2010 bis 07.12.2010

Orlando

**ADAMTS13 activity in manifestation and remission of  
different microangiopathic diseases (Poster)**

M Qorraj<sup>1</sup>, T Falter<sup>1</sup>, S Steinemann<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology, Oncology and Pneumology, University Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

<sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz

**Evaluation of clotting factor concentrates for treatment  
of thrombotic thrombocytopenic purpura (Poster)**

T Falter<sup>1</sup>, M Qorraj<sup>1</sup>, S Steinemann<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology, Oncology and Pneumology,

University Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

<sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine University Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

**ADAMTS13 in 4 different VWF/VIII concentrates and its  
impact on therapy (Poster)**

M Qorraj<sup>1</sup>, T Falter<sup>1</sup>, S Steinemann<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Haematology, Oncology and Pneumology, University Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

<sup>2</sup>Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine University Medical Centre of the Johannes Gutenberg University Mainz

**41. Hämophilie Symposion**

12.11.2010 bis 13.11.2010

Hamburg

**ADAMTS13-Aktivität im akuten Schub und der Remission bei verschiedenen Mikroangiopathien (Vortrag)**T Falter<sup>1</sup>, M Qorraj<sup>1</sup>, S Steinemann<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, G Dannhardt<sup>3</sup>, KLackner<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup><sup>1</sup>Universitätsmedizin Mainz, III. Medizinische Klinik, Hämostaseologische Ambulanz,<sup>2</sup>Universitätsmedizin Mainz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin<sup>3</sup>J. Gutenberg-Universität, Institut für Pharmazie, Medizinische/Pharmazeutische Chemie, Mainz**Vergleich von Fresh Frozen Plasma und solvent/detergent Plasma in der Therapie der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (Poster)**S Steinemann<sup>1</sup>, T Falter<sup>1</sup>, M Qorraj<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, G Dannhardt<sup>3</sup>, K Lackner<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup><sup>1</sup>Universitätsmedizin Mainz, III. Medizinische Klinik, Hämostaseologische Ambulanz,<sup>2</sup>Universitätsmedizin Mainz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin<sup>3</sup>J. Gutenberg-Universität, Institut für Pharmazie, Medizinische/Pharmazeutische Chemie, Mainz**7. Jahrestagung Gesellschaft  
sche Chemie und****Laboratoriumsmedizin**

29.09.2010 bis 02.10.2010

Mannheim

**Vergleich von Methoden zur Bestimmung der für Klini-  
ADAMTS13-Aktivität (Poster)**T Falter<sup>1</sup>, M Qorraj<sup>1</sup>, S Steinemann<sup>1</sup>, T Vigh<sup>2</sup>, G Dannhardt<sup>3</sup>, K Lackner<sup>2</sup>, I Scharrer<sup>1</sup><sup>1</sup>Universitätsmedizin Mainz, III. Medizinische Klinik, ,  
Hämostaseologische Ambulanz<sup>2</sup>Universitätsmedizin Mainz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin<sup>3</sup>J. Gutenberg-Universität, Institut für Pharmazie, Medizinische/Pharmazeutische Chemie, Mainz

## **9 Danksagung**

Zu aller Erst möchte ich Frau Prof. Dr. I. S. ganz herzlich danken für die hervorragende und persönliche Betreuung, ihr unglaubliches Engagement und Vertrauen, aber auch dafür, dass sie mir ermöglicht hat an Kongressen teilzunehmen. Dadurch konnte ich während meiner Promotion unvergessene Eindrücke sammeln.

Herrn Prof. Dr. W. H. möchte ich meinen Dank für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit aussprechen und danke ihm für seine unkomplizierte und schnelle Hilfe in besonderen Situationen, sowie für die Bereitstellung der Fresh Frozen Plasma-Proben. Auch seinem Team aus der Transfusionszentrale möchte ich Danken, da mir die Mitarbeiter mit Tat und Rat stets zur Seite standen. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Dr. R. C. für die hervorragende Zusammenarbeit und Kooperation bezüglich der Plasmaproben.

Meinen besonderen Dank schulde ich meinem Betreuer T. V., der jederzeit für mich da war und mir bei sämtlichen Problemen helfend zu Seite stand. Aber auch durch die herzliche Aufnahme im Zentrallabor, die vielen netten Gespräche sowie die schöne Zeit bei Kongressen werden mir immer in wunderbar Erinnerung bleiben!

Bei Herrn Prof. M. B. bedanke ich mich für die überaus gute Hilfestellung bei der statistischen Auswertung meines Fragebogens und der Analyse meiner Daten.

Bei allen TTP-Patienten möchte ich mich herzlich für Ihre große Hilfe bei der Beantwortung meines Fragebogens sowie der Bereitstellung ihrer Plasmaproben für Forschungszwecke bedanken. Ich schätze ihr großes Engagement und bedanke mich für ihre positiven Rückmeldungen.

Der Firma Octapharma GmbH Deutschland und Herrn Dr. T. F. danke ich für die kostenfreie zur Bereitstellung der des solvent/detergent Plasmas und darüber hinaus der steten Zusendung von Informationsmaterial. Besonders bedanken möchte ich mich für die Kongressreise nach Orlando, FL, wo ich meine Forschungsergebnisse der American Society of Hematology (ASH) persönlich vorstellen konnte.

Zudem muss ich mich zutiefst bei meiner Mutter und meiner Schwester J. bedanken, die mir bei der Ausführung der Arbeit unterstützend zur Seite standen, die mit vielen hilfreichen Tipps und Tricks mir die Arbeit erleichterten und viel Zeit in eine gründliche Korrektur gesteckt haben. Vielen Dank liebe J., dass du dir so viel Mühe bei der Korrektur meiner Arbeit gegeben hast, obwohl auch du mitten in der Masterarbeit stecktest!

Auch meinen Freunden P. F. und T. R. möchte ich für ihre Geduld, Zeit und ihre Ideen danken, sowie für ihr Interesse an meiner Forschungsarbeit!

Zum Schluss möchte ich mich bei zwei ganz besonderen Menschen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet haben: meinen „Doktorschwestern“ T. F. und M. Q.. Ich danke ihnen von ganzem Herzen für die grandiose Teamarbeit, den Zusammenhalt und ihren Rückhalt. Ich hoffe, dass die Freundschaft, die unter diesen besonderen Bedingungen „im Labor“ gewachsen ist auch „in vivo“ eine aussichtsreiche und erfolgreiche Zukunft hat! Vielen Dank für drei wundervolle Jahre in der AG Scharrer, die ich nie vergessen werde und die dank euch zu so viel mehr als einer Promotion geworden sind!

## 10 Lebenslauf

<b>Name</b>	<b>Sarah Steinemann</b>
Geburtsdatum	1986
<b>Hochschulstudium</b>	
Seit 10/2008 – 12/2012	Johannes Gutenberg-Universität Mainz Studium der Humanmedizin; erwarteter Abschluss Ende 2012
Seit 06/2009 – 11/2012	Promotion in der Transfusionsmedizin der Universitäts- medizin Mainz bei Prof. Dr. med. W. H., unter der Betreuung von Prof. Dr. med. I. S., zum Thema <i>Unter- suchungen zur Plasmapheresetherapie bei Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura</i>
09/2006 – 06/2008	Universität Pécs, Pécs, Ungarn Studium der Humanmedizin und Erwerb des Physi- kums