

**Aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Markus Böck

**Einfluss der Immunadsorption mit einer rekombinanten Protein A-
basierten Adsorbersäule auf die Zusammensetzung des peripheren Blutes**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nadine Schossee

aus Höchberg

Würzburg, November 2022

Referent: Professor Dr. med. Markus Böck

Korreferentin: Professorin Dr. Nurcan Üçeyler

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.05.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

In dieser Arbeit sind alle Bezeichnungen in der maskulinen Form angegeben. Dies geschieht ausschließlich aufgrund der besseren Lesbarkeit. Grundsätzlich sind auch die feminine und diverse Form immer miteingeschlossen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Einsatz von Aphereseverfahren in der Medizin.....	1
1.2 Prinzip der therapeutischen Apherese.....	6
1.2.1 Anwendung von Zellapheresen.....	6
1.2.2 Therapeutischer Plasmaaustausch.....	6
1.2.3 Immunadsorptionsverfahren.....	10
1.3 Adsorberarten.....	11
1.4 Eigenschaften des Adsorbers Ligasorb®.....	14
1.5 Hintergrundinformationen zu ausgewählten Plasmaproteinen.....	15
1.6 Das menschliche Blutgerinnungssystem.....	20
1.7 Krankheitsbild Myasthenia gravis.....	21
1.8 Krankheitsbild Stiff-Person-Syndrom.....	23
1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	24

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum.....	25
2.2 Charakteristika des Patientenkollektivs.....	25
2.3 Praktische Durchführung der Immunadsorptionen.....	27
2.4 Dokumentation der Behandlungen.....	29
2.5 Blutentnahme und Bestimmung der untersuchten Parameter.....	30
2.6 Statistische Auswertung.....	31

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der durchgeführten Immunadsorptionsverfahren.....	31
3.2 Auswirkungen der Behandlung auf die zelluläre Blutzusammensetzung....	33
3.3. Einfluss der Immunadsorptionen auf klinisch-chemische Parameter.....	34
3.4 Auswirkung auf Immunglobuline und Plasmaproteine.....	35
3.4.1 Effiziente Reduktion der Immunglobuline vom Typ IgG.....	36
3.4.2 Wirksame Absenkung der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörperkonzentration.....	37
3.4.3 Auswirkungen der Behandlung auf Immunglobuline vom Typ IgM und IgA, Komplementfaktoren und Albumin.....	38
3.5 Einfluss der Immunadsorptionen auf die Blutgerinnung.....	39
3.5.1 Deutliche Veränderung der Gerinnungsglobaltests nach Behandlung.....	39
3.5.2 Antithrombin und D-Dimere zeigen nach Immunadsorption stabile Werte	40
3.5.3. Analyse der einzelnen Gerinnungsfaktoren zeigt deutliche Affektion der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X.....	41
3.6 Regeneration der Blutgerinnungsparameter innerhalb von 16 – 20 Stunden nach Immunadsorption.....	44
3.6.1 Weitgehende Normalisierung des Fibrinogens und der Gerinnungsglobaltests.....	44
3.6.2 Fast vollständige Regeneration der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren.....	46

4 Diskussion

4.1 Effektivität der Immunglobulin-Reduktion.....	47
---	-----------

4.2 Kein Einfluss der IA auf zelluläre Blutbestandteile, klinisch-chemische Parameter und weitere Plasmaproteine.....	48
4.3 Stabile Fibrinogenwerte.....	49
4.4 Deutliche Reduktion der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren.....	50
4.5 Praktikabilität des Verfahrens.....	51
4.6 Einschränkungen der Studie und Ausblick.....	52
5 Zusammenfassung.....	53
6 Literaturverzeichnis.....	54

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungsverzeichnis

III Tabellenverzeichnis

IV Danksagung

V Lebenslauf

VI Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

1 Einleitung

1.1 Einsatz von Aphereseverfahren in der Medizin

Die Anfänge von Aphereseverfahren gehen auf die Griechen Hippocrates und Galen zurück, die auf Grundlage der Viersäftelehre die Entstehung von Krankheiten in einem Ungleichgewicht der Körpersäfte sahen (1). Darauf beruhend folgten etwa im 17. Jahrhundert die ersten Versuche von therapeutischen Aderlässen. Mit Beginn des 20. Jahrhunderts beschrieb John J. Abel die Entfernung pathogener Substanzen aus dem Patientenblut und prägte im Jahr 1914 den Begriff Plasmapherese (2).

Die Begriffe Apherese und Hämapherese werden im medizinischen Sprachgebrauch synonym verwendet, in dieser Arbeit wird der Begriff Apherese verwendet.

Der Begriff Apherese, welcher sich aus dem Griechischen ableiten lässt und „wegnehmen, entfernen“ bedeutet, bezeichnet ein medizinisches Verfahren, bei dem über einen extrakorporalen Kreislauf Substanzen aus dem Blut entfernt werden können. Apheresen können sowohl bei gesunden Menschen zur Gewinnung von Einzelblutbestandteilen im Rahmen einer Blutspende (präparative Apherese) als auch bei Patienten zur Therapie bestimmter Krankheitsbilder eingesetzt werden (therapeutische Apherese).

Über einen peripheren oder zentralen Venenkatheter wird das Blut kontinuierlich einem Apheresegerät zugeführt, das Blutplasma von den zellulären Bestandteilen trennt und das entsprechende Agens eliminiert. Dies findet innerhalb eines extrakorporal hergestellten sterilen Kreislaufs statt (**Abbildung 1**).

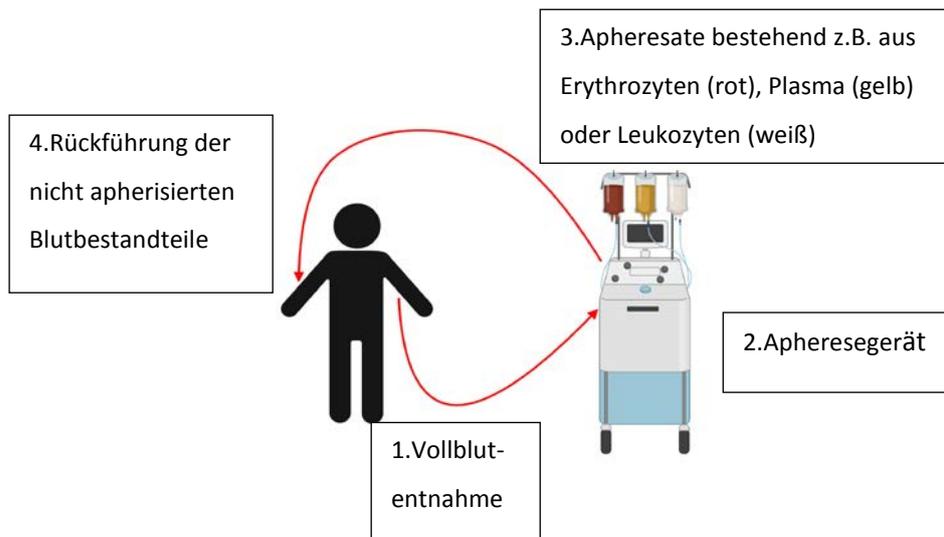


Abbildung 1: Schematische Darstellung extrakorporaler Kreislauf über periphere Zugänge mit Apheresegerät und verschiedenen Apheresaten (Abb. erstellt mit biorender.com)

Je nach Apheresegerät und angewendetem Verfahren befindet sich jeweils nur ein kleiner Teil des Gesamtblutvolumens außerhalb des Körpers.

Alle Blutbestandteile, die nicht entfernt werden, werden der Person im Anschluss wieder retransfundiert. Die Durchführung von Apheresen geschieht mit Zellseparatoren, die durch Zentrifugation die zellulären Blutbestandteile vom Blutplasma abtrennen. Die ersten Zellseparatoren wurden in den 1960er Jahren entwickelt (3, 4). Neben den Zellseparatoren gibt es auch Primärgeräte, die diese Auftrennung über Plasmafiltration erreichen (5).

Zentrifugen nutzen das Prinzip der Massenträgheit zur Auftrennung des Vollbluts. Physiologisches Vollblut besteht zu ca. 45% aus Zellen und zu etwa 55% aus Blutplasma. Nach der Zentrifugation sind Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma entsprechend ihrer Dichte über einander geschichtet und man erkennt eine typische Dreischichtung, in der Leukozyten und Thrombozyten in einer gemeinsamen Schicht vereint sind (**Abbildung 2**).



<<< Blutplasma

<<< buffy coat=Leukozyten+Thrombozyten

<<<Erythrozytensediment

Abbildung 2: Vollblut nach Zentrifugation mit Erythrozytensediment unten, dünnem buffy coat in der Mitte und Blutplasma oben (Abb. erstellt mit biorender.com)

Den größten Anteil der Blutzellen stellen mit 4-5 Millionen pro μl Blut die Erythrozyten, sie bilden nach Zentrifugation die unterste Schicht. Danach folgt eine dünne Schicht bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, für die der englische Name „buffy coat“ (dt. Leukozytenfilm) verwendet wird. Thrombozyten stellen mit Normwerten von 150000 – 300000 pro μl Blut die zweitgrößte Zellfraktion dar. Leukozyten weisen mit 4000 - 9000 Zellen pro μl Blut die kleinste Zellpopulation auf. Die oberste Schicht nach Zentrifugation bildet das Blutplasma, welches als gelblich, klare Flüssigkeit zu erkennen ist (**Abbildung 2**).

Um eine Gerinnung des Blutes im extrakorporalen Kreislauf aufgrund des Kontaktes zu Fremdoberflächen während der Apherese zu verhindern, muss dem entnommenem Blut unverzüglich ein Antikoagulans beigemischt werden (6). Dabei handelt es sich zumeist um Citrat oder Heparin, auch eine Kombination beider Substanzen ist möglich. Citratlösungen haben sich als Mittel der Wahl etabliert (7), üblicherweise wird ACD-A (Acidum-Citricum-Dextrose, Formel A) in einem Verhältnis von 1:12 zwischen Antikoagulans und Vollblut verwendet.

Die gerinnungshemmende Wirkung von Citrat beruht auf der Chelatkomplexbildung mit Calciumionen und der damit verbundenen Blockade der Calcium-abhängigen Aktivierungsreaktionen von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren im Blut. Zusätzlich hat Citrat auch einen hemmenden Effekt auf die Calcium-abhängigen Schritte der Komplementaktivierung, was bei

verschiedenen Aphereseverfahren von Vorteil ist (8). Bei einer Mischantikoagulation wird zusätzlich zum Citrat Heparin verabreicht. Heparine binden Antithrombin III, wodurch die Inaktivierung von aktivierten Gerinnungsfaktoren um das Tausendfache beschleunigt wird (9).

Aphereseverfahren können mit einer Reihe von Risiken behaftet sein, wobei schwerwiegende Nebenwirkungen sehr selten sind. Die Mortalitätsrate eines Aphereseverfahrens wird von *Kaplan et al.* mit 0,05% angegeben, wobei nicht in allen Todesfällen eine direkte Kausalität zur Apherese hergestellt werden konnte (10). Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen alle Symptome, die auf die periprozedurale Citratzufuhr und die damit verbundene Hypokalzämie zurückgeführt werden können (11). Leitsymptome einer leichten Citratreaktion mit milder Hypokalzämie sind periorale und/oder periphere Parästhesien, Übelkeit, Frieren oder Geschmacksstörungen (12). Schwere Hypokalzämien können zu Muskelspasmen, Herzrhythmusstörungen und epileptischen Anfällen führen. Schwere Hypokalzämiesymptome treten heutzutage nur noch sehr selten auf, da moderne Apheresegeräte die Gesamtdosis und die Citratinfusionsrate in Abhängigkeit vom Blutvolumen des Patienten begrenzen. Prophylaktisch kommt außerdem an vielen Apheresezentren die intravenöse Calciumsubstitution zum Einsatz.

Komplikationen und Nebenwirkungen im Zusammenhang mit den erforderlichen Gefäßzugängen ergeben sich meist aus der Anlage zentraler Venenkatheter, welche mit Risiken für Thrombosebildungen oder lokale Infektionen behaftet ist (13). Daher wird im Regelfall der periphere Gefäßzugang über die Kubitalvenen bevorzugt (14).

Selten treten durch die extrakorporale Zirkulation vasovagale Reaktionen auf, die oft mit Blässe, Kaltschweißigkeit, Bradykardie und Hypertonie einhergehen können. Eine begleitende anihypertensive Therapie wird deshalb vor Therapiebeginn kritisch geprüft.

Das Auftreten allergischer Reaktionen im Rahmen therapeutischer Apheresen hängt vor allem von der verwendeten Substitutionslösung ab. Nach Transfusion von Frischplasma, welches reich an Fremdeiweiß ist, ist das Risiko für eine

allergische oder anaphylaktische Reaktion im Vergleich zur Anwendung einer anderen Substitutionslösung deutlich erhöht (15). Die Symptomatik kann von einer milden Urtikaria, über einen Bronchospasmus, einer Hypotonie und Tachykardie bis hin zu einem schweren allergischen Schock reichen. Aus diesem Grund werden vorzugsweise Humanalbumin- und Elektrolytlösungen in Kombination als Plasmasubstitutionslösung eingesetzt.

Grundsätzlich sollte vor Einleitung einer Apheresetherapie eine gründliche Medikamentenanamnese erfolgen, insbesondere stellen Angiotensin Converting Enzym-Hemmer (ACE-Hemmer) eine kritische Substanz dar. Bei Blutkontakt mit negativ geladenen künstlichen Oberflächen kann es zu einer Bradykinin-Kallikrein Aktivierung kommen. ACE-Hemmer verhindern den physiologischen Bradykininabbau mit der möglichen Folge der Ausbildung eines potentiell lebensbedrohlichen Angioödems (16) und/oder einer schweren Hypotonie.

Ebenso muss beachtet werden, dass viele Patienten aufgrund kardiovaskulärer Vorerkrankungen häufig eine systemische Antikoagulation erhalten. Dies muss bei der Indikationsstellung berücksichtigt werden, eventuell ist eine Dosisanpassung des verwendeten Antikoagulans notwendig.

Bei therapeutischen Aphereseverfahren kann es auch zu signifikanten Konzentrationsabfällen von Medikamenten im Blut des Patienten kommen. Dies trifft vor allem für den therapeutischen Plasmaaustausch zu. Daher kann es bei kritisch kranken Patienten sinnvoll sein, Einnahmezeitpunkte während der Therapie neu festzulegen und Medikamentenspiegel zu bestimmen (17).

Technische Komplikationen sind grundsätzlich möglich, allerdings sind solche unerwünschten Ereignisse durch die hohen Sicherheitsstandards der Behandlungsgeräte sowie bei sachgerechter Anwendung von ausschließlich geschultem und erfahrenem Personal eine Rarität.

1.2 Prinzip der therapeutischen Apherese

Zu therapeutischen Apheresen zählen Zellapheresen, Plasmapheresen und Immunadsorptionen. Diese Verfahren ermöglichen seit vielen Jahren eine effektive Behandlung verschiedenster symptomatischer Erkrankungen (18). Das Behandlungsspektrum umfasst dabei neben internistischen Krankheitsbildern ebenso die Therapie neurologischer Autoimmunerkrankungen.

Ziel von therapeutischen Apheresen ist, je nach zugrundeliegender Erkrankung, die Entfernung von Zellen, Proteinen, proteingebundenen Substanzen oder toxischen Stoffwechselprodukten aus dem Blutkreislauf. Im Gegensatz zur Hämodialyse sind therapeutische Aphereseverfahren nicht auf die Entfernung wasserlöslicher, toxischer Substanzen mit geringem Molekulargewicht beschränkt und somit sehr breit einsetzbar (17).

1.2.1 Anwendung von Zellapheresen

Mit therapeutischen Zellapheresen (Zytapheresen) ist man in der Lage, pathologisch veränderte oder pathologisch erhöht vorliegende Zellpopulationen (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) aus dem Blut zu entfernen und, falls nötig, durch Zellkonzentrate gesunder Spender zu ersetzen. Beispielhaft sei an dieser Stelle die Leukozytapherese zur Behandlung der symptomatischen Hyperleukozytose bei Leukämien genannt. Durch die Reduktion der hohen Leukozytenzahlen mittels Zellapherese mit anschließender zytoreduktiver Systemtherapie kann u.a. das Risiko eines schweren Tumorlysesyndroms gesenkt werden (19).

1.2.2 Therapeutischer Plasmaaustausch

Heutzutage werden die Begriffe „Plasmaaustausch(behandlung)“ und „therapeutischer Plasmaaustausch (TPA)“ dem früher häufig verwendeten Begriff der „therapeutischen Plasmapherese“ vorgezogen. Der TPA ist das am häufigsten angewendete Aphereseverfahren (2). Bei einem TPA findet eine

unspezifische Elimination der Plasmafraktion statt. Die Separation von den zellulären Blutbestandteilen kann über einen Filter oder durch Zentrifugation erreicht werden. Das verworfene Plasma wird durch Substitutionslösungen ersetzt und diese zusammen mit den zellulären Blutbestandteilen dem Patienten retransfundiert. In den 1950-er Jahren begann mit den ersten erfolgreichen Behandlungen des Hyperviskositätssyndroms im Rahmen eines Morbus Waldenström die stetige Weiterentwicklung dieses Verfahrens (20). Seine Vorteile liegen im einfachen Aufbau eines extrakorporalen Kreislaufs und der generellen Anwendbarkeit bei allen im Blutplasma befindlichen Substanzen. Die Effektivität ist auch bei Erkrankungen mit nicht genau bekannter pathogener Substanz gegeben, z.B. beim Guillain-Barré Syndrom (21). Als Nachteil dieses Verfahrens kann seine unselektive Wirkweise angesehen werden, da nicht gezielt pathogene Substanzen entfernt werden können, sondern das separierte Plasmavolumen vollständig verworfen wird. Dadurch kommt es auch zur unerwünschten Depletion von physiologischen Plasmabestandteilen wie etwa den Gerinnungsfaktoren oder Immunglobulinen. Mit der Entfernung von einem Gramm pathogener Antikörper gehen gleichzeitig 150 Gramm Plasmaproteine verloren (2). Dies führt häufig zu einer erworbenen Koagulopathie. Aufgrund der kompromittierten Blutgerinnung können notwendige Therapien erheblich mehr Zeit in Anspruch nehmen.

Die Therapieintervalle richten sich nach der Grunderkrankung und variieren je nach Krankheitsbild. Beim TPA bei neurologischen Erkrankungen haben sich Serienbehandlungen bewährt. Die Anzahl der notwendigen TPA hängt auch davon ab, wie schnell die Symptombesserung eintritt. Dies kann wenige Tage bis Wochen dauern. Bei der Behandlung der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) ist ein täglicher, oft auch zweimalig täglicher Plasmaaustausch notwendig. Die Therapieintensität ist bei diesem Krankheitsbild zu Beginn nicht festgelegt und hängt von einer ausreichend stabilen Thrombozytenregeneration ab (22).

Zur Substitution des entzogenen Blutplasmas eignen sich sowohl Humanalbumin, isotonische Elektrolytlösungen als auch Frischplasma. Bei der Auswahl des entsprechenden Ersatzmediums werden verschiedene Faktoren

berücksichtigt. Ziel ist die Aufrechterhaltung des physiologischen onkotischen Drucks mit Isovolumie. Die Festlegung der Austauschflüssigkeit erfolgt immer nach individueller Beurteilung der Grund- und Begleiterkrankungen des Patienten, sowie unter Berücksichtigung der voraussichtlichen Behandlungsdauer und -intensität. Frischplasmen kommen aufgrund ihres hohen allergischen und potentiell infektiösen Potentials regulär nur noch bei der Behandlung der TTP oder einer manifesten Dilutionskoagulopathie zum Einsatz. Die Substitution des entfernten Plasmas erfolgt mit Frischplasma oder mit Kombinationslösungen aus Humanalbumin und Elektrolytlösungen. Humanalbumin wird aus humanem Poolplasma gewonnen, welches aufgrund des Herstellungsprozesses und der damit verbundenen Pathogeninaktivierung als infektionssicher gilt. Allergische Reaktionen nach Humanalbumingabe sind sehr selten (23).

Es existieren eine Vielzahl von Indikationen für einen TPA (24). Neben klassisch internistischen Krankheitsbildern wie der TTP, besteht mit dem TPA auch für autoimmunvermittelte neurologische Krankheitsbilder eine Therapieoption (25) (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Indikationen für einen TPA bei neurologischen Autoimmunerkrankungen

Auszug aus der 8. überarbeiteten Auflage (2019) der „Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practise“ der Amerikanischen Gesellschaft für Apherese (ASFA) (25), Kategorie I: Apherese als Erstlinientherapie akzeptiert, Kategorie II: Apherese als Zweitlinientherapie akzeptiert, Kategorie III: optimale Rolle der Apherese unklar, Evidenzgrade: 1A: starke Empfehlung mit hervorragender Evidenz, 1B: starke Empfehlung mit eingeschränkter Evidenz, 1C: starke Empfehlung mit schwacher Evidenz, 2A: schwache Empfehlung mit hervorragender Evidenz, 2B: schwache Empfehlung mit eingeschränkter Evidenz, 2C: schwache Empfehlung mit wenig Evidenz

Krankheitsbild	Indikation	Evidenzgrad	Kategorie
Akute disseminierte Enzephalomyelitis	steroidrefraktär	2C	II
Guillain-Barré Syndrom	Primärtherapie	1A	I
Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)	Primärtherapie oder Erhaltungstherapie	1B	I
Multiple Sklerose	Akutphase	1A	II
	Erhaltungstherapie	2B	III
Myasthenia Gravis	Akutphase	1B	I
	Erhaltungstherapie	2B	II
Neuromyelitis Optica Spektrum Erkrankungen (NMOSD)	Akutphase	1B	II
	Erhaltungstherapie	2C	III
Stiff-Person-Syndrom	Keine Daten verfügbar	2C	III

1.2.3 Immunadsorptionsverfahren

Immunadsorptionsverfahren (IA) stellen eine Weiterentwicklung des TPA dar. Mit ihnen können gezielt je nach verwendetem Adsorber definierte Substanzen aus dem Patientenplasma adsorbiert werden. Im Allgemeinen versteht man unter dem Begriff Adsorption einen Prozess, bei dem Stoffe auf der Oberfläche eines anderen Stoffes angereichert werden. Der große Vorteil gegenüber einem TPA ist das selektive Entfernen von pathogenen Substanzen aus dem Plasma mit anschließender Plasmarückführung. Dadurch entfällt die Plasmasubstitution mit einer Ersatzlösung und physiologische Plasmapbestandteile bleiben weitgehend erhalten (26).

Für die Durchführung von IA ist analog zum TPA ein primäres Plasmaseparationsgerät notwendig (**Abbildung 3**).

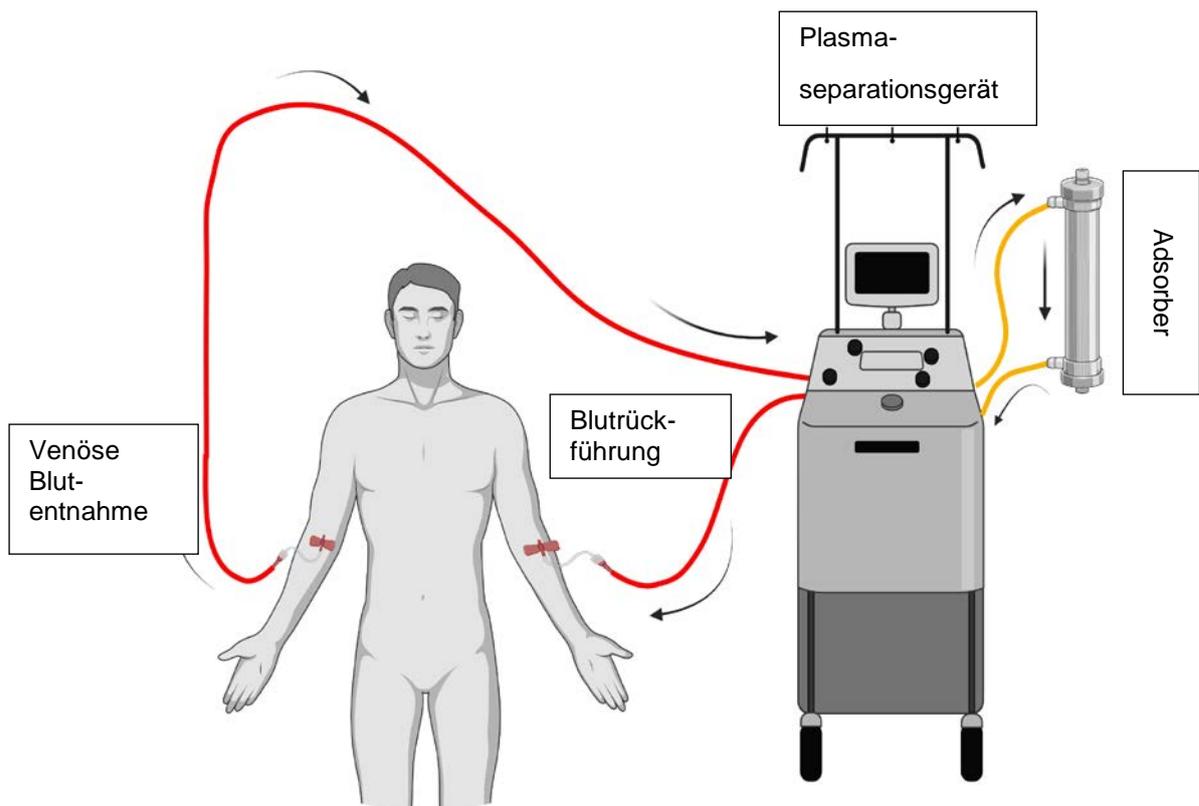


Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Immunadsorption mit Plasmaseparationsgerät und nicht-regenerierbarem Adsorber ohne Sekundärgerät (Abb. erstellt mit biorender.com)

Bei der Verwendung regenerierbarer Adsorber kommt neben dem Adsorber selbst auch ein Zweitgerät zur Steuerung der Säulenbeladung zum Einsatz. Nach Auftrennung des antikoagulierten Vollbluts im Plasmaseparationsgerät wird das Blutplasma über sterile Leitungen zum angeschlossenen Zweitgerät geleitet. Das Zweitgerät überwacht und steuert den Plasmafluss zum Adsorber sowie die notwendigen Spülvorgänge. Das behandelte Plasma wird aus der Adsorbersäule zurück zum Plasmaseparationsgerät geleitet und anschließend dem Patienten retransfundiert. Bei der Verwendung nicht-regenerierbarer Adsorber ist kein Zweitgerät notwendig, das Blutplasma wird direkt zur Adsorbersäule geleitet und anschließend behandelt zurückgegeben.

Im Grunde ist die IA bei allen neurologischen Autoimmunerkrankungen anwendbar, für die auch eine Indikation zum TPA besteht (**Tabelle 1**).

1.3 Adsorberarten

Es gibt regenerierbare und nicht-regenerierbare Adsorber. Regenerierbare Adsorbersäulen können als Doppeladsorber oder Einzeladsorber verwendet werden. Man unterscheidet außerdem zwischen Adsorbern für den einmaligen Gebrauch und solchen, die patientenbezogen mehrfach verwendet werden können. Die mehrfach verwendbaren Säulen lassen sich sehr gut bei Patienten anwenden, bei denen in regelmäßigen Abständen IA durchgeführt werden. Einmalsäulen dagegen können sowohl in Akutsituationen bei neuen Patienten als auch in der Dauertherapie eingesetzt werden.

Regenerierbare Adsorber werden während der Behandlung nach Erreichen der Adsorptionskapazität von den gebundenen pathogenen Substanzen gereinigt. Wenn das Verfahren mit zwei Adsorbern durchgeführt wird, kann während der Regeneration des einen Adsorbers der zweite Adsorber weiter mit Plasma beladen werden. Der Einsatz von Doppeladsorbern ermöglicht eine kontinuierliche Behandlung des Patientenplasmas. Bei Immunadsorptionen, die mit einem Adsorber durchgeführt werden, findet in der Zeit der Säulenregeneration keine Plasmabehandlung statt. Das hat zur Folge, dass das

Verfahren bis zum Erreichen der gewünschten Plasmabehandlungsmenge mehr Zeit in Anspruch nimmt. Der Vorteil regenerierbarer Adsorbersäulen liegt darin, dass mehr Plasmavolumen über die Säule prozessiert werden kann. Es existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Adsorbersäulen, die je nach Ligandenspezifität in der Lage sind z.B. Komplementfaktoren, Zytokine, Chemokine, Antikörper oder Antikörperkomplexe aus dem Patientenplasma zu eliminieren. Alle Adsorber sind sterile Medizinprodukte, die eine CE-Kennzeichnung tragen. Im Folgenden wird näher auf die Adsorbersäulen eingegangen, die für eine Immunglobulin-Plasmaadsorption zur Verfügung stehen (**Tabelle 2**).

Immusorba TR-350 und Immusorba PH-350 sind nicht-regenerierbare Einwegadsorbersäulen der Firma Asahi Kasei Medical, Tokio, Japan. Ihre Liganden sind Tryptophan bzw. Phenylalanin, welche an einem Polyvinylalkoholgel immobilisiert sind (27). Für die Verwendung dieser Adsorbertypen ist kein Zweitgerät notwendig.

TheraSorb® -Ig Adsorber verwenden Anti-Human-Immunglobulin G Moleküle vom Schaf, die an einer Sepharosematrix aufgetragen sind (28). Sie sind patientenbezogen mehrfach verwendbar.

Immunosorba® PH-350 der Firma Fresenius Medical Care ist eine regenerierbare, patientenbezogene wiederverwendbare Adsorbersäule, die in der Praxis als Doppelsäule eingesetzt wird. Sie enthält als Liganden Protein A, welches aus der Zellwand von *Staphylokokkus aureus* stammt. Das Protein A ist kovalent an eine unlösliche Sepharose-Trägermatrix gebunden. Es hat eine starke Bindungsaffinität zum konstanten Fc-Abschnitt speziell der IgG-Antikörper, mit geringerer Affinität bindet Protein A auch IgM- und IgA-Antikörper. Die Bindungskapazität dieser Säule wird bei vollständiger Sättigung mit 1,2 g Immunglobulin angegeben (29).

Tabelle 2: Adsorberarten für Immunglobulin-Adsorption von Plasma

Adsorbersäule	Gebrauch	Ligand	Trägermaterial	Hersteller
Immusorba TR-350	Einmalprodukt Nicht-regenerierbar	Tryptophan	Polyvinylalkohol	Asahi Kasei Medical, Tokio, Japan
Immusorba PH-350	Einmalprodukt Nicht-regenerierbar	Phenylalanin	Polyvinylalkohol	Asahi Kasei Medical, Tokio, Japan
TheraSorb®-Ig	Patientenbezogenes Mehrwegprodukt	Anti-Human IgG vom Schaf	Sepharose	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Immunosorba® PH-350	Patientenbezogenes Mehrwegprodukt, Regenerierbar während Behandlung, Einsatz als Doppeladsorber	Staphylokokken Protein A	Sepharose	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Globaffin®	Patientenbezogenes Mehrwegprodukt, Regenerierbar während Behandlung, Einsatz als Doppeladsorber	Synthetisches Peptid-GAM	Sepharose	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland
Ligasorb®	Einmalprodukt, Regenerierbar während Behandlung, Einzeladsorber	Rekombinantes Protein A	Polymethacrylat	Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland

Die Globaffin® Säule unterscheidet sich von der Immunosorba® PH-350 Säule nur in der Art ihres Liganden (**Tabelle 2**). Diese Säule enthält das synthetische Peptid GAM, welches eine hohe Affinität für humane Immunglobuline, vor allem IgG und Immunkomplexe zeigt (30).

Einen neuartigen Adsorbentyp stellt die im Jahr 2015 zugelassene Ligasorb® Säule dar.

1.4 Eigenschaften des Adsorbens Ligasorb®

Dieser Adsorber verwendet rekombinant hergestelltes Protein A als Liganden für Immunglobuline. Rekombinante Proteine sind biotechnologisch hergestellte Proteine, die mit Hilfe von gentechnisch veränderten Organismen oder speziellen Zellkulturen hergestellt wurden (31). Das Protein A ist kovalent an einer porösen Polymethacrylat-Matrix immobilisiert (**Abbildung 4**). Diese Ligand/Trägermaterialkombination wurde bislang in der Patientenbehandlung im Rahmen von IA nicht eingesetzt. Rekombinantes Protein A bindet humane Immunglobulin G (IgG)-Moleküle und Immunkomplexe. Die Bindungskapazität des Adsorbens wird unter Sättigungsbedingungen mit >2 g je Beladungszyklus angegeben (32).

Das Gehäuse besteht aus Polykarbonat und enthält zwei Anschlüsse für die Plasmazu- und -ausleitung. Der Adsorber ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt und als Einzelsäulensystem konzipiert. Pro Behandlung wird der Adsorber mehrfach regeneriert. Die maximale Plasmaflussrate über die Säule beträgt 30 ml/min (33).

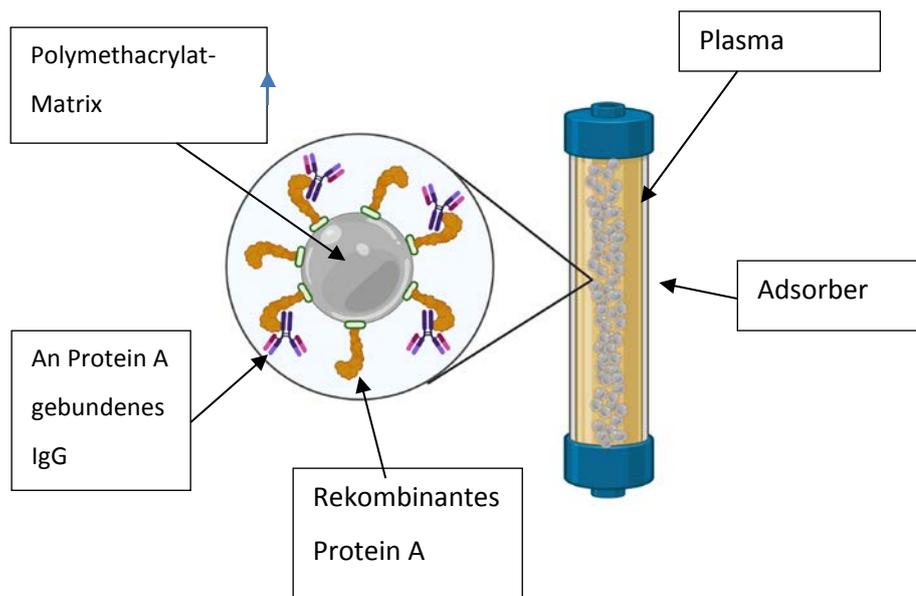


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Adsorbers Ligasorb®

(Abb. erstellt mit biorender.com)

Zur Verwendung dieses Säulentyps ist ein Zweitgerät notwendig, welches die Vorbereitung, die Beladung und die Regeneration steuert. Nach Erreichen der Plasmabeladungsobergrenze wird der Adsorber in mehreren Schritten regeneriert. Dabei wird zuerst das noch vorhandene Plasma mit Neutralpuffer abgeleitet, danach wird der Adsorber mittels Säureelution von gebundenen Substanzen gereinigt und anschließend wieder mit Neutralpuffer neutralisiert. Jeder Regenerationsschritt dauert ca. 10 Minuten. Während der Regenerationsphasen findet keine Plasmabehandlung statt, das ankommende Plasma wird über eine Bypass-Leitung unbehandelt direkt zum Patienten zurückgeführt.

1.5 Hintergrundinformationen zu ausgewählten Plasmaproteinen

Blutplasma besteht zu 90% aus Wasser, die restlichen Bestandteile sind gelöste Stoffe, wie z.B. Proteine, Elektrolyte, Lipide, Glucose und Harnstoff. Blutplasma

dient als Transportmedium und ist mit seinem hohen Proteingehalt wichtig für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes des Blutes (34). Humanes Blutplasma enthält eine Vielzahl von Proteinen. Ihr Gewichtsanteil liegt bei ca. 60 – 80 g/1000 ml Plasma. Die meisten Plasmaproteine werden in der Leber synthetisiert, Immunglobuline stammen von den B-Lymphozyten. Mit der Serumeiweiß-Elektrophorese können die Plasmaproteine entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften (Größe und elektrische Ladung der Proteine) in 5 Fraktionen aufgetrennt werden: Albuminfraktion, Alpha-1-Globulinfraktion, Alpha-2-Globulinfraktion, Beta-Globulinfraktion und die Gamma-Globulinfraktion. Viele der Plasmaproteine können gemäß ihrer Funktion folgenden Gruppen zugeordnet werden:

Transportproteine, Immunglobuline, Lipoproteine, Komplementkomponenten, Gerinnungsfaktoren, Fibrinolysefaktoren, Regulatorproteine und Hormone.

Die Hauptmenge des gesamten Plasmaproteinanteils wird von nur wenigen Proteinen verkörpert.

Albumin stellt mit 30-40 g/l den größten Plasmaproteinanteil dar und gehört funktionell zu den Transportproteinen (35). Die Albuminsynthese findet ausschließlich in den Hepatozyten statt und wird über den extravasalen kolloidosmotischen Druck reguliert. Etwa 10 % des intravasal vorhandenen Albumins wird pro Tag neu synthetisiert. Verglichen mit anderen Plasmaproteinen kann die Albuminsyntheserate nur wenig gesteigert werden (36).

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 40 Proteinen und ist Teil des menschlichen Immunsystems. Es trägt zur Eliminierung von zellulären Antigenen und Mikroorganismen bei (37). Die Proteine des Komplementsystems liegen zellgebunden und als inaktive Vorstufen im Blutplasma vor. Diese können über verschiedene Wege aktiviert werden (38). Zentraler Vorgang der Aktivierung ist immer die Spaltung des Komplementfaktors C3 in die Fragmente C3a und C3b. Beim klassischen Aktivierungsweg bindet die erste Komponente C1 an Antigen-Antikörper-Komplexe oder Pathogenoberflächen und löst damit den Ablauf der Komplementkaskade aus. Der alternative Aktivierungsweg kann durch

aktivierende (Fremd-)Oberflächen wie z.B. von Bakterien oder Pilzen erfolgen und ist antigenunspezifisch. Am Ende der Komplementkaskade wird der Membranangriffskomplex gebildet, was zur Lyse der Zielzelle führt. Außerdem stimuliert ein aktiviertes Komplementsystem indirekt proinflammatorische Reaktionen und erleichtert über die Opsonierung die Phagozytose.

Immunglobuline werden von den B-Lymphozyten gebildet (39), welche nach Antigenkontakt aktiviert werden und terminal zu Plasmazellen differenzieren. B-Lymphozyten gehören neben anderen zu den Zellen des Immunsystems. Sie entstehen durch Differenzierungsschritte aus hämatopoetischen Stammzellen. An ihrer Oberfläche tragen sie Immunglobuline als Rezeptoren für Antigene. In der Regel exprimiert der Lymphozyt nur einen Antikörper, welcher auch als lösliches Protein sezerniert wird. Diese Immunglobuline sind heterodimere Moleküle, die aus schweren und leichten Ketten bestehen (40). Die Grundeinheit der Immunglobuline ist ein Monomer, ein Molekül, das aus zwei leichten(L) und zwei schweren (H) Ketten besteht. L- und H-Kette haben jeweils am N-Terminus eine variable Region (Fab-Region), die die Antigenbindungsstelle bildet. Der konstante Teil der H-Kette (Fc-Region) ist für die Effektorfunktion des Antikörpers verantwortlich, z.B. die Bindung von Komplement oder Fc-Rezeptoren. Die Ketten werden über Disulfidbrücken zusammengehalten. Im Laufe der klonalen Expression des B-Lymphozyten nach Antigenkontakt kommt es in Interaktion mit T-Helferzellen zu einem irreversiblen Klassenwechsel des produzierten Immunglobulins. Immunglobuline liegen beim Menschen in folgenden Klassen und Subklassen (Isotypen) vor: IgM, IgD, IgG mit den Subklassen 1-4, IgA mit zwei Subklassen und IgE. Immunglobuline weisen unterschiedliche Serumkonzentrationen auf (**Tabelle 3**).

Als sezerniertes Produkt ist IgM meist ein Pentamer, das durch eine zusätzliche J-Kette kovalent zusammengehalten wird (**Abbildung 5**). Da IgM der Rezeptor der naiven B-Lymphozyten ist, tritt es im Verlauf der Immunantwort als erstes auf. Daher gilt spezifisches IgM als Indiz für eine Erstinfektion. Aufgrund der hohen Zahl an Antigenbindungsstellen pro Molekül ist ein einziges IgM-Molekül ausreichend, um Komplement zu aktivieren.

Tabelle 3: Serumkonzentrationen verschiedener Immunglobulinklassen

modifiziert nach (37)

Immunglobulinklasse	Serumkonzentration (mg/ml)
IgM	1,5
IgG1	8
IgG2	4
IgG3	0,8
IgG4	0,4
IgA1 und IgA2	3,5
IgD	0,03
IgE	0,0003

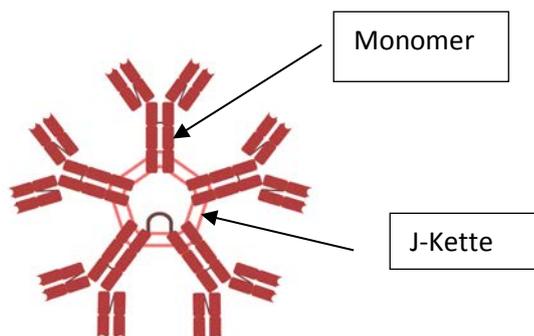


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines IgM-Moleküls

5 Monomere, die über eine J-Kette miteinander verbunden sind (Abb. erstellt mit biorender.com)

IgD ist nur in sehr geringen Mengen im Serum vorhanden, es ist v.a. membranständig auf bestimmten B-Lymphozyten zu finden. Die genaue Funktion ist noch nicht geklärt (41).

IgG (**Abbildung 6**) stellen im Serum 75% aller Immunglobuline dar. Die 4 Subklassen liegen in unterschiedlichen Konzentrationen vor (**Tabelle 3**) und unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften. IgG1 und IgG3 können effektiv das Komplementsystem aktivieren und binden gut an die hochaffinen Fc γ -Rezeptoren auf Makrophagen (42). IgG-Moleküle sind die einzigen Immunglobuline, die die Plazentaschranke überwinden können (43).

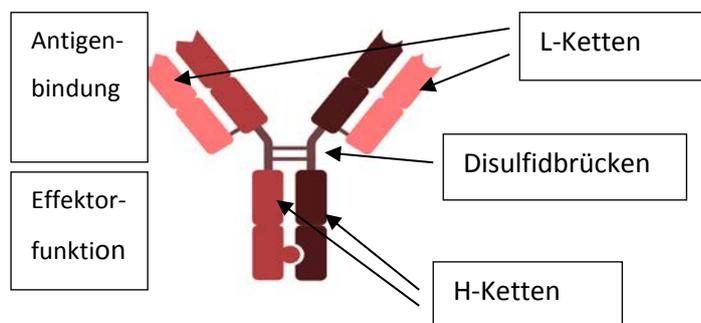


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls

Antigenbindungsstelle (Fab-Region), Effektorfunktion (Fc-Region), leichte (L-) und schwere (H-) Ketten (Abb. erstellt mit biorender.com)

IgA ist als zweithäufigstes Immunglobulin im Serum und in Sekreten vorhanden. Durch die Lokalisation auf den Schleimhäuten bildet IgA einen spezifischen lokalen Schutz vor Infektionen (37).

IgE ist nur in Spuren im Serum vorhanden. Dieses Immunglobulin spielt eine wesentliche Rolle bei der Abwehr von Parasiten und in der Pathogenese von allergischen Erkrankungen (37).

1.6 Das menschliche Blutgerinnungssystem

Das menschliche Blutgerinnungssystem stellt ein komplexes Wechselspiel zwischen pro- und antikoagulatorischen Komponenten dar (44). Unter dem Begriff der Hämostase werden alle Funktionen der Blutgerinnung zusammengefasst. Sowohl humorale als auch zelluläre Systeme tragen zur physiologischen Hämostase bei. Die primäre Hämostase basiert auf der Aktivierung von zirkulierenden Thrombozyten. Bei einer Gefäßverletzung kommt es durch die Freilegung von subendothelialer Matrix zur Thrombozytenadhäsion und zur Bindung des von Willebrand-Faktors. Die Aktivierung der Thrombozyten bewirkt eine Konformitätsänderung des Oberflächenglykoproteins IIb/IIIa, welches auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet wird. Durch die Bindung von Fibrinogen kommt es zur Formierung von Thrombozytenaggregaten. Über die im aktivierten Zustand negativ geladene Zellmembran der Thrombozyten kommt es zeitgleich zur Aktivierung der Kaskade der plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Durch dieses Zusammenspiel entsteht am Ende durch die Mitwirkung der Serinprotease Thrombin ein stabiles Fibringerinnsel (45).

Die plasmatische Gerinnung kann ebenso über die Freisetzung des Gewebefaktors (tissue factor) aktiviert werden. An diesen bindet aktivierter Faktor VII, was die weitere Aktivierung von Gerinnungsfaktoren in Gang setzt.

Die plasmatischen Gerinnungsfaktoren sind Glykoproteine, die im Blut als inaktive Proenzyme vorliegen und im Laufe des Gerinnungsprozesses in ihre aktive Form überführt werden.

Die Faktoren II, VII, IX und X werden in der Leber synthetisiert und müssen einen Vitamin K-abhängigen Carboxylierungsschritt durchlaufen, bevor sie funktionsfähig sind. Die Carboxylierung der Glutaminsäurereste dieser Gerinnungsfaktoren erlaubt die Bindung über Calcium an negativ geladene Zelloberflächen von Endothelzellen oder Thrombozyten (44).

Viele Schritte der plasmatischen Gerinnung sind von der Anwesenheit von Calciumionen abhängig. Sowohl bei der Aktivierung durch den tissue factor

(extrinsische Aktivierung) als auch bei der intrinsischen Aktivierung über den Faktor XII, sind Calciumionen notwendig.

1.7 Krankheitsbild Myasthenia gravis

Die Myasthenia gravis (MG) hat eine Inzidenz von 0,25-2/100000 Einwohner und beruht auf einer Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung (46).

Es handelt sich um eine Autoimmunerkrankung, die meist durch Autoantikörper vom Typ IgG1 und IgG3 gegen den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (AChR) an der neuromuskulären Synapse hervorgerufen wird (47). Bei manchen Subgruppen der Erkrankung können auch Antikörper gegen die muskelspezifische Tyrosinkinase (Anti-MuSK-Antikörper), Antikörper gegen LRP4 (low-density lipoprotein receptor-related protein 4) oder Antikörper gegen Agrin nachgewiesen werden (48, 49). Der Begriff der seronegativen MG sollte nur für Patienten verwendet werden, die keinen der genannten Antikörper aufweisen.

Die gebräuchlichste klinische Klassifikation der MG ist die der Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) (**Tabelle 4**), die auch als Orientierung für die aktuelle Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie dient.

Die Klassen II-IV lassen sich in 2 Subgruppen unterteilen. Bei der Subgruppe A sind v.a. die Extremitäten und/oder der Gliedergürtel betroffen, bei der Subgruppe B liegt eine besondere Beteiligung der oropharyngealen und/oder Atemmuskulatur vor.

Außerdem wird zwischen der MG mit frühem Beginn (< 45 Jahre, „early-onset“ MG, EOMG) und derjenigen mit spätem Beginn (> 45 Jahre, „late-onset“ MG, LOMG) unterschieden. Der häufigste Typ ist mit ca. 45% aller MG Fälle die LOMG. 10-15% der Patienten haben ein Thymom („Thymom-assoziierte“ MG, TAMG).

Die Myasthenie Krise stellt eine lebensbedrohliche Exazerbation der MG mit respiratorischer Insuffizienz dar.

Tabelle 4: Klinische Klassifikation der Myasthenia gravis

Modifiziert nach (50)

Klasse	Charakteristika
I	Rein okuläre Myasthenie, beschränkt auf äußere Augenmuskeln und Lidschluss
II	Leicht- bis mäßig generalisierte MG mit Einbeziehung anderer Muskelgruppen, oft einschließlich der Augenmuskeln
III	Mäßig generalisierte MG, oft einschließlich der Augenmuskeln
IV	Schwere generalisierte MG
V	Intubationsbedürftigkeit mit und ohne Beatmung

Therapeutisch kommen neben der medikamentösen Therapie der TPA, die IA und Immunglobuline zum Einsatz. Die medikamentöse Therapie beinhaltet v.a. Cholinesterase-Inhibitoren, Glukokortikosteroide sowie weitere Immunsuppressiva. Der TPA und die IA sind in der myasthenen Krise indiziert und werden als gleich wirksam betrachtet (51, 52). Diese Verfahren können auch zur Stabilisierung vor operativen Eingriffen angewandt werden.

1.8 Krankheitsbild Stiff-Person-Syndrom

Das Stiff-Person-Syndrom (SPS) ist eine seltene neurologische Erkrankung, die häufig bei Patienten mit autoimmuner Prädisposition auftritt. Frauen sind häufiger betroffen als Männer. In etwa 80 % der Fälle lassen sich Autoantikörper gegen die Glutamat-Dekarboxylase (GAD), in 15% der Fälle Autoantikörper gegen den Glycin-Rezeptor nachweisen (53). Weitere Autoantikörper gegen Proteine inhibitorischer Synapsen (Anti-Gephyrin, Anti-Amphiphysin) oder gegen regulatorische Proteine von Kaliumkanälen (Anti-Kalium-Kanal) sind nicht selten, oft treten diese auch im Rahmen einer Neoplasie auf (54). Kernsymptome der Erkrankung sind fluktuierende Rigidität und schmerzhaft einschießende Spasmen, meist sind der Rumpf und die Beine betroffen. Dazu können fakultativ noch weitere Symptome mit Gangstörungen, Skelettdeformierungen, adrenergen autonomen Dysregulationen, Schreckhaftigkeit oder Angststörungen hinzukommen.

Therapeutisch kommt neben der medikamentösen Therapie (Immunglobuline, Kortikosteroide, Immunsuppressiva) auch der TPA oder die IA zum Einsatz (55).

1.9 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Mit der Einführung von neuen Adsorbermaterialien für Immunadsorptionsverfahren stellt sich die Frage, ob die ausgelobte Leistungsfähigkeit erbracht wird und ob die Behandlungen unerwünschte Auswirkungen auf die Blutzusammensetzung oder Nebenwirkungen induzieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effektivität der Säulenbehandlungen mit dem neuen rekombinanten Protein A-basierten Adsorber Ligasorb® zu überprüfen. Dazu wurde im Patientenblut die Reduktionsrate der Immunglobulinkonzentrationen sowie der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörperkonzentrationen (bei seropositiven MG-Patienten) analysiert.

Zur Einschätzung des Sicherheitsprofils der Adsorbersäule, wurde die Auswirkung auf die zelluläre Blutzusammensetzung, auf relevante klinisch-chemische Parameter und auf Plasmaproteine im Patientenblut untersucht. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Untersuchung von Blutgerinnungsparametern gelegt, da Koagulopathien zu potenziell lebensgefährlichen Komplikationen (z.B. Blutungen oder Thrombosebildungen) führen können.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Patienten wurden über den Ablauf des Forschungsprojekts sowie über die Verwendung der Blutproben aufgeklärt. Sie willigten schriftlich in die Untersuchungen ein. Die Einhaltung der ethischen Grundsätze für medizinische Forschung am Menschen gemäß der Deklaration von Helsinki wurde stets gewährleistet. Das Forschungsvorhaben wurde von der lokalen Ethikkommission der Universität Würzburg geprüft und genehmigt (Ethikvotum Nr. 256/12).

2.2 Charakteristika des Patientenkollektivs

An der Studie nahmen insgesamt 4 weibliche und 3 männliche Patienten teil (**Tabelle 5**). Es handelt sich dabei um die ersten 7 Patienten, die nach Verfügbarkeit mit der Ligasorb® Säule an unserem Institut behandelt wurden. Insgesamt wurden 11 Behandlungen in die Auswertung einbezogen. Das initiale Ziel, mindestens 10 IA in die statistischen Berechnungen einschließen zu können, wurde somit erreicht. 6 Patienten waren wegen einer MG und eine Patientin mit SPS behandlungsbedürftig. Die häufigsten Krankheitssymptome der MG Patienten waren okuläre Störungen in Form von Doppelbildern und Ptosis, Schluck- und Sprachstörungen sowie allgemeine Muskelschwäche. Analog der klinischen MGFA Klassifikation (**Tabelle 4**) handelte es sich daher zum Zeitpunkt der IA um Klasse III MG. Die Patientin mit der Diagnose SPS litt rezidivierend unter schmerzhafter Verkrampfung der Skelettmuskulatur. Bei 5/6 Patienten mit der Diagnose MG konnte ein Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor nachgewiesen werden, eine Patientin hatte eine MuSK-Antikörper positive MG. Zum Zeitpunkt der durchgeführten IA handelte es sich in keinem Fall um die Erstdiagnose der Erkrankung. Alle Patienten mit MG erhielten bereits seit einiger Zeit eine leitliniengerechte immunsuppressive Basistherapie in Kombination mit einem Cholinesterase-Inhibitor. Die Patientin mit SPS erhielt als Dauermedikation Benzodiazepine und Opioid-Analgetika.

Tabelle 5: Patientencharakteristika

Bei den fett gedruckten/farbigen IA handelt es sich um die Immunadsorptionen, die in die Auswertung eingeflossen sind: n=11. AChR: Acetylcholinrezeptor, IA: Immunadsorption, m: männlich, MuSK: muskelspezifische Rezeptor-Tyrosinkinase, MG: Myasthenia gravis, SPS: Stiff-Person-Syndrom, TPA: Therapeutischer Plasmaaustausch, w: weiblich.

Patient	Alter/ Geschlecht	Diagnose	Hauptsymptome	Auto- antikörper gegen	Individuelles Behandlungsregime
1	22/w	MG	Ptosis, Schluckstörung, allgemeine Muskelschwäche	MuSK	IA-IA-IA- TPA-TPA
2	60/w	SPS	Verkrampfung der Skelettmuskulatur	-	IA-IA
3	31/w	MG	Doppelbilder, allgemeine Muskelschwäche	AChR	IA-TPA-IA
4	77/m	MG	Doppelbilder, Ptosis, Schluckstörungen, allgemeine Muskelschwäche	AChR	IA-IA
5	51/m	MG	Allgemeine Muskelschwäche, Doppelbilder	AChR	IA-IA-TPA
6	50/w	MG	Sprech- und Schluckstörung	AChR	IA-TPA- IA -TPA- TPA
7	72/m	MG	Sprech- und Schluckstörung	AChR	IA-IA-TPA-IA

Die Indikation zur IA wurde in allen Fällen aufgrund akuter Verschlechterung der bereits vordiagnostizierten und bis dato medikamentös behandelten Erkrankung gestellt. Eine Eskalation der immunmodulierenden Therapie brachte in den Akutsituationen keine ausreichende Symptomlinderung. Alle Patienten profitierten von den Immunadsorptionen, die meisten verspürten bereits nach der

ersten Behandlung eine Symptomlinderung. Bei allen Patienten wurden mindestens zwei IA durchgeführt, oft kombiniert mit TPA im Rahmen individueller Behandlungsregime. Die Festlegung der jeweiligen Behandlungsstrategie erfolgte interdisziplinär zusammen mit den betreuenden Kollegen der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg und war stets symptom- und patientenorientiert.

2.3 Praktische Durchführung der Immunadsorptionen

Die primäre Plasmaseparation wurde mit dem therapeutischen Apheresesystem Spectra Optia® der Firma Terumo BCT Europa NV (Garching bei München, Deutschland), Softwareversion 11.3 unter kontinuierlicher Zugabe von ACD-A (Antikoagulans Citrat Dextrose Lösung A, Terumo BCT) durchgeführt. Das ACD-A dient zur Antikoagulation und zur Inhibition der Komplement-Aktivierung. Die Auftrennung des Patientenvollblutes in die Bestandteile Zellsediment und Blutplasma erfolgt bei diesem Gerät über kontinuierliche Zentrifugation und optischer Detektionstechnologie. Von der Spectra Optia® wurde das separierte Patientenplasma dem universellen Sekundärsystem ADAorb® (medicap clinic GmbH, Ulrichstein, Deutschland, Softwareversion 3.00) zugeführt, welches mit der im Jahr 2015 zugelassenen Ligasorb® Säule der Firma Fresenius Medical Care bestückt worden war. Das Sekundärgerät steuert die Vorbereitung, die Beladung und die Regeneration des Adsorbers. Der Adsorber besteht aus einem Gehäuse aus Polycarbonat und enthält zwei integrierte Anschlüsse für die Plasmazuleitung und Ausleitung (**Abbildung 7**). Das Adsorbervolumen beträgt 137,5 ml. Die Adsorbensäule Ligasorb® enthält als Ligand rekombinantes Protein A, welches kovalent an einer porösen Polymethacrylat-Matrix immobilisiert ist. Protein A stammt ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums Staphylokokkus aureus und ist in der Lage den Fc-Abschnitt von Immunglobulinen zu binden. Die Bindungskapazität pro Zyklus wird vom Hersteller bei vollständiger Sättigung mit > 2 g IgG angegeben (33).

Die Patientenplasmavolumina wurden jeweils vor Behandlungsbeginn nach der Methode von *Sprenger et al.* berechnet (56). Die Kalkulation erfolgte abhängig vom Geschlecht, dem Körpergewicht in kg und dem Hämatokrit in %.



Abbildung 7: Ligasorb®-Säule vor der Anwendung

Foto: N. Schossee, mit freundlicher Genehmigung von Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland.

Die Säule ist zum einmaligen Gebrauch bestimmt, daher wurde sie am Behandlungsende verworfen. Während einer Behandlung wurde der Adsorber mehrmals regeneriert. Nach der Beladung der Säule mit 500-600 ml Plasmavolumen setzte die Regenerationsphase von ca. 10 Minuten Dauer ein. Während dieser Zeit wurde die Säule durch Modulation des pH-Wertes schrittweise von gebundenen Antikörpern und Immunkomplexen gereinigt, die dafür nötigen Spüllösungen wurden vorher am Sekundärsystem installiert. Die Spülflüssigkeit wurde während der Regenerationsphasen in einen Verwurfbeutel geleitet. Während der Regeneration fand keine Plasmabehandlung statt. Die Patienten erhielten periprozedural kontinuierlich intravenös niedrigdosierte Calciumlösung (0,37 %) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 30 ml/h über die Rückgabeleitung. Den Patienten werden durch die Antikoagulation mit Citrat

nicht dauerhaft Calciumionen entzogen. Nach Metabolisierung des Citrats in der Leber stehen sie dem Körper wieder zur Verfügung. Eine potentiell lebensbedrohliche schwere Hyperkalzämie $\geq 3,5$ mmol/l nach IA wird durch die niedrige Dosierung der Calciumsubstitution vermieden.

2.4 Dokumentation der Behandlungen

Die Dokumentation der einzelnen IA erfolgte jeweils auf einem Behandlungsprotokoll (**Abbildung 8**). Die in der Tabelle zu erfassenden Daten wurden ca. halbstündlich sowie bei Ereignissen eingetragen.

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg
Seite 1 von 1

Formular freigegeben am: 07.10.2019 längstens gültig bis: s. Intranet-QS-System

Behandlungsprotokoll Immunadsorption														
Vorbereitung Name:		Kontrolle (Geräte/Lsg.) Name:				letzte Behandlung: _____ Datum: _____								
Name, Vorname SAP-Etikett (Etikett 16)		Swisslab Auftrags-Nr.		HA 5% Chargen-Etikett mit Verfallsdatum			Prog. Vers. Nr.:		Gerätetyp: Optia		Geräte-ID-Nr.:		<input type="checkbox"/> Adasorb-ID-Nr.: <input type="checkbox"/> TR 350	
							Globaffin Säule 1		Charge:		Verfall:			
							Globaffin Säule 2		Charge:		Verfall:			
Diagnose:		Station:		Tel.-Nr.:		RR /mmHg		<input type="checkbox"/> Ligasorb <input type="checkbox"/> TR 350		Charge:		Verfall:		
Größe (cm):		Gewicht (kg):		GBV: ml		Puls /min		SpO2 %		Infusomat : 200 ml Calciumchlorid-Lösung 0,37 % <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein				
Zu beh. PLV (ml): Adasorb		GPLV: ml		Entnahmeseite: <input type="checkbox"/> Shaldon <input type="checkbox"/> Shunt <input type="checkbox"/> peripher venös			Dialysekannüle: <input type="checkbox"/> 16 G <input type="checkbox"/> 17 G		ACE-Hemmer: <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein					
Ladevolumen der Säule <input type="checkbox"/> 400 ml <input type="checkbox"/> 600 ml		<input type="checkbox"/> Ersteinsetz der Säulen <input type="checkbox"/> Folgeeinsetz		Rückgabeseite: <input type="checkbox"/> Shaldon <input type="checkbox"/> Shunt <input type="checkbox"/> peripher venös			Verweilkanüle: <input type="checkbox"/> 18 G <input type="checkbox"/> 20 G		ACD-A : 750 ml		Heparin Bolus iv.:			
Bemerkungen (Fib, Medikamente, etc.)									Heparin: IE					
									Substitution:ml Sterofundin	ml HA 5%			
Ankunft:		Entlassung:		Beginn Aph.:		Ende Aph.:		Patient hat Essen erhalten: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein		Patient hat Getränke erhalten: <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein				
Minuten nach Start	RR/ SpO2 %	Puls	Säulen-Nr.	Zyklen	Säulen-druck	AK	Einlass	Plasma	Ersetzen	Blut-/AK Verhältnis	Plasmafluss Adasorb	CaCl 0,37% ml/h	Bemerkungen:	
AK-Volumen (ml) :				Ersatzvolumen (ml):				RR /mmHg :		Besonderheiten:				
Verarb. Einlassvol. (VB+AK ml):				Verfahrensdauer (Min.):				Puls /min :		SpO2%:				
Entferntes Vol. (Plasma + AK) (ml): Optia				behandeltes Plasma (ml): Adasorb				Konservierung durchgeführt: <input type="checkbox"/> Ja						

Datum, Unterschrift Arzt

Unterschrift Operator

Abbildung 8: Behandlungsprotokoll Immunadsorption

2.5 Blutentnahme und Bestimmung der untersuchten Parameter

Vor Start der IA sowie innerhalb von 15 Minuten nach Behandlungsende wurden die notwendigen Blutproben aus einer oberflächlichen Armvene der Patienten entnommen und unmittelbar der Labordiagnostik zugeführt. Es wurden ausschließlich Entnahmeröhrchen der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Die Gerinnungsdiagnostik, die Zellzahlmessungen und die Bestimmungen der Parameter der Klinischen Chemie und Immunologie erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg.

Um eine adäquate Präanalytik zu gewährleisten, folgte die Probenverarbeitung den Vorgaben der Reagenzienhersteller für die verschiedenen Testmethoden.

Für die Gerinnungsdiagnostik wurden Entnahmeröhrchen verwendet, welche eine 3.2 % Tri-Natriumcitrat-Lösung enthielten. Die Bestimmungen wurden mit dem BCS® XP System (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Deutschland) und den entsprechenden Assays durchgeführt.

Für die Zellzahlmessungen wurden 1,6 mg/ml Ethylendiamintetraessigsäure Röhrchen (EDTA-Blut) am Analysengerät KX-21 N (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) eingesetzt.

Die Parameter der Klinischen Chemie und Immunologie wurden aus Serumgelröhrchen an Cobas®-Analysegeräten (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

Sowohl die Bestimmung der IgG-Subklassen 1-4 als auch die quantitative Messung der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper mittels spezifischem Radioimmunassay erfolgten aus Serum durch ein externes DAkkS akkreditiertes Labor (IMD Labor Berlin, Nicolaistraße 22, 12247 Berlin). Die verwendeten Serumgelröhrchen wurden unmittelbar nach der Blutentnahme zentrifugiert, das Serum abpipettiert, in Neutralröhrchen überführt und sofort bei -20°C tiefgefroren gelagert. Nach abgeschlossener Patientenrekrutierung wurden die Proben nach vorheriger Absprache mit dem IMD Labor in aufgetautem Zustand nach Berlin verschickt, wo sie 24 Stunden später eingetroffen sind und unmittelbar der Diagnostik zugeführt wurden.

2.6 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung- und Verarbeitung erfolgte in Microsoft Excel 2016. Die Statistik wurde mit Hilfe des GraphPad PRISM 7 Programms (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

Die Verteilung der Daten wurde anhand des Shapiro-Wilk Tests untersucht. Unterschiede zwischen Gruppen wurden durch ANOVA (one-way analysis of variance), gefolgt vom Tukey-Kramer post-hoc-Test, oder durch den gepaarten Student's t-Test ermittelt, $p < 0.01$ wurde als statistisch signifikant eingestuft.

Die schematischen Abbildungen wurden mit Hilfe von bioRender (Toronto, Kanada) erstellt (biorender.com).

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der durchgeführten Immunadsorptionsverfahren

Insgesamt wurden 11 IA mit der Ligasorb®-Säule in die Datenauswertung einbezogen (**Tabelle 6**). Da eine korrekte Präanalytik der zu untersuchenden Blutproben, wie z.B. unverzügliches Einfrieren oder direkte Analyse ohne Zwischenlagerung, nicht zu jeder Tageszeit gewährleistet werden konnte, mussten die anderen in Tabelle 5 dargestellten IA ausgeschlossen werden.

In 5 Fällen handelte es sich um Erstbehandlungen nach akuter Krankheitsverschlechterung, in 6 Fällen um Folgebehandlungen, welche in Abstimmung mit der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg im Rahmen individueller Behandlungsregime und abhängig von der klinischen Symptomatik durchgeführt wurden.

Im Durchschnitt wurde bei den IA über eine Behandlungsdauer von ca. 5 Stunden das 1,8-fache (5486 ml) der kalkulierten Patientenplasmen inklusive dem verabreichten Citrat prozessiert (**Tabelle 6**). Diese Vorgehensweise entspricht den Herstellerangaben, die die Prozessierung des bis zu 1,5-fachen reinen Plasmavolumens (ohne Citrat) über die Säule empfiehlt. Das zur notwendigen Antikoagulation verwendete Citrat belief sich auf über 1000 ml/ Behandlung. In

3/11 Behandlungen war periprozedural die zusätzliche Gabe einer geringen Dosis Heparin (1250 IE) aufgrund von Koagelbildung im Entnahmeschlauch notwendig.

Tabelle 6: Behandlungscharakteristika

min: Minuten, ml: Milliliter, SD: Standardabweichung, Tabelle übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

Anzahl der Behandlungen	11
Prozessiertes Plasmavolumen (ml) (Mittelwert \pm SD)	5486 \pm 744
Prozessiertes Plasmavolumen (inclusive Citrat) in Relation zum Patientenplasmavolumen % (Mittelwert \pm SD)	183 \pm 24.7
Citratvolumen (ml) (Mittelwert \pm SD)	1038 \pm 132
Behandlungsdauer(min) (Mittelwert \pm SD)	295 \pm 35.4
Art des Zugangs zentral /peripher	0/ 11
Unerwünschte Ereignisse	Keine

Alle 11 Behandlungen erfolgten über peripher-venöse Zugänge. Die IA konnten ohne technische Probleme durchgeführt werden. Es kam zu keinen unerwünschten Ereignissen während und bis zu 24 h nach den Behandlungen. Keiner der Patienten zeigte Zeichen einer allergischen Reaktion, ebenso kam es zu keinen Herz-Kreislauf- oder zentralnervösen Beschwerden. Alle Patienten wurden während der gesamten Behandlungszeit permanent pulsoxymetrisch

überwacht, es erfolgte außerdem eine kontinuierliche EKG-Aufzeichnung. Die überwachten Vitalparameter waren zu keinem Zeitpunkt pathologisch verändert. Eine speziell in Aphereseverfahren geschulte und erfahrene Krankenpflegekraft (Operator) war während der gesamten Behandlungszeit anwesend.

3.2 Auswirkungen der Behandlung auf die zelluläre Blutzusammensetzung

Bei 11 IA mit der Ligasorbsäule wurde jeweils vor und nach Behandlung ein kleines Blutbild bestimmt. Untersucht wurde der mögliche Einfluss der Prozeduren auf den Hämoglobinwert, die Erythrozytenzahl und deren mittleres korpuskuläres Volumen, die Leukozytenzahl sowie die Thrombozytenzahl im Patientenblut (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Einfluss der IA auf die zelluläre Blutzusammensetzung.

Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. *p < 0.01 (in Bezug zu „Vor IA“); n=11.

IA: Immunadsorption, m: männlich, w: weiblich, Tabelle übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

Parameter	Einheit	Normwert	Vor IA	Nach IA
Hämoglobin	g/dl	m: 14-18 w: 12-16	12.3±0.9	11.8±0.7
Erythrozyten	10 ⁶ /μl	m: 4-6 w: 4-5	4.0±0.4	3.8±0.3
Mittleres Erythrozytenvolumen	fl	m: 82-94 w: 82-96	92.0±5.2	91.8±5.8
Leukozyten	10 ³ /μl	5-10	7.0±2.4	7.3±2.8
Thrombozyten	10 ³ /μl	150-450	216±40	184±40*

Der Hämoglobinwert vor Behandlung betrug im Durchschnitt 12.3 ± 0.9 g/dl und wurde nach Behandlung mit 11.8 ± 0.7 g/dl nur geringfügig niedriger gemessen. Die Erythrozytenzahlen veränderten sich während den Behandlungen ebenfalls nicht wesentlich. Das erythrozytäre mittlere korpuskuläre Volumen blieb nach den Prozeduren nahezu unverändert. Die Leukozytenzahlen nach Behandlung differierten kaum zu den vor Behandlungsbeginn gemessenen Werten. Insbesondere war in keinem Fall nach IA eine Leukozytose zu beobachten, welche in der Gebrauchsanweisung/Packungsbeilage der Säule (57) als mögliche spezifische Nebenwirkung aufgeführt ist. Nach den Behandlungen lagen die Thrombozyten geringfügig niedriger, aber weiterhin im unteren Normbereich vor.

3.3 Einfluss der Immunadsorptionen auf klinisch-chemische Parameter

Die untersuchten klinisch-chemischen Parameter waren Natrium, Kalium, Chlorid, Gesamtcalcium, Anorganisches Phosphat, Kreatinin, Harnstoff und die Lactat-Dehydrogenase (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Einfluss der IA auf klinisch-chemische Parameter

Normwerte bezogen auf Serum, Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0.01$ (in Bezug zu „Vor IA“); $n=11$. IA: Immunadsorption, übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

Parameter	Einheit	Normwert	Vor IA	Nach IA
Natrium	mmol/l	135-145	140.8 ± 3.3	142.7 ± 2.7
Kalium	mmol/l	3.5-5.0	4.0 ± 0.4	3.7 ± 0.4
Chlorid	mmol/l	94-110	100.3 ± 2.6	101.2 ± 2.6

Gesamtcalcium	mmol/l	2.0-2.7	2.3±0.1	2.8±0.2*
Anorg. Phosphat	mmol/l	0.87-1.45	0.97±0.10	1.10±0.10*
Kreatinin	mg/dl	0-1.17	1.0±0.2	0.9±0.2*
Harnstoff	mg/dl	10-50	31.9±9.8	26.0±8.6*
Lactat-Dehydrogenase	U/l	< 250	173.7±26.3	154.5±18.6

Die Behandlungen mit dem Adsorber Ligasorb® hatten keinen relevanten Einfluss auf die Konzentrationen von Natrium, Kalium und Chlorid im Patientenserum.

Das gemessene freie Gesamtcalcium lag nach den Behandlungen in höherer Konzentration im Patientenserum vor, im Durchschnitt bei 2.8±0.2 mmol/l und somit über der oberen Normgrenze. Um eine zu starke systemische Verminderung des ionisierten Calciums durch die kontinuierliche Citrat-Zugabe während der IA zu verhindern, wird in den Rückgabeschlauch prophylaktisch eine niedrigdosierte Calciumlösung parallel zur Behandlung infundiert. Dies kann die geringfügig erhöhten Calciumwerte nach Behandlung erklären.

Keine klinisch relevanten Veränderungen waren bei der Bestimmung des Anorganischen Phosphats, des Kreatinins und der Harnstoffkonzentration zu verzeichnen (**Tabelle 8**).

Das Enzym Lactat-Dehydrogenase als ein wichtiger Hämolyseparameter wurde durch die Behandlungen nicht signifikant beeinflusst.

3.4 Auswirkung auf Immunglobuline und Plasmaproteine

Ziel der Behandlungen mit der Ligasorb®-Säule war in unserem Kollektiv die therapeutisch beabsichtigte Eliminierung von Immunglobulinen oder

Immunkomplexen bei Vorliegen von neurologischen Autoimmunerkrankungen. Untersucht wurden dabei die quantitative Veränderung der Immunglobulinklassen IgG mit Betrachtung der Subklassen IgG1 bis IgG4, sowie IgA und IgM. Bei den Myasthenie-Patienten mit Nachweis von Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpern (n = 5) wurde außerdem deren Konzentration vor und nach Behandlung bestimmt. Um einen möglichen weiteren Einfluss der Ligasorb®-Säule auf andere Plasmaproteine zu untersuchen, erfolgte eine Analyse der Plasmaproteine Gesamteiweiß, Albumin und der Komplementfaktoren C3 und C4.

3.4.1 Effiziente Reduktion der Immunglobuline vom Typ IgG

Tabelle 9: Immunglobulinkonzentrationen und Plasmaproteine vor und nach IA
Referenzbereiche bezogen auf Serum, Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardabweichung. *: p<0.001 (in Bezug zu „Vor IA“); n=11. #: p<0.01 (in Bezug zu „Vor IA“); n=8.

AChR-AK: Achetylcholinrezeptor-Autoantikörper, C3/C4: Komplementfaktoren 3 und 4, IA: Immunadsorption, Ig: Immunglobulin, m: männlich, w: weiblich. Tabelle übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Vor IA	Nach IA	Durchschnittliche Reduktion in %
IgG	mg/dl	690-1600	769±356	352±247	-58.9*
IgG1	mg/dl	280-800	391±184	153±113	-62.2*
IgG2	mg/dl	120-570	303±134	136±109	-57.9*
IgG3	mg/dl	24-125	54±28	36±22	-34.0*
IgG4	mg/dl	5-130	32±16	13±9	-63.5*
IgA	mg/dl	m: 88-410 w: 70-370	166±58	126±53	-24.7*

IgM	mg/dl	m: 34-210 w: 40-240	73±50	45±30	-38.8*
AChR-AK	nmol/l	<0.25	6.46±9.3	1.87±2.80	-70.3#
C3	mg/dl	75-140	81±14	68±12	-16.1*
C4	mg/dl	10-34	17.6±3.3	13.3±3.3	-26.0*
Gesamt-Eiweiß	g/dl	6.6-8.7	6.2±0.6	4.8±0.4	-22.0*
Albumin	g/dl	3.5-5.5	4.1±0.4	3.5±0.3	-14.7*

Die Behandlungen mit der Ligasorb®-Säule zeigten einen deutlichen Einfluss auf die Immunglobulin G-Konzentration im Patientenblut (**Tabelle 9**).

Nach den Behandlungen wurden im Durchschnitt um ca. 60% niedrigere Werte gemessen. Die Subklassen betrachtet, erreichten IgG1, IgG2 und IgG4 ähnliche prozentuale Reduktionen. Die Konzentration der Immunglobulin-Subklasse IgG3 wurde durchschnittlich um 34% verringert.

3.4.2 Wirksame Absenkung der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper Konzentration

Mit der Ligasorb®-Säule wurde eine deutliche Reduktion der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörperkonzentration im Patientenblut erreicht (**Abbildung 9**).

Unabhängig von der Höhe der Ausgangskonzentration (<1 nmol/l bis zu 27 nmol/l) lag die Konzentration des Acetylcholinrezeptor-Autoantikörpers nach Behandlung durchschnittlich um 70% niedriger vor und erreichte somit vergleichbare Reduktionsraten wie das Gesamt-IgG, IgG1, IgG2 und IgG4 (**Tabelle 9**).

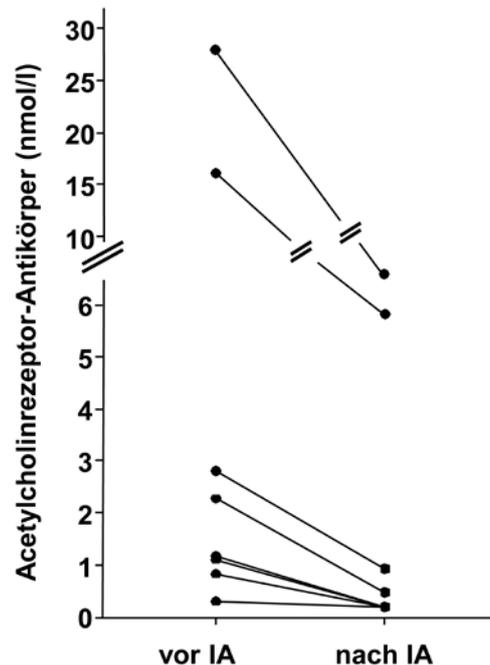


Abbildung 9: Acetylcholinrezeptor-Autoantikörperkonzentration vor und nach IA

IA: Immunadsorption, n=8, Abbildung übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

3.4.3 Auswirkungen der Behandlung auf Immunglobuline vom Typ IgM und IgA, Komplementfaktoren und Albumin

Die Absenkung der Immunglobuline der Klassen M und A betrug nach den IA 39 % bzw. 25% (**Tabelle 9**).

Zur Detektion einer möglichen Komplementaktivierung wurden die Komplementfaktoren C3 und C4 bestimmt (**Tabelle 9**). Die Konzentrationen lagen nach den IA 16% bzw. 26% niedriger vor. Das gemessene Gesamteiweiß und die Albuminkonzentration (**Tabelle 9**) im Patientenblut waren nach den Behandlungen geringfügig niedriger (22% bzw. 15%). **Abbildung 10** demonstriert die deutlich höheren prozentualen Reduktionen von Gesamt IgG, IgG1, IgG2, IgG4 und des Acetylcholinrezeptor-Antikörpers gegenüber IgG3, IgA, IgM, C3, C4, Gesamteiweiß und Albumin.

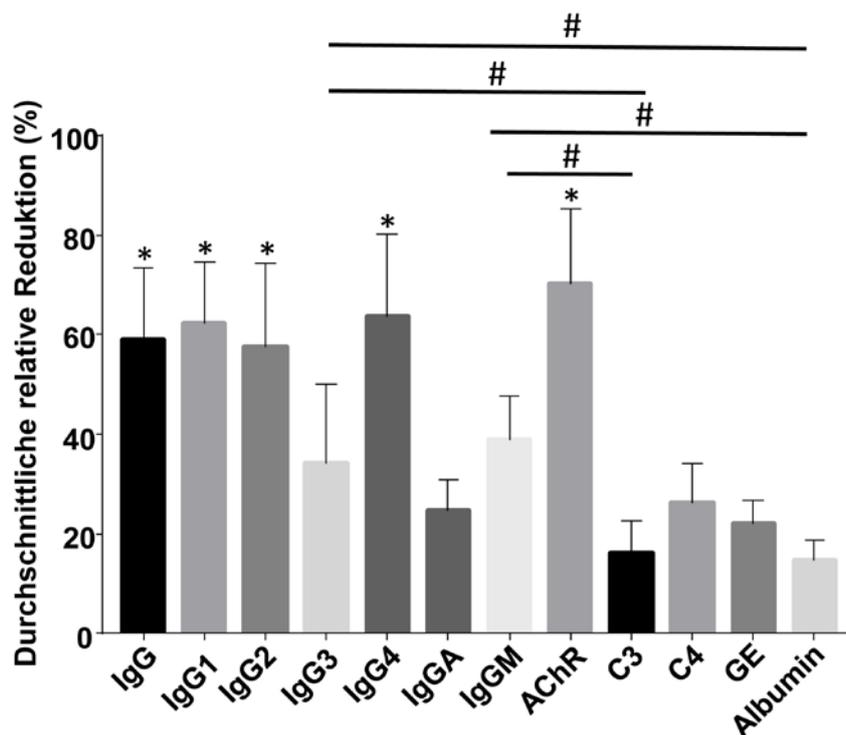


Abbildung 10: Reduktion der Plasmaproteine nach IA

Reduktion in % als Mittelwert in Bezug zum Vorwert, * $p < 0.01$ (im Vergleich zu IgG3, IgA, IgM, C3, C4, GE oder Albumin), # $p < 0.01$ (Vergleich wie mit durchgezogener Linie dargestellt), $n=11$. AChR: Antikörper gegen Acetylcholinrezeptor, C3 und C4: Komplementfaktor 3 und 4, GE: Gesamteiweiß, Ig: Immunglobulin, Abbildung übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

3.5 Einfluss der Immunadsorptionen auf die Blutgerinnung

3.5.1 Deutliche Veränderung der Gerinnungsglobaltests nach Behandlung

Um den Einfluss der IA auf die Blutgerinnung zu untersuchen, erfolgte zunächst die Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick (TPZ), der International Normalized Ratio (INR) und der Partiellen Thromboplastinzeit (PTT) jeweils vor und nach Behandlung (**Tabelle 10**).

Tabelle 10: Globaltests der Gerinnung vor und nach IA

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung. * $p < 0.001$ (in Bezug zu „Vor IA“); $n=11$.
IA: Immunadsorption, INR: International Normalized Ratio, PTT: Partielle Thromboplastinzeit, TPZ: Thromboplastinzeit n. Quick.

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Vor IA	Nach IA	Durchschnittliche Änderung in %
TPZ	%	70-130	89.5 \pm 15.8	44.7 \pm 7.1	-49.8*
INR	-	0.85-1.18	1.08 \pm 0.12	1.72 \pm 0.26	+59.1*
PTT	s	23-36	34.7 \pm 5.8	45.8 \pm 8.2	+32.7*

Nach den Behandlungen fiel eine durchschnittliche Reduktion der Thromboplastinzeit nach Quick von ca. 50% auf, die Werte lagen damit sämtlich außerhalb des Referenzbereichs. Die International Normalized Ratio zeigte nach den Behandlungen erhöhte Werte, im Schnitt erhöhte sich dieser Parameter von durchschnittlich 1.08 \pm 0.12 auf 1.72 \pm 0.26. Die Partielle Thromboplastinzeit war nach den Immunadsorptionen signifikant länger, durchschnittlich betrug sie nachher 45.8 \pm 8.2 Sekunden und war damit ca. 11 Sekunden länger als zu Behandlungsbeginn mit 34.7 \pm 5.8.

3.5.2 Antithrombin und D-Dimere zeigen nach Immunadsorption stabile Werte

Um eine mögliche, generelle Aktivierung der Blutgerinnung durch das IA-Verfahren feststellen zu können, wurden Antithrombin und D-Dimere bestimmt (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Antithrombin und D-Dimere vor und nach IA

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0.001$, in Bezug zu „Vor IA“, $n=11$.
IA: Immunadsorption.

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Vor IA	Nach IA	Durchschnittliche Reduktion in %
Antithrombin	%	75-125	97.6 \pm 9.9	81.5 \pm 8.1	-16.4*
D-Dimere	mg/l	0-0.5	0.35 \pm 0.15	0.40 \pm 0.19	---

Das Antithrombin wies nach den IA veränderte Werte auf, die einer Reduktion des Parameters um 16.4% entsprachen.

Die gemessenen D-Dimer-Werte lagen nach den Behandlungen weiterhin innerhalb des Referenzbereiches ≤ 0.5 mg/l.

3.5.3 Analyse der einzelnen Gerinnungsfaktoren zeigt deutliche Affektion der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X

Um die Ursache der deutlichen Veränderungen der Gerinnungsglobaltests besser zu verstehen, war daher die Bestimmung weiterer Gerinnungsfaktoren nötig. Vor und nach Behandlung wurden folgende Einzelfaktoren der Blutgerinnung analysiert: Fibrinogen (Faktor I), Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Faktor XII, Faktor XIII und der von Willebrand Faktor (als Aktivität, VWF:Ac, sowie als Antigen, VWF:Ag) (**Tabelle 12**).

Alle Gerinnungsfaktoren lagen nach den Behandlungen in unterschiedlichem Ausmaß im Patientenblut erniedrigt vor.

Die Faktoren II und X wiesen mit 67% und 66 % Reduktion die größte gemessene Differenz zwischen den Vor- und Nachwerten auf. Faktor VII war nach den Behandlungen im Durchschnitt ebenfalls ca. 50% reduziert messbar. Der Faktor

IX wies in den Nachwerten eine Reduktion von 42% auf. Somit ließ sich insgesamt postinterventionell eine deutliche Reduktion der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren verzeichnen, die in einem Bereich zwischen 67% und 42% lag.

Tabelle 12: Gerinnungsfaktoren vor und nach IA

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, *: $p < 0.001$, #: $p < 0.01$ in Bezug zu „Vor IA“, $n=11$. IA: Immunadsorption; VWF:Ac: von-Willebrand-Faktor Aktivität; VWF:Ag: von-Willebrand-Faktor Antigen, Tabelle übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

Parameter	Einheit	Referenzbereich	Vor IA	Nach IA	Durchschnittliche Reduktion in %
Fibrinogen (Clauss)	g/l	2.1-4	2.24 \pm 0.35	1.71 \pm 0.49	-24.9*
Faktor II	%	70-120	84.5 \pm 18.4	27.7 \pm 6.3	-66.8*
Faktor V	%	70-140	97.5 \pm 23.4	77.6 \pm 20.4	-20.2*
Faktor VII	%	70-120	90.2 \pm 12.5	44.4 \pm 8.3	-50.9*
Faktor VIII	%	50-175	166.7 \pm 59.7	126.9 \pm 65.0	-29.8#
Faktor IX	%	70-120	91.9 \pm 18.6	53.0 \pm 11.7	-42.3*
Faktor X	%	70-120	76.2 \pm 16.2	26.1 \pm 7.8	-65.9*
Faktor XI	%	70-120	90.3 \pm 17.0	69.1 \pm 4.7	-23.2*
Faktor XII	%	70-150	81.1 \pm 20.1	64.5 \pm 16.5	-20.3*
Faktor XIII	%	70-140	102.2 \pm 27.7	78.5 \pm 24.9	-23.5*
VWF:Ac	%	50-180	156.6 \pm 79.0	131.5 \pm 64.3	-15.3#
VWF:Ag	%	60-200	163.9 \pm 65.5	139.4 \pm 52.7	-14.4#

Die Gerinnungsfaktoren Faktor I (Fibrinogen), Faktor V, Faktor VIII, Faktor XI, Faktor XII und Faktor XIII lagen nach den Behandlungen um 20-30 % reduziert vor (**Tabelle 12**). Die gemessenen Nachwerte des von Willebrand-Faktors (Aktivität und Antigen) zeigten ebenfalls eine Reduktion von ca. 15%.

Abbildung 11 veranschaulicht die stärkeren Reduktionen der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X gegenüber den anderen Parametern.

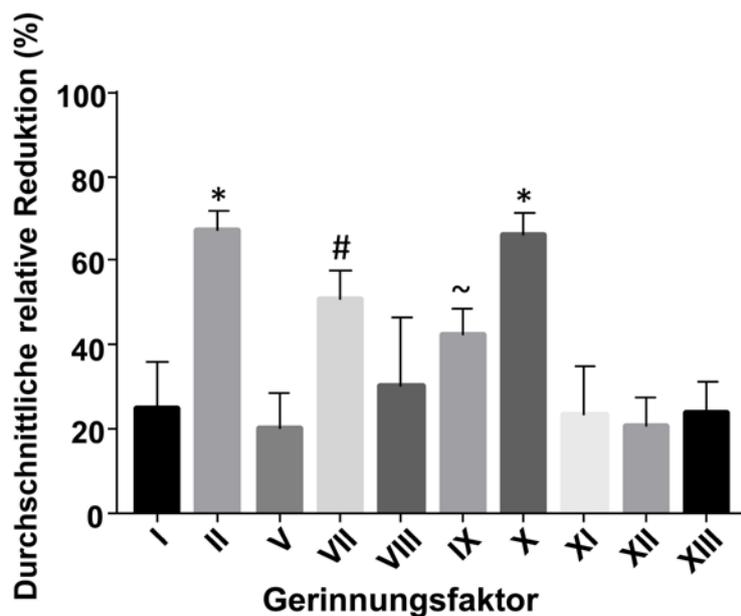


Abbildung 11: Reduktion der Gerinnungsfaktoren nach IA

in Bezug zu „Vor IA“, Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung, * $p < 0.01$ (im Vergleich zu allen Gerinnungsfaktoren außer Faktor II und X), # $p < 0.01$ (im Vergleich zu allen Gerinnungsfaktoren außer Faktor II, VII und X), ~ $p < 0.01$ (im Vergleich zu allen Gerinnungsfaktoren außer Faktor II, VII, IX und X), $n=11$, Abbildung übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

3.6 Regeneration der Blutgerinnungsparameter

innerhalb von 16 -20 Stunden nach Immunadsorption

Nachdem die Behandlungen mit der Ligasorb®-Säule zu deutlich veränderten Gerinnungsparametern geführt hatten, wurde der Frage nachgegangen, innerhalb welchen Zeitraumes sich die Blutgerinnungsparameter beim Patienten wieder weitgehend normalisieren würden. Für eventuell nachfolgend notwendige Eingriffe diagnostischer oder therapeutischer Art, die mit einem Blutungsrisiko einhergehen können, wie z. B. einer Lumbalpunktion, ist die Beantwortung dieser Fragestellung unerlässlich. Bei 6 Patienten erfolgte innerhalb von 16 - 20 Stunden nach abgeschlossener IA eine weitere IA. Zu Beginn der Folgeimmunadsorptionen wurden daher erneut Blutgerinnungsparameter bestimmt. Bei den Patienten lagen keine Hinweise für eine eingeschränkte Lebersyntheseleistung vor.

3.6.1 Weitgehende Normalisierung des Fibrinogens und der Gerinnungsglobaltests

16-20 Stunden nach IA waren die im Patientenblut gemessenen Fibrinogenwerte von durchschnittlich $1,75 \pm 0,56$ g/l unmittelbar nach IA auf $2,20 \pm 0,50$ g/l angestiegen (**Abbildung 12**).

Die nach IA deutlich veränderten Werte der Blutgerinnungsglobaltests waren nach 16-20 Stunden wieder weitgehend normalisiert. Die TPZ lag im Durchschnitt wieder bei $79 \pm 9,5$ % und somit im Normbereich. Der INR war mit dem Durchschnittswert $1,2 \pm 0,095$ annähernd normwertig. Die PTT normalisierte sich von $43,8 \pm 7,05$ auf $34,9 \pm 7,25$ Sekunden (**Abbildung 12**).

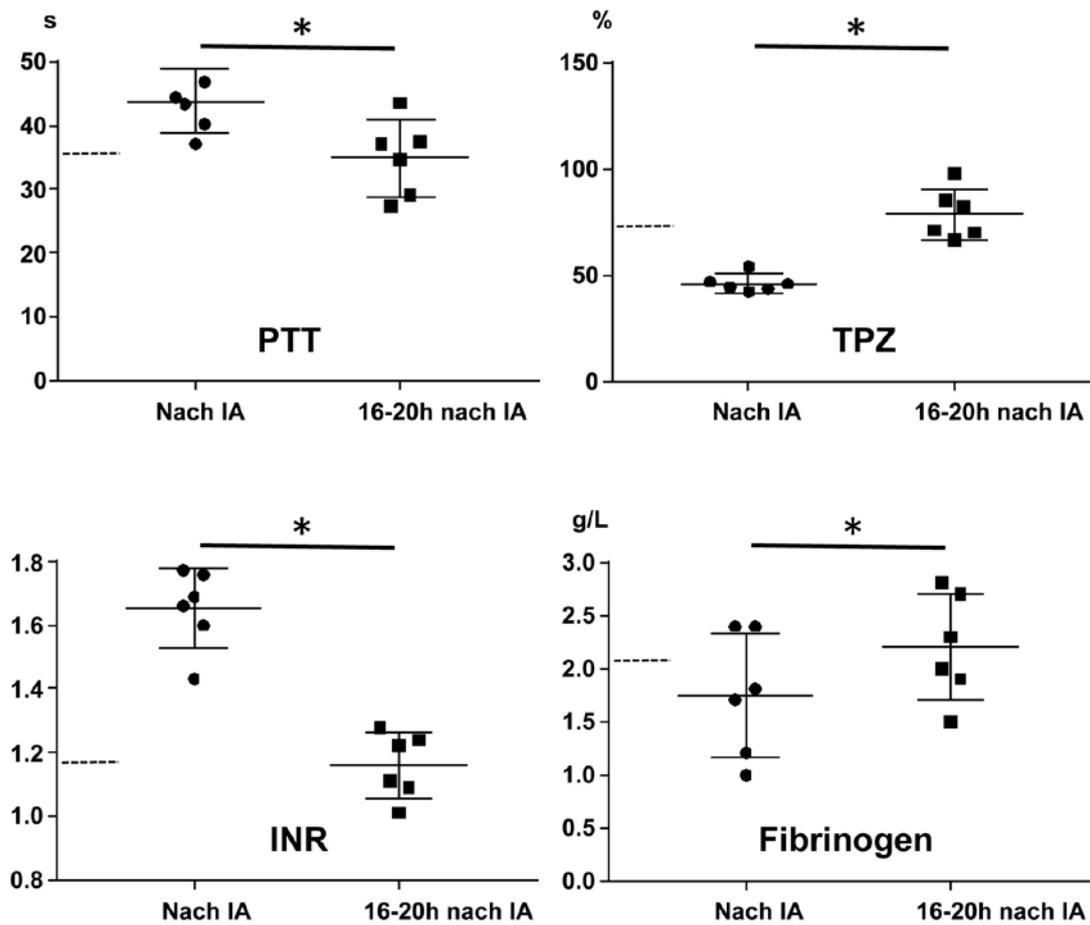


Abbildung 12: Regeneration von PTT, TPZ, INR und Fibrinogen

• und ▪ stellen die individuellen Werte der entsprechenden Gerinnungsparameter unmittelbar nach IA und 16-20h nach IA dar, gestrichelte Linie markiert den Referenzbereich, * $p < 0.01$, $n = 6$. h: Stunden, IA: Immunadsorption, INR: International Normalized Ratio, PTT: Partielle Thromboplastinzeit, TPZ: Thromboplastinzeit n. Quick, Abbildung übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

3.6.2 Fast vollständige Regeneration der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X erreichten 16-20 Stunden nach IA wieder annähernd Normwerte (**Abbildung 13**).

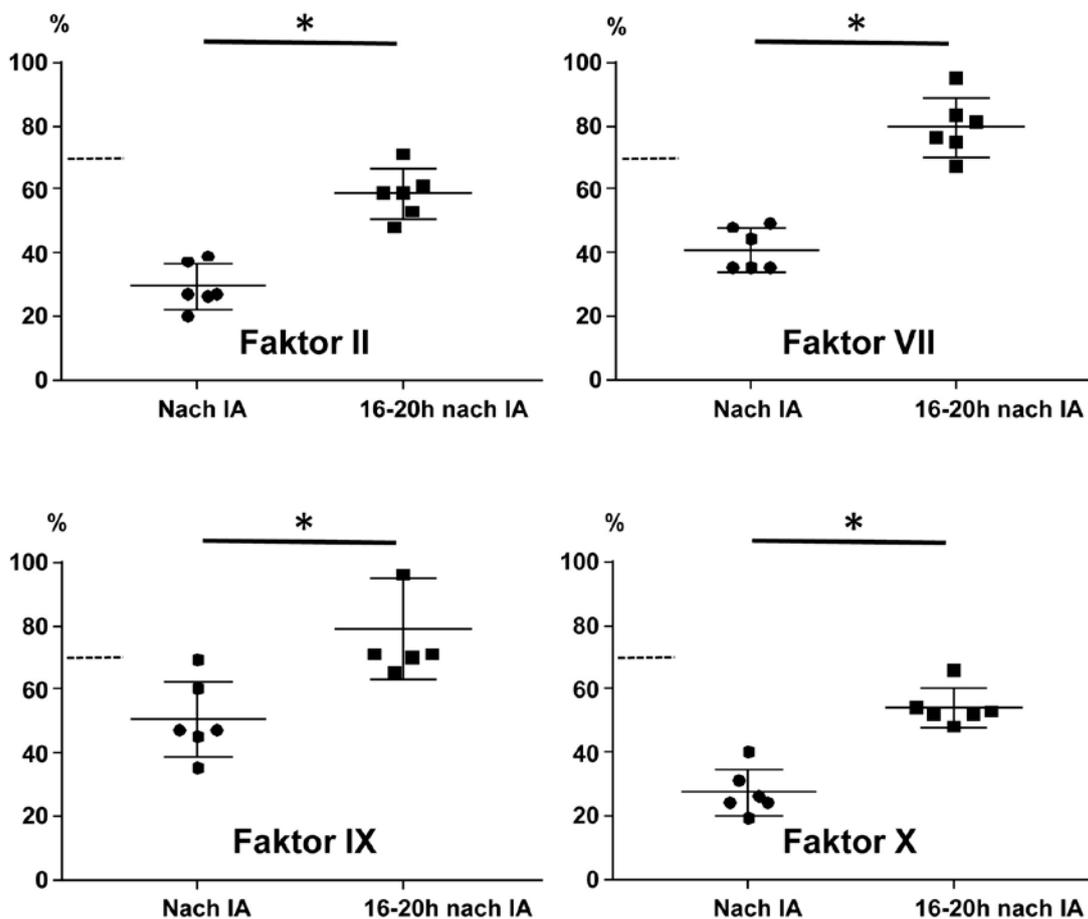


Abbildung 13: Regeneration der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

• und ▪ stellen die individuellen Werte der entsprechenden Gerinnungsparameter unmittelbar nach IA und 16-20h nach IA dar, gestrichelte Linie markiert den Referenzbereich, * $p < 0.01$, $n = 6$. h: Stunden, IA: Immunadsorption, INR: International Normalized Ratio, PTT: Partielle Thromboplastinzeit, TPZ: Thromboplastinzeit n. Quick, Abbildung übernommen aus (70) mit Erlaubnis des Wiley-Verlages.

Die Durchschnittswerte der Faktoren II und X verdoppelten sich 16-20 Stunden nach IA (59 % bzw. 54%) und erreichten somit nicht ganz den unteren Referenzbereich von 70%. Die Durchschnittswerte der Faktoren VII und IX erreichten mit 80 % bzw. 79% 16-20 Stunden nach IA wieder Normwertigkeit.

4. Diskussion

IA mit der Ligasorb®-Säule führen zu einer effektiven Abreicherung der Immunglobulin G Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4 sowie der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper im Patientenblut. Nach IA konnte eine relevante Reduktion der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X beobachtet werden.

4.1. Effektivität der Immunglobulin-Reduktion

Ein Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung der Effektivität der neuartigen regenerierbaren Adsorbersäule Ligasorb®. Es lag vor Beginn dieser Dissertationsarbeit zwar eine Studie zur Leistungsfähigkeit der Säule von *Süfke et al.* vor (32), allerdings wurden die Untersuchungen bei 11 gesunden Freiwilligen vorgenommen. Analysen unter Einbeziehung von Patientenkollektiven gab es bis dato daher nicht.

Die Adsorbersäule entfernt im Rahmen von IA sehr effizient Immunglobuline vom Typ IgG aus dem Patientenplasma. Die Reduktionsraten des Gesamt-IgG und der Subklassen IgG1, IgG2 und IgG4 bewegten sich nach einer einzigen Behandlung im Bereich von etwa 60 % (**Tabelle 9**). Zum gleichen Ergebnis kamen auch *Süfke et al.* (32). Die IA mit der Säule senkt die Konzentration der Acetylcholinrezeptor-Antikörper bei den seropositiven Myasthenia gravis Patienten auf über 70% des Ausgangswertes ab (**Tabelle 9**). Diese Absenkungskapazität ist vergleichbar mit der Tryptophanadsorbersäule Immusorba (58, 59). Im Gegensatz zur Adsorbersäule Immusorba TR-350, deren

Plasmabehandlungskapazität mit ca. 2200 ml begrenzt ist (58, 59), wurden bei den IA im Schnitt 5500 ml Plasma unter Ausschöpfung der oberen Grenze des 1,5-fachen Patientenplasmavolumens prozessiert, da die Adsorbersäule Ligasorb® durch ihre Regenerierbarkeit für die Behandlung größerer Plasmavolumina konzipiert ist. Daher sind die Reduktionsraten der Ligasorb® und der Immusorba TR-350 aufgrund der ungleichen Plasmabehandlungsmenge nicht direkt miteinander vergleichbar. Die Tryptophansäule erreicht bei deutlich weniger behandeltem Plasmavolumen die gleiche Reduktionsrate. Dies könnte an einer höheren Bindungskapazität der Antikörper an den Liganden Tryptophan liegen. Auf der anderen Seite wurde die Absenkungskapazität nach Behandlung von ca. 2000 ml Plasma mit der Ligasorb®-Säule, analog zur Tryptophansäule, nicht untersucht. Mit fortlaufender IA ist dabei auch zu berücksichtigen, dass Reduktionskurven einen asymptotischen Verlauf annehmen (60), d. h. IA werden mit zunehmenden Volumen an behandeltem Plasma stets ineffektiver.

4.2 Kein Einfluss der IA auf zelluläre Blutbestandteile, klinisch-chemische Parameter und weitere Plasmaproteine

Neben der Effektivität wurde untersucht, ob die Behandlungen auch quantitativen Einfluss auf zelluläre Blutbestandteile, klinisch-chemische Parameter und weitere Plasmaproteine ausüben.

Die IA hatten keinen relevanten Einfluss auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut. Passagere Leukozytenerhöhungen während und/oder nach IA sind von anderen Säulentypen als Nebenwirkung bekannt (61). Lediglich die Thrombozytenzahl nahm nach IA leicht erniedrigte Werte an, was z.B. auf einen moderaten Verbrauch der Thrombozyten bei Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen hindeuten könnte.

Die geringfügig veränderten Albuminwerte nach IA von etwa -15% sind am ehesten auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen. Im Durchschnitt erhielten alle Patienten während einer Behandlung etwas mehr als 1000 ml Citratlösung. als Antikoagulans intravenös verabreicht. Passend dazu konnte *Benny et al.* für

Protein A Säulen zeigen, dass es zu keiner relevanten Albuminabsenkung im Patientenblut kommt (62). Auch für den Einsatz der Tryptophansäule ist bekannt, dass Albuminspiegel nicht wesentlich verändert werden (63). Auch die Reduktion der Serumproteine C3 und C4 als Faktoren des Komplementsystems von 16% bzw. 26% kann am ehesten auf einen Verdünnungseffekt zurückgeführt werden. Allerdings kann auch eine geringe periprozedurale Komplementaktivierung nicht ausgeschlossen werden.

Das Enzym Lactat-Dehydrogenase als ein Zellzerfallparameter blieb im untersuchten Kollektiv nach IA unverändert, wodurch keine Hinweise auf eine Hämolyse vorliegen.

Das gemessene Gesamtcalcium wurde nach IA mit 2,8 mmol/l höher gemessen als vor Start (2,3 mmol/l). Diese Hyperkalzämie kann auf die kontinuierliche niedrigdosierte Calciumzufuhr während der IA zurückgeführt werden. Durch diese prophylaktische Gabe können Calciummangelerscheinungen während der Behandlung vorgebeugt werden.

4.3 Stabile Fibrinogenwerte

Da ein extrakorporaler Kreislauf nur unter Antikoagulation zur Unterdrückung einer Gerinnungsaktivierung durchführbar ist, sind durch eine IA induzierte Veränderungen auf Gerinnungsparameter von besonderem Interesse, um das Risiko für Blutungskomplikationen abschätzen zu können. Der große Vorteil der IA gegenüber dem TPA sei hier erwähnt. Da bei dem TPA nahezu die gesamte Plasmafraktion verworfen wird, ist die Beeinflussung der Blutgerinnung, falls kein Frischplasma als Ersatzlösung verwendet wird, ein limitierender Faktor bei der Festlegung der Therapieintervalle. Auch der Einsatz mancher Adsorbersäulen kann trotz Rückführung des behandelten Plasmas zum Patienten eine relevante Fibrinogenreduktion im Patientenblut nach IA auslösen (64, 65). Bei der Tryptophansäule scheint das Fibrinogen hydrophobe und elektrostatische Bindungen mit dem Indolring einzugehen, die zu einer Fibrinogenreduktion nach IA führen können (66). Nach IA mit der Ligasorb®-Säule konnte eine

Fibrinogenreduktion von etwa 25% beobachtet werden, die entweder mit der periprozeduralen Blutverdünnung und/oder mit einem leichten Fibrinogenverbrauch durch Gerinnungsaktivierung im extrakorporalen Kreislauf erklärt werden kann. Die Werte des Fibrinogens nach IA lagen alle deutlich über 1g/l, so dass die Fibrinogenreduktion alleine nicht auf eine wesentliche Hämostaseeinschränkung hinweist. Die Kollegen *Süfke et al.* konnten in ihrer Studie an gesunden Freiwilligen eine vergleichbare Fibrinogenreduktionsrate von 17% feststellen (32). Auch andere Adsorber, die als Liganden Protein A oder das Oligopeptid GAM 146 enthalten, haben nur einen geringen Einfluss auf die Fibrinogenwerte nach IA (67).

4.4 Deutliche Reduktion der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Nach den IA fiel bei allen Patienten eine relevante Veränderung der Gerinnungsglobaltests Quick, INR und PTT auf. In der Einzelfaktoranalyse zeigte sich, dass die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, deren Synthese Vitamin K-abhängig ist, Reduktionsraten von 40% - 70% nach IA aufwiesen. Alle anderen Gerinnungsfaktoren lagen lediglich zu etwa 20% vermindert vor, was wiederum mit der periprozeduralen Blutverdünnung erklärt werden kann. Vorstellbar ist eine direkte Interaktion der Gerinnungsfaktoren mit dem Adsorber aus rekombinantem Protein A und/oder der Polymethacrylat-Matrix (**Abbildung 4**). Typischerweise besitzen die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren Glutaminsäurereste an ihrem N-terminalen Ende, aus denen im letzten Schritt ihrer Synthese durch das Enzym Carboxylase γ -Carboxyglutaminsäurereste entstehen (44, 45), die eine Interaktion begünstigen könnten. Der Einsatz eines Endotoxinadsorbers, dessen Matrix auch aus Polymethacrylat besteht, führte ebenfalls zu einer Verlängerung der PTT (68). Es ist auch denkbar, dass andere Faktoren wie das verwendete Citrat als Antikoagulans, der pH-Wert des Blutes oder die Calciumionenkonzentration zu diesem Phänomen beitragen (69). In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung des Einflusses der Ligasorb®-

Säule auf weitere Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren wie z.B. den Proteinen C und S für Apherese durchführende Einheiten von Bedeutung.

Der nachgewiesene Effekt auf die Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X ist für die Patientenversorgung im Rahmen von IA mit der Ligasorb®-Säule von erheblicher Relevanz, z.B. muss die Hämostaseeinschränkung für eventuelle Folgeprozeduren mit potentiellm Blutungsrisiko, wie z.B. einer Lumbalpunktion, unbedingt berücksichtigt werden. Da eine nahezu vollständige Regeneration der Gerinnungsparameter innerhalb von 16-20 Stunden nach IA beobachtet werden konnte, sollte vor Durchführung invasiver und/oder mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergehender Prozeduren zumindest dieser Zeitabstand nach IA eingehalten werden. Vor Folgeeingriffen mit Blutungsrisiko sollte sinnvollerweise eine Kontrolle von TPZ und PTT erfolgen, vor allem bei Einschränkungen der Leberfunktion, die die Regeneration der Gerinnungsparameter verzögern könnten.

4.5 Praktikabilität des Verfahrens

Abgesehen von dem Einfluss auf die Blutgerinnung wiesen die Behandlungen mit der Ligasorb®-Säule ein gutes Sicherheitsprofil auf. Alle 11 Behandlungen wurden ohne klinische Komplikationen durchgeführt. Es traten auch keine technischen Probleme auf.

Abhängig von der Menge des prozessierten Plasmavolumens kann eine Behandlung eine mehrstündige Zeitdauer in Anspruch nehmen, verbunden mit entsprechender Personalbindung und Belastung der Patienten. Das Prinzip der regenerierbaren Säule im Einzelsäulenverfahren stellt sich dabei als Nachteil dar, da in den Phasen der Säulenregeneration keine Plasmabehandlung stattfindet und sich damit die Behandlung verlängert. Eine Konzeption der Säule als Doppeladsorber könnte diesbezüglich Abhilfe schaffen, allerdings hätte diese Veränderung vermutlich auch erhöhte Behandlungskosten zur Folge, da hierfür zwei Adsorber pro Behandlung notwendig sind.

Tabelle 13 fasst das Leistungsprofil und die Nachteile der Ligasorb®-Säule zusammen.

Tabelle 13 Zusammenfassung Leistungsprofil und Nachteile der Ligasorb®-Säule

Leistungsprofil	Nachteile
Effektive Absenkung von IgG und Acetylcholinrezeptor-Antikörpern	Lange Behandlungsdauer durch Einzelsäulenkonzept
Keine relevante Reduktion von Fibrinogen	Relevanter Einfluss auf Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren
Gutes Sicherheitsprofil	Hohe Citratbelastung aufgrund der langen Behandlungszeit
Durch Regenerierbarkeit Behandlung großer Plasmavolumina möglich	

4.6 Einschränkungen der Studie und Ausblick

Das Patientenkollektiv besteht aus 7 Patienten und es konnten 11 Behandlungen in die Auswertung einbezogen werden. Trotz einheitlicher Ergebnisse wäre eine Überprüfung der Kernaussagen der Arbeit an einer größeren Patientenfallzahl wünschenswert.

Auch ist die Erfassung seltener Nebenwirkungen sicherlich nur in größeren Patientenkollektiven möglich.

Es wurde nur eine Auswahl an Parametern mit dem Schwerpunkt Gerinnung untersucht. Mögliche Auswirkungen der Behandlung mit der eingesetzten Säule beispielsweise auf zelluläre Funktionen (qualitativer Einfluss auf Leukozytenpopulationen) wären gerade auch bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen ebenfalls von Interesse.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Effektivität und mögliche Einflüsse der Immunadsorption mit der auf rekombinatem Protein A-basierter Einmalsäule Ligasorb® auf bestimmte Blutparameter bei einer Kohorte von neurologischen Patienten mit Myasthenia gravis oder Stiff-Person-Syndrom evaluiert.

Die IA mit der Ligasorb®-Säule senkte effizient die Immunglobulinkonzentrationen IgG1, IgG2 und IgG4 im Patientenblut. Die durchschnittliche Reduktion dieser Plasmaproteine betrug 60%. Die Reduktionsrate der Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper der MG Patienten lag bei 70% nach IA. Die Blutkonzentrationen der Serumproteine wie Albumin oder der Komplementfaktoren C3 und C4 wurden durch die IA nicht wesentlich beeinflusst. Die IA zeigten auch keine klinisch relevanten Auswirkungen auf die zelluläre Blutzusammensetzung, insbesondere wurden keine Leukozytosen beobachtet.

Die IA hatten außerdem keinen relevanten Einfluss auf die untersuchten klinisch-chemischen Parameter.

Nach den IA konnte aber eine relevante Störung der Hämostaseparameter festgestellt werden. Die Globaltests Quick, INR und PTT zeigten nach Behandlung deutlich pathologische Werte. Die nachfolgende Einzelfaktorbestimmung ergab Verminderungen der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X um 42% bis 67%, die z.B. auf einer direkten Interaktion dieser Faktoren mit der Adsorbermatrix und/oder dem Liganden aus rekombinatem Protein A beruhen könnten. Nach 16 bis 20 Stunden zeigten sich die abweichenden Gerinnungsparameter wieder weitgehend normalisiert. Das Einhalten eines entsprechenden Zeitabstands bis zur Durchführung anderer medizinischer Eingriffe, wie z.B. einer Lumbalpunktion, sowie eine vorherige Kontrolle der Globaltests TPZ und PTT sind daher anzuraten.

6. Literaturverzeichnis

1. Kambic HE, Nose Y. Historical perspective on plasmapheresis. *Ther Apher*. 1997;1(1):83-108.
2. Schroder A, Linker RA, Gold R. Plasmapheresis for neurological disorders. *Expert Rev Neurother*. 2009;9(9):1331-9.
3. Gurland HJ, Samtleben W. [Clinical application and the technical procedure of plasmapheresis]. *Internist (Berl)*. 1983;24(1):14-26.
4. Shumak KH, Rock GA. Therapeutic plasma exchange. *N Engl J Med*. 1984;310(12):762-71.
5. Agishi T, Kaneko I, Hasuo Y, Hayasaka Y, Sanaka T, Ota K, et al. Double filtration plasmapheresis. 1980. *Ther Apher*. 2000;4(1):29-33.
6. Lee G, Arepally GM. Anticoagulation techniques in apheresis: from heparin to citrate and beyond. *J Clin Apher*. 2012;27(3):117-25.
7. Shunkwiler SM, Pham HP, Wool G, Ipe TS, Fang DC, Biller E, et al. The management of anticoagulation in patients undergoing therapeutic plasma exchange: A concise review. *J Clin Apher*. 2018;33(3):371-9.
8. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. 2010(4. Auflage):S. 459.
9. Onishi A, St Ange K, Dordick JS, Linhardt RJ. Heparin and anticoagulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21(7):1372-92.
10. Kaplan A. Complications of apheresis. *Semin Dial*. 2012;25(2):152-8.
11. Weinstein R. Hypocalcemic toxicity and atypical reactions in therapeutic plasma exchange. *J Clin Apher*. 2001;16(4):210-1.
12. Pepe J, Colangelo L, Biamonte F, Sonato C, Danese VC, Cecchetti V, et al. Diagnosis and management of hypocalcemia. *Endocrine*. 2020;69(3):485-95.
13. Geerts W. Central venous catheter-related thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):306-11.
14. Golestaneh L, Mokrzycki MH. Vascular access in therapeutic apheresis: update 2013. *J Clin Apher*. 2013;28(1):64-72.
15. Garraud O, Coppo P. Types of fresh plasma with focus on therapeutic plasma exchange. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(3):258-61.
16. Sica DA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors side effects--physiologic and non-physiologic considerations. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2004;6(7):410-6.
17. Standard der Therapeutischen Apherese der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie e.V. 2019:S.9.
18. Maitta RW. Current state of apheresis technology and its applications. *Transfus Apher Sci*. 2018;57(5):606-13.
19. Choi MH, Choe YH, Park Y, Nah H, Kim S, Jeong SH, et al. The effect of therapeutic leukapheresis on early complications and outcomes in patients with acute leukemia and hyperleukocytosis: a propensity score-matched study. *Transfusion*. 2018;58(1):208-16.
20. Schwab PJ, Fahey JL. Treatment of Waldenstrom's macroglobulinemia by plasmapheresis. *N Engl J Med*. 1960;263:574-9.
21. Querol L, Lleixa C. Novel Immunological and Therapeutic Insights in Guillain-Barre Syndrome and CIDP. *Neurotherapeutics*. 2021;18(4):2222-35.
22. Zheng XL, Vesely SK, Cataland SR, Coppo P, Geldziler B, Iorio A, et al. ISTH guidelines for treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*. 2020;18(10):2496-502.
23. McLeod BC. Plasma and plasma derivatives in therapeutic plasmapheresis. *Transfusion*. 2012;52 Suppl 1:38S-44S.
24. Fernandez-Zarzoso M, Gomez-Segui I, de la Rubia J. Therapeutic plasma exchange: Review of current indications. *Transfus Apher Sci*. 2019;58(3):247-53.

25. Padmanabhan A, Connelly-Smith L, Aqui N, Balogun RA, Klingel R, Meyer E, et al. Guidelines on the Use of Therapeutic Apheresis in Clinical Practice - Evidence-Based Approach from the Writing Committee of the American Society for Apheresis: The Eighth Special Issue. *J Clin Apher.* 2019;34(3):171-354.
26. Sanchez AP, Cunard R, Ward DM. The selective therapeutic apheresis procedures. *J Clin Apher.* 2013;28(1):20-9.
27. Hirata N, Kuriyama T, Yamawaki N. Immusorba TR and PH. *Ther Apher Dial.* 2003;7(1):85-90.
28. Koll RA. Ig-Therasorb immunoadsorption for selective removal of human immunoglobulins in diseases associated with pathogenic antibodies of all classes and IgG subclasses, immune complexes, and fragments of immunoglobulins. *Ther Apher.* 1998;2(2):147-52.
29. Fresenius. Immunosorba®. <https://www.freseniusmedicalcare.com/de/medizinisches-fachpersonal/therapeutische-apherese/immunapherese/immunosorba> (Zugang: 15072022).
30. Fuchs K, Rummeler S, Ries W, Helmschrott M, Selbach J, Ernst F, et al. Performance, clinical effectiveness, and safety of immunoadsorption in a wide range of indications. *Ther Apher Dial.* 2022;26(1):229-41.
31. Burnouf T. Recombinant plasma proteins. *Vox Sang.* 2011;100(1):68-83.
32. Sufke S, Lehnert H, Uhlenbusch-Korwer I, Gebauer F. Safety Aspects of Immunoadsorption in IgG Removal Using a Single-Use, Multiple-pass Protein A Immunoadsorber (LIGASORB): Clinical Investigation in Healthy Volunteers. *Ther Apher Dial.* 2017;21(4):405-13.
33. Fresenius. Ligasorb®. <https://www.freseniusmedicalcarech/de-ch/medizinisches-fachpersonal/therapeutische-apherese/produkte/ligasorb> (Zugang 15072022).
34. Haupt H. [Chemistry and clinical significance of human plasma proteins]. *Behring Inst Mitt.* 1990(86):1-66.
35. Thadikkaran L, Siegenthaler MA, Crettaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD. Recent advances in blood-related proteomics. *Proteomics.* 2005;5(12):3019-34.
36. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis. *Int Rev Physiol.* 1980;21:249-74.
37. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie.* 2010(4. Auflage):S. 70.
38. Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clin Lab Med.* 2019;39(4):579-90.
39. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie.* 2010(4. Auflage):S. 67 -70.
40. Nezlin R. Dynamic Aspects of the Immunoglobulin Structure. *Immunol Invest.* 2019;48(8):771-80.
41. Edholm ES, Bengten E, Wilson M. Insights into the function of IgD. *Dev Comp Immunol.* 2011;35(12):1309-16.
42. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie.* 2010;4. Auflage:S.69.
43. Palmeira P, Quinello C, Silveira-Lessa AL, Zago CA, Carneiro-Sampaio M. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:985646.
44. Barthels M. vDM. *Das Gerinnungskompodium.* 2003. Georg Thieme Verlag.
45. Furie B, Furie BC. Molecular and cellular biology of blood coagulation. *N Engl J Med.* 1992;326(12):800-6.
46. Carr AS, Cardwell CR, McCarron PO, McConville J. A systematic review of population based epidemiological studies in Myasthenia Gravis. *BMC Neurol.* 2010;10:46.
47. al. Se. Advances in autoimmune myasthenia gravis management. *Expert Rev Neurother* 2018 Jul;18(7):573-588.
48. Higuchi O, Hamuro J, Motomura M, Yamanashi Y. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol.* 2011;69(2):418-22.
49. Gasperi C, Melms A, Schoser B, Zhang Y, Meltoranta J, Risson V, et al. Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology.* 2014;82(22):1976-83.

50. Jaretzki A, 3rd, Barohn RJ, Ernstoff RM, Kaminski HJ, Keeseey JC, Penn AS, et al. Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology*. 2000;55(1):16-23.
51. Chiu HC, Chen WH, Yeh JH. The six year experience of plasmapheresis in patients with myasthenia gravis. *Ther Apher*. 2000;4(4):291-5.
52. Zeitler H, Ulrich-Merzenich G, Hoffmann L, Kornblum C, Schmidt S, Vetter H, et al. Long-term effects of a multimodal approach including immunoadsorption for the treatment of myasthenic crisis. *Artif Organs*. 2006;30(8):597-605.
53. Ortiz JF, Ghani MR, Morillo Cox A, Tambo W, Bashir F, Wirth M, et al. Stiff-Person Syndrome: A Treatment Update and New Directions. *Cureus*. 2020;12(12):e11995.
54. Geis C, Weishaupt A, Hallermann S, Grunewald B, Wessig C, Wultsch T, et al. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain*. 2010;133(11):3166-80.
55. Czempik PF, Gawryluk J, Wiorek A, Krzystanek E, Krzych LJ. Efficacy and safety of therapeutic plasma exchange in stiff person syndrome. *Open Med (Wars)*. 2021;16(1):526-31.
56. Sprenger KB, Huber K, Kratz W, Henze E. Nomograms for the prediction of patient's plasma volume in plasma exchange therapy from height, weight, and hematocrit. *J Clin Apher*. 1987;3(3):185-90.
57. Fresenius. Gebrauchsanweisung/Packungsbeilage Ligasorb®-Protein-A-Säule für die Immunadsorption.
58. Yoshida M, Tamura Y, Yamada Y, Yamawaki N, Yamashita Y. Immusorba TR and Immusorba PH: basics of design and features of functions. *Ther Apher*. 1998;2(3):185-92.
59. Shibuya N, Sato T, Osame M, Takegami T, Doi S, Kawanami S. Immunoadsorption therapy for myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57(5):578-81.
60. Kiefel. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*. 2010(4. Auflage): S.462-463.
61. Ota K, Shimizu Y, Ichikawa H, Ueda M, Akiyama N, Higuchi C, et al. Neutrophil activation in immunoadsorption. *Ther Apher*. 2000;4(3):229-34.
62. Benny WB, Sutton DM, Oger J, Bril V, McAteer MJ, Rock G. Clinical evaluation of a staphylococcal protein A immunoadsorption system in the treatment of myasthenia gravis patients. *Transfusion*. 1999;39(7):682-7.
63. Yeh JH. Comparison between double-filtration plasmapheresis and immunoadsorption plasmapheresis in the treatment of patients with myasthenia gravis. *J Neurol* 2000 Jul;247(7):510-3.
64. Koessler J, Kobsar A, Kuhn S, Koessler A, Yilmaz P, Weinig E, et al. The effect of immunoadsorption with the Immusorba TR-350 column on coagulation compared to plasma exchange. *Vox Sang*. 2015;108(1):46-51.
65. Fadul JE, Danielson BG, Wikstrom B. Reduction of plasma fibrinogen, immunoglobulin G, and immunoglobulin M concentrations by immunoadsorption therapy with tryptophan and phenylalanine adsorbents. *Artif Organs*. 1996;20(9):986-90.
66. Y H. Selective adsorption of immunoglobulin G and immunoglobulin M from plasma without adsorption of fibrinogen by using thienyl amino acids as ligands. *J Chromatogr Separat Techniq* 2013;4:6.
67. Zollner S, Pablik E, Druml W, Derfler K, Rees A, Biesenbach P. Fibrinogen reduction and bleeding complications in plasma exchange, immunoadsorption and a combination of the two. *Blood Purif*. 2014;38(2):160-6.
68. Ullrich H, Jakob W, Frohlich D, Rothe G, Prasser C, Drobnik W, et al. A new endotoxin adsorber: first clinical application. *Ther Apher*. 2001;5(5):326-34.

69. Nelsestuen GL, Ostrowski BG. Membrane association with multiple calcium ions: vitamin-K-dependent proteins, annexins and pentraxins. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9(4):433-7.
70. Schossee N, Veit G, Gittel J, Viebahn J, Niklaus M, Klingler P, et al. Profile of the single-use, multiple-pass protein A adsorber column in immunoabsorption. *Vox Sang.* 2021.

I Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Antikoagulans Citrat Dextrose Lösung A
ACE-Hemmer	Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmer
AChR	Acetylcholinrezeptor
AChR-AK	Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper
Anti-MusK-AK	Antikörper gegen muskelspezifische Tyrosinkinase
GAD	Glutamat-Dekarboxylase
GE	Gesamteiweiß
IA	Immunadsorption
Ig	Immunglobulin
INR	International Normalized Ratio
LRP4-AK	Antikörper gegen low density receptor-related protein 4
m	männlich
ml/h	Milliliter pro Stunde
ml/min	Milliliter pro Minute
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
SPS	Stiff-Person-Syndrom
SD	Standardabweichung
TPZ	Thromboplastinzeit nach Quick
VWF:Ac	Von Willebrand Faktor Aktivität
VWF:Ag	Von Willebrand Faktor Antigen
w	weiblich

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung extrakorporaler Kreislauf über periphere Zugänge mit Apheresegerät und verschiedenen Apheresaten

Abbildung 2: Vollblut nach Zentrifugation mit Erythrozytensediment unten, dünnem buffy coat in der Mitte und Blutplasma oben

Abbildung 3: Schematischer Aufbau einer Immunadsorption mit Plasmaseparationsgerät und nicht-regenerierbarem Adsorber ohne Sekundärgerät

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Adsorbers Ligasorb®

Abbildung 5: Schematische Darstellung eines IgM-Moleküls

Abbildung 6: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls

Abbildung 7: Ligasorb®-Säule vor der Anwendung

Abbildung 8: Behandlungsprotokoll Immunadsorption

Abbildung 9: Acetylcholinrezeptor-Autoantikörperkonzentration vor und nach IA

Abbildung 10: Reduktion der Plasmaproteine nach IA

Abbildung 11: Reduktion der Gerinnungsfaktoren nach IA

Abbildung 12: Regeneration von PTT, TPZ, INR und Fibrinogen

Abbildung 13: Regeneration der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren

Die Abbildungen **1,2,3,4,5 und 6** wurden mit dem wissenschaftlichen Zeichenprogramm bioRender erstellt.

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationen für einen TPA bei neurologischen Autoimmunerkrankungen

Tabelle 2: Adsorberarten für Immunglobulin-Adsorption von Plasma

Tabelle 3: Serumkonzentrationen verschiedener Immunglobulinklassen

Tabelle 4: Klinische Klassifikation der Myasthenia gravis

Tabelle 5: Patientencharakteristika

Tabelle 6: Behandlungscharakteristika

Tabelle 7: Einfluss der IA auf die zelluläre Blutzusammensetzung

Tabelle 8: Einfluss der IA auf klinisch-chemische Parameter

Tabelle 9: Immunglobulinkonzentrationen und Plasmaproteine vor und nach IA

Tabelle 10: Globaltests der Gerinnung vor und nach IA

Tabelle 11: Antithrombin und D-Dimere vor und nach IA

Tabelle 12: Gerinnungsfaktoren vor und nach IA

Tabelle 13: Zusammenfassung Leistungsprofil und Nachteile der Ligasorb®-Säule

IV Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Vorgesetzten und dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Markus Böck, der es mir ermöglicht hat, die vorliegende Dissertationsarbeit am Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg durchzuführen.

Ich möchte mich außerdem bei meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. Jürgen Kößler herzlich bedanken, der immer ein verständnisvoller und hilfreicher Ansprechpartner war.

Außerdem bedanke ich mich sehr bei Frau Privatdozentin Dr. Anna Kobsar für ihre Hilfe bei der Einarbeitung in die Arbeitsweisen zur Datenauswertung und -darstellung.

Ein weiteres Dankeschön gilt sowohl meinen ärztlichen Kollegen als auch dem Pflegepersonal des Instituts, die mich mit ihrer großen Hilfsbereitschaft bei der Entnahme und Logistik der Blutproben unterstützt haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Patienten, die durch ihre Teilnahme die vorliegende Dissertationsarbeit ermöglicht haben.

Mein persönlicher Dank richtet sich auch an meinen Mann und meine Kinder, die in jeder Phase dieser Arbeit stets Verständnis für den Zeitaufwand gezeigt haben.

Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

Das Thema dieser Arbeit wurde 2021 als Artikel in der Zeitschrift VoxSanguinis veröffentlicht: N. Schossee et al., Profile of the single-use, multiple-pass protein A adsorber column in immunoabsorption, Vox Sang 2021, Accession Number: 34545576 DOI:10.1111/vox.13205 (70).

Die Genehmigung des Verlages zur Verwendung der in der Publikation enthaltenen Tabellen und Abbildungen für diese Dissertationsarbeit liegt schriftlich vor. Die Genehmigung beinhaltet auch eine Druckerlaubnis.

Der Inhalt dieser Dissertation wurde von mir am 16.09.2020 im Rahmen eines Vortrags mit dem Titel „The impact of immunoabsorption with the novel single-use, protein A-based Ligasorb column on plasma composition and coagulation“ bei der 53. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie vorgestellt.